

Interleukin 2: Implikationen für Angst und Depression?

Ein tierexperimenteller Ansatz



Publikationsbasierte Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Psychologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Britta Daniela Karrenbauer
aus Burscheid

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Psychologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am

Erstgutachter: Prof. Dr. Cornelius R. Pawlak

Zweitgutachter: Prof. Dr. Winfried Rief

Tag der mündlichen Prüfung:

„Das Streben nach Wahrheit und Erkenntnis gehört zum Schönsten, dessen der Mensch fähig ist, wenn auch der Stolz auf dieses Streben meist im Munde derjenigen ist, die am wenigsten von solchem Streben erfüllt sind.“

(Albert Einstein 1943)

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	4
1 Theoretischer Hintergrund	6
1.1 Psychoneuroimmunologie	6
1.2 Zytokine	8
1.3 Interleukin-2	10
1.4 Neurochemische Effekte von Interleukin-2	10
1.5 Sickness Behaviour	11
1.6 Angst und Depression: Phänomenologie und biologische Grundlagen.....	13
1.6.1 Angst.....	13
Biologische Grundlagen der Angst.....	14
Zytokine: Interleukin-2 und Angst.....	17
1.6.2 Depression.....	18
Biologische Grundlagen der Depression.....	18
Interleukin-2 im Kontext der Zytokin-Hypothese der Depression	21
2 Motivationsforschung im Tiermodell	23
2.1 Messung angstähnlichen Verhaltens im Tiermodell	24
2.1.1 Das erhöhte Plus-Labyrinth	25
2.1.2 Artikel 3: The elevated plus-maze test:	
Differential psychopharmacology of anxiety-related behaviour	26
2.1.3 Das Offenfeld.....	28
2.1.4 Neurochemie angstähnlichen Verhaltens	30
2.1.5 Effekte von Interleukin-2 auf angstähnliches Verhalten.....	31
2.2 Messung depressivähnlichen Verhaltens im Tiermodell	31
2.2.1 Der Forced Swim Test	32
2.2.2 Sickness Behaviour im Tiermodell.....	34
2.2.3 Interleukin-2: Effekte auf depressivähnliches Verhalten.....	35

3	Durchgeführte Studien	36
3.1	Fragestellung Artikel 1	36
3.1.1	Stereotaxie und Mikroinjektion	38
3.2	Artikel 1: Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats	39
3.3	Fragestellung Artikel 2	40
3.3.1	Mikrodialyse und Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.....	42
	Mikrodialyse	42
	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	43
3.4	Artikel 2: Time-dependent in-vivo effects of Interleukin-2 on neurotransmitters in various cortices: Relationship and effects on depressive-related and anxiety-like behaviour.	45
4	Diskussion	47
4.1	Neurochemische Veränderungen	48
4.2	Übertragbarkeit der Ergebnisse der Mikrodialyse auf die Verhaltenstests	49
4.3	Angst	51
4.3.1	Striatum injiziertes IL-2 und Verhalten im Offenfeld.....	51
4.3.2	Peripher injiziertes IL-2 und Verhalten im erhöhten Plus-Labyrinth	52
	Wird das Verhalten im EPM serotonerg vermittelt?.....	53
	IL-2 wirkt auf furcht- und nicht auf angstähnliches Verhalten.....	55
4.4	Depression.....	56
4.5	Sickness Behaviour	59
4.6	Konfundierende Faktoren.....	61
5	Fazit und Ausblick	65
	Abkürzungsverzeichnis	67
	Literaturverzeichnis	69
	Curriculum Vitae	88
	Veröffentlichungen und Manuskripte	94

Zusammenfassung

Seit Jahren ist bekannt, dass das zentrale Nervensystem und das Immunsystem wechselseitig interagieren und dass diese Interaktionen Auswirkungen auf Motivation, Emotionen und Verhalten haben. Es wird angenommen, dass Zytokine, Botenstoffe des Immunsystems, motiviertes Verhalten beeinflussen und auf diesem Wege an psychischen Erkrankungen wie Angst und Depression beteiligt sein können. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass angstähnliches Verhalten im erhöhten Plus-Labyrinth (elevated plus maze; EPM) bei männlichen Wistar-Ratten (Auszucht) mit der Zytokinexpression in verschiedenen Arealen im Gehirn korreliert war - und dass diese Korrelationen zytokin- (Interleukin-2 mRNA) und arealspezifisch (Striatum, frontaler Kortex) waren (Pawlak et al., 2003; Pawlak et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Interleukin-2 (IL-2; 1; 10; 25 ng) striatal injiziert im Trend biphasisch auf angstähnliches Verhalten im EPM wirkt (Pawlak & Schwarting, 2006a).

In der ersten vorliegenden Studie (**Artikel 1**) wurden die Auswirkungen von striatal injiziertem IL-2 (0; 0,1 and 1 ng) auf angstähnliches Verhalten im Offenfeld (OF) untersucht. Die 45minütigen Testungen erfolgten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, während nur vor der ersten Testung IL-2 appliziert wurde. Bei der akuten Testung zeigte sich für die geringste Dosierung (0,1 ng) IL-2 ein nicht signifikanter Anstieg im angstähnlichen Verhalten. Dieses tendenziell erhöhte angstähnliche Verhalten war auch noch zeitverzögert am zweiten Testtag beobachtbar und signifikant unterschiedlich gegenüber der höheren Dosis und der Kontrollgruppe. Des Weiteren zeigten während der akuten Testung beide mit IL-2 behandelten Gruppen und während der zweiten Testung die Gruppe, die mit der geringeren Dosis behandelt wurde (0,1 ng), signifikant weniger freies Aufrichten (Exploration) verglichen mit der Kontrollgruppe. Gleichzeitig zeigten sich in der Lokomotion keine Unterschiede zwischen den Gruppen, die die angstähnlichen Effekte erklären könnten. In einem zweiten Experiment wurde überprüft, ob die verzögerten Effekte aufgrund eines zeitverzögerten (proaktiven) Wirkungsmechanismus zustande gekommen waren. In diesem Zusammenhang wurden die Tiere 24 und 48 Stunden nach der striatalen Injektion von verschiedenen Dosierungen Interleukin-2 (0; 0,01 und 0,1 ng) im OF getestet. Weder bei der ersten Testung (24 Stunden nach der Injektion) noch bei der zweiten Testung (48 Stunden nach der Injektion) ergaben sich Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität oder dem angstähnlichen Verhalten zwischen den Gruppen. Aus diesen Ergebnissen kann

geschlussfolgert werden, dass einmalig striatal injiziertes IL-2 (in den verwendeten Dosierungen) emotionsähnliches Verhalten für maximal 24 Stunden beeinflussen kann, und dass diese Effekte nur in Zusammenhang mit bestimmten Umgebungsreizen (z.B. Offenfeld) zustande kommen. Von daher kann hier ein proaktiver Wirkungsmechanismus ausgeschlossen werden.

Es wird angenommen, dass IL-2 neben den Auswirkungen auf das Verhalten auch neurochemische (z.B. serotonerge oder dopaminerge) Prozesse im Gehirn beeinflusst, die mit Depression und Angst in Verbindung gebracht werden. In **Artikel 2** wurden die Auswirkungen von peripher injiziertem IL-2 (2,5 µg/kg) auf die serotonerge (5-HT, 5-Hydroxytryptophan) und dopaminerge (DA) Neurotransmission in verschiedenen Kortexarealen (präfrontal, okzipital, temporal) mittels Mikrodialyse an anästhesierten Ratten untersucht (Exp. 1). Des Weiteren wurde in zwei weiteren Experimenten die Wirkung von IL-2 (0; 1; 2,5; 5 µg/kg, intraperitoneal; i.p.) auf depressivähnliches Verhalten im Forced Swim Test (FST) untersucht. Basierend auf dem in Experiment 1 beobachtetem serotonergen Wirkungsprofil wurden die Tiere in Exp. 2a direkt 5 Minuten (akut) und in Exp. 2b zwei Stunden nach der Injektion (zeitverzögert) getestet. Aufgrund der Vorstudien und des bekannten Zusammenhangs zwischen Serotonin und Angst und angstähnlichem Verhalten wurde in einem weiteren Experiment (Exp. 3) der potentielle zeitverzögerte Einfluss (zwei Stunden Postinjektion) von IL-2 (0; 1; 2,5; 5 µg/kg, i.p.) auf angstähnliches Verhalten im EPM getestet.

In der Mikrodialysestudie zeigte sich, dass systemisch injiziertes IL-2 extrazelluläres Serotonin im präfrontalen (-75%), okzipitalen (-70%) und temporalen (-45%) Kortex reduzierte. Die ersten Effekte zeigten sich 40 Minuten nach der Injektion, erreichten nach ca. 120 Minuten ihr Maximum und blieben über die restliche Testdauer von drei Stunden stabil. Im Gegensatz dazu zeigte sich nur eine allgemeine moderate Reduktion von Dopamin im präfrontalen Kortex, jedoch nicht für bestimmte Zeitpunkte. Diese neurochemischen Effekte werden durch die Ergebnisse der Verhaltensexperimente ergänzt. IL-2 führte bei einer um zwei Stunden verzögerten Testung im FST zu dosisabhängigen Effekten auf depressivähnliches Verhalten mit einem signifikanten Anstieg des Immobilitätsverhaltens in der Gruppe, die mit der niedrigsten Dosierung (1 µg/kg) behandelt wurde. Bei der akuten Testung ließen sich keine Effekte beobachten. Obwohl das EPM einer der am meisten verbreitetsten Tests zur Messung angstähnlichen Verhaltens ist (**Artikel 3**) und Studien auf eine serotonerge Beteiligung hinweisen, konnten keine zeitverzögerten Effekte von IL-2 auf angstähnliches Verhalten beobachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Daten die Potenz von IL-2, neurochemische Prozesse zu beeinflussen, verdeutlichen und gleichzeitig belegen, dass dieser Einfluss einem zeitlichen Verlauf folgt. Ferner zeigen sie, dass IL-2 depressivähnliches und bedingt angstähnliches Verhalten beeinflusst und dass diese Effekte möglicherweise mit IL-2-induzierten serotonergen Effekten im Gehirn in Verbindung stehen.

Summary

It has been known for years that the brain interacts with the immune system and vice versa. Furthermore, it is known that this interaction has an impact on motivation, emotion and behaviour. It is suggested that cytokines, messengers of the immune system, can modulate motivated behaviour and are involved in psychiatric conditions such as anxiety and depression. Previous studies (Pawlak et al., 2003; Pawlak et al., 2005) showed that cytokine expression in specific brain tissues is correlated with anxiety-like behaviour (open arm time) in the elevated plus-maze (EPM) in male Wistar rats, and that this relationship is site- (striatum, frontal cortex) and cytokine-specific (Interleukin-2 mRNA). These studies also found evidence for a biphasic impact of a single striatal IL-2 (1; 10; 25 ng) injection on anxiety-like behaviour in the EPM (Pawlak & Schwarting, 2006a).

In the first of the present studies (**article 1**), rats were tested for anxiety-like effects, acutely and 24 h later (drug free), after a single striatal interleukin-2 injection (0; 0.1 and 1 ng) followed by 45 min open field test. During the acute testing we observed a non-significant increase in anxiety-like behaviour in the group treated with the lowest dose (0.1 ng). On the second test day (24h later), animals treated with the lowest dose showed an increase in anxiety-like behaviour (i.e. reduced centre time) compared to the 1 ng and the control group. In addition, suppression of free rearing activity was shown for both IL-2 doses (0.1; 1 ng) compared to control in the acute test. A similar effect, but only for the group treated with 0.1 ng IL-2, was also observed 24 h later. However, measures of locomotion did not differ between groups so that general activity changes cannot account for these differences. Therefore, in a subsequent study we tested for proactive drug mechanisms. Rats were tested in an open field 24 and 48 hours after interleukin-2 (0, 0.01, 0.1 ng) injection. The analyses showed no significant effects for the first (24 h after IL-2 infusion) or for the second exposure (48 h later) in the variables locomotor activity or anxiety-like behaviour. Therefore, it was suggested that emotion-related behaviour could be modulated by striatal IL-2 (in the used dosages) over a period of at least 24 h. However, such IL-2 effects can only be observed, if environmental challenges (e.g. open field) immediately follow infusion. In conclusion, proactive drug effects can be excluded for striatal IL-2 effects on emotion-related behaviour.

IL-2 is assumed to be one factor which may mediate the behavioural and neurochemical (e.g. serotonergic, dopaminergic) features of depression and anxiety in the brain. The second study (**article 2**) investigated the impact of systemically injected IL-2 (2.5 µg/kg, i.p.) on

serotonergic (5-HT, 5-Hydroxytryptophane) and dopaminergic (DA) neurotransmission in various cortical areas by in-vivo microdialysis in anaesthetised rats (Exp.1). Based on the serotonergic time profile obtained from Exp.1, two further experiments were conducted to test for acute (Exp.2a) and delayed (2 hours post injection, Exp.2b) behavioural effects of systemic IL-2 (0; 1; 2.5; 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) on depressive-related behaviour in the Forced Swim Test (FST). Because of the data found in our previous studies and the well known involvement of serotonin in anxiety disorders and anxiety-like behaviour, the effects of systemic IL-2 (0; 1; 2.5; 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were tested in the EPM, 2 hours post injection (Exp.3).

The neurochemical results revealed that systemic IL-2 lastingly reduced extracellular 5-HT levels in the medial prefrontal (-75%), occipital (-70%), and temporal (-45%) cortices. The first effects were observed 40 minutes after injection, reached their maximum after circa 120 minutes and remained stable for rest of the experiment, at least 3 hours after IL-2 treatment. In contrast, dopamine was only moderately reduced in the medial prefrontal cortex. The functional relevance of these specific neurochemical changes was supported by subsequent behavioural evaluation since IL-2 had dose-dependent effects on depressive-related behaviour in the FST after delayed testing, with a significant increase in immobility with the lower dose (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). No such effects were observed acutely after injection. Despite the fact that a) the EPM is one of most frequently used tests to measure anxiety-like behaviour (**article 3**) and b) that anxiety and anxiety-like behaviour are in some way related to serotonin, we found no delayed effects of IL-2 on anxiety-like behaviour in the EPM.

In summary, these data show the potency of IL-2 to kinetically influence neurochemical processes and support the hypothesis that IL-2 dose-dependently affects depressive-related and partly anxiety-like behaviour, which may be related to its serotonergic effects in the brain.

1 Theoretischer Hintergrund

1.1 Psychoneuroimmunologie

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass das zentrale Nervensystem (ZNS) und das Immunsystem bidirektional interagieren. Diese Interaktion spiegelt sich auch im Bereich der psychischen Störungen wieder. Die physiologischen Mechanismen, die psychischen Störungen wie Depression oder Angststörungen zugrunde liegen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Ein großer Teil der bisherigen Forschung basierte ausschließlich auf der Untersuchung der Beteiligung von Neurotransmittern und Hormonen. Es ist bekannt, dass psychische Störungen mit Veränderungen in verschiedenen Neurotransmittersystemen einhergehen, und dass diese mittels Pharmaka und/oder Psychotherapie wieder modifiziert werden können und dies mit einer Verbesserung der psychischen Symptome assoziiert wird (z.B. Briley & Moret, 1993; Charney, 1998; Karlsson et al., 2010; Papakostas et al., 2008). Ein weiterer potentieller physiologischer Mechanismus stellt die Einflussnahme des Immunsystems, u.a. durch Beeinflussung verschiedener Neurotransmittersysteme, auf psychische Krankheiten dar (z.B. Leonard, 2001).

Diese Wechselwirkung zwischen dem Immunsystem und dem ZNS und deren Zusammenhang mit psychologischen Prozessen ist Forschungsthema der Psychoneuroimmunologie (Cohen & Herbert, 1996). Dieser bidirektionale Zusammenhang zeigt sich daran, dass einerseits positive und negative Emotionen Auswirkungen auf körperliche Prozesse haben und auf der anderen Seite sich auch physiologische Vorgänge auf psychische, emotionale Zustände auswirken. Es existieren mittlerweile viele Studien, welche auf eine klinische Bedeutung der Interaktion zwischen Emotionen und immunologischen sowie hormonellen Prozessen hinweisen. So zeigt sich, dass natürliche Stressoren, wie z.B. Prüfungen oder alltägliche negative Vorkommnisse, und künstlich im Labor erzeugte Stressoren, sich auf verschiedene Immunparameter auswirken (Cohen & Herbert, 1996; Segerstrom & Miller, 2004). Relevant für eine veränderte Immunreaktion scheint hier der subjektiv wahrgenommene Stress zu sein (Jabaaij et al., 1993).

Des Weiteren weisen Studien auf den deutlichen Einfluss sozialer Beziehungen auf die Immunaktivität hin. Ein starkes soziales Netzwerk und wahrgenommene Unterstützung sind z.B. korreliert mit allgemein besseren Immunfunktionen, einer längeren Lebenserwartung bei schwer kranken Menschen, einer geringeren pathogenen Reaktion auf einen Stressor und mit einer geringeren Anfälligkeit für infektiöse Krankheiten wie z.B. Erkältungen (Cohen et al.,

1997; Graham et al., 2007). Auf der anderen Seite sind selbstberichtete Einsamkeit, Scheidung und fehlende soziale Unterstützung assoziiert mit einer geringeren Immunaktivität (Cohen & Herbert, 1996; Graham et al., 2007; Kiecolt-Glaser et al., 2002; Maier & Watkins, 1998).

Es konnte ein Zusammenhang zwischen verschiedenen psychologischen Faktoren (z.B. negative Emotionen, Trauer, Copingstrategien etc.) und durch das Immunsystem vermittelten Erkrankungen - wie infektiösen Krankheiten (z.B. Infektion der Atemwege, Lippenherpes), AIDS, Autoimmunerkrankungen und Krebs - hergestellt werden (Cohen & Herbert, 1996; Lutgendorf et al., 2007; Mitsonis et al., 2009; Sloan et al., 2007). Es zeigte sich, dass negative Emotionen sich ungünstig auf den Krankheitsverlauf und die Wundheilung auswirken (Kiecolt-Glaser et al., 2005; Kiecolt-Glaser et al., 2002). Ferner ergaben Untersuchungen, dass sogar leichte emotionale Veränderungen, wie die Stimmung bei gesunden Probanden, verschiedene immunologische Parameter beeinflussen wie z.B. die Aktivität der natürlichen Killerzellen oder die Proliferation von Immunzellen als Reaktion auf ein Antigen (Cohen & Herbert, 1996; Locke et al., 1984). Studien der letzten Jahre demonstrierten, dass Patienten mit Depression und Angststörungen Veränderungen in verschiedenen Immunparametern, speziell den Botenstoffen aus der Gruppe der Zytokine, aufweisen (z.B. Anisman et al., 1999; Brietzke et al., 2009; Kim et al., 2007a; Rapaport & Stein, 1994a; Seidel et al., 1995; Shelton et al., 2010; Song et al., 2007).

Ein möglicher Mechanismus auf welchem Wege psychologische Faktoren das Immunsystem und somit auch das Risiko von Krankheiten und deren Verlauf beeinflussen könnten, ist eine Dysregulation entzündungsfördernder Immunbotenstoffe, sogenannter proinflammatorischer Zytokine. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine kann direkt oder auch indirekt durch negative Emotionen und belastende Erfahrungen stimuliert werden. Diese Dysregulation kann zu einer Über- oder Unterproduktion verschiedener Zytokine führen und sich somit negativ auf die körpereigene Abwehr auswirken (Kiecolt-Glaser et al., 2002).

Auf der anderen Seite können auch physiologische Prozesse einen Einfluss auf psychische, hier emotionale, Zustände ausüben: Nach der therapeutischen Verabreichung von Zytokinen, z.B. im Rahmen einer Krebstherapie, wiesen Patienten depressive Symptome auf (Capuron et al., 2002b; Capuron et al., 2001; Walker et al., 1997). Ferner konnte die Verabreichung von Zytokinen während einer Behandlung von Hepatitis C mit erhöhten Angstsymptomen in Zusammenhang gebracht werden (Capuron et al., 2002c). In tierexperimentellen Studien führte die Gabe von Zytokinen zu Veränderungen in

Verhaltensweisen, von denen angenommen wird, dass sie an psychischen Störungen wie z.B. Angststörungen und Depression beteiligt sind (Anisman et al., 2002; Anisman & Matheson, 2005; Anisman et al., 2005; Dunn et al., 2005b; Konsman et al., 2002; Raison et al., 2006).

Ein heute in der psychoneuroimmunologischen Forschung eher vernachlässigtes Zytokin ist das Interleukin-2 (IL-2). IL-2 wurde in den neunziger Jahren intensiv auf der molekularen Ebene und in Hinsicht seiner immunologischen Funktionen erforscht (Hanisch, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde es v.a. aufgrund seiner psychologischen Verhaltenseffekte wieder aufgegriffen. Peripheres IL-2 und andere Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei Autoimmunkrankheiten (Efthimiou & Blanco, 2009), Krebs (Waldmann, 2006) oder bei der Transplantation von Organen (Pham et al., 2009). Zusätzlich zeigte sich, dass IL-2, neben anderen Zytokinen, auch im zentralen Nervensystem vorkommt und dort neuromodulatorische Eigenschaften aufweist (Hanisch & Quirion, 1996; Vitkovic et al., 2000a). Ferner konnte IL-2 in einigen tierexperimentellen Studien mit emotionsähnlichem Verhalten in Verbindung gebracht werden (Anisman et al., 2002; Zalcman et al., 1998). Des Weiteren konnte Pawlak et al. (2003, 2006) im Tiermodell einen Zusammenhang zwischen angstähnlichem Verhalten und IL-2 mRNA im Striatum und dem präfrontalen Kortex demonstrieren. Mit den Auswirkungen von Interleukin-2 auf angst- und depressivähnliches Verhalten sowie auf neurochemische Parameter bei der Ratte befasst sich die vorliegende Arbeit.

1.2 Zytokine

Zum Immunsystem zählen eine Vielzahl an Organen, Zellverbänden und löslichen Proteinen, die eingedrungene Erreger (z. B. Bakterien, Viren) schnell erkennen und unschädlich machen (Martin & Resch, 2009; Murphy et al., 2009). Die Immunabwehr erfordert sehr viele unterschiedliche Zellen und Botenstoffe, die zwischen den Zellen engmaschig kommunizieren. Diese Kommunikation und Koordination der verschiedenen Systeme erfolgt zu einem großen Teil durch Zytokine, weshalb sie auch als „Botenstoffe des Immunsystems“ bezeichnet werden. Zu ihrem Wirkungsspektrum gehören unter anderem die Aktivierung verschiedener Zelltypen, aber auch deren Wachstum, Ausdifferenzierung und Zellteilung. Zytokine können Immun- oder Entzündungsreaktionen auslösen, verstärken oder hemmen (Kirchner et al., 1994; Murphy et al., 2009). Zytokine agieren in einer Art Netzwerk und werden auch in Abhängigkeit voneinander, hauptsächlich von Lymphozyten oder Monozyten, produziert, d.h. verschiedene Zytokine werden als Reaktion auf einen speziellen Stimulus

ausgeschüttet, wobei ihre Wirkung antagonistisch, additiv oder synergistisch sein kann. Hierbei nutzen sie häufig parakrine, autokrine und - wahrscheinlich seltener - endokrine Kommunikationswege. Zytokine können in proinflammatorische, eine Entzündung auslösende [z.B. Interferone (z.B. IFN- α , - β , - γ), Interleukine (z.B. IL-1 α , -1 β , IL-6) oder Tumor- Nekrose-Faktor- α (TNF- α)] und antiinflammatorische, eine Entzündung hemmende (z.B. IL-4, IL10, Transformierender Wachstumsfaktor- β ; TGF- β) Zytokine unterteilt werden.

Zytokine sind nicht nur auf die Peripherie beschränkt, sondern sie werden auch in geringen Mengen im ZNS von verschiedenen Zelltypen produziert, wie z.B. Gliazellen oder Neuronen (Hanisch, 2001; Vitkovic et al., 2000a). Ferner können sie mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) kommunizieren, indem sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden (z.B. Dantzer et al., 2008). Von Zytokinen wird angenommen, dass sie im Gehirn neuromodulatorische Eigenschaften besitzen (Vitekovic et al., 2000a). Ähnlich wie Neurotransmitter und Hormone rufen Zytokine ihre biologischen Reaktion via Aktivierung spezifischer Rezeptoren auf der Zellmembran (wie bei Neurotransmittern) oder durch Kombination mit intrazellulären Rezeptoren, wie die meisten Hormone, hervor (Leonard & Myint, 2009). Zytokine können somit direkt auf das ZNS und verschiedene Neurotransmittersysteme wirken, indem sie spezifische Zytokinrezeptoren auf Neuronen oder Gliazellen aktivieren. Zusätzlich zu diesen direkten Effekten wirken Zytokine auch auf die Funktionen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (Besedovsky & del Rey, 1996). Zytokine werden nur zum aktuellen Bedarf produziert, weswegen die konstitutive Konzentration von Zytokinen im Gehirn (auch in der Peripherie) oft sehr niedrig ist, so dass diese z.T. kaum messbar sind. Nach einer Stimulation (z.B. mit einem Antigen) kann ihr Spiegel allerdings innerhalb von sehr kurzer Zeit auf über das Tausendfache des Ausgangswertes ansteigen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Zytokine im gesunden Gehirn exprimiert werden und durch ihre neuromodulatorische Wirkungsweise das Erleben und Verhalten beeinflussen können (Vitekovic et al., 2000a). Speziell das Interleukin-2 (IL-2) ist seit langem nicht nur aus der Immunologie, sondern auch im Kontext der Modulation von Verhalten bekannt und wird im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen und in den folgenden Kapitel weiter erläutert.

1.3 Interleukin-2

IL-2 wurde 1976 als ein Wachstumsfaktor für Knochenmark T-Lymphozyten entdeckt und gehörte zu den ersten Zytokinen, die auf molekularer Ebene erforscht wurden. IL-2 ist ein monomeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ~ 15,5 kDa. Es wird von durch die Bindung eines Antigens aktivierten T-Helferzellen produziert, in kleineren Mengen auch von B-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Es ist an der Regulation der Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten beteiligt und beeinflusst die Aktivität der Natürlichen Killerzellen (NK). Somit wird IL-2 als essenzielles Zytokin bei der adaptiven Immunantwort angesehen. Durch seinen Einfluss auf die NK-Zellen sowie das Wachstum und die Proliferation von T-Lymphozyten beeinflusst IL-2 indirekt auch die Produktion fast aller Zytokine, die von diesen Zellen produziert werden. Dadurch spielt IL-2 eine entscheidende Rolle in der Regulation von Immunreaktionen und deren Homöostase (Gaffen & Liu, 2004; Hanisch, 2001; Martin & Resch, 2009; Murphy et al., 2009).

IL-2 bindet vor allem an hochaffine Rezeptoren, die von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden. Der IL-2-Rezeptor (IL-2R) ist ein komplexer, aus drei verschiedenen Untereinheiten ($\alpha/\beta/\gamma$) bestehender Rezeptor. Die IL-2R α -Untereinheit erhöht die Affinität des Rezeptors für IL-2 und ist spezifisch für IL-2, obwohl eine Signalweiterleitung nur an die β - und γ -Untereinheiten gekoppelt ist (Gaffen & Liu, 2004). IL-2 kommt nicht nur im peripheren, sondern auch im zentralen Nervensystem vor und wirkt hier womöglich als effektiver Neuromodulator (Hanisch & Quirion, 1996). Rezeptoren für IL-2 sind hauptsächlich im frontalen Kortex¹, Hypothalamus, Hippocampus, Septum, Striatum, Cerebellum und Locus coeruleus zu finden (Araujo & Cotman, 1995; Araujo & Lapchak, 1994; Hanisch, 2001; Hanisch & Quirion, 1996; Hwang et al., 2006; Lapchak et al., 1991).

1.4 Neurochemische Effekte von Interleukin-2

IL-2 wurde im zentralen Nervensystem nachgewiesen, es wird daher vermutet, dass es dort als ein potenter Neuromodulator unterschiedlicher Funktionen agiert (Hanisch, 2001). IL-2 ist an einer enormen Vielfalt von Prozessen beteiligt; hier wird von einer vollständigen

¹ Anatomische Begriffe zitiert nach Trepel, 2004.

Aufzählung abgesehen, da dies nicht im Fokus dieser Arbeit steht, und für Interessierte auf Gaffen und Liu (2004) verwiesen.

Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass auch IL-2, neben den typischen proinflammatorischen Zytokinen IL-1, IL-6 und TNF- α , einen Einfluss auf Neurotransmitter hat, welche an Verhaltensweisen beteiligt sind, die mit menschlichen Emotionen assoziiert werden (Dunn et al., 2005b; Hanisch, 2001). Die systemische Verabreichung von IL-2 führte in Tierexperimenten zu Konzentrationsveränderungen von Noradrenalin (NE) im Hippocampus, der Amygdala, dem präfrontalen Kortex (Lacosta et al., 2000) und dem Hypothalamus (Zalcman et al., 1994). In-vitro-Experimente zeigten IL-2-induzierte biphasische Ausschüttungen von Dopamin (DA) im Striatum und im Mittelhirn (Lapchak, 1992; Petitto et al., 1997) sowie Veränderungen in dessen Abbaurate im präfrontalen Kortex (Zalcman et al., 1994). Die zentrale Verabreichung von IL-2 (intracerebroventrikulär i.c.v.) führte zu einem Anstieg von Homovanilinsäure (HVA), einem Metaboliten von DA (Connor et al., 1998).

Studien am lebenden Organismus konnten dies bestätigen. IL-2 führte auch hier zu Veränderungen der Konzentration von DA sowie von dessen Abbaurate im Nucleus accumbens (Anisman et al., 1996; Song et al., 1999), Neostriatum und Substantia nigra (Lacosta et al., 2000). Des Weiteren führte eine wiederholte systemische Verabreichung von IL-2 zu einer Erhöhung des 5-HT-Levels im Hippocampus und zu einer Reduktion im präfrontalen Kortex (Lacosta et al., 2000). Auch eine zentrale cerebroventrikuläre Verabreichung resultierte in einem erhöhten hippocampalen 5-HT-Level und einer Erhöhung des 5-HT-Metaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure (5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HIAA; (Pauli et al., 1998).

1.5 Sickness Behaviour

Ein oft im Zusammenhang mit Zytokinen diskutiertes motivationales Konzept ist das „Sickness Behaviour“². Dieser Begriff bezeichnet Verhaltensweisen, die ein Organismus während einer bakteriellen oder viralen Infektion zeigt. Auf der einen Seite können typische physiologische Symptome wie Fieber und entzündliche Prozesse, auch charakteristische Verhaltensänderungen (wie z.B. Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, vermehrter Schlaf, verminderte lokomotorische Aktivität, Übelkeit), auftreten. Auf der anderen Seite werden,

² Der Begriff *Sickness Behaviour* hat sich im englischen sowie im deutschen Sprachgebrauch durchgesetzt und wird von daher im Folgenden zur Beschreibung dieses Konstruktes verwendet (Dantzer, 1996).

neben diesen physiologischen Veränderungen, oft psychische Symptome wie Lustlosigkeit, Trägheit, Depressivität und Konzentrationsschwäche beschrieben, die lange als unwichtige Begleiterscheinungen angesehen wurden. Heute werden sie als ein wesentlicher Bestandteil einer hoch entwickelten, motivationalen Strategie angesehen, durch die ein Organismus einen Infekt effektiv bekämpfen kann (Hart, 1988; Johnson, 2002). All diese Symptome repräsentieren eine adaptive Reorganisation der Prioritäten, die evolutionär gesehen während einer Infektion überlebenswichtig für den erkrankten Organismus sein kann (Dantzer et al., 2001). Ähnliche Verhaltensmuster wie Lethargie, verringertes Putzverhalten, Anhedonie und Anorexie sind auch bei Tieren beobachtbar (Hart, 1988). Sickness Behaviour umfasst die Interaktion verschiedener Neurotransmitter in diversen Arealen des Gehirns, wie z.B. dem Hirnstamm, dem Hypothalamus und der Amygdala (Dantzer, 2001). Proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 und IL-6 werden mittlerweile als Mediatoren bzw. Auslöser des Sickness Behaviour verstanden (Konsman et al., 2002).

Die Ähnlichkeit der Symptome des Sickness Behaviour mit denen einer depressiven Erkrankung, sowie die Entdeckung verschiedener immunologischer Veränderungen im Zusammenhang mit depressiven Erkrankungen führten zur Formulierung der „Zytokin-Hypothese“ der Depression (Maes et al., 1995a; Maes et al., 1995b; Smith, 1991).

Diese besagt sinngemäß, dass Depression eine extreme Form des Sickness Behaviour darstellen könnte (Dantzer et al., 2007; Dantzer et al., 2008; siehe auch S. 21). Studien, die zeigten, dass die Gabe proinflammatorischer Zytokine zu depressiven Symptomen führt, bestätigten diese These (Capuron et al., 2000). Dieser Zusammenhang führte in der Vergangenheit oft dazu, dass Sickness Behavior als eine Art Depressionsmodell betrachtet wurde (Dantzer et al., 2007). Eine mögliche Erklärung, wie Zytokine depressive Symptome beeinflussen bzw. hervorrufen können, liefert ihr Einfluss auf das serotonerge System bzw. auf die Synthese von Serotonin (Miura et al., 2008; Myint et al., 2009). Ein weiterer Hinweis für diese These sind Studien, die zeigten, dass zytokin-induzierte depressive Symptome effektiv mit serotonerg wirkenden Antidepressiva (selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, SSRIs, selective serotonin reuptake inhibitors) erfolgreich behandelt wurden (z.B. Capuron et al., 2002b).

1.6 Angst und Depression: Phänomenologie und biologische Grundlagen

Angststörungen und depressive Störungen zählen zu den häufigsten psychischen Erkrankungen der westlichen Welt (Reinecker, 2003; Sansone & Sansone, 2010; Wittchen & Hoyer, 2006; Wittchen & Jacobi, 2005). Auffällig ist außerdem die sehr hohe Komorbidität zwischen diesen beiden Erkrankungen (Baldwin et al., 2002). 58% der Patienten mit Depression (Major Depression; MD) weisen komorbid eine Angststörung auf, während 68% der Patienten mit der Diagnose Generalisierte Angststörung auch an einer unipolaren depressiven Störung leiden (Pollack, 2005b).

Seit mindestens zwei Dekaden ist bekannt, dass Zytokine im Gehirn vorkommen und an verschiedenen emotionalen und motivationalen Prozessen (Anisman et al., 2005; Hanisch, 2001; Kiecolt-Glaser et al., 2002) beteiligt sind, die mit psychischen Erkrankungen assoziiert werden. Studien konnten Unterschiede im Zytokingehalt zwischen gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit affektiven und motivationalen Störungen wie z.B. Major Depression (Kim et al., 2007a; Myint et al., 2005; Seidel et al., 1995; Tsao et al., 2006), Bipolarer Störung (Kim et al., 2007b), Dysthymie (Anisman et al., 1999), Panikstörung (Rapaport & Stein, 1994a), Posttraumatische Belastungsstörung (Song et al., 2007), Manie und Schizophrenie (Maes et al., 1995a) aufdecken.

Der folgende Abschnitt wird allgemeine Informationen über depressive und Angststörungen liefern und die mögliche Beteiligung von Zytokinen an diesen Erkrankungen diskutieren. Es wird im Folgenden hauptsächlich auf die Zusammenhänge zwischen IL-2 und Depression und Angststörungen eingegangen.

1.6.1 Angst

Die Emotion Angst stellt ein komplexes behaviorales Phänomen dar. Bei der Definition von Angst wird oft zwischen Angst und Furcht unterschieden (Depue & Lenzenweger, 2005; Gray & McNaughton, 2000; McNaughton & Corr, 2004; McNaughton & Gray, 2000). Unter Angst wird hier oft ein allgemeines, ungerichtetes und unangenehmes Gefühl verstanden, welches durch diffuse, generalisierte Reize, also eher durch die Wahrnehmung einer potentiellen Bedrohung, ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu ist Furcht ein gegenstandsbezogenes Gefühl, welches sich auf einen identifizierbaren Reiz, z.B. auf eine bestimmte Situation oder ein konkretes Objekt, bezieht. Während Furcht sich auf eine realistische, objektive Gefahr

beziehe, sei Angst nicht an eine objektiv nachweisbare Bedrohung gekoppelt und eher in die Zukunft gerichtet (Depue & Lenzenweger, 2005; Pawlak & Weyers, 2006b).

Angsterkrankungen umfassen eine Vielzahl verschiedener Symptome, Störungsbilder und Diagnosen. Das DSM-IV (Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen (APA, 1994)) beschreibt zehn verschiedene Syndrome: Panik (mit und ohne Agoraphobie), Agoraphobie, Sozialphobie, spezifische Phobien, Zwangsstörung, Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS), Akutes Stress Syndrom, Generalisierte Angststörung (GAS), Angststörung aufgrund des medizinischen Allgemeinzustandes und substanzinduzierte Angststörung. Die biologischen Grundlagen dieser Störungen sind noch weitgehend ungeklärt, aber viele Modelle haben versucht, Angst auf eine neuronale Ebene, also mit verschiedenen Neurotransmittersystemen und Hirnregionen in Zusammenhang zu bringen (Clement & Chapouthier, 1998).

Biologische Grundlagen der Angst

Neurochemie der Angst

An der Pathogenese von Angststörungen und der Steuerung von Angst sind viele Neurotransmittersysteme beteiligt³, wobei der am häufigsten diskutierte Botenstoff GABA (γ -Aminobuttersäure) ist, u.a. aufgrund der beobachteten anxiolytischen Wirkung der Benzodiazepine (Clement & Chapouthier, 1998; Millan, 2003). Ein weiterer wichtiger Botenstoff ist 5-HT (Graeff, 2002; Handley & McBlane, 1993; Handley et al., 1993). Obwohl ein Ungleichgewicht im zentralen 5-HT-System früher nur im Zusammenhang mit depressiven Störungen diskutiert wurde, ist mittlerweile bekannt, dass auch Angststörungen mit einem Ungleichgewicht im serotonergen System einhergehen können und dass Angsterleben auch bei gesunden Probanden mit 5-HT in Zusammenhang steht (Guimaraes et al., 2010).

Momentan werden eine Reihe von Angststörungen mit Hilfe von antidepressiv wirkenden Substanzen (trizyklische Antidepressiva oder SSRIs) effektiv behandelt, z.B. Panikstörung (Schneier et al., 1990; Westenberg, 1996), Generalisierte Angststörung (Pollack et al., 2001; Schatzberg, 2000), Soziale Phobie (Schatzberg, 2000) und Zwangsstörung (Isaac,

³ Diese Arbeit konzentriert sich primär (u.a. aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studien) auf die Neurotransmitter Serotonin und Dopamin, obwohl auch verschiedene andere Neurotransmitter an Angst und angstassoziierten Prozessen beteiligt sind.

1999; Schatzberg, 2000). Des Weiteren zeigte sich, dass eine Depletion des 5-HT-Vorläufermoleküls Tryptophan bei Panikpatienten im Vergleich zu Gesunden eine Panikattacke hervorrief (Schruers et al., 2000; van Megen et al., 1997). Dieser Effekt konnte durch die Verabreichung von L-5-Hydroxytryptophan, einem Zwischenprodukt bei der Serotoninsynthese, wieder aufgehoben werden (Schruers et al., 2002a). Ferner führte eine Vorbehandlung mit dem SSRI Fluvoxamin zu einer Reduktion von Panikgefühlen als Folge eines durch Cholecystokin-4 (CCK₄; ein Peptidhormon, das zu Angst- und Panikgefühlen führen kann) ausgelösten Panik-„Challenge“-Tests (van Megen et al., 1997).

Ein weiterer Neurotransmitter, der im Zusammenhang mit Angst, Angststörungen und angstähnlichem Verhalten im Tiermodell eine Rolle spielt, ist Dopamin (DA) (Millan, 2003). Im Vergleich zu anderen Neurotransmittern wurde DA in diesem Feld wenig untersucht. Der Zusammenhang zwischen DA und Angststörungen ist kompliziert; Forschungsergebnisse weisen ein sehr heterogenes Bild auf: Es existieren Hinweise auf eine Verbindung zwischen einem geringeren DA-Gehalt bzw. einer verringerten dopaminergen Aktivität und erhöhten Angstsymptomen (Stein, 2008; Stein et al., 2002). Zum Beispiel wiesen Panikpatienten ein niedrigeres Level des dopaminergen Metaboliten HVA auf (Johnson et al., 1994), und es zeigte sich, dass Patienten, die an der primär dopaminerg gesteuerten Neurodegeneration Morbus Parkinson erkrankt waren, retrospektiv und aktuell mehr diagnostizierte Angststörungen aufwiesen (Menza et al., 1993). Auch bei gesunden Probanden wurde ein Zusammenhang zwischen niedriger präsynaptischer dopaminerg Aktivität und ängstlichen Persönlichkeitseigenschaften festgestellt (Laakso et al., 2003).

Auf der anderen Seite liefern verschiedene Studien Anhaltspunkte dafür, dass Angstsymptome mit einer erhöhten dopaminergen Aktivierung einhergehen. Zum Beispiel wiesen Panikpatienten im Vergleich zu depressiven Patienten eine dopaminerge Überfunktion auf (Pitchot et al., 1992). Ferner wurden bei Patienten mit Sozialer Phobie geringere Bindungseigenschaften von Dopaminrezeptoren beobachtet, was auch als ein Hinweis auf eine dopaminerge Überfunktion betrachtet wird (Schneier et al., 2000).

Neuroanatomie der Angst

Das „Basic Fear System“ (Angstsystem) verläuft vom zentralen und lateralen Bereichen der Amygdala über den anterioren und medialen Hypothalamus durch das Periaquäduktale Grau (Zentrales Höhlengrau) zum unteren Hirnstamm und dem Rückenmark, von wo aus die physiologischen Symptome der Angst gesteuert werden. Außerdem interagiert es sehr eng mit dem Schmerzsystem (Überblick bei Depue & Lenzenweger, 2005; Graeff, 1994; LeDoux,

1995; Panksepp, 1998). Studien zeigen zusätzlich eine Beteiligung des Hippocampus und des Septum an Angstprozessen auf (Degroot & Treit, 2004; Hasler et al., 2007; McNaughton & Gray, 2000). Darüber hinaus weist das Angstsystem Verbindungen zu fast allen Kortextbereichen auf (Millan, 2003). Einige Studien liefern auch Hinweise auf eine Beteiligung der Basalganglien und v.a. des Striatum an der Verarbeitung angstbesetzter Stimuli (Jensen et al., 2003; Lorberbaum et al., 2004; van den Heuvel et al., 2005).

Eine der einflussreichsten psychologischen Theorien stammt aus dem Bereich der Persönlichkeitsforschung. Jeffrey A. Gray (1982) entwickelte ein Modell mit drei unabhängig von einander agierenden Systemen, die von unterschiedlichen Reizen aktiviert werden, unterschiedliche Verhaltensmuster steuern und neuroanatomisch unterschieden werden können (Gray & McNaughton, 2000). Das Verhaltenshemmsystem (Behavioral Inhibition System; BIS) wird durch Bestrafung und Frustration z.B. durch Entzug einer Belohnung aktiviert und führt zu passiver Vermeidung und Angst. Ein weitverzweigtes Netzwerk, dessen Zentrum das septo-hippocampale System bildet (Hippocampus und Septumkerne), wurde als die neuroanatomische Grundlage angenommen. Ergänzt wird dieses System durch Elemente des limbischen Systems (v.a. dem zingulären Kortex) sowie, durch Verbindungen zum präfrontalen Kortex und aufsteigende monoaminerge Fasern.

Das Verhaltensaktivierungssystem (Behavioral Approach System; BAS) hingegen reagiert auf Belohnung und dem Entgehen einer Bestrafung. Dieses System steuert Annäherungsverhalten und aktive Vermeidung und bildet die Grundlage für Impulsivität. Die neurale Basis besteht aus Teilen der Basalganglien (v.a. das Striatum), den zu den Basalganglien aufsteigenden dopaminergen Fasern (die nigrostriatale und mesolimbische Bahn) sowie Verbindungen zum präfrontalen Kortex.

Das dritte System bezeichnete Gray als das Fight-Flight-System (FFS, Kampf-Flucht-System) oder auch Fight-Flight-Freezing-System (FFFS). Dieses System reagiert auf Reize, die eine direkte existentielle Bedrohung darstellen, primär unconditionierte Reize für Bestrafung und Hinweise für das Fehlen von Belohnung. Wird dieses System aktiviert, so führt dies bei einer geringen Distanz zu der jeweiligen Bedrohung zu einer Kampfhandlung oder Erstarrung, bei einer größeren Distanz zu einer Fluchtreaktion. Diese Aktivierung zeigt sich in einem Erleben von Panik. Gray sah das Periaquäduktale Grau und mediale Hypothalamuskernkerne als die neuroanatomische Grundlage an.

In der überarbeiteten Version (Gray & McNaughton, 2000; McNaughton & Corr, 2004) entwickelten die Autoren ein gemeinsames System, in dem der Annäherungs-Vermeidungs-Konflikt als wichtigstes Kriterium für eine potenzielle Bedrohung angesehen wird. In dieser

revidierten Fassung existieren zwei komplementäre Verhaltensaktivierungssysteme - das BAS und das FFFS, während das BIS grundlegend verändert wurde und nun als Detektor für Annäherungs-Vermeidungs-Konflikte (z.B. zwischen BAS und FFFS) fungiere. Das BAS reagiere auf sämtliche appetitiven Stimuli, konditioniert und unkonditioniert, und eine Aktivierung dieses Systems führe zu einer Annäherung an den jeweiligen Reiz. Umgekehrt reagiere das FFFS auf alle Formen aversiver Stimulation, wobei eine Aktivierung eine behaviorale Vermeidung des aktivierenden Reizes zur Folge habe, welche sich im Erleben von Panik äußere. Das nachfolgende Verhalten sei von der Nähe des bedrohlichen Reizes abhängig; so löse ein proximaler Reiz Fluchtverhalten aus, während ein distaler Reiz Verteidigungsverhalten zur Folge habe. Das BIS werde nun nicht mehr von aversiven Reizen aktiviert, sondern habe die Aufgabe Zielkonflikte zwischen BAS und FFFS aufzudecken und zu lösen. Laut dieser Theorie könnten sehr neue Reize beide Systeme simultan aktivieren, welches zu einem Konflikt zwischen Annäherung und Vermeidung führe. Eine Aktivierung des BIS Systems gehe mit einem Zustand der Angst einher und führe zu einer Hemmung des konfligierenden Verhaltens. Gleichzeitig käme es zu einer Aufmerksamkeitsverschiebung auf die Umgebung, um optimal nach weiteren Hinweisreizen für Gefahren zu suchen (Corr, 2010).

Zytokine: Interleukin-2 und Angst

Zusammenhänge zwischen Zytokinen, speziell IL-2, und Angst und Angststörungen wurden bis heute wenig erforscht und zusätzlich weisen bisherige Ergebnisse ein heterogenes Profil auf.

Patienten, bei denen eine Angststörung diagnostiziert wurde, wiesen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine erhöhte IL-2 Produktion im Blut auf (Koh & Lee, 1998; Koh & Lee, 2004). Bei Panikpatienten hingegen wurde ein verringertes Serumlevel an IL-2 festgestellt (Rapaport & Stein, 1994a), während sich bei Patienten mit einer Sozialen Phobie keine Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe zeigte (Rapaport & Stein, 1994b). Des Weiteren führte die wiederholte Verabreichung einer Kombination von IL-2 und INF- α -2b im Rahmen einer Immunchemotherapie bei Krebspatienten zu erhöhten Angstsymptomen im Vergleich zu Patienten mit ausschließlicher Chemotherapie (Capuron et al., 2003; Capuron et al., 2000). Ferner weisen Studien darauf hin, dass der potentielle zugrundeliegende Mechanismus mit 5-HT in Zusammenhang gebracht werden kann: SSRIs reduzierten eine

erhöhte Angstsymptomatik im Verlauf einer IFN- α -Immuntherapie (Capuron et al., 2002c; Musselman et al., 2001).

1.6.2 Depression

Depressive Störungen zählen zusammen mit den bipolaren Störungen und zwei ätiologieorientierten Störungen (Affektive Störung aufgrund eines medizinischen Krankheitsfaktors und substanzinduzierte Affektive Störung) zu den Affektiven Störungen (DSM-IV; APA, 1994). Die depressiven Störungen werden noch weiter in die Major Depression, Dysthymie und nicht näher bezeichnete Depression mit diversen Unterformen (Melancholie etc.) usw. unterteilt und zählen zu den häufigsten psychischen Erkrankung in der westlichen Welt (z.B. Reinecker, 2003; Wittchen & Jacobi, 2005). Zu den Hauptsymptomen zählen eine niedergeschlagene Stimmung und Interessenverlust sowie als weitere Symptome Gefühle der Wertlosigkeit und Schuldgefühle, Gewichtsveränderungen, Veränderungen im Schlafverhalten, psychomotorische Veränderungen, Motivationsarmut und Energieverlust, Anhedonie sowie Konzentrationsschwierigkeiten (DSM-IV; APA, 1994). Viele dieser Symptome treten auch im Zusammenhang mit einer physiologischen Erkrankung auf (siehe S. 11f.), weswegen eine Verbindung zwischen dem Immunsystem und emotionalem und motivationalen Verhalten angenommen wird (Dantzer & Kelley, 2007; Hayley et al., 2005; Leonard & Myint, 2009; Wichers & Maes, 2002). Depressive Störungen werden mit einer Reihe von hormonellen, neurochemischen und neuroanatomischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht. Ein umfassender Überblick ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, weshalb im Folgenden nur einige neurochemische und neuroanatomische Veränderungen betrachtet werden sollen, die für die eigenen Befunde von Relevanz sind. Hormonelle und andere biologische Veränderungen werden nicht behandelt. Einen grundlegenden Überblick hierzu liefern z.B. die Arbeiten von Mössner et al. (2007) und Southwick et al. (2005).

Biologische Grundlagen der Depression

Neurochemie der Depression

Depression ist assoziiert mit einer Reihe von Veränderungen in verschiedenen Neurotransmittersystemen, z.B. DA (Dunlop & Nemeroff, 2007), NE (Delgado & Moreno,

2000) und Glutamat (Müller & Schwarz, 2007)⁴. Doch der am häufigsten diskutierte Neurotransmitter im Zusammenhang mit depressiven Störungen ist 5-HT.

Das serotonerge System ist ein evolutionär altes und über das gesamte Gehirn verbreitetes Neurotransmittersystem. Es entspringt den Raphekernen im Mittelhirn und projiziert in fast alle Regionen des ZNS, hauptsächlich in den Kortex, das limbische System, die Basalganglien und den Hypothalamus (Trepel, 2004). Diese Vielfalt an Innervationen erklärt zum Teil auch die Beteiligung dieses Systems an einer enormen Vielzahl von Verhaltensweisen wie Motorik, Lernen, Schlaf, zirkadiane Rhythmik, Stimmung, Nahrungsaufnahme und sexuelle Aktivität (Wichers & Maes, 2002).

Verschiedene neurochemische Veränderungen konnten im Zusammenhang mit depressiven Störungen beobachtet werden: Zum Beispiel zeigte sich ein reduzierter Spiegel von 5-HT und 5-HIAA in der Cerebrospinalflüssigkeit bei unbehandelten depressiven Patienten (Owens & Nemeroff, 1994) und auch in post mortem Untersuchungen bei depressiven und suizidalen Patienten (Owens & Nemeroff, 1994). Ebenso beobachtet wurde eine erhöhte Anzahl von 5-HT-Transportern (Mechanismen zur Wiederaufnahme von 5-HT in die präsynaptische Zelle) bei depressiven Patienten (Tsao et al., 2006). Patienten mit depressiven Störungen wiesen ein signifikant niedrigeres Level an Tryptophan im Serum auf (Maes et al., 1996). Eine Tryptophandepletion führte zu einem Anstieg depressiver Symptome bei depressiven Patienten (Moore et al., 2000; Van der Does, 2001) und zu einer Aufhebung der therapeutischen Effekte von Antidepressiva (Moore et al., 2000).

In klinischen Studien führte die Behandlung mit Substanzen, die das serotonerge System beeinflussen (z.B. SSRI), zu signifikanten Verbesserungen der Symptome bei Patienten mit Major Depression (Cuijpers et al., 2008) und bipolaren Störungen (Silverstone & Silverstone, 2004). Obwohl mittlerweile auch einige Studien zu differenzierteren Ergebnissen kommen, so zeigten Kirsch et al. (2008), dass die Effektivität einer Behandlung mit SSRIs, also der Unterschied zwischen SSRI und Placebo, stark mit der Schwere der Depression zusammenhängt. Die Beteiligung von 5-HT an depressiven Erkrankungen ist unumstritten, allerdings ist das Ausmaß dieser Beteiligung bis heute noch unbekannt.

Ein weiterer in diesem Kontext wichtiger Neurotransmitter ist DA. Ein relevantes Symptom depressiver Erkrankungen ist Anhedonie, die verminderte Reaktion auf positive Reize und Belohnungen. Es konnte gezeigt werden, dass Strukturen, die mit

⁴ Diese Arbeit stellt in diesem Zusammenhang keinen Anspruch an Vollständigkeit und wird im Folgenden nur auf Dopamin, Serotonin und hauptsächlich serotonerg wirkende Substanzen eingehen.

Belohnungsprozessen assoziiert sind (wie z.B. die mesolimbische dopaminerge Bahn) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese depressiver Erkrankungen spielen (Nestler et al., 2002; Nestler & Carlezon, 2006; Stein, 2008).

Es existieren auch Hinweise auf Verbindungen von DA mit anderen typischen depressiven Symptomen wie z.B. psychomotorischer Verlangsamung oder einer verringerten Motivation und einer verringerten dopaminergen Aktivität (Schrijvers et al., 2008). Zum Beispiel wiesen Patienten mit depressiven Störungen und psychomotorischer Verlangsamung parallel ein verringertes Level von HVA in der Cerebrospinalflüssigkeit (Winograd-Gurvich et al., 2006) und eine höhere DA-Rezeptorbindung (d.h. Hinweis für eine reduzierte DA-Aktivität) im Striatum auf (Meyer et al., 2006). Ferner zeigte sich eine hohe Komorbidität zwischen Depression und Morbus Parkinson, welches z.T. auf die Überlappung der Symptome (z.B. Anhedonie, psychomotorische Verlangsamung) zurückgeführt wird (Lemke et al., 2004).

Neuroanatomie der Depression

Die Veränderungen in den Neurotransmittersystemen sind allerdings auch oft mit bestimmten Regionen assoziiert, wodurch implizit gilt, dass auch bestimmte Areale mit der Pathogenese depressiver Störungen assoziiert werden können. Durch die Verwendung bildgebender Verfahren zeigte sich, dass Patienten mit depressiven Störungen einen veränderten Metabolismus in verschiedenen Kortexarealen, vor allem dem frontalen und präfrontalen Kortex, aber auch im temporalen und parietalen Bereich, aufwiesen (Cummings, 1993; Drevets, 2001; Drevets et al., 1999; George et al., 1993; Koenigs & Grafman, 2009; Winograd-Gurvich et al., 2006). Ferner zeigte sich ein reduziertes Bindungspotential an serotonergen Rezeptoren in den Raphekernen, dem temporalen und dem okzipitalen Kortex (Drevets et al., 1999). Des Weiteren wurden Veränderungen im Metabolismus subkortikaler Bereiche wie dem Hippocampus (Kalia, 2005; Nestler et al., 2002), dem Striatum (Drevets, 2001; Leppanen, 2006), der Amygdala (George et al., 1993) oder dem Hypothalamus (Nestler et al., 2002; Nestler & Carlezon, 2006) nachgewiesen. Neben diesen funktionalen Veränderungen ließen sich z.B. für den Hippocampus, das Striatum, die Amygdala und den präfrontalen Kortex auch strukturelle Veränderungen beobachten (Sheline, 2008). Zusätzlich war eine Lateralisierung der Effekte zu beobachten; Patienten mit einer linksseitigen Schädigung im Frontalkortex oder den Basalganglien wiesen ein erhöhtes Risiko auf, eine Depression zu entwickeln (Cummings, 1993). Auch zeigte sich bei depressiven Patienten

linksseitig ein stärkerer Hypometabolismus im frontalen und temporalen Kortex verglichen mit der rechten Hemisphäre und mit gesunden Kontrollprobanden (George et al., 1993).

Interleukin-2 im Kontext der Zytokin-Hypothese der Depression

Die „Zytokin-Hypothese“ impliziert, dass proinflammatorische Zytokine eine Schlüssel-funktion in der zentralen Steuerung neurochemischer und neuroendokriner Veränderungen einnehmen, die mit psychischen Störungen einhergehen, indem sie neuromodulatorisch wirken (Leonard & Myint, 2009; Müller & Schwarz, 2007; Schiepers et al., 2005). Zum Beispiel wird durch Zytokine (z.B. IFN- α) das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) aktiviert, welches Tryptophan zu Kynurenin (KYN) abbaut und somit eine reduzierte 5-HT-Synthese zur Folge hat (Müller & Schwarz, 2007). Des Weiteren entstehen beim Abbau von Kynurenin Chinolinsäure (Quinolinic acid; QUIN) und 3-Hydroxy-Kynurenin (3-OH-KYN), welche in hohen Konzentrationen neurotoxisch wirken und mit einer Hippocampusatrophie assoziiert werden. Eine Hippocampusatrophie wird u.a. auch nicht selten bei depressiven Erkrankungen beobachtet (Müller & Schwarz, 2007; Wichers & Maes, 2002; Wichers & Maes, 2004).

Patienten mit affektiven Störungen im Vergleich zu Gesunden zeigten neben verschiedenen anderen immunologischen Veränderungen signifikant unterschiedliche Level verschiedener Zytokine auf; Major Depression (Anisman et al., 1999; Kim et al., 2007b; Myint et al., 2005; Seidel et al., 1995; Tsao et al., 2006), Bipolare Störung (Brietzke et al., 2009; Kim et al., 2007a), Dysthymie (Anisman et al., 1999).

Die therapeutische Verabreichung von Zytokinen (IFN- α und IL-2) im Rahmen einer Krebs- oder Hepatitis-C-Therapie führte zu verschiedenen Nebenwirkungen wie Müdigkeit, Appetitverlust, verschlechterter Konzentration, aber auch zu erhöhten depressiven Symptomen (Anisman et al., 2005; Bonaccorso et al., 2002; Capuron et al., 2002a; Denicoff et al., 1987; Waldmann, 2006; Walker et al., 1997; Wichers & Maes, 2002). Diese depressiven Symptome gingen mit einer Verringerung von Tryptophan im Serum der Patienten einher. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Schwere der Symptome und dem Ausmaß der Reduktion von Tryptophan (Capuron et al., 2003; Capuron et al., 2002a). Des Weiteren konnten bereits ältere Studien zeigen, dass die Verabreichung von IL-2 Tryptophan reduziert und gleichzeitig den Kynureninspiegel im Urin (ein Metabolit von Tryptophan) erhöht (Brown et al., 1989). Die zytokin-induzierten depressiven Symptome konnten durch die Verabreichung von Antidepressiva wieder reduziert werden (Capuron et

al., 2002c; Musselman et al., 2001). Andere Studien führten zu weniger eindeutigen Effekten. In einer Studie von Eller et al. (2008) wurde demonstriert, dass nur das TNF- α -Level das Ansprechen auf die Antidepressivumbehandlung mit Escitalopram vorhersagte. Allerdings zeigte sich ein unterschiedliches Muster an IL-2 Rezeptoren zwischen Patienten, die auf die Behandlung ansprachen, und den Patienten, bei denen die Behandlung zu keinen Effekten führte (Eller et al., 2008).

In weiteren Studien wurden funktionale Veränderungen nach der Verabreichung von INF- α in Hirnarealen beobachtet, die mit depressiven Erkrankungen assoziiert sind. Hepatitis-C Patienten, die mit geringen Dosen IFN- α behandelt wurden, zeigten einen reduzierten Metabolismus im präfrontalen Kortex, welcher mit einem Anstieg in selbstberichteten Depressionswerten korreliert war. Parallel dazu konnte ein Hypermetabolismus in den Basalganglien (Putamen) und dem linken okzipitalen Kortex nachgewiesen werden (Juengling et al., 2000). Diese Ergebnisse werden zum Teil von Capuron et al. (2007b) bestätigt: Krebspatienten zeigten im Rahmen einer INF- α -Therapie einen Hypometabolismus im präfrontalen Kortex und den Basalganglien. Ferner korrelierte der Glukosemetabolismus im linken Nucleus accumbens und dem Putamen negativ mit selbstberichteter Müdigkeit (Capuron et al., 2007b).

2 Motivationsforschung im Tiermodell

Motivation kann allgemein als der Beweggrund eines Menschen oder Tieres für eine bestimmte Verhaltensweise definiert werden (Deckers, 2010; Pinel, 2006). Verhalten erfolgt nicht spontan, sondern wird von äußeren Anreizen (z.B. Geld, berufliche Ziele etc.) und inneren Motiven (psychologische und physiologische Bedürfnisse, z.B. Hunger, Fortpflanzung, Neugier) gesteuert. Ein Motiv ist hier als eine interne Disposition eines Lebewesens zu verstehen, sich einem positiven Anreiz (z.B. einer Belohnung) zu nähern und einen negativen Anreiz (z.B. ein erwartetes aversives Ereignis) zu vermeiden. So kann Verhalten zuerst einmal in positiv und aversiv motiviertes Verhalten eingeteilt werden. Die Verbindung zwischen Anreiz und Motiv ist nicht immer eindeutig, kann aber so definiert werden, dass das Ziel eines Motivs darin besteht, einen bestimmten Anreiz zu erhalten (Deckers, 2010; Pinel, 2006).

