

Aus dem
Zentralinstitut für seelische Gesundheit Mannheim
der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Meyer-Lindenberg)

**Pränataler Stress führt zu Änderungen der
Ultraschallvokalisationen bei adulten männlichen Mäusen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg
vorgelegt von
Florian Lapert

aus
Mont-Saint-Aignan
2017

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts

Referent: Prof. Dr. med. Peter Gass



Song Ty, *Two mice* 1853
Bac Ninh, Viet Nam

1	EINLEITUNG	6
1.1	PRÄNATALER STRESS (PNS)	6
1.1.1	Auswirkungen von pränatalem Stress auf das Verhalten der Nachkommen.....	6
1.1.2	Abhängigkeit der Auswirkungen von pränatalem Stress vom Zeitpunkt der Stressexposition während der Schwangerschaft	7
1.2	BIOLOGISCHE KONZEPTE ZUR PATHOGENESE DES VERÄNDERTEN SEXUALVERHALTENS DER NACHKOMMEN NACH PNS.....	8
1.2.1	HPG- und HPA-Achse	8
1.2.2	Tiermodelle mit genetisch verändertem Glukokortikoid-Rezeptor	10
1.3	ULTRASCHALL VOKALISATION (USV)	11
1.3.1	Allgemein	11
1.3.2	„Mating songs“	12
1.3.3	Die Silbe: Erkennung und Klassifizierung.....	14
1.3.3.1	Visuelle Aufteilung der USV in verschiedene Silbenarten	14
1.3.3.2	Klassifizierung durch Cluster-Analyse.	16
1.4	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	16
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSDESIGN	19
2.1.1	Versuchstiere	19
2.1.2	Zucht und Verfahren der PNS-Exposition	20
2.1.3	Genetisch veränderte Tiermodelle: gewebsspezifische Inaktivierung des Glukokortikoid-Rezeptors (GR).....	21
2.2	STANDARDISIERTE SOZIALE UND SEXUELLE ERFAHRUNG.....	21
2.3	SAMMLUNG DES URINS	22
2.4	ULTRASCHALL VOKALISATIONEN	23
2.4.1	USV-Aufnahmen.....	23
2.4.2	USV-Analysen.....	24
2.4.3	Statistische Auswertung mittels Cluster-Analyse	26
2.5	KORTIKOSTERON (CORT)- UND TESTOSTERONSPIEGEL	28
2.5.1	CORT-Spiegel.....	28
2.5.2	Testosteronspiegel	28
2.5.3	Statistische Analyse der CORT- und Testosteronspiegel.....	29

3	ERGEBNISSE.....	30
3.1	ERGEBNISSE USV	30
3.2	HORMONE.....	36
3.2.1	Kortikosteron.....	36
3.2.2	Testosteron	38
4	DISKUSSION.....	39
4.1	USV: STATISTISCHE ANALYSE	39
4.2	DAS DRITTE TRIMENON: EINE KRITISCHE PERIODE.....	41
4.3	PNS UND FÜR „MATING SONGS“ WICHTIGE ANATOMISCHE STRUKTUREN ..	42
4.4	KORTIKOSTERON UND TESTOSTERON.....	43
4.5	GR +/- MÄUSE.....	44
4.6	AUSBLICK UND PERSPEKTIVE.....	45
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	50
7	DANKSAGUNG	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
CORT	Kortikosteron
CRF	Corticotropin Releasing Factor
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DHT	Dihydrotestosteron
FFT	Fast Fourier transform
FM	directional frequency modulation
FT	frequency transition
GLM	Generalisierte Lineare Modelle
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
HPA	Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPG	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
kHz	Kilohertz
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
n	Anzahl (z.B. der Versuchstiere)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNS	Pränataler Stress
PVN	Paraventricular nucleus (Hypothalamus)
T	Testosteron
USV	Ultraschall Vokalisation