Auch Emotionen werden als Motive angesehen. Eine Emotion ist definiert als ein funktionales Reaktionsmuster auf interne oder externe (auch antizipierte) Reize oder Veränderungen. Dieses emotionale Reaktionsmuster äußert sich auf verschiedenen Ebenen: Erleben (subjektives Gefühl), Kognitionen, Physiologie (z.B. Blutdruck, Herzfrequenz, neurochemische Prozesse im Gehirn, Immunsystem) sowie Verhalten und Mimik. Das subjektive Gefühl wird als eine subjektive Erfahrung beschrieben, die nur direkt von dem Individuum erlebt wird und durch Sprache kommuniziert werden kann. Von daher sind nur die anderen Ebenen im Tiermodell operationalisierbar. Dabei werden je nach Theorie 6-8 Basisemotionen unterschieden (Freude, Liebe, Trauer, Angst, Ärger, Ekel, Überraschung und Neugier). Davon differenziert zu betrachten sind Stimmungen. Sie sind ähnlich aber nicht identisch mit Emotionen. Sie dauern länger, sind weniger intensiv und nicht unbedingt auf einen klaren Stimulus zurückzuführen (z.B. saisonale depressive Stimmung). Eine bestimmte Stimmung kann allerdings die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Emotion erhöhen (Deckers, 2010; Pinel, 2006).

In den vorliegenden Studien liegt der Fokus auf der Analyse von Verhaltensweisen. Da aber verschiedene Verhaltensweisen mit unterschiedlichen Emotionen und Stimmungen assoziiert sein können und das subjektive Gefühl im Tiermodell nicht erhoben werden kann,

wird in dieser Arbeit von emotionsähnlichem (angst- und depressivähnlichem⁵) Verhalten gesprochen.

Einige psychische Störungen können als eine Extremform von Emotionen und Stimmungen verstanden werden, die sich auf mehrere Motive auswirken und somit auch das Verhalten verändern: z.B. Depression als Extremform einer depressiven Stimmung, wirkt sich z.B. unter anderem auch auf den Hunger, Neugier oder sexuelle Aktivitäten aus. Ausgehend von dieser Definition könnte durch die Erhebung von Verhalten auf Emotionen, Stimmungen und auch auf psychische Störungen rückgeschlossen werden. Im Folgenden sollen die wichtigsten verwendeten Verhaltensmethoden detaillierter beschrieben werden.

2.1 Messung angstähnlichen Verhaltens im Tiermodell

Tiermodelle zur Messung von aversiv motiviertem Verhalten werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: 1. Modelle basierend auf einer konditionierten Furchtreaktion; hierzu zählen z.B. Konfliktparadigmen (wie z.B. bestrafte Trinken) oder die konditionierte emotionale Reaktion. 2. Modelle der unkonditionierten, natürlichen Angstreaktion; diese Modelle basieren üblicherweise auf neuheits-induzierten Variationen der Explorationsaktivität. Beispiele sind das Offenfeld (OF), das erhöhte Plus-Labyrinth (elevated plus-maze; EPM), die Hell-Dunkel-Box oder der Soziale Interaktionstest. Im Folgenden wird hier nur auf in den Experimenten verwendete Verfahren (EPM und OF) eingegangen. Beide Verfahren basieren auf der Annahme, dass das natürliche Explorationsverhalten von Ratten unter bestimmten Umständen, die einen Annäherungs-Vermeidungs-Konflikt auslösen (z.B. freie offene Plätze oder Höhen), unterdrückt werden kann. Dieses motivierte Verhalten wird mit Emotionen und Intentionen in Verbindung gebracht: Annäherung wird oft mit Neugier und Vermeidung mit Angst assoziiert (Carobrez & Bertoglio, 2005). Diesen Zusammenhang macht man sich im Tiermodell zu Nutze, durch Verhaltenstests, die Annäherungs- und Vermeidungsverhalten messen und so ein Maß für angstähnliches Verhalten darstellen. In diesem Kontext wird auch oft der Begriff „unkonditioniertes Vermeidungsverhalten“ verwendet, da dieses Verhalten natürlich ist und nicht erlernt werden muss.

⁵ Der Begriff depressivähnlich soll nicht implizieren, dass mit dem hier verwendeten Verfahren ein mit Depression beim Menschen vergleichbarer Zustand hervorgerufen werden kann und in diesem Experiment mit depressiven Tieren gearbeitet wird. Es soll vielmehr darauf hingewiesen werden, dass das hier verwendete Verfahren eine hohe prädiktive Validität in Bezug auf antidepressiv wirkende Pharmaka aufweist und dass das in diesem Test gemessene Verhalten deshalb als depressivähnlich bezeichnet wird.

2.1.1 Das erhöhte Plus-Labyrinth

Das EPM ist eines der am weitesten verbreiteten und auf Basis von Pharmakologie, Neurobiologie und Verhalten validierten Tiermodelle (v.a. bei Nagern) zur Messung von angstähnlichem Verhalten (Carobrez & Bertoglio, 2005; Pawlak et al., im Druck (**Artikel 3**); Walf & Frye, 2007). Dieser Test ist eine modifizierte Version des Y-Labyrinths (Montgomery, 1955) und wurde durch Pellow et al. (1985) weiterentwickelt.

Dieses Labyrinth steht auf einem 50 cm hohen Stangengerüst und besteht aus zwei gegenüberliegenden, von Wänden (ca. 40 cm hoch) umschlossenen, dunkleren Armen und zwei offenen, helleren Armen (Abb. 1). Die vier Arme sind je 50 cm lang und 10 cm breit. In der Mitte befindet sich eine kleine Plattform, die 10x10 cm misst (detaillierte Beschreibung in **Artikel 3**: Pawlak et al., im Druck).

Der Test wird in der Regel an naiven Tieren durchgeführt, die während der fünfminütigen Testzeit das Labyrinth frei explorieren können. In unseren Experimenten wurde dieser Test aus methodischen Gründen an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt (siehe Fragestellung **Artikel 2** S. 45f.; Carobrez & Bertoglio, 2005).

Das EPM wird als Test unkonditionierten angstähnlichen Verhaltens eingestuft. Die Beschaffenheit des Labyrinths induziert bei den Tieren einen Annäherungs-Vermeidungskonflikt: Annäherung aufgrund von Neuheit und Vermeidung der offenen Arme vermutlich aufgrund der offenen Fläche, der Höhe und der Helligkeit (Fernandes & File, 1996; Treit et al., 1993). Diese natürlichen Verhaltensweisen (Annäherung und Vermeidung) der Tiere werden als Variablen zur Messung angstähnlichen Verhaltens herangezogen. Als klassisches Maß für angstähnliches Verhalten wird hier die Aufenthaltszeit auf den offenen Armen erhoben, wobei eine hohe Aufenthaltszeit als wenig angstähnliches Verhalten und eine niedrige Aufenthaltszeit als ein hoch angstähnliches Verhalten interpretiert wird. Hierbei kann die absolute Zeit, aber auch die relative Zeit im Vergleich zur gesamten, auf den Armen (ohne

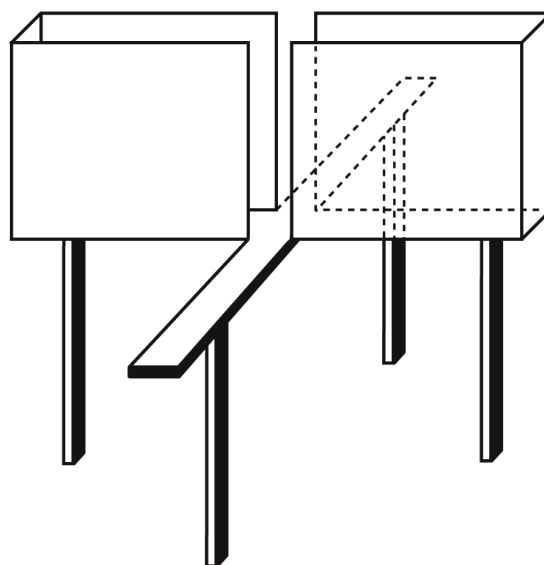


Abbildung 1: Schematische Darstellung des EPM

Mittelstück) verbrachten Zeit als Verhaltensmaß angenommen werden. Unbehandelte Tiere zeigen eine Präferenz für die geschlossenen Arme, welche durch das natürliche Rückzugsverhalten der Tiere (Vermeidung von freien Flächen und Höhen) erklärt wird (Treit et al., 1993). Substanzen, die im Humanbereich anxiolytisch oder anxiogen wirken (mit Ausnahme einiger SSRIs), zeigen in diesem Tiermodell vergleichbare Wirkungen, also erhöhen bzw. verringern die Aufenthaltszeit und die Eintritte in die offenen Armen (Pellow et al., 1985).

Ein weiteres Maß stellt die allgemeine Aktivität dar, die durch die Eintritte in die Arme (horizontale Lokomotion) und das Aufrichtverhalten (vertikale Lokomotion) operationalisiert wird. Dieses Maß ist relevant zur Prävention von Fehlinterpretationen, z.B. eine geringe Aufenthaltszeit auf den offenen Armen aufgrund einer generell reduzierte Lokomotion kann auf die sedative Wirkung einer Substanz zurückgehen und sollte nicht fälschlicherweise als ein anxiogen-ähnlicher Effekt betrachtet werden.

Zusätzlich wird oft auch noch ein Verhalten erhoben, welches allgemein als „Risk Assessment“ (Risikoabschätzung) bezeichnet wird (Blanchard & Blanchard, 1989). Dieses Verhalten wird von Nagern hauptsächlich in potentiell bedrohlichen Situationen gezeigt und beinhaltet a) den Aufenthalt in einem der geschlossenen Arme und observieren der offenen Arme, b) eine typische, flache, lang gestreckte Körperhaltung in Richtung eines beliebigen offenen Armes und c) eine vorsichtige Körperbewegung in Richtung der offenen Arme. Das Risk Assessment wird zum Teil auch als ein Maß für angsthähnliches Verhalten angesehen, da es ein gutes Maß für den Annäherungs-Vermeidungs-Konflikt darstellt und durch die Verabreichung von Anxiolytika reduziert werden kann (Carobrez & Bertoglio, 2005; Rodgers et al., 1997).

2.1.2 Artikel 3: The elevated plus-maze test:

Differential psychopharmacology of anxiety-related behaviour

Artikel 3 (Pawlak et al., im Druck), diskutiert zusätzlich einige zum weiteren Verständnis dieses Testverfahrens relevante Themen: Auf einige Themengebiete soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Was genau wird im EPM gemessen? Das im EPM gemessene angsthähnliche Verhalten wird in vielen Untersuchungen als eine Art Annäherungs-Vermeidungs-Konflikt beschrieben (Carobrez & Bertoglio, 2005; Handley et al., 1993). Bei Menschen anxiolytisch wirkende Substanzen verschieben diesen Konflikt zugunsten der Annäherung, was in diesem Fall zu

erhöhten Aufenthaltszeiten auf den zuvor vermiedenen offenen Armen führt (Gray & McNaughton, 2000). Laut Corr und McNaughton (2004) hat Furcht die Funktion, das Tier von der Gefahrenquelle weg zu bewegen, während Angst in einem Annäherungs-Vermeidungskonflikt die Funktion hat, das Tier zu der Gefahrenquelle zu führen. Die Unterscheidung zwischen Furcht und Angst spielt auch im EPM eine Rolle. Die Annäherung an eine Gefahrenquelle, hier die offenen Arme, wird als angstähnliches Verhalten interpretiert, während die Vermeidung der offenen Arme als ein Ausdruck furchtähnlichen Verhaltens betrachtet wird.

Was ist der „One Trial Tolerance Effect“ und wie kann er im EPM erklärt werden? Ein bis heute ungelöstes Phänomen dieses Verhaltensparadigmas ist die „One Trial Tolerance“, was bedeutet, dass die anxiolytisch-ähnliche Wirkung der Benzodiazepine, d.h. ein Anstieg der Aufenthaltszeit auf den offenen Armen, nur am ersten Testtag im EPM beobachtbar ist (File & Zangrossi, 1993). Eine mögliche Erklärung ist, dass der erste Testtag eine Messung von angstähnlichem Verhalten und der zweite Testtag eher eine Messung von furchtähnlichem Verhalten darstellt (Carobrez & Bertoglio, 2005), da Benzodiazepine auf Furcht und furchtähnliches Verhalten keine Wirkung zeigen (Cruz-Morales et al., 2002). Ferner existieren Hinweise, dass an beiden Testtagen unterschiedliche Eigenschaften der Apparatur relevant sind. Am ersten Testtag schien die Tatsache, dass die Tiere sich auf einer ungeschützten Fläche befinden, ausschlaggebend für das Verhalten (Treit et al., 1993) und am zweiten Testtag die Höhe der Arme relevant (Fernandes & File, 1996). Für diese Theorie spricht zusätzlich, dass das gezeigte Verhalten an zwei Testtagen bei einer Faktorenanalyse zur Klassifikation relevanter Faktoren auf unterschiedlichen unabhängigen Faktoren repräsentiert war (File et al., 1993b). Diese Studien liefern Indizien, dass das im EPM an zwei aufeinander folgenden Tagen gemessene Verhalten jeweils ein Maß für unterschiedliches emotionsähnliches Verhalten (für angst- und furchtähnliches Verhalten) darstellt. Dies bestätigt Hinweise aus dem Humanbereich, wo Furcht- und Angstmessungen ebenfalls unkorreliert waren (Depue & Lenzenweger, 2005).

Welches ist der zugrundeliegende neurochemische Mechanismus des gezeigten Verhaltens? Der Frage, welche neurochemischen Prozesse an der Vermittlung von Angst und angstähnlichem Verhalten beteiligt sind, ist in einigen Studien nachgegangen worden (Millan, 2003). Untersuchungen mit antidepressiv wirkenden Substanzen, Neuroleptika und Stimulantien kommen zu unterschiedlichen und inkonsistenten Ergebnissen (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997). Borsinin et al. (2002) kamen zu dem Schluss, dass das EPM nur für GABAerge Substanzen, also hauptsächlich Benzodiazepine, sensitive Messungen zulässt.

Allerdings existieren einige Studien, die anxiolytisch-ähnliche Effekte einer chronischen Verabreichung serotonerger Substanzen nachwiesen (Fedotova et al., 2004; Motta et al., 1992; Silva & Brandao, 2000). Ähnlich zeigt sich dies auch im klinischen Alltag, z.B. verbessern Antidepressiva (SSRI) erst nach chronischer Verabreichung eine Angstsymptomatik (Pollack et al., 2001).

Inwiefern kann die natürliche Varianz im angsthähnlichen Verhalten der Tiere einen weiteren Forschungsansatz in den Verhaltensneurowissenschaften darstellen? Des Weiteren kann dieser Test zur Differenzierung von individuellen Unterschieden im Tiermodell herangezogen werden. Tiere werden anhand ihrer Aufenthaltszeit auf den offenen Armen in hoch (LOA, low open arm time) und niedrig (HOA, high open arm time) ängstliche Tiere eingeteilt. Diese Unterscheidung erwies sich in verschiedenen Studien als sinnvoll, da sich auch in anderen Verhaltenstests, aber auch in der Reaktion auf psychoaktive Substanzen (z.B. 3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin; MDMA) Unterschiede zwischen LOA und HOA Tieren zeigten (Borta et al., 2006; Ho et al., 2002; Ho et al., 2004; Ludwig et al., 2008; Schwarting & Pawlak, 2004). Obwohl das EPM schon in einer Vielzahl von Experimenten zum Einsatz kam, existieren nur sehr wenige Studien, in denen systematisch individuelles Verhalten in diesem Paradigma und assoziierte neurobiologische Funktionen untersucht wurden (Landgraf & Wigger, 2003). In dem vorliegenden Überblicksartikel wird das Thema der Individualität im Tiermodell und die daraus entstehenden Forschungsmöglichkeiten für die behavioralen Neurowissenschaften diskutiert, dieses steht allerdings nicht im Fokus der vorliegenden Dissertation.

2.1.3 Das Offenfeld

Das OF ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden in der tierexperimentellen Verhaltensforschung (Prut & Belzung, 2003) und kann sowohl zur Messung lokomotorischer Aktivität und unconditioniertem Explorations- und Neugierverhalten als auch zur Messung von angsthähnlichem Vermeidungsverhalten eingesetzt werden.

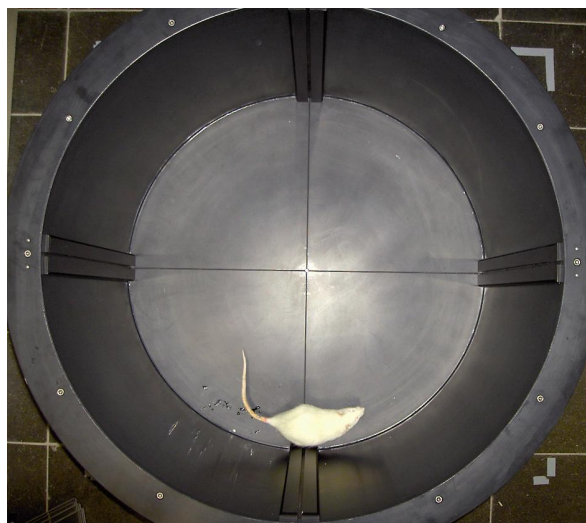


Abbildung 2: Großes rundes OF

Das OF ist eine relativ zum Heimatkäfig große helle Arena, die das Tier für einen definierten Zeitrahmen frei explorieren kann. Die Abmaße (Größe, Form, Farbe) und Testbedingungen (Beleuchtung, Dauer) dieses Tests sind verglichen mit dem EPM weitaus weniger standardisiert. Generell ist zu erwähnen, dass das Verhalten der Tiere stark von Größe, Form und Beleuchtung der Apparatur abhängig ist, die zwischen verschiedenen Laboren stark variieren (Prut & Belzung, 2003). Ferner kann zwischen einer forcierten und einer freiwilligen Version des Tests, in welcher den Tieren eine Rückzugsmöglichkeit geboten wird, unterschieden werden. In der vorliegenden Studie wurde die forcierte Version, ohne eine Rückzugsmöglichkeit, und als Apparatur eine schwarze runde Arena mit einem Durchmesser von 80 cm verwendet (Abb.2; Pawlak, 2007).

Die erhobenen Parameter sind zum einen das Explorationsverhalten, welches hier durch das Aufrichten auf die Hinterbeine (Rearing, auch manchmal als vertikale Lokomotion bezeichnet) definiert wird und zum anderen die lokomotorische Aktivität, die durch die zurückgelegte Distanz (horizontale Lokomotion) operationalisiert wird. Des Weiteren ist es möglich, angstähnliches oder Vermeidungsverhalten im OF zu erheben; hierzu wird die Fläche der Arena in einen Rand- und Zentrumsbereich eingeteilt, um auf diese Weise die Verhaltensparameter differenziert betrachten zu können (Choleris et al., 2001; Treit & Fundytus, 1988). In der vorliegenden Studie (**Artikel 1**) wurde ein rundes Offenfeld verwendet, wobei ein 10 cm breiter Rand auf der Basis von Vorstudien als Randbereich definiert wurde.

Der Zentrumsbereich wird hier wie auch die offenen Arme im EPM als aversiv angesehen, da es sich um eine freie, helle Fläche handelt und dementsprechend von den Tieren vermieden wird. Als Maß für angstähnliches Verhalten wird somit die Zeit im Zentrum erhoben, wobei eine hohe Aufenthaltszeit als wenig angstähnliches Verhalten und eine niedrige Aufenthaltszeit als ein hoch angstähnliches Verhalten interpretiert wird. Eine pharmakologische Validierung zeigte, dass Substanzen, die beim Menschen anxiolytisch wirken, auch die Aufenthaltszeit im Zentrum der Arena erhöhen (Prut & Belzung, 2003).

2.1.4 Neurochemie angstähnlichen Verhaltens⁶

Einige neurochemischen Veränderungen die beim Menschen mit Angst assoziiert waren, konnten in der tierexperimentellen Forschung bestätigt werden. Für 5-HT zeigt sich allerdings in der tierexperimentellen Forschung ein eher heterogenes Bild (Köks et al., 2001; Pinheiro et al., 2007). Zum Beispiel führte die akute Verabreichung des SSRI Fluoxetin zu anxiogen-ähnlichen Effekten (Silva et al., 1999). In anderen Studien konnten keine Effekte von SSRIs auf angstähnliches Verhalten gefunden werden (Überblick bei Borsini et al., 2002; Pinheiro et al., 2007). Auf der anderen Seite führte die chronische Verabreichung serotonerg wirkender Substanzen [NAN-190 (5-HT-Antagonist), Cianopramin (trizyklisches Antidepressivum), Gepiron (5-HT-Agonist) und Fluoxetin (SSRI)] zu anxiolytisch-ähnlichen Effekten (Fedotova et al., 2004; Griebel et al., 1994; Silva & Brandao, 2000). Des Weiteren wiesen Tiere, die anhand ihres Explorationsverhalten im OF, als hoch explorative Tiere klassifiziert wurden, im Vergleich zu wenig explorativen Tieren ein geringeres 5-HT-Niveau im medialen präfrontalen Kortex auf (Thiel et al., 1999). Parallel konnte bei diesen Tieren auch ein höherer DA-Gehalt im Striatum festgestellt werden (Thiel et al., 1999). Kongruent dazu zeigten in einer anderen Studie Tiere, die als wenig explorative Tiere eingestuft wurden, mehr angstähnliches Verhalten im EPM und wiesen gleichzeitig auch ein geringeres DA-Level im Striatum auf (Mallo et al., 2007). Außerdem korrelierte eine ausgeprägtere rechtsseitige Umsatzrate von Dopamin im Frontalkortex mit einem geringeren angstähnlichen Verhalten im EPM (Thiel & Schwarting, 2001). Ferner hatte der dopaminerge Agonist Aripirazol in verschiedenen Verhaltenstests eine Reduktion angstähnlichen Verhaltens zur Folge (Biojone et al., 2010).

Im Gegensatz dazu und parallel zu den Studien an Patienten existieren auch hier Studien die auf einen umgekehrten Zusammenhang hinweisen. Negative Erfahrungen die mit einem erhöhten angstähnlichen Verhalten assoziiert sind wie Handhabung der Tiere, Fußschock oder die Erfahrung, einem hell erleuchteten OF ausgesetzt zu sein, führten zu einer erhöhten dopaminergen Aktivität im präfrontalen Kortex (Beaufour et al., 2001; Del Arco & Mora, 2001) oder im Nucleus accumbens (Kalivas & Duffy, 1995).

⁶ Hier soll auf die Möglichkeit hingewiesen werden potentielle Zusammenhänge zwischen Neurochemie und Emotionen, die anhand von Patientenstudien erhoben wurden, auch im Tiermodell abzubilden. Es wird nur auf die Neurotransmitter DA und 5-HT und deren Beteiligung an im EPM und OF gemessenen angstähnlichen Verhalten eingegangen, da diese im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen.

2.1.5 Effekte von Interleukin-2 auf angstähnliches Verhalten

Im tierexperimentellen Bereich wurden die Auswirkungen von IL-2 auf angst-ähnliches Verhalten bisher erst wenig untersucht und die existierenden Studien führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. IL-2/15R β -Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu heterozygoten Mäusen im EPM deutlich reduziertes angstähnliches Verhalten (Petitto et al., 2002). Auf der anderen Seite führte weder die akute, noch eine mehrmalige Verabreichung von IL-2 zu Verhaltensveränderungen im EPM (Anisman et al., 2002; Connor et al., 1998; Lacosta et al., 1999a; Petitto et al., 1997).

Im Gegensatz zu einer systemischen Verabreichung demonstrierten einige Arbeitsgruppen verschiedene Verhaltenseffekte mit zentral appliziertem IL-2. Direkt in den medialen Hypothalamus von Katzen mikroinjiziertes IL-2 hatte eine Suppression defensiven Verhaltens („defensive rage“) zur Folge, während eine Mikroinjektion ins Periaquäduktale Grau das defensive Verhalten begünstigte (Bhatt & Siegel, 2006; Zalman & Siegel, 2006). Ferner, führte die Mikroinjektion von IL-2, abhängig von dem Injektionsbereich zu schlaffördernden Effekten (Nistico, 1993), bei unilateraler Injektion zu ipsilateralen Drehungen sowie asymmetrischer Körperhaltung (De Sarro et al., 1990), erhöhter Lokomotion und Explorationsverhalten bei Ratten (Nistico & De Sarro, 1991).

2.2 Messung depressivähnlichen Verhaltens im Tiermodell

Die Messung depressivähnlichen Verhaltens im Tiermodell gestaltet sich aufgrund der Komplexität der Störung und der hauptsächlich kognitiven depressiven Symptome (z.B. Grübeln, Sorgen machen, dysfunktionale Gedanken etc.) schwierig. Im Tiermodell werden von daher oft symptomähnliche Verhaltensweisen, wie z.B. eine reduzierte Motivation für einen appetitiven Stimulus zu arbeiten (das Break-Point-Paradigma; Hodos & Kalman, 1963; M. Schneider et al., 2010) oder eine reduzierte Hedonie (gemessen als verminderter Zuckerkonsum; Papp et al., 1991) als Variablen zur Messung depressivähnlichen Verhaltens erhoben. Auch das Modell der erlernten Hilflosigkeit (Seligman, 1972) und chronisch milder Stress (chronic mild stress, CMS; Willner et al., 1992) haben sich als valide Modelle zur Untersuchung von depressivähnlichem Verhalten erwiesen (Cryan et al., 2002; Willner & Mitchell, 2002).

Als ein aktuelles Modell zur Untersuchung der kognitiven Symptome einer depressiven Störung stellten Enkel und Kollegen (2010) das „Ambiguous-Cue-Interpretation“-Paradigma

vor. In diesem Paradigma werden Ratten trainiert, zwei verschiedene Hebel zu drücken. Drücken des einen Hebels resultiert in einer Futterbelohnung, durch das Drücken des anderen Hebels kann eine Bestrafung durch einen elektrischen Fußschock vermieden werden. Jeder Hebel ist mit einem Ton assoziiert. Im ambigen Stimulustest werden den Tieren verschiedene Töne mit Frequenzen zwischen den trainierten Tönen präsentiert. Die Hebeldrückraten werden als Indikatoren für die jeweilige Erwartung eines positiven oder eines negativen Ereignisses in Folge des dargebotenen Reizes angesehen (Enkel et al., 2010). Mit diesem Paradigma konnte bei hilflos gezüchteten Ratten, einem genetischen Tiermodell für Depression (Henn & Vollmayr, 2005), ein negativer Reaktionsfehler, bedingt durch eine verringerte Reaktion auf positive und einer erhöhten Reaktion auf negative Reize, nachgewiesen werden. Ein ähnliches Verhaltensmuster, eine Aufmerksamkeitsverschiebung zugunsten negativer Reize, wurde auch häufig bei Patienten mit depressiven Störungen beobachtet (Leppanen, 2006).

Ferner wurden neurochemische Befunde aus dem Humanbereich im Tiermodell bestätigt. Studien lieferten Hinweise für eine Beteiligung von 5-HT an depressivähnlichem Verhalten. Serotonerg wirkenden Substanzen wie z.B. SSRIs führten zu einer Verringerung dieses Verhaltens in verschiedenen Modellen z.B. im Forced Swim Test (FST, genaue Beschreibung folgt), erlernte Hilflosigkeit, CMS (Bourin et al., 2009; Cryan et al., 2005; Willner & Mitchell, 2002).

Tierexperimentelle Studien bestätigen auch einen Zusammenhang zwischen DA und depressivähnlichem Verhalten. Zum Beispiel zeigten ihre Umgebung wenig explorierende Tiere bei gleichzeitig geringerem striatalen DA mehr passives depressivähnliches Verhalten im FST verglichen mit hoch explorativen Tieren (Mallo et al., 2007). Ferner führten parkinsonähnliche dopaminerge Läsionen im Bereich der Substantia nigra und des ventralen tegmentalaren Areals zu einem erhöhten depressivähnlichen Verhalten im Paradigma der erlernten Hilflosigkeit (Winter et al., 2007).

2.2.1 Der Forced Swim Test

Ein weiterer Test zur Messung depressivähnlichen Verhaltens ist der von Porsolt und Mitarbeitern (1977) entwickelte „Forced Swim Test“ (FST; (Porsolt et al., 1978; Porsolt et al., 1977). Der FST ist ein weit verbreiteter Test zur Erforschung einer potentiellen antidepressiven Wirkung einer pharmakologischen Substanz bei Nagern (Cryan et al., 2005). In diesem Paradigma werden Ratten einzeln in einen Behälter, der 40 cm tief mit Wasser

gefüllt ist, gesetzt und somit gezwungen zu schwimmen. Der Test wird an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Tag 1 (15 Minuten Testung) ist als eine Art Habituation zu betrachten. 24 Stunden später (Tag 2) erfolgt die pharmakologische Behandlung und die Ratten werden erneut, diesmal nur für 5 Minuten, getestet. An beiden Versuchstagen zeigen die

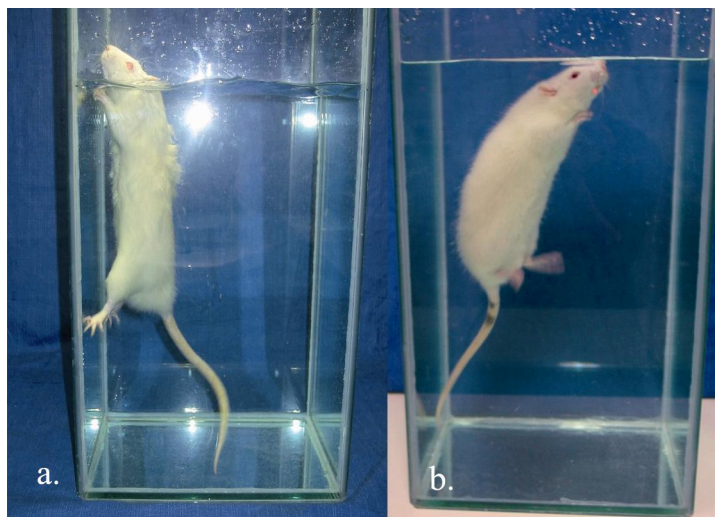


Abbildung 3: Verhalten im FST
a) Struggling, b) immobiles Verhalten

Tiere verschiedene typische Verhaltensweisen; anfänglich überwiegt das sehr aktive fluchtähnliche Verhalten („struggling“; Abb. 3a), dieses nimmt aber über die Testdauer ab, so dass die Tiere (am ersten Tag nach ca. 7-10 min und am zweiten Tag nach ca. 2 min) immer häufiger eine immobile Position einnehmen. Diese Immobilität ist durch eine starre Körperhaltung und minimale Bewegungen, die nur dazu dienen, die Nase des Tieres über der Wasseroberfläche zu halten, gekennzeichnet (Abb. 3b). Das Ausmaß der Immobilität wird als Indikator für depressivähnliches Verhalten angesehen, da Substanzen, die beim Menschen antidepressiv wirken (wie z.B. SSRIs) die Zeit der Immobilität verringern und das aktive fluchtähnliche Verhalten erhöhen (Borsini & Meli, 1988; Cryan et al., 2005). Somit weist dieser Test eine hohe prädiktive Validität auf (Cryan et al., 2002; Lucki, 1997).

Ein bedeutender Nachteil dieses Paradigmas ist die fehlende Standardisierung der Durchführung und Auswertung. In der vorliegenden Arbeit wurden die ursprünglichen Vorgaben aus den Originalarbeiten von Porsolt et al. (1977; 1978; 1979) hinsichtlich der Durchführung weitgehend übernommen. Lediglich die Wassertiefe wurde erhöht und die Auswertung in Minutenblöcke unterteilt (Cryan et al., 2002; Cryan et al., 2005). Aufgrund mangelnder standardisierter Auswertungskriterien wurden für diesen Versuch, basierend auf verschiedenen Beschreibungen des Verhaltens (z.B. (Armario et al., 1988; Cryan et al., 2005; Haidkind et al., 2004; Ho et al., 2002; Porsolt et al., 1978) interindividuell überprüfbare Auswertungskriterien konzipiert und anschließend Inter-Rater- und Intra-Rater-Reliabilitäten (mindestens $r = .90$, $p \leq .001$) bestimmt.

2.2.2 Sickness Behaviour im Tiermodell

Anschließend an das Konzept des Sickness Behaviours (S. 11f.) wurde auch tierexperimentell ein Zusammenhang zwischen Zytokinen und Elementen des Sickness Behaviour bestätigt und somit auch die Beteiligung von Immunbotenstoffen an Motivation und Emotionen. Verschiedene Studien zeigten, dass Zytokine wie IL-1 oder Endotoxine (u.a. Lipopolysaccharid; LPS) auch im Tiermodell z.B. soziales Verhalten und Nahrungsaufnahme beeinflussen (Dantzer, 2001). Darüber hinaus führte eine Injektion von IL-1 β direkt in das Gehirn zu einem erhöhten angstähnlichen Verhalten im EPM (Connor et al., 1998). Im Gegensatz zu IL-1 und IL-6 sind die Auswirkungen von IL-2 auf Komponenten des Sickness Behaviour bis heute seltener untersucht worden und die bisherigen Resultate sind heterogen. Nur eine Studie berichtet eindeutig von Anzeichen von Sickness Behaviour. Pauli et al. (1998) fanden nach einer intracerebrospinalen Injektion von 500ng (nicht bei 50ng) verschiedene Symptome von Sickness Behaviour (eine reduzierte Lokomotion, zusammengerollte Haltung, Immobilität, erhöhter Körpertemperatur). In einer anderen Studie ließen sich nach wiederholter Verabreichung von IL-2 moderaten Anzeichen für Sickness Behaviour nachweisen. Diese wurden allerdings lediglich mittels einer 4-Punkte Ratingskala eingeschätzt. Gleichzeitig zeigte sich, dass IL-2 stressinduzierte Verhaltensveränderungen nicht verstärkte und auch nicht, wie Stress, zu einem erhöhtem Corticosteronlevel und NE-Aktivität führt (Sudom et al., 2004). In beiden Studien wurde allerdings kein speziesspezifisches IL-2 verabreicht, was die Ergebnisse beeinflussen kann (S. 61ff.). Andere Studien wiesen für IL-2 keine Anzeichen von Sickness Behaviour nach, da nach der Verabreichung ausschließlich motivationale Veränderungen, aber keine typischen physiologischen Krankheitssymptome auftraten (Anisman et al., 2005; Bhatt et al., 2005). Diese heterogenen Studien weisen daraufhin, dass IL-2 motivationale Veränderungen ohne die Notwendigkeit eines Sickness Behaviours hervorrufen kann (Anisman et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wird von der Hypothese ausgegangen, dass IL-2 maximal in extrem hohen Dosierungen und hier eventuell nur durch die Wirkung von IL-2 auf andere Zytokine zu Krankheitssymptomen und zu Elementen des Sickness Behaviour führen kann und das IL-2 in den hier verwendeten Dosierungen ausschließlich zu motivationalen oder emotionalen Effekten führt (Pawlak, 2007; Pawlak & Schwarting, 2006a).

2.2.3 Interleukin-2: Effekte auf depressivähnliches Verhalten

Tierexperimentelle Studien zur Erforschung des Zusammenhangs zwischen IL-2 und depressivähnlichem Verhalten sind selten und die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich. Chronisch systemisch injiziertes IL-2 führte zu einer erhöhten neuheits-induzierten Lokomotion und Explorationsverhalten (Zalcman et al., 1998; Zalcman, 2001) und IL-2/15-Rezeptor-Knock-out-Mäuse wiesen im Vergleich zu Wildtypmäusen eine erhöhte Lokomotion auf (Petitto et al., 2002).

In anderen Untersuchungen hatte eine chronische systemische Injektion eine reduzierte Lokomotion (Sudom et al., 2004)⁷, und eine ventrikuläre Injektion eine schlaffördernde Wirkung zur Folge (De Sarro et al., 1990). Psychomotorische Veränderungen können als ein Hinweis auf depressivähnliches Verhalten betrachtet werden, da auch beim Menschen häufig eine reduzierte Psychomotorik zu beobachten ist, v.a. im Zusammenhang mit einer atypischen Depression, bei der neurovegetative Symptome vordergründig sein können (Anisman et al., 2002; Schrijvers et al., 2008).

Des Weiteren zeigte sich, dass IL-2 zu einem wichtigen Symptom depressiver Erkrankungen führte, der Anhedonie. Peripher injiziertes IL-2 hemmte Verhalten, welches in einer belohnenden lateralen hypothalamischen Stimulation resultiert (Anisman et al., 1998; Anisman et al., 1996). Ferner modulierte IL-2 dosisabhängig die hedonischen Effekte welche durch die Stimulation des medialen Vorderhirnbündels ausgelöst wurden (Miguelez et al., 2004) und reduzierte den Konsum von ansonsten bevorzugtem Futter (Sudom et al., 2004). Trotz vieler Hinweise aus der Humanforschung existieren nicht viele Studien, die die Effekte von Zytokinen, speziell IL-2, auf depressivähnliches Verhalten im Tiermodell erforschen. Wenige Zytokine wurden bis heute in gängigen Tests zur Messung depressivähnlichen Verhalten untersucht. Makino et al. (2000) konnte zeigen, dass humanes INF- α im FST zu depressivähnlichen Effekten führte, während INF- β und - γ zu keinen Verhaltensänderungen führte (Makino et al., 2000).

⁷ Da das Sickness Behaviour in dieser Studie nur mittels einer 4-stufigen Ratingskala eingeschätzt wurde, werden die Auswirkungen von IL-2 auf depressivähnliches Verhalten auch hier aufgeführt.

3 Durchgeführte Studien

Die vollständigen veröffentlichten Artikel, bzw. die zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte sind im Anhang dieser Arbeit eingebunden.

3.1 Fragestellung Artikel 1

In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Interleukin-2 und emotionalem und motivationalem Verhalten nachgewiesen werden. Auch im Humanbereich konnte eine Beziehung zu Angststörungen hergestellt werden. Systematische Studien speziell zur Wirkung von IL-2 auf angsthähnliches Verhalten sind allerdings selten. In der vorliegenden ersten Studie (**Artikel 1**) soll der Zusammenhang zwischen angsthähnlichem Verhalten im OF und striatal injiziertem IL-2 untersucht werden.

Auf den ersten Blick ist das Striatum keine der typischen Strukturen zur Erforschung aversiv motivierten Verhaltens, wie z.B. die Amygdala, der präfrontale Kortex oder das Periaquäduktale Grau. Dennoch konnte mehrfach gezeigt werden, dass diese Struktur eng mit motivationalem Verhalten assoziiert ist. Anhand ihres Verhaltens im EPM in hoch und niedrig ängstlich eingeteilte Ratten unterschieden sich nur im Striatum in ihren 5-HT Konzentrationen (Schwartz et al., 1998). Tiere, die ein ausgeprägteres Vermeidungsverhalten zeigten, wiesen eine höhere Aktivierung im Striatum (c-Fos mRNA Expression, Marker für Zellaktivität), im Vergleich zu Tieren mit einem niedrigeren Vermeidungsverhalten, auf (Kabbaj & Akil, 2001). Ferner weisen Humanstudien und tierexperimentelle Untersuchungen auf eine intensive Beteiligung des Striatums (dorsaler und ventraler Teil) an der Verarbeitung aversiver und angstbesetzter Stimuli hin. Angstpatienten wiesen in verschiedenen Tests in Reaktion auf angstbesetzte Stimuli eine erhöhte Aktivierung in subkortikalen Strukturen (speziell im Striatum) auf (Lorberbaum et al., 2004; van den Heuvel et al., 2005). Tierexperimentell führte eine striatale Läsion zu weniger furchthähnlichem Verhalten in einem Furchtkonditionierungsparadigma (Ferreira et al., 2003).

In vorangegangenen Studien konnte ein korrelativer Zusammenhang zwischen IL-2-mRNA (im Striatum und im präfrontalen Kortex) und individuellem angsthähnlichen Verhalten nachgewiesen werden (Pawlak et al., 2003). Adulte Wistar-Ratten wurden aufgrund ihres angsthähnlichen Verhaltens im EPM, gemessen an der Aufenthaltszeit auf den offenen Armen, in hoch und niedrig ängstliche Tiere eingeteilt. Danach wurde das mRNA-Level verschiedener Zytokine (IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α) in zentralen Arealen (präfrontaler

Kortex, Striatum, Hippocampus, amygdaloider Kortex) und peripherem Gewebe (Nebenniere, Milz) analysiert. Nur für IL-2 zeigte sich ein Zusammenhang mit angsthähnlichem Verhalten. Tiere, die viel angsthähnliches Verhalten zeigten, wiesen auch mehr IL-2 mRNA im Striatum auf, während weniger ängstliche Tiere ein signifikant höheres Level an IL-2 mRNA im präfrontalen Kortex zeigten. Ferner zeigte sich ungeachtet der Verhaltensvariablen für das IL-2 mRNA-Level eine negative Korrelation zwischen Striatum und präfrontalem Kortex (Pawlak et al., 2003; Pawlak et al., 2005)

In einer Folgestudie wurde IL-2 in verschiedenen Dosierungen (1, 10 und 25 ng) direkt in das Striatum appliziert und die Effekte auf angsthähnliches Verhalten im EPM gemessen. IL-2 wirkte dosisabhängig auf angsthähnliches Verhalten, allerdings zeigten sich erst am zweiten Testtag statistisch relevante Effekte. Es ergab sich ein Trend für anxiolytisch-ähnliche Effekte und vermehrtes Aufrichten in der Gruppe die mit der höchsten Dosis (25 ng) behandelt wurde. Die niedrigste Dosis (1 ng) führte zu moderaten anxiogen-ähnlichen Verhaltenseffekten und einem verringerten Aufrichten. Diese Effekte waren allerdings nicht signifikant (Pawlak & Schwarting, 2006a). Die Ergebnisse wurden als eine mögliche biphasische Wirkungsweise von IL-2 interpretiert und zeigen weiterhin die Möglichkeit einer verzögerten Substanzwirkung auf. Allgemeine Veränderungen der Lokomotion, wie z.B. bei Petitto et al. (2002), konnten nicht beobachtet werden, obwohl das Striatum als eine wichtige Struktur in der Regulation von lokomotorischem Verhalten gilt (Grillner et al., 2008).

Die Tatsache, dass der behaviorale Wirkungsverlauf von IL-2 noch kaum erforscht ist, kann Hinweise für eine mögliche Erklärung für diese uneindeutigen Ergebnisse liefern. Nur wenige Studien geben Anhaltspunkte auf das psychoaktive Zeitfenster, in welchem IL-2 emotionsähnliches Verhalten oder auch Neurotransmitteraktivitäten moduliert. In einer Studie waren in einem Zeitraum von 5-10 Minuten nach einer zentralen Mikroinjektion von IL-2 in den Locus coeruleus die ersten Verhaltenseffekte zu beobachten, welche zwischen 25 und 65 Minuten anhielten (De Sarro et al., 1990). Song et al. (1999) beobachteten nach einer peripheren Verabreichung von IL-2 die ersten neurochemischen Effekte im Nucleus accumbens für dopaminerge und serotonerge Metaboliten (HVA und 5-HIAA) nach 30 Minuten und für DA erst nach 120 Minuten.

Das EPM lässt nur für eine relativ kurze Testzeit (5 Min.; Carobrez & Bertoglio, 2005; Pawlak et al., im Druck (**Artikel 3**); Walf & Frye, 2007) valide Verhaltensmessungen zu. Das große OF bietet hier eine gute Alternative, da mit diesem Test wie mit dem EPM unkonditioniertes angsthähnliches Verhalten erhoben werden kann, nur liegt hier kein restriktives Testzeitlimit vor (Prut & Belzung, 2003). In der ersten vorliegenden Studie

(Artikel 1) wurden adulte Wistar-Ratten nach einer einmaligen striatalen Mikroinjektion speziesspezifischem⁸ IL-2 für 45 Minuten an zwei aufeinander folgenden Tagen im großen OF getestet (Exp.1). Als Dosierung wurde eine Mengenvorgabe (1 ng) aus der vorherigen Studie übernommen und zusätzlich noch eine geringere Dosis (0,1 ng) hinzugefügt. Die Kontrollgruppe wurde (in allen Experimenten) mit steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate-buffered-saline; PBS) behandelt. Aufgrund der Hypothese eines biphasischen Wirkungsverlaufs von IL-2 wurde angenommen, dass IL-2 in diesen Dosierungen, aber vor allem in der geringsten Dosierung, zu anxiogen-ähnlichen Effekten im OF führen sollte. Aufgrund der signifikanten Ergebnisse am zweiten Testtag bei Pawlak et al. (2006) wurde erstens an zwei aufeinander folgenden Tagen getestet (d.h. akut und 24 Stunden nach der Injektion) und zweitens in einem weiteren Experiment überprüft, ob die beobachteten Ergebnisse aufgrund einer zeitverzögerten Substanzwirkung zustande gekommen waren (Exp. 2). Hierzu wurde ein „proaktives“ Design verwendet, was keine Testung während der akuten Substanzwirkung, sondern eine zeitverzögerte Testung nach 24 und 48 Stunden beinhaltete. In dieser Studie wurde IL-2 direkt in das Striatum injiziert. Hierzu wurde die Methode der Mikroinjektion verwendet, die im Folgenden näher erläutert werden soll.

3.1.1 Stereotaxie und Mikroinjektion

Die präzise Mikroinjektion einer Substanz in ein definiertes Hirnareal ist eine gebräuchliche Methode, um die direkten Auswirkungen einer Substanz in einem bestimmten Zielgebiet auf das Verhalten zu analysieren.

Für die Mikroinjektion wird eine Kanüle mittels stereotaktischer Operation in ein bestimmtes Zielgebiet eingeführt. Mit Hilfe eines anatomischen Atlas (Paxinos & Watson,

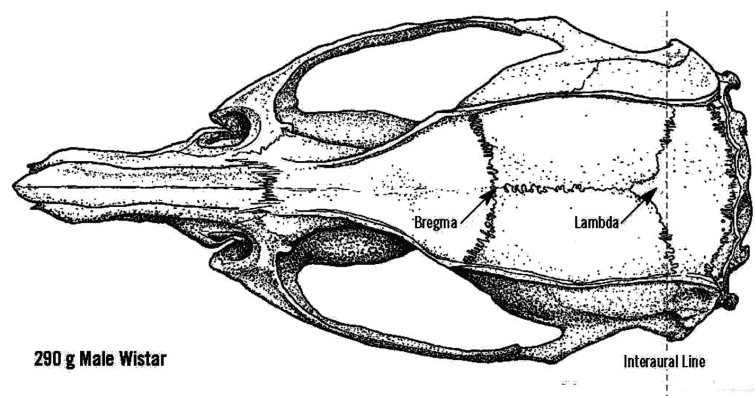


Abbildung 4: Rattenschädel
(aus Paxinos und Watson, 1998)

⁸ In den vorliegenden Studien wird ausschließlich speziesspezifisches IL-2 verwendet.

2007) können die dreidimensionalen Koordinaten einer Struktur (z.B. des Striatum) bestimmt werden. Die Koordinaten orientieren sich an dem Referenzpunkt Bregma, einer Knochennaht auf dem Schädel (Abb. 4). Der Schädel des anästhesierten Tieres wird in der stereotaktischen Apparatur eingespannt, eine kleine Stelle des Schädels freigelegt und Bregma bestimmt. Anhand der Koordinaten können kleine Löcher über dem Zielgebiet gebohrt werden, so dass die Kanüle präzise abgesenkt werden kann. Bei langfristig wirkenden Stoffen (z.B. Toxine zum Setzen von Läsionen) wird die Substanz direkt appliziert. Bei akut wirkenden Substanzen (wie in der vorliegenden Studie), bei denen deren Auswirkung auf das Verhalten von Interesse ist, werden permanente Kanülen (oder auch Führungskanülen) verwendet, d.h. die Kanüle wird mittels Zahnzement (Paladur) und zwei Knochenschrauben am Schädel befestigt. Die Führungskanüle wird mit einer Pseudokanüle, die das Verstopfen der Kanüle verhindert, verschlossen.

Für die Injektion wird eine Injektionspumpe verwendet, da bei einer Injektion direkt ins Gehirn nur sehr geringe Volumina (in der vorliegenden Studie 0,5 µl) verwendet werden, welche sehr langsam und gleichmäßig (0,2 µl pro Minute) injiziert werden müssen. In diese Injektionspumpe wird eine Hamilton®-Glasspritze eingespannt, die durch einen sehr dünnen Schlauch mit der Injektionskanüle verbunden ist. Das gesamte Injektionssystem wird mit sterilem Wasser gespült und dann mit der zu injizierenden Substanz befüllt. Durch das Einführen der Injektionskanüle in die implantierte Führungskanüle kann die Substanz präzise in das Zielgebiet injiziert werden. Je nach Substanz und Dicke der Kanüle ist es sinnvoll, das Fortschreiten der Injektion zu beobachten. Dafür wird das System mit sterilem Wasser und nur der vordere Teil des Spezierschlauches und die Injektionskanüle mit der zu injizierenden Substanz befüllt. Substanz und Wasser werden hierbei durch eine kleine Blase oder eine farbige Flüssigkeit getrennt, deren Bewegung man während der Injektion beobachten kann.

3.2 Artikel 1: Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats

Basierend auf der Literatur und den Vorstudien wurde in dieser Studie der Zusammenhang zwischen IL-2, welches direkt in das Striatum injiziert wurde, und angstähnlichem Verhalten im OF untersucht. Pawlak et al. (2006) zeigten, dass striatal injiziertes IL-2 zu biphasischen Verhaltensveränderungen im EPM führt. Diese Ergebnisse waren allerdings nicht eindeutig. Eine mögliche Erklärung bezieht sich auf das Versuchsdesign. In dieser Studie wurden die Tiere direkt nach der Injektion des IL-2 für fünf Minuten im EPM getestet. Nur eine Studie

(De Sarro et al., 1990) gibt Hinweise auf den behavioralen Wirkungsverlauf von IL-2. In der vorliegenden Studie wurden die Tiere deshalb mit dem OF getestet, da dort eine längere Testung (45 Minuten) möglich ist.

Für die Mikroinjektion wurden Ratten unilaterale Kanülen in das Striatum (anterior = 1,6 mm; lateral = \pm 2,0 mm; ventral = 5,8 mm, relativ zu Bregma; (Paxinos & Watson, 2007) implantiert. IL-2 wurde in zwei niedrigen Dosierungen (1 und 0,1 ng IL-2) verabreicht und das Verhalten im OF akut (OF 1), 5 Minuten nach der Injektion, und 24 Stunden später (OF 2), ohne erneute Substanzgabe, im Vergleich zu einer mit PBS behandelten Kontrollgruppe getestet. Während der akuten Testung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den IL-2 behandelten Tieren. Allerdings war in der mit der geringsten Dosis behandelten Gruppe nach 30 Min. eine deutliche Reduktion in der Aufenthaltszeit im Zentrum der Arena zu beobachten. Die geringste Dosierung (0,1 ng IL-2) führte in der zweiten Testung (OF 2) zu einer signifikanten Reduktion der Aufenthaltszeit im Zentrum des OF im Vergleich zu der höheren Dosis oder der Kontrollgruppe. Des Weiteren zeigten beide mit IL-2 behandelten Gruppen am ersten Testtag (OF 1) signifikant weniger freies Aufrichten (Exploration) verglichen mit der Kontrollgruppe. Ferner zeigten sich an beiden Testtagen keine Unterschiede in der Lokomotion.

Eine potentielle Erklärung für die verzögerten Effekte von IL-2 auf angstähnliches Verhalten ist die Möglichkeit, dass IL-2 zeitverzögert wirkt. In einem zweiten Experiment wurden die Ratten aufgrund der Ergebnisse des ersten Experimentes direkt nach der Injektion (mit 0; 0,01; 0,1 ng IL-2) zurück in ihren Gruppenkäfig gesetzt und erst 24 (OF 1) und 48 Stunden (OF 2) nach der Injektion im OF getestet. Weder an OF 1 noch an OF 2 konnten signifikante Verhaltensunterschiede festgestellt werden. Es kann also angenommen werden, dass niedrig dosiertes, striatal verabreichtes IL-2 bis zu 24 Stunden lang angstähnliches Verhalten beeinflusst. Diese Effekte können allerdings nur beobachtet werden, wenn die Verabreichung von IL-2 vorher mit einem milden Stressor (hier die neue Umgebung des OF) gepaart wurde. Eine zeitverzögerte Substanzwirkung von striatal injizierten IL-2 kann aufgrund der Ergebnisse des zweiten Experiments, zumindest unter den vorliegenden Bedingungen, ausgeschlossen werden.

3.3 Fragestellung Artikel 2

Ein Zusammenhang zwischen IL-2 und depressiven Störungen im Humanbereich und depressivähnlichem Verhalten im Tiermodell wurde schon mehrfach demonstriert. Basierend

auf der dargestellten Literatur und den beschriebenen Vorstudien wird in **Artikel 2** der Frage nachgegangen, inwiefern IL-2 einen Einfluss auf neurochemische Prozesse und angst- und depressivähnliches Verhalten ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-2 im Rahmen einer Krebstherapie bei Menschen zu depressiven Symptomen führte. Darüber hinaus existieren Hinweise, dass sich IL-2 auf depressions- und angst-relevante Neurotransmitter wie DA und 5-HT auswirkt. Basierend auf der Annahme der Monoamin-Hypothese der Depression (depressive Erkrankungen gehen mit einer Reduktion von Monoaminen im Gehirn einher), wird hier angenommen, dass IL-2 ebenfalls zu einer Reduktion von DA und 5-HT führt und auf diesem Wege depressivähnliche Symptome auslöst.

Wie schon beschrieben, sind verschiedene Gehirnareale mit der Pathogenese depressiver Erkrankungen assoziiert. Wiederholt konnte eine Beteiligung kortikaler Strukturen beobachtet werden. In der vorliegenden Studie soll die Auswirkung einer geringen peripher injizierten Dosis IL-2 (2,5 µg) auf die Neurotransmitter DA und 5-HT in verschiedenen Kortexarealen (präfrontal, temporal und okzipital) mittels der Methode der Mikrodialyse (Exp. 1; genaue Beschreibung S. 42f.) untersucht werden. Aufgrund des unbekanntem Wirkfensters von IL-2 wurden in einem Zeitraum von 3 Stunden alle 20 Minuten Proben entnommen.

Die Ergebnisse der Mikrodialysestudie konnten die Hypothese bestätigen und gaben weitere Hinweise auf den Wirkungsverlauf von IL-2. Nach circa 40 Minuten zeigten sich erste Reduktionen im 5-HT-Level in den verschiedenen Kortexarealen, die nach ungefähr 120 Minuten ihr Maximum erreichten.

Zur Messung der behavioralen Konsequenzen dieser neurochemischen Veränderungen wurden in zwei weiteren Experimenten die Auswirkungen von peripher verabreichtem IL-2 auf angst- (EPM) und depressivähnliches Verhalten (FST) untersucht. Bei diesen beiden Experimenten wurden verschiedene Dosierungen verwendet (1; 2,5 und 5 µg/kg IL-2), bei denen bei mindestens einer Dosierung eine anxiogen-ähnliche bzw. depressiogen-ähnliche Wirkung erwartet wurde. Parallel zu der ersten hier vorgelegten Studie (Karrenbauer et al., 2009; **Artikel 1**) und der Untersuchung von Pawlak et al. (2006) wäre auch hier von einer biphasischen Wirkungsweise von IL-2 auszugehen. Bei einer biphasischen Wirkung von IL-2 wäre bei einer niedrigen Dosierungen eine anxiogen-ähnliche, bzw. depressivähnliche und bei einer hohen Dosierungen eine anxiolytisch-ähnliche, bzw. antidepressiv-ähnliche Wirkung zu erwarten. Ferner wurde aufgrund der Ergebnisse der Mikrodialyse angenommen, dass IL-2 parallel zu dem zeitlichen Verlauf der neurochemischen Veränderungen emotionsähnliches Verhalten beeinflusst und somit nicht akut sondern mit einer Verzögerung von ungefähr zwei

Stunden auf das Verhalten wirkt. Von daher wurde in dieser Studie in zwei separaten Experimenten die Wirkung von IL-2 auf depressiv-ähnliches Verhalten akut (5 Minuten; Exp. 2a) und zeitverzögert, zwei Stunden (Exp. 2b) nach der Injektion im FST getestet. In einem weiteren Experiment wurde zusätzlich der potentielle Einfluss von IL-2 auf angstähnliches Verhalten mit einer Zeitverzögerung von zwei Stunden überprüft (Exp.3).

3.3.1 Mikrodialyse und Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie⁹

Mikrodialyse

Die Mikrodialyse-Technik ist eine Methode zur Gewinnung von Proben zur Messung von Neurotransmitterkonzentrationen in einem definierten Gehirnareal im lebenden Organismus. Diese Methode kann sowohl am anästhesierten Tier, was durch Lokomotion verursachte Artefakte ausschließt, als auch am wachen, frei beweglichen Tier durchgeführt werden. Letzteres hat den Vorteil, dass die erhobenen neurochemischen Daten direkt mit beobachtbarem Verhalten in Verbindung gebracht werden können. Einschränkend ist zu erwähnen, dass aufgrund der Mikrodialyseprozedur nicht alle Verhaltensparadigmen für eine parallele Erhebung geeignet sind.

Das Prinzip der Mikrodialyse basiert auf der Diffusion von Molekülen entlang eines Konzentrationsgradienten zwischen zwei durch eine Membran getrennte

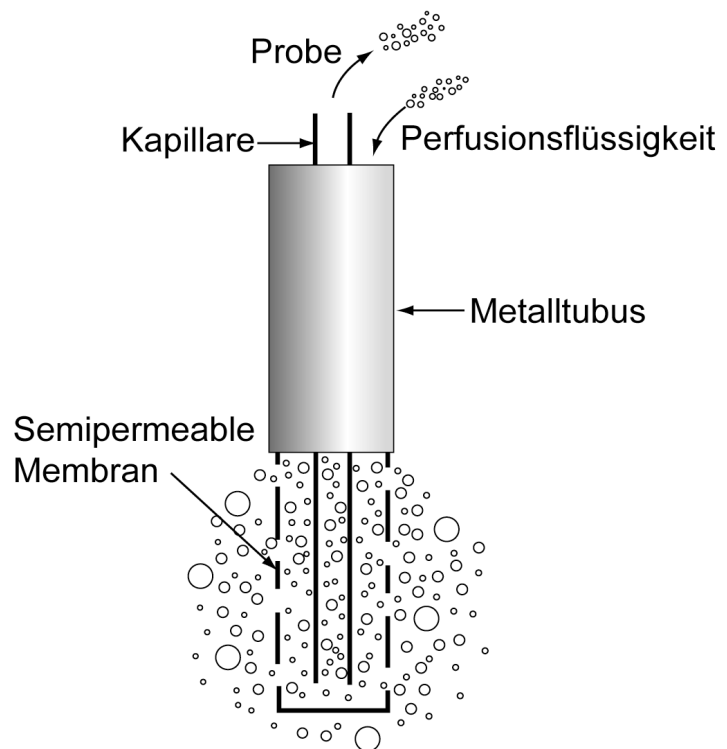


Abbildung 5: schematische Darstellung einer bei der Mikrodialyse verwendeten Kanüle

⁹ Diese Methoden wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Christian P. Müller, Universität Erlangen, Institut für Psychiatrie und Psychotherapie, durchgeführt.

Kompartimente. Ist das eine Kompartiment eine implantierte, mit isotonischer Flüssigkeit durchspülte Sonde mit einer Membran am unteren Ende und das andere Kompartiment der extrazelluläre Raum, so können aufgrund von Konzentrationsunterschieden extrazelluläre Substanzen in die Sonde diffundieren. Es wird davon ausgegangen, dass innerhalb der Membran die extrazelluläre Zusammensetzung widergespiegelt wird und somit Proben entnommen und Neurotransmitterkonzentrationen analysiert werden können.

Bei der Mikrodialyse wird eine Sonde mit einer semipermeablen Membran am unteren Ende mittels stereotaktischer Operation (s.o.) in ein definiertes Zielgebiet implantiert. Wie schon im Zusammenhang mit der Mikroinjektion beschrieben, werden auch hier Führungskanülen implantiert, um das Einsetzen der Messsonden zu erleichtern. Eine der am häufigsten verwendeten Sondenarten ist die konzentrische Parallelförmigkeit. Diese Sonde besteht aus einem Metalltubus und einer zylinderförmigen semipermeablen Dialysemembran, die am unteren Ende verschlossen ist (Abb. 5). Die Membran kann so gewählt werden, dass nur Moleküle bestimmter Größe hindurch diffundieren können, was die Verunreinigung der Probe durch unerwünschte Moleküle verhindert. Die Sonde wird mit einer isotonischen Kochsalzlösung (Perfusionsflüssigkeit) durchspült, die in ihrer groben Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit ähnelt. Der Metalltubus mündet in einen Plastikschlauch, durch welchen die Perfusionsflüssigkeit zur Membran gepumpt wird. Aufgrund der passiven Diffusion wird davon ausgegangen, dass es möglich ist, das Milieu des Extrazellulärraumes innerhalb der Sonde abzubilden und als Proben zu entnehmen. Die Proben werden über die im Inneren von Membran, Tubus und Plastikschlauch befindliche Kapillare entnommen. Diese Kapillare verlässt nach einigen Zentimetern den Plastikschlauch und läuft parallel zu ihm. Am Ende der Kapillare kann dann die Probe in Eppendorfgefäßen aufgefangen werden.

Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. High Pressure/Performance Liquid Chromatography, HPLC) ist eine Methode zur Bestimmung von Konzentrationen von z.B. klassischen Neurotransmittern, Neuropeptiden und Peptiden. Die gesamte Analyse besteht aus zwei Teilschritten: 1. die Auftrennung der Probe in ihre Bestandteile, also der Chromatographie und 2. der Substanzanalyse. Unter Chromatographie wird im Allgemeinen die Auftrennung von Stoffen in ihre Bestandteile anhand ihrer Verteilung zwischen zwei Phasen verstanden, der mobilen und der stationären Phase (siehe Abb. 6). Die Probe wird in einem Antioxidans-Probengefäß aufgefangen, wodurch die Neurotransmitter vor weiterer

Oxidation geschützt werden sollen. Restliche feste Partikel werden abzentrifugiert und gefiltert. Die Probe wird dann in den Fließmittelkreislauf (mobile Phase) der HPLC injiziert und gelangt so zu der Trennsäule oder auch stationären Phase. Die verschiedenen Probenbestandteile weisen unterschiedliche Charakteristika (z.B. Molekülgröße oder Ladung) auf; dies führt zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial in der Trennsäule, welches unterschiedliche Verweilzeiten (Retentionszeit) in der stationären Phase zur Folge hat, so dass die Bestandteile auf diesem Wege aufgetrennt werden können. Durch

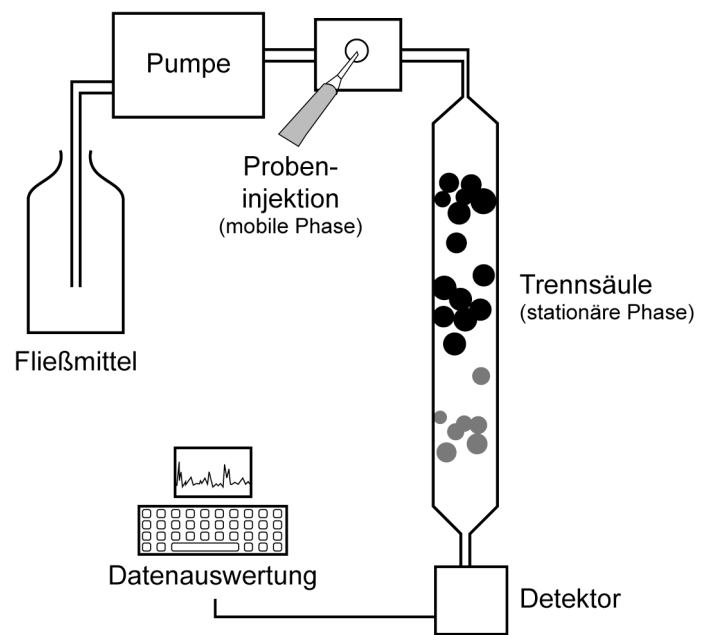


Abbildung 6: Schematische Darstellung der HPLC-Analyse
(Graphik modifiziert in Anlehnung an die Dissertation von Frau Verena Klose, geb. Ludwig, 2007;
unveröffentlichte Dissertation der Universität Marburg; Ludwig, 2007)

die Verwendung von Standardlösungen, die jeweils nur eine Substanz enthalten, kann die jeweilige Retentionszeit einer Substanz bestimmt werden. Dieses Ergebnis ist allerdings nur die Auftrennung des Substanzgemisches in seine Bestandteile.

Der zweite Teilschritt, die quantitative Analyse der Bestandteile, kann mittels verschiedener Methoden erfolgen. In der vorliegenden Studie wurde ein elektrochemischer Detektor (electrochemical detector, EC) verwendet. Dieser Detektor misst Spannungsänderungen in einem angelegten Stromfluss, die durch die zu messenden Stoffe verursacht werden. Diese Veränderungen können festgehalten und mittels eines Integrators als Kurven, auch „Peaks“ genannt, aufgezeichnet werden. Mit Hilfe der externen Standardlösungen, die

eine definierte Menge der zu analysierenden Substanz enthalten, kann nun eine Standardkurve erzeugt werden. Da sich die Spannungsveränderung proportional zur Menge der Substanz in einer Probe verhält, kann durch den Vergleich der Standardkurve mit der Kurve der Probe die quantitative Substanzmenge bestimmt werden.

3.4 Artikel 2: Time-dependent in-vivo effects of Interleukin-2 on neurotransmitters in various cortices: Relationship and effects on depressive-related and anxiety-like behaviour.

Einige Arbeiten weisen auf einen Zusammenhang zwischen IL-2 und psychischen Störungen wie Depression und Angststörungen hin. Ferner zeigten sich auch im Tiermodell Auswirkungen von IL-2 auf angst- und depressivähnliches Verhalten. Des Weiteren beeinflusst IL-2 neurochemische Prozesse, die mit psychischen Störungen wie Angststörungen und depressiven Störungen in Zusammenhang gebracht werden (siehe S.17; S. 21 f.).

In der vorliegenden Studie wurden die potentiellen neurochemischen Veränderungen, induziert durch die periphere Verabreichung von IL-2, mittels der Methode Mikrodialyse und HPLC-EC untersucht. Hierzu wurden drei Führungskanülen in den drei Kortexarealen (präfrontal, okzipital, temporal; genaue Koordinaten in **Artikel 2**) implantiert. Die Mikrodialysesonden wurden kurz vor Experimentbeginn eingesetzt. Nach zwei Baselinemessungen wurde einmalig IL-2 (2,5 µg/kg; i.p.) injiziert und alle 20 Minuten für eine Gesamtdauer von drei Stunden entnommen. Es zeigte sich, dass schon eine einmalige Injektion von 2,5 µg/kg IL-2 im Vergleich zu Vehikelkontrollen die extrazelluläre serotonerge in-vivo Transmission in unterschiedlichen Kortexarealen reduzierte (medialer Präfrontalkortex -75%, Okzipitalkortex -75%, Temporalkortex -45%). Die ersten Veränderungen im serotonergen System traten nach ca. 40 Minuten ein, verstärkten sich mit zunehmender Dauer, erreichten nach 120 Minuten ihr Maximum und hielten bis zum Ende der Testung (drei Stunden nach der Injektion) unvermindert an. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein ungefähres Zeitfenster ablesen, mit maximalen Effekten ungefähr zwei Stunden nach der Injektion, währenddessen IL-2 aktiv auf die serotonerge Neurotransmission wirkt. Für DA ließ sich eine moderate Reduktion lediglich im medialen Präfrontalkortex nachweisen.

In Anlehnung an die Zytokin-Hypothese der Depression und der These, dass Zytokine über eine serotonerge Manipulation depressive Störungen beeinflussen können, wurde

weiterhin untersucht, ob Veränderungen im depressivähnlichen Verhalten im Forced Swim Test dosis- und zeitabhängig parallel zu den serotonergen Verringerungen auftraten. Hypothesenkonform zeigten die Ergebnisse keine Veränderungen des Verhaltens bei unmittelbarer Testung nach IL-2 Gabe (Exp. 2a), jedoch dosisabhängig (1, 2,5 und 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) eine Veränderung im depressivähnlichen Verhalten gegenüber den Kontrolltieren zwei Stunden nach IL-2-Behandlung (Exp. 2b). IL-2 führte hier speziell in der Gruppe die mit der niedrigsten Dosierung (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) behandelt wurde zu einem signifikanten Anstieg des Immobilitätsverhaltens. Aufgrund der hohen Komorbidität zwischen Angst und Depression und der Effektivität serotonerger Substanzen in der Therapie von Angststörungen wurden die Effekte von IL-2 auf angstähnliches Verhalten im EPM getestet. Hier zeigten sich, zwei Stunden nach der IL-2 Behandlung, keine Effekte von IL-2 auf angstähnliches Verhalten. Diese Ergebnisse geben erstmals Hinweise auf den Zusammenhang zwischen verminderten 5-HT-Konzentrationen und parallel dazu depressions-relevanten Verhaltensänderungen im FST nach Zytokinbehandlung mit IL-2.

4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Dissertation vorgelegten Studien konnten weitere Hinweise für eine Beteiligung von IL-2 an emotions- und motivationsähnlichen Verhaltensweisen liefern. Es zeigte sich, dass IL-2 neurochemische Veränderungen hervorruft, welche mit psychischen Erkrankungen aus dem Formenkreis Angst und Depression assoziiert werden.

Die vorliegende Arbeit liefert weitere Hinweise auf einen funktionalen Zusammenhang zwischen angstähnlichem Verhalten im OF und striatalem IL-2 und unterstützt so die Thesen von Pawlak et al. (2003, 2005) und Pawlak & Schwarting (2006a). In **Artikel 1** führte eine striatale Mikroinjektion der geringsten Dosierung (0,1 ng/kg) zeitverzögert zu einer Vermeidung des Zentrums des OF (anxiogen-ähnliche Wirkung) welche auch 24 Stunden nach der Injektion zu beobachten war. Dieser Effekt war nicht durch Unterschiede in der Lokomotion oder durch einen proaktiven Wirkungsmechanismus zu erklären. Ferner wirkte sich die Gabe von IL-2 in der geringsten Dosierung hemmend auf die Exploration (freies Aufrichten) aus.

In der zweiten Studie wurde erstmalig die Auswirkung von systemisch injiziertem IL-2 auf die Neurotransmission von 5-HT und DA in verschiedenen Kortextbereichen demonstriert. Hier zeigten sich eine zum Teil gravierende Reduktion von 5-HT im präfrontalen (-75%), okzipitalen (-70%) und temporalen (-45%) Kortext. Für DA konnte eine moderate Reduktion im präfrontalen Kortext nachgewiesen werden. Ferner weisen diese Ergebnisse auf ein Wirkungszeitfenster von IL-2 auf neurochemische Prozesse (5-HT und DA) in kortikalen Arealen hin. In dieser Arbeit wurde zusätzlich zum ersten Mal die Wirkung von IL-2 auf depressivähnliches Verhalten im FST getestet. Es zeigte sich, dass IL-2 sich dosis- (1 µg/kg IL-2) und zeitabhängig (zwei Stunden Postinjektion) auf dieses Verhalten auswirkt. Diese Ergebnisse liefern, aufgrund der im gleichen Wirkungszeitfenster (zwei Stunden Postinjektion), auftretenden depressivähnlichen und neurochemischen Effekte, mögliche Hinweise auf einen zugrundeliegenden serotonergen Mechanismus, obgleich eine Ursache-Wirkungsfolge nur hypothetisch formuliert werden darf. Entgegen der Erwartung ließ sich kein Unterschied zwischen den IL-2 behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe im angstähnlichen Verhalten im EPM feststellen.

Diese Studien verdeutlichen das Potential von IL-2 neurochemische Prozesse zu beeinflussen und dass diese Modulation einem zeitlichen Verlauf folgt. Ferner belegen diese Studien die Auswirkung von IL-2 auf emotionsähnliches Verhalten. Die Ergebnisse der

vorgelegten Studien sollen im Weiteren vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes diskutiert werden.

4.1 Neurochemische Veränderungen

Eine einmalige systemische IL-2 Injektion führte zu signifikanten Reduktionen von 5-HT und DA in verschiedenen Kortexarealen. Über welchen Mechanismus peripher injiziertes IL-2 eine Reduktion von 5-HT im Gehirn verursacht, konnte bis heute nicht geklärt werden und darüber lässt sich auch im Kontext der hier vorliegenden Ergebnisse lediglich spekulieren. Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diese gravierende Reduktion von 5-HT in allen erhobenen Kortexbereichen sind in **Artikel 2** diskutiert worden und sollen hier nur kurz umrissen werden. Aus der momentanen Forschungslage kristallisieren sich drei mögliche Erklärungsansätze heraus: 1. IL-2 erhöht, eventuell indirekt über die Stimulation von IFN- α , die Verfügbarkeit von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), das erste Enzym zum Abbau von Tryptophan, und führt somit zu einer verringerten Verfügbarkeit von Tryptophan und zu einer reduzierten Synthese von 5-HT. 2. Verschiedene proinflammatorische Zytokine können zu einem Anstieg von Serotonintransportern (5-HTT) führen und dementsprechend die Wiederaufnahme von Serotonin in die Zellen beschleunigen, was zu einem geringeren extrazellulären 5-HT-Level führt. Ob IL-2 auch einen Anstieg von 5-HTT induziert, ist allerdings noch nicht erforscht. 3. IL-2 kann zu einer verringerten Nahrungsaufnahme und darüber ebenfalls zu einer reduzierten Tryptophanaufnahme führen. Letztere Erklärungsmöglichkeit kann bei der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da hier anästhesierte Tiere verwendet wurden (Karrenbauer et al., eingereicht; **Artikel 2**).

Ferner wurde auch eine im Vergleich zu 5-HT weniger stark ausgeprägte Reduktion von DA im präfrontalen Kortex beobachtet. Wie schon eingangs diskutiert, wird auch DA mit emotionalen Prozessen assoziiert (Millan, 2003). Eine Studie konnte eine negative Korrelation zwischen der dopaminergen Aktivität in den Basalganglien und der Schwere der depressiven und Angstsymptome bei Parkinsonpatienten feststellen (Weintraub et al., 2005). Die vorliegende Studie bestätigt den Einfluss von IL-2 auf die dopaminerge Neurotransmission und demzufolge auch Ergebnisse aus früheren Studien (siehe S. 10f.). Es existieren Hinweise, dass IL-2 direkt mittels präsynaptischer Rezeptoren (Alonso et al., 1993) oder indirekt, durch den Einfluss auf Interneurone, auf dopaminerge Zellen wirkt (Petitto et al., 1997). Zalzman (2002) beobachtete einen funktionalen Zusammenhang zwischen IL-2, DA und Verhalten: Ein IL-2-induzierter Anstieg im Kletterverhalten von Mäusen ließ sich

durch Gabe von selektiven dopaminergen Antagonisten blocken. Allerdings waren diese Effekte erst nach einer fünftägigen Verabreichung von IL-2 zu beobachten, eine einzelne Injektion von IL-2 führte zu keinen Veränderungen (Zalcman, 2002). Überdies führte eine chronische Verabreichung von IL-2 über 14 Tage zu einer Reduktion dopaminerger Rezeptorbindung im präfrontalen Kortex und im Nucleus accumbens (Hanisch et al., 1997). Allerdings arbeiteten die aufgeführten Studien entweder mit in-vitro Modellen oder applizierten IL-2 chronisch über mehrere Tage, so dass sie mit der hier diskutierten Arbeit nur sehr eingeschränkt vergleichbar sind. Der genaue Mechanismus wie IL-2 v.a. nach einer einmaligen Injektion zu einer Reduktion von DA im präfrontalen Kortex führen kann, ist bis heute ungeklärt.

4.2 Übertragbarkeit der Ergebnisse der Mikrodialyse auf die Verhaltenstests

Verschiedene Faktoren können die Übertragbarkeit der Mikrodialysedaten auf die Verhaltensexperimente beeinträchtigen, da diese Untersuchungen in unterschiedlichen Laboren durchgeführt wurden. Dies allein kann aufgrund verschiedener Faktoren, wie z.B. eines anderen Tierlieferanten, Unterschieden in der Raumtemperatur etc. die Vergleichbarkeit von Experimenten beeinträchtigen.

Kritisch anzumerken ist, dass die Mikrodialyse während der Nachtphase und die Verhaltenstests während der Tagphase des Tag/Nacht-Rhythmus der Tiere durchgeführt wurden. Die Ausschüttung von Zytokinen (Lissoni et al., 1998; Vitkovic et al., 2000a) und Neurotransmittern unterliegt einer zirkadianen Rhythmik und das Verhalten der Tiere kann in Abhängigkeit von der Tageszeit variieren (Carobrez & Bertoglio, 2005). Allerdings existieren keine Untersuchungen, die den Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf eine zytokin-bedingte Neurotransmitterausschüttung detaillierter erforscht haben. Um die zirkadiane Rhythmik als mögliche Störvariable endgültig ausschließen zu können, müssten die Verhaltensexperimente während der Nachtphase der Tiere oder die Mikrodialyse in der Tagphase wiederholt werden.

Des Weiteren wurde die Mikrodialyse im Gegensatz zu den Verhaltensexperimenten an anästhesierten Tieren durchgeführt. Allgemein können Anästhesien einen Einfluss auf die basale Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter haben (De Souza Silva et al., 2007) was in Kombination mit der Verabreichung einer psychoaktiven Substanz zu Boden- oder Deckeneffekten führen kann. In der vorliegenden Studie wurde Urethan als Anästhetikum verwendet und in Bezug auf die hier gemessenen Neurotransmitter (5-HT und DA) sind bis

heute keinerlei Nebeneffekte bekannt (De Souza Silva et al., 2007). Auf der anderen Seite birgt ein Testen unter Anästhesie auch Vorteile. Sensorische Eindrücke, Erregung, Aufmerksamkeit und Lokomotion bringen Veränderungen in verschiedenen Neurotransmittersystemen mit sich, diese Störvariablen können durch die Anästhesie ausgeschaltet werden (De Souza Silva et al., 2007). Weiterhin wurden aufgrund des Kontrollgruppendesigns mögliche Auswirkungen der Anästhesie auf Neurotransmitterkonzentrationen weitestgehend kontrolliert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Anästhesie auf den Metabolismus von IL-2 auswirkt, was wiederum Unterschiede in der Neurotransmitterausschüttung zur Folge haben könnte.

Um den Verlust der implantierten Kanüle und anderen möglichen Verletzungen durch die Interaktion mit Artgenossen vorzubeugen, wurden die Tiere nach der Operation (Implantation der Führungskanüle der Mikrodialysesonde) in Einzelkäfigen gehalten, während in den Verhaltensexperimenten des 2. Artikels die Haltung in Gruppen erfolgte. Es konnte gezeigt werden, dass die Haltungsbedingungen einen starken Einfluss auf das Verhalten haben. Allerdings beschäftigen sich ein Großteil der Studien mit den Effekten von Jungtierisolationen (Fone & Porkess, 2008), während in den vorliegenden Studien adulte Tiere für einen Zeitraum von maximal einer Woche isoliert wurden.

Die vorliegende Mikrodialysestudie ist die erste Studie, welche Neurotransmitterveränderungen im Kortex als Reaktion auf eine periphere Injektion von speziesspezifischen IL-2 misst. Diese Ergebnisse liefern aufschlussreiche Indizien, über welchen neurochemischen Mechanismus IL-2 zu Veränderungen im Verhalten führen kann und geben Hinweise für das psychoaktive Wirkungsfenster von IL-2. Somit liefern diese Ergebnisse trotz einiger Unterschiede in der Methodik interessante Hinweise für nachfolgende neurochemische und Verhaltensexperimente.

Zukünftige Untersuchungen sollten sich auf weitere Dosierungen (v.a. die hier verhaltenseffektive Dosierung von 1 µg/kg) von IL-2 konzentrieren. Des Weiteren können Mikrodialysestudien am wachen freibeweglichen Tier die Einschränkungen der Anästhesie aufheben und in Kombination mit Verhaltenserhebungen wie z.B. mit dem OF oder dem EPM könnten neurochemische Daten direkt mit dem Verhalten assoziiert werden. Ferner wäre es hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen IL-2, Neurotransmittern und zirkadianer Rhythmik aufschlussreich, die Mikrodialysestudie in der Tagphase der Tiere zu wiederholen.

4.3 Angst

Basierend auf der aktuellen Literatur und Vorstudien (Pawlak & Schwarting, 2006a) wurde die Hypothese aufgestellt, dass striatal und systemisch injiziertes IL-2 angstähnliches Verhalten beeinflusst.

4.3.1 Striatal injiziertes IL-2 und Verhalten im Offenfeld

In **Artikel 1** (Karrenbauer et al., 2009) zeigte sich, dass striatales IL-2 in einer sehr geringen Dosierung zu einer verringerten Aufenthaltszeit im Zentrum des OF führte. Diese angstähnlichen Effekte zeigten sich zuerst nach ca. 30 Minuten und waren auch am Folgetag noch nachzuweisen. In einem weiteren Experiment konnte mittels eines „proaktiven“ Designs ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf einer ausschließlich verzögerten Wirkung der Substanz beruht. Nur im ersten Experiment, in welchem die Tiere akut in einer moderat aversiven Situation (OF) getestet wurden, zeigten sich Unterschiede im angstähnlichen Verhalten. Ferner wurden Unterschiede im spezifischen Aktivitätsverhalten der Tiere beobachtet. IL-2 behandelte Tiere wiesen signifikant weniger freies Aufrichtverhalten auf als die Kontrollgruppe.

Obwohl das Striatum als kritische Struktur für die Regulation von Bewegungsabläufen angesehen wird (Grillner et al., 2008), beruhen die Effekte nicht auf IL-2-induzierten Veränderungen der generellen (horizontalen) Lokomotion, wie bereits in anderen Studien (Pawlak & Schwarting, 2006a; Petitto et al., 2002) gezeigt wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese aus der Vorstudie von Pawlak et. al. (2006), dass IL-2 dosisabhängig angstähnliches Verhalten verändert.

Ferner sind diese Ergebnisse teilweise konkordant mit dem neurochemischen serotonergen Profil, welches in **Artikel 2** beschrieben wurde. Demnach waren die ersten Effekte von systemisch injiziertem IL-2 auf 5-HT nach ca. 40 Minuten zu erkennen. Diese serotonerge Reduktion erreichte ihr Maximum ca. 120 Minuten nach der Injektion und blieb für die restliche Versuchsdauer stabil (insgesamt drei Stunden). Die neurochemischen Effekte von IL-2 nach 24 Stunden wurden leider bisher noch nicht untersucht. Erste Hinweise liefert eine Studie von P. Schneider et al. (2010), welche neurochemische Veränderungen noch 24 Stunden nach der Verabreichung von IL-2 nachweisen konnten. In einem intra-individuellem Ansatz wurden anästhesierte Ratten im Abstand von einer Woche zwei Mal in einem 1H-MRS (Protonen Magnetresonanz Spektrographie) 9.4 Tesla Scanner gemessen. In der

Baselinemessung blieben die Tiere unbehandelt, während 24 Stunden vor der zweiten Messung den Tieren IL-2 (2,5 µg/kg; i.p.) verabreicht wurde. Hier zeigten sich Veränderungen in verschiedenen Metaboliten (z.B. Glutamat, Glutamin, Kreatin, Myo-Inositol) im präfrontalen Kortex und von Myo-Inositol (ein endogenes Polyol, relevant für verschiedene Second Messenger) im Hippocampus. Darüber hinaus zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Myo-Inositol und angstähnlichem Verhalten im EPM. Myo-Inositol wurde schon in verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Studien mit affektiven und Angststörungen und angst- und depressivähnlichem Verhalten assoziiert (Cecil et al., 2003; Einat & Belmaker, 2001; Palatnik et al., 2001; Shaldubina et al., 2006). Hierzu wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, Ratten vom gleichen Stamm (Wistar) und Hersteller sowie spezies-spezifisches IL-2 verwendet.

Die Ergebnisse der Mikrodialyse sind nicht direkt mit den Verhaltenseffekten im OF zu vergleichen, da sie sich in verschiedenen methodischen Aspekten (z.B. der Applikation von IL-2) grundlegend unterscheiden, aber sie geben einen entscheidenden Hinweis auf den möglichen zugrundeliegenden Wirkmechanismus.

Die Frage, warum die Effekte von IL-2 auf angstähnliches Verhalten verstärkt am zweiten, substanzfreien Testtag zu beobachten waren bzw. ob und inwiefern die Gabe von IL-2 mit der Erfahrung eines leichten bis moderaten Stressors (wie hier einer neuen Umgebung) gekoppelt werden muss, um zu angstähnlichen Effekten zu führen, kann bis heute nicht befriedigend erklärt werden.

In Folgeexperimenten sollte die Mikrodialyse im OF an wachen frei beweglichen Tieren durchgeführt werden, um den Zusammenhang zwischen neurochemischen Veränderungen und Verhalten besser beurteilen zu können. Ferner kann die Relevanz der ersten Erfahrung im OF durch eine Testung von IL-2 an OF-erfahrenen Tieren (wiederholte substanzfreie Testung) erhoben werden.

4.3.2 Peripher injiziertes IL-2 und Verhalten im erhöhten Plus-Labyrinth

Aufgrund der Tatsache, dass das Wirkungsprofil von IL-2 noch weitgehend unerforscht ist, besteht die Möglichkeit, dass Testungen zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurde, an dem IL-2 noch nicht seine maximale Wirkungspotenz entwickelt hatte. Dies könnte zum Teil die weniger eindeutigen Ergebnisse der Vorstudie (Pawlak & Schwarting, 2006a) und des ersten hier vorgelegten Artikels (Karrenbauer et al., 2009) erklären. Die Ergebnisse der

Mikrodialyse lieferten einen Hinweis auf ein psychoaktives Wirkungsfenster. Ein Zusammenhang zwischen 5-HT und Angst wurde mehrfach belegt, weswegen ein serotonerger zugrundeliegender Mechanismus angenommen werden könnte. In **Artikel 2** wurde von daher die Hypothese überprüft, ob IL-2 erst nach einer Postinjektionsphase von ca. zwei Stunden seine Wirkung auf angstähnliches Verhalten entfaltet. Entgegengesetzt zu dieser These konnten weder am ersten noch am zweiten Testtag Effekte von IL-2 auf angstähnliches Verhalten im EPM nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen zum Teil andere Studien, bei denen weder nach einmaliger noch wiederholter Verabreichung ein Effekt von IL-2 auf angstähnliches Verhalten gefunden wurde (Anisman et al., 2002). Allerdings wurden bei diesen Studien die Effekte von IL-2 niemals mit einer Zeitverzögerung getestet. Zur Gewinnung weiterer Informationen über einen möglichen zugrundeliegenden Mechanismus wäre eine Mikrodialyse am wachen, frei beweglichen Tier während einer EPM Testung nötig. Hierbei wäre zusätzlich die Erhebung weiterer Neurotransmitter wie GABA oder NE hilfreich. Der Zusammenhang zwischen striatal injiziertem IL-2 und angstähnlichem Verhalten, bzw. ob den IL-2-induzierten Effekten ein serotonerger Mechanismus zugrunde liegt, bleibt weiterhin im Detail unklar.

Wird das Verhalten im EPM serotonerg vermittelt?

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen IL-2-induzierter angstähnlicher Effekte im EPM (**Artikel 2**) könnte sein, dass das im EPM gemessene Verhalten nicht durch 5-HT gesteuert wird. Tierexperimentelle Studien der letzten Jahre wiesen unterschiedliche Ergebnisse auf (z.B. Köks et al., 2001; Canto-de-Souza et al., 2002; Holmes et al., 2003; Pinheiro et al., 2007). In einigen Studien führte die Verabreichung des SSRIs Fluoxetin zu anxiogen-ähnlichen Effekten im EPM, also einer Reduktion der Aufenthaltszeit auf den offenen Armen (Silva et al., 1999). Andere Studien fanden keine Auswirkungen auf angstähnliches Verhalten im EPM, (z.B. Borsini et al., 2002). Basierend auf diesen gegensätzlichen Ergebnissen wurde von Borsini et al. (2002) geschlossen, dass die prädiktive Validität des EPM eventuell auf Benzodiazepine beschränkt ist.

In klinischen Studien an Menschen konnte allerdings gezeigt werden, dass die akute Verabreichung von SSRIs einen Anstieg der Angstsymptomatik auslöste, während eine chronische Behandlung zu einer Milderung führte (Kent et al., 1998). Auch bei gesunden Probanden hatte eine akute Verabreichung des SSRIs Citalopram Auswirkungen auf die Verarbeitung angstbesetzter Stimuli (Browning et al., 2007). Diese gegensätzlichen Effekte

bei akuter versus chronischer Verabreichung von SSRIs zeigten sich auch tierexperimentell in verschiedenen Paradigmen wie Furchtkonditionierung und erhöhtes T-Labyrinth (Burghardt et al., 2004; Gomes et al., 2009).

In Gegensatz zu den Thesen von Borsini et al. (2002) zeigen verschiedene tierexperimentelle Studien eine Beteiligung von 5-HT an dem im EPM gemessenen Verhalten (den Boer & Westenberg, 1996; Handley & McBlane, 1993; Pinheiro et al., 2007). Eine weitere zeigte, dass eine 82-prozentige Reduktion von 5-HT im präfrontalen Kortex mit einer Erhöhung von angsthähnlichem Verhalten im EPM einherging (Pum et al., 2009). Zusätzlich konnten einige der wenigen Langzeitstudien konsistente anxiolytische Effekte nach einer chronischen Verabreichung eines 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten (NAN-190; Fedotova et al., 2004) und eines 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten (Gepirone) bei Ratten nachweisen (Maisonnette et al., 1993; Motta et al., 1992; Silva & Brandao, 2000). Diese Studien zeigen eine Beteiligung des serotonergen Systems an, im EPM gemessenen, angsthähnlichen Verhalten. Allerdings führten serotonerge Agonisten als auch Antagonisten zu anxiolytisch-ähnlichen Effekten, so dass der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht geklärt ist.

Wie schon anfänglich erwähnt, spielen bei der Vermittlung von Angst und angsthähnlichem Verhalten viele Neurotransmitter eine Rolle (Clement & Chapouthier, 1998; Millan, 2003). Zum Beispiel zeigt IL-2 Auswirkungen auf andere angstrelevante Neurotransmitter wie GABA (Bhatt et al., 2005) oder NE (Lacosta et al., 2000; Zalzman et al., 1994).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass IL-2-induzierten angsthähnlichen Effekten ein serotonerger Mechanismus zugrunde liegt, sollten in zukünftigen Studien Paradigmen verwendet werden, bei denen eine serotonerge Beteiligung am gemessenen Verhalten besser gesichert ist. Ein geeigneter Kandidat wäre der „Novelty Suppressed Feeding“-Test, von dem angenommen wird, dass das gemessene Verhalten auf die Aktivierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren zurückgeht (Gross et al., 2002; Santarelli et al., 2003). Ein weiterer relevanter Test könnte das erhöhte T-Labyrinth sein. Es konnte gezeigt werden, dass einige serotonerg wirkende Substanzen, die im klinischen Bereich effektiv bei der Behandlung von Angststörungen eingesetzt wurden, sich im erhöhten T-Labyrinth positiv auf das angsthähnliche Verhalten auswirkten, obwohl sie im EPM zu keinen Effekten führten (Gomes et al., 2009; Pinheiro et al., 2007).

IL-2 wirkt auf furcht- und nicht auf angstähnliches Verhalten

Eine potentielle Erklärung für die verstärkten Effekte von IL-2 im OF 24 Stunden nach der Injektion in **Artikel 1** (Karrenbauer et al., 2009) und bei Pawlak et al. (2006) liegt in der Möglichkeit, dass IL-2 eventuell eher auf furcht- und kaum auf angstähnliches Verhalten wirkt.

Wie eingangs erläutert, kann zwischen Angst und Furcht unterschieden werden. Diese Differenzierung kann auch im EPM vorgenommen werden. Es existieren Hinweise darauf, dass sich das gemessene Verhalten, bei einer wiederholten Testung qualitativ unterscheiden. Die theoretischen Überlegungen von z.B. Gray und McNaughton (2000) zusammen mit den neurochemischen Erkenntnissen (File & Zangrossi, 1993; File et al., 1993b) in Verbindung mit dem Phänomen der *One Trial Tolerance* könnten bedeuten, dass bei einer wiederholten Durchführung der erste Test (EPM 1) ein Maß für angstähnliches, während der zweite Test (EPM 2; 24 Stunden später) ein Maß für furcht- oder panikähnliches Verhalten liefert (Pawlak et al., im Druck; **Artikel 3**). Das bedeutet im Detail, dass Angst eine Annäherung an die Bedrohung zur Folge hat und durch klassische Anxiolytika (Benzodiazepine) beeinflusst wird. In verschiedenen Studien führte die Verabreichung dieser Substanzen am ersten Testtag (EPM 1) zu Veränderungen der Aufenthaltszeit auf den offenen Armen, dem Maß für angstähnliches Verhalten (z.B. Cruz-Morales et al., 2002; File & Zangrossi, 1993a). Auf der anderen Seite führt Furcht zu Flucht bzw. Panik vor der Bedrohung und kann durch serotonerge Substanzen (SSRIs, erfolgreich bei Behandlung von Panikstörungen, siehe Einleitung) manipuliert werden. Hier müsste folgerichtig die Verabreichung von serotonerg wirkenden Substanzen zu einer Veränderung des Verhaltens am zweiten Testtag führen. Hier konnten Studien zeigen, dass z.B. die Gabe eines serotonergen Agonisten am zweiten Testtag (EPM 2) die Aufenthaltszeit auf den offenen Armen veränderte, nur dass dieser Effekt eher als furcht- bzw. panikähnliches Verhalten bezeichnet werden kann (File et al., 1996; Gomes & Nunes-De-Souza, 2009). In tierexperimentellen Untersuchungen wurde zwar IL-2 wiederholt verabreicht, allerdings seine Auswirkungen bis heute nicht wiederholt im EPM oder OF getestet, weshalb hier keine vergleichbaren Daten vorliegen um diese These zu prüfen. Es wurde allerdings gezeigt, dass IL-2 sich auf das furchtkonditioniertes Verhalten auswirkt (Lee et al., 2008).

Eine Übersetzung der Überlegungen aus dem Tiermodell in den Humanbereich gelang Perkins et al. (2009). Hypothesekonform führte die anxiolytische Substanz Lorazepam (Benzodiazepin) zu einer Reduktion von defensivem Verhalten. Allerdings entgegen der

Erwartung hatte Citalopram (SSRI, welches erfolgreich zur Behandlung von Panikstörungen eingesetzt wird) keine Veränderungen im „Fluchtverhalten“ der Probanden zur Folge (Perkins et al., 2009).

Im Humanbereich existieren leider nur sehr wenige Studien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen IL-2 und Angst bzw. Angststörungen beschäftigen, und dementsprechend noch weniger Studien, die detailliert den Zusammenhang zwischen Panik und IL-2 erforschen. Rapaport und Stein (1994a) konnten ein leicht erhöhtes IL-2 Niveau bei Panikpatienten feststellen. In einer anderen Studie wiesen Patienten mit einer Panikstörung verglichen mit gesunden Probanden eine signifikant niedrigere Produktion von IL-2 auf (Koh & Lee, 2004). Allerdings zeigte sich in einer früheren Studie mit einer Stichprobe, die sich aus Patienten mit Panik- oder generalisierter Angststörung zusammensetzte, ebenfalls eine niedrigere IL-2-Produktion (Koh & Lee, 1998).

In Bezug auf die Ergebnisse im OF kann die These, dass IL-2 eher auf furcht-, als auf angstähnliches Verhalten wirkt, nur unter der Voraussetzung angenommen werden, dass der zweite Testtag beim OF, ähnlich wie beim EPM, eher ein Maß für furcht- statt für angstähnliches Verhalten darstellt. Der *One Trial Tolerance* Effekt konnte allerdings bis heute nur beim EPM und nicht beim OF beobachtet werden (Wehrmeister et al., 2010).

Einerseits können die fehlenden Effekte im EPM nach einer zweistündigen Verzögerung (Karrenbauer et al., eingereicht; **Artikel 2**) durch diese These nicht erklärt werden. Infolgedessen hätte IL-2 zumindest am zweiten Testtag zu Verhaltensveränderungen führen müssen. Andererseits besteht hier die Möglichkeit, dass die Wirkung schon so stark nachgelassen hat, dass die Effekte nicht mehr zu erkennen waren.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte IL-2 wiederholt im OF und EPM getestet werden, mit dem Fokus auf das Verhalten während des zweiten Testdurchlaufs. Zusätzlich wäre es sinnvoll, IL-2 am zweiten Testtag akut und mit einer Verzögerung von zwei Stunden zu testen, um an die neurochemischen Daten anzuknüpfen. Ferner würde sich auch ein Paradigma mit einer eindeutigeren Furchtkomponente wie z.B. die Furchtkonditionierung oder das T-Labyrinth anbieten.

4.4 Depression

Der Zusammenhang zwischen Zytokinen (speziell auch IL-2), 5-HT und depressiven Symptomen wurde schon mehrfach bestätigt (z.B. Capuron et al., 2002b; Capuron et al., 2000; Musselman et al., 2001). Auch tierexperimentelle Studien konnten Hinweise für eine

Verbindung zwischen IL-2 und depressivähnlichem und anhedonischem Verhalten liefern (Anisman et al., 2002; Anisman et al., 2005). Relativierend sollte zusätzlich erwähnt werden, dass auch Studien existieren, die keinen Zusammenhang zwischen Zytokinen, Depression und der Behandlung mit Antidepressiva beobachteten (Lesperance et al., 2004; Marques-Deak et al., 2007; Steptoe et al., 2003).

Basierend auf den Ergebnissen der Mikrodialysestudie (**Artikel 2**) wurden die Hypothesen getestet, ob peripher injiziertes IL-2 nach einer Verzögerung von ca. zwei Stunden depressivähnliches Verhalten im FST beeinflusst, sich aber bei einer akuten Testung keine Veränderungen beobachten lassen. Hypothesenkonform konnte gezeigt werden, dass sich die Verhaltensveränderungen nicht akut, sondern erst nach einer ca. zweistündigen Verzögerung abspielten.

Aufgrund der eingeschränkten Übertragbarkeit kann zwischen den neurochemischen Ergebnissen und den Verhaltenstests kein kausaler Zusammenhang hergestellt werden. Da allerdings die Verhaltensänderungen parallel zu neurochemischen Veränderungen zu beobachten waren, liefern die vorliegenden Daten erste Hinweise auf einen - zumindest teilweise - serotonerg beeinflussten Mechanismus. Somit passen die Ergebnisse zu der Vermutung, dass IL-2 über einen serotonergen Mechanismus die während einer Zytokinbehandlung beobachtbaren depressiven Symptome hervorruft (Wichers & Maes, 2002).

Patientenstudien berichteten mehrfach von effektiv mit SSRIs behandelten vornehmlich durch Interferone ausgelösten zytokin-induzierten depressiven Symptomen (Capuron et al., 2002b; Hauser et al., 2000; Leonard, 2001; Musselman et al., 2001). Ferner gingen diese Symptome mit verringerten Tryptophan- (Capuron et al., 2003; Capuron et al., 2002a) und 5-HT-Spiegel einher (Bonaccorso et al., 2002).

Es ist möglich, dass IL-2 direkt (Myint & Kim, 2003) oder indirekt über IFN- α (Schiller et al., 1993) 5-HT beeinflusst und auf diesem Wege depressivähnliche Symptome hervorrufen könnte (Myint et al., 2009). Dieser indirekte Weg spricht nicht gegen die Annahme, dass den IL-2-induzierten Effekten ein serotonerger Mechanismus zugrunde liegt, sondern verdeutlicht eher die Komplexität dieses Forschungsbereiches.

Neben der Tatsache, dass IL-2 erst nach einer Zeitverzögerung auf das depressivähnliche Verhalten wirkte, wurden auch dosisabhängige Effekte beobachtet. IL-2 führte im Vergleich zu der Kontrollgruppe in der geringsten Dosierung (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) im FST zu einem Anstieg im depressivähnlichen Verhalten. In der höchsten Dosierung ließ sich eine Reduktion des depressivähnlichen Verhaltens beobachten, diese Reduktion war allerdings nur

im Vergleich zu den beiden mit IL-2 behandelten Gruppen signifikant. Diese Ergebnisse deuten erneut, ähnlich wie bei Pawlak und Schwarting (2006a), auf einen biphasischen Zusammenhang zwischen IL-2 und emotionsähnlichem Verhalten hin. Montkowski et al. (1997) berichteten über ein ähnliches biphasisches Reaktionsmuster bei IL-1.

Allerdings führte die zuvor in der Mikrodialyse verwendete Dosis (2,5 µg/kg) zu keinen Veränderungen im depressivähnlichen Verhalten. Dies kann neben translationalen Aspekten möglicherweise dadurch erklärt werden, dass der vermutete Zusammenhang zwischen Depression und 5-HT nicht so stabil ist, wie derzeit oft angenommen wird oder dass der hier gewählte Test (FST) für diese Fragestellung nicht geeignet ist.

Der Zusammenhang zwischen 5-HT und Depression und depressivähnlichem Verhalten im Tiermodell ist mehrfach dokumentiert worden. Dennoch lassen einige Studien Zweifel an einem direkten Zusammenhang aufkommen. Ein großer Teil dieser Annahme basiert auf der Effektivität der SSRIs als mittlerweile weit verbreitete Therapie bei depressiven Erkrankungen. Kirsch et al. (2008) jedoch zeigten in einer Metaanalyse, dass die Effektivität von SSRIs zu einem großen Teil von der anfänglichen Schwere der Depression abhängt. Bei leichteren Formen depressiver Erkrankungen erzielen SSRIs weniger bis keine Wirkung.

Eine weitere Erklärung wäre, dass das im FST getestete Verhalten nicht durch 5-HT beeinflusst wird. Obwohl die prädiktive Validität des FST für antidepressiv-wirkende und v.a. auch für serotonerg wirkende Substanzen mehrfach bestätigt wurde (z.B. (Cryan et al., 2002; Willner & Mitchell, 2002)), weisen einige Studien darauf hin, dass die im FST gemessene Immobilität nicht oder nicht vollständig durch 5-HT vermittelt wird. Es gibt Hinweise, dass nicht alle SSRIs zu Veränderungen im Immobilitätsverhalten im FST führen (Borsini, 1995; Sanchez & Meier, 1997). Dieses Phänomen konnte allerdings durch einige Veränderungen im Versuchsaufbau aufgehoben werden, so dass auch SSRIs zu einer reduzierten Immobilität führten (siehe S. 32 und Cryan et al., 2005). Dies legt wiederum eine Beteiligung von 5-HT nahe. Von daher kann angenommen werden, dass das Verhalten im FST zumindest teilweise durch 5-HT vermittelt wird. Auf der anderen Seite ist, wie eingangs erwähnt, 5-HT nicht der einzige Neurotransmitter, der an depressiven Störungen (Kalia, 2005; Kirsch et al., 2008), an zytokin-induzierten depressiven Symptomen (Raison et al., 2005) und auch an depressivähnlichem Verhalten im FST beteiligt ist (Bourin et al., 2009; Prica et al., 2008).

Warum die in der Mikrodialysestudie verwendete Dosierung von 2,5 µg im FST keine Auswirkung auf depressivähnliches Verhalten hatte, könnte lediglich durch eine mangelnde Übertragbarkeit der neurochemischen Daten auf die Verhaltens-experimente erklärt werden (siehe S. 61f.).

Wie bereits diskutiert, wird auch DA mit depressiven Erkrankungen in Verbindung gebracht. Die hier beobachtete Reduktion von DA im präfrontalen Kortex lässt sich somit gut in den aktuellen Forschungsstand integrieren. Während im Humanbereich dopaminerge Reduktionen häufig mit psychomotorischer Verlangsamung in Verbindung gebracht wurden (Schrijvers et al., 2008), konnten in den vorliegenden Studien keine Veränderungen in der Lokomotion beobachtet werden.

Trotz vieler Kritikpunkte an dem FST ist dieser Test einer der am meisten eingesetzten Paradigmen zur Erhebung depressivähnlichen Verhaltens. Bis heute wurden allerdings, trotz vieler Hinweise aus dem Humanbereich, kaum Zytokine (außer IL-1- β , IFN- α , - β , - γ und TNF- α ; Dunn & Swiergiel, 2005a; Makino et al., 2000c; O'Connor et al., 2009) im FST getestet. Die hier vorliegende Studie ist somit die erste Studie, welche die Effekte von IL-2 auf depressivähnliches Verhalten getestet hat und Veränderungen in diesem Verhalten dokumentieren konnte. Ferner konnten diese Ergebnisse mit einem serotonergen Wirkmechanismus in Verbindung gebracht werden, da die Verhaltenseffekte, genau wie die IL-2-induzierte serotonerge Reduktion im Kortex, erst nach einer Verzögerung (zwei Stunden) und nicht akut nach der Injektion von IL-2 zu beobachten waren.

Kritisierend ist zu erwähnen, dass der FST zwar eine gute prädiktive Validität, aber gleichzeitig eine mangelnde Augenscheinvalidität aufweist (Willner & Mitchell, 2002). Da im Tiermodell immer nur einige Aspekte des klinischen Bildes einer depressiven Störung abgebildet werden können, sollten in zukünftigen Studien mit verschiedenen Tests unterschiedliche Facetten der Störung untersucht werden. Die reduzierte Motivation könnte zum Beispiel mit dem Break Point Paradigma (Hodos & Kalman, 1963; M. Schneider et al., 2010), Anhedonie mit dem Konsum eines bevorzugten Futters (Papp et al., 1991) oder Interessenverlust mittels des sozialen Interaktionstests untersucht werden (File & Seth, 2003). Ferner würde sich als Maß für kognitive Aspekte depressiver Erkrankungen, im Sinne eines negativen Interpretationsfehlers, das zuvor beschriebene „Ambiguous-Cue-Interpretation“-Paradigma eignen (Enkel et al., 2010; S. 31f.).

4.5 Sickness Behaviour

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die anxiogen-ähnliche Wirkung von IL-2 im ersten und die depressivähnlichen Effekte im zweiten Artikel könnte die Induktion von Sickness Behaviour sein. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und bakterielle Endotoxine können Sickness Behaviour (z.B. Müdigkeit, Unwohlsein), aber auch Symptome

von Angst und depressiven Störungen zur Folge haben. IL-2 hingegen führt zu weniger intensiven bis keinen Krankheitssymptomen, aber zu Anhedonie, einem Symptom depressiver Störungen (Anisman et al., 2005).

Weder in der Vorstudie (Pawlak & Schwarting, 2006a), den vorliegenden Experimenten in **Artikel 1** (Karrenbauer et al., 2009), **Artikel 2** (Karrenbauer et al., eingereicht) und weiteren Studien in einem assoziierten Labor (P. Schneider et al., 2010) konnten Anzeichen von Sickness Behaviour nachgewiesen werden. In keiner der aufgeführten Studien wurden typische Symptome wie erhöhte Körpertemperatur, verringertes Körpergewicht, verringertes Putzverhalten oder einer Reduktion der allgemeinen Lokomotion nach einmaliger IL-2-Behandlung, beobachtet. Auffällig ist, dass die Körpertemperatur der Tiere zwischen den beiden FST-Tests um ca. 2°C variiert. Dies ist auf das Versuchsdesign zurückzuführen, da die Tiere im FST 1 für 15 min. in 27°C kaltem Wasser getestet werden und am zweiten Testtag (FST 2) nur für 5 min. Darüber hinaus waren im Körpergewicht der Tiere keine Unterschiede zwischen IL-2-behandelten Tiere und der Kontrollgruppe zu erkennen.

Ferner wäre es möglich, die Ergebnisse des ersten Artikels durch inflammatorische Prozesse im Gehirn, ausgelöst durch die direkte striatale Mikroinjektion von IL-2, zu erklären. Stichprobenartige Untersuchungen des Gehirngewebes am Einstichkanal wiesen keine Mikrogliaaktivität auf (unpublizierte Daten). Eine Mikrogliaaktivität kann auf inflammatorische Prozesse hinweisen, da Mikroglia auf inflammatorische Stimuli (auch andere Zytokine) mit der Produktion von u.a. proinflammatorischen Zytokinen, reagieren (Dantzer et al., 2008).

Da die Befundlage in der Literatur spärlich und sehr heterogen ist, kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass IL-2 unter bestimmten Bedingungen zu Sickness Behaviour führen könnte. Auf der einen Seite konnte in verschiedenen Studien nach einmaliger (Zalcman et al., 1998) und nach mehrmaliger Behandlung (Zalcman, 2002) mit IL-2 sogar verhaltensaktivierende Effekte gefunden werden (Zalcman et al., 1998; Zalcman, 2002). Auf der anderen Seite berichteten zwei Studien von leichten bis moderaten Symptomen von Sickness Behaviour und einer leicht reduzierten Lokomotion, allerdings entweder nach einer chronischen Verabreichung (ca. 3,1 µg über 7 Tage) von IL-2 (Sudom et al., 2004) oder nach der Verabreichung von sehr hohen Dosierungen IL-2 (500 ng i.c.v. (Pauli et al., 1998). Allerdings wurde in der Studie von Sudom et al. (2004) das Sickness Behaviour nur anhand einer 4-Punkte- Ratingskala erhoben, des weiteren beeinflusste die Gabe von IL-2 nur emotionsähnliches Verhalten (Lokomotion und anhedonisches Verhalten). Ferner wurde in beiden Studien im Gegensatz zu den vorliegenden kein speziesspezifisches IL-2 verwendet.

In den vorliegenden Studien wurden verhältnismäßig geringe Dosierungen (1 und 0,1 ng intrastriatal; 1; 2,5 und 5 µg i.p.) speziesspezifischen IL-2 verwendet, welches nur einmalig injiziert wurde (Karrenbauer et al., 2009). Zuletzt sprechen auch die fehlenden Effekte im EPM gegen die Induktion von Sickness Behaviour, da dieses zu deutlichen Effekten im EPM führt (Montkowski et al., 1997).

Aufgrund dieser Angaben ist es sehr unwahrscheinlich, dass in den vorliegenden Studien durch die Injektion von IL-2 Sickness Behaviour induziert wurde. Viel mehr können die Ergebnisse der Verhaltenstudien als weitere Hinweise für das Potential von IL-2, verhaltensmodulierend auf emotions- und motivationsähnliches Verhalten zu wirken, gewertet werden. Somit liefern die vorliegenden Studien für IL-2 weitere Anhaltspunkte für eine Dissoziation zwischen depressivähnlichen Effekten und Sickness Behaviour. Ähnliche Ergebnismuster wurden auch in anderen Studien (mit IL-1 und LPS) nachgewiesen¹⁰.

4.6 Konfundierende Faktoren

Viele Studien in der Literatur sind aufgrund der Heterogenität der verwendeten Methoden oder anderer Faktoren nur unzulänglich miteinander vergleichbar. Dies spiegelt ein wenig die Komplexität dieses Forschungsbereiches wieder, so dass kausale Aussagen sehr schwierig werden. Einige der konfundierenden Faktoren sollen hier beispielhaft erläutert werden.

Spezies: Mensch vs. Tiermodell. Viele Studien im Bereich der Psychoneuroimmunologie sind Studien aus der Humanforschung. Diese haben gegenüber den Tiermodellen einen deutlichen Vorteil, nämlich, dass Menschen ihr Befinden besser kommunizieren können als Tiere. Leider existieren hier andere konfundierende Faktoren, wie z.B. das Alter, Geschlecht, gesundheitsförderndes/hemmendes Verhalten (z.B. Rauchen), die im Tiermodell besser kontrolliert werden können. Da es sich in diesem Bereich sehr oft um Patientenstudien handelt, sind auch krankheitsspezifischen Faktoren wie der Verlauf der Krankheit, Messung der Symptome, Medikamente und evtl. krankheitsbedingte zusätzliche Entzündungen relevant (Capuron et al., 2007a; Haack et al., 1999).

¹⁰ Es zeigte sich, dass LPS depressivähnliche Effekte unabhängig von motorischen Effekten (Hinweise auf Sickness Behaviour) auslösen konnte (Frenois et al., 2007). In einer anderen Studie führte die Verabreichung eines IL-1 Rezeptor Antagonisten zu einer Milderung der LPS-induzierten Reduktion des sozialen Interaktionsverhaltens, hatte aber keinen Einfluss auf Sickness Behaviour relevante Faktoren wie Fieber oder Körpergewicht (Konsman et al., 2008).

Verwendung von speziesspezifischem IL-2: Viele Studien verwenden kein speziesspezifisches IL-2. Es zeigte sich, dass z.B. bei Ratten exogen verabreichtes speziesspezifisches IL-2 die Ausschüttung von ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) erhöhte, während humanes IL-2 keine Auswirkung auf die Ausschüttung hatte (Naito et al., 1989). Umgekehrt erhöhte humanes IFN- α die Immobilität im FST bei einzelner und auch wiederholter Verabreichung bei Ratten, während speziesspezifisches IFN ($-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$) keine Auswirkungen hatte (Makino et al., 2000c).

Häufigkeit und Menge der Verabreichung: In Anlehnung an viele Humanstudien, in denen im Zuge einer Immuntherapie IL-2 über einen längeren Zeitraum verabreicht wurde, wurde auch in tierexperimentellen Studien IL-2 mehrfach verabreicht. Auf der einen Seite führte IL-2 nach wiederholter Verabreichung zu Veränderungen im räumlichen Lernen (Lacosta et al., 1999a) und Belohnung (Anisman et al., 1998), hatte aber nach einmaliger Verabreichung keine Effekte (Lacosta et al., 1999a). Auf der anderen Seite zeigten einige Studien schon nach einer einzigen Injektion Effekte auf z.B. neuheits-induzierte Lokomotion (Zalcman, 2001) und belohnungs-assoziiertes (Anisman et al., 1998) oder angstähnliches Verhalten (Pawlak & Schwarting, 2006a). Aber auch die Dosis pro Injektion variiert stark zwischen den Studien. Dieser Fakt ist nicht irrelevant, da Hinweise existieren, dass IL-2 an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist und somit in sehr hoher Dosierung auch zu Anzeichen von Sickness Behaviour führen kann (Pauli et al., 1998).

In-vitro versus in-vivo Untersuchungen: Vor allem viele frühe Untersuchungen fanden an Zellkulturen statt. In-vitro Methoden sind sehr gut geeignet zur Erforschung basaler neurochemischer Zusammenhänge, wohingegen Aussagen über die Auswirkungen einer Substanz (z.B. IL-2) auf ein Verhalten nur am lebenden Tier (in-vivo) oder Mensch getroffen werden können. Eine in-vivo Methode mit der Aussagen über neurochemische und parallel behaviorale Auswirkungen einer Substanz möglich wären, ist die in-vivo Mikrodialyse am wachen frei beweglichen Tier. Es existiert nach Wissen der Autorin bis heute erst eine Untersuchung mit IL-2 (Pauli et al., 1998), welche allerdings aufgrund diverser methodischer Unterschiede (höhere Dosis, kein speziesspezifisches IL-2 und cerebrale Injektion) mit den vorliegenden Daten nicht vergleichbar ist.

Heterogenität der Auswertungsmethoden: Obwohl die in den vorliegenden Studien verwendeten Verhaltenstests weltweit eingesetzt und als Standardtests betrachtet werden, existieren bezüglich der Apparaturen, der Durchführung und der Auswertung deutliche Unterschiede. Das hier verwendete EPM kann als standardisiert angesehen werden (Pawlak et al., im Druck; **Artikel 3**). Das OF variiert häufig zwischen den Arbeitsgruppen in Form,

Farbe, Größe, Beleuchtung etc. (siehe S. 28f.), obwohl hier zumindest die ausgewerteten Variablen vergleichbar sind. Sehr heterogen fallen die Auswertungskriterien des FST aus. In einigen Studien wird kurz umrissen, welche Verhaltensweisen hier mit „Immobilität“ bezeichnet werden, allerdings sind die meisten Beschreibungen nicht zur Nachahmung geeignet.

Kommunikation zwischen Peripherie und Gehirn: Da viele Zytokine in der Peripherie produziert werden, stellt sich die Frage, wie diese Moleküle mit dem Gehirn kommunizieren, bzw. die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Die Blut-Hirn-Schranke kann als eine regulatorische Schnittstelle zwischen zentralem Nervensystem und peripheren Gewebe betrachtet werden. Sie dient dazu, die Homöostase im Gehirn aufrecht zu erhalten und schützt so das Gehirn von im Blut zirkulierenden Toxinen, Krankheitserregern und auch Botenstoffen. Laut Dantzer (2008) wird von vier potentiellen Kommunikationswegen zwischen Peripherie und Gehirn ausgegangen (Dantzer et al., 2008):

1. Lokal produzierte Zytokine aktivieren primär afferente Nerven, wie z.B. den Vagusnerv (nervus vagus), während abdominalen und visceralen Infektionen (Watkins et al., 1994) oder den Zungen-Rachen-Nerv (nervus glossopharyngeus) während oro-lingualen Infektionen (Romeo et al., 2001), welche diese afferenten Informationen direkt zum Gehirn weiterleiten.
2. Eine weitere Möglichkeit stellen zytokin-spezifische Transporter dar. Während bestimmte Zytokine, wie z.B. IL-1 α und IL-6 (Banks et al., 1989; Banks et al., 1994), durch ein sättigbares Influx-Transportersystem durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn transportiert werden, konnte für IL-2 ein solcher Mechanismus nicht nachgewiesen werden (Banks et al., 1995; Waguespack et al., 1994). Auf der anderen Seite wurde ein anderer Kommunikationsweg bisher wenig beleuchtet. IL-2 ist bis heute das einzige Zytokin, bei dem ein sättigbares Efflux-System nachgewiesen werden konnte (Banks, 2006; Banks et al., 2004). Über diesen Mechanismus können überschüssige Zytokine abgeführt und somit das Gehirn geschützt werden.
3. Ein weiterer Mechanismus verläuft über sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLRs) auf makrophagen-ähnlichen Zellen in den zirkumventrikulären Organen oder dem Plexus choroideus. Diese reagieren auf pathogen-assoziierte Molekülmuster mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Quan et al., 1998). Da die ventrikulären Organe außerhalb der BBB liegen, können Zytokine diese einfach per Volumendiffusion passieren (Vitkovic et al., 2000b).
4. Zytokine binden an spezifische Zytokinrezeptoren an perivaskulären Makrophagen und Endothelzellen der Gehirnvenen (oder Venolen genannt) und induzieren die Freisetzung von

Second Messengern (z.B. Stickstoffmonooxid) innerhalb der Blut-Hirn-Schranke (Konsman et al., 2002; Konsman et al., 2004; Schiltz & Sawchenko, 2002).

Zudem ist die Wirkungsweise des Immunsystems noch lange nicht endgültig verstanden ist, weswegen viele Ergebnisse nur als vorläufig gelten und daher vorsichtig interpretiert werden sollten. Da die Bestandteile des Immunsystems, v.a. Zytokine (siehe S. 8) wie ein Netzwerk zusammenarbeitet, ist es oftmals sehr schwierig den zugrundeliegenden Mechanismus eines Ergebnisses zu bestimmen.

5 Fazit und Ausblick

Verschiedene Studien im Humanbereich geben Hinweise darauf, dass eine klare Trennung zwischen Angst und Depression nicht möglich ist. Aufgrund der hohen Komorbidität zwischen Angststörungen und depressiven Störungen (Pollack, 2005b) und der hohen Korrelation zwischen Angst und depressiven Symptomen (Weintraub et al., 2005), wurde in einigen Studien darauf hingewiesen, dass diesen beiden Bereichen möglicherweise eine gemeinsame oder zumindest ähnliche biologische Basis zugrunde liegt (Baldwin et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Studien sprechen eher für eine Dissoziation zwischen angst- und depressivähnlichem Verhalten. Obwohl in der ersten Studie Effekte von IL-2 auf angstähnliches Verhalten gefunden wurde, sprechen die Ergebnisse des 2. Artikels (Karrenbauer et al., eingereicht) nicht für einen gemeinsamen Mechanismus.

Direkt in das Striatum injiziertes IL-2 in einer sehr geringen Dosierung (0,1 ng) wirkt zeitverzögert auf angstähnliches Verhalten im OF. Diese Effekte scheinen nicht auf einem proaktiven Wirkungsmechanismus von IL-2 alleine zu beruhen. Das heißt, auch wenn sich in diesen Ergebnissen schon eine verzögerte Wirkung von IL-2 erkennen ließ, führte eine systematisch zeitverzögerte Testung im EPM zu keinen Effekten. Gleichzeitig konnte ein dosisabhängiger Effekt von IL-2 auf depressivähnliches Verhalten im FST nach einer zweistündigen Verzögerung beobachtet werden. Eine Testung direkt nach einer akuten Verabreichung hatte keine Veränderungen im Verhalten zur Folge. Ferner konnten diese Daten auch auf der neurochemischen Ebene zeigen, dass IL-2 zu gravierenden Effekten in verschiedenen Kortextbereichen führt und diese einem bestimmten zeitlichen Verlauf folgen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass den depressivähnlichen Effekten möglicherweise ein serotonerger Wirkungsmechanismus zugrunde liegt, da die Effekte parallel zu der serotonergen Reduktion im präfrontalen und okzipitalen Kortext auftraten. Gleichzeitig legen diese Daten aufgrund der fehlenden Effekte im EPM auch nahe, dass in Bezug auf angstähnliches Verhalten der zugrundeliegende Mechanismus möglicherweise ein anderer ist oder der hier gewählte Test nicht passend war.

Trotz einiger Kritikpunkte in der Übertragbarkeit der Daten zeigt sich in diesen Studien die Potenz von einmalig injiziertem IL-2 Verhalten zu beeinflussen und neurochemische Prozesse zu manipulieren. Diese Studien sind die ersten, die Hinweise auf einen funktionalen Zusammenhang zwischen speziesspezifischem IL-2 und depressivähnlichem Verhalten im FST bei der Ratte liefern. Die hier vorgelegten Daten weisen nicht nur auf einen Dosis-

Wirkungs-Zusammenhang, sondern auch auf einen kinetischen Wirkungsverlauf von IL-2 hin.

In zukünftigen Studien sollte die Mikrodialyse mit verschiedenen Dosierungen von IL-2 wiederholt werden. Auch die Erhebung anderer Neurotransmitter könnte aufschlussreich sein. Ferner sollte beim Design auf eine möglichst gute Übertragbarkeit geachtet werden, idealerweise könnte die Mikrodialyse parallel zur Verhaltenstestung (z.B. OF) erhoben werden.

Darüber hinaus sollte in Folgeprojekten, aufgrund der beträchtlichen Auswirkungen von IL-2 auf 5-HT und des mehrfach belegten Zusammenhangs zwischen 5-HT und depressiven Störungen die Wirkung von IL-2 auf depressivähnliches Verhalten weiter verfolgt werden. Da die Komplexität eines humanen Störungsbildes nicht auf ein Tiermodell übertragen werden kann, sollte sich in zukünftigen Studien auf Tests konzentriert werden, die einzelne Symptome abbilden, z.B. bzgl. Anhedonie und Motivation: Zuckerkonsum und das Break Point Paradigma, oder zur Interpretation mehrdeutiger Reize auf das „Ambiguous-Cue-Interpretation“-Paradigma (Enkel et al., 2010).