1 EINLEITUNG

1.1 Pränataler Stress (PNS)

1.1.1 Auswirkungen von pränatalem Stress auf das Verhalten der Nachkommen

Daten aus Human- und Tiermodellen zeigen, dass pränataler Stress (PNS) eine Vielzahl an Auswirkungen nicht nur auf die Mutter und auf verschiedene Geburtsparameter, sondern auch auf die soziale Interaktion der Nachkömmlinge einschließlich ihres Sexualverhaltens hat [1-17]. Es ist nicht überraschend, dass mütterlicher Stress während der Schwangerschaft den Verlauf der fetalen Entwicklung verändern kann. Beim Menschen weisen Studien heterogene Ergebnisse auf, deren Ursachen in der sehr unterschiedlichen Definition und Operationalisierung des Begriffs „Stress“, aber auch in Einschränkungen der methodischen Möglichkeiten liegen. Einer der Hauptgründe hierfür ist, dass im Gegensatz zu humanen Studien in Tierstudien Stress kontrolliert appliziert werden kann.

So zeigen Studien beim Menschen, dass PNS mit verändertem Verhalten von Neugeborenen beziehungsweise Kleinkindern einhergeht [18-21]. Beispiele hierfür sind Auffälligkeiten in Temperament [22-24], externalisierende- und Angststörungen [25], ein Mangel an Unabhängigkeit und eine Störung des sozialen Verhaltens [26], atypische oder gemischte Händigkeit [27, 28] und ADHS Symptome [29-32]. Auch ist PNS mit langfristigen psychischen Problemen wie motorischen und geistigen Entwicklungsstörungen [33-35], Minderung der geistigen und sprachlichen Fähigkeiten [36], Impulsivität [25] sowie Geschlechtsidentitätsstörung [5, 37] in

Verbindung gebracht worden. Die Auswirkungen von PNS auf die sexuelle Orientierung bleibt umstritten: wenige Studien zeigen eine subtile Wirkung von PNS auf die sexuelle Neigung der männlichen Nachkommen, vor allem wenn der Stress während des ersten oder zweiten Trimenons der Schwangerschaft aufgetreten ist [5, 15].

Laut Ward et al. (1986) und Weinstock et al. (2001) führt PNS bei männlichen Ratten zu "demaskulinisiertem" Verhalten: ein verringertes Kopulationsverhalten, eine Abnahme der Lordose (Rückgratkrümmung als Zeichen für die Bereitschaft zum Geschlechtsakt) sowie eine verminderte Ejakulationsfrequenz und eine Abnahme des Anogenitalabstandes wurden beobachtet [1, 10]. Auch zeigten die Nachkommen weniger „sniffing“, „grooming“, und „boxing/wrestling“, was als verminderte Qualität der sozialen Interaktion interpretiert werden kann [12].

1.1.2 Abhängigkeit der Auswirkungen von pränatalem Stress vom Zeitpunkt der Stressexposition während der Schwangerschaft

Zu welchem Zeitpunkt während der fetalen Entwicklung PNS den stärksten Einfluss auf das Verhalten der Nachkommen im Erwachsenenalter hat, ist noch unklar: Müller et al. (2007) zeigten, dass früher PNS (embryonaler Tag E1-7) im Vergleich zu mittlerem (E8-14) und spätem (E15-21) PNS ein größeres Defizit in Bezug auf Bewältigungsstrategien sowie Lernleistungen bei männlichen Mäusen hervorruft [2].

Ishiwata et al. (1992) beobachteten ihrerseits eine reduzierte Lernkompetenz bei C57/BL6 Nachkommen nach dreimal täglicher Stressapplikation während des dritten Trimenons (E15-21) [38]. Van den Hove et al. (2011) und Murmu et al. (2006) fanden jeweils ein erhöhtes depressives Verhalten bei Mäusen und eine erhöhte Ängstlichkeit bei Ratten, wenn die Muttertiere dreimal täglich von E17 bis E21 gestresst wurden [39, 40]. In Rattenexperimenten zeigten Pawluski et al. (2015),

dass PNS im zweiten Trimenon einen signifikanten Einfluss auf die Neurogenese und die Dichte der Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) im weiblichen Hippocampus hat [6].

1.2 Biologische Konzepte zur Pathogenese des veränderten Sexualverhaltens der Nachkommen nach PNS

1.2.1 HPG- und HPA-Achse

Auf der hormonellen Ebene wird die sexuelle Differenzierung des Gehirns durch Sexualhormone wie Androgene, Östrogene und Gestagene [41] geregelt. Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HPG) und vor allem perinatale Testosteron (T) Spikes bestimmen - neben anderen Faktoren - das sexuelle Verhalten erwachsener männlicher Ratten. T-Spikes treten an Gestationstagen 17-19 und innerhalb weniger Stunden nach der Geburt auf [42, 43]. Diese T-Spikes bestimmen die Entwicklung neuronaler Netze, die- wenn sie durch Androgene in ausgewachsenen Tieren stimuliert werden- in der Lage sind, typisch männliches Verhalten auszulösen [44].