Um die potentielle Beteiligung von 5-HT an zytokin-induziertem angstähnlichen Verhalten näher zu untersuchen, sollten Tests wie z.B. das Novelty Suppressed Feeding oder das T-Labyrinth, bei denen eine serotonerge Beteiligung besser gesichert ist als beim EPM, verwendet werden.

Des Weiteren sollte von einer Testung im EPM nicht völlig abgesehen und die Möglichkeit der chronischen Verabreichung in Betracht gezogen werden, da gezeigt werden konnte, dass serotonerg wirkende Substanzen erst nach einer chronischen Verabreichung auf angstähnliches Verhalten im EPM Einfluss nahmen. Um das Risiko einer Induktion von Sickness Behaviour zu senken, sollten bei einer solchen Testung nur geringe Dosierungen verwendet und der körperliche Zustand der Tiere gut überwacht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorliegenden Studien zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen IL-2 und angst- und depressionsähnlichem Verhalten beitragen und Hinweise auf einen zugrundeliegenden serotonergen und womöglich teilweise DA-vermittelten Mechanismus liefern.

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
BBB	Blood Brain Barrier, Blut-Hirn-Schranke
BAS	Behavioural Activation System
BIS	Behavioural Inhibition System
CMS	Chronic Mild Stress (Chronisch milder Stress)
DA	Dopamin
DSM-IV	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen (DSM-IV). Handbuch der Differentialdiagnosen
EPM	Elevated Plus Maze, erhöhtes Plus Labyrinth
Exp.	Experiment
FFS / FFFS	Fight-Flight-System (Kampf-Flucht-System) / Fight-Flight-Freezing- System
FST	Forced Swim Test
GABA	γ -Aminobutyric acid (γ -Aminobuttersäure)
GAS	Generalisierte Anstörung (GAD, general anxiety disorder)
HPLC-EC	High Performance Liquid Chromatography - electrochemical detection Hochdruck Flüssigkeits-Chromatographie mit elektrochemischer Detektion
HOA	High open arm time
HVA	Homovanillinsäure (homovanillic acid)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferone ($-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$)
IL	Interleukine
IL-2	Interleukin 2
IL-2R	Interleukin 2 Rezeptor
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
KYN	Kynurenin
LOA	Low open arm time

LPS	Lipopolysaccharide
MD	Major Depression
MDMA	3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NE	Noradrenalin
OF	Open Field, Offenfeld
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphat-buffert-saline; PBS)
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung (PTSD; Post traumatic stress disorder)
QUIN	Chinolinsäure (Quinolinic acid)
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (Transforming Growth Factor)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
WHO	World Health Organisation
ZNS	zentrales Nervensystem
$^1\text{H-MRS}$	Protonen Magnet Resonanz Spektographie (proton magnetic resonance spectrography oder hydrogen magnetic resonance spectrography)
3-OH-KYN	3-Hydroxy-Kynurenin
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure (5-hydroxyindoleacetic acid)
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTT	5-Hydroxytryptamin-, Serotonintransporter

Literaturverzeichnis

- Alonso, R., Chaudieu, I., Diorio, J., Krishnamurthy, A., Quirion, R., & Boksa, P. (1993). Interleukin-2 modulates evoked release of [3H]dopamine in rat cultured mesencephalic cells. *J Neurochem*, *61*(4), 1284-1290.
- Anisman, H., Kokkinidis, L., Borowski, T., & Merali, Z. (1998). Differential effects of interleukin (IL)-1beta, IL-2 and IL-6 on responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res*, *779*(1-2), 177-187.
- Anisman, H., Kokkinidis, L., & Merali, Z. (1996). Interleukin-2 decreases accumbal dopamine efflux and responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res*, *731*(1-2), 1-11.
- Anisman, H., Kokkinidis, L., & Merali, Z. (2002). Further evidence for the depressive effects of cytokines: Anhedonia and neurochemical changes. *Brain, Behavior and Immunity*, *16*, 544-556.
- Anisman, H., & Matheson, K. (2005). Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(4-5), 525-546.
- Anisman, H., Merali, Z., Poulter, M. O., & Hayley, S. (2005). Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr Pharm Des*, *11*(8), 963-972.
- Anisman, H., Ravindran, A. V., Griffiths, J., & Merali, Z. (1999). Endocrine and cytokine correlates of major depression and dysthymia with typical or atypical features. *Mol Psychiatry*, *4*(2), 182-188.
- APA. (1994). *American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (H. Saß, H. U. Wittchen & M. Zaudig, Trans. 4 ed.). Washington DC: American Psychiatric Press.
- Araujo, D. M., & Cotman, C. W. (1995). Differential effects of interleukin-1 beta and interleukin-2 on glia and hippocampal neurons in culture. *Int J Dev Neurosci*, *13*(3-4), 201-212.
- Araujo, D. M., & Lapchak, P. A. (1994). Induction of immune system mediators in the hippocampal formation in Alzheimer's and Parkinson's diseases: selective effects on specific interleukins and interleukin receptors. *Neuroscience*, *61*(4), 745-754.
- Armario, A., Gavaldà, A., & Martí, O. (1988). Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate. *Eur J Pharmacol*, *158*(3), 207-212.
- Baldwin, D. S., Evans, D. L., Hirschfeld, R. M., & Kasper, S. (2002). Can we distinguish anxiety from depression? *Psychopharmacol Bull*, *36 Suppl 2*, 158-165.
- Banks, W. A. (2006). The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. *Neurol Clin*, *24*(3), 413-419.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., & Broadwell, R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, *2*(4), 241-248.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., & Durham, D. A. (1989). Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res Bull*, *23*(6), 433-437.

- Banks, W. A., Kastin, A. J., & Gutierrez, E. G. (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett*, *179*(1-2), 53-56.
- Banks, W. A., Niehoff, M. L., & Zalcman, S. S. (2004). Permeability of the mouse blood-brain barrier to murine interleukin-2: predominance of a saturable efflux system. *Brain Behav Immun*, *18*(5), 434-442.
- Beaufour, C. C., Le Bihan, C., Hamon, M., & Thiebot, M. (2001). Extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during reward-, punishment- and novelty-associated behaviour. Effects of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav*, *69*(1-2), 133-142.
- Besedovsky, H. O., & del Rey, A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, *17*(1), 64-102.
- Bhatt, S., & Siegel, A. (2006). Potentiating role of interleukin 2 (IL-2) receptors in the midbrain periaqueductal gray (PAG) upon defensive rage behavior in the cat: role of neurokinin NK(1) receptors. *Behav Brain Res*, *167*(2), 251-260.
- Bhatt, S., Zalcman, S., Hassanain, M., & Siegel, A. (2005). Cytokine modulation of defensive rage behavior in the cat: role of GABAA and interleukin-2 receptors in the medial hypothalamus. *Neuroscience*, *133*(1), 17-28.
- Biojone, C., Casarotto, P. C., Resstel, L. B., Zangrossi, H., Jr., Guimares, F. S., & Moreira, F. A. (2010). Anti-aversive effects of the atypical antipsychotic, aripiprazole, in animal models of anxiety. *J Psychopharmacol*.
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*, *103*(1), 70-82.
- Bonaccorso, S., Marino, V., Puzella, A., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., Almerighi, C., Verkerk, R., Meltzer, H., & Maes, M. (2002). Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *J Clin Psychopharmacol*, *22*(1), 86-90.
- Borsini, F. (1995). Role of the serotonergic system in the forced swimming test. *Neurosci Behav Rev*, *19*(3), 377-395.
- Borsini, F., & Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*, *94*(2), 147-160.
- Borsini, F., Podhorna, J., & Marazziti, D. (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl)*, *163*(2), 121-141.
- Borta, A., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res*, *166*(2), 271-280.
- Bourin, M., Chenu, F., Prica, C., & Hascoet, M. (2009). Augmentation effect of combination therapy of aripiprazole and antidepressants on forced swimming test in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *206*(1), 97-107.
- Briley, M., & Moret, C. (1993). Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. *Clin Neuropharmacol*, *16*(5), 387-400.

- Brietzke, E., Stertz, L., Fernandes, B. S., Kauer-Sant'anna, M., Mascarenhas, M., Escosteguy Vargas, A., Chies, J. A., & Kapczinski, F. (2009). Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord*, *116*(3), 214-217.
- Brown, R. R., Lee, C. M., Kohler, P. C., Hank, J. A., Storer, B. E., & Sondel, P. M. (1989). Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2. *Cancer Res*, *49*(17), 4941-4944.
- Browning, M., Reid, C., Cowen, P. J., Goodwin, G. M., & Harmer, C. J. (2007). A single dose of citalopram increases fear recognition in healthy subjects. *J Psychopharmacol*, *21*(7), 684-690.
- Burghardt, N. S., Sullivan, G. M., McEwen, B. S., Gorman, J. M., & LeDoux, J. E. (2004). The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: a comparison with tianeptine. *Biol Psychiatry*, *55*(12), 1171-1178.
- Capuron, L., Miller, A., & Irwin, M. R. (2007a). Psychoneuroimmunology of depressive disorder: mechanism and clinical implications. In R. Ader (Ed.), *Psychoneuroimmunology* (4 ed., Vol. 1, pp. 509- 530). San Diego: Academic Press.
- Capuron, L., Gummnick, J. F., Musselman, D. L., Lawson, D. H., Reemsnyder, A., Nemeroff, C. B., & Miller, A. H. (2002c). Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology*, *26*(5), 643-652.
- Capuron, L., Hauser, P., Hinze-Selch, D., Miller, A. H., & Neveu, P. J. (2002b). Treatment of cytokine-induced depression. *Brain Behav Immun*, *16*(5), 575-580.
- Capuron, L., Neurauder, G., Musselman, D. L., Lawson, D. H., Nemeroff, C. B., Fuchs, D., & Miller, A. H. (2003). Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry*, *54*(9), 906-914.
- Capuron, L., Pagnoni, G., Demetrashvili, M. F., Lawson, D. H., Fornwalt, F. B., Woolwine, B., Berns, G. S., Nemeroff, C. B., & Miller, A. H. (2007b). Basal ganglia hypermetabolism and symptoms of fatigue during interferon-alpha therapy. *Neuropsychopharmacology*, *32*(11), 2384-2392.
- Capuron, L., Ravaud, A., & Dantzer, R. (2000). Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy. *J Clin Oncol*, *18*(10), 2143-2151.
- Capuron, L., Ravaud, A., Gualde, N., Bosmans, E., Dantzer, R., Maes, M., & Neveu, P. J. (2001). Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. *Psychoneuroendocrinology*, *26*(8), 797-808.
- Capuron, L., Ravaud, A., Neveu, P. J., Miller, A. H., Maes, M., & Dantzer, R. (2002a). Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry*, *7*(5), 468-473.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(8), 1193-1205.
- Cecil, K. M., DelBello, M. P., Sellars, M. C., & Strakowski, S. M. (2003). Proton magnetic resonance spectroscopy of the frontal lobe and cerebellar vermis in children with a mood disorder and a familial risk for bipolar disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, *13*(4), 545-555.
- Charney, D. S. (1998). Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry*, *59 Suppl 14*, 11-14.

- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(3), 235-260.
- Christianson, J. P., Rabbett, S., Lyckland, J., & Drugan, R. C. (2008). The immobility produced by intermittent swim stress is not mediated by serotonin. *Pharmacol Biochem Behav*, 89(3), 412-423.
- Clement, Y., & Chapouthier, G. (1998). Biological bases of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 22(5), 623-633.
- Cohen, S., Doyle, W. J., Skoner, D. P., Rabin, B. S., & Gwaltney, J. M., Jr. (1997). Social ties and susceptibility to the common cold. *Jama*, 277(24), 1940-1944.
- Cohen, S., & Herbert, T. B. (1996). Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol*, 47, 113-142.
- Connor, T. J., Song, C., Leonard, B. E., Merali, Z., & Anisman, H. (1998). An assessment of the effects of central interleukin-1beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience*, 84(3), 923-933.
- Corr, P. J. (2010). The Reinforcement Sensitivity Theory of Personality. In P. J. Corr & G. Matthews (Eds.), *The Cambridge handbook of Personality Psychology* (pp. 347-376). Cambridge: University Press.
- Cruz-Morales, S. E., Santos, N. R., & Brandao, M. L. (2002). One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 72(4), 973-978.
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, 23(5), 238-245.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 547-569.
- Cuijpers, P., van Straten, A., van Oppen, P., & Andersson, G. (2008). Are psychological and pharmacologic interventions equally effective in the treatment of adult depressive disorders? A meta-analysis of comparative studies. *J Clin Psychiatry*, 69(11), 1675-1685; quiz 1839-1641.
- Cummings, J. L. (1993). The neuroanatomy of depression. *J Clin Psychiatry*, 54 Suppl, 14-20.
- Dantzer, R. (1996). „Sickness behaviour“: Eine neuroimmunologische Antwort auf Infektionskrankheiten. In M. Schedlowski & U. Tewes (Eds.), *Psychoneuroimmunologie*. Heidelberg: Spektrum.
- Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun*, 15(1), 7-24.
- Dantzer, R., Bluthé, R. M., Castanon, N., Chauvet, N., Capuron, L., Goodall, G., Kelley, K. W., Konsman, J. P., Layé, S., Parnet, P., & Pousset, F. (2001). Cytokine effects on behavior. In R. Ader, D. L. Felten & N. Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (3 ed., Vol. 1, pp. 703-727). San Diego: Academic Press.

- Dantzer, R., Bluthé, R. M., Castanon, N., Kelley, K. W., Konsman, J. P., Layé, S., Lestage, J., & Parnet, P. (2007). Cytokines, Sickness Behavior and Depression. In R. Ader (Ed.), *Psychoneuroimmunology* (4 ed., pp. 241-278). San Diego: Academic Press.
- Dantzer, R., & Kelley, K. W. (2007). Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun*, *21*(2), 153-160.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, *9*(1), 46-56.
- De Sarro, G. B., Masuda, Y., Ascioti, C., Audino, M. G., & Nistico, G. (1990). Behavioural and ECoG spectrum changes induced by intracerebral infusion of interferons and interleukin 2 in rats are antagonized by naloxone. *Neuropharmacology*, *29*(2), 167-179.
- De Souza Silva, M. A., Müller, C. P., & Huston, J. P. (2007). Microdialysis in the brain of anesthetized vs. freely moving animals. In B. H. C. Westerink & T. I. F. H. Cremers (Eds.), *Handbook of Microdialysis. Methods, Applications and Perspectives* (Vol. 16, pp. 71-91). Amsterdam: Elsevier.
- Deckers, L. (2010). Motivation: biological, psychological and environmental. (3 ed.). Boston: Allyn & Bacon.
- Degroot, A., & Treit, D. (2004). Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res*, *1001*(1-2), 60-71.
- Del Arco, A., & Mora, F. (2001). Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the local activation of glutamate receptors. *Brain Res Bull*, *56*(2), 125-130.
- Delgado, P. L., & Moreno, F. A. (2000). Role of norepinephrine in depression. *J Clin Psychiatry*, *61 Suppl 1*, 5-12.
- den Boer, J. A., & Westenberg, H. G. (1996). Involvement of Serotonin Receptor Subtypes in Panic Disorder: A Critical Appraisal of the Evidence. In H. G. Westenberg, J. A. den Boer & D. L. Murphy (Eds.), *Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders* (pp. 139-172). Chichester: Wiley.
- Denicoff, K. D., Rubinow, D. R., Papa, M. Z., Simpson, C., Seipp, C. A., Lotze, M. T., Chang, A. E., Rosenstein, D., & Rosenberg, S. A. (1987). The neuropsychiatric effects of treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Ann Intern Med*, *107*(3), 293-300.
- Depue, R., & Lenzenweger, M. (2005). A neurobehavioral dimensional model of personality disturbance. In M. Lenzenweger & J. Clarkin (Eds.), *Theories of Personality Disorders* (2 ed.). New York: Guilford Press.
- Drevets, W. C. (2001). Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*, *11*(2), 240-249.
- Drevets, W. C., Frank, E., Price, J. C., Kupfer, D. J., Holt, D., Greer, P. J., Huang, Y., Gautier, C., & Mathis, C. (1999). PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry*, *46*(10), 1375-1387.
- Dunlop, B. W., & Nemeroff, C. B. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry*, *64*(3), 327-337.

- Dunn, A. J., & Swiergiel, A. H. (2005a). Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, *81*(3), 688-693.
- Dunn, A. J., Swiergiel, A. H., & de Beaupaire, R. (2005b). Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(4-5), 891-909.
- Efthimiou, P., & Blanco, M. (2009). Pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and potential biomarkers. *Mod Rheumatol*, *19*(5), 457-468.
- Einat, H., & Belmaker, R. H. (2001). The effects of inositol treatment in animal models of psychiatric disorders. *J Affect Disord*, *62*(1-2), 113-121.
- Eller, T., Vasar, V., Shlik, J., & Maron, E. (2008). Pro-inflammatory cytokines and treatment response to escitalopram in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *32*(2), 445-450.
- Enkel, T., Gholizadeh, D., von Bohlen Und Halbach, O., Sanchis-Segura, C., Hurlemann, R., Spanagel, R., Gass, P., & Vollmayr, B. (2010). Ambiguous-cue interpretation is biased under stress- and depression-like states in rats. *Neuropsychopharmacology*, *35*(4), 1008-1015.
- Fedotova, J. O., Hartmann, G., Lenard, L., & Sapronov, N. S. (2004). Effects of 5-HT1A receptor agonist and antagonist on anxiety in intact and ovariectomized female rats. *Acta Physiol Hung*, *91*(3-4), 175-184.
- Fernandes, C., & File, S. E. (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, *54*(1), 31-40.
- Ferreira, T. L., Moreira, K. M., Ikeda, D. C., Bueno, O. F., & Oliveira, M. G. (2003). Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res*, *987*(1), 17-24.
- File, S. E., Gonzalez, L. E., & Andrews, N. (1996). Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci*, *16*(15), 4810-4815.
- File, S. E., & Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol*, *463*(1-3), 35-53.
- File, S. E., & Zangrossi, H., Jr. (1993a). „One-trial tolerance“ to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology (Berl)*, *110*(1-2), 240-244.
- File, S. E., Zangrossi, H., Jr., Viana, M., & Graeff, F. G. (1993b). Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)*, *111*(4), 491-494.
- Fone, K. C., & Porkess, M. V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, *32*(6), 1087-1102.
- Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K. W., Dantzer, R., & Castanon, N. (2007). Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, *32*(5), 516-531.

- Gaffen, S. L., & Liu, K. D. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 28(3), 109-123.
- George, M. S., Ketter, T. A., & Post, R. M. (1993). SPECT and PET imaging in mood disorders. *J Clin Psychiatry*, 54 Suppl, 6-13.
- Gomes, K. S., de Carvalho-Netto, E. F., Monte, K. C., Acco, B., Nogueira, P. J., & Nunes-de-Souza, R. L. (2009). Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. *Brain Res Bull*, 78(6), 323-327.
- Gomes, K. S., & Nunes-De-Souza, R. L. (2009). Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(7), 1261-1269.
- Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, 27(4), 811-829.
- Graeff, F. G. (2002). On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 163(3-4), 467-476.
- Graham, J. E., Christian, L. M., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2007). Close Relationships and Immunity. *Psychoneuroimmunology*, 781-798.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety: an Enquiry in to the Functions of the Septo-hippocampal System* (2nd Edition ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Griebel, G., Moreau, J. L., Jenck, F., Misslin, R., & Martin, J. R. (1994). Acute and chronic treatment with 5-HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology (Berl)*, 113(3-4), 463-470.
- Grillner, S., Wallen, P., Saitoh, K., Kozlov, A., & Robertson, B. (2008). Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates--an overview. *Brain Res Rev*, 57(1), 2-12.
- Guimaraes, F. S., Zangrossi Jr, H., Del Ben, C. M., & Graeff, F. G. (2010). Serotonin in Panic and Anxiety Disorders. In (pp. 667-685).
- Haack, M., Hinze-Selch, D., Fenzel, T., Kraus, T., Kuhn, M., Schuld, A., & Pollmacher, T. (1999). Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors in psychiatric patients upon hospital admission: effects of confounding factors and diagnosis. *J Psychiatr Res*, 33(5), 407-418.
- Haidkind, R., Eller, M., Kask, A., Harro, M., Rincken, A., Orelund, L., & Harro, J. (2004). Increased behavioural activity of rats in forced swimming test after partial denervation of serotonergic system by parachloroamphetamine treatment. *Neurochem Int*, 45(5), 721-732.
- Handley, S. L., & McBlane, J. W. (1993). 5HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 112(1), 13-20.
- Handley, S. L., McBlane, J. W., Critchley, M. A., & Njung'e, K. (1993). Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res*, 58(1-2), 203-210.
- Hanisch, U. K. (2001). Effects of Interleukin-2 and interferons on the nervous system. In Ader R, Felten DL & Cohen N (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (3 ed., Vol. 1, pp. 585-631). San Diego: Academic Press.

- Hanisch, U. K., Neuhaus, J., Rowe, W., Van Rossum, D., Moller, T., Kettenmann, H., & Quirion, R. (1997). Neurotoxic consequences of central long-term administration of interleukin-2 in rats. *Neuroscience*, *79*(3), 799-818.
- Hanisch, U. K., & Quirion, R. (1996). Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. *Brain Res Brain Res Rev*, *21*(3), 246-284.
- Hart, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev*, *12*(2), 123-137.
- Hasler, G., Fromm, S., Alvarez, R. P., Luckenbaugh, D. A., Drevets, W. C., & Grillon, C. (2007). Cerebral blood flow in immediate and sustained anxiety. *J Neurosci*, *27*(23), 6313-6319.
- Hauser, P., Soler, R., Reed, S., Kane, R., Gulati, M., Khosla, J., Kling, M. A., Valentine, A. D., & Meyers, C. A. (2000). Prophylactic treatment of depression induced by interferon-alpha. *Psychosomatics*, *41*(5), 439-441.
- Hayley, S., Poulter, M. O., Merali, Z., & Anisman, H. (2005). The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*, *135*(3), 659-678.
- Hedou, G., Pryce, C., Di Iorio, L., Heidbreder, C. A., & Feldon, J. (2001). An automated analysis of rat behavior in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav*, *70*(1), 65-76.
- Henn, F. A., & Vollmayr, B. (2005). Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(4-5), 799-804.
- Ho, Y. J., Eichendorff, J., & Schwarting, R. K. (2002). Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behav Brain Res*, *136*(1), 1-12.
- Ho, Y. J., Pawlak, C. R., Guo, L., & Schwarting, R. K. (2004). Acute and long-term consequences of single MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat. *Behav Brain Res*, *149*(2), 135-144.
- Hodos, W., & Kalman, G. (1963). Effects of increment size and reinforcer volume on progressive ratio performance. *J Exp Anal Behav*, *6*, 387-392.
- Hwang, I. K., Yoo, K. Y., Kim, D. W., Lee, H. J., Kang, H. Y., Lee, H. Y., Kang, T. C., Choi, S. Y., Kim, Y. S., & Won, M. H. (2006). Transient ischemia-induced changes of interleukin-2 and its receptor beta immunoreactivity and levels in the gerbil hippocampal CA1 region. *Brain Res*, *1106*(1), 197-204.
- Isaac, M. (1999). Where are we going with SSRIs? *Eur Neuropsychopharmacol*, *9 Suppl 3*, S101-106.
- Jabaaij, L., Grosheide, P. M., Heijntink, R. A., Duivenvoorden, H. J., Ballieux, R. E., & Vingerhoets, A. J. (1993). Influence of perceived psychological stress and distress on antibody response to low dose rDNA hepatitis B vaccine. *J Psychosom Res*, *37*(4), 361-369.
- Jensen, J., McIntosh, A. R., Crawley, A. P., Mikulis, D. J., Remington, G., & Kapur, S. (2003). Direct activation of the ventral striatum in anticipation of aversive stimuli. *Neuron*, *40*(6), 1251-1257.
- Johnson, M. R., Lydiard, R. B., Zealberg, J. J., Fossey, M. D., & Ballenger, J. C. (1994). Plasma and CSF HVA levels in panic patients with comorbid social phobia. *Biol Psychiatry*, *36*(6), 425-427.
- Johnson, R. W. (2002). The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet Immunol Immunopathol*, *87*(3-4), 443-450.

- Juengling, F. D., Ebert, D., Gut, O., Engelbrecht, M. A., Rasenack, J., Nitzsche, E. U., Bauer, J., & Lieb, K. (2000). Prefrontal cortical hypometabolism during low-dose interferon alpha treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, *152*(4), 383-389.
- Kabbaj, M., & Akil, H. (2001). Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study. *Neuroscience*, *106*(3), 535-545.
- Kalia, M. (2005). Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism*, *54*(5 Suppl 1), 24-27.
- Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1995). Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Res*, *675*(1-2), 325-328.
- Karlsson, H., Hirvonen, J., Kajander, J., Markkula, J., Rasi-Hakala, H., Salminen, J. K., Nagren, K., Aalto, S., & Hietala, J. (2010). Research letter: Psychotherapy increases brain serotonin 5-HT1A receptors in patients with major depressive disorder. *Psychol Med*, *40*(3), 523-528.
- Karrenbauer, B. D., Ho, Y. J., Ludwig, V., Lohn, J., Spanagel, R., Schwarting, R. K., & Pawlak, C. R. (2009). Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats. *J Neuroimmunol*, *208*(1-2), 10-18.
- Karrenbauer, B. D., Müller, C. P., Ho, Y. J., Spanagel, R., Huston, J. P., Schwarting, R. K. W., & Pawlak, C. R. (eingereicht). Time-dependent in-vivo effects of interleukin-2 on neurotransmitters in various cortices: Relationships with depressive-related and anxiety-like behaviour.
- Kent, J. M., Coplan, J. D., & Gorman, J. M. (1998). Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biol Psychiatry*, *44*(9), 812-824.
- Kiecolt-Glaser, J. K., Loving, T. J., Stowell, J. R., Malarkey, W. B., Lemeshow, S., Dickinson, S. L., & Glaser, R. (2005). Hostile marital interactions, proinflammatory cytokine production, and wound healing. *Arch Gen Psychiatry*, *62*(12), 1377-1384.
- Kiecolt-Glaser, J. K., McGuire, L., Robles, T. F., & Glaser, R. (2002). Emotions, morbidity, and mortality: new perspectives from psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol*, *53*, 83-107.
- Kim, Y. K., Jung, H. G., Myint, A. M., Kim, H., & Park, S. H. (2007b). Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *J Affect Disord*, *104*(1-3), 91-95.
- Kim, Y. K., Na, K. S., Shin, K. H., Jung, H. Y., Choi, S. H., & Kim, J. B. (2007a). Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *31*(5), 1044-1053.
- Kirchner, H., Kruse, A., Neustock, P., & Rink, L. (1994). *Zytokine und Interferone: Botenstoffe des Immunsystems*. Heidelberg: Spektrum.
- Kirsch, I., Deacon, B. J., Huedo-Medina, T. B., Scoboria, A., Moore, T. J., & Johnson, B. T. (2008). Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. *PLoS Med*, *5*(2), e45.
- Koenigs, M., & Grafman, J. (2009). The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res*, *201*(2), 239-243.
- Koh, K. B., & Lee, B. K. (1998). Reduced lymphocyte proliferation and interleukin-2 production in anxiety disorders. *Psychosom Med*, *60*(4), 479-483.

- Koh, K. B., & Lee, Y. (2004). Reduced anxiety level by therapeutic interventions and cell-mediated immunity in panic disorder patients. *Psychother Psychosom*, 73(5), 286-292.
- Köks, S., Beljajev, S., Koovit, I., Abramov, U., Bourin, M., & Vasar, E. (2001). 8-OH-DPAT, but not deramciclone, antagonizes the anxiogenic-like action of paroxetine in an elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 153(3), 365-372.
- Konsman, J. P., Parnet, P., & Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*, 25(3), 154-159.
- Konsman, J. P., Veeneman, J., Combe, C., Poole, S., Luheshi, G. N., & Dantzer, R. (2008). Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci*, 28(12), 2499-2510.
- Konsman, J. P., Vignes, S., Mackerlova, L., Bristow, A., & Blomqvist, A. (2004). Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol*, 472(1), 113-129.
- Laakso, A., Wallius, E., Kajander, J., Bergman, J., Eskola, O., Solin, O., Ilonen, T., Salokangas, R. K., Sivalahti, E., & Hietala, J. (2003). Personality traits and striatal dopamine synthesis capacity in healthy subjects. *Am J Psychiatry*, 160(5), 904-910.
- Lacosta, S., Merali, Z., & Anisman, H. (1999a). Influence of acute and repeated interleukin-2 administration on spatial learning, locomotor activity, exploratory behaviors, and anxiety. *Behav Neurosci*, 113(5), 1030-1041.
- Lacosta, S., Merali, Z., & Anisman, H. (2000). Central monoamine activity following acute and repeated systemic interleukin-2 administration. *Neuroimmunomodulation*, 8(2), 83-90.
- Landgraf, R., & Wigger, A. (2003). Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress*, 6(2), 111-119.
- Lapchak, P. A. (1992). A role for interleukin-2 in the regulation of striatal dopaminergic function. *Neuroreport*, 3(2), 165-168.
- Lapchak, P. A., Araujo, D. M., Quirion, R., & Beaudet, A. (1991). Immunohistochemical localization of interleukin 2-like immunoreactivity and interleukin 2 receptors (Tac antigen-like immunoreactivity) in the rat brain. *Neuroscience*, 44(1), 173-184.
- LeDoux, J. E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*, 46, 209-235.
- Lee, Y. T., Wang, W. F., Cheng, C. W., Wu, S. L., Pawlak, C. R., & Ho, Y. J. (2008). Effects of escapable and inescapable stressors on behavior and interleukin-2 in the brain. *Neuroreport*, 19(12), 1243-1247.
- Lemke, M. R., Fuchs, G., Gemende, I., Herting, B., Oehlwein, C., Reichmann, H., Rieke, J., & Volkman, J. (2004). Depression and Parkinson's disease. *J Neurol*, 251 Suppl 6, VI/24-27.
- Leonard, B. E. (2001). The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 25(4), 767-780.
- Leonard, B. E., & Myint, A. (2009). The psychoneuroimmunology of depression. *Hum Psychopharmacol*, 24(3), 165-175.

- Leppanen, J. M. (2006). Emotional information processing in mood disorders: a review of behavioral and neuroimaging findings. *Curr Opin Psychiatry*, *19*(1), 34-39.
- Lesperance, F., Frasere-Smith, N., Theroux, P., & Irwin, M. (2004). The association between major depression and levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, interleukin-6, and C-reactive protein in patients with recent acute coronary syndromes. *Am J Psychiatry*, *161*(2), 271-277.
- Lissoni, P., Rovelli, F., Brivio, F., Brivio, O., & Fumagalli, L. (1998). Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun*, *16*(1), 1-5.
- Locke, S. E., Kraus, L., Leserman, J., Hurst, M. W., Heisel, J. S., & Williams, R. M. (1984). Life change stress, psychiatric symptoms, and natural killer cell activity. *Psychosom Med*, *46*(5), 441-453.
- Lorberbaum, J. P., Kose, S., Johnson, M. R., Arana, G. W., Sullivan, L. K., Hamner, M. B., Ballenger, J. C., Lydiard, R. B., Brodrick, P. S., Bohning, D. E., & George, M. S. (2004). Neural correlates of speech anticipatory anxiety in generalized social phobia. *Neuroreport*, *15*(18), 2701-2705.
- Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*, *8*(6-7), 523-532.
- Ludwig, V., Mihov, Y., & Schwarting, R. K. (2008). Behavioral and neurochemical consequences of multiple MDMA administrations in the rat: role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res*, *189*(1), 52-64.
- Ludwig V. (2007). Neurobiopsychologische Analyse des Angstverhaltens im Modell der Ratte: Auswirkung serotonerger Manipulationen. Publikationsbasierte unveröffentlichte Dissertation am Fachbereich Psychologie, Philipps - Universität Marburg, Deutschland.
- Lutgendorf, S. K., Costanzo, E. S., & Siegel, S. D. (2007). Psychosocial Influences in Oncology: An Expanded Model of Biobehaviour Mechanisms. In A. R & C. N (Eds.), *Psychoneuroendocrinology* (pp. 869-895). San Diego: Academic Press.
- Maes, M., Bosmans, E., Calabrese, J., Smith, R., & Meltzer, H. Y. (1995a). Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. *J Psychiatr Res*, *29*(2), 141-152.
- Maes, M., Smith, R., & Scharpe, S. (1995b). The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology*, *20*(2), 111-116.
- Maes, M., Wauters, A., Verkerk, R., Demedts, P., Neels, H., Van Gastel, A., Cosyns, P., Scharpe, S., & Desnyder, R. (1996). Lower serum L-tryptophan availability in depression as a marker of a more generalized disorder in protein metabolism. *Neuropsychopharmacology*, *15*(3), 243-251.
- Maier, S. F., & Watkins, L. R. (1998). Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev*, *105*(1), 83-107.
- Maisonnette, S., Morato, S., & Brandao, M. L. (1993). Role of resocialization and of 5-HT1A receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, *54*(4), 753-758.
- Makino, M., Kitano, Y., Komiyama, C., & Takasuna, K. (2000). Human interferon-alpha increases immobility in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *148*(1), 106-110.

- Mallo, T., Alntoa, A., Koiv, K., Tonissaar, M., Eller, M., & Harro, J. (2007). Rats with persistently low or high exploratory activity: behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behav Brain Res*, *177*(2), 269-281.
- Marques-Deak, A. H., Neto, F. L., Dominguez, W. V., Solis, A. C., Kurcgant, D., Sato, F., Ross, J. M., & Prado, E. B. (2007). Cytokine profiles in women with different subtypes of major depressive disorder. *J Psychiatr Res*, *41*(1-2), 152-159.
- Martin, M., & Resch, K. (2009). *Immunologie*. Stuttgart: UTB.
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*, *28*(3), 285-305.
- McNaughton, N., & Gray, J. A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*, *61*(3), 161-176.
- Menza, M. A., Robertson-Hoffman, D. E., & Bonapace, A. S. (1993). Parkinson's disease and anxiety: comorbidity with depression. *Biol Psychiatry*, *34*(7), 465-470.
- Meyer, J. H., McNeely, H. E., Sagrati, S., Boovariwala, A., Martin, K., Verhoeff, N. P., Wilson, A. A., & Houle, S. (2006). Elevated putamen D(2) receptor binding potential in major depression with motor retardation: an [11C]raclopride positron emission tomography study. *Am J Psychiatry*, *163*(9), 1594-1602.
- Migueluez, M., Lacasse, M., Kentner, A. C., Rizk, I., Fouriez, G., & Bielajew, C. (2004). Short- and long-term effects of interleukin-2 on weight, food intake, and hedonic mechanisms in the rat. *Behav Brain Res*, *154*(2), 311-319.
- Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, *70*(2), 83-244.
- Mitsonis, C. I., Potagas, C., Zervas, I., & Sfagos, K. (2009). The effects of stressful life events on the course of multiple sclerosis: a review. *Int J Neurosci*, *119*(3), 315-335.
- Miura, H., Ozaki, N., Sawada, M., Isobe, K., Ohta, T., & Nagatsu, T. (2008). A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. *Stress*, *11*(3), 198-209.
- Montkowski, A., Landgraf, R., Yassouridis, A., Holsboer, F., & Schobitz, B. (1997). Central administration of IL-1 reduces anxiety and induces sickness behaviour in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *58*(2), 329-336.
- Moore, P., Landolt, H. P., Seifritz, E., Clark, C., Bhatti, T., Kelsoe, J., Rapaport, M., & Gillin, J. C. (2000). Clinical and physiological consequences of rapid tryptophan depletion. *Neuropsychopharmacology*, *23*(6), 601-622.
- Mössner, R., Mikova, O., Koutsilieri, E., Saoud, M., Ehli, A. C., Müller, N., Fallgatter, A. J., & Riederer, P. (2007). Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. *World J Biol Psychiatry*, *8*(3), 141-174.
- Motta, V., Maisonneuve, S., Morato, S., Castrechini, P., & Brandao, M. L. (1992). Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, *107*(1), 135-139.

- Müller, N., & Schwarz, M. J. (2007). The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry*, *12*(11), 988-1000.
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie* (7 ed.). Heidelberg: Springer.
- Musselman, D. L., Lawson, D. H., Gumnick, J. F., Manatunga, A. K., Penna, S., Goodkin, R. S., Greiner, K., Nemeroff, C. B., & Miller, A. H. (2001). Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med*, *344*(13), 961-966.
- Myint, A. M., & Kim, Y. K. (2003). Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses*, *61*(5-6), 519-525.
- Myint, A. M., Leonard, B. E., Steinbusch, H. W., & Kim, Y. K. (2005). Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression. *J Affect Disord*, *88*(2), 167-173.
- Myint, A. M., Schwarz, M. J., Steinbusch, H. W., & Leonard, B. E. (2009). Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment. *Metab Brain Dis*, *24*(1), 55-68.
- Naito, Y., Fukata, J., Tominaga, T., Masui, Y., Hirai, Y., Murakami, N., Tamai, S., Mori, K., & Imura, H. (1989). Adrenocorticotrophic hormone-releasing activities of interleukins in a homologous in vivo system. *Biochem Biophys Res Commun*, *164*(3), 1262-1267.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, *34*(1), 13-25.
- Nestler, E. J., & Carlezon, W. A., Jr. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*, *59*(12), 1151-1159.
- Nistico, G. (1993). Communications among central nervous system, neuroendocrine and immune systems: interleukin-2. *Prog Neurobiol*, *40*(4), 463-475.
- Nistico, G., & De Sarro, G. (1991). Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain? *Trends Neurosci*, *14*(4), 146-150.
- O'Connor, J. C., Andre, C., Wang, Y., Lawson, M. A., Szegedi, S. S., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2009). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci*, *29*(13), 4200-4209.
- Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem*, *40*(2), 288-295.
- Palatnik, A., Frolov, K., Fux, M., & Benjamin, J. (2001). Double-blind, controlled, crossover trial of inositol versus fluvoxamine for the treatment of panic disorder. *J Clin Psychopharmacol*, *21*(3), 335-339.
- Panksepp, J. (1998). The Sources of Fear and Anxiety in the Brain. In J. Panksepp (Ed.), *Affective Neuroscience* (pp. 206-222). Oxford: University Press.
- Papp, M., Willner, P., & Muscat, R. (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*, *104*(2), 255-259.

- Pauli, S., Linthorst, A. C., & Reul, J. M. (1998). Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Eur J Neurosci*, *10*(3), 868-878.
- Papakostas, G. I., Homberger, C. H., & Fava, M. (2008). A meta-analysis of clinical trials comparing mirtazapine with selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of major depressive disorder. *J Psychopharmacol*, *22*(8), 843-848.
- Pawlak, C. R. (2007). *Individual behaviour in rats: Cytokines in the brain*. Unpublished habilitation thesis, Philipps-University of Marburg.
- Pawlak, C. R., Ho, Y. J., Schwarting, R. K., & Bauhofer, A. (2003). Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behaviour in the rat. *Neurosci Lett*, *341*(3), 205-208.
- Pawlak, C. R., Karrenbauer, B. D., Schneider, P., & HO, Y.-J. (im Druck). The elevated plus-maze test: Differential psychopharmacology of anxiety-related behaviour. *Emotion Reviews*.
- Pawlak, C. R., & Schwarting, R. K. (2006a). Striatal microinjections of interleukin-2 and rat behaviour in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, *168*(2), 339-344.
- Pawlak, C. R., Schwarting, R. K., & Bauhofer, A. (2005). Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior. *Brain Res Mol Brain Res*, *137*(1-2), 159-165.
- Pawlak, C. R., & Weyers, P. (2006b). Tiermodelle für Angst und Angststörungen. *Psychologische Rundschau*, *57*(3), 139 - 153.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain: In stereotaxic coordinates* (6 ed.). Oxford: Elsevier.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, *14*(3), 149-167.
- Perkins, A. M., Ettinger, U., Davis, R., Foster, R., Williams, S. C., & Corr, P. J. (2009). Effects of Lorazepam and citalopram on human defensive reactions: ethopharmacological differentiation of fear and anxiety. *J Neurosci*, *29*(40), 12617-12624.
- Petitto, J. M., Huang, Z., Hartemink, D. A., & Beck, R., Jr. (2002). IL-2/15 receptor-beta gene deletion alters neurobehavioral performance. *Brain Res*, *929*(2), 218-225.
- Petitto, J. M., McCarthy, D. B., Rinker, C. M., Huang, Z., & Getty, T. (1997). Modulation of behavioral and neurochemical measures of forebrain dopamine function in mice by species-specific interleukin-2. *J Neuroimmunol*, *73*(1-2), 183-190.
- Pham, P. T., Pham, P. C., & Wilkinson, A. H. (2009). Management of renal dysfunction in the liver transplant recipient. *Curr Opin Organ Transplant*, *14*(3), 231-239.
- Pinel, J. P. J. (2006). *Biopsychology* (6 ed.). Boston: Pearson.
- Pinheiro, S. H., Zangrossi, H., Jr., Del-Ben, C. M., & Graeff, F. G. (2007). Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. *An Acad Bras Cienc*, *79*(1), 71-85.
- Pitchot, W., Anseau, M., Gonzalez Moreno, A., Hansenne, M., & von Frenckell, R. (1992). Dopaminergic function in panic disorder: comparison with major and minor depression. *Biol Psychiatry*, *32*(11), 1004-1011.

- Pollack, M. H. (2005b). Comorbid anxiety and depression. *J Clin Psychiatry*, *66 Suppl 8*, 22-29.
- Pollack, M. H., Zaninelli, R., Goddard, A., McCafferty, J. P., Bellew, K. M., Burnham, D. B., & Iyengar, M. K. (2001). Paroxetine in the treatment of generalized anxiety disorder: results of a placebo-controlled, flexible-dosage trial. *J Clin Psychiatry*, *62(5)*, 350-357.
- Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, *47(4)*, 379-391.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266(5604)*, 730-732.
- Prica, C., Hascoet, M., & Bourin, M. (2008). Is co-administration of bupropion with SSRIs and SNRIs in forced swimming test in mice, predictive of efficacy in resistant depression? *Behav Brain Res*, *194(1)*, 92-99.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, *463(1-3)*, 3-33.
- Pum, M. E., Huston, J. P., & Müller, C. P. (2009). The role of cortical serotonin in anxiety and locomotor activity in Wistar rats. *Behav Neurosci*, *123(2)*, 449-454.
- Quan, N., Whiteside, M., & Herkenham, M. (1998). Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*, *83(1)*, 281-293.
- Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, *27(1)*, 24-31.
- Raison, C. L., Demetrashvili, M., Capuron, L., & Miller, A. H. (2005). Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS Drugs*, *19(2)*, 105-123.
- Rapaport, M. H., & Stein, M. B. (1994a). Serum cytokine and soluble interleukin-2 receptors in patients with panic disorder. *Anxiety*, *1(1)*, 22-25.
- Rapaport, M. H., & Stein, M. B. (1994b). Serum interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor levels in generalized social phobia. *Anxiety*, *1(2)*, 50-53.
- Reinecker, H. (2003). *Lehrbuch der klinischen Psychologie und Psychotherapie: Modelle psychischer Störungen* (4 ed.). Göttingen: Hogrefe.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*, *30(3)*, 289-304.
- Romeo, H. E., Tio, D. L., Rahman, S. U., Chiappelli, F., & Taylor, A. N. (2001). The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J Neuroimmunol*, *115(1-2)*, 91-100.
- Sanchez, C., & Meier, E. (1997). Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology (Berl)*, *129(3)*, 197-205.
- Sansone, R. A., & Sansone, L. A. (2010). Psychiatric disorders: a global look at facts and figures. *Psychiatry (Edgmont)*, *7(12)*, 16-19.
- Schatzberg, A. F. (2000). New indications for antidepressants. *J Clin Psychiatry*, *61 Suppl 11*, 9-17.

- Schiepers, O. J., Wichers, M. C., & Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(2), 201-217.
- Schiller, J. H., Hank, J., Storer, B., Borchert, A. A., Moore, K. H., Albertini, M., Bechhofer, R., Wesley, O., Brown, R. R., Bastin, A. M., & et al. (1993). A direct comparison of immunological and clinical effects of interleukin 2 with and without interferon-alpha in humans. *Cancer Res*, 53(6), 1286-1292.
- Schiltz, J. C., & Sawchenko, P. E. (2002). Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci*, 22(13), 5606-5618.
- Schneider, M., Heise, V., & Spanagel, R. (2010). Differential involvement of the opioid receptor antagonist naloxone in motivational and hedonic aspects of reward. *Behav Brain Res*, 208(2), 466-472.
- Schneider, P., Weber-Fahr, W., Leonardi-Essmann, F., Spanagel, R., Sartorius, A., & Pawlak, C. (2010). *Differential psychopharmacology: Interleukin-2 effects on behaviour and neurochemistry*. Paper presented at the Society for Neuroscience, San Diego.
- Schneier, F. R., Liebowitz, M. R., Abi-Dargham, A., Zea-Ponce, Y., Lin, S. H., & Laruelle, M. (2000). Low dopamine D(2) receptor binding potential in social phobia. *Am J Psychiatry*, 157(3), 457-459.
- Schneier, F. R., Liebowitz, M. R., Davies, S. O., Fairbanks, J., Hollander, E., Campeas, R., & Klein, D. F. (1990). Fluoxetine in panic disorder. *J Clin Psychopharmacol*, 10(2), 119-121.
- Schrijvers, D., Hulstijn, W., & Sabbe, B. G. (2008). Psychomotor symptoms in depression: a diagnostic, pathophysiological and therapeutic tool. *J Affect Disord*, 109(1-2), 1-20.
- Schruers, K., Klaassen, T., Pols, H., Overbeek, T., Deutz, N. E., & Griez, E. (2000). Effects of tryptophan depletion on carbon dioxide provoked panic in panic disorder patients. *Psychiatry Res*, 93(3), 179-187.
- Schruers, K., van Diest, R., Overbeek, T., & Griez, E. (2002a). Acute L-5-hydroxytryptophan administration inhibits carbon dioxide-induced panic in panic disorder patients. *Psychiatry Res*, 113(3), 237-243.
- Schwartz, R. K., Thiel, C. M., Müller, C. P., & Huston, J. P. (1998). Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport*, 9(6), 1025-1029.
- Schwartz, R. K. W., & Pawlak, C. R. (2004). Behavioural Neuroscience in the Rat: Taking the Individual into Account. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 26, 17-22.
- Seegerstrom, S. C., & Miller, G. E. (2004). Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull*, 130(4), 601-630.
- Seidel, A., Arolt, V., Hunstiger, M., Rink, L., Behnisch, A., & Kirchner, H. (1995). Cytokine production and serum proteins in depression. *Scand J Immunol*, 41(6), 534-538.
- Seligman, M. E. (1972). Learned helplessness. *Annu Rev Med*, 23, 407-412.
- Shaldubina, A., Stahl, Z., Furszpan, M., Regenold, W. T., Shapiro, J., Belmaker, R. H., & Bersudsky, Y. (2006). Inositol deficiency diet and lithium effects. *Bipolar Disord*, 8(2), 152-159.

- Shelton, R. C., Claiborne, J., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Reddy, R., Aschner, M., Lewis, D. A., & Mirnics, K. (2010). Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol Psychiatry*.
- Sheline, Y. (2008). Neuroanatomical Changes Associated with Unipolar Major Depression. *The Neuroscientist*, 4(5), 331 - 334.
- Silva, M. T., Alves, C. R., & Santarem, E. M. (1999). Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*, 32(3), 333-339.
- Silva, R. C., & Brandao, M. L. (2000). Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacol Biochem Behav*, 65(2), 209-216.
- Silverstone, P. H., & Silverstone, T. (2004). A review of acute treatments for bipolar depression. *Int Clin Psychopharmacol*, 19(3), 113-124.
- Sloan, E., Collado-Hidalgo, A., & Cole, S. (2007). Psychobiology of HIV Infection. In A. R & C. N (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (pp. 1053-1074). San Diego: Academic Press.
- Smith, R. S. (1991). The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*, 35(4), 298-306.
- Song, Y., Zhou, D., Guan, Z., & Wang, X. (2007). Disturbance of serum interleukin-2 and interleukin-8 levels in posttraumatic and non-posttraumatic stress disorder earthquake survivors in northern China. *Neuroimmunomodulation*, 14(5), 248-254.
- Song, C., Merali, Z., & Anisman, H. (1999). Variations of nucleus accumbens dopamine and serotonin following systemic interleukin-1, interleukin-2 or interleukin-6 treatment. *Neuroscience*, 88(3), 823-836.
- Southwick, S. M., Vythilingam, M., & Charney, D. S. (2005). The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu Rev Clin Psychol*, 1, 255-291.
- Stein, D. J. (2008). Depression, anhedonia, and psychomotor symptoms: the role of dopaminergic neurocircuitry. *CNS Spectr*, 13(7), 561-565.
- Stein, D. J., Westenberg, H. G., & Liebowitz, M. R. (2002). Social anxiety disorder and generalized anxiety disorder: serotonergic and dopaminergic neurocircuitry. *J Clin Psychiatry*, 63 Suppl 6, 12-19.
- Steptoe, A., Kunz-Ebrecht, S. R., & Owen, N. (2003). Lack of association between depressive symptoms and markers of immune and vascular inflammation in middle-aged men and women. *Psychol Med*, 33(4), 667-674.
- Sudom, K., Turrin, N. P., Hayley, S., & Anisman, H. (2004). Influence of chronic interleukin-2 infusion and stressors on sickness behaviors and neurochemical change in mice. *Neuroimmunomodulation*, 11(5), 341-350.
- Thiel, C. M., Müller, C. P., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1999). High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93(1), 243-251.
- Thiel, C. M., & Schwarting, R. K. (2001). Dopaminergic lateralisation in the forebrain: relations to behavioural asymmetries and anxiety in male Wistar rats. *Neuropsychobiology*, 43(3), 192-199.

- Treit, D., & Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *31*(4), 959-962.
- Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, *44*(2), 463-469.
- Trepel, M. (2004). *Neuroanatomie. Struktur und Funktion* (3 ed.). München: Elsevier.
- Tsao, C. W., Lin, Y. S., Chen, C. C., Bai, C. H., & Wu, S. R. (2006). Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *30*(5), 899-905.
- van den Heuvel, O. A., Veltman, D. J., Groenewegen, H. J., Witter, M. P., Merkelbach, J., Cath, D. C., van Balkom, A. J., van Oppen, P., & van Dyck, R. (2005). Disorder-specific neuroanatomical correlates of attentional bias in obsessive-compulsive disorder, panic disorder, and hypochondriasis. *Arch Gen Psychiatry*, *62*(8), 922-933.
- Van der Does, A. J. (2001). The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. *J Affect Disord*, *64*(2-3), 107-119.
- van Megen, H. J., Westenberg, H. G., den Boer, J. A., Slaap, B., & Scheepmakers, A. (1997). Effect of the selective serotonin reuptake inhibitor fluvoxamine on CCK-4 induced panic attacks. *Psychopharmacology (Berl)*, *129*(4), 357-364.
- Vitkovic, L., Bockaert, J., & Jacque, C. (2000a). „Inflammatory“ cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem*, *74*(2), 457-471.
- Vitkovic, L., Konsman, J. P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., & Jacque, C. (2000b). Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry*, *5*(6), 604-615.
- Waguespack, P. J., Banks, W. A., & Kastin, A. J. (1994). Interleukin-2 does not cross the blood-brain barrier by a saturable transport system. *Brain Res Bull*, *34*(2), 103-109.
- Waldmann, T. A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*, *6*(8), 595-601.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, *2*(2), 322-328.
- Walker, L. G., Walker, M. B., Heys, S. D., Lolley, J., Wesnes, K., & Eremin, O. (1997). The psychological and psychiatric effects of rIL-2 therapy: a controlled clinical trial. *Psychooncology*, *6*(4), 290-301.
- Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Mooney-Heiberger, K., Martinez, J., Furness, L., Smith, K. P., & Maier, S. F. (1994). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. *Brain Res*, *639*(2), 283-299.
- Wehrmeister, T. D., Izidio, G. S., Pereira, E., Izidio, G., & Ramos, A. (2010). Absence of repeated-trial tolerance to the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in the rat triple test. *Pharmacol Biochem Behav*, *97*(2), 301-309.
- Weintraub, D., Newberg, A. B., Cary, M. S., Siderowf, A. D., Moberg, P. J., Kleiner-Fisman, G., Duda, J. E., Stern, M. B., Mozley, D., & Katz, I. R. (2005). Striatal dopamine transporter imaging correlates with anxiety and depression symptoms in Parkinson's disease. *J Nucl Med*, *46*(2), 227-232.

- Westenberg, H. G. (1996). Developments in the drug treatment of panic disorder: what is the place of the selective serotonin reuptake inhibitors? *J Affect Disord*, *40*(1-2), 85-93.
- Wichers, M., & Maes, M. (2002). The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int J Neuropsychopharmacol*, *5*(4), 375-388.
- Wichers, M. C., & Maes, M. (2004). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *J Psychiatry Neurosci*, *29*(1), 11-17.
- Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). Animal Models of Depression: A Diathesis/Stress Approach. In H. D'haenen, J. A. den Boer & P. Willner (Eds.), *Biological Psychiatry* (pp. 703-726). Chichester: Wiley.
- Willner, P., Muscat, R., & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, *16*(4), 525-534.
- Winograd-Gurvich, C., Fitzgerald, P. B., Georgiou-Karistianis, N., Bradshaw, J. L., & White, O. B. (2006). Negative symptoms: A review of schizophrenia, melancholic depression and Parkinson's disease. *Brain Res Bull*, *70*(4-6), 312-321.
- Winter, C., von Rumohr, A., Mundt, A., Petrus, D., Klein, J., Lee, T., Morgenstern, R., Kupsch, A., & Juckel, G. (2007). Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behav Brain Res*, *184*(2), 133-141.
- Wittchen, H. U., & Hoyer, J. (2006). *Klinische Psychologie und Psychotherapie* (1 ed.). Heidelberg: Springer.
- Wittchen, H. U., & Jacobi, F. (2005). Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of 27 studies. *Eur Neuropsychopharmacol*, *15*(4), 357-376.
- Zalcman, S., Green-Johnson, J. M., Murray, L., Nance, D. M., Dyck, D., Anisman, H., & Greenberg, A. H. (1994). Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res*, *643*(1-2), 40-49.
- Zalcman, S., Murray, L., Dyck, D. G., Greenberg, A. H., & Nance, D. M. (1998). Interleukin-2 and -6 induce behavioral-activating effects in mice. *Brain Res*, *811*(1-2), 111-121.
- Zalcman, S. S. (2001). Interleukin-2 potentiates novelty- and GBR 12909-induced exploratory activity. *Brain Res*, *899*(1-2), 1-9.
- Zalcman, S. S. (2002). Interleukin-2-induced increases in climbing behavior: inhibition by dopamine D-1 and D-2 receptor antagonists. *Brain Res*, *944*(1-2), 157-164.
- Zalcman, S. S., & Siegel, A. (2006). The neurobiology of aggression and rage: role of cytokines. *Brain Behav Immun*, *20*(6), 507-514.

Curriculum Vitae

Britta Daniela Karrenbauer

Persönliche Daten

Name	Britta Daniela Karrenbauer
Anschrift	Friedensplatz 3 35037 Marburg
Telefon	06421-309757 Mobil: 0177-4148746
E-Mail	Karrenbb@staff.uni-marburg.de; Karrenbauerb@web.de
Geburtsdatum	03.06.1978
Geburtsort	Leverkusen-Opladen
Familienstand	Ledig

Schul Ausbildung

11/05	Abschluss des Studiums: Diplom (1)
03/03 – 09/04	Verfassen der experimentellen Diplomarbeit Titel: Nikotin: Konditionierte Platzpräferenz und das Phänomen der Sensitivierung
05/01	Vordiplom (2)
10/98	Studium der Psychologie an der Philipps-Universität in Marburg
06/98	Allgemeine Hochschulreife (1,6)
09/91 – 07/98	Gesamtschule Schlebusch
09/88 – 07/91	Gymnasium Marianum Leverkusen-Opladen

Berufsrelevante Tätigkeiten

04/11 seit 12/10	voraussichtlicher Abschluss der Promotion Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Gießen/Marburg, Abteilung Psychosomatische Medizin und Psychotherapie (Prof. Dr.med. Beat Kolb-Niemann)
10/06 – 10/10	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Psychologie Abteilung Allgemeine und Physiologische Psychologie, AG Basalganglienfunktionen und -dysfunktionen (Prof. Dr. Rainer Schwarting)
04/06	Beginn der Promotion am Institut für Psychologie Abteilung Allgemeine und Physiologische Psychologie, AG Basalganglienfunktionen und -dysfunktionen (Prof. Dr. Rainer Schwarting), externer Anleiter Dr. Cornelius Pawlak, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim, Abteilung Psychopharmakologie
09/04 – 12/04	Praktikum im Forschungszentrum Jülich am Institut für Medizin (funktionale Bildgebung in kognitiven Neurowissenschaften, speziell pharmakologischen Modulation von Aufmerksamkeitsfunktionen)
10/03	Praktikum zur Versuchstierkunde an der Philipps-Universität Marburg
03/03 – 05/03	Praktikum (Tierexperimentelle Verhaltensbeobachtung unter pharmakologischer Manipulation) Abteilung Allgemeine Psychologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/01 – 04/04	studentische Hilfskraft am Institut für Psychologie, Abteilung Allgemeine und Physiologische Psychologie, AG Basalganglienfunktionen und -dysfunktionen (Prof. Dr. Rainer Schwarting)

Lehrtätigkeit

2009	Literaturseminar „Psychopharmakologie“
2008/2009	Experimentalpraktikum „Wie weit wollen Ratten gehen? Motivationsforschung im Tiermodell“

Poster

2010

Karrenbauer BD, Müller CP, Spanagel R, Ho YJ, Schwarting RKW, Pawlak CR (2010). Interleukin-2 reduces extracellular cortical serotonin: Impact on depressive-related and anxiety-like behaviour. *Poster at the Meeting of the International PsychoNeuroImmunology Research Society (PNIRS)*. Dublin, Ireland.

2009

Karrenbauer BD, Mueller CP, Schwarting RKW, Spanagel R, Huston JP, Pawlak CR (2009). Der Immunbotenstoff Interleukin-2 (IL-2) verändert dosis- und zeitabhängig depressionsrelevantes Verhalten (2009). Pabst Science Publishers: Lengerich, ISBN 978-3-89967-542-9, S. 129. *Poster at the 51st Workshop of Experimentally Working Psychologists (TeaP)*. Jena, Germany.

Karrenbauer BD, Mueller CP, Schwarting RKW, Spanagel R, Huston JP, Pawlak CR (2009). Extracellular cortical serotonin and depression-related behaviour in the forced swim test are influenced by interleukin-2 (2009). Programme No. T13-7A Neuroforum 2009 (1), Vol. 15. CD-ROM, ISSN 0947-0875. *Poster at the 32nd Göttingen Neurobiology Conference (NWG)*. Göttingen, Germany.

Karrenbauer BD, Mueller CP, Schwarting RKW, Spanagel R, Pawlak CR (2009). Interleukin-2: A modulator of extracellular serotonin in the prefrontal cortex and depression-related behaviour? Abstract published in Behavioural Pharmacology (2009) Special Issue 1: 63. *Poster at the 13th biennial Meeting of the European Behavioural Pharmacology Society (EBPS)*. Rom, Italy.

Karrenbauer BD, Mueller CP, Schwarting RKW, Spanagel R, Pawlak CR (2009) Extracellular cortical serotonin and depression-related behaviour in the forced swim test is influenced by Interleukin-2. Abstract published in Acta Neurobiologiae Experimentalis (2009) 69 (3): 353. *Poster at the 9th International Congress of the Polish Neuroscience Society (PNS)*. Warsaw, Poland.

2008

Karrenbauer BD, Müller C, Spanagel R, Huston JP, Schwarting RKW, Pawlak CR (2008). Interleukin-2 reduces extracellular serotonin levels in cortices of the rat brain. GCC Grafisches Centrum Cuno GmbH und Co. KG: Calbe, 125. *Poster at the 34th Conference on Psychology and Brain*. Magdeburg, Germany.

Pawlak CR, Müller CP, Spanagel R, Huston JP, Schwarting RKW, **Karrenbauer BD** (2008). Interleukin-2 reduces extracellular cortical serotonin and influences depression-related behaviour in rats. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 258, Suppl. 4, 24. *Poster at the 7th Three-Country-Symposium for Biological Psychiatry*. Göttingen, Germany.

Karrenbauer BD, Müller CP, Spanagel R, Huston JP, Schwarting RKW, Pawlak CR (2008). Interleukin-2 reduces extracellular serotonin levels in cortex areas and influences depressive-related behaviour in rats. Program No. 478. *2008 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online. *Poster at the Society for Neuroscience 38th Annual Meeting*. Washington, DC, USA.

2007

Karrenbauer BD, Löhn J, Schwarting RKW, Pawlak CR (2007). Interleukin-2 in the striatum affects behaviour in rats. Programme No. T36-1C Neuroforum. CD-ROM. *Poster at the 31st Göttingen Neurobiology Conference*. Göttingen, Germany.

Karrenbauer BD, Schwarting RKW, Ludwig V, Löhn J, Spanagel R, Ho YJ, Pawlak CR (2007). Proactive drug mechanisms do not play a role in acute and delayed effects of Interleukin-2 in the striatum on emotional behaviour in rats. *Behavioural Pharmacology* 18, Suppl. 1, S79. *Poster at the 12th Biennial Meeting of the European Behavioural Pharmacology Society*. Tübingen, Germany.

Karrenbauer BD, Ho YJ, Ludwig V, Schwarting RKW, Pawlak CR (2007). Effects of cytokines in the striatum on motivated behaviour in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 67, Suppl., 343. *Poster at the 8th International Congress of the Polish Neuroscience Society*. Krakow, Poland.

Karrenbauer BD, Schwarting RKW, Ludwig V, Löhn J, Spanagel R, Ho YJ, Pawlak CR. Proactive drug mechanisms do not play a role in acute and delayed effects of interleukin-2 in the striatum on emotional behaviour in rats. Program No. 269.18/X14. *2007 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2007. Online. *Poster at the Society for Neuroscience 37th Annual Meeting*. San Diego, USA.

2004

Pawlak CR, **Karrenbauer B**, Schwarting RKW (2004). Behavioural sensitization and place preference with repeated nicotine treatment in individual groups of rats. *Beiträge zur 46. Tagung experimentell arbeitender Psychologen*. Pabst Science Publishers: Lengerich, 192. *Poster at the 46th Workshop of experimental working psychologists (TeaP)*. Gießen, Germany.

2002

Pawlak CR, **Karrenbauer B**, Schwarting, RKW Analysis of behavioural sensitization and place preference in rats with repeated nicotine treatment. Program No. 289.13. *2002 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: *Society for Neuroscience*, 2002. CD-ROM. *Poster at the Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting*. Orlando, USA.

Vorträge

Karrenbauer BD, Mueller CP, Schwarting RKW, Spanagel R, Huston JP, Pawlak CR (2009). Der Immunbotenstoff Interleukin-2 (IL-2) verändert dosis- und zeitabhängig depressionsrelevantes Verhalten. Leipziger Universitätsverlag ISBN 978-3-86583-364-8, S. 138. *Vortrag auf der 35zigsten Arbeitstagung Psychophysiologie und Methodik (APM)*. Leipzig, Deutschlang.

Karrenbauer BD, Mueller CP, Schwarting RKW, Spanagel R, Pawlak CR (2009) Interleukin-2 reduces extracellular cortical serotonin and increases depression-related behaviour in the forced swim test in rats. *Vortrag auf der Tagung der German-Endocrine-Brain-Immune-Network (GEBIN)*. Frankfurt, Deutschland.

Karrenbauer BD, Müller CP, Spanagel R, Huston JP, Schwarting RKW, Pawlak CR (2008). The immune messenger interleukin-2 (IL-2) reduces serotonin (5-HT) in the medial prefrontal (mPFC), occipital, and temporal cortices of the rat brain. Beiträge zur 50. Tagung experimentell arbeitender Psychologen. Pabst Science Publishers: Lengerich, 72. *Vortrag auf der 50zigsten Tagung der experimentell arbeitenden Psychologen (TeaP)*. Marburg, Deutschland.

Pawlak CR, **Karrenbauer BD**, Schwarting RKW (2007). Motivated behaviour in rats and cytokines. *Journal of Psychophysiology. Talk at the 33rd Conference on Psychology and Brain*. Dortmund, Germany.

Veröffentlichte Artikel

B. D. Karrenbauer, Y.-J. Ho, V. Ludwig, J. Löhn, R. Spanagel, R. K. W. Schwarting, C. R. Pawlak (2009). Acute and delayed effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats. *Journal of Neuroimmunology* 208 (1-2), 10-18.

C. R. Pawlak, **B.D. Karrenbauer**, P. Schneider, Y-J. HO (in Druck). The elevated plus-maze test: Differential psychopharmacology of anxiety-related behaviour. *Emotion Reviews*.

B. D. Karrenbauer, C. P. Müller, Y. J. Ho, R. Spanagel, J. P. Huston, R. K. W. Schwarting, C. R. Pawlak (eingereicht). Time-dependent in-vivo effects of Interleukin-2 on neurotransmitters in various cortices: Relationship and effects on depressive-related and anxiety-like behaviour.

Stipendien

Reisestipendium (2009) der Federation of European Neurosciences (FENS) zu der 9ten internationalen Tagung der *Polish Neuroscience Society (PNS) in Warschau, Polen*.

Reisestipendium (2009) der European Behavioural Pharmacology Society (EBPS) zu dem 13ten zweijährlichen Kongress der *European Behavioural Pharmacology Society* in Rom, Italien.

Reisestipendium (2007) des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Dr. Y-J Ho der „Chung-Shan Medical University“ in Taichung (Taiwan).

Sonstige Kenntnisse

EDV	Office Anwendungen: MS Word, MS Excel, MS Power Point
Statistische Analysen:	SPSS, SPM für fMRT Daten
Programmierkenntnisse:	Presentation
Graphikverarbeitung:	Sigma Plot, Corel Draw, Adobe Photo Shop
Internetanwendungen:	real FTP, Literatursuche (Pubmend; Medline; ISI)
Literaturverwaltung:	Endnote, Referencemanager
Sprachkenntnisse	Deutsch (Muttersprache) Englisch (flüssig in Wort und Schrift) Latinum
Fachkenntnisse	Psychoneuroimmunologie, Psychopharmakologie, funktionale Neuroanatomie, Neurophysiologie und -psychologie Angst und depressiver Störungen, Statistische Analysen
Tierexperimentelle Forschungsmethoden	Versuchsdurchführung folgender Verhaltensexperimente: Offenfeld, Sozialer Interaktionstest, Erhöhtes Plus-Labyrinth, Konditionierte Platzpräferenz, Inhibitorische Vermeidung, Aktive Vermeidung, Objekt Erkennungstest, Ess- und Trinkverhaltenstests, Forcierter Schwimmtest Bedienung folgender Verhaltenssysteme: TruScan, Etho Vision, Biobserve Handhabung von Versuchstieren incl. Systemischer Injektion, stereotaktische Operationstechniken und Mikroinjektionen in das Gehirn

Marburg den 20.04.2011

Dipl.-Psych. Britta D. Karrenbauer

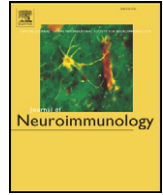
Veröffentlichungen und Manuskripte

Artikel 1

Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats.

B.D. Karrenbauer, Y.-J. Ho, V. Ludwig, J. Löhn, R. Spanagel,
R.K.W. Schwarting, C.R. Pawlak

Journal of Neuroimmunology 208 (1-2), 10-18



Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats

Britta D. Karrenbauer^{a,*}, Ying-Jui Ho^b, Verena Ludwig^a, Jeanette Löhn^a, Rainer Spanagel^c,
Rainer K.W. Schwarting^a, Cornelius R. Pawlak^{c,*}

^a Experimental and Physiological Psychology, Philipps-University, Marburg, Germany

^b School of Psychology, Chung Shan Medical University, Tai-Chung City, Taiwan, ROC

^c Psychopharmacology, Central Institute of Mental Health, Mannheim, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2008

Received in revised form 12 December 2008

Accepted 12 December 2008

Keywords:

Cytokines
Microinjection
Anxiety
Avoidance
Basal ganglia
Aversion

ABSTRACT

There is evidence that immune messengers like cytokines can modulate emotional and motivated behaviours and are involved in psychiatric conditions like anxiety, and depression. Previously, we showed that cytokine gene expression (interleukin (IL)-2 mRNA) in specific brain tissues (striatum, prefrontal cortex) correlated with anxiety-like behaviour (open arm time) in an elevated plus-maze in rats. In a subsequent experiment, a single striatal IL-2 injection showed behavioural trends with the lower dose (1 ng) acting in a behavioural suppressive way, whereas the highest dosage (25 ng) led to activation and anxiolytic-like behaviour. Here, to support and extend our previous findings, we tested Wistar outbred rats after a single unilateral (balanced brain sites) IL-2 injection into the ventral/dorsal striatum followed by an open field test acutely and 24 h later. Analyses for horizontal locomotion showed no differences between groups. However, rats with IL-2-treatment (0.1 ng) showed a dose-dependent avoidance effect (i.e. reduced centre time) compared to the 1 ng group and vehicle controls 24 h later. In addition, suppression of free rearing activity was shown for both IL-2 doses (0.1; 1 ng) compared to saline in the acute test, and partly 24 h later. Thus, in experiment 2, we tested for proactive drug mechanisms to test for delayed effects of IL-2 as observed in experiment 1. In a new sample, rats were returned to their home cages after a striatal IL-2 injection (0.1; 0.01; 0 ng), and tested 24 h and 48 h after the injection in an open field. Neither for the first (24 h) nor for the second exposure (48 h later) did the analyses show any significant behavioural effects. We therefore suggest that emotional-related behaviour can be modulated by striatal IL-2 for at least 24 h. However, such IL-2 effects can only be observed if a mild stressful environmental challenge (i.e., forced open field exposure) is followed immediately after injection. In conclusion, proactive drug effects may be excluded for striatal IL-2 effects on open field behaviour.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Interleukin-2 (IL-2) is a pleiotropic cytokine that is mainly produced by T-cells and plays a crucial role in initiation and modulation of the cellular immune response in the periphery (Gaffen and Liu, 2004). However, IL-2 is also prominent in the central nervous system where it acts as a neuromodulator in specific brain areas (Hanisch and Quirion, 1996; Nisticò, 1993). Both IL-2-like and IL-2-like receptors are found in the hippocampus, hypothalamus, cerebellum, prefrontal cortex, striatum, septum, and locus coeruleus of humans and other mammals (Hwang et al., 2006; Hanisch and Quirion, 1996; Lapchak et al., 1991); brain regions that are known to play a critical role in psychiatric conditions. In addition, IL-2 influences monoaminergic neurotransmission in the CNS

(Anisman et al., 1996; Lacosta et al., 2000; Petitto et al., 1997; Song et al., 1999; Zalcman et al., 1994), which are often linked to psychological diseases like depression, or anxiety disorders (Booij et al., 2003; Nestler et al., 2002).

Accumulating evidence suggest important relationships between IL-2 and emotional and motivated behaviours (Hanisch, 2001). For example, patients diagnosed with anxiety disorders exhibited lower IL-2 production levels in peripheral blood compared to healthy controls (Koh and Lee, 1998, 2004), whereas patients with panic disorders displayed increased IL-2 serum levels (Rapaport and Stein, 1994). Even more, IL-2 which is known through its application in cancer therapy (Waldmann, 2006), evokes various negative side-effects of emotional and motivational affect during treatment, for example, increasing depressive-like symptoms (Anisman et al., 2005; Capuron et al., 2002).

In animals, systemically administered IL-2 induced depressive-like effects (Anisman et al., 2002), increased locomotor activity (Petitto et al., 1997), and novelty-induced locomotion and exploration behaviour in rodents (Zalcman et al., 1998; Zalcman, 2001). Finally, IL-2 inhibited responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation (Anisman et al., 1996, 1998), and demonstrated dose-related effects on

* Corresponding authors. Pawlak is to be contacted at Department of Psychopharmacology, Central Institute of Mental Health J5, D-68159 Mannheim, Germany. Tel.: +49 0 621 1703 6262; fax: +49 0 621 1703 6255. Karrenbauer, Experimental and Physiological Psychology Philipps-University Gutenbergstr. 18, D-35032 Marburg, Germany. Tel.: +49 0 6421 2823678; fax: +49 0 6421 2826621.

E-mail addresses: karrenbb@staff.uni-marburg.de (B.D. Karrenbauer), cornelius.pawlak@zi-mannheim.de (C.R. Pawlak).

hedonic processes arising from medial forebrain bundle stimulation (Migueluez et al., 2004).

Only a few animal studies analysing anxiety-related behaviour and IL-2 exist, most with ambiguous results. Neither acute nor repeated IL-2 application led to alteration in elevated plus-maze behaviour in IL-2-treated rats or mice compared to saline (Anisman et al., 2002; Connor et al., 1998; Lacosta et al., 1999; Petitto et al., 1997). On the other hand, it was shown that IL-2/15R β knockout mice exhibited a reduced anxiety-like behaviour in the elevated plus-maze when compared to wild type and heterozygous mice (Petitto et al., 2002).

Studies investigating the behavioural effects of centrally administered IL-2 are still scarce. For example, IL-2 microinjected into the medial hypothalamus suppressed defensive rage, while microinjections of IL-2 in the periaqueductal gray (PAG) potentiated defensive rage in cats (Bhatt and Siegel, 2006; Zalzman and Siegel, 2006). Even more, depending on the brain injection area, IL-2 led to soporific effects (Nisticò, 1993), ipsilateral turning and asymmetric body posture (De Sarro et al., 1990), and increased locomotion and exploratory behaviour in rats (Nisticò and De Sarro, 1991).

In our previous studies, we showed that cytokine mRNA expression in specific brain tissues correlated with anxiety-like behaviour in rats gauged by open arm time in the elevated plus-maze. These relationships indicated that cytokines in the brain can be related to avoidance behaviour, and that this relationship is site- (striatum, prefrontal cortex), and cytokine-specific (IL-2; Pawlak et al., 2003, 2005). This hypothesis was functionally tested by microinjections of IL-2 into the striatum, followed by testing on the elevated plus-maze acutely and after a delay of 24 h. Overall, rats showed dose-dependent effects, particularly with a trend for anxiolytic-like effects and more rearings in the higher dose (25 ng), whereas the lowest dose tested (1 ng) led to anxiogenic-like effects and decreased rearings compared to saline controls, although the differences were not significant (Pawlak and Schwarting, 2006). These results suggest that IL-2 may act in a biphasic manner and that IL-2 behavioural effects peak after a yet unspecified delay of time.

To support our previous data, we conducted two further experiments to gain supplementary insights into the actions of central cytokines. In the present study we tested the dose–response curve of microinjected striatal IL-2 and possible delayed drug effects. Therefore, in experiment 1, we investigated the acute and delayed effects of different doses of IL-2 on emotional and motivational behaviour. Based on our previous results (Pawlak and Schwarting, 2006), we hypothesised that a striatal IL-2 microinjection (1 ng; 0.1 ng) has no impact on horizontal locomotion, but dose-dependently increases anxiety-like avoidance behaviour and decreases vertical activity (rearing) compared to vehicle controls. Taking into account that the temporal profile of IL-2 effects is unknown, we tested the rats in an open field, which allows a longer testing time than in the elevated plus-maze. The open field also constitutes an aversive environment in which rodents avoid the open centre, and prefer zones where walls offer protection from potential aerial predators (Prut and Belzung, 2003).

In experiment 2, we tested the hypothesis that the predicted avoidance results of experiment 1 might be explained by a proactive drug effect, that is, independent of immediate exposure to the testing environment. Compared to experiment 1, we tested the lowest and most effective dose of IL-2 again (0.1 ng) and one even lower dose (0.01 ng).

2. Experiment 1

2.1. Methods

2.1.1. Animals

Forty-eight male outbred adult Wistar Unilever rats (Harlan Winkelmann, Borcheln, Germany) were initially used, weighing between 260 and 298 g (mean: 277.6, standard error: \pm 1.4 g) at the arrival in the lab. They were housed individually in purpose-built acrylic cages

(21 \times 20 \times 38 cm), which were higher than normal single cages to prevent injuries after surgery. The animals were kept under standard laboratory conditions with food and water available *ad libitum* and a 12 h light–dark cycle (lights on: 7:00–19:00 h).

2.1.2. Design

Upon arrival, animals were weighed every day until the end of the experiment. In addition, before surgery all animals were gentled in a self-defined procedure during which each rat was touched and picked up for 5 min (days 3, 5, and 7). Surgery was performed on day 8. After surgery, animals were gentled again for three days (days 12–14), but now with another purpose-defined procedure to prepare them for the microinjection. On day 15 the animals received a single unilateral microinjection. After the injection the animal was returned to its home cage, carried to the dimly lit behavioural testing room and left alone for 5 min. Then, it was tested in an unfamiliar open field (OF 1), and 24 h later the animal was retested without further pharmacological treatment (OF 2). This time, the animal was directly brought to the testing room, where it again was kept alone for 5 min before being tested. The open field test lasted 45 min each. All animal manipulations throughout the study were conducted during the light cycle between 09:00 and 18:00 h. Great caution was exerted to counterbalance the time of the day for the injections of the different doses to avoid possible circadian effects. All experiments were implemented in accordance with the ethical regulations for animal experimentation at the University of Marburg.

2.1.3. Surgery

On day 8, animals underwent stereotactic surgery to implant one unilateral permanent cannula into the striatum, which was inserted alternately in the right or in the left hemisphere. Rats were anaesthetised with a mixture of 10 mg/kg Xylazine (0.5 ml/kg Rompun[®], Bayer, Germany) and 100 mg/kg ketaminhydrochlorid (1 ml/kg Ketavet[®], Upjohn, Germany). The animals were fixed in the stereotactic apparatus (TSE-Systems, Bad Homburg, Germany) and an unilateral guide cannula (C317G, 23 G, inside diameter (ID) 0.32 mm, outside diameter (OD) 0.64 mm, Plastics One, USA) was implanted permanently. The target area was the centre of the striatum as previously used (Pawlak and Schwarting, 2006), with the coordinates anterior = 1.6 mm, lateral = \pm 2.0 mm, ventral = 5.8 mm, relative to bregma (Paxinos and Watson, 1998). The guide cannula was fixed with dental cement (Paladur, Heraeus-Kulzer, Germany), which was kept in place by two stainless skull screws. Removable stainless steel dummy cannulae (C317 DC, OD 0.3 mm, Plastics One, USA) were placed into the guide cannula. Finally, the animal was put into its home cage, brought back into the animal room where it was kept for approximately one h under red light conditions.

2.1.4. IL-2 treatment

One week after the surgery (day 15), the rats were microinjected as follows: The respective animal was brought in a different room other than the testing room using the home cage. Carrier-free recombinant rat IL-2 (R&D Systems, USA) was delivered as a 10 μ g lyophilised filtered solution in 20 mM of ammonium acetate. Appropriate volumes of sterile phosphate buffered saline (PBS) were added to obtain aliquots containing 1 ng, or 0.1 ng of IL-2. Experimental rats were injected once with one of the two IL-2 doses (1 ng; 0.1 ng), and control animals received injections of PBS vehicle. All procedures were performed with protein low binding pipette tips and tubes, respectively.

All injections were conducted by an injection system consisting of a syringe pump (Syringe Pump 101, World Precision Instruments, Germany), and a syringe (diameter 0.46 mm; 10 μ l, 1701LT Hamilton, Switzerland), which was attached via flexible polyethylene tubing (ID 0.4 mm, OD 0.8 mm) to the injection cannula (C317I, 30 G, ID 0.15 mm, OD 0.3 mm, Plastics One, USA). The injection cannula was protruding 0.5 mm from the guide cannula. Injections were performed with an injection rate of 0.2 μ l/min (volume 0.5 μ l) and were started 30 s after

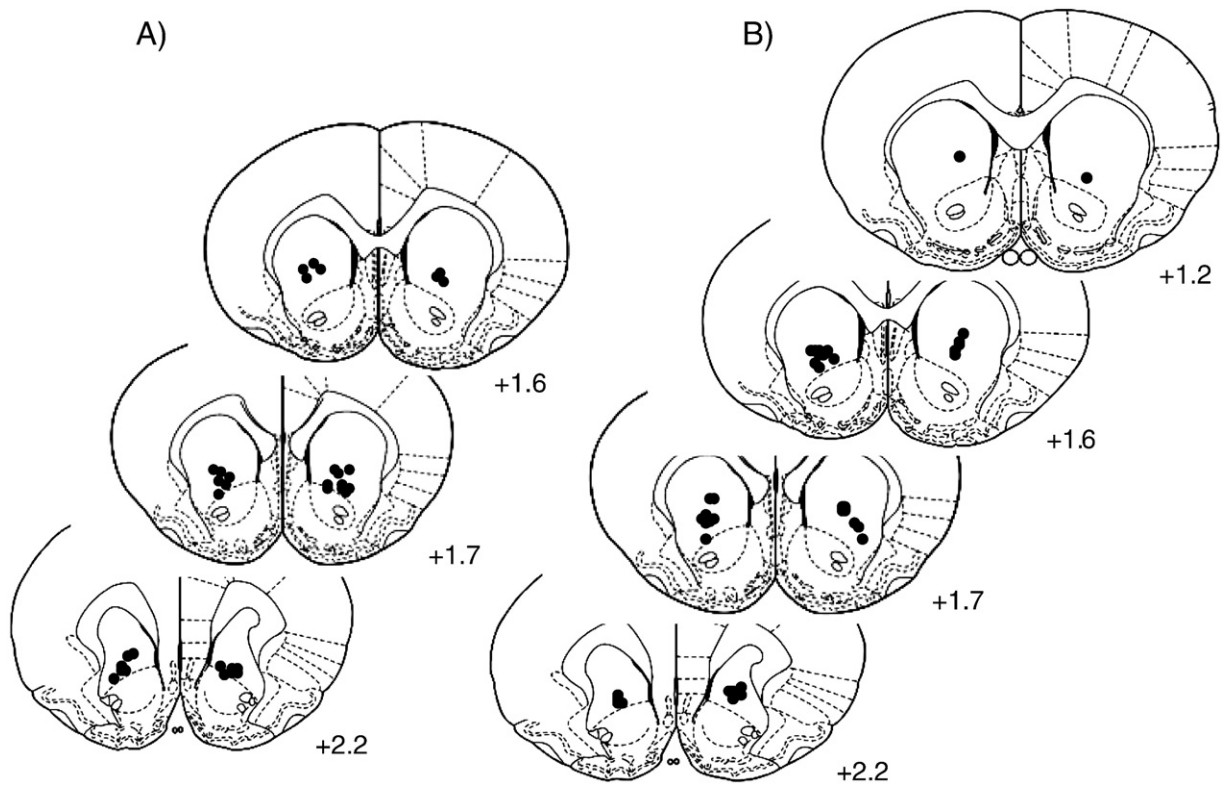


Fig. 1. Coronal sections according to the atlas of Paxinos and Watson (1998) showing the areas of the cannula tip placement in the striatum of A) experiment 1, and B) experiment 2. The figures summarise the correct tip placements from all included animals. The number next to each section refers to its position in the antero-posterior plane relative to bregma (mm). In the individual rat, the cannula was implanted either in the left or right hemisphere.

lowering the injection cannula. After the injection, the injection cannula remained in the guide cannula for further 30 s. During this procedure, the animal was placed on a table where it was hand-held gently.

2.1.5. Behavioural testing: open field (OF)

The OF consisted of a black circular box (inside diameter 79 cm with 50.5 cm high walls), which was monitored by an automated activity monitoring system (EthoVision Pro 3.0, Noldus, Netherlands). All trials were recorded on videotape by a video camera placed ~200 cm above the centre of the apparatus. Behaviour was tested under dimmed white light of 30 lx (centre of the apparatus). The animals were tested 5 min after injection of IL-2 or PBS in OF 1 and re-tested 24 h later, without further drug treatment (OF 2). Each open field test lasted 45 min.

For anxiety-like avoidance behaviour we measured the time spent in the different areas in the OF. We divided the OF into a margin and a centre area. Margin area was considered as a ring near the wall of 9.75 cm width. The remaining middle area of the apparatus was defined as the centre area.

Using EthoVision system, we analysed distance moved, centre time, and entries into the centre. It is commonly accepted, that anxious animals spend more time in the margin area than in the centre (e.g., Clement and Chapouthier, 1998). Therefore time spent in the centre of the open field was taken as an inverse measurement of avoidance behaviour. Distance moved was taken as measure of horizontal locomotor activity to express general activity.

The frequency of rearing behaviour was subdivided into on-wall and off-wall (free) because there is evidence that these two behaviours might be qualitatively different (Lever et al., 2006). One rearing was counted when the rat stood on its hind paws, raised both forepaws off the ground, and stretched its back. The rearing was considered to end when at least one forepaw had reached the floor again. The on-wall

rearing was scored when the animal had at least one forepaw on the wall during rearing time, while off-wall rearing was counted when the animal did not touch the wall with any forepaw at any time during one rearing activity. Rearing behaviour was scored from videotape by observers blind with respect to treatment. We also measured grooming behaviour, which was defined as licking, brushing, or scratching of face and body (duration, frequency). The interrater reliability was analysed with Pearson correlations. For all subjective behavioural analyses correlations between two independent raters ranged between $r=0.825$ to $r=0.981$, P -values ≤ 0.006 .

2.1.6. Histological evaluation

After OF 2, animals were deeply anaesthetised with i.p. 2.5 ml/kg pentobarbital-sodium (Narcoren®, Merial, Germany) and transcardially perfused with 0.9% saline solution followed by perfusion solution containing 4% formaldehyde. Correct placements of the cannulae were validated by standard histological analysis. Rat brains were removed, postfixed, stored at -20 °C and cut into 30 μ m thick sections using a cryostat (Leica Microsystems, Germany). Thereafter, we used cresyl violet staining to verify injection sites by two observers blind with regard to treatment, or behaviour.

2.1.7. Data analysis

Behavioural coding was executed by trained observers blind to treatment. Behaviour was analysed in three time blocks of 15 min each. Analyses were performed using ANOVAs with repeated measures for each OF test, with the three time blocks (15, 30, 45 min) as a within-subject factor, and the treatment groups (0 ng; 0.1 ng; 1 ng) as between-subjects factor. All but one three-factor ANOVAs showed significant test day effects which only can be further disentangled by two-factor ANOVAs. However, analyses for each day are essential to the understanding of the underlying mechanisms between acute versus delayed effects. Thus, we report here only two-factor ANOVAs for each

test day separately. Post hoc comparisons were made by least significant difference (LSD) tests.

ANOVA results revealing a statistical trend ($P < 0.10$) were also analysed by post hoc comparisons (Pawlak and Schwarting, 2006). The rationale is that the overall F is not required in order to conduct multiple comparisons (Howell, 1992; Wilcox, 1987). In some cases we additionally performed univariate ANOVAs to analyse differences between the groups at single time points. Data are expressed as mean \pm SEM. Post hoc p -values for locomotion, free rearing, and grooming are two-tailed and taken as statistically significant when $P \leq 0.05$, whereas post hoc p -values for centre time and rearing behaviour are one-tailed according to our predictions based on our previous results (Pawlak and Schwarting, 2006).

2.2. Results

2.2.1. Histological evaluation

Only data from rats with correctly placed cannulae were analysed ($n = 34$). For details see Fig. 1A. The final group sizes were: PBS = 10 (left 5 / right 5), 1 ng IL-2 = 13 (7/6), 0.1 ng IL-2 = 11 (5/6) rats.

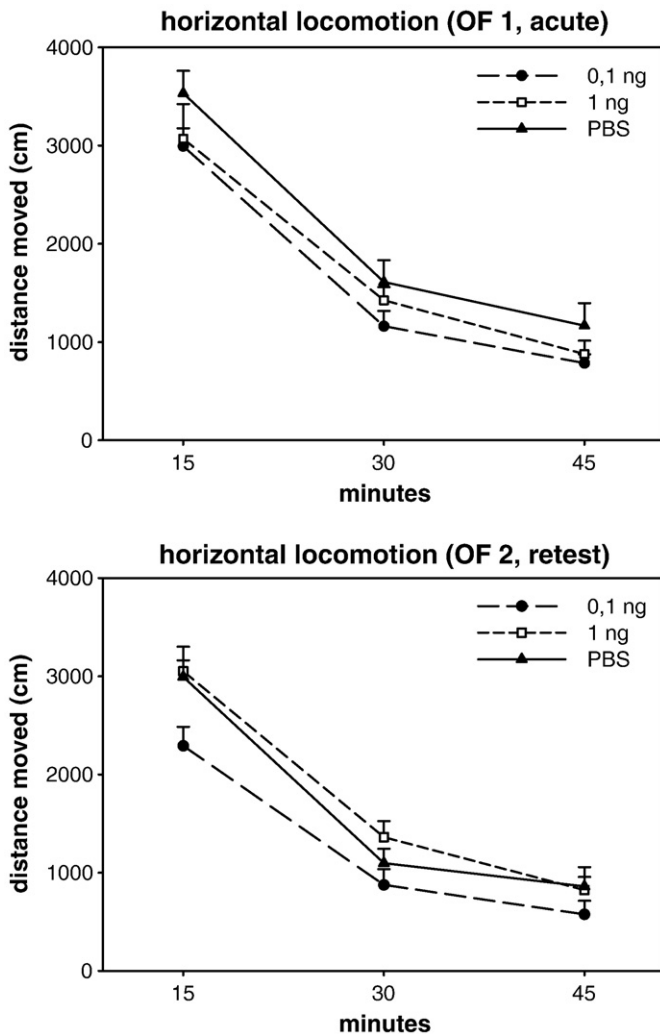


Fig. 2. Experiment 1: Effects of striatal IL-2 on horizontal locomotion (distance moved) in an open field (OF). The OF test (45 min) was performed 5 min (acute) and again 24 h (retest) after a unilateral striatal microinjection of IL-2 (0 ng, 0.1 ng, 1.0 ng). Data are shown in 3×15 min blocks and are expressed as mean \pm SEM. Please refer to the text for the statistical analyses.

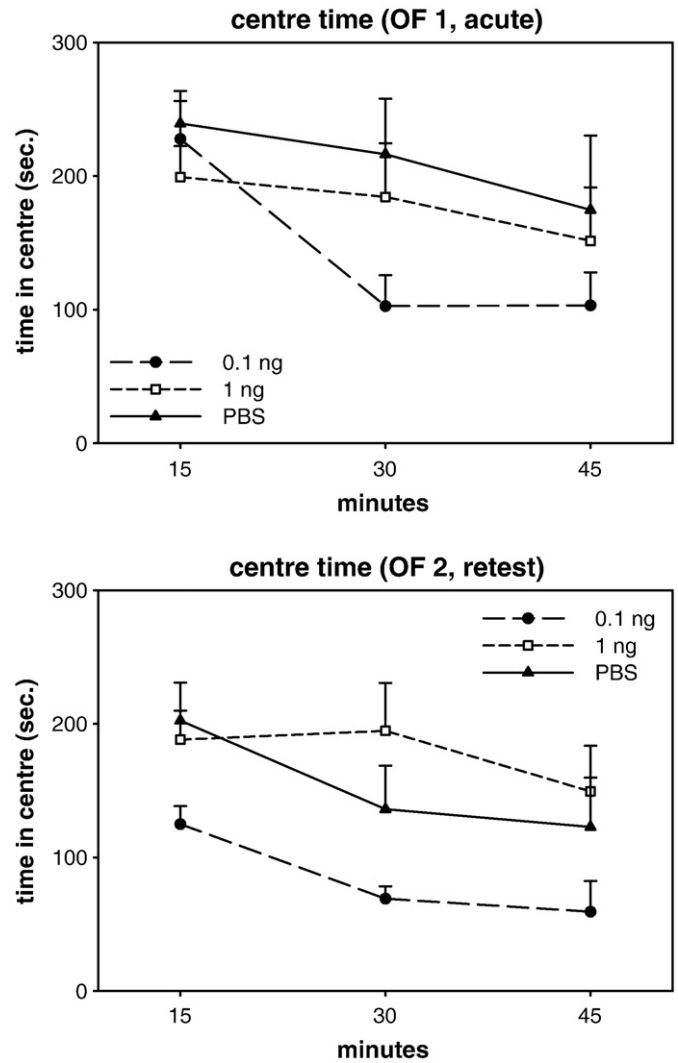


Fig. 3. Experiment 1: Effects of striatal IL-2 on centre time in an open field (OF). The OF test (45 min) was performed 5 min (acute) and again 24 h (retest) after a unilateral striatal microinjection of IL-2 (0 ng, 0.1 ng, 1.0 ng). Data are shown in 3×15 min blocks and are expressed as mean \pm SEM. Please refer to the text for the statistical analyses.

2.2.2. Locomotion (horizontal activity)

The degree of locomotion was measured automatically by the variable distance moved. A clear habituation in locomotion behaviour could be seen in both tests (OF 1, OF 2) with a continuous decrease of distance travelled during the whole test time (OF 1: $F(2, 31) = 216.8$, $P < 0.001$; OF 2: $F(2, 31) = 268.2$, $P < 0.001$; Fig. 2). There was no difference in locomotion behaviour between IL-2 treated and PBS treated rats for OF 1 ($F(2, 31) = 1.6$, $P = 0.214$), but a trend for a dose effect at the undrugged retest 24 h later (OF 2: $F(2, 31) = 3.0$, $P = 0.063$). LSD post hoc analysis for OF 2 revealed significantly more locomotor activity in animals treated with the higher IL-2 dose (1 μ g, $P = 0.024$) compared to the lower dose of 0.1 ng. Further, the 0.1 ng treatment revealed a trend for lower horizontal activity compared to the control group ($P = 0.082$).

2.2.3. Anxiety-like avoidance behaviour (centre time)

Both IL-2 treated groups tended to spend less centre time compared to the control group (Fig. 3), although the centre time was not significantly different between IL-2 groups and control group ($F(2, 31) = 1.1$, $P = 0.358$) in OF 1. However there was a trend for an interaction effect between time and group ($F(4, 62) = 2.3$, $P = 0.067$). The OF 2 test was performed on the subsequent day and without any further drug treatment. Analysis

showed a significant dose effect ($F(2, 31)=4.4, P=0.022$). LSD post hoc tests revealed significantly less time spent in the centre for the 0.1 ng IL-2 treated rats compared to the 1 ng IL-2 treated group ($P=0.004$), and a significant reduction compared to the control group ($P=0.027$). Parallel to locomotor activity, on both test days there was a significant time effect (OF 1: $F(2, 31)=11.4, P<0.001$; OF 2: $F(2, 31)=7.8, P<0.001$) for the time spent in the centre, showing that rats spent less time in the centre with progression of time.

2.2.4. Rearing (vertical activity)

In both OFs we observed decreasing general rearing activity during the course of testing (OF 1: $F(2, 31)=122.7, P<0.001$; OF 2: $F(2, 31)=108.0, P<0.001$), Table 1. Neither on OF 1 nor on OF 2 statistical analysis revealed significant differences between the IL-2 groups and the control group (OF 1: $F(2, 31)=1.1, P=.344$; OF 2: $F(2, 31)=1.5, P=0.231$). However, on OF 2 we observed a significant interaction effect for total rearing activity ($F(4, 62)=3.9, P=0.007$). When considering the single test points of the 15 min blocks it shows that there is a significant difference between the groups in the first time block (1–15 min; $F(2, 31)=3.6, P=0.020$; LSD: 0.1 ng < 1 ng IL-2: $P=0.007$; 0.1 ng IL-2 < PBS: $P=0.038$), and during the second time block (16–30 min; $F(2, 31)=3.4, P=0.024$; LSD: 0.1 ng < 1 ng IL-2: $P=0.018$; PBS < 1 ng IL-2: $P=0.017$).

When rearing activity is divided into on-wall and off-wall (free) rearing, both IL-2 treated groups showed less free rearing activity compared to PBS treated animals in OF 1 (Fig. 4), although this analysis did not quite reach statistical significance ($F(2, 31)=3.1, P=0.061$). LSD post hoc tests revealed significantly less free rearing in both IL-2 treated rats compared to PBS (1 ng: $P=0.043$; 0.1 ng: $P=0.032$). Furthermore, analysis on OF 2 revealed a trend for an interaction effect ($F(4, 62)=2.4, P=0.061$) in free rearing activity (Fig. 4). Moreover, post hoc LSD tests showed that free rearing in the 0.1 ng IL-2 group was significantly lower compared to the PBS group in the first time block (1–15 min; $P=0.050$). We found a significant time effect on both test days, showing that free rearing also decreased during the test time (OF 1: $F(2, 31)=20.8, P<0.001$; OF 2: $F(2, 31)=14.8, P<0.001$). Finally, we observed no significant differences between any groups when comparing on-wall rearing (data not shown).

2.2.5. Grooming

Comparing grooming behaviour between groups did not yield any indication for substantial differences neither in OF 1 nor in OF 2 (P -values ≥ 0.299 ; data not shown).

3. Summary experiment 1

As predicted, a single unilateral injection of IL-2 into the striatum had no significant impact on locomotor behaviour, which supports our previous results where we also showed no alteration on locomotion behaviour in the elevated plus-maze (Pawlak and Schwarting, 2006). However, the lower dose of IL-2 (0.1 ng) significantly increased

Table 1

	PBS (n=10)		IL-2			
			0.1 ng (n=11)		1 ng (n=13)	
	Acute	24 h	Acute	24 h	Acute	24 h
Rearing total (no.)	80.7±10.9	60.0±8.6	61.9±7.6	48.0±9.0	64.9±9.1	69.8±9.1
Rearing 1–15 min. (no.)	45.6±4.1	40.4±2.6	40.7±4.3	29.6±4.1	39.9±5.7	44.1±4.6
Rearing 16–30 min. (no.)	20.5±4.4	8.8±1.8	13.4±2.8	9.2±2.7	16.9±2.8	18.7±3.9
Rearing 31–45 min. (no.)	14.6±3.7	10.8±5.2	7.8±1.4	9.3±4.4	8.2±2.2	7.0±2.0

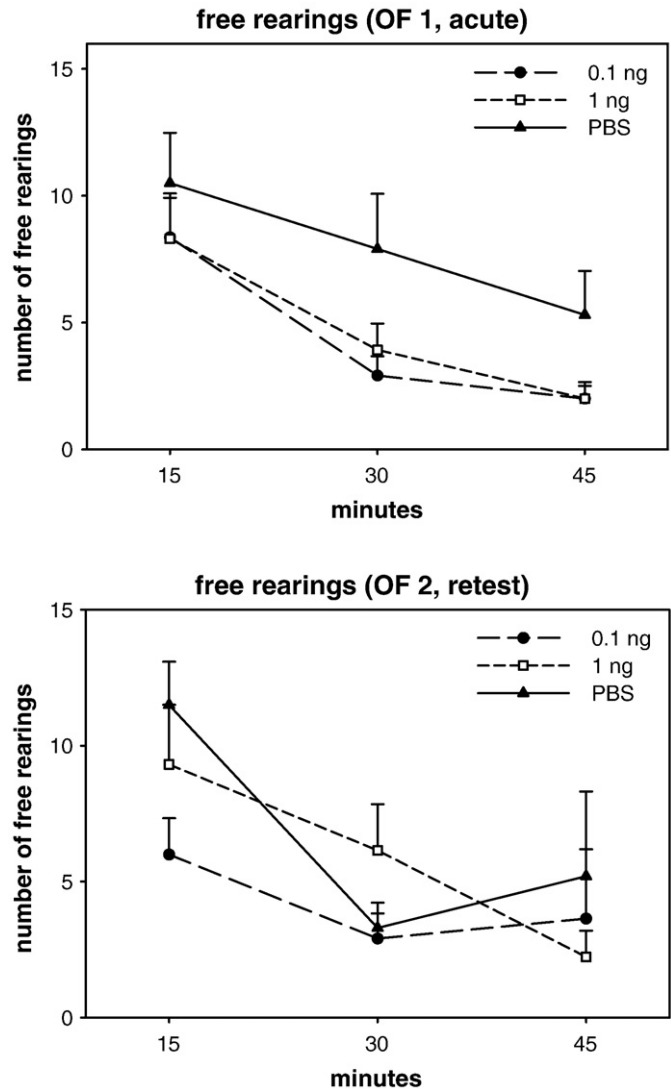


Fig. 4. Experiment 1: Effects of striatal IL-2 on vertical activity (free rearings) in an open field (OF). The OF test (45 min) was performed 5 min (acute) and again 24 h (retest) after a unilateral striatal microinjection of IL-2 (0 ng, 0.1 ng, 1.0 ng). Data are shown in 3×15 min blocks and are expressed as mean±SEM. Please refer to the text for the statistical analyses.

avoidance behaviour since the centre of the open field was continuously avoided particular in the delayed test. Furthermore, a significant interaction was observed in total rearing behaviour in OF 2. Even more, IL-2 treated rats showed blunted free rearing activity in OF 1, and in the beginning of OF 2 for the 0.1 ng IL-2 group, suggesting that IL-2 affects vertical activity, but not horizontal locomotor behaviour.

With regard to aversive stimuli, the group treated with the lowest dose of IL-2 (0.1 ng) showed a trend for an interaction effect in centre time in the acute test, and showed a substantial dose-dependent effect 24 h later, possibly since IL-2 had lasting proactive effects. Proactive drug effects may occur after a delay of time without acute exposure to the testing environment. However, this could not be unambiguously discovered by the present experiment, since we tested the animals 5 min after the injection. Therefore, we conducted a second experiment to test for a possible proactive impact of IL-2. Therefore, rats were tested in an open field 24 h and 48 h after a unilateral striatal IL-2 injection. In experiment 2, we used the most effective IL-2 dose (0.1 ng) of experiment 1, and an even lower dose (0.01 ng) to extend the dose-response effects.

4. Experiment 2

Experiment 2 was conducted under very similar conditions to experiment 1. The methodological differences are resumed below. These minimal variations were intended to optimise the procedure.

4.1. Methods

4.1.1. Animals

Forty-eight male adult Wistar rats (Harlan Winkelmann, Borchen, Germany) weighing 238–288 g (266.4±1.9 g) at the time of arrival were used. Housing conditions were the same as in experiment 1.

4.1.2. Design

We used a proactive design: On day 15, there was no immediate behavioural testing conducted following the microinjection. Instead rats were returned to their home cages, and tested 24 h (OF 1), and retested 48 h (OF 2) after striatal IL-2 treatment.

4.1.3. Surgery

We implanted smaller cannulae (C315G, 26 G, ID 0.24 mm; OD 0.46 mm, Plastics One, USA) into the striatum, and used appropriate smaller dummy cannulae (C315 DC, OD 0.2 mm, Plastics One, USA) compared to experiment 1. We used a modified injection system with the same syringe pump and Hamilton syringe as in experiment 1, but a smaller flexible polyethylene tube (ID 0.28 mm, OD 0.61 mm, Portex, UK), and a smaller injection cannula (C315I, 33 G, ID 0.1 mm, OD 0.2 mm, Plastics One, USA). With this improved system the volume (0.2 µl) and the injection rate (0.1 µl/min) was reduced to further minimise spreading and to maximise local effects.

4.1.4. IL-2 treatment

The injected doses of IL-2 were partly different compared to the previous experiment. We used one lower (0.01 ng) and one identical IL-2 dose (0.1 ng) as used before in experiment 1, because the latter one yielded the most significant behavioural effects (see experiment 1). In addition, after injection, the injection cannula remained in the guide cannula for 2 min to minimise the ascension of the injected fluid.

4.1.5. Behavioural testing: open field (OF)

We did not assess grooming behaviour this time because of the lack of effects of IL-2 on such behaviour in experiment 1.

4.2. Results

4.2.1. Histological evaluation

Data of 41 animals with correctly placed cannulae were analysed. For details see Fig. 1B. The group sizes were as follows: PBS=15 (left 7 / right 8), 0.1 ng IL-2=15 (7/8), 0.01 ng IL-2=11 (7/4).

4.2.2. Behaviour in the OF

The statistical analyses were identical to experiment 1 and performed with three time blocks of 15 min each as repeated factor. However, due to exclusively non-significant group and interaction effects, we show all behavioural data collapsed for the total time of OF 1 and OF 2, respectively (Table 2).

4.2.3. Locomotion (horizontal activity)

Analysis of locomotor behaviour yielded a time effect reaching significance for both OF tests (OF 1: $F(2, 38)=144.1$, $P<.001$; OF 2: $F(2, 38)=207.2$, $P<.001$) showing that distance moved decreased over the time tested. As in experiment 1, group and interaction effects for locomotor behaviour between both IL-2 and control groups were non-significantly different for both test days (F -values ≤ 0.8 , P -values ≥ 0.556 ; Table 2).

Table 2

Experiment 2: effects of striatal IL-2 on behaviour in an open field (OF)

	PBS (n=15)		IL-2			
	24 h	48 h	0.01 ng (n=11)		0.1 ng (n=15)	
			24 h	48 h	24 h	48 h
Locomotion (cm)	6296.0±395.8	4696.2±348.1	6518.4±481.2	4987.8±475.3	6333.4±338.4	5019.3±373.6
Centre time (s)	594.9±102.2	429.7±125.0	648.8±88.4	456.5±94.4	643.7±47.5	414.5±46.1
Total rearing (no.)	106.0±6.9	81.9±7.1	107.1±5.8	79.7±8.2	116.3±9.1	91.5±8.0
On-wall rearing (no.)	54.6±3.2	41.1±4.3	52.7±6.1	42.4±6.4	49.9±2.8	40.4±3.8
Off-wall rearing (no.)	43.4±5.4	36.0±5.3	45.7±5.1	30.9±4.2	57.9±7.2	43.7±6.6

The OF test (45 min) was performed 24 h and 48 h after a unilateral striatal microinjection of IL-2 (0 ng, 0.01 ng, 0.1 ng). Results are presented as means±SEM.

4.2.4. Anxiety-like avoidance behaviour (centre time)

The centre time continuously decreased showing a significant time effect for OF 1 ($F(2, 38)=8.9$, $P>0.001$), and a trend during OF 2 ($F(2, 38)=3.0$, $P=0.054$).

In both tests, we observed no substantial group differences, or interaction effects between both IL-2 and control groups (F -values ≤ 1.7 P -values ≥ 0.156). Thus treatment with IL-2 led to no effect on avoidance behaviour in a proactive design (Table 2).

4.2.5. Rearing (vertical activity)

Rearing behaviour remained unaffected by proactive treatment of IL-2 for both test days (Table 2). Over the period of test time all rats showed less rearing behaviour (OF 1: $F(2, 38)=256.4$, $P<0.001$; OF 2: $F(2, 38)=306.0$, $P<0.001$). The same pattern emerged when rearing was divided into free (OF 1: $F(2, 38)=48.8$, $P<0.001$; OF 2: $F(2, 38)=52.3$, $P<0.001$), and on-wall rearing (OF 1: $F(2, 38)=301.7$, $P<0.001$; OF 2: $F(2, 38)=261.0$, $P<0.001$). Neither main effects of dose nor interaction effects approached statistical significances (F -values ≤ 1.69 , P -values ≥ 0.199).

5. General discussion

In the present study, and in combination with our previous study (Pawlak and Schwarting, 2006), we have shown that IL-2 had an impact on avoidance behaviour in a hypothesised biphasic manner: In experiment 1 of the present study a low dose of IL-2 (0.1 ng) showed an increase in avoidance behaviour particularly upon undrugged retesting after 24 h, whereas in the foregoing study this cytokine showed a trend towards a decrease in avoidance behaviour in high doses also following a retest 24 h later with 25 ng (Pawlak and Schwarting, 2006).

Further, we observed an interaction between groups in total rearing behaviour in OF 2, but only in free rearing activity did we show a dose-dependent attenuation after acute injection with IL-2 (0.1 ng; 1 ng), and partly after 24 h (0.1 ng) compared to controls. As expected (Pawlak and Schwarting, 2006), IL-2 treatment had no impact on horizontal locomotion as shown before (Petitto et al., 2002), although the striatum is commonly accepted as a critical structure in the regulation of locomotor behaviour (Grillner et al., 2008). In experiment 2, we observed no behavioural effects at all suggesting that such IL-2 effects can only be obtained if a mild stressful environmental challenge (i.e. forced open field exposure) is followed immediately after injection. We therefore suggest that proactive drug effects can possibly be excluded for IL-2 effects on aversive environmental challenges.

Zalcman et al. (1998) showed that particularly IL-2 increased the number of free rearings, but decreased the time spent engaged in ambulatory exploration. At first sight, their results appear to be opposite to our findings, where IL-2 treated animals showed less free rearings compared to the controls. It is known that IL-2 can influence striatal

dopaminergic neurotransmission in vivo and dose-dependently in vitro (Lacosta et al., 2000; Petitto et al., 1997; Song et al., 1999), and there is evidence for a positive relationship between rearing behaviour and dopamine in the ventral striatum (Thiel et al., 1999). Thus, it is possible that systemically administered IL-2 (Zalcman et al., 1998) could have opposite behavioural effects compared to a cranial application, as shown in our study. Other methodological approaches between the studies of Zalcman et al. (1998) and ours should be taken into account, for example, non-species versus species specific IL-2, or the use of mice versus rats. Notwithstanding these different results, it is remarkable that IL-2 has repeatedly shown to alter free rearing behaviour.

Lever et al. (2006) proposed that rearing could be distinguished between unsupported and supported rearing against a surface (e.g., wall). One may speculate that these different types of rearings have also different functional meanings. Along this line, unsupported off-wall (free) rearing may reflect exploratory behaviour coupled with an unknown form of arousal, since it has been suggested that rearing activity may also be determined by emotionality (Gironi Carnevale et al., 1990; Thiel et al., 1998) apart from novel object exploration (Pawlak and Schwarting, 2002). Thus, in the present data our animals treated with striatal IL-2 may have shown an increase of emotionality and decrease of exploration behaviour.

The main results revealed that the 0.1 ng IL-2 group showed a trend for an interaction effect for centre time in the acute test of experiment 1. Even more, 0.1 ng IL-2 dose-dependently reduced centre time 24 h later, which is indicative of avoidance behaviour. On the basis of the pronounced effects 24 h later one could presume that behavioural effects of IL-2 were reached only after a delayed period of time. The present findings are in line with our previous studies, when a higher dose of IL-2 (25 ng) showed a trend for an anxiolytic-like effect 24 h following a striatal microinjection (Pawlak and Schwarting, 2006). This further supports our biphasic hypothesis of IL-2, increasing avoidance behaviour in low doses and decreasing avoidance behaviour in high doses of this cytokine. Moreover, the behavioural modulation had a kinetic component. A trend effect in centre avoidance behaviour was only observed with some delay starting 16–30 min only after 0.1 ng IL-2 injection in OF 1, which continued thereafter. Even more, this behaviour was robust also during the retest 24 h after injection. These avoidance effects on retest were subject to different interpretations.

First, IL-2 appears to start its impact several minutes after injection, but there is only one study which gives evidence about the latency of IL-2 induced behavioural effects (De Sarro et al., 1990). While investigating the effects of IL-2 microinjected into the locus coeruleus, the first behavioural effects appeared within 5–10 min and lasted from 25 to 65 min (De Sarro et al., 1990). However, the authors did not analyse possible delayed effects thereafter, and detailed behavioural data were not provided (De Sarro et al., 1990). Therefore, we conducted the second experiment to test for a possible proactive drug impact by testing the rats 24 h after IL-2 injection in an open field and after 48 h again. The results showed that exploratory and avoidance behaviours were clearly non-significant between IL-2 and PBS-treated groups, suggesting no proactive IL-2 drug effects, at least under our conditions. We suggest that an environmental challenge (e.g., mild stress by forced exposure to an open field as presented here) is necessary to induce delayed emotional and motivational behavioural effects of IL-2. In detail, it is possible that IL-2 induces an aversive state which is associated with the environment (open field) and that this aversive experience come to the fore in the behaviour also during the second exposure to the open field.

Second, IL-2 could have also affected memory of the initial open field experience. When administered repeatedly and systemically, IL-2 led to impaired spatial memory performance in a Morris water maze in mice (Lacosta et al., 1999). However, evidence for impaired memory processes is not supported by our data. Instead, IL-2-treated animals in experiment 1 showed an increase of avoidance behaviour and may therefore indicate an improvement of memory performance. Even

more, IL-2-treated animals may have shown a learned (adaptive) response more quickly as the vehicle treated rats. Notwithstanding our speculations, supportive evidence about the role of the striatum in formation of emotional memory apart from its regulation of motor activity has come from various other studies (e.g., Cahill and McGaugh, 1998; Ferreira et al., 2003; Leppanen, 2006; Morgane et al., 2005).

Apart from memory altering mechanisms, which need to be tested further, IL-2 could have acted in an anxiety-relevant way. IL-2/15R β knockout mice exhibited significant reductions in acoustic startle and significant differences in behaviour in the elevated plus-maze, indicating a decreased level of anxiety-like avoidance behaviour (Petitto et al., 2002). Based on our previous work, we hypothesised IL-2 to act in a biphasic manner when striatal microinjections of 25 ng IL-2 led to a trend of increased open arm time as opposed to a 1 ng IL-2-induced nonsignificant decrease of open arm time in an elevated plus-maze (Pawlak and Schwarting, 2006). In line with our previous data, low doses of IL-2 (0.1 ng) were seen to decrease centre time which could be interpreted as anxiety-like avoidance behaviour. Thus, IL-2 appears to affect anxiety-related behaviour in a biphasic manner as hypothesised.

Evidence suggests that IL-2 can initiate a cascade of neurotransmitter activity, for example serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine), which may modulate anxiety-related behaviour, although the consequences of immune modulators like IL-2 on neurotransmission and their effects on behaviour have only rarely been investigated. Remarkably, an in-vivo reduction of 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) in the nucleus accumbens was demonstrated following a systemic IL-2 injection (Song et al., 1999). Also, Lacosta et al. (2000) found reduced 5-HT levels in the prefrontal cortex after repeated systemic IL-2 injection, while showing the opposite 5-HT effect in the hippocampus post mortem. Accordingly, i.c.v. injected IL-2 led to marked increases of hippocampal 5-HT levels and its metabolite 5-HIAA (Pauli et al., 1998). Finally, we have first indications that systemic IL-2 can affect 5-HT but only moderately dopamine in various brain regions in the rat in-vivo (Karrenbauer et al., 2008). Thus, IL-2 is able to alter neurotransmission in brain regions, which are known to be critical in emotion and motivation.

Strong evidence suggests that cytokines induce behaviour resembling some symptoms of depression (Dantzer et al., 1999), which are thought to be mediated by neurotransmitters, particularly 5-HT. It is well established that 5-HT is crucial for anxiety and related disorders (e.g., depression); patients diagnosed with anxiety or depression disorders are treated successfully with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). Moreover, depressive symptoms increased during IL-2 therapy of cancer patients (Capuron et al., 2000; Walker et al., 1997), and these symptoms were accompanied by decreased concentrations of serum tryptophan, which is the main precursor of 5-HT and noradrenalin (Capuron et al., 2002; Wichers and Maes, 2002). Taken together, these findings provide evidence for a critical action of IL-2 in the brain substantially influencing the release of monoaminergic neurotransmitters, which are known to be involved in affective behaviours. Additionally, it is likely that this neurochemical influence has a temporal variable which could explain the delayed, pronounced effects of IL-2 shown here (Karrenbauer et al., 2008).

At first sight, the striatum does not appear to be the typical structure to study aversively motivated behaviour. However, our previous results identified the striatum as a structure in the interrelation of IL-2 and aversive motivated behaviour (Pawlak et al., 2003). In addition, we have shown that rats with high versus low anxiety-like avoidance behaviour differed in their 5-HT post mortem levels in the striatum, but not other brain areas (Schwarting et al., 1998). Furthermore, rats displaying pronounced avoidance behaviour showed a higher c-fos mRNA expression in the dorsal striatum compared with rats with low avoidance behaviour (Kabbaj and Akil, 2001). There are now even studies showing local microcircuits in the nucleus accumbens mediating motivated/affective behaviours that are bivalently organised with negative and positive valence along rostrocaudal gradients (Reynolds and Berridge, 2002). Moreover, recent human studies from different groups strongly

suggest that the striatum (ventral and dorsal part) is involved in anxiety and aversive stimulation (e.g., Jensen et al., 2003; Laakso et al., 2003; Lorberbaum et al., 2004; van den Heuvel et al., 2005). Finally, first evidence showed that cytokines increase self-reported fatigue, which was correlated to increased glucose metabolism in the nucleus accumbens and putamen (Capuron et al., 2007). Interestingly, there are some studies that report a motivational impact of IL-2 (Anisman et al., 1996, 1998; Petitto et al., 2002; Zalcman, 2001; Zalcman et al., 1998), but the results reveal controversial relationships between IL-2 and anxiety-related behaviour in animals (Anisman et al., 2002; Petitto et al., 2002). Possible explanations for this lack of effects might be due to methodological factors, for example, the use of human versus rat recombinant IL-2, with the latter used in the present experiment. This detail might be crucial as Naito et al. (1989) showed that rat IL-2 caused an increase in plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), but human IL-2 had no effect on rats ACTH levels. Another methodological difference between studies is the site of administration, which was primarily systemic (Anisman and Merali, 1999; Lacosta et al., 1999), i.c.v. (Connor et al., 1998), or into the locus coeruleus (De Sarro et al., 1990).

In summary, together with our previous results, we found evidence that a single unilateral IL-2 injection into the striatum biphasically influenced aversively motivated behaviours, enhancing avoidance behaviour in lower (present study) and reducing it in higher doses (Pawlak and Schwarting, 2006). Two behavioural dimensions, time spent in the centre, and free rearings are suggested as indicators for anxiety-like avoidance behaviour and emotionality impact of IL-2. In addition, we did not find evidence for proactive IL-2 drug effects. We therefore suggest that an acute mild stressor (e.g., open field) is necessary to induce emotional and motivational behavioural effects of IL-2, and that this aversive experience comes to the fore in behaviour also during re-exposure to the mild open field stressor. Although our data may contradict previous studies of IL-2 effects on such behaviours, we provide a number of differences to the design of those studies which may account for their previous lack of IL-2 effects specifically on anxiety-related behaviours. Thus, these data provide a basis on which the role of IL-2 in the pathogenesis of some neuropsychiatric diseases could be explored anew.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Project Based Personnel Exchange Programme (0940042882 from the NSC and D/05/06869 from the German Academic Exchange Service DAAD), and the German Research Foundation (DFG PA 818/4-1).

References

- Anisman, H., Merali, Z., 1999. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 461, 199–233.
- Anisman, H., Kokkinidis, L., Merali, Z., 1996. Interleukin-2 decreases accumbal dopamine efflux and responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res.* 731, 1–11.
- Anisman, H., Kokkinidis, L., Borowski, T., Merali, Z., 1998. Differential effects of interleukin (IL)-1beta, IL-2 and IL-6 on responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res.* 779, 177–187.
- Anisman, H., Kokkinidis, L., Merali, Z., 2002. Further evidence for the depressive effects of cytokines: anhedonia and neurochemical changes. *Brain Behav. Immun.* 16, 544–556.
- Anisman, H., Merali, Z., Poulter, M.O., Hayley, S., 2005. Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr. Pharm. Design* 11, 963–972.
- Bhatt, S., Siegel, A., 2006. Potentiating role of interleukin 2 (IL-2) receptors in the midbrain periaqueductal gray (PAG) upon defensive rage behavior in the cat: role of neurokinin K(1) receptors. *Behav. Brain Res.* 167, 251–260.
- Booij, L., Van der Does, A.J.W., Riedel, W.J., 2003. Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. *Mol. Psychiatry* 8, 951–973.
- Cahill, L., McGaugh, J.L., 1998. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci.* 21, 294–299.
- Capuron, L., Ravaut, A., Dantzer, R., 2000. Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon Alfa-2b therapy. *J. Clin. Oncol.* 18, 2143–2151.
- Capuron, L., Ravaut, A., Neveu, P.J., Miller, A.H., Maes, M., Dantzer, R., 2002. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol. Psychiatry* 7, 468–473.
- Capuron, L., Pagnoni, G., Demetrashvili, M.F., Lawson, D.H., Fornwalt, F.B., Woolwine, B., Berns, G.S., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., 2007. Basal ganglia hypermetabolism and symptoms of fatigue during interferon- α therapy. *Neuropsychopharmacology* 32, 2384–2392.
- Clement, Y., Chapouthier, G., 1998. Biological bases of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 623–633.
- Connor, T.J., Song, C., Leonard, B.E., Merali, Z., Anisman, H., 1998. An assessment of the effects of central interleukin-1beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience* 84, 923–933.
- Dantzer, R., Wollman, E., Vitkovic, L., Yirmiya, R., 1999. Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol. Psychiatry* 4, 328–332.
- De Sarro, G.B., Masuda, Y., Ascicci, C., Audino, M.G., Nisticò, G., 1990. Behavioural and ECoG spectrum changes induced by intracerebral infusion of interferons and interleukin 2 in rats are antagonized by naloxone. *Neuropharmacology* 29, 167–179.
- Ferreira, T.L., Moreira, K.M., Ikeda, D.C., Bueno, O.F.A., Oliveira, M.G.M., 2003. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res.* 987, 17–24.
- Gaffen, S.L., Liu, K.D., 2004. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28, 109–123.
- Gironi Carnevale, U.A., Vitullo, E., Sadile, A.G., 1990. Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat. *Behav. Brain Res.* 39, 187–195.
- Grillner, S., Wallén, P., Saitoh, K., Kozlov, A., Robertson, B., 2008. Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates – An overview. *Brain Res. Rev.* 57, 2–12.
- Hanisch, U.K., 2001. Effects of interleukin-2 and interferons on the nervous system. In: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Eds.), 3rd ed. *Psychoneuroimmunology*, vol. 1. Academic Press, San Diego, pp. 585–631.
- Hanisch, U.K., Quirion, R., 1996. Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. *Brain Res. Rev.* 21, 246–284.
- Howell, D.C., 1992. *Statistical Methods for Psychology*, 3rd ed. Duxbury Press, Belmont, p. 338.
- Hwang, K., Yoo, K.Y., Kim, D.W., Lee, H.J., Kang, H.Y., Lee, H.Y., Kang, T.C., Choi, S.Y., Kim, Y.S., Won, M.H., 2006. Transient ischemia-induced changes of interleukin-2 and its receptor immunoreactivity and level in the gerbil hippocampal CA1 region. *Brain Res.* 1106, 197–204.
- Jensen, J., McIntosh, A.R., Crawley, A.P., Mikulis, D.J., Remington, G., Kapur, S., 2003. Direct activation of the ventral striatum in anticipation of aversive stimuli. *Neuron* 40, 1251–1257.
- Kabbaj, M., Akil, H., 2001. Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a *c-fos* study. *Neuroscience* 106, 535–545.
- Karrenbauer, B.D., Müller, C., Spanagel, R., Huston, J.P., Schwarting, R.K.W., Pawlak, C.R., 2008. Interleukin-2 reduces extracellular cortical serotonin and influences depression-related behaviour in rats. Program No. 478. 2008 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Society for Neuroscience, Washington, DC, 2008. Online.
- Koh, K.B., Lee, B.K., 1998. Reduced lymphocyte proliferation and interleukin-2 production in anxiety disorders. *Psychosom. Med.* 60, 479–483.
- Koh, K.B., Lee, Y., 2004. Reduced anxiety level by therapeutic interventions and cell-mediated immunity in panic disorder patients. *Psychother. Psychosom.* 73, 286–292.
- Laakso, A., Wallius, E., Kajander, J., Bergman, J., Eskola, O., Solin, O., Ilonen, T., Salokangas, R.K.R., Sävälähti, E., Hietala, J., 2003. Personality traits and striatal dopamine synthesis capacity in healthy subjects. *Am. J. Psychiatry* 160, 904–910.
- Lacosta, S., Merali, Z., Anisman, H., 1999. Influence of acute and repeated interleukin-2 administration on spatial learning, locomotor activity, exploratory behaviors, and anxiety. *Behav. Neurosci.* 113, 1030–1041.
- Lacosta, S., Merali, Z., Anisman, H., 2000. Central monoamine activity following acute and repeated systemic interleukin-2 administration. *Neuroimmunomodulation* 8, 83–90.
- Lapchak, P.A., Araujo, D.M., Quirion, R., Beaudet, A., 1991. Immunoautoradiographic localization of interleukin 2-like immunoreactivity and interleukin 2 receptors (Tac antigen-like immunoreactivity) in the rat brain. *Neuroscience* 44, 173–184.
- Leppänen, J.M., 2006. Emotional information processing in mood disorders: a review of behavioral and neuroimaging findings. *Curr. Opin. Psychiatry* 19, 34–39.
- Lever, C., Burton, S., O'Keefe, J., 2006. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev. Neurosci.* 17, 111–133.
- Lorberbaum, J.P., Kose, S., Johnson, M.R., Arana, G.W., Sullivan, L.K., Hamner, M.B., Ballenger, J.C., Lydiard, R.B., Brodrick, P.S., Bohning, D.E., George, M.S., 2004. Neural correlates of speech anticipatory anxiety in generalized social phobia. *NeuroReport* 15, 2701–2705.
- Migueluez, M., Lacasse, M., Kentner, A.C., Rizk, I., Fouriez, G., Bielajew, C., 2004. Short- and long-term effects of interleukin-2 on weight, food intake, and hedonic mechanisms in the rat. *Behav. Brain Res.* 154, 311–319.
- Morgane, P.J., Galler, J.R., Mokler, D.J., 2005. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog. Neurobiol.* 75, 143–160.
- Naito, Y., Fukata, J., Tominaga, T., Masui, Y., Hirai, Y., Murakami, N., Tamai, S., Mori, K., Imura, H., 1989. Adrenocorticotropic hormone-releasing activities of interleukins in a homologous in vivo system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 1262–1267.
- Nestler, E.J., Barrot, M., Dileone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25.
- Nisticò, G., 1993. Communications among central nervous system, neuroendocrine and immune systems: Interleukin-2. *Prog. Neurosci* 40, 463–475.
- Nisticò, G., De Sarro, G., 1991. Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain? *Trends Neurosci.* 14, 146–150.