Bei Menschen, Ratten und anderen Säugetieren stören Stress und hohe Glukokortikoid-Spiegel im Allgemeinen alle Aspekte der HPG-Funktion, einschließlich des Fortpflanzungsverhaltens, der LHRH Expression, der Plasma-LH-Sekretion und der Sexualsteroidsynthese und -freisetzung [45, 46]. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass der Testosteronspiegel einen hemmenden Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) hat. Deshalb zeigen Männer in der Regel niedrigere Konzentrationen von ACTH und Glukokortikoiden als Frauen, sowohl in Ruhe als auch in stressreichen Situationen [47].

Da HPA- und HPG-Achse eng interagieren, kommen Viau et al. zu dem Schluss, dass beide Systeme stets gleichzeitig bewertet werden sollten [48]. Diese Interaktionen werden durch Testosteron-sensitive Afferenzen der HPA-Achse vermittelt, die unter anderem in der zentralen und medialen Amygdala, dem medialen präoptischen Bereich des Hypothalamus (Paraventricular Nucleus, PVN) sowie Kerne der Stria terminalis gefunden werden können [48-50]. Interessanterweise haben Neurone im PVN – diese sind eng mit der medialen präoptischen Area verbunden – eine hohe GR-Dichte. Mehrere Studien zeigen zudem, dass GR-exprimierende PVN-Neurone auch Corticotropin Releasing Factor (CRF), Vasopressin und andere Neuropeptide exprimieren [51, 52].

Die Wirkung von Stress auf die HPA- und HPG-Achse wurde durch mehrere Studien gezeigt: chronischer Stress [38, 53-57] und eine akute Stressexposition bewirken bei Ratten einen Ausfall des hypothalamischen Corticotropin-Releasing-Hormon-Spiegels (CRH) und zeitgleich eine Erhöhung des ACTH- und Glukokortikoid-Plasmaspiegels. Zusätzlich ist eine allgemeine inhibitorische Wirkung von Stress auf die HPG-Achse durch eine verminderte LH- und Testosteron-Produktion [54, 58-61] zu erwähnen. Xu et al. zeigten, dass nicht nur chronischer oder akuter Stress, sondern auch „restraint“ Stress (Stress durch Bewegungseinschränkung) der Mutter während der Schwangerschaft zu Hyperreagibilität der HPA-Achse sowie zu Demethylierung des CRH-Promotors und zu vermehrtem ängstlichen Verhalten bei erwachsenen Nachkommen von Ratten führt [62]. Rodriguez et al. konnten zeigen, dass eine chronische Immobilisierung während des zweiten und dritten Schwangerschaftsdrittels (E7-21) eine deutliche Reduktion des Plasma-

Testosteronspiegels bei männlichen Nachkommen von Ratten im Alter von 70 Tagen verursacht [63].

1.2.2 Tiermodelle mit genetisch verändertem Glukokortikoid-Rezeptor

Die Rolle des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) für die Ätiologie und die Entwicklung von stressbedingten psychiatrischen Störungen wie z.B. depressiver Erkrankungen wurde in mehreren Studien gezeigt [64-68].

In diesem Zusammenhang wurde die heterozygote Deletion des GR (GR +/-) als ein valides Modell verwendet, um unser Verständnis von Depression zu erweitern [66]. GR +/- Mäuse haben eine erhöhte Vulnerabilität für Stress und weisen eine Fehlregulation der HPA-Achse auf. Diese scheint sich in erster Linie zu manifestieren, wenn die Tiere mit herausfordernden Situationen durch bestimmte externe Stressoren konfrontiert sind, was die These eines Gen-Umwelt-Modells der Depression unterstützt [65]. Ridder et al. (2005) konnten ebenfalls zeigen, dass der Plasma-Kortikosteron-Spiegel nach akutem Stress in erwachsenen GR +/- Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht ist [69].