- Pauli, S., Linthorst, A.C.E., Reul, J.M.H.M., 1998. Tumour necrosis factor- α and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 10, 868–878.
- Pawlak, C.R., Schwarting, R.K.W., 2002. Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 679–687.
- Pawlak, C.R., Schwarting, R.K.W., 2006. Striatal microinjections of interleukin-2 and rat behaviour in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 168, 339–344.
- Pawlak, C.R., Ho, Y.J., Schwarting, R.K.W., Bauhofer, A., 2003. Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behaviour in the rat. *Neurosci. Lett.* 341, 205–208.
- Pawlak, C.R., Schwarting, R.K.W., Bauhofer, A., 2005. Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: Relationships with plus-maze behaviour. *Mol. Brain Res.* 137, 159–165.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotactic Coordinates*, 4th ed. Academic Press, Sydney.
- Petitto, J.M., McCarthy, D.B., Rinker, C.M., Huang, Z., Getty, T., 1997. Modulation of behavioral and neurochemical measures of forebrain dopamine function in mice by species-specific interleukin-2. *J. Neuroimmunol.* 73, 183–190.
- Petitto, J.M., Huang, Z., Hartemink, D.A., Beck, R., 2002. IL-2/15 receptor-beta gene deletion alters neurobehavioral performance. *Brain Res.* 929, 218–225.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.
- Rapaport, M.H., Stein, M.B., 1994. Serum cytokine and soluble interleukin-2 receptors in patients with panic disorder. *Anxiety* 1, 22–25.
- Reynolds, S.M., Berridge, K.C., 2002. Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste “liking”/“disliking” reactions, place preference/avoidance, and fear. *J. Neurosci.* 22, 7308–7320.
- Schwarting, R.K.W., Thiel, C.M., Müller, C.P., Huston, J.P., 1998. Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *NeuroReport* 9, 1025–1029.
- Song, C., Merali, Z., Anisman, H., 1999. Variations of nucleus accumbens dopamine and serotonin following systemic interleukin-1, interleukin-2 or interleukin-6 treatment. *Neuroscience* 88, 823–836.
- Thiel, C.M., Huston, J.P., Schwarting, R.K.W., 1998. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85, 1253–1262.
- Thiel, C.M., Müller, C.P., Huston, J.P., Schwarting, R.K.W., 1999. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 93, 243–251.
- van den Heuvel, O.A., Veltman, D.J., Groenewegen, H.J., Witter, M.P., Merkelbach, J., Cath, D.C., van Balkom, A.J.L.M., van Oppen, P., van Dyck, R., 2005. Disorder-specific neuroanatomical correlates of attentional bias in obsessive-compulsive disorder, panic disorder, and hypochondriasis. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 922–933.
- Waldmann, T.A., 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 595–601.
- Walker, L.G., Walker, M.B., Heys, S.D., Lolley, J., Wesnes, K., Eremin, O., 1997. The psychological and psychiatric effects of rIL-2 therapy: a controlled clinical trial. *Psycho-Oncology* 6, 290–301.
- Wichers, M., Maes, M., 2002. The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 5, 375–388.
- Wilcox, R.R., 1987. New designs in analysis of variance. *Annu. Rev. Psychol.* 38, 29–60.
- Zalcman, S.S., 2001. Interleukin-2 potentiates novelty- and GBR 12909-induced exploratory activity. *Brain Res.* 899, 1–9.
- Zalcman, S.S., Siegel, A., 2006. The neurobiology of aggression and rage: role of cytokines. *Brain Behav. Immun.* 20, 507–514.
- Zalcman, S.S., Green-Johnson, J.M., Murray, L., Nance, D.M., Dyck, D., Anisman, H., Greenberg, A.H., 1994. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res.* 643, 40–49.
- Zalcman, S., Murray, L., Dyck, D.G., Greenberg, A.H., Nance, D.M., 1998. Interleukin-2 and -6 induce behavioral-activating effects in mice. *Brain Res.* 811, 111–121.

Artikel 2

Time-dependent in-vivo effects of interleukin-2 on neurotransmitters in various cortices: Relationships with depressive-related and anxiety-like behaviour.

B.D. Karrenbauer, C.P. Müller, Y.-J. Ho, R. Spanagel,
J.P. Huston, R.K.W. Schwarting, C.R. Pawlak

Journal of Neuroimmunology

(eingereicht)

Time-dependent in-vivo effects of interleukin-2 on neurotransmitters in various cortices: Relationships with depressive-related and anxiety-like behaviour.

B. D. KARRENBAUER^{1*}, C. P. MÜLLER², Y. J. HO³, R. SPANAGEL⁴, J. P. HUSTON⁵, R. K. W. SCHWARTING¹, C. R. PAWLAK^{6,7*}

¹Physiological Psychology, Philipps-University Marburg, Germany

²Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Erlangen, Germany

³School of Psychology, Chung Shan Medical University, Tai-Chung City, Taiwan, ROC

⁴Psychopharmacology, Central Institute of Mental Health, Mannheim, Germany

⁵Center for Behavioral Neuroscience, University of Düsseldorf, Germany

⁶Clinical and Cognitive Neuroscience, Central Institute of Mental Health, Mannheim, Germany

⁷Institute of Psychology, Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany

***Corresponding authors:**

Dr. Cornelius R. Pawlak

Institute of Psychology

Goethe-University Frankfurt am Main

Mertonstr. 17, 60054 Frankfurt am Main, Germany

e-mail: pawlak@psych.uni-frankfurt.de

Tel: +49 (0) 69 798 22905

Fax: +49 (0) 69 798 23457

Britta D. Karrenbauer

Experimental and Physiological Psychology

Philipps-University

Gutenbergstr. 18, D-35032 Marburg, Germany

e-mail: karrenbb@staff.uni-marburg.de

Tel: +49 (0) 6421 2823678

Fax: +49 (0) 6421 2826621

Running title: IL-2, neurotransmitters, and behaviour

Abstract

We investigated the impact of systemically injected IL-2 (2.5 µg/kg, i.p.) on serotonergic and dopaminergic neurotransmission in various cortical areas by in-vivo microdialysis (Exp.1). IL-2 lastingly reduced extracellular 5-HT levels in the medial prefrontal (-75%), occipital (-70%), and temporal cortices (-45%), whereas dopamine was only moderately reduced in the medial prefrontal cortex.

Based on the serotonergic time profile, we conducted further experiments to test for acute (Exp.2a) and delayed (two hours post injection, Exp.2b) depressive-related effects of systemic IL-2 (0-5.0 µg/kg) in a forced swim test and delayed effects on anxiety-like behaviour in the elevated plus-maze (Exp.3). IL-2 had dose-dependent effects on depressive-related behaviour after delayed but not acute testing, but no effects on anxiety-like behaviour.

Keywords: Cytokines; Anxiety; Depression; Forced Swim Test; In-Vivo Microdialysis; HPLC-EC

1. Introduction

It is becoming increasingly clearer that there is a reciprocal link between the immune system and the nervous system. This link is suggested to modulate emotional and motivational processes (Anisman et al., 2005; Kiecolt-Glaser et al., 2002) and to be involved in certain psychopathologies, namely depression and anxiety disorders (Anisman and Merali, 1999; Dantzer et al., 2008). Potential candidates for this link are pro-inflammatory cytokines, which are also present in the brain and which are now commonly recognised to act also as neuromodulators (Vitkovic et al., 2000; Hanisch, 2001).

Several studies showed that blood cytokine levels differ between healthy controls and patients diagnosed with affective and motivational disorders, such as major depression (Kim et al., 2007b, Myint et al., 2005; Seidel et al., 1995; Tsao et al., 2006), bipolar disorder (Kim et al., 2007a), dysthymia (Anisman et al., 1999), panic disorder (Rapaport and Stein 1994), schizophrenia, and mania (Maes et al., 1995).

Furthermore, therapeutic administration of interferon- α (IFN- α) to patients with hepatitis (Bonaccorso et al., 2002), and the combination of interleukin-2 (IL-2) and IFN- α immunotherapy in cancer patients (Capuron et al., 2000; Capuron et al., 2001) can lead to symptoms of depression. Also, Bonaccorso and colleagues (2002) showed that an increase in depressive ratings during an immunotherapy with IFN- α is correlated with IFN- α -induced changes in the serotonergic system. Similar results were also seen in an older study, where administration of IL-2 during cancer immunotherapy led to a decrease of blood tryptophan (essential amino acid precursor of 5-HT), and an increase in urine kynurenine, a metabolite of tryptophan (Brown et al., 1989). Follow-up studies supported this potential association between IL-2, decreased tryptophan, and depressive symptoms (Capuron et al., 2002a; Capuron et al., 2003).

Studies on patients with depressive disorders yielded reduced brain metabolism in the left frontal and prefrontal cortex and, to some extent, increases in the basal ganglia and the parietal cortex (Cummings, 1993; George et al., 1993; Drevets et al., 1997). However, little is known about therapeutic cytokine treatment, brain metabolism, and mood. Hepatitis C patients treated with low doses of IFN- α showed hypometabolism in the prefrontal cortex, measured by PET scan, which was correlated with an increase in depression score; this was accompanied by a

hypermetabolism in the putamen and left occipital cortex (Juengling et al., 2000). Capuron et al. (2007) partially supported these results: Cancer patients who received IFN- α therapy also had decreased metabolism in the prefrontal cortex and the basal ganglia. Moreover, subjective feelings of energy were negatively correlated with glucose metabolism in the left nucleus accumbens and the putamen.

Several animal studies have demonstrated the impact of cytokines on central neurotransmission relevant for affective motivated behaviours (Anisman et al., 2005). Apart from the pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, or tumour necrosis factor- α (TNF- α), IL-2 has been suggested to be involved in the modulation of various neurotransmitters in the brain (Hanisch et al., 2001; Dunn et al., 2005b). For example, Petitto and colleagues (1997) showed that IL-2 modulates dopamine (DA) release from striatal slices in a biphasic way. IL-2 administration also influenced DA levels and turnover in the prefrontal cortex (Zalcman et al., 1994), nucleus accumbens (Anisman et al., 1996; Song et al., 1999), neostriatum, and substantia nigra (Lacosta et al., 2000). Other animal studies provided evidence for an impact of IL-2 on 5-HT levels. Lacosta and colleagues (2000) found an increase in 5-HT levels in the hippocampus and a decrease in the prefrontal cortex after repeated systemic IL-2 administration. In-vivo, intracerebroventricular IL-2 increased 5-HT and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the hippocampus (Pauli et al., 1998), and systemic IL-2 increased 5-HIAA in the nucleus accumbens (Song et al., 1999).

In contrast, studies on IL-2 and behaviour in animal models relevant for depression or anxiety are still scarce. Concomitant to human findings, IL-2 also led to alterations in depressive-related or anxiety-like behaviours. For example, systemic IL-2 was reported to increase locomotion (Petitto et al., 1997; Zalcman et al., 1998), alter exploration of and approach to a novel stimulus (Lacosta et al., 1999; Zalcman et al., 1998, 2001). Furthermore, IL-2 was tested in behavioural tests for anhedonia, which is thought to be one critical symptom of depression. Acute administration of IL-2 did not influence hedonic behaviour measured by the consumption of palatable food (chocolate milk; Anisman and Merali, 1999). However, if IL-2 was continuously infused over seven days it markedly reduced consumption (Anisman et al., 2002). Systemic IL-2 also impaired responding for rewarding brain stimulation in the medial forebrain bundle, which can also be taken as a measure of anhedonia (Anisman et

al., 1996). However, IL-2 has not been tested in other paradigms measuring depressive-related behaviour, such as the forced swim test (FST).

In our previous studies, we found that IL-2 mRNA levels in the striatum and prefrontal cortex were correlated with individual anxiety-like behaviour, as measured in the elevated plus-maze (EPM; Pawlak et al., 2003; Pawlak et al., 2005). Also, we found a trend for a biphasic effect on EPM behaviour when IL-2 was injected into the striatum, with a lower dose (1 ng) leading to an anxiogenic- and the higher dose (25 ng) leading to an anxiolytic-like effect (Pawlak and Schwarting, 2006). This preliminary evidence for a biphasic effect was recently supported when we observed that an even lower dose of striatal IL-2 (0.1 ng) led to a significant anxiogenic-like effect in an open field test (Karrenbauer et al., 2009). Thus, we suggest that IL-2, like other cytokines, also possesses the potential to act as a neuromodulator apart from inflammatory processes (Vitkovic et al., 2000; Hanisch, 2001).

There are no studies which analysed the impact of peripherally administered species-specific IL-2 on neurotransmission in the living animal and corresponding behaviours. Thus, in the first part of this study, we focused on systemic IL-2 and its effects on neurotransmission in several cortical areas (medial prefrontal, occipital, and temporal cortex), as measured by in-vivo microdialysis (Exp.1). The second part consists of two behavioural experiments: Experiment 2 investigated the impact of IL-2 on depressive-related behaviour measured by the forced swim test (FST; Exp.2) upon acute (exp. 2a), and delayed IL-2 treatment (Exp.2b). Finally, IL-2 effects on anxiety-like behaviour were tested by the elevated plus-maze (EPM; Exp.3).

2. Methods

2.1 Material and Methods

All experiments were conducted in conformity with the Animal Protection Law of the Federal Republic of Germany.

Animals and Surgery

In the following, different experiments will be described, in each of which separate animals were used.

Microdialysis and high-performance liquid chromatography. Male Wistar rats (animal facility, University of Düsseldorf, Germany), weighing 349 g (\pm 13.5, SD) before

surgery, were used. Until surgery they were housed four animals per cage under standard laboratory conditions, with a reversed light-dark rhythm (light on from 19:00 to 7:00) with food and tap water provided ad libitum. For surgery, rats were deeply anaesthetised with a mixture of 0.9 ml/kg Ketavet (containing 100 mg/ml Ketamine; Pharmacia and Upjohn, Germany) and 0.4 ml/kg Rompun (containing 20 mg/ml Xylazin; Bayer, Germany) and placed in a Kopf stereotaxic frame. Three guide cannulae with a thread on the top were aimed at the medial prefrontal cortex, mPFC (AP: +2.8, ML: +/-1.0, DV: -2.4, angle: 5° from midline), the occipital cortex, OccC (A:-6.8; L:+4.5; V:-1.8; angle: ±20°), and the temporal cortex, TempC (A:-3.8; L:+4.5; V:-3.5; angle: ±20°; all coordinates relative to bregma; Paxinos and Watson, 1986) and fixed to the skull with two stainless steel screws and dental cement (Müller et al., 2007). To prevent post-operative pain, 100 µl Novaminsulfon-ratiopharm (containing 500 mg/ml Metamizol-sodium) was administered p.o. after rats awoke from anaesthesia. After surgery, the animals were housed individually. They were handled daily and were allowed to recover for at least four days.

Forced swim test. Seventy-nine (Exp. 2a: N = 39; Exp. 2b: N = 40) male outbred adult Wistar Unilever rats (Harlan Winkelmann, Borchon, Germany) were used, weighing 269 ± 7.4 g in experiment 2a and 261 ± 10.9 g in experiment 2b on arrival in the lab. They were housed in groups of 4 in acrylic cages (38 x 20 x 59 cm). The animals were kept under standard laboratory conditions under a 12 hour light-dark cycle (lights on: 7:00-19:00) and with food and tap water available ad libitum.

Elevated plus-maze. Seventy-six male outbred adult Wistar Unilever rats (Harlan Winkelmann, Borchon, Germany) were used, weighing 282 ± 7.7 g on at the arrival in the lab. The animals were kept under the same conditions as in experiment 2a and 2b.

Microdialysis procedure

On the day of the experiment the animals were anaesthetised with 1.25 g/kg urethane (i.p.) and microdialysis probes of concentric design (membrane length: mPFC: 2 mm; OccC and TempC: 3 mm; 6 kDa molecular cut off) were inserted into the guide cannulae and fixed to the thread (probe construction described in Boix et al. 1995). Ex-vivo recovery for these probes at the used perfusion conditions were

13.7% for DA and 21.6% for 5-HT. After probe insertion the animal was placed on a heating pad within a sound and light isolated chamber kept under red light conditions (2.6 Lux; Müller et al., 2007). Body temperature was maintained during the experiment between 36.5 and 37.5 °C by a temperature controller. Animals received 0.2 ml phosphate buffered saline (PBS) every 20 min via a catheter in the intraperitoneal cavity to maintain body fluid balance, or additional urethane, when required. The microdialysis probes were connected to a microinfusion pump (CMA 100, Carnegie, Sweden) on top of the chamber and were perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing Na⁺ 147 mmol, K⁺ 4 mmol, Ca²⁺ 2.2 mmol, Cl⁻ 156 mmol, pH=7.4) at room temperature. The perfusion flow was set at 1.08 µl/min and was allowed to stabilise for at least two hours. After this, samples were collected every 20 min into vials containing 2 µl of 0.1 M perchloric acid and 500 pg dihydroxybenzylamine (DHBA) as internal standard (Pum et al., 2008).

Analytical procedure

The samples were immediately assayed after collection using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. The column was an ET 125/2, Nucleosil 120-5, C-18 reversed phase column (Macherey and Nagel, Germany) perfused with a mobile phase composed of 75 mM NaH₂PO₄, 4 mM KCl, 20 µM EDTA, 1.5 mM sodium dodecylsulfate, 100 µl/l diethylamine, 12% methanol and 12% acetonitril adjusted to pH 6.0 using phosphoric acid (modified from: Chen and Reith, 1994). The electrochemical detector (Intro, Antec, Netherlands) was set at 500 mV vs. an ISAAC reference electrode (Antec, Leyden, Netherlands) at 30°C. This set-up allows the measurement of 5-HT and DA in cortical samples. The detection limit of the assay was 0.1 pg for 5-HT and DA with a signal-noise ratio of 2:1. Neurochemical data were not corrected for recovery.

Experimental procedure

After obtaining stable baselines for 5-HT and DA, three 20 min samples were taken as baseline. Subsequently, rats received an i.p. injection with either IL-2 (2.5 µg/kg) or PBS. The injection volume was 1 ml/kg. Thereafter, sampling continued for 3 h (9 samples).

Histological analysis

After the experiment, the animals were deeply anaesthetised with 0.5 ml Nembutal (containing 60 mg/ml pentobarbital; Sanofi, France) and transcardially perfused with PBS followed by 10% phosphate buffered formalin. The brains were removed, sliced on a cryotome and stained with cresyl-violet for microscopic analysis of probe placement. Only animals with placement within the respective brain areas were considered for data analysis.

Behavioural design

Upon arrival, animals were weighed daily until the end of the experiment. All animals were gentled in a standardised procedure during which each rat was touched and picked up for 5 minutes on three consecutive days (day 2-4). In experiment 2a and 2b, animals were routinely exposed on two consecutive days both, to an open field (OF, day 5 and 6, 10 min each) and to an elevated plus maze (EPM, day 9 and 10, 5 min each; data not shown). In each group, rats were screened for their behavioural response to a novel open field and assigned to the groups based on comparable horizontal locomotor activity (distance travelled; data not shown). After a break of three days, the animals were tested in the FST on two consecutive days. On FST day 1 (FST 1), animals were tested without pharmacological treatment, while 24 hours later and prior to the second test (FST 2) IL-2 was injected. The difference between both experiments was that in experiment 2a the animals were tested acutely (5 min), whereas in experiment 2b they were tested two hours after the IL-2 injection.

In experiment 3, animals were tested on the EPM on two consecutive days (day 5 and 6). Pharmacological treatment took place only prior to the first test (EPM 1), while 24 hours later in the second test (EPM 2) animals were tested drug free. All treatments were conducted during the light cycle between 09:00-18:00 hours.

Forced Swim Test (FST)

The FST procedure was derived from Porsolt et al. (1977, 1978), but with modifications regarding water depth, temperature, and procedure (Cryan et al., 2002). In detail, a vertical square glass tank (25 x 25 x 60 cm) was filled with 27°C water to a depth of 40 cm. This depth was chosen so that the animals could swim and float without hind limbs or tail touching the bottom of the tank. The apparatus was cleaned after each trial with 0.1% acetic acid solution and refilled with fresh water.

In both experiments, animals were tested for 15 min during the first FST (FST 1) without pharmacological treatment. On the second test day (FST 2) in experiment 2a each animal was injected 5 min prior to behavioural testing with one dose of IL-2 (1, 2.5, 5 µg/kg), or sterile PBS. In experiment 2b animals were injected as above, but testing occurred two hours after single injection of IL-2 or PBS. Pharmacological treatment and behavioural testing were conducted in separate rooms.

During the FST, each rat was placed gently into the swim tank for the respective time periods (15 min on day 1, and 5 min on day 2). The following behavioural measures were scored from videotape by two observers (inter-rater reliability $r = .90$ $P \leq .001$) blind with respect to treatment: 1) Immobility, defined as the time the rat made only slow and minimal vertical movements, meaning slow sinking, calm movements just necessary to get back to surface during which the paws did not break the water surface. 2) Struggling, defined as the time the rat showed intense movements with all four paws and with the forepaws touching the wall of the tank, or breaking the water surface. These movements are mainly vertical, and the animals typically make more movements than necessary to keep the nose above the water surface.

In line with the literature (Porsolt et al. 1977), immobility during FST 2 (5 min) was taken as the index of depressive-related behaviour. In addition, behaviour during the same time period of FST 1 was taken as baseline values.

Elevated Plus-maze (EPM)

Testing was carried out in two identical set-ups, which were situated in two separated chambers. They were made of grey plastic and consisted of two opposed open arms (50 x 10 cm), two opposed closed arms (50 x 10 x 40 cm), and a middle section (10 x 10 cm) in the centre. A small raised edge (5 mm) surrounding the open arms prevented animals from falling off of the maze. The apparatus was elevated 50 cm above the floor and behaviour was monitored by a video camera located above the maze. The EPM was illuminated by four white bulbs, producing a light intensity of 30 lux in the centre.

First, the animals were tested for 5 minutes on the unfamiliar EPM (EPM 1). Twenty-four hours later they were tested again (EPM 2). For testing, every animal was carried from the animal room to the test room in an extra cage. This

transportation cage was cleaned thoroughly by 0.1% acetic acid solution before each animal. Thereafter, the rat was brought back to the animal room.

The following behavioural measurements were scored from videotape by trained observers, who were blind with respect to the treatments: 1) time spent on the open arms, 2) time spent on the closed arms (time was counted when all four paws were placed on one arm), 3) number of rearings, separately for closed and open arms and the middle, 4) number of open and closed arm entries (entry was counted when all four paws were placed in one arm), 5) latencies until first open and closed arm entry, respectively, and 6) risk assessment time. Risk assessment was counted when the animal was situated in a closed arm (at least with one paw), but explored the open arm with its head, whereas the eyes of the animal had to pass the line between the middle section and the open arm.

Homeostatic measures for sickness behaviour

Since a number of cytokines can reliably induce inflammation and sickness behaviour, body temperature (experiment 2b), and body weight (experiment 3) were recorded as systemic physiological measures. Rectal temperature was measured using a digital thermometer (Präzisionsthermometer, Testo, Germany) 5 min after testing on both test days (FST 1 = drug free baseline; FST 2 = single IL-2 or PBS treatment).

Body weight was recorded in each experiment, but was exemplarily analysed as a measure for sickness behaviour in experiment 3. Data were collected directly before IL-2 treatment on EPM 1 and 24 hours later (EPM2).

IL-2 treatment

In experiments 2a and 2b animals were randomly assigned to groups of ten, or nine, each. In experiment 3 animals were randomly divided into four groups leading to n=19 for each IL-2 treated group, and n = 18 for the control group.

Carrier-free recombinant rat IL-2 (R&D Systems, USA) was used, which was delivered as a 50 µg lyophilised filtered solution in 20 mM of ammonium acetate. Appropriate volumes of sterile PBS (Dulbecco's, Gibco®, Invitrogen Germany) were added to obtain aliquots containing 1, 2.5, or 5 µg of IL-2. All groups received a single systemic (i.p.) injection of either IL-2 (1, 2.5, or 5 µg/kg) or PBS. Animals were

injected either immediately before (experiment 2a), or two hours before testing (experiments 2b and 3).

Statistics

The neurochemical data were expressed as percentage of the baseline samples, which were taken as 100%. The data were analysed by two-way repeated measures ANOVAs with treatment and time as factors. In order to compare single time points, Tukey's HSD tests were used. In order to determine the absolute magnitude of the neurochemical effects over time, areas under the curve (AUC) were calculated by summing the values of the samples after the injection, and were compared vs. control.

Behavioural coding was executed by trained observers blind to treatment. Identically to other studies behavioural data were analysed with univariate ANOVAs for each test day. Post hoc tests were performed using least significant difference (LSD) tests. ANOVA results revealing a statistical trend ($P < .10$) were also analysed by post hoc comparisons (Pawlak and Schwarting, 2006). The rationale is that the overall F is not required in order to conduct multiple comparisons (Wilcox 1987; Howell 1992).

Data are expressed as mean + SEM. All p-values are two-tailed and taken as statistically significant when $P \leq .05$.

3. Results

Experiment 1: Microdialysis and HPLC-EC

Histological Results

After exclusion of incorrect probe placements, the following group sizes were obtained: mPFC saline $n = 7$, IL-2 $n = 6$; OccC: saline $n = 5$, IL-2 $n = 5$; TempC: saline $n = 7$, IL-2 $n = 5$. For probe placements see Fig.1.

Basal neurotransmitter levels

Basal levels of 5-HT were 1.62 ± 0.18 pg/20 μ l (mean \pm -S.E.M.) in the mPFC ($n=13$), 4.19 ± 0.78 pg/20 μ l in the OccC ($n=10$), and 2.42 ± 0.32 pg/20 μ l in the TempC ($n=12$). Basal DA levels were 1.27 ± 0.16 pg/20 μ l, 0.65 ± 0.15 pg/20 μ l, and $1.02 \pm$

0.22 pg/20 μ l for mPFC (n=12), OccC (n=10), and TempC (n=12), respectively. These basal extracellular levels did not differ between groups (p-values>0.05).

IL-2 effects on cortical 5-HT levels

IL-2 significantly decreased 5-HT levels in the mPFC (Fig. 2a). Statistical analysis showed a significant effect of treatment ($F = 63.23$, $P < 0.001$), time ($F = 5.26$, $P < 0.001$), and a significant treatment x time interaction ($F = 8.97$, $P < 0.001$). Single time point comparisons vs. saline revealed a significant decrease in 5-HT levels in the 80 min ($P = 0.009$), 100 min ($P = 0.008$), and in the 120-180 min ($P < 0.001$) samples after injection. These findings were confirmed when AUC values were considered ($t = -7.93$; $P < 0.001$).

There was also a significant decrease of 5-HT levels in the OccC (Fig. 2b). Statistical analysis showed a significant effect of treatment ($F = 26.09$, $P < 0.001$), time ($F = 5.43$, $P < 0.001$), and a significant treatment x time interaction ($F = 7.53$, $P < 0.001$). Single time point comparisons vs. saline revealed a significant decrease in 5-HT levels in the 40 min ($P = 0.034$), 60 min ($P = 0.003$), 80 min ($P = 0.019$), 100 min ($P = 0.002$), and in the 120-180 min ($P < 0.001$) samples after injection. These findings were again confirmed when AUC values were considered ($t = -5.11$; $P < 0.001$).

Finally, IL-2 significantly decreased 5-HT levels in the TempC (Fig. 2c). Statistical analysis showed a significant effect of treatment ($F = 21.08$, $P = 0.001$), time ($F = 2.34$, $P = 0.013$), and a significant treatment x time interaction ($F = 3.84$, $P < 0.001$). Single time point comparisons vs. saline revealed a significant decrease in 5-HT levels in the 80 min ($P = 0.007$), 120 min ($P = 0.035$), 140 min ($P = 0.005$), 160 min ($P = 0.040$), and 180 min ($P = 0.002$) intervals after injection. These findings were confirmed when AUC values were considered ($t = -4.62$; $P = 0.010$).

IL-2 effects on cortical dopamine levels

IL-2 significantly decreased DA levels in the mPFC (Fig. 3a), but this effect was less pronounced than the IL-2 effect on 5-HT. Statistical analysis showed a significant effect of treatment ($F = 6.82$, $P = 0.026$), but no time effect, or treatment x time interaction ($P > 0.05$). Single time point comparisons did not show significant differences vs. saline ($P > 0.05$). However, an overall treatment effect was confirmed when AUC values were considered, showing that IL-2 treatment significantly reduced

DA levels in the mPFC compared to saline controls ($t = -2.58$; $P = 0.028$). In contrast, IL-2 did not affect DA levels in the OccC and TempC (Fig. 3b and 3c), where neither analysis of variance nor AUC value comparisons revealed significant differences vs. saline ($P > 0.05$).

Experiment 2: Behaviour in the forced swim test

In experiment 1, we obtained a clear reduction of 5-HT in different cortical areas, which followed a specific time profile. There is evidence that decreased 5-HT is associated with symptoms of depression (Coppen, 1967). Also, a negative correlation between 5-HT levels and depressive symptoms in IFN- α -induced depression was shown (Bonaccorso et al., 2002). Furthermore, depression and also cytokine-induced depressions can successfully be treated with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs; Hauser et al., 2002; Musselman et al., 2001; Capuron et al., 2002b,c). On the basis of the postulated link between 5-HT, depression, and cytokines, we analysed the impact of acute, or 2 hours delayed, systemic IL-2 on depressive-related behaviour measured by the FST. Here, the first test (FST 1) served as a baseline, and the second test (FST 2) as the drug test.

Experiment 2a: No effects of IL- 2 on acute testing in the forced swim test

Forced swim test

In the baseline test (FST 1), i.e. without drug treatment, we obtained no group differences in immobility ($F = 0.39$, $P = .760$), or struggling ($F = 1.20$, $P = .325$; data not shown). Also, and in contrast to Experiment 2b (see below), we observed no differences between IL-2 or PBS treatments in the FST 2 performed acutely after injection (immobility: $F = 0.80$, $P = .502$; struggling: $F = .68$, $P = .573$; Table 1).

Body temperature

There were no significant differences ($F \leq 1.08$, $P \geq .371$) between the IL-2 treated groups and the control group (Table 2).

Experiment 2b: Effects of IL-2 on delayed testing in the forced swim test

There were no baseline (FST 1) differences between groups, neither in immobility ($F = 0.22$, $P = .881$), nor struggling ($F = 0.24$, $P = .870$; data not shown).

During FST 2, i.e. 2 hours after injection, we found a significant group effect in immobility ($F = 3.75$, $P = .020$; Fig. 4a). LSD post hoc analysis revealed significantly more immobility in animals treated with the lowest IL-2 dose (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $P = .049$) compared to the control group, and the group treated with the highest IL-2 dose (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $P = .003$). Furthermore, animals treated with the intermediate dose of IL-2 (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) showed increased immobility compared to the highest dose ($P = .045$).

An opposite behavioural pattern was found in struggling behaviour, but only with a trend for a group effect ($F = 2.61$, $P = .067$; Fig. 4b). Post hoc analysis also showed a trend for decreased struggling behaviour in the 1 μg IL-2 group compared to controls ($P = .100$). In contrast, the group treated with the highest dose of IL-2 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) showed significantly more struggling than the lowest IL-2 dose (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $P = .011$), and a trend compared to the intermediate IL-2 dose (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $P = .091$).

Experiment 3: Elevated plus-maze behaviour

Here, we wanted to test whether systemic IL-2 also had effects on anxiety-like avoidance behaviour in the EPM. Since the previous FST experiments showed that IL-2 had delayed, but not acute, behavioural effects, we restricted our analysis to the delayed condition, i.e. EPM testing at 2 hours after injections. Also, we repeated the test on the consecutive day to examine whether the treatments might have even longer lasting effects (Karrenbauer et al., 2009), or behavioural trends (Pawlak and Schwarting, 2006) as was previously found in case of intrastriatal injections.

Systemic IL-2, however, had no effects on delayed testing for anxiety-like behaviour, since there were no differences between IL-2 and PBS treated animals regarding the time spent on the open arms, neither during the first (EPM 1: $F = .55$; $P = .649$) nor the second test (EPM 2: $F = 1.07$; $P = .369$). When data were expressed as percent time spent on the open arms, there were also no significant differences between the IL-2 treated and the control group (EPM 1: $F = .03$; $P = .994$; EPM 2: $F = 1.11$; $P = .350$). When the measurement for locomotion, namely entries into the arms, was divided into open and closed arm entries, we observed a trend for a group effect for the closed arm entries ($F = 2.39$; $P = .076$) on EPM 1. Post hoc analysis revealed that the group treated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of IL-2 showed significantly more closed arm entries than the control group ($P = .016$), and compared to the group treated with 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of IL-2 ($P = .043$).

In all other variables (EPM 1, EPM 2) there were no significant differences

between IL-2 and control groups ($\leq F = 2.11$; $\geq P = .106$; for details see Table 3).

Body weight

There were no significant differences between IL-2 treated and control animals on body weight before ($F = 0.20$; $P = .899$) and one day after IL-2 treatment ($F = 0.24$; $P = .869$; for details see Table 4).

5. Discussion

In the first experiment, we focused on systemic IL-2 and its effects on neurotransmission in several cortical areas as measured by in-vivo microdialysis. Our results showed that IL-2 excessively reduced cortical 5-HT levels, whereas DA was comparably mildly affected. Importantly, the 5-HT effects developed over time, that is, they became most pronounced after about 120 min, and sustained at least until the end of data collection 180 min upon IL-2 treatment. To test for the functional consequences of these neurochemical effects, two behavioural experiments were then performed, where we tested A) for IL-2 effects on depressive-related behaviour using the FST (Exp. 2a/b), and B) for effects on anxiety using the EPM (Exp. 3). Based on the temporal profiles of the neurochemical effects in the microdialysis experiment, we expected that IL-2 effects should be more pronounced around two hours after injection (termed delayed) as compared to acute testing, i.e. shortly after IL-2 administration. We showed in our behavioural experiments that systemic low doses of IL-2 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) led to depressive-related effects. In accord with our hypotheses, these effects were obtained only after delayed but not after acute testing. Against expectation and our previous results with intrastriatal injections, we found no effects of systemic IL-2 on anxiety-like behaviour.

Neurochemistry

There is a scarcity of studies investigating the impact of peripheral IL-2 on brain neurotransmission. Merely one study shows that systemically injected IL-2 affects neurotransmission in the living rat as measured by in-vivo microdialysis in the nucleus accumbens (Song et al., 1999). In that study, repeated injection of human IL-2 (i.p.) led to a reduction in DAergic activity (DA and homovanilic acid) and serotonergic turnover as measured by the 5-HT metabolite 5-HIAA. Another study by Pauli et al. (1998) showed that very high doses (500 ng) of IL-2, injected i.c.v., led to

a marked increase in hippocampal levels of 5-HT and 5-HIAA. Our work adds new evidence in showing that a single systemic injection of rather low dose of IL-2 (2.5 µg/kg) can be sufficient to decrease extracellular 5-HT in various cortices (medial prefrontal, occipital, and temporal cortex), and can partially decrease also DA (mPFC).

There are at least three possible mechanisms by which IL-2 might have affected 5-HT: First, via reducing the availability of tryptophan. There is evidence for a link between cytokines and tryptophan levels (Capuron et al., 2002a; Miura et al., 2008) in that IFN- α and IL-2 can increase IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), the first enzyme in the kynurenine pathway, which degrades and converts tryptophan to kynurenine and then to quinolinic acid (Carlin et al., 1987). The detailed mechanism whereby IL-2 alters 5-HT metabolism is unknown, but IFN- α is a potential inducer of IDO (Müller and Schwarz, 2007; Myint and Kim, 2003), and it may be possible that IL-2 influences the IDO level via an indirect way, even via inducing IFN- α (Schiller et al., 1993). The overexpression of IDO results in decreased local availability of tryptophan and consequently to reduced synthesis of 5-HT. Second, there is also evidence that IFN- α and other pro-inflammatory cytokines like IL-1 β (Ramamoorthy et al., 1995), tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Mössner et al., 1998), and IFN- γ (Morikawa et al., 1998) increase levels of the 5-HT transporter (5-HTT), which then may lead to increased re-uptake of 5-HT into the cell, and thus to a decrease of extracellular 5-HT. However, there are no data on the influence of IL-2 on this transporter. Third, IL-2 could reduce tryptophan and, consequently, also 5-HT due to reduced food intake and anorexia (Plata-Salaman, 1998; Reichenberg et al., 2001), but such effects cannot account for our microdialysis findings in the anesthetized rat. Taken together, the mechanism for our rapid and massive cortical 5-HT suppression remains unknown.

Regarding DA, there is evidence for several effects of IL-2 on DA and DA-mediated behaviour (Hanisch, 2001). For example, Anisman et al. (1998) showed that systemic IL-2 (1 µg), disrupted rewarding intracranial self-stimulation in the lateral hypothalamus but did not provoke alterations in reward unrelated behaviour. These effects were attributed to anhedonia stemming from disturbances of the DAergic system, because in their previous study they found that IL-2 led to reduced DA release in the nucleus accumbens (Anisman et al., 1996).

Thus, our study gives new insight into the neurochemical effects of IL-2, but the limitations of these findings have to be addressed: Due to the fact that the microdialysis and the behavioural experiments were conducted in different labs there are some discrepancies between the studies. First, we tested anaesthetised rats, which may differ pharmacokinetically from awake animals, and future microdialysis experiments will be required here using awake, freely-moving rats. On the other hand, we tested the animals hours after the induction of the anaesthesia, so that the normal effects of the anaesthesia on neurotransmitter levels are expected to have no effects on the results (De Souza Silva et al., 2007).

Secondly, the microdialysis study was conducted in the dark phase, whereas the behavioural tests were performed in the light phase of the artificial light/dark cycle. The release of cytokines and neurotransmitters is dependent on circadian rhythm (Lissoni et al., 1998; Vitkovic et al., 2000a), and behaviour is also influenced by the time of day (Carobrez and Bertoglio, 2005). However, it is unknown how cytokine-induced neurotransmitter releases may be influenced by circadian rhythm and how this might be expressed in rat behaviour. Finally, we tested only one dose of IL-2 neurochemically. In further studies it is essential to add more doses of IL-2 to obtain a dose-response curve.

Despite these limitations, our findings hint at pronounced time-, site-, and transmitter-dependent neurochemical consequences of systemically administered IL-2, and in our subsequent studies we explored whether these extracellular neurotransmitter depletions are also paralleled by functional effects, that is, depressive-related and anxiety-like behaviour.

Depressive-related behaviour

Progressive numbers of studies show relationships between inflammatory processes, cytokines, and depression (Bonaccorso et al., 2002; Wichers et al., 2002). For example, Capuron et al. (2000) have shown that IFN- α and IL-2 immunotherapy in combination with chemotherapy led to depressive symptoms compared to control patients who received only chemotherapy. Follow-up studies showed that these cytokine-induced depressive symptoms could be attenuated by antidepressant drugs (SSRIs; Leonard, 2001; Musselman et al., 2001; Capuron et al., 2002b; Hauser et al., 2002) and that these symptoms were associated with decreased tryptophan levels (Capuron et al., 2002a; Capuron et al., 2003). However, there are also studies (e.g.

Steptoe et al., 2003; Lesperance et al., 2004; Marques-Deak et al., 2007) that found no correlation between cytokines, antidepressant treatment, and depression.

Notwithstanding the controversial evidence between cytokines, 5-HT, and depression, we analysed the impact of peripherally injected IL-2 on depressive-related behaviour measured by the FST (Exp.2). The FST is one of the most common screening tests for antidepressant drugs and is based on the fact that animals that are forced to swim develop an immobile posture after an initial period of escape behaviour (Cryan et al., 2002). The high predictive validity is based, e.g., on the effects of antidepressant drugs (like SSRIs), which decrease the time spent immobile and increase active escape-directed behaviour (Lucki, 1997; Cryan et al., 2002). Therefore, one can assume that behaviour in the FST is mediated, at least partially, by 5-HT. It should be noted, however, that 5-HT is surely not the only transmitter involved both, in the FST (Bourin et al., 2009; Prica et al., 2008) and in the clinical disorder (Kirsch et al., 2008, Raison et al. 2005), where DA and others may also play a role.

We found dose-dependent effects of IL-2 on immobility behaviour in the FST, when tested two hours post injection, with an increase in depressive-related behaviour in case of the lowest dose (1 µg/kg) and a decrease in case of the highest (5 µg/kg). So far, there is only scarce evidence for depressive-related behaviour induced by cytokines in the FST. Dunn and Swiergiel (2005a) tested mice treated with different doses of IL-1β in the FST. They found that IL-1β (1 µg) increased immobility behaviour after a post-injection delay of around 110 minutes. Albeit the fact that they used a different species and a different cytokine compared to our study, they also found effects after a post-injection delay. Furthermore, in a study by O'Connor et al. (2009), IFN-γ and TNF-α increased IDO while also increasing depressive-related behaviour in mice. In addition, Makino et al. (1998) showed that a combination of antidepressant drugs and IFN-α did not increase immobility time in a FST, whereas IFN-α alone did.

To our knowledge there is no previous study in which the impact of IL-2 on depressive-related behaviour was analysed in the FST, and only scarce evidence is available on other depressive-related paradigms in animals (Anisman et al., 1996, 1998; Dunn et al., 2005b). Therefore, we interpret our data as follows: Peripherally injected IL-2 led to dose-dependent depressive-related effects in the FST when tested two hours after the injection. Furthermore, we speculate that the reduction of

central 5-HT, and partially DA, induced by peripherally injected IL-2 may serve as a critical mechanism for this effect. Possibly, the same holds for the phenomenon of cytokine-induced depression during cytokine therapy in cancer patients. Interestingly our effects were seen in structures (prefrontal, occipital cortex), which, according to human imaging techniques, are also involved in depression (Cummings, 1993; Drevets et al., 1997; George et al., 1993), in general, and cytokine-induced depression (Capuron et al., 2007; Juengling et al., 2000), in specific.

Still, one might wonder why IL-2 caused an increase in immobility in case of the lowest but not the highest dose. Actually, however, this is not an unexpected finding, since multiphasic response patterns are in accord with the cytokine literature (Montkowski et al. 2007) and with our previous experiments (Pawlak and Schwarting, 2006), where striatal injections of IL-2 led to an anxiogenic-like trend with the lowest dose (1 ng) and anxiolytic-like trend with the highest dose (25 ng) tested.

More unexpected is the finding, that the dose of 2.5µg/kg of IL-2 was highly effective to reduce extracellular levels of cortical 5-HT, but did not lead to behavioural effects in the FST. This discrepancy is probably due to methodological differences between the neurochemical and the behavioural experiments, especially the fact that microdialysis was performed under urethane anesthesia, which may affected pharmacokinetics and/or dynamics of IL-2.

Finally, one has to point out that the FST may model only few aspects of the clinical disease, and some, e.g. worries and dysfunctional thoughts, cannot be modelled in such basic behavioural paradigms. Therefore, future studies with IL-2 should also include other depressive-related behavioural aspects and tests, for example, the ambiguous-cue test (Enkel et al., 2010), learned helplessness (Cryan et al., 2002), or tests of decreased motivation like the break point paradigm (Hodos and Kalman 1963; Schneider et al., 2010), or anhedonia as tested in the sucrose consumption test (Papp et al., 1991).

Anxiety-like behaviour

Clinically, a high co-morbidity between anxiety and depressive disorders has been observed (Baldwin et al., 2002), and there is evidence for a serotonergic involvement in the pathogenesis of anxiety disorders. It has also been shown that various anxiety disorders can be treated successfully by antidepressants of the SSRI type (Allgulander et al., 2001; Figeo and Denys, 2009; Kent et al., 1998; Pollack et al.,

2001; Schatzberg, 2000; Westenberg, 1996). In addition, tryptophan depletion leads to enhanced anxiety in carbon dioxide provoked panic in panic disorder patients compared to controls (Schruers et al., 2000). This effect was inhibited by administering L-5-hydroxytryptophan, which increases the availability of 5-HT (Schruers et al., 2002). Similar results were found in the cholecystokinin-4 (CCK₄) challenge test, and pre-treatment with the SSRI fluvoxamine reduced the vulnerability to the panicogenic effects of CCK₄ in panic patients (van Megen et al., 1997). There is also evidence that IFN- α immunotherapy can increase anxiety in cancer patients, and this increase was reduced by antidepressant treatment with an SSRI (Musselman et al., 2001).

In animal models, only few studies analysed the impact of IL-2 on anxiety-like behaviour, and most of these studies yielded ambiguous results. Petitto et al. (2002) showed that IL-2/15R β knockout mice exhibited reduced anxiety-like behaviour in the EPM compared to heterozygous mice. On the other hand, there are also studies in which neither acute nor repeated IL-2 treatments lead to alterations in EPM behaviour (Anisman et al., 2002; Connor et al., 1998; Lacosta et al., 1999; Petitto et al., 1997). In our previous studies, we had shown that IL-2 directly injected into the striatum moderately (i.e. non-significantly) affected anxiety-like behaviour in the EPM (Pawlak and Schwarting, 2006), and significantly in an open field test (Karrenbauer et al., 2009). However, these effects were ambiguous and one reason might be the time point of testing: The present neurochemical experiment indicates the possibility that testing in previous studies was not conducted during the critical time window, i.e., following too soon after injection. Therefore, our third present experiment focused on delayed effects of IL-2 on anxiety-like behaviour, and we assumed that IL-2, in addition to its effects on depressive-related behaviour, should also affect anxiety-like behaviour. Contrary to our hypotheses, systemically injected IL-2 led to some minor effects (closed arm entries) but had no effects on typical and major EPM measures of anxiety-like behaviour, i.e. open arm time and risk assessment. Overall, these findings are surprising in light of the vast amount of data showing a relationship between anxiety and 5-HT. The reasons for these outcomes remain unexplained yet, but it can be concluded, at least, that the mechanisms of IL-2 action in the FST are apparently not relevant or not effective in case of the EPM.

Homeostatic measures for sickness behaviour

Dependent on the type of cytokine, these molecules can lead to symptoms of sickness behaviour, which can partly resemble depression, including fever, anorexia, sleep disturbance, lack of motivation, etc. (Dantzer et al., 2001). This behavioural pattern is also well known in animals at the onset of febrile infectious diseases, with behavioural characteristics like reduced grooming, lethargy, anhedonia and anorexia (Hart, 1988). Taking into account this evidence, one could argue that our effects of IL-2 on FST behaviour could stem from the fact that the animals were sick.

However, studies that analysed the ability of IL-2 to induce sickness behaviour are rare. Pauli et al. (1998) reported sickness after IL-2 treatment, but these findings may not be comparable to ours since they used a different site of drug administration (i.c.v.), higher doses, and not species-specific IL-2. On the other hand, Bhatt et al. (2005) failed to show any alteration in rectal temperature after a microinjection of IL-2 into the medial hypothalamus of cats. In another study by Miguelez et al. (2004) systemically injected IL-2 did not affect body weight or food intake, using drug doses comparable to the present work. Also, the majority of studies have tested cytokines in much higher concentrations, which presumably induce an immune challenge and consequently pathophysiological processes, which are then expressed as sickness behaviour. Therefore, to avoid confounds with sickness, we measured body temperature before and after IL-2 treatment and found no changes compared to controls (Table 2). Finally, the difference in body temperature between FST 1 and FST 2 may easily be explained by the fact that in FST 1 the animals have to swim for 15 min in 27°C water, whereas the FST 2 lasts only 5 min. In addition, we found no evidence of sickness behaviour, e.g., reduced grooming, or locomotion in our previous studies (Karrenbauer et al., 2009; Pawlak and Schwarting, 2006, Pawlak et al., 2003, 2005), which were recently supported by our findings in a different laboratory (Schneider et al., submitted). Also, the lack of IL-2 effects in the EPM argue against a role of sickness behaviour, since sickness should have a strong effect on EPM behaviour (e.g. Montkowski et al. 1997).

Therefore, we assume that our behavioural findings are not due to sickness behaviour, but to alterations in motivation and emotion, suggesting that IL-2 has neuromodulatory functions as has been reported with other cytokines (Vitkovic et al., 2000), and immune stimuli (Frenois et al., 2007).

In summary, our experiments demonstrate that peripherally injected IL-2 modulates both, neurochemical (5-HT, and partially DA) and concomitantly

behavioural parameters (depressive-related behaviour). These data are the first to establish that IL-2 alters cortical 5-HT in a specific time profile, which may be informative for further studies. The fact that we observed IL-2 induced effects on depressive-related behaviour two hours after injection, but not acutely, is suggested to be mediated, at least partially, by serotonergic mechanisms.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Project Based Personnel Exchange Programme (0940042882 from the NSC and D/05/06869 from the German Academic Exchange Service DAAD), the German Research Foundation (DFG PA 818/4-1, DE 792/4-1 and DFG Hu 306/27-2), and by funds of the University of Erlangen. The authors thank Anselm Crombach and Gabi Külz for assisting in the collection of the behavioural data.

6. References

Allgulander C, Nilsson B (2001). A prospective study of 86 new patients with social anxiety disorder. *Acta Psychiatr Scand* 103:447-52.

Anisman H, Kokkinidis L, Borowski T, Merali Z (1998). Differential effects of interleukin (IL)-1beta, IL-2 and IL-6 on responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res* 779:177-87.

Anisman H, Kokkinidis L, Merali Z (1996). Interleukin-2 decreases accumbal dopamine efflux and responding for rewarding lateral hypothalamic stimulation. *Brain Res* 731:1-11.

Anisman H, Merali Z (1999). Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv Exp Med Biol* 461:199-233.

Anisman H, Merali Z, Poulter MO, Hayley S (2005). Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Current Pharmaceutical Design* 11:963–972.

Anisman H, Kokkinidis L, Merali Z (2002). Further evidence for the depressive effects of cytokines: anhedonia and neurochemical changes. *Brain Behav Immun* 16:544-556.

Baldwin DS, Evans DL, Hirschfeld RM, Kasper S (2002). Can we distinguish anxiety from depression? *Psychopharmacol Bull* 36:158-65.

Bhatt S, Zalcman S, Hassanain M, Siegel A (2005). Cytokine modulation of defensive rage behavior in the cat: role of GABAA and interleukin-2 receptors in the medial hypothalamus. *Neuroscience* 133:17-28.

Boix F, Sandor P, Nogueira PJ, Huston JP, Schwarting RKW (1995). Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by

substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. *Neuroscience* 64: 1045-55.

Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M, Artini M, Almerighi C, Verkerk R, Meltzer H, Maes M (2002). Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *J Clin Psychopharmacol* 22:86-90.

Bourin M, Chenu F, Prica C, & Hascoet M (2009). Augmentation effect of combination therapy of aripiprazole and antidepressants on forced swimming test in mice. *Psychopharmacology* 206: 97-107.

Brown RR, Lee CM, Kohler P, Hank JA, Storer BE, Sondel PM (1989). Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 49:4941-4.

Capuron L, Ravaud A, Dantzer R (2000). Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon Alfa-2b therapy. *J Clin Oncol* 18:2143-51.

Capuron L, Ravaud A, Gualde N, Bosmans E, Dantzer R, Maes M, Neveu, P. J. (2001). Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. *Psychoneuroendocrinology* 26:797-808.

Capuron L, Gumnick JF, Musselman DL, Lawson DH, Reemsnyder A, Nemeroff CB, Miller AH (2002c). Neurobehavioral effects of interferon- α in cancer patients: Phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology* 26:643-652.

Capuron L, Hauser P, Hinze-Selch D, Miller AH, Neveu PJ (2002b). Treatment of cytokine-induced depression. *Brain Behav Immun* 16:575-80.

Capuron L, Ravaut A, Neveu PJ, Miller AH, Maes M, Dantzer R (2002a). Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry* 7:468-73.

Capuron L, Neurauter G, Musselman DL, Lawson DH, Nemeroff CB, Fuchs D, Miller AH (2003). Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry* 54:906-14.

Capuron L, Pagnoni G, Demetrashvili MF, Lawson DH, Fornwalt FB, Woolwine B, Berns GS, Nemeroff CB, Miller AH (2007). Basal ganglia hypermetabolism and symptoms of fatigue during interferon- α therapy. *Neuropsychopharmacology* 32:2384-2392.

Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI (1987). Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol* 139: 2414-8.

Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1193-205.

Chen NH, Reith ME (1994). Autoregulation and monoamine interactions in the ventral tegmental area in the absence and presence of cocaine: a microdialysis study in freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1597-610.

Connor TJ, Song C, Leonard BE, Merali Z, Anisman H (1998). An assessment of the effects of central interleukin-1 β , -2, -6, and tumor necrosis factor- α administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience* 84:923-33.

Coppen A (1967). The biochemistry of affective disorders. *Brit J Psychiatry* 119:1237-64.

Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238-45.

Cummings JL (1993). The neuroanatomy of depression. *J Clin Psychiatry* 54:14-20.

Dantzer R, Bluthé RM, Castanon N, Chauvet N, Capuron L, Goodall G, Kelley KW, Konsman JP, Layé S, Parnet P and Pousset F (2001). Cytokine effects on behavior. In: R Ader, DL Felten N Cohen (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, 3rd ed., Vol. 1, Academic Press, San Diego, pp. 703-27.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46-57.

De Souza Silva MA, Müller CP, Huston JP (2007). Microdialysis in the brain of anesthetized vs. freely moving animals. In: B Westerink, T Cremers (Eds.), *Handbook of Microdialysis: Methods, Applications and Perspectives*, 71-92. Amsterdam: Elsevier.

Drevets WC, Price JL, Simpson JRJ, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 386:824-827.

Dunn AJ, Swiergiel AH (2005a). Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 81:688-93.

Dunn AJ, Swiergiel AH, de Beaurepaire R (2005b). Cytokines as mediator of depression: What can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29:891-909.

Enkel T, Gholizadeh D, von Bohlen und Halbach O, Sanchis-Segura C, Hurlmann R, Spanagel R, Gass P, Vollmayr B (2010). Ambiguous-cue interpretation is biased under stress— and depression—like states in rats. *Neuropsychopharmacology* 35:1008-15.

Figee M, Denys D (2009). New pharmacotherapeutic approaches to obsessive-compulsive disorder. *CNS Spectr* 14:13-23.

Frenois F, Moreau M, O' Connor J, Lawson M, Micon C, Lestage J, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N (2007). Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 32:516-31.

George MS, Ketter TA, Post RM (1993). SPECT and PET imaging in mood disorders. *J Clin Psychiatry* 54:6-13.

Hanisch UK (2001). Effects of Interleukin-2 and interferons on the nervous system. In: Ader R, Felten DL, Cohen N, (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, 3rd ed., Vol. 1, Academic Press, San Diego, pp 585-631.

Hart BL (1988). Biological basis of the behaviour of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12: 123-37.

Hauser P, Khosla J, Aurora H, Laurin J, Kling MA, Hill J, Gulati M, Thornton AJ, Schultz RL, Valentine AD, Meyers CA, Howell CD (2002). A prospective study of the incidence and open-label treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C. *Mol Psychiatry* 7:942-7.

Hodos W, Kalman G (1963). Effects of increment size and reinforcer volume on progressive ratio performance. *J Exp Anal Behav* 6:387-92.

Howell DC (1992). *Statistical Methods for Psychology*, 3rd ed. Duxbury Press, Belmont, 338.

Juengling FD, Ebert D, Gut O, Engelbrecht MA, Rasenack J, Nitzsche EU, Bauer J, Lieb K (2000). Prefrontal cortical hypometabolism during low-dose interferon alpha treatment. *Psychopharmacology* 152:383-389.

Karrenbauer BD, Ho YJ, Ludwig V, Löhn J, Spanagel R, Schwarting RKW, Pawlak CR (2009). Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats. *J Neuroimmunol* 208:10-8.

Kent JM, Coplan JD, Gorman JM (1998). Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biol Psychiatry* 44:812-24.

Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R (2002). Emotions, morbidity, and mortality: new perspectives from psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol* 53:83-107.

Kim YK, Jung HG, Myint AM, Kim H, Park SH (2007a). Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *J Affect Disord* 104:91-5.

Kim YK, Na KS, Shin KH, Jung HY, Choi SH, Kim JB (2007b). Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1044-53.

Kirsch I, Deacon BJ, Huedo-Medina TB, Scoboria A, Moore TJ, Johnson BT (2008). Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. *PLoS Med* 5:260-8.

Konsman JP, Luheshi GN, Bluthé RM, Dantzer R (2000). The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci* 12:4434-46.

Lacosta S, Merali Z, Anisman H (1999). Influence of acute and repeated interleukin-2 administration on spatial learning, locomotor activity, exploratory behaviors, and anxiety. *Behav Neurosci* 113:1030-41.

Lacosta S, Merali Z, Anisman H (2000). Central monoamine activity following acute and repeated systemic interleukin-2 administration. *Neuroimmunomodulation* 8:83-90.

Leonard BE (2001). The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:767-80.

Lesperance F, Frasurre-Smith N, Thérroux P, Irwin M (2004). The association between major depression and levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, interleukin 6, and C-reactive protein in patients with recent acute coronary syndromes. *Am J Psychiatry* 161: 271-77.

Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L (1998). Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun* 16: 1-5.

Lucki I (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8:523-32.

Maes M, Bosmans E, Calabrese J, Smith R, Meltzer HY (1995). Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. *J Psychiatr Res* 29:141-52.

Makino M, Kitano Y, Hirohashi M, Takasuna K (1998). Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *Eur J Pharmacol* 356:1-7

Marques-Deak AH, Lotufo Neto F, Dominguez WV, Solis AC, Kurcgant D, Sato F, Ross JM, Prado EBA (2007). Cytokines profiles in women with different subtypes of major depressive disorders. *J Psychiatr Res* 41:152-59.

Migueluez M, Lacasse M, Kentner AC, Rizk I, Fouriez G, Bielajew C (2004). Short- and long-term effects of interleukin-2 on weight, food intake, and hedonic mechanisms in the rat. *Behav Brain Res* 154:311-9.

Miura H, Ozaki N, Sawada M, Isobe K, Ohta T, Nagatsu T (2008). A link between stress and depression: shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. *Stress* 11: 198-209.

Montkowski A, Landgraf R, Yassouridis A, Holsboer F, Schobitz B (1997). Central administration of IL-1 reduces anxiety and induces sickness behaviour in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 329-36.

Morikawa O, Sakai N, Obara H, Saito N (1998). Effects of interferon-alpha, interferon-gamma and cAMP on the transcriptional regulation of the serotonin transporter. *Eur J Pharmacol* 349:317-24.

Mössner R, Heils A, Stober G, Okladnova O, Daniel S, Lesch KP (1998). Enhancement of serotonin transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6. *Neurochem Int* 33:251-4.

Müller CP, De Souza Silva MA, Huston JP (2007). Double dissociating effects of sensory stimulation and cocaine on serotonin activity in the occipital and temporal cortices. *Neuropharmacology* 52:854-62.

Müller N, Schwarz MJ (2007). The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry* 12:988-1000.

Musselman DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, Greiner K, Nemeroff CB, Miller AH (2001). Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med* 344:961-6.

Myint AM, Leonard BE, Steinbusch HW, Kim YK (2005). Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression. *J Affect Disord* 88:167-73.

Myint AM, Kim YK (2003). Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses* 61:519-25.

O'Connor JC, Andre C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R (2009). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci* 29:4200-9.

Papp M, Willner P, Muscat R (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* 104:255-9.

Pauli S, Linthorst ACE, Reul JMHM (1998). Tumour necrosis factor- α and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Eur J Neurosci* 10:868-78.

Pawlak CR, Ho YJ, Schwarting RKW, Bauhofer A (2003). Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behaviour in the rat. *Neurosci Lett* 341:205-8.

Pawlak CR, Schwarting RKW, Bauhofer A (2005). Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: Relationships with plus-maze behaviour. *Mol Brain Res* 137:159-65.

Pawlak CR, Schwarting RKW (2006). Striatal microinjections of interleukin-2 and rat behaviour in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 168:339-44.

Paxinos G, Watson C (1986). *The rat brain in stereotactic coordinates*, 2nd ed. Sydney: Academic Press.

Petitto JM, McCarthy DB, Rinker CM, Huang Z, Getty T (1997). Modulation of behavioral and neurochemical measures of forebrain dopamine function in mice by species-specific interleukin-2. *J Neuroimmunol* 73:183-90.

Petitto JM, Huang Z, Hartemink DA, Beck Jr R (2002). IL-2/15 receptor- β gene deletion alters neurobehavioral performance. *Brain Res* 929:218-25.

Plata-Salaman CR (1998). Cytokine-induced anorexia. Behavioral, cellular, and molecular mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 856:160-70.

Plata-Salaman CR, Turrin N (1999). Cytokine interactions and cytokine balance in the brain: relevance to neurology and psychiatry. *Mol Psychiatry* 4:302-6.

Pollack MH, Zaninelli R, Goddard A, McCafferty JP, Bellew KM, Burnham DB, Iyengar MK (2001). Paroxetine in the treatment of generalized anxiety disorder: results of a placebo-controlled, flexible-dosage trial. *J Clin Psychiatry* 62:350-7.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-2.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379-91.

Prica C, Hascoet M, & Bourin M (2008). Is co-administration of bupropion with SSRIs and SNRIs in forced swimming test in mice, predictive of efficacy in resistant depression? *Behav Brain Res* 194: 92-99.

Pum ME, Huston JP De Souza Silva MA, Müller CP (2008). Visual sensory-motor gating by serotonin activation in the medial prefrontal and occipital, but not in the rhinal, cortices in rats. *Neuroscience* 153:361-72.

Raison CL, Demetrashvili M, Capuron L, Miller AH (2005). Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS Drugs* 19:105-23.

Ramamoorthy S, Ramamoorthy JD, Prasad PD, Bhat GK, Mahesh VB, Leibach FH, Ganapathy V (1995). Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. *Biochem Biophys Res Commun* 216:560-7.

Rapaport MH, Stein MB (1994). Serum cytokine and soluble interleukine-2 receptors in patients with panic disorder. *Anxiety* 1:22-5.

Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, Pollmächer T (2001). Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 58:445-52.

Schatzberg AF (2000). New indications for antidepressants. *J Clin Psychiatry* 61:9-17.

Schiller JH, Hank J, Storer B, Borchert AA, Moore KH, Albertini M, Bechhofer R, Wesley O, Brown RR, Bastin AM, Sondel PM (1993). A direct comparison of immunological and clinical effects of interleukin 2 with and without interferon-alpha in humans. *Cancer Res* 53:1286-92.

Schneider M, Heise V, Spanagel R (2010). Differential involvement of the opioid receptor antagonist naloxone in motivational and hedonistic aspects of reward. *Behav Brain Res* 208:466-72.

Schneider P, Weber-Fahr W, Leonardi-Essmann F, Spanagel R, Sartorius A, Pawlak CR (submittend). Differential psychopharmacology: Interleukin-2 effects on behaviour and neurochemistry. Society for Neuroscience, 2010. Poster at the Society for Neuroscience 40th Annunal Meeting. San Diego, USA.

Schruers K, Klaassen T, Pols H, Overbeek T, Deutz NE, Griez E (2000). Effects of tryptophan depletion on carbon dioxide provoked panic in panic disorder patients. *Psychiatry Res* 93:179-87.

Schruers K, van Diest R, Overbeek T, Griez E (2002). Acute L-5-hydroxytryptophan administration inhibits carbon dioxide-induced panic in panic disorder patients. *Psychiatry Res* 113:237-43.

Seidel A, Arolt V, Hunstiger M, Rink L, Behnisch A, Kirchner H (1995). Cytokine production and serum proteins in depression. *Scand J Immunol* 41:534-8.

Song C, Merali Z, Anisman H (1999). Variations of nucleus accumbens dopamine and serotonin following systemic interleukin-1, interleukin-2 or interleukin-6 treatment. *Neuroscience* 88:823-36.

Stephoe A, Kunz-Ebrecht SR, Owen N (2003). Lack of association between depressive symptoms and markers of immune and vascular inflammation in middle-aged men and women. *Psychol Med* 33:667-74.

Tsao CW, Lin YS, Chen CC, Bai CH, Wu SR (2006). Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:899-905.

van Megen HJ, Westenberg HG, den Boer JA, Slaap B, Scheepmakers A (1997). Effect of the selective serotonin reuptake inhibitor fluvoxamine on CCK-4 induced panic attacks. *Psychopharmacology* 129:357-64.

Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C (2000). "Inflammatory" cytokines: Neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74:457-71.

Westenberg HG (1996). Developments in the drug treatment of panic disorder: what is the place of the selective serotonin reuptake inhibitors? *J Affect Disord* 40:85-93.

Wichers M, Maes M (2002). The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int J Neuropsychopharmacol* 5:375-88.

Wilcox RR (1987). New designs in analysis of variance. *Annu Rev Psychol* 38:29–60.

Zalcman SS, Green-Johnson JM, Murray L, Nance DM, Dyck D, Anisman H, Greenberg AH (1994). Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res* 643:40-9.

Zalcman S, Murray L, Dyck DG, Greenberg AH, Nance DM (1998). Interleukin-2 and -6 induce behavioral-activating effects in mice. *Brain Res* 811:111-21.

Zalcman SS (2001). Interleukin-2 potentiates novelty- and GBR 12909-induced exploratory activity. *Brain Res* 899:1-9.

Fig. 1: Localisation of microdialysis probes within the medial prefrontal cortex (mPFC), temporal cortex (TempC), and occipital cortex (OccC), based on the stereotaxic atlas by Paxinos and Watson (1986). Caption refers to the anterior-posterior coordinates relative to bregma.

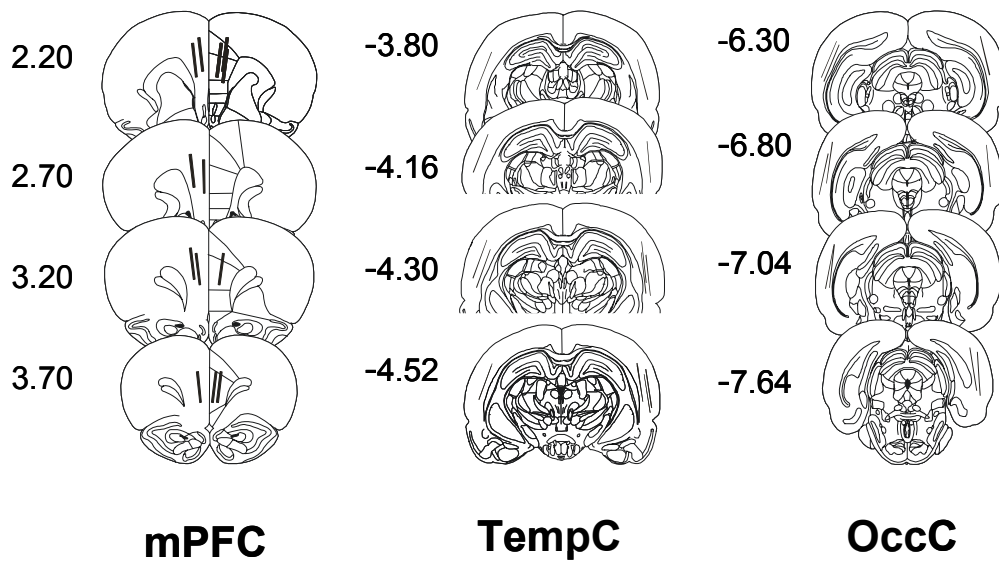


Fig. 2: Extracellular 5-HT (serotonin) levels in the medial prefrontal cortex (a), occipital cortex (b), and temporal cortex (c) after interleukin-2 (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) injection (* $p < 0.05$, + $p < 0.01$, # $p < 0.001$, two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test vs. saline). Boxes: AUC values ($^{\$}$ $p < 0.01$, $^{\text{§}}$ $p < 0.001$, two-tailed t-test).

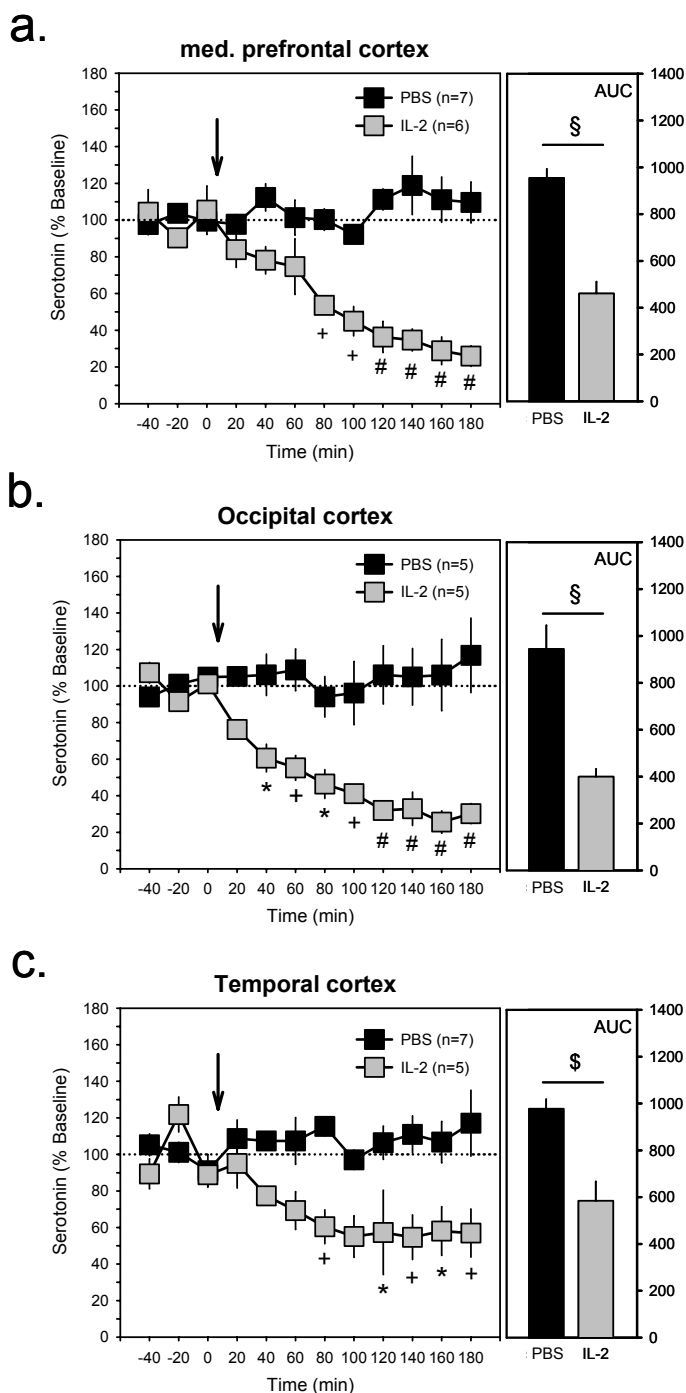


Fig. 3: Extracellular DA (dopamine) levels in the medial prefrontal cortex (a), occipital cortex (b), and temporal cortex (c) after interleukin-2 (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) injection. Boxes: AUC values (& $p < 0.05$, two-tailed t-test).

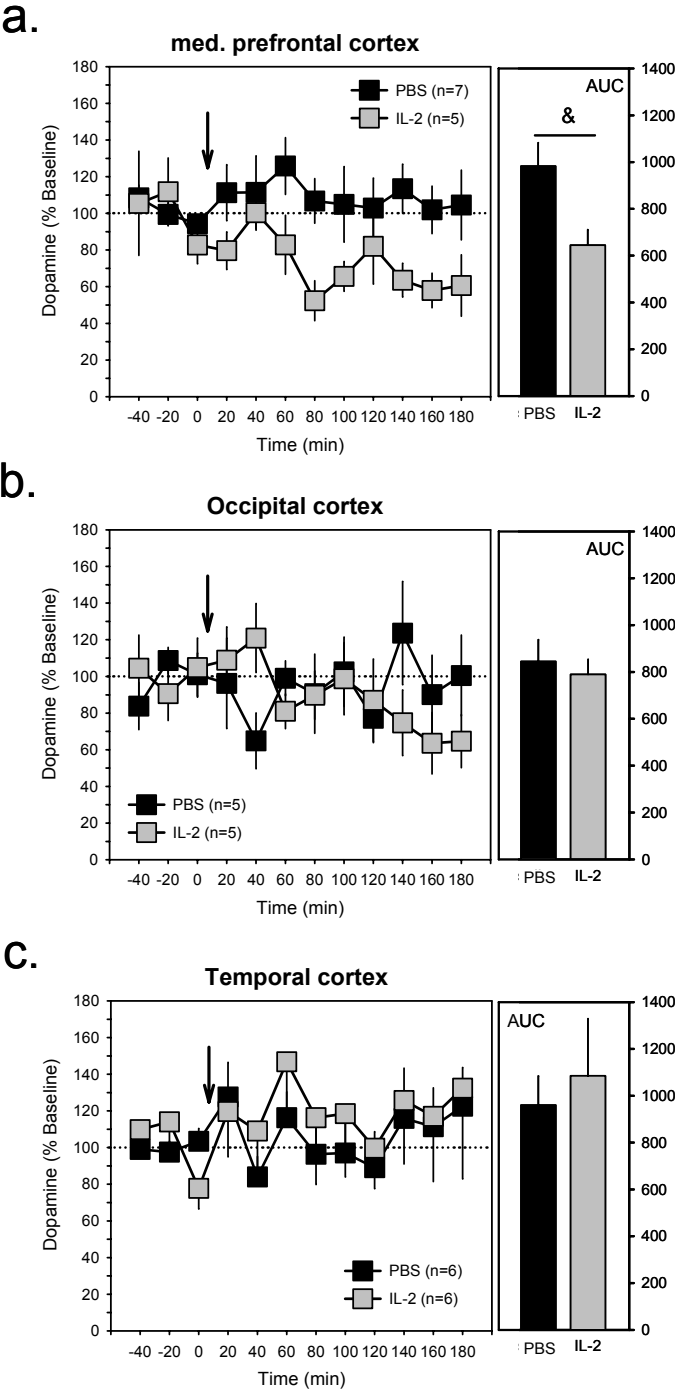
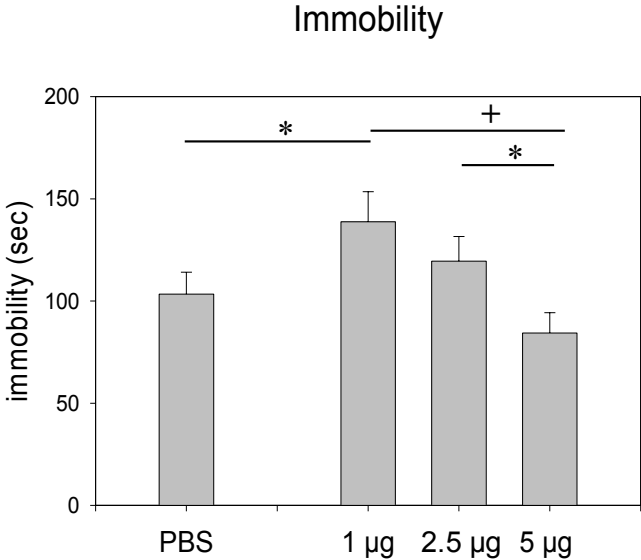
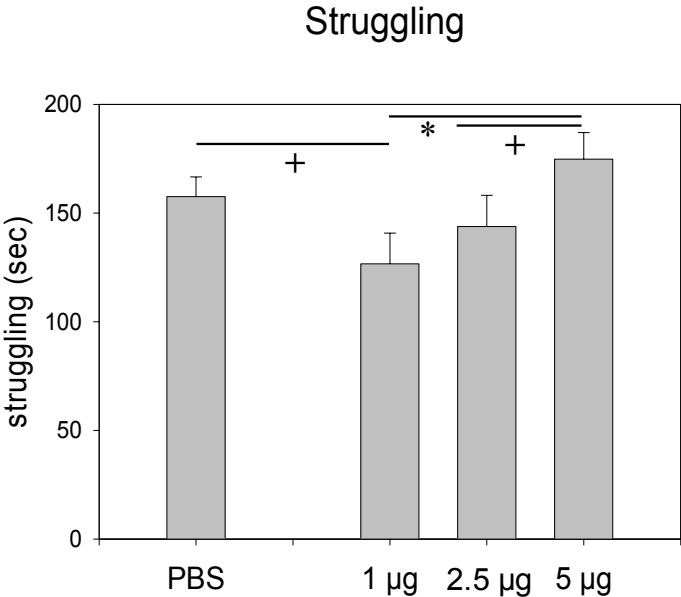


Fig. 4: Experiment 2b: Effects of peripheral IL-2 on immobility (a) and struggling (b) behaviour in a forced swim test. This test was performed 2 hours after injections of IL-2 (1, 2.5, or 5 µg/kg) or PBS. Results are presented as means ± SEM (* p<0.05; + p<0.01). Please refer to the text for the statistical analyses.

a)



b)



Karrenbauer et al.

Table 1: Experiment 2a: Effects of peripheral IL-2 on behaviour in a forced swim test (FST). Behaviour was tested acutely (5 min) after injections of IL-2 (1, 2.5, 5 µg/kg), or PBS. Results are presented as means ± SEM.

		PBS	IL-2		
			1 µg	2.5 µg	5 µg
FST 2	Immobility (sec.)	124.0 ± 17.7	99.8 ± 20.8	134.2 ± 19.0	138.4 ± 19.8
	Struggling (sec.)	152.7 ± 18,9	175.1 ± 20.3	142.9 ± 19.9	139.4 ± 20.2

Table 2: Body temperature: Effects of single peripheral IL-2 injection on body temperature (in Celsius °) 5 min after FST 1 (without IL-2), 5 min after FST 2 (with IL-2).

		PBS	IL-2		
			1 µg	2.5 µg	5 µg
FST 1		31.6 ± 0.2	31.4 ± 0.3	31.6 ± 0.2	31.5 ± 0.3
FST 2		34.2 ± 0.1	33.8 ± 0.2	34.1 ± 0.2	34.1 ± 0.1

Table 3: Experiment 3: Effects of peripheral IL-2 on behaviour in an elevated plus-maze (EPM). Behaviour during EPM1 was tested two hours after injections of IL-2 (1, 2.5, 5 µg/kg), or PBS. EPM2 was conducted on the subsequent day without further injections. Results are presented as means ± SEM. (**bold** = significant effects compared to PBS). * OT = open arm time; CT = closed arm time

	PBS		IL-2					
			1 µg		2.5 µg		5 µg	
	EPM1	EPM2	EPM1	EPM2	EPM1	EPM2	EPM1	EPM2
Open arm time (sec.)	45.8 ± 8.9	34.5 ± 8.2	35.0 ± 7.2	19.2 ± 4.8	48.7 ± 7.9	35.5 ± 9.4	46.2 ± 8.6	35.2 ± 8.0
% Open arm time * (OT/OT+CT)*100	19.1 ± 3.9	13.5 ± 3.4	18.6 ± 5.4	7.2 ± 1.8	20.0 ± 3.2	13.7 ± 3.6	18.5 ± 3.7	13.9 ± 3.2
Closed arm time (sec.)	186.4 ± 18.0	233.9 ± 12.5	215.3 ± 15.5	249.5 ± 8.4	206.2 ± 13.2	234.5 ± 12.1	214.0 ± 13.0	228.7 ± 12.4
% Closed arm time* (CT/CT+OT)*100	75.3 ± 5.8	86.5 ± 3.4	81.4 ± 5.4	92.8 ± 1.8	80.0 ± 3.2	86.3 ± 3.6	81.5 ± 3.7	86.1 ± 3.2
Entries into arms (no.)	7.5 ± 1.2	7.8 ± 1.0	7.7 ± 1.1	7.5 ± 0.9	10.5 ± 1.0	8.7 ± 1.1	8.9 ± 1.0	8.6 ± 1.0
Entries into open arms (no.)	2.7 ± 0.6	2.4 ± 0.6	2.6 ± 0.5	1.8 ± 0.4	3.5 ± 0.5	2.5 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.5 ± 0.5
Entries into closed arms (no.)	4.8 ± 0.6	5.4 ± 0.5	5.2 ± 0.6	5.7 ± 0.6	7.00 ± 0.7	6.2 ± 0.6	5.7 ± 0.6	6.1 ± 0.6
Rearing (no.)	11.9 ± 1.9	12.1 ± 1.4	13.6 ± 1.8	13.5 ± 1.6	16.0 ± 1.5	14.2 ± 1.2	16.0 ± 1.9	14.6 ± 1.6
Open arm latency (sec.)	84.1 ± 26.6	132.7 ± 31.1	70.4 ± 28.0	84.8 ± 25.6	70.0 ± 25.3	140.8 ± 29.8	69.9 ± 24.7	81.7 ± 27.4
Closed arm latency (sec.)	66.3 ± 17.4	19.9 ± 6.8	46.0 ± 15.5	14.5 ± 3.7	29.1 ± 10.3	10.1 ± 3.6	24.9 ± 5.0	19.4 ± 5.7
Risk Assessment (sec.)	35.1 ± 5.2	41.0 ± 6.1	33.0 ± 5.9	37.2 ± 5.1	38.7 ± 5.2	37.0 ± 5.6	41.0 ± 5.6	35.8 ± 6.0

Table 4: Body weight: Effects of single peripheral IL-2 injection on body weight (in gram). Measures were performed 5 min before IL-2 treatment and subsequent EPM testing (EPM 1), and were repeated 24 hours later 5 min before EPM 2 .

	PBS	IL-2		
		1 μ g	2.5 μ g	5 μ g
EPM 1	309.7 \pm 3.3	305.7 \pm 5.9	308.7 \pm 3.1	308.6 \pm 2.4
EPM 2	313.0 \pm 3.0	310.1 \pm 2.2	311.8 \pm 3.2	310.5 \pm 2.2

Artikel 3

The elevated plus-maze test: Differential psychopharmacology of anxiety-related behaviour.

C.R. Pawlak, B.D. Karrenbauer, P. Schneider, Y.-J. Ho

Emotion Review

(im Druck)

Emotion Review: *In Press*

The elevated plus-maze test: Differential psychopharmacology of anxiety-related behaviour

Cornelius R. Pawlak^{1,2}, Britta D. Karrenbauer³, Peggy Schneider⁴, Ying-Jui Ho⁵

¹ Department of Cognitive and Clinical Neuroscience
Central Institute of Mental Health
68159 Mannheim
Germany

² Institute of Psychology
University of Frankfurt/Main
60054 Frankfurt/Main
Germany

³ Department of Experimental and Physiological Psychology
Philipps-University of Marburg
35032 Marburg
Germany

⁴ Department of Psychopharmacology
Central Institute of Mental Health
68159 Mannheim
Germany

⁵ School of Psychology
Chung Shan Medical University
Tai-Chung City 402
Taiwan, ROC

Corresponding author:

Cornelius R. Pawlak, Ph.D.
Department of Cognitive and Clinical Neuroscience
Central Institute of Mental Health
J 5
68159 Mannheim
Germany
E-mail: cornelius.pawlak@zi-mannheim.de
Tel: +49 (0)621-1703-6302
Fax: +49 (0)621-1703-6305

Abstract

The role of individual factors in behavioural neuroscience is an important, but still neglected area of research. For example, the elevated plus-maze test has been one of the most used paradigms to gauge unconditioned aversively motivated behaviour in rodents. However, despite a great number of experiments with this test there have been only few efforts to assess systematic individual variations in the elevated plus-maze and related neurobiological functions. The present review aims to give, first, a general overview and introduction about the test, and second, an animal model of anxiety based on natural variance of plus-maze behaviour within a given unselected population of rats. Finally, critical aspects of such approaches in animal research are discussed, and suggestions are given where to go from here.

Key words: Individuality; Personality; Traits; Avoidance Behaviour; Anxiety; Fear; One-Trial Tolerance; Exploration Behaviour; High open arm (HOA); low open arm (LOA); Emotion; Motivation; Striatum; Basal Ganglia; Translational; Differential Psychopharmacology

The role of individual difference factors in behavioural neuroscience is an important, but still neglected area of research. One problem is the need for higher numbers of participants or subjects than the commonly used approach. Accordingly, research issues requiring many subjects (e.g., dose-response effects) are often neglected in favour of less laborious inquiries. In the last years, however, the necessity of an individual approach for research on biology/behaviour relationships has become more and more important (Mehta and Gosling 2008; Pawlak et al. 2008). Despite the progress in examining biopsychological processes in humans, behavioural neuroscience in animals remains indispensable. For example, do animals show substantial differences in behaviour, physiology, or pharmacological reactivity? What are the relationships between these parameters and how consistent are they? What are the key domains of individual behavioural differences that have physiological relevance? More importantly, can these domains predict a priori the outcome of experimental manipulations? To what extent do certain stable characteristics of the organism shape physiological outcomes, before and after experimental manipulations? Data on animal's individual behaviour and physiological functions could be important for the further understanding of psychiatric disorders by individual personality dimensions (Khan et al. 2005). It may be reasonable for personality researchers to accept animal research to tackle questions on personality that are difficult or impossible to address by human studies solely. Already Pavlov (summarised by Strelau 1997), Yerkes and Yerkes (1936), and Hebb (1949) have performed comparative studies of personality in animals. However, there is no uniform framework for comparative research specifying how animal studies can contribute to personality research (Gosling 2001).

The present review aims to give, first, a general overview and introduction about the elevated plus-maze test which is one of the most often used paradigm to gauge unconditioned avoidance/approach behaviour (Walf and Frye 2007). Second, we like to introduce the concept of an animal model of anxiety-like behaviour based on natural variance within a given population. Finally, critical aspects of such approaches in animal research are discussed, and suggestions are given where to go from here.

Rationale, set-up, procedure

Originally, a so-called symmetrically elevated Y maze was created for rats by Montgomery (1955). This test was further modified by Pellow et al. (1985) into what is now known as the elevated plus-maze. The assumption in this paradigm is that natural exploratory behaviour of rats is suppressed under certain conditions (e.g., elevation, open space) causing an approach-avoidance conflict. The elevated plus-maze is assumed to gauge unconditioned anxiety-like behaviour or, expressed in more specific behavioural terms, unconditioned avoidance behaviour, which has been extensively used as an animal model for anxiety. During a typical elevated plus-maze test, animals will actively avoid the open arms in favour of the closed arms. During a retest animals avoid the open arms more than during the first exposition, which may reflect a fear-like response. A corresponding apparatus was developed for mice by Lister (1987).

A typical rat maze has four arms arranged as a plus and is commonly elevated at a height of approximately 50 cm. The closed parts consist of two opposite arms provided with side walls (approximately 40 cm high) whereas the two opposite open arms have no side walls. All four arms have a length usually of 50 cm each, and a width usually of 10 cm. The middle section, that allows the animal to transit from arm to arm, consists of a square with dimensions usually of 10 x 10 cm. The apparatus is often made of grey plastic (sometimes the open arms do have opaque walls), or wood. The open arms can be modified to prevent animals from falling off, by a small raised edge surrounding the open arms, or a rough surface. The animal is then able to get a grip with its claws.

At the start of testing, the animal is placed in the middle section and is often released towards an open, or a closed arm. The animal may also be released between an open and closed arm (45° towards each arm), but regardless, the same procedure is used throughout a given experiment. The animal is then allowed to freely explore the elevated plus-maze for 5 minutes (sometimes 10 minutes or more have been used but this may have dramatic behavioural effects on successive trials, see below the paragraph on "one-trial tolerance effect"). The most important measure for anxiety-like/avoidance behaviour is either the relative time spent on open arms expressed as the percentage from the sum of open plus closed arm time, or the total open arm time. Also used measures include total open arm time and total open arm entries separately, or the ratio of the number of entries into the open arms relative to all arm entries. Open arm

time and open arm entries are usually highly correlated. In order to control for general activity, entries into the closed arms and entries into all arms are analysed (File 2001). Anxiolytic-like/approach activity is attributed to a given test drug if the animal prefers the open arms without changing the number of closed arm entries compared to controls (Weiss et al. 1998). The processes mediating such avoidance-approach behaviour are not clear, but it seems that either height and/or the open aspects of the arms may be critical (Fernandes and File 1996; File and Zangrossi 1993).

There are additional control issues to consider. When using a battery of tests, particularly if the tests are performed over a brief period of time, the sequence may be crucial. There is evidence that testing the animals in an open field (test paradigm which also evokes unconditioned aversive behaviour), or other apparatus, shortly before the elevated plus-maze produces different results (Rodgers and Cole 1993). Factors such as early handling of the animals (Andrews and File 1993), environmental enrichment (Santucci et al. 1994), or low illumination of the plus-maze (Garcia et al. 2005) can decrease anxiety-like/avoidance behaviour and thus change the reactivity to anxiolytic drugs (Hogg 1996; Kőks et al. 2001). Further, age, sex, environment, experience, and the experimenter can exert strong influences (e.g., Crabbe et al. 1999; Steimer and Driscoll 2005; Wahlsten et al. 2003). Finally, when tests are carried out at different times of the day/night cycle, there may be interference with circadian rhythms which would have to be taken into consideration (Andrade et al. 2003).

But interestingly, there have been reports from the present laboratory showing no substantial differences in total open arm times and other behaviours for rats tested in the elevated plus-maze (and open field) comparing daytime (e.g., Pawlak and Schwarting 2002) with nighttime (Bauhofer et al. 2004), or after transient isolated housing beginning immediately after weaning (Schwarting and Pawlak 2004). Finally, combined handling (i.e., picking up the animal) and gentling (i.e., gentle stroking to familiarise the animal with the experimenter more thoroughly than purpose-defined handling) did not affect open arm time or entries, but risk assessment (see below), in the elevated plus-maze (Borta et al. 2006). There is also other evidence showing that elevated plus-maze behaviour can also be relatively immune to certain test- or pretest conditions, including anxiogenic ones (Garcia et al. 2005; Vyas and Chattarji 2004), which may point at its usefulness to measure trait -rather than state- dependencies.

Conflict between approach and avoidance behaviour

The elevated plus-maze is a conflict test in which novelty produces both approach (open arm) and avoidance (closed arm), interpreted as curiosity and anxiety or caution, respectively (Handley and McBlane 1993). In a recent review, Carobrez and Bertoglio (2005) summarise that the shift from exploratory to avoidance/anxiety-like behaviour in the first trial occurs until the second minute, when roughly equal open and enclosed arm exploration are observed, suggesting novelty/curiosity as the main motivational stimulus during this phase. As the session continues, however, rats show a pronounced preference for the closed arms. This approach/avoidance conflict is generated when the animal encounters a novel situation that creates ambiguity between motivated exploratory behaviour and unconditioned anxiety-like/avoidance behaviour towards novelty (Ohl 2003). This is the reason why it is appropriate to assess the total time in separate bins. Anxiolytic drugs can shift the balance of this conflict from avoidance towards approach (Gray and McNaughton 2000). It is established that the increased tendency to avoid the open arms during minutes 3-5 can be prevented by anxiolytic drugs such as benzodiazepines (GABA_A receptor agonist). Conversely, the predominance of approach during the initial two minutes can be blocked by anxiogenic drugs, causing increased avoidance of the open arms.

The conflict between approach and avoidance behaviour is exemplified by the so-called 'risk assessment' when the animal behaves ambiguous in its approach towards the open arms of an elevated plus-maze which is discussed below. Risk assessment behaviour has been proposed to improve the validity of anxiety-like behaviour in addition to the open arm time (Carobrez and Bertoglio 2005).

Risk assessment behaviour

In potentially dangerous situations (e.g., when a predator has been seen but is no longer present), laboratory rats (Blanchard and Blanchard 1989) and mice (Blanchard et al. 1995) have been reported to engage in a cluster of behavioural actions collectively referred to as risk assessment. Rodgers et al. (1997) summarise that these responses, originally identified in specially constructed visible burrow systems, are characterised by cautious approaches to an area where a predator (e.g., cat) has briefly been presented. Risk assessment includes a) scanning the danger area from tunnel openings, b)

stretched attend, or flatback, postures directed towards the danger area, and c) stretched, or flatback, locomotion upon initial re-entry into the danger area (Rodgers et al. 1997). Very similar behaviour patterns have been observed in the rat defensive burying paradigm (another test of aversive motivated behaviour; Molewijk et al. 1995; Pinel and Mana 1989) and in mice exposed to conspecific odours (Garbe and Kemble 1994; Kaesermann 1986), supporting the idea that the pattern may be of functional importance. Thus, common risk assessment behaviour could reflect a comparable behavioural strategy in different potentially dangerous situations (Blanchard and Blanchard 1990; Blanchard et al. 1993).

Impulsivity

In spite of the emphasis on anxiety in the present studies (and in much of the literature) some data also point to another interesting and often neglected hypothesis: Rats with low avoidance behaviour may not simply be less anxious than high avoidance animals, but they may also be more impulsive, or novelty-seeking, as postulated in a behavioural model based on evidence with high versus low avoidance rats (summarised by Steimer and Driscoll 2003).

The relationship between anxiety-like/avoidance behaviour, impulsivity, and exploratory behaviour has also recently been reviewed by Carver (2005), who put this into the context of other theories (e.g., Strack and Deutsch 2004). His ideas draw heavily from the concept of Gray and McNaughton (2000) relating approach tendency and impulsive action: They suggest that 1) the weaker the approach tendency, the lower is the likelihood of impulsive action, and 2) the stronger the approach tendency, the greater is the probability of impulsive action. In the presence of threat or novel cues, however, the behavioural inhibition system becomes active, generating anxiety and behavioural inhibition of ongoing approach. In terms of individual differences, a reactive behavioural inhibition system presumably permits little impulsive behaviour. In contrast, low sensitivity of behavioural inhibition allows approach to be expressed more frequently.

According to Carver (2005), discussions of impulsive action typically focus on impulsiveness to be relevant only to approach. However, impulsivity could also be viewed as equally important to aversion. Humans and animals alike probably vary in

how impulsively versus deliberately they act to avoid or withdraw from threats. Carver (2005) suggests to examine these possibilities, research investigating reactive control and effortful control must examine contexts in which the focus is on avoidance of threats, not just approach of incentives.

There is evidence that impulsive behaviour is indicated by high open arm time percentage and high open arm entries in relation to total arm time and arm entries (Ueno et al. 2002). Moreover, prenatal protein malnutrition increased exploratory behaviour of the open arms of rats from both sexes in the elevated plus-maze (Almeida et al. 1993, 1996). These results could also be interpreted as higher impulsiveness; that is, prenatal malnutrition could lead to deficits in behavioural inhibition resulting in increased exploration of open arms in the elevated plus-maze (Almeida et al. 1993, 1996). Supporting this view, perinatally malnourished rats exhibit more errors at adult age in a procedure of differential reinforcement of low response rates. This suggests that the rats have problems inhibiting operant responses for food/water reward (Brioni and Orsingher 1988).

However, there is also evidence contrary to the idea that increased impulsivity is related to higher approach behaviour, that is, to spending more time in the open arms. Contrary to the assumption that impulsivity is dominant in the expression of elevated plus-maze behaviour, Binder et al. (2004) observed after four weeks of voluntary exercise that mice appear to exhibit decreased anxiety-like/avoidance behaviour in the elevated plus-maze (i.e., more open arm time) but also decreased impulsiveness (e.g., a longer latency to enter the centre of an open field) in various behavioural tests. These results are in contrast to the view that increased impulsivity is associated with reduced anxiety in the elevated plus-maze (i.e., more open arm time). Further evidence for a dissociation of anxiety and impulsivity in rodents stems from a series of studies by Petitto et al. (1993, 1994). They found that selectively bred low aggressive mice as opposed to selectively bred high aggressive mice did not result in differences in the elevated plus-maze. Interestingly, the authors characterised the low aggressive mice as "socially inhibited" (Petitto et al. 1993, 1994), therefore suggesting no relationship between impulsivity and anxiety-like behaviours.

To summarise, it is important to elucidate the potential role of impulsivity, and to disentangle possible relationships with the different types of anxiety and fear with

respect to elevated plus-maze behaviour. As long as the concept of impulsivity has not been better understood one cannot fully rule out that impulsive behaviour also plays a role in the elevated plus-maze. However, there is little, and even controversial, data on impulsivity in the elevated plus-maze, but there is substantial evidence for anxiety-related behaviour in this test.

Anxiety and fear as two distinct behavioural systems

Personality researchers nowadays have acknowledged that anxiety and fear are two distinct behavioural systems (Depue and Lenzenweger 2005; Gray and McNaughton 2000; McNaughton and Corr 2004). The theoretical categorical distinction between fear and anxiety derives from detailed analyses of defensive responses and their regulation in animals explaining the pattern of associations between emotion and defensive behaviour in terms of the differing functional demands arising from cautious approach to threat (anxiety) versus departure from threat (fear) (e.g., Blanchard and Blanchard 1988; Graeff 1994). Evidence for this differentiation also stems from a translational model of fear and anxiety in humans (Perkins et al. 2009).

For example, the studies of Depue and Lenzenweger (2005) argue for the independence of anxiety and fear within the literature on personality traits, showing that the relationship between neuroticism (anxiety) and harm avoidance (fear) is approaching zero. Additionally, one of the most reliable indices of conditioned fear in animals is behavioural inhibition (Davis et al. 1997; Panksepp 1998; Phelps and LeDoux 2005), which is not the case for stimulus-induced anxiety-like behaviour (Davis et al. 1997). In parallel, other personality psychologists (Tellegen and Waller 1992), behavioural neuroscientists (e.g., Andreatini et al. 2001; Deakin and Graeff 1991; Graeff et al. 1996) and clinical psychologists (e.g., Barlow 2002; Yehuda and Hyman 2005, but see Marks and Nesse 1994) also postulate that anxiety and fear are different emotions.

A clear distinction between fear and anxiety has been postulated by Gray and McNaughton 2000, and McNaughton and Corr 2004, which had not been evident in the initial theory (Gray 1982). The authors postulate that "fear has the function of moving the animal *away* from danger" (McNaughton and Corr 2004, p 286) resembling the defensive avoidance system, whereas "in an approach-avoidance conflict situation, anxiety has the function of moving the animal *toward* danger" (McNaughton and Corr

2004, p 286) resembling the defensive approach system, suggesting that the defensive direction is the critical factor. Conversely, McNaughton and Corr (2004) critically comment that the differentiation between fear and anxiety is not dependent on the conditioned or unconditioned nature of the stimuli (see the literature for the defensive burying test first reported by Pinel and Treit 1978). The fear system is insensitive to anxiolytic drugs, while anxiety involves inhibitory behaviour, and enhanced risk assessment. Accordingly, the core features of anxiety are sensitive to anxiolytic drugs, which also enhance exploration behaviour and novelty-seeking.

For example, approach to threat corresponding to anxiety (e.g., open arm approach) and avoidance of threat corresponding to fear (e.g., open arm avoidance) can be typically observed in an elevated plus-maze. This view is similar to Depue and Lenzenweger (2005), who claim that behavioural inhibition will not allow the individual to explore the environment to discover if the situation is threatening. Thus, increased attentional scanning of the uncertain surrounding, and cognitive worrying about possible outcomes may resolve the uncertainty when a rat enters an open arm: Caution, slow approach, heightened attentional scanning, and enhanced cognitive activity are optimal, whereas freezing is not. In contrast, in the case of fear conditioned stimuli, the motor response is not escape, but rather freezing or behavioural inhibition (LeDoux 2000; Phelps and LeDoux 2005).

The "one-trial tolerance effect"

One yet unresolved feature of testing with the elevated plus-maze is the "one-trial tolerance effect". This phenomenon refers to the partial, or even total, disappearance of the anxiolytic-like effects of benzodiazepines if an animal is tested twice in the elevated plus-maze (File 1990). There is a marked neurochemical distinction between trial-1 versus trial-2 (inter-test interval ranging between 24 hours to 2 weeks). Benzodiazepines exert pronounced anxiolytic-like/approach effects to the elevated plus-maze when administered before a first exposure (trial-1) of undrugged rats and mice. However, it has been shown that mice and rats with previous experience of the elevated plus-maze show a reduced, or even absent, anxiolytic-like/approach response to benzodiazepines (File 1990; File et al. 1990, 1993; Gonzalez and File 1997; Lister 1987; Pereira et al. 1999; Rodgers and Shepherd 1993; Rodgers et al. 1992). This tolerance appears to be

general to tests other than the elevated plus-maze like the light-dark box, which typically tests the non-forced transition behaviour from a dark, narrow, and closed box to a bright, and open space (Rodgers and Shepherd 1993). In contrast, responses to serotonergic manipulation become also prominent on trial-2 (File et al. 1992).

File et al. (1993) found that the measures of anxiety-like/avoidance behaviour derived from trials-1 and -2 in the elevated plus-maze load on two independent factors, that is, two distinct states of anxiety-like/avoidance behaviours are generated on the two trials and this has been confirmed in mice (Holmes and Rodgers 1998). The lack of anxiolytic-like effects of benzodiazepines in trial-2 is suggested to reflect the inefficacy on fear which predominates behaviour in trial-2 (Cruz-Morales et al. 2002). In trying to understand the effects it seems that the open aspect of the arms is important in controlling behaviour on trial-1 (Treit et al. 1993), whereas it may be the elevation that is most critical on trial-2 (Fernandes and File 1996).

The loss of the anxiolytic-like action of benzodiazepines on trial-2 occurs only when the trials last the typical 5 minutes. When the trials are longer (i.e., 10 minutes on each trial), however, benzodiazepines retain anxiolytic-like/approach efficacy (File et al. 1993). The open question remains then is why benzodiazepines retained anxiolytic-like/approach efficacy when prolonged exposure to the aversive phobic should have already increased anxiolytic-like/approach behaviour to the open arms? This raises the possibility that the second form of avoidance behaviour (i.e., phobia) rapidly extinguishes with further exposure to the elevated plus-maze. This rapid extinction is consistent with the possibility that trial-2 behaviour in the elevated plus-maze represents a fear-like state to heights since phobias do diminish as a result of exposure to the phobic situation (Marks 1987). In addition, it is also known that benzodiazepines are not helpful when treating specific phobias in patients. Therefore, a prolonged exposure to the elevated plus-maze may finally end the specific phobia, but again exhibits differences in anxiolytic-like/approach behaviour as during the first plus-maze test. In addition, Frussa-Filho and Ribeiro (2002) showed that previous exposure to a four-enclosed-arm elevated plus-maze induced the phenomenon of one-trial tolerance, whereas previous exposure to a four-open-arm apparatus did not. Therefore the authors hypothesise that the phenomenon of one-trial tolerance is not due to the acquisition of a phobic avoidance of open arms but to the discovery and exploration of relatively safe

places such as the closed arms (Frussa-Filho and Ribeiro 2002). Other hypotheses regarding the resistance to pharmacological substances to anxiolytics with elevated plus-maze retesting are summarised in Carobrez and Bertoglio (2005). For example, the one-trial tolerance phenomenon can be prevented when changing the context between trials: Rodents continue to display an anxiolytic-like profile in response to drugs on the elevated plus-maze trial-2 when a new motivational conflict situation (e.g., light and hot air blow, Pereira et al. 1999; food and water deprivation for 24 hours, or introduction of a novel object in the open arm, Andreatini et al. 2003) is introduced in the test. Our group is currently systematically testing an extension of such preliminary evidence by neither depriving the animals nor manipulating the plus-maze apparatus as such to avoid the one-trial tolerance effect (Schneider et al. in preparation).

Psychopharmacology and neuroanatomy

A bewildering array of neurotransmitters, peptides, hormones and other chemical messengers have been discussed and suggested as potential modulators of anxiety in humans and animals (review by Millan 2003). It is beyond the scope of the present work to report evidence for all of these substances. Antidepressants, neuroleptics, and stimulants show different and incoherent effects (reviews by Pellow et al. 1985; Rodgers et al. 1997). Until now, sensitivity to anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze appears to be limited to benzodiazepine/GABA-related compounds (review by Borsini et al. 2002), although far less work has been done on chronic administration of antidepressants in anxiety models as such, including the elevated plus-maze. According to Borsini et al. (2002), acute or chronic administration with antidepressants acting on noradrenergic and dopaminergic mechanisms showed no effects.

There is an increasing number of studies dealing with the neuroanatomy of elevated plus-maze behaviour and relevant neuroanatomical areas and tissues. The structures considered to be most relevant are the raphe nuclei (e.g., Canto-de-Souza et al. 2002), hippocampus (e.g., Nunes-de-Souza et al. 2002), and amygdala (e.g., File et al. 1998). However, recent work suggest the involvement of other tissues than the limbic system for anxiety-like/avoidance behaviour in the elevated plus-maze such as the striatum (e.g., Schwarting et al. 1998; Pawlak et al. 2003; Pawlak and Schwarting 2006a, see discussion below), the bed nucleus of the stria terminalis (e.g., Wigger et al.

2004), septum (e.g., Liebsch et al. 1996) as well as the (medial) prefrontal cortex (e.g., Pawlak et al. 2005; Schwabe et al. 2006).

Validity

The translational value of animal research is an often neglected area in basic and pre-clinical research. Thus, it is of crucial importance to determine criteria for animal research that are comparable with human conditions. For example, in all animal models for psychiatric conditions three types of validity have been suggested, namely predictive, face, and construct validity (e.g., Pawlak and Weyers 2006; Rodgers 1997; Treit 1985; Willner 1986; Willner and Mitchell 2002). This framework shall be briefly introduced.

Predictive validity denotes the evaluation of drug effects in animal models resembling effects in the clinic, or as Willner (1984) puts it, the performance in a given test predicts the performance in the modelled condition. The predictive validity of the elevated plus-maze is good with regard to the effectiveness of benzodiazepine/GABAergic drugs, but inconsistent evidence has been shown for various neuropeptides and serotonergic drugs. However, recently there have been a number of promising studies with chronic treatment showing that not only GABA but also 5-HT can alter behaviour which resembles treatment modulated behaviour of anxiety disorders (Fedotova et al. 2004; Motta et al. 1992; Silva and Brandão 2000). Aforementioned, central neuroanatomical areas of the limbic system are involved in both animals and humans.

Face validity denotes the phenomenological similarity between the animal model and its disorder (Abramson and Seligman 1977; McKinney and Bunney 1969; Willner 1984), or at a minimum draws comparisons of such behaviour to non-pathological conditions of anxiety-like/avoidance behaviour.

Construct validity denotes the evaluation of the theoretical rationale of an animal model (Willner 1984). For example, Willner (1986) argues that human behaviour and animal behaviour should be based on comparable psychological and neurobiological mechanisms. Construct validity should also take into account principles of the aetiology of a disorder. There are still a number of unresolved questions relating to construct validity of the elevated plus-maze as a model for anxiety and phobia disorders. For example, it is not clear to what extent the elevated plus-maze can be used to gauge

behaviour to model specific human disorders. There are suggestions that the first trial with naive animals is a model for generalised anxiety or panic, whereas the second test 24 h later could be a model for specific phobia (e.g., Fernandes and File 1996; File et al. 2000; File and Zangrossi 1993). With respect to statements regarding the specificity of the elevated plus-maze Borsini et al. (2002) postulated inevitable experiments with chronic drug treatments that mimic the clinical aspects more closely (this need is also evident for basically all other animal models of anxiety). Recently, there have been approaches increasing in numbers showing promising results. For example, the 5-HT_{1A} receptor agonist gepirone showed acute anxiogenic but chronic anxiolytic effects (Silva and Brandão 2000).

It needs to be noted that the present review is not intended to be exhaustive and there are possibly more anxiety/avoidance tests that resemble the elevated plus-maze paradigm. Nonetheless, the validation of these recent alternative developments is still fragmentary and needs more research. Thus, the elevated plus-maze remains the most applied test for unconditioned avoidance behaviour. It is likely to remain the main paradigm, at least in the near future.

Individuality in animal models

Typically, animal researchers attempt to avoid variance in their outcomes. Deviations from homogeneous results, or even outliers, are to be avoided, omitted, or at best are tolerated in the final reports. However, for a number of decades it has been the aim of several research groups to take advantage of large variances in animal research and to scrutinise such variability systematically. To do so, it is important to establish methodologies to assess behavioural traits in animals and to differentiate between conspecifics of a given species. "Trait" is defined here as a pattern of a specific behaviour, which differs between individuals, but which is relatively constant within subjects over time and situations (Amelang et al. 2006). This term is usually used in animal behavioural research instead of "personality" in humans.

There is a wide range of animal behaviours suggested to reflect personality dimensions in humans such as, for example, avoidance behaviour in chimpanzees (Yerkes and Yerkes 1936), neuroticism in horses (Morris et al. 2002), nervousness in response to other animals in chickens (Hasuo 1935), response to females in newts

(Halliday 1976), exposure to a mirror and aggression in the midas cichlid (Francis 1990), assertiveness in the spotted hyena (Gosling 1998), dominance behaviour in baboons (Sapolsky and Ray 1989), or social ability in rhesus monkeys (Capitanio 1985), among others. Probably the most studied dimensions of individual differences of behaviour in animals, however, relate to anxiety, activity, and exploratory behaviour (excellent reviewed by Gosling 2001).

Approaches to assess systematic variability in animals

Mice and rats are the major experimental animals in the field of behavioural neuroscience, and various approaches have been pursued to analyse dimensions of anxiety and exploratory behaviour. They extend from systematic behavioural differences in normal animals (i.e., not specifically bred for trait behaviour) to the recently established genetic models. There are at least four methodological approaches when analysing individual behaviour of a cohort. First, a simple and effective approach is to correlate values of individuals on two dimensions which provide information about the extent of a relationship between individuals (e.g., avoidance behaviour and corticosterone in the blood). For example, primarily cortisol is produced by humans, while in rodents mainly corticosterone is secreted from adrenal glands. Second, a cohort of animals is exposed to a behavioural test. The individuals are then divided into at least two subgroups according to their behaviour (e.g., high and low open arm time), that is, using a median split, or extreme groups of a given population (e.g., upper and lower quartiles). Subsequently, additional assays of various types are performed. Third, selective breeding for behavioural dispositions has been carried out scientifically since the first half of the 20th century. There, the most common behavioural dimensions were lines bred for learning and memory experiments, psychomotor activation, addiction models, and emotionality. The fourth approach consists of the comparison of different strains (genetic variation minimised by inbreeding) of mice or rats, as well as inbred strains versus outbred stocks (genetically heterogeneous by crossing two or more strains), and finally of genetically manipulated animals.

The advantages of an individual-oriented approach of animal behaviour are various. First, variance between individuals can be systematically reduced or at least explained. Second, systematic relationships between different behaviours or between

behaviour and biological functions can be measured more closely. Third, behavioural screening can be used for the prediction of pharmacological or behavioural reactivity in other tests. Fourth, differential animal behaviour, with state or trait characteristics, can also be applied to analyse the susceptibility to disease models. Fifth, the approach makes it feasible to determine an array of behaviours in a broad range of species that resemble human personality dimensions; this then allows one to draw comparisons between animals and humans (Gosling 2001). The various reasons for the expression of individual differences, even in genetically identical animals, are summarised elsewhere in an overview by Lathe (2004), but are not the focus of the present studies.

It is commonly accepted that animal models make use of 'selective' breeding for a specific trait. However, there has been no uniform term coined denoting animals stemming from a given sample population. Some authors have used the term 'normal' as a means to filter outliers from sample populations based on the presence of strongly deviant behaviour (Karl et al. 2003). But this term may not fully account for the rat models introduced here, although this term is also often used to denote animals that are naive to behavioural tests and pharmacological manipulations. Other terms such as 'intact' or 'healthy' are also in use. However, they are more restricted and lay the focus more on health-related issues. One needs to be cautious as such terms require A) definitions of the terms 'healthy' and 'intact', respectively, and B) subsequent extensive health monitoring, which not all laboratories are capable of. For the rats used here, it would not be possible to know if they were all 'healthy' or 'intact' until the end of the experiments, although for example the weight of the rats provides a crude evaluation of the health status. The term 'unselected' may also appear somewhat misleading since the rats used in given approaches have usually been selected for sex, age, stock, and breeder. Nonetheless, the term 'unselected' appears to be the most appropriate expression since it basically comprises all individuals from a sample population, without making assumptions about their health status ('healthy', 'intact'), or claiming that they are 'normal'.

In the following section the most comprehensive systematic approach of unconditioned anxiety-like/avoidance behaviour based on unselected rodents tested in an elevated plus-maze will be introduced. Even more, to the best of our knowledge, this

is the first systematic differential approach with unselected animals (i.e., not specifically bred for trait behaviour) on anxiety-related behaviour.

Anxiety-like/avoidance behaviour in unselected animals: High (HOA) and low open arm (LOA) rats

One approach to systematically analyse variance in an unselected cohort of male rats has been successfully employed for elevated plus-maze behaviour in our laboratories (Pawlak and Weyers 2006; Pawlak et al. 2008; Schwarting and Pawlak 2004). All animals used in the studies described below were unselected, young adult (approximately 8 to 9 weeks old at arrival in the laboratory), male, outbred, Wistar Unilever rats generated by Harlan Winkelmann, Germany. Before experimental manipulations, the animals are divided by a median split upon their first exposure to the apparatus into those that spend less time on the open arms (LOA, that is, they show *more* anxiety-like/avoidance behaviour), and those that spend more time on the open arms (HOA, that is, they show *less* anxiety-like/avoidance behaviour).

First of all, significant retest reliability for a period of 24 hours or 120 days provides evidence for a relative stability of this dimension (Schwarting and Pawlak 2004; Fig. 1). The HOA Wistar rats showed less avoidance behaviour of aversive objects in the unconditioned object burying test (Ho et al. 2002; Fig. 2) and faster active avoidance learning in a shuttle box (Ho et al. 2002). In comparison to LOA rats, they also showed less freezing behaviour in a standard fear conditioning paradigm on the conditioning and test day, respectively (Borta et al. 2006; Fig. 3). These differences seem not to be due to pain reactivity (Borta and Schwarting 2005a). Finally, LOA and HOA rats did not differ regarding immobility in the forced swim test, an animal model related to depression (Ho et al. 2002).

These results suggest that the performance of active coping behaviour might be different between LOA and HOA rats in escapable stress, but not of passive coping in inescapable stress (forced swim test). This indicates that the individual anxiety-like/avoidance level has certain correlations with the ability to cope with environmental challenges. Furthermore, there are indications for positive correlations between ultrasound vocalisation of pups and their adult behaviour in an elevated plus-maze: Pups which utter more ultrasounds during separation spent more time on the open arms

as adults, that is, they showed less anxiety-like/avoidance behaviour (Schwartz and Pawlak 2004). When these subgroups were tested in a standard fear conditioning paradigm, adult LOA rats now emitted more calls, and with higher peak frequency, than their HOA counterparts (Borta et al. 2006). On the subsequent testing day, ultrasound call differences between groups were no longer detectable (Borta et al. 2006).

Interestingly, behaviour of all studies except one (Borta and Schwartz 2005a) consistently showed no relationships between anxiety-related profiles in an elevated plus-maze and vertical psychomotor activation (rearings) in a novel open field, performed in different laboratories, with different experimenters, and with different animal providers (Borta and Schwartz 2005b; Ho et al. 2002; Pawlak and Schwartz 2002; Schwartz et al. 1998; Thiel et al. 1999).

Concerning pharmacological reactivity, differences following a single systemic injection of the amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") 15 days after drug treatment became evident during active avoidance learning. There was a significant interaction between treatments and subgroups, since the number of avoidances in vehicle-treated LOA rats was lower than in vehicle-treated HOA rats. Furthermore, MDMA-treated HOA rats showed less avoidance behaviour than vehicle-treated HOA rats (Ho et al. 2004; Fig. 4). A more recent study (Ludwig et al. 2008) showed that HOA and LOA rats also responded differently to a regimen of repeated MDMA treatments. Additionally, HOA rats showed higher phasic rectal body temperature following handling stress (Ho et al. 2004).

Analyses of post mortem neurochemistry revealed relationships between open arm time in an elevated plus-maze and 5-HT in the brain. LOA animals had lower tissue levels of 5-HT in the ventral striatum but not in other brain areas (Schwartz et al. 1998; Fig. 5). Furthermore, there were no differences between the two LOA and HOA groups of animals with respect to noradrenaline or dopamine levels (Schwartz et al. 1998). Differences were obtained on neuroimmunological levels showing that LOA rats had higher striatal (i.e. striatum), and less prefrontal IL(interleukin)-2 mRNA (messenger ribonucleic acid) - but not IL-1 β , IL-6, and TNF- α mRNA - compared to HOA rats (Pawlak et al. 2003; Pawlak et al. 2005; Fig. 6). These results indicate that the relationship between anxiety-like/avoidance behaviour, and central cytokines is site- (striatum, prefrontal cortex), and cytokine-specific (IL-2 mRNA). Subsequent striatal

microinjection studies supported the otherwise correlative link between IL-2 and anxiety-related behaviour (Pawlak and Schwarting 2006a,b; Karrenbauer et al. 2009). In addition, anxiety-like/avoidance levels in half of a female rat sample were increased by ovariectomy. After chronic treatment with dioscorea, a Chinese medicine, a decrease in anxiety-like/avoidance behaviour and IL-2 levels in the cerebral cortex was observed in the LOA ovariectomised rats, whereas administration of dioscorea increased anxiety-like/avoidance behaviour and IL-2 levels in the prefrontal cortex in HOA ovariectomised rats (Ho et al. 2007).

Our laboratory recently analysed dyadic social interaction behaviour of HOA and LOA rats. During the test of two rats an increase in social interaction is interpreted as anxiolytic-like behaviour. Our results showed that the most frequent behaviour, that is, non-anogenital sniffing, was substantially higher for HOA/HOA dyads on (Schneider et al. 2008). Then, we tested the effects of a single systemic IL-2 injection on differential social interaction behaviour in relation to HOA and LOA traits. The results showed treatment effects of IL-2 treated LOA rats on social interaction behaviour compared to vehicle injected LOA animals. Additionally, we found a tendency of IL-2 treated HOA rats to show overall more social interaction than LOA animals (Schneider et al. 2009).

D-cycloserine, a partial agonist of glycine binding site on *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors, was found to suppress the immobility in the day-2 trial of the forced swim test in LOA rats (Wu et al. 2008; Fig. 7). In parallel, post mortem analyses showed that LOA but not HOA rats had increased levels of phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase1/2 (p-ERK1/2) in the amygdala following D-cycloserine treatment (Wu et al. 2008; Fig. 7). These findings indicate different sensitivities of p-ERK1/2, IL-2, and behavioural responses to the treatment of D-cycloserine between HOA and LOA rats, suggesting that the activity of NMDA receptor-mediated ERK1/2 signaling and cytokine (IL-2) function in the brain are related to individual behavioural differences of anxiety.

Taken together, the HOA and LOA Wistar rats can be distinguished in a number of behavioural paradigms, psychopharmacological reactivity, neurochemistry, and physiology. Our approach takes advantage of the fact that there are existing systematic stable natural variances that may resemble conditions of a wide spectrum of behaviours and their related physiology. We suggest this approach to be particularly suitable to

display a continuum of a population, including extremes on both ends, rather than following a rigid selective dichotomy because our results often also showed substantial individual correlations between parameters when analysing all animals of a given sample.

How does our approach interface with theories of anxiety?

The basal ganglia system contains several nuclei, and some of them are often labeled inconsistently, which is partly due to the type of species under study. One part of this brain system is the striatum, which consists of a dorsal (upper) and a ventral (lower) part. Here, the terms striatum, which consists of the dorsal and ventral striatum will be used.

The potential role for cytokines, especially IL-2, was discussed above. But what is still not clear how these actions of IL-2 in the striatum and behaviour fit into existing theories of aversive emotions. The theory of anxiety by Gray and McNaughton (2000) and McNaughton and Corr (2004) postulates behavioural (i.e., fear and anxiety) and neurobiological distinctions between panic (periaqueductal grey), phobia (hypothalamus/amygdala), and anxiety (amygdala/septo-hippocampal system). According to them, neural control of fear relative to anxiety is more elaborated at lower levels of the neural system, whereas anxiety is considered to be relatively more elaborated at higher brain levels (see above). The anxiety-like/avoidance effects of IL-2 in the striatum (Pawlak and Schwarting 2006a; Karrenbauer et al. 2009), and the frontal-striatal relationships between these neuroanatomical areas and IL-2 and anxiety-like/avoidance behaviour (Pawlak et al. 2003, 2005) appear to fit since the prefrontal cortex also plays a critical role in complex anxiety such as social anxiety (Gray and McNaughton 2000). However, in the theory by Gray and McNaughton (2000) the striatum is not critically involved in anxiety-like/avoidance behaviour. This points to a role for the striatum in this emotional behaviour that is still unknown.

The striatum does also not play a critical role in the theory of aversive mood and emotion by Depue and Lenzenweger (2005), and Cloninger et al. (1993). Specifically, the striatum is not considered to be a critical site for anxiety (e.g., Letwin et al. 2006), fear (e.g., Calder et al. 2001), or panic. In addition, cytokines, aside from IL-2, do not play a role in any of these theories. Thus, classical personality theories and empirical

evidence do not address the combination between cytokines and anxiety in the striatum. Rather, the striatum (and particularly the nucleus accumbens within the ventral part of the striatum) is conceived to be involved in the realisation of motivation into action. Until now the nucleus accumbens is often seen of as a well-defined anatomical nucleus that is specialised to transfer limbic activities to the motor system. This is not at all unusual, since practically all major brain regions involved in emotional and motivational functions have a more or less direct relation to motor structures in the brainstem. Recent studies of connections, chemoarchitecture, and development of the basal forebrain of amphibians have revealed that mammalian and nonmammalian vertebrates share a common pattern of basal ganglia organisation (Smeets et al. 2000).

The basal ganglia as a whole are not viewed as important for the *feeling* of anxiety, fear, or panic, but for the execution of moving away or towards danger. The only anxiety-related psychiatric condition that is consistently suggested to be related to the striatum is obsessive-compulsive disorder (e.g., Graybiel and Rauch 2000; Stein and Stahl 2000). Dysfunction of frontal-striatal, particularly orbitofrontal-striatal, circuitry has been implicated in the pathophysiology of obsessive-compulsive disorder independent of state anxiety and disease symptom severity (van den Heuvel et al. 2005a). However, there are now even studies showing local microcircuits in the nucleus accumbens mediating motivated/affective behaviour that is bivalently organised with negative and positive valence along rostrocaudal gradients (Reynolds and Berridge 2002). Some resemblance to the present data stems also from depression research (e.g., reviewed by Dantzer et al. 2008; Raison et al. 2006; Wichers and Maes 2002).

In addition to previous studies (Reiman et al. 1989; Richard et al. 1996; Wu et al. 1991), there are a number of very recent studies in rodents and humans that point to a role for the basal ganglia, especially for the striatum, in anxiety. The fact that the elevated plus-maze is considered as a model for anxiety and possibly learned phobic behaviour when animals are tested again (see chapter on the elevated plus-maze) indicates the importance of the present results and related evidence recently published by other groups. Anxiety-like/avoidance behaviour in animals was found to induce distinct patterns of activation of the immediate-early gene *c-fos* in the brains of high and low responding rats following a 5-minute exposure to an anxiogenic stressor (light-dark box). When compared to low responders, high responding rats showed high *c-fos*

mRNA levels in the dorsal striatum (Kabbaj and Akil 2001). C-fos is used as an indirect marker of neuronal activity because it is often expressed when neurons fire action potentials, and it indicates recent activity. Furthermore, anxiety-like/avoidance behaviour in an open field shown by higher centre avoidance and corner preference in Connexin30-deficient mice was related to lower dopamine and metabolite levels in the ventral striatum (Dere et al. 2003). Connexin proteins allow region-specific and cell-type dependent intercellular electrical and metabolic communication.

The results of Weintraub et al. (2005) suggest an inverse correlation in patients with Parkinson disease compared to healthy controls with regard to the severity of depression and anxiety symptoms correlated with basal ganglia decreased dopamine function, specifically with regard to the left anterior putamen. They also found a substantial correlation between depression and anxiety, suggesting a common neurobiologic basis for these symptoms. If so, then it is possible that a given treatment may be effective for both symptoms. This would be consistent with existing research in patients without Parkinson disease showing that newer antidepressants have both antidepressant and anti-anxiety effects (Tollefson and Rosenbaum 1998). A recent review on the aetiology and neurobiology of social anxiety disorder indicated that neuroanatomical areas implicated in social anxiety disorder include also the striatum (Mathew and Ho 2006). This is in line with Sareen et al. (2007) who examined whether patients with generalised social phobia had differential activation in striatal regions compared with healthy controls while engaged in a cognitive task that has been shown to activate striatal regions. The generalised social phobia and healthy comparison participants were not different from each other in their test performance. However, patients with generalised social phobia showed reduced neural activation related to implicit learning compared with healthy comparison participants in the left caudate head assessed by functional magnetic resonance imaging (Sareen et al. 2007). These results are supported by Lorberbaum et al. (2004) who observed that patients with generalised social phobia as opposed to healthy controls showed greater striatal activity in addition to other brain areas, during anticipation of a public speech.

High scores on two anxiety-related personality scales, somatic anxiety and muscular tension, were significantly associated with low presynaptic dopamine synthesis capacity in the caudate in healthy participants (Laakso et al. 2003). In addition, abusers

of methamphetamine provided higher self-ratings of depression and anxiety than control subjects and showed higher relative regional glucose metabolism in the ventral striatum amongst other brain areas (London et al. 2004).

Interesting, although contrary, data are also now available for fear and striatal functions. Rats lesioned in the dorsal striatum were not impaired in contextual fear conditioning but in tone fear conditioning. Both electrolytically and neurotoxically lesioned animals showed less freezing behaviour compared with controls (Ferreira et al. 2003). In contrast, the group of Kandel did not show that the striatum is involved in learned safety by negatively correlating auditory conditioned stimuli with aversive events (Rogan et al. 2005). In addition, there were no differences found between contextual- or tone-cued conditioning fear responses of mice with selectively ablated cholinergic neurons in the striatum (Kitabatake et al. 2003). Finally, in an individual approach taken by Schenberg et al. (2006), rats were exposed to a contextual fear conditioning task and were then classified as high or low responders according to performance. Out of 52 analysed brain regions, NR2A gene expression was higher only in the dorsal striatum of low-performance rats, while no differences were shown in any of the other brain areas, or for NR2B.

Recently, van den Heuvel et al. (2005b) investigated functional neural correlates and disease specificity of attentional bias across different anxiety disorders (e.g. panic) with a cognitive and emotional stress test (Stroop test). Their results suggest increased distractibility by irrelevant information in patients with panic disorder as compared to controls and this seems to involve ventral and widespread dorsal striatal brain regions.

Finally, in a series of fMRI (functional magnetic resonance imaging) experiments with healthy individuals aversive conditioning using unpleasant cutaneous electrical stimulation was shown to reliably activate the ventral striatum (Jensen et al. 2003). This activation was observed during anticipation and was not a consequence of relief after the aversive event. Further, the ventral striatum was activated in anticipation regardless of whether there was an opportunity to avoid the aversive stimulus or not. These data are supported by Hasler et al. (2007) who found that there are distinct neuronal networks involved in cued fear (e.g., bilateral putamen) and contextual anxiety (bilateral ventral striatum). Even more so, there is accumulating evidence supporting the role of

the striatum for aversive outcomes (Schiller et al. 2008). Although striatal activation has been observed in aversive learning paradigm in humans (Jensen et al. 2003), and animals (Horvitz 2000; Schoenbaum and Setlow 2003), the role of this region in aversive learning is only beginning to be understood in normal and pathological aversive states. For example, it was demonstrated that regional activity in frontolimbic and striatal areas increased significantly and connectivity among limbic and striatal networks was attenuated in participants who had recently experienced severe emotional trauma (Lui et al. 2009).

Suggestions for future research

At first sight, the elevated plus-maze appears to be thoroughly characterised and effective for understanding clinically relevant problems, but a number of issues remain to be addressed. One stems from the lack of sufficient studies on longterm effects of drugs. Another issue concerns a need for more precise validity of the elevated plus-maze for human disorders as postulated in general for animal tests by Willner (1991), and Willner and Mitchell (2002). In the future, the individual approach to study behaviour of laboratory animals has to play a more important role than before. Thus, the introduced animal model of differential anxiety-like/avoidance behaviour provides one critical method to develop a much needed individualised approach to the treatment of psychiatric disorders (Pawlak et al. 2008), and other diseases (Woodcock 2007).

It may also be necessary to develop further animal models to examine hitherto unknown relationships concerning cognitive influences on emotional behaviour that have not been systematically addressed in rodents. Recently, such approach was established by a new ambiguous-cue interpretation paradigm and, with respect to the aetiology of depression, evaluated if environmental and genetic factors contribute to a negative bias (Enkel et al. 2010). Rats were trained to press a lever to receive a food reward contingent to one tone and to press another lever in response to a different tone in order to avoid punishment by electric foot-shock. In the ambiguous-cue test, the lever-press responses to tones with frequencies intermediate to the trained tones were taken as indicators for the rats' expectation of a positive or negative event ("glass half empty or half full?"). A negative response bias due to decreased positive and increased negative responding was found in congenitally helpless rats, a genetic animal model of

depression (Henn and Vollmayr 2005). Moreover, treatment with a combined noradrenergic-glucocorticoid challenge, mimicking stress-related changes in endogenous neuromodulation, biased rats away from positive responding. This response shift was accompanied by neuronal activation in dentate gyrus and amygdala (Enkel et al. 2010).

As was ingeniously demonstrated by Enkel et al. (2010), animals alike to humans do not react in the same manner to an identical stimulus taking cognition into account. It is therefore a must to distinguish between individual subjects, and to select subgroups of animals in a given population that are particularly reactive and are thus readily transformed in different emotional states than animals that are less responsive to external stimuli. These differential models are interesting with regard to anxiety and its potential treatments. In this respect it is necessary to incorporate evidence from animal personality research in order to gain better insight into differential mechanisms. In the end the usually great variance in putative similar animals is still one of the most neglected problems. As pointed out in this work, much of this variance is systematic in nature (Gosling 2001; Pawlak et al. 2008).

It should be also a promising approach to combine this line of research by analysing different behavioural subgroups and their quantitative trait loci (QTL), that is indicating a significant relationship between the phenotype, e.g. anxiety-related behaviour, and a genetic trait, of which the genomic location is known (Fernández-Teruel et al. 2002). Moreover, current thinking holds that genotype has a substantial influence in determining personality traits (Bouchard 1994), although research has developed from assuming single gene causation in support to more complex polygenic models of personality traits (Noblett and Coccaro 2005). In the field of behavioural genetics, a wide array of research tools is available to determine the role of genetics in behaviour of laboratory animals. Research on genetically modified animals has increased dramatically over the last years. Overviews are given by Bucán and Abel (2002), Clément et al. (2002), Finn et al. (2003), Flint (2003), and Gross and Hen (2004). Even more, it has been possible to assess single genes or a conglomeration of genes that may be relevant for the expression of behaviour also in humans.

We believe that an extended individualised approach in animal research is an optimal way to develop a personalised approach in biopsychosocial research and

pathophysiology. The heterogeneity of psychiatric conditions (and other diseases) should be taken into account when further modeling behaviour. For example, caution needs to be exerted when claiming a model to display the full construct. It should be clear that single existing behavioural tests or paradigms are not capable of displaying the wide array of a psychiatric condition or psychological state (e.g., anxiety). Often, we do not specify what type of anxiety (or any other psychological construct) we test animals. Thus, a new generation of animal models and a more sophisticated and in-depth approach of existing behavioural tests are much needed when to specifically mimic symptoms more in depth in translational research. Hence, such work requires extensive communication between all disciplines.

Likewise as shown in research with humans and experienced in encounters in daily life with humans, animals simply do not react uniformly to the same stimulus. It should be investigated in detail whether and how individual anxiety-like/avoidance behaviour and activity levels affect the reactivity to anxiolytic drugs, since it may prove useful to get a better understanding of normal behaviour and psychiatric conditions. Our novel approach of combining individual behaviour, drugs (particularly interesting here are becoming cytokines), peripheral, and central nervous processes is challenging, but will likely be of benefit in the long run for a better understanding. It is quite clear now that part of the psychopharmacological effects observed at behavioural levels is explained by the interference of behavioural traits, that is, by relations between the organism and its environment (Pawlak et al. 2008). The appropriate term for such research by taking the individual into account is *differential psychopharmacology*. This term has been already used by Boissier (1978), and even earlier coined by Richelle (1968). This term denotes the fact that behaviour should be treated in psychopharmacological research not only as a dependent variable, but, eventually, as an independent variable. In other words, in contrast to the traditional approaches in behavioural pharmacology, reactivity of drugs to personality in humans or behavioural traits in animals must be critically considered. The time is ripe to revitalise and extend this approach with fervour.

Acknowledgements

We are indebted to Dr. Rainer K.W. Schwarting and Dr. Ron Mucha for carefully revising an earlier version of this manuscript. Parts of this work were supported by the German Research Foundation (DFG PA 818/4-1).

References

1. Abramson LY, Seligman MEP (1977). Modeling psychopathology in the laboratory: history and rationale. In: JD Maser, MEP Seligman (Eds.), *Psychopathology: Experimental Models*, pp 1-26. San Francisco: Freeman.
2. Almeida SS, Garcia RA, de Oliveira LM (1993). Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior* 54:749-752.
3. Almeida SS, Tonkiss J, Galler JR (1996). Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior* 60:675-680.
4. Amelang M, Bartussek D, Stemmler G, Hagemann D (2006). *Differentielle Psychologie und Persönlichkeitsforschung*, 6th ed. Stuttgart: Kohlhammer.
5. Andrade MMM, Tomé MF, Santiago ES, Lúcia-Santos A, de Andrade TGCS (2003). Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior* 78:125-133.
6. Andreatini R, Blanchard C, Blanchard R, Brandão ML, Carobrez AP, Griebel G, Guimarães FS, Handley SL, Jenck F, Leite JR, Rodgers J, Schenberg LC, Da Cunha C, Graeff FG (2001). The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34:145-154.
7. Andreatini R, Vital MABF, Santos GL (2003). The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plus-maze. *European Neuropsychopharmacology* 13 Suppl 4:378-379.
8. Andrews N, File SE (1993). Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *European Journal of Pharmacology* 235:109-112.
9. Barlow DH (2002). *Anxiety and its Disorders: The Nature and Treatment of Anxiety and Panic*, 2nd ed. New York: Guilford Press.
10. Bauhofer A, Schwarting RKW, Köster M, Schmitt A, Lorenz W, Pawlak CR (2004). Sickness behavior of rats with abdominal sepsis can be improved by antibiotic

- and G-CSF prophylaxis in clinic modeling randomized trials. *Inflammation Research* 53:697-705.
11. Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM (2004). Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behavioural Brain Research* 155:197-206.
 12. Blanchard DC, Blanchard RJ (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology* 39:43-68.
 13. Blanchard RJ, Blanchard DC (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology* 103:70-82.
 14. Blanchard RJ, Blanchard DC (1990). An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In: N McNaughton, G Andrews (Eds.), *Anxiety*, pp 124-133. Dunedin: Otago University Press.
 15. Blanchard RJ, Parmigiani S, Bjornson C, Masuda C, Weiss SM, Blanchard DC (1995). Antipredator behaviour of Swiss-Webster mice in a visible burrow system. *Aggressive Behavior* 21:123-136.
 16. Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research* 58:155-165.
 17. Boissier JR (Ed.) (1978). *Differential Psychopharmacology on Anxiolytics and Sedatives*. Modern Trends in Pharmacopsychiatry 14. Karger: Basel.
 18. Borsini F, Podhorna J, Marazziti D (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology* 163:121-141.
 19. Borta A (2006). *Faktorenanalytische Betrachtung des Verhaltens von Wistar-Ratten im Offenfeld Test und im Plus-Labyrinth Test*. Philipps-University of Marburg: Unpublished dissertation thesis.
 20. Borta A, Schwarting RKW (2005a). Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behaviour in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiology & Behavior* 84:387-396.
 21. Borta A, Schwarting RKW (2005b). Post-trial treatment with the nicotinic agonist metanicotine: differential effects in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 80:541-548.

22. Borta A, Wöhr M, Schwarting RKW (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research* 166:271-280.
23. Bouchard Jr TJ (1994). Genes, environment, and personality. *Science* 264:1700-1701.
24. Brioni JD, Orsingher OA (1989). Operant behavior and reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. *Physiology & Behavior* 44:193-198.
25. Bucán M, Abel T (2002). The mouse: genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics* 3:114-123.
26. Calder AJ, Lawrence AD, Young AW (2001). Neuropsychology of fear and loathing. *Nature Reviews Neuroscience* 2:352-363.
27. Capitanio JP (1985). Early experience and social processes in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): II. Complex social interaction. *Journal of Comparative Psychology* 99:133-144.
28. Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29:1193-1205.
29. Carver CS (2005). Impulse and constraint: perspectives from personality psychology, convergence with theory in other areas, and potential for integration. *Personality and Social Psychology Review* 9:312-333.
30. Clément Y, Calatayud F, Belzung C (2002). Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain Research Bulletin* 57:57-71.
31. Cloninger CR, Svrakic DM, Przybeck TR (1993). A psychobiological model of temperament and character. *Archives of General Psychiatry* 50:975-990.
32. Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284:1670-1672.
33. Cruz-Morales SE, Santos NR, Brandão ML (2002). One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 72:973-978.

34. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 9:46-57.
35. Davis M, Walker D, Lee Y (1997). Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences* 821:305-331.
36. Deakin JFW, Graeff FG (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology* 5:305-315.
37. Depue R, Lenzenweger M (2005). A neurobehavioral dimensional model of personality disturbance. In: M Lenzenweger, J Clarkin (Eds.), *Theories of Personality Disorders*, 2nd ed. New York: Guilford Press.
38. Dere E, De Souza-Silva MA, Frisch C, Teubner B, Söhl G, Willecke K, Huston JP (2003). Connexin30-deficient mice show increased emotionality and decreased rearing activity in the open-field along with neurochemical changes. *European Journal of Neuroscience* 18:629-638.
39. Enkel T, Gholizadeh D, von Bohlen und Halbach O, Sanchis-Segura C, Hurlemann R, Spanagel R, Gass P, Vollmayr B (2010). Ambiguous-cue interpretation is biased under stress- and depression-like states in rats. *Neuropsychopharmacology* 35:1008-1015.
40. Fedotova JO, Hartmann G, Lénárd L, Saprónov NS (2004). Effects of 5-HT_{1A} receptor agonist and antagonist on anxiety in intact and ovariectomized female rats. *Acta Physiologica Hungarica* 91:175-184.
41. Fernandes C, File SE (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 54:31-40.
42. Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Gray JA, Aguilar R, Gil L, Giménez-Llort L, Tobeña A, Bhomra A, Nicod A, Mott R, Driscoll P, Dawson GR, Flint J (2002). A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Research* 12:618-626.

43. Ferreira TL, Moreira KM, Ikeda DC, Bueno OFA, Oliveira MGM (2003). Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Research* 987:17-24.
44. File SE (1990). One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100:281-282.
45. File SE (2001). Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research* 125:151-157.
46. File SE, Andrews N, Wu PY, Zharkovsky A, Zangrossi Jr H (1992). Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *European Journal of Pharmacology* 218:9-14.
47. File SE, Gonzalez LE, Gallant R (1998). Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 19:397-405.
48. File SE, Kenny PJ, Cheeta S (2000). The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 66: 65-72.
49. File SE, Mabbutt PS, Hitchcott P (1990). Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 102:98-101.
50. File SE, Zangrossi Jr H (1993). "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* 110:240-244.
51. File SE, Zangrossi Jr H, Viana M, Graeff FG (1993). Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 111:491-494.
52. Finn DA, Rutledge-Gorman MT, Crabbe JC (2003). Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics* 4:109-135.
53. Flint J (2003). Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *Journal of Neurobiology* 54:46-77.
54. Francis RC (1990). Temperament in a fish: a longitudinal study of the development of individual differences in aggression and social rank in the Midas cichlid. *Ethology* 86:311-325.

55. Frussa-Filho R, Ribeiro R de A (2002). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sciences* 71:519-525.
56. Garbe CM, Kemble ED (1994). Effects of prior agonistic experience on risk assessment and approach behavior evoked by familiar and unfamiliar conspecific odors. *Aggressive Behavior* 20:143-149.
57. Garcia AMB, Cardenas FP, Morato S (2005). Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior* 85:265-270.
58. Gonzalez LE, File SE (1997). A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience* 17:1505-1511.
59. Gosling SD (1998). Personality dimensions in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *Journal of Comparative Psychology* 112:107-118.
60. Gosling SD (2001). From mice to men: what can we learn about personality from animal research? *Psychological Bulletin* 127:45-86.
61. Graeff FG (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in animals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27:811-829.
62. Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TGCS, Deakin JFW (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 54:129-141.
63. Gray JA (1982). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*, 1st ed. Oxford: Oxford University Press.
64. Gray JA, McNaughton N (2000). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
65. Graybiel AM, Rauch SL (2000). Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron* 28:343-347.
66. Gross C, Hen R (2004). The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience* 5:545-552.

67. Halliday TR (1976). The libidinous newt: an analysis of variations in the sexual behaviour of the male smooth newt, *Triturus vulgaris*. *Animal Behaviour* 24:398-414.
68. Handley SL, McBlane JW (1993). 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology* 112:13-20.
69. Hasler G, Fromm S, Alvarez RP, Luckenbaugh DA, Drevets WC, Grillon C (2007). Cerebral blood flow in immediate and sustained anxiety. *The Journal of Neuroscience* 27:6313-6319.
70. Hasuo (1935). Effects of milieu upon character. I. Experiments with young chickens. *Japanese Journal of Experimental Psychology* 2:109-118.
71. Hebb DO (1949). Temperament in chimpanzees: I. Method and analyses. *The Journal of Comparative and Physiological Psychology* 42:192–206.
72. Henn FA, Vollmayr B (2005). Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29:799-804.
73. Ho YJ, Eichendorff J, Schwarting RKW (2002). Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behavioural Brain Research* 136:1-12.
74. Ho YJ, Pawlak CR, Guo L, Schwarting RKW (2004). Acute and long-term consequences of single MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat. *Behavioural Brain Research* 149:135-144.
75. Ho YJ, Wang CF, Hsu WY, Tseng T, Hsu CC, Kao MD, Tsai YF (2007). Psychoimmunological effects of dioscorea in ovariectomized rats: role of anxiety level. *Annals of General Psychiatry* 6:21.
76. Hogg S (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 54:21-30.
77. Holmes A, Rodgers RJ (1998). Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 60:473-488.
78. Horvitz JC (2000). Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96:651- 656.

79. Jensen J, McIntosh AR, Crawley AP, Mikulis DJ, Remington G, Kapur S (2003) Direct activation of the ventral striatum in anticipation of aversive stimuli. *Neuron* 40:1251-1257.
80. Kabbaj M, Akil H (2001). Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study. *Neuroscience* 106:535-545.
81. Kaesermann HP (1986). Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. *Psychopharmacology* 89:31-37.
82. Karl T, Pabst R, von Hörsten S (2003). Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Experimental and Toxicologic Pathology* 55:69-83.
83. Karrenbauer BD, Ho YJ, Ludwig V, Löhn J, Spanagel R, Schwarting RKW, Pawlak CR (2009). Time-dependent effects of striatal interleukin-2 on open field behaviour in rats. *Journal of Neuroimmunology* 208:10-18.
84. Khan AA, Jacobson KC, Gardner CO, Prescott CA, Kendler KS (2005). Personality and comorbidity of common psychiatric disorders. *British Journal of Psychiatry* 186:190-196.
85. Kitabatake Y, Hikida T, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2003). Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7965-7970.
86. Köks S, Beljajev S, Koovit I, Abramov U, Bourin M, Vasar E (2001). 8-OH-DPAT, but not deramciclone, antagonizes the anxiogenic-like action of paroxetine in an elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 153:365-372.
87. Laakso A, Wallius E, Kajander J, Bergman J, Eskola O, Solin O, Ilonen T, Salokangas RKR, Syvälahti E, Hietala J (2003). Personality traits and striatal dopamine synthesis capacity in healthy subjects. *American Journal of Psychiatry* 160:904-910.
88. Lathe R (2004). The individuality of mice. *Genes, Brain and Behavior* 3:317-327.
89. LeDoux JE (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* 23:155-184.

90. Letwin NE, Kafkafi N, Benjamini Y, Mayo C, Frank BC, Luu T, Lee NH, Elmer GI (2006). Combined application of behavior genetics and microarray analysis to identify regional expression themes and gene-behaviour associations. *The Journal of Neuroscience* 26:5277-5287.
91. Liebsch G, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M (1996). Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats. *Neuroscience Letters* 217:101-104.
92. Lister RG (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180-185.
93. London ED, Simon SL, Berman SM, Mandelkern MA, Lichtman AM, Bramen J, Shinn AK, Miotto K, Learn J, Dong Y, Matochik JA, Kurian V, Newton T, Woods R, Rawson R, Ling W (2004). Mood disturbances and regional cerebral metabolic abnormalities in recently abstinent methamphetamine abusers. *Archives of General Psychiatry* 61:73-84.
94. Lorberbaum JP, Kose S, Johnson MR, Arana GW, Sullivan LK, Hamner MB, Ballenger JC, Lydiard RB, Brodrick PS, Bohning DE, George MS (2004). Neural correlates of speech anticipatory anxiety in generalized social phobia. *Neuroreport* 15:2701-2705.
95. Ludwig V, Mihov Y, Schwarting RKW (2008). Behavioral and neurochemical consequences of multiple MDMA administrations in the rat: role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research* 189:52-64.
96. Lui S, Huang X, Chen L, Tang H, Zhang T, Li X, Li D, Kuang W, Chan RC, Mechelli A, Sweeney JA, Gong Q (2009). High-field MRI reveals an acute impact on brain function in survivors of the magnitude 8.0 earthquake in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:15412-15417.
97. Marks IM (1987). *Fears, Phobias, and Rituals: Panic, Anxiety, and their Disorders*. New York: Oxford University Press.
98. Marks IM, Nesse RM (1994). Fear and fitness: an evolutionary analysis of anxiety disorders. *Ethology and Sociobiology* 15:147-161.
99. Mathew SJ, Ho S (2006). Etiology and neurobiology of social anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychiatry* 67 Suppl 12:9-13.

100. McKinney Jr WT, Bunney Jr WE (1969). Animal models of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Archives of General Psychiatry* 21:240-248.
101. McNaughton N, Corr PJ (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28:285-305.
102. Mehta PH, Gosling SD (2008). Bridging human and animal research: a comparative approach to studies of personality and health. *Brain, Behavior, and Immunity* 22:651-661.
103. Millan MJ (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology* 70:83-244.
104. Molewijk HE, van der Poel AM, Olivier B (1995). The ambivalent behaviour "stretched approach posture" as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. *Psychopharmacology* 121:81-90.
105. Montgomery KC (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *The Journal of Comparative and Physiological Psychology* 48:254-260.
106. Motta V, Maissonette S, Morato S, Castrechini P, Brandão ML (1992). Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 107:135-139.
107. Morris PH, Gale A, Duffy K (2002). Can judges agree on the personality of horses? *Personality and Individual Differences* 33:67-81.
108. Noblett KL, Coccaro EF (2005). Molecular genetics of personality. *Current Psychiatry Reports* 7:73-80.
109. Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, Rodgers RJ (2002). Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. *Brain Research* 927:87-96.
110. Ohl F (2003). Testing for anxiety. *Clinical Neuroscience Research* 3:233-238.
111. Panksepp J (1998). *Affective Neuroscience: The Foundations of Human and Animal Emotions*. New York: Oxford University Press.

112. Pawlak CR, Ho YJ, Schwarting RKW (2008). Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32:1544-1568.
113. Pawlak CR, Ho YJ, Schwarting RKW, Bauhofer A (2003). Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behaviour in the rat. *Neuroscience Letters* 341:205-208.
114. Pawlak CR, Schwarting RKW (2002). Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73:679-687.
115. Pawlak CR, Schwarting RKW (2006a). Striatal microinjections of interleukin-2 and rat behaviour in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research* 168:339-344.
116. Pawlak CR, Schwarting RKW (2006b). Interleukin-2 in the striatum affects motivated open field behaviour in rats. Program No. A078.7. 2006 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Vienna, Austria: The Federation of European Neuroscience Societies. Online.
117. Pawlak CR, Schwarting RKW, Bauhofer A (2005). Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior. *Molecular Brain Research* 137:159-165.
118. Pawlak CR, Weyers P (2006). Tiermodelle für Angst und Angststörungen. Ausgewählte Modelle und Ansätze zur Untersuchung individueller Differenzen. *Psychologische Rundschau* 57:139-153.
119. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14:149-167.
120. Pereira JKD, Vieira RJ, Konishi CT, Ribeiro R de A, Frussa-Filho A (1999). The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sciences* 65:PL101-107.
121. Perkins AM, Ettinger U, Davis R, Foster R, Williams SCR, Corr PJ (2009). Effects of Lorazepam and citalopram on human defensive reactions:

- ethopharmacological differentiation of fear and anxiety. *The Journal of Neuroscience* 29:12617-12624.
122. Petitto JM, Huang Z (1994). Molecular cloning of a partial cDNA of the interleukin-2 receptor-b in normal mouse brain: in situ localization in the hippocampus and expression by neuroblastoma cells. *Brain Research* 650:140-145.
 123. Petitto JM, Lysle DT, Gariepy J, Clubb PH, Cairns RL, Lewis MH (1993). Genetic differences in social behavior: relation to natural killer cell function and susceptibility to tumor development. *Neuropsychopharmacology* 8:35-43.
 124. Phelps EA, LeDoux JE (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48:175-187.
 125. Pinel JPJ, Mana MJ (1989). Adaptive interactions of rats with dangerous inanimate objects: support for a cognitive theory of defensive behavior. In: RJ Blanchard, PF Brain, S Parmigiani, DC Blanchard (Eds.), *Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior*, pp 137-150. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
 126. Pinel JPJ, Treit D (1978). Burying as a defensive response in rats. *The Journal of Comparative and Physiological Psychology* 92:708-712.
 127. Raison CL, Capuron L, Miller AH (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology* 27:24-31.
 128. Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman KA (1989). Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Archives of General Psychiatry* 46:493-500.
 129. Reynolds SM, Berridge KC (2002). Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place preference/avoidance, and fear. *The Journal of Neuroscience* 22:7308-7320.
 130. Richard IH, Schiffer RB, Kurlan R (1996). Anxiety and Parkinson's disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 8:383-392.
 131. Richelle M (1968). The integration of behavior as a variable in psychopharmacological research. *Journal of Physiology (Paris)* 60 Suppl 1:149-203.

132. Rodgers RJ (1997). Animal models of 'anxiety': where next? *Behavioural Pharmacology* 8:477-496.
133. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30:289-304.
134. Rodgers RJ, Cole JC (1993). Influence of social isolation, gender, strain and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiology & Behavior* 54:729-736.
135. Rodgers RJ, Cole JC, Aboualfa K, Stephenson LH (1995). Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 52:805-813.
136. Rodgers RJ, Lee C, Shepherd JK (1992). Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology* 106:102-110.
137. Rodgers RJ, Shepherd JK (1993). Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology* 113:237-242.
138. Rogan MT, Leon KS, Perez DL, Kandel ER (2005). Distinct neural signatures for safety and danger in the amygdala and striatum of the mouse. *Neuron* 46:309-320.
139. Santucci LB, Daud MM, Almeida SS, de Oliveira LM (1994). Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 49:393-398.
140. Sapolsky RM, Ray JC (1989). Styles of dominance and their endocrine correlates among wild olive baboons (*papio anubis*). *American Journal of Primatology* 18:1-13.
141. Sareen J, Campbell DW, Leslie WD, Malisza KL, Stein MB, Paulus MP, Kravetsky LB, Kjernisted KD, Walker JR, Reiss JP (2007). Striatal function in generalized social phobia: a functional magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry* 61:396-404.

142. Schenberg EE, Ferreira TL, Figueredo LZP, Hipólido DC, Nobrega JN, OliveiraMGM (2006). Fear conditioning performance and NMDA receptor subtypes: NR2A differential expression in the striatum. *Brain Research Bulletin* 69:440-446.
143. Schiller D, Levy I, Niv Y, Le Doux JE, Phelps EA (2008). From fear to safety and back: reversal of fear in the human brain. *The Journal of Neuroscience* 28:11517-11525.
144. Schneider P, Spanagel R, Pawlak CR (2009). Interleukin-2 affects social interaction behaviour in relation to anxiety-like trait behaviour in the elevated plus-maze in adult Wistar rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 23 Suppl. 1:S19.
145. Schneider P, Spanagel R, Schwarting RKW, Pawlak CR (2008). Individual behaviour and relationship between elevated plus-maze and social interaction test in adult rats. Program No. 393. 2008 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience. Online. Poster auf dem Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. Washington, DC, USA.
146. Schwabe K, Klein S, Koch M (2006). Behavioural effects of neonatal lesions of the medial prefrontal cortex and subchronic pubertal treatment with phencyclidine of adult rats. *Behavioural Brain Research* 168:150-160.
147. Schwarting RKW, Pawlak CR (2004). Behavioral neuroscience in the rat: taking the individual into account. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 26 Suppl 2:17-22.
148. Schwarting RKW, Thiel CM, Müller CP, Huston JP (1998). Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport* 9:1025-1029.
149. Schoenbaum G, Setlow B (2003). Lesions of nucleus accumbens disrupt learning about aversive outcomes. *The Journal of Neuroscience* 23:9833-9841.
150. Silva RCB, Brandão ML (2000). Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 65:209-216.
151. Smeets WJAJ, Marín O, González A (2000). Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *Journal of Anatomy* 196:501-517.

152. Steimer T, Driscoll P (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RLA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 6:87-100.
153. Steimer T, Driscoll P (2005). Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29:99-112.
154. Stein DJ, Stahl S (2000). Serotonin and anxiety: current models. *International Clinical Psychopharmacology* 15 Suppl 2:S1-S6.
155. Strack F, Deutsch R (2004). Reflective and impulsive determinants of social behavior. *Personality and Social Psychology Review* 8:220-247.
156. Strelau J (1997). The contribution of Pavlov's typology of CNS properties to personality research. *European Psychologist* 2:125-138.
157. Tellegen A, Waller NG (1992). Exploring personality through test construction: development of the multidimensional personality questionnaire. Minneapolis, MN: University of Minnesota Press. Unpublished manuscript.
158. Thiel CM, Müller CP, Huston JP, Schwarting RKW (1999). High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 93:243-251.
159. Tollefson GD, Rosenbaum JF (1998). Selective serotonin reuptake inhibitors. In: AF Schatzberg, CB Nemeroff (Eds.), *Textbook of Psychopharmacology*, pp 219-237. Washington, DC: American Psychiatric Press, Inc.
160. Treit D (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 9:203-222.
161. Treit D, Menard J, Royan C (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 44:463-469.
162. Ueno KI, Togashi H, Mori K, Matsumoto M, Ohashi S, Hoshino A, Fujita T, Saito H, Minami M, Yoshioka M (2002). Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. *Behavioural Pharmacology* 13:1-13.
163. van den Heuvel OA, Veltman DJ, Groenewegen HJ, Cath DC, van Balkom AJLM, van Hartkamp J, Barkhof F, van Dyck R (2005a). Frontal— dysfunction during

- planning in obsessive-compulsive disorder. *Archives of General Psychiatry* 62:301-310.
164. van den Heuvel OA, Veltman DJ, Groenewegen HJ, Witter MP, Merkelbach J, Cath DC, van Balkom AJLM, van Oppen P, van Dyck R (2005b). Disorder-specific neuroanatomical correlates of attentional bias in obsessive-compulsive disorder, panic disorder, and hypochondriasis. *Archives of General Psychiatry* 62:922-933.
 165. Vyas A, Chattarji S (2004). Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress. *Behavioral Neuroscience* 118:1450-1454.
 166. Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm II SL, Burkhart-Kasch S, Dorow J, Doerksen S, Downing C, Fogarty J, Rodd-Henricks K, Hen R, McKinnon CS, Merrill CM, Nolte C, Schalomon M, Schlumbohm JP, Sibert JR, Wenger CD, Dudek BC, Crabbe JC (2003). Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *Journal of Neurobiology* 54:283-311.
 167. Walf AA, Frye CA (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2:322-328.
 168. Weintraub D, Newberg AB, Cary MS, Siderowf AD, Moberg PJ, Kleiner-Fisman G, Duda JE, Stern MB, Mozley D, Katz IR (2005). Striatal dopamine transporter imaging correlates with anxiety and depression symptoms in Parkinson's disease. *The Journal of Nuclear Medicine* 46:227-232.
 169. Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT (1998). Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23:265-271.
 170. Wichers M, Maes M (2002). The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 5:375-388.
 171. Wigger A, Sánchez MM, Mathys KC, Ebner K, Frank E, Liu D, Kresse A, Neumann ID, Holsboer F, Plotsky PM, Landgraf R (2004). Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. *Neuropsychopharmacology* 29:1-14.
 172. Willner P (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83:1-16.

173. Willner P (1986). Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 10:677-690.
174. Willner P (1991). Behavioural models in psychopharmacology. In: P Willner (Ed.), *Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives*, pp 3-18. Cambridge: Cambridge University Press.
175. Willner P, Mitchell PJ (2002). Animal models of depression: a diathesis/stress approach. In: H D'haenen, JA den Boer, P Willner (Eds.), *Biological Psychiatry*, pp 703-726. Chichester: Wiley.
176. Woodcock J (2007). The prospects for "personalized medicine" in drug development and drug therapy. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 81:164-169.
177. Wu JC, Buchsbaum MS, Hershey TG, Hazlett E, Sicotte N, Johnson JC (1991). PET in generalized anxiety disorder. *Biological Psychiatry* 29:1181-1199.
178. Wu SL, Hsu LS, Tu WT, Wang WF, Huang YT, Pawlak CR, Ho YJ (2008). Effects of d-cycloserine on the behavior and ERK activity in the amygdala: Role of individual anxiety levels. *Behavioural Brain Research* 187:246-253.
179. Yehuda R, Hyman SE (2005). The impact of terrorism on brain, and behavior: what we know and what we need to know. *Neuropsychopharmacology* 30:1773-1780.
180. Yerkes RM, Yerkes AW (1936). Nature and conditions of avoidance (fear) responses in chimpanzees. *Journal of Comparative Psychology* 21:53-66.

Legends

Fig. 1: Time in the open arm of an elevated plus-maze (expressed in percentage of total test time; mean +SEM) in rats which were tested either on day-1 (1st exposure) and re-tested on days-2 and -12 (left side), or in rats which were re-tested 120 days after the 1st exposure. Correlation coefficients (Spearman) reflect comparisons between the given test day and the 1st exposure (d1). Based on the amount of open arm time during the 1st test (d1), the animals were assigned either to the subgroup with low open arm (LOA) or high open arm (HOA) time. Adapted from Schwarting and Pawlak (2004).

Fig. 2: Time course of cumulated % of rats showing unconditioned object burying behaviour (A) and the number (mean +SEM) of marbles buried (B). Four marbles coated with Tabasco sauce were introduced into the rat's home cage at 10 h. Asterisk (*) indicates a difference ($P < .05$) between low open arm (LOA) compared with high open arm (HOA) rats at that time point. Adapted from Ho et al. (2002).

Fig. 3: Freezing behavior (in seconds) during fear conditioning (top) and during testing (bottom) expressed separately for the six tone(t)/shock(s) (A; t/s-1 to t/s-6), or tone intervals (B; tone-1 to tone-6), and the six inter-stimulus intervals (A, B; ISI-1 to ISI-6). Open circles: rats with low open arm (LOA) time (n=10), full circles: rats with high open arm (HOA) time in an elevated plus-maze. Adapted from Borta et al. (2006).

Fig. 4: The number of avoidances (mean +SEM) during three consecutive blocks of five trials each in an active avoidance learning test. Fifteen days before, the animals had received either an i.p. injection of vehicle (left) or 7.5 mg/kg MDMA. Asterisk (*) indicates a difference ($P < .05$) between low (LOA; full circles) and high open arm (HOA; open circles) rats, and ## indicates a difference ($P < .01$) between vehicle- vs. MDMA-treated HOA rats. Adapted from Ho et al. (2004).

Fig. 5: Analyses of post mortem neurochemistry of 5-HT in the brain. For each group and brain area, two bars are given, which refer to data of the left and brain hemisphere, respectively. Rats with low open arm (LOA) compared to high open arm (HOA) time had

lower tissue levels of 5-HT in the ventral striatum but not in other brain areas (mean +SEM).

* $p < .05$, represents significant difference between HOA and LOA rats (unpaired t -tests). Adapted from Schwarting et al. (1998).

Fig. 6: Cytokine expression levels in different central and peripheral tissues of animals with high open arm (HOA) or low open arm (LOA) behavior. Based on the percentage of open arm time, LOA compared to HOA rats expressed higher levels of IL-2 mRNA in the striatum, and lower IL-2 mRNA expression in the prefrontal cortex. Other cytokines did not differ between the two subgroups. * $p < .05$, represents significant difference between HOA and LOA rats. Data are expressed as mean +SEM. Adapted from Pawlak et al. (2003, 2005).

Fig. 7: Role of anxiety level in the effects of D-cycloserine (DCS) on the immobility of rats in forced swim test and the activation of ERK1/2 (p-ERK1/2) in the amygdala. Thirty minutes after the treatment of DCS (30 mg/kg, i.p.), the immobility in the day-2 trial of the forced swim test is suppressed (A) but the p-ERK1/2 level in the amygdala is increased in LOA (low open arm) but not HOA (high open arm) rats (B). Data are expressed as mean +SEM. ** $P < .01$, *** $P < .001$, compared to the day-1 session. ### $P < .001$, compared to the rats treated by vehicle in the LOA subgroup. Adapted from Wu et al. (2008).

Pawlak et al.

Figure 1

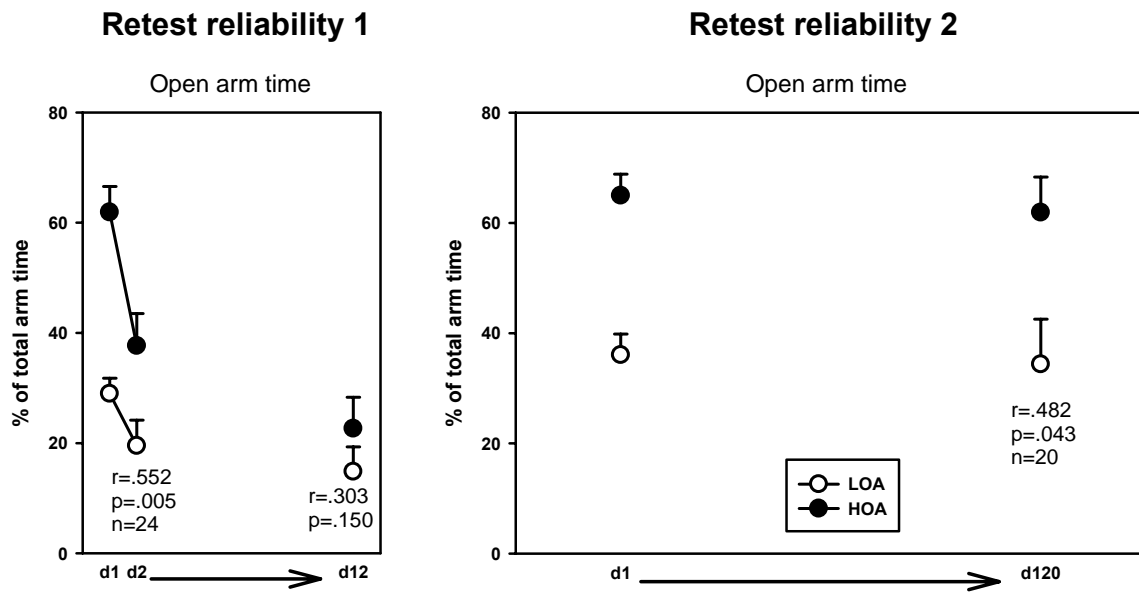


Figure 2

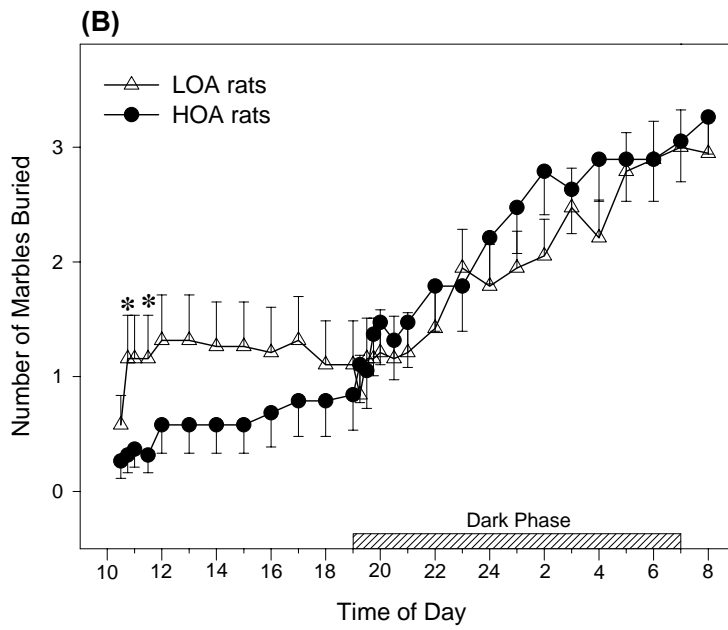
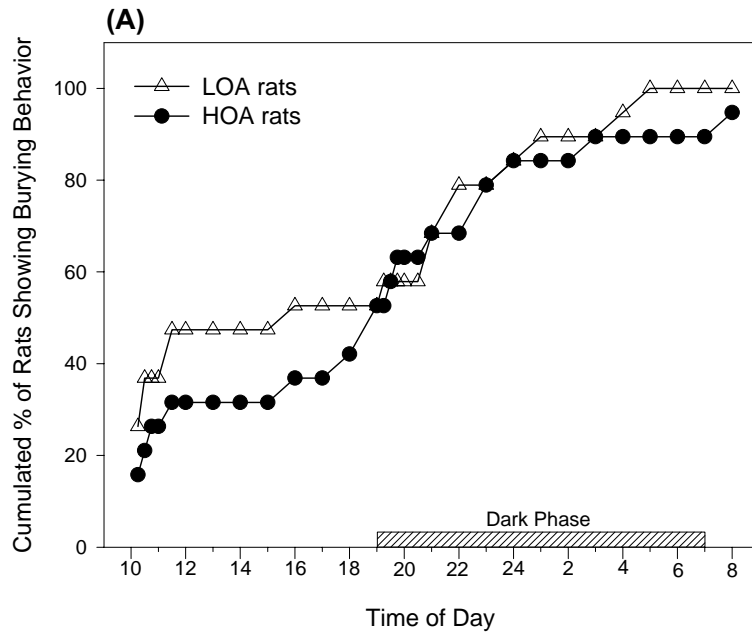


Figure 3

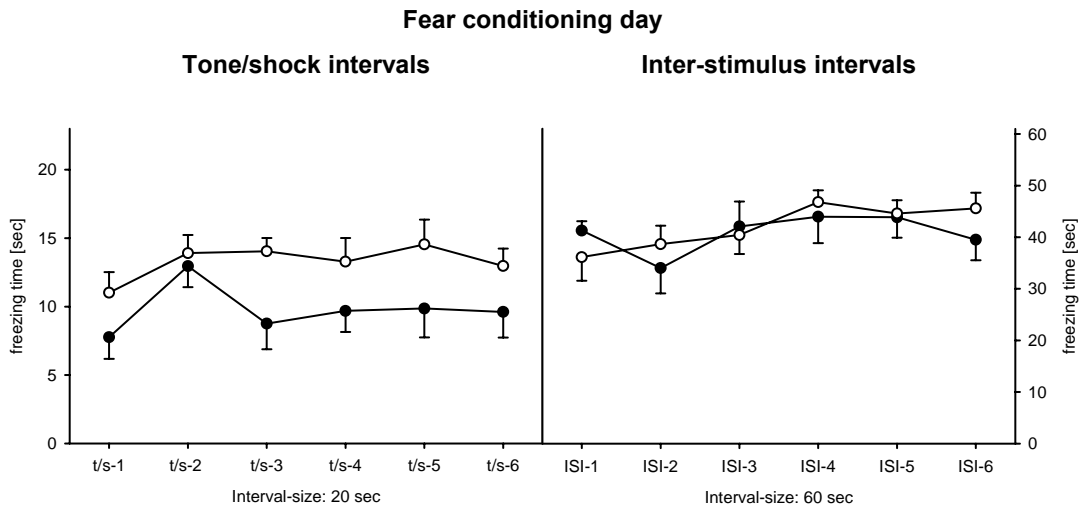
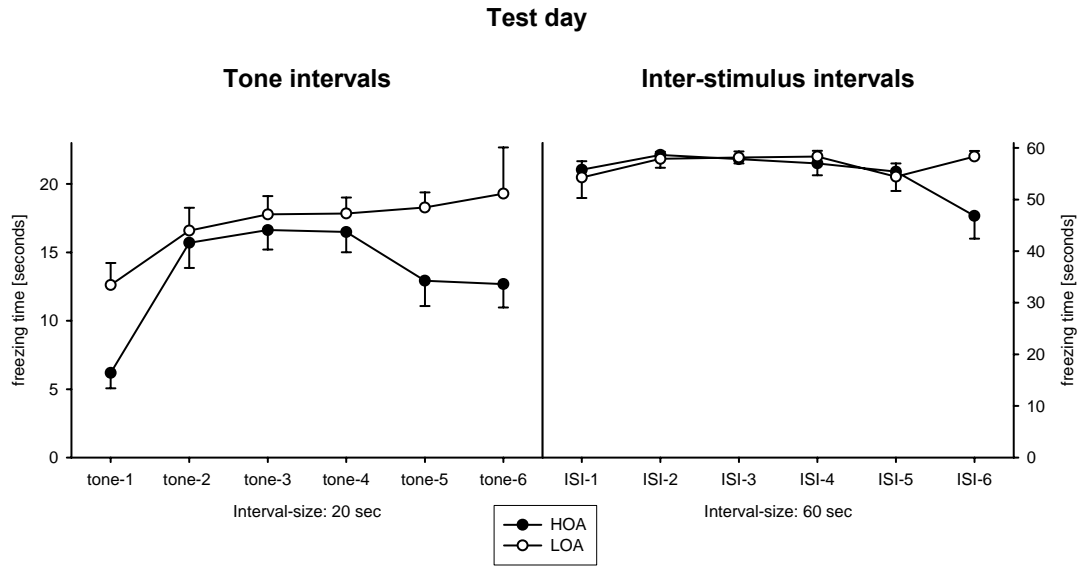


Figure 4

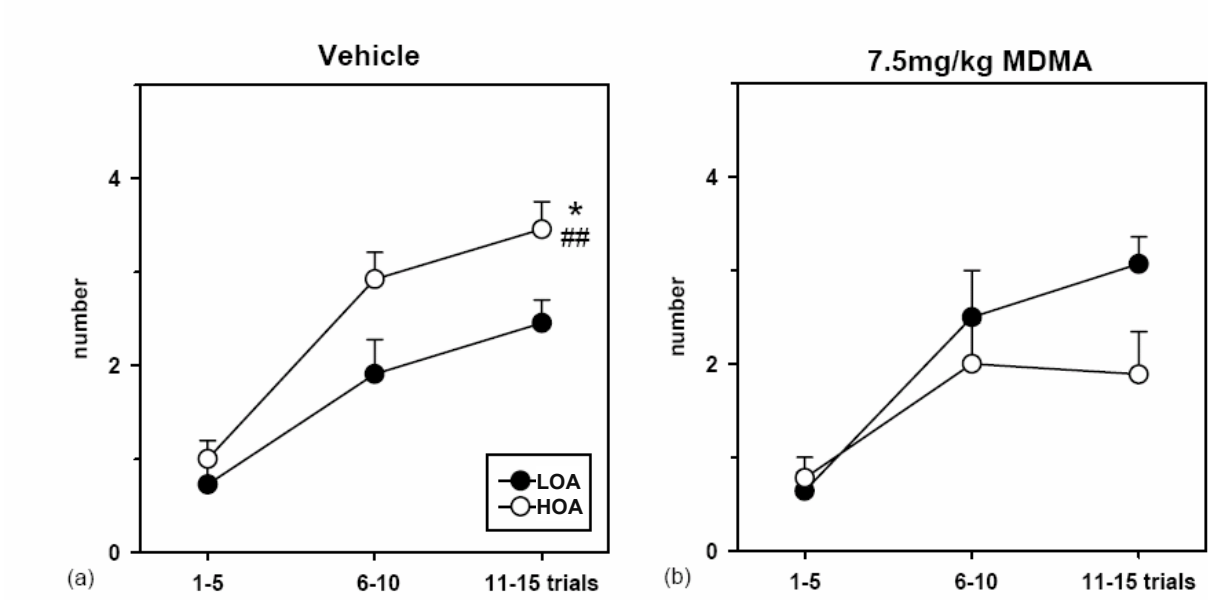


Figure 5

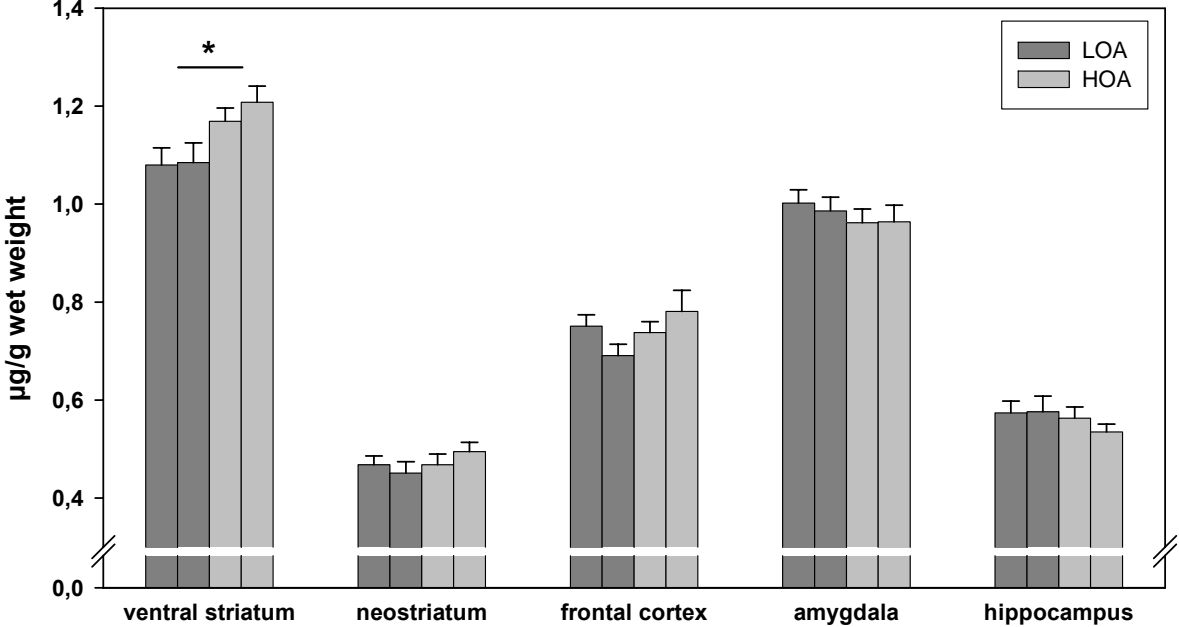


Figure 6

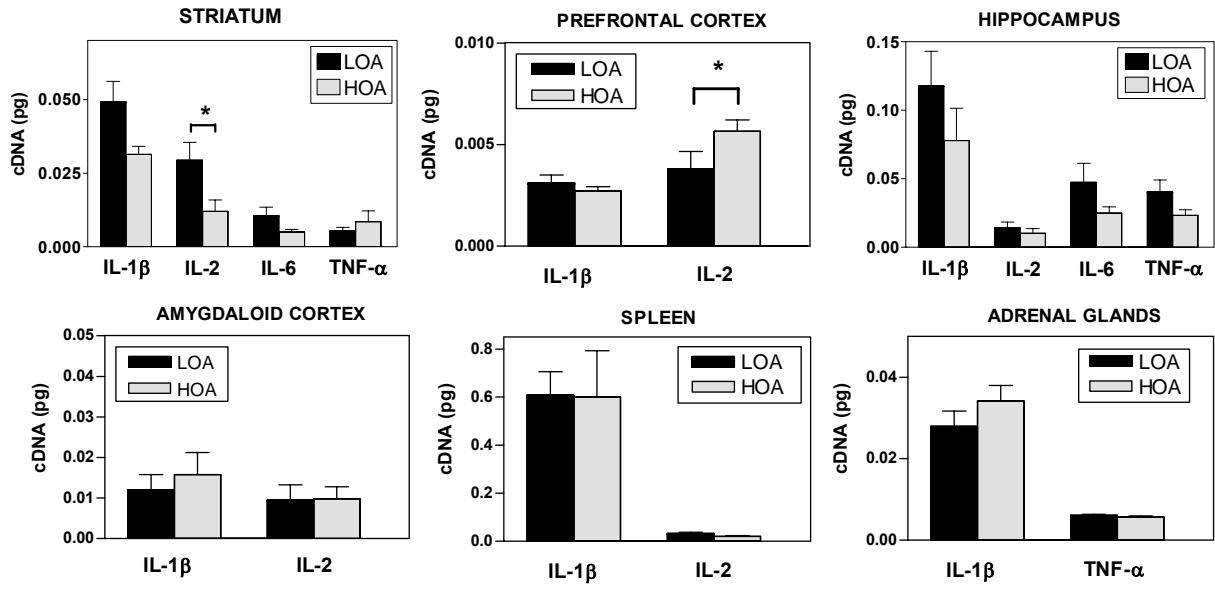
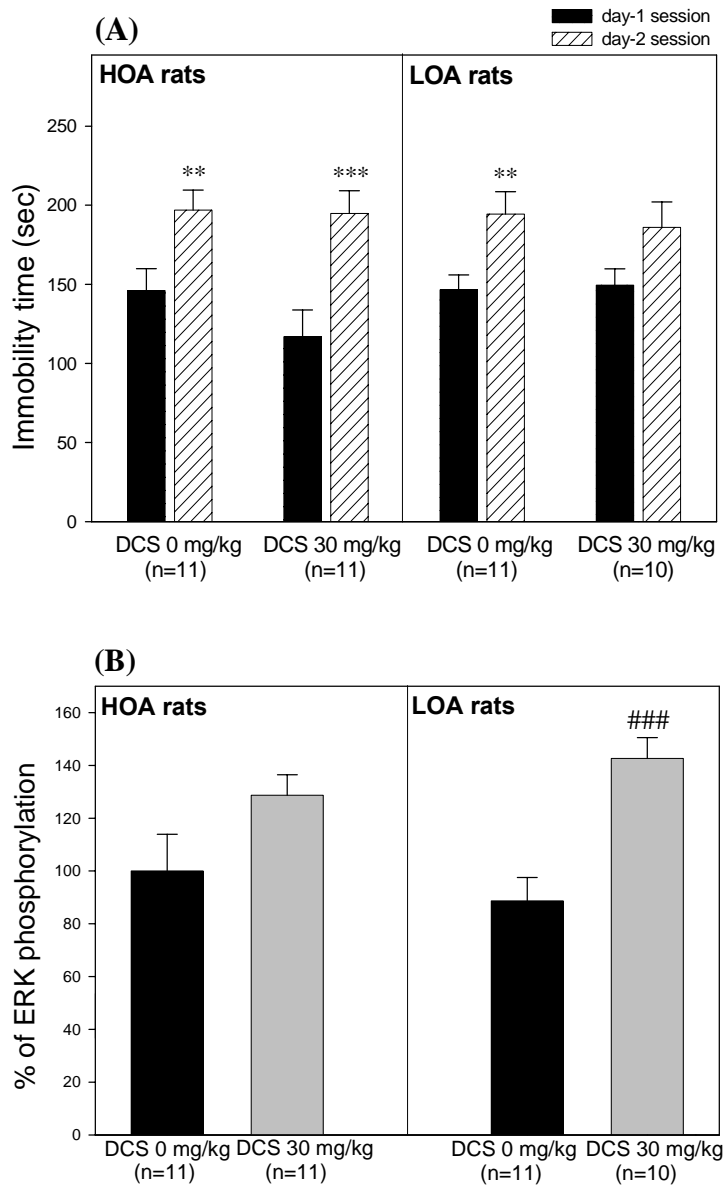


Figure 7



Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinen beiden Anleitern Prof. Dr. Rainer K.W. Schwarting und Prof. Dr. Cornelius R. Pawlak für die Ermöglichung dieser interessanten Arbeit, die hervorragende Unterstützung, die mir zugestandene große wissenschaftliche Freiheit und die angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke Prof. Dr. Ying-Jui Ho, Prof. Dr. Joseph Huston, Prof. Dr. Christian Müller und Prof. Dr. Rainer Spanagel für die gute kooperative Zusammenarbeit und die exzellenten fachlichen Ratschläge.

Ferner sei all jenen gedankt, die an den vorgelegten Arbeiten beteiligt waren oder diese unterstützt haben: Anselm Crombach, Christian Friedel, Anja Hennig, Dr. Verena Klose, Gabi Külz, Jeanette Löhn, Peggy Schneider, Jörg Stück.

Für das kritische Lesen der Dissertation möchte ich Anika Hennings und Björn Kasche und für die Unterstützung beim Layout Leif Eickhoff und Christoph Göbel danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Basalganglienfunktionen und -dysfunktionen“ für die mir zuteilgewordene Unterstützung, die anregenden Diskussionen und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Für die finanzielle Unterstützung der vorgelegten Arbeiten möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken.

Schließlich danke ich besonders meiner Familie und meinen Freunden für das entgegengebrachte Verständnis, die offenen Ohren und die moralische Unterstützung.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat auch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 20.04.2011

Dipl.-Psych. Britta D. Karrenbauer