Aus diesen Gründen wurden in dieser Studie GR +/- Mäuse mit Wildtyp-Mäusen verglichen.

1.3 Ultraschall Vokalisation (USV)

1.3.1 Allgemein

Soziale Interaktionen sind bei Säugern häufig mit speziesspezifischer Vokalisation verbunden und können verschiedene Arten von Informationen übermitteln: individuelle Merkmale (Alter, Geschlecht, Körpergröße), aber auch emotionale Zustände und/oder sozialer Status spielen eine Rolle. Nagetiere emittieren Ultraschall-Laute, sogenannte Ultraschallvokalisationen (USV). Diese liegen oberhalb des für Menschen hörbaren Frequenzbereichs.

Die komplexesten stereoakustischen Signale bei Mäusen sind die Gesänge, die als nicht zufällige zeitliche Abfolge von unterschiedlichen Silbentypen definiert sind [70]. Eine Silbe ist eine Klangeinheit, die durch eine Pause von anderen Klangeinheiten getrennt ist [70]. Durch die Vielfältigkeit der unterschiedlichen Silbentypen innerhalb eines Gesanges können Rückschlüsse auf die Größe des Liedrepertoires eines Individuums gezogen werden. Die Komplexität der Song-Repertoires der Männchen beeinflusst die weibliche Partnerwahl, da sie potenzielle Informationen über Qualität, Individualität und genetische Kompatibilität liefert. Dies wurde bereits bei Vögeln [71], bei Mäusen [72] und bei Fröschen [73] beobachtet.

Bei Mäusen sind bisher verschiedene Arten der Vokalisation untersucht worden. Jungtiere produzieren USV zum Beispiel als Reaktion auf die Trennung von der Mutter, sogenannte „isolation calls“ oder „Pfeifen des Verlassenseins“. Diese Rufe werden fünf bis zwölf Tage nach der Geburt emittiert und haben eine Frequenz zwischen 40 und 70 kHz [74, 75]. Eine andere Art der Vokalisation sind die „mating songs“ bzw. „courtship vocalizations“, die im nächsten Abschnitt näher erklärt werden.

1.3.2 „Mating songs“

Die evolutionäre Funktion der USVs männlicher Mäuse ist nicht ganz geklärt. Während „mating songs“ bei Vögeln, Insekten und Fröschen weit verbreitet sind, wurden sie nur selten bei Säugetieren dokumentiert - unseres Wissens nach bisher nur bei Walen und Fledermäusen [76, 77].

Bezogen auf das Sexualverhalten sind chemosensorische Reize bei den meisten Säugetieren der Hauptmechanismus für die soziale Kommunikation. Diese Art der Kommunikation überträgt nicht nur Informationen, sie kann sogar direkt Physiologie und Verhalten der Tiere beeinflussen. Der Urin von Mäusen und Ratten zum Beispiel enthält erhebliche Mengen an Proteinen der Lipocalinfamilie, die für die Bindung und Freisetzung von Pheromonen mit niedrigem Molekulargewicht verantwortlich sind, und spielt damit bei der individuellen Identität und beim Revierverhalten eine Rolle.

Darüber hinaus haben mehrere Studien gezeigt, dass erwachsene Mäuse Ultraschall-Laute im Frequenzbereich von 40 bis 150 kHz in Anwesenheit von Weibchen bzw. deren Urin emittieren.

Obwohl beide Geschlechter USVs produzieren, wird angenommen, dass die Mehrheit der USVs während zwischengeschlechtlicher Interaktion von Männchen produziert wird [78-81]. Unterschiedliche Studien geben außerdem Hinweise darauf, dass „mating songs“ eine Rolle bei der Partnerwahl und Erkennung von Verwandten spielen: Weibchen fühlen sich von männlichen USVs angezogen und können die Laute nicht verwandter Männchen von Geschwistern unterscheiden [72]. Hammerschmidt et al. zeigten außerdem, dass „mating songs“ bei C57/BL6-Mäusen ein Annäherungsverhalten bei Weibchen auslöst [82].

Darüber hinaus scheinen USVs mit dem Grad der männlichen sexuellen Erregung zu korrelieren [83]. Es wird angenommen, dass die „mating songs“ Weibchen in

unmittelbarer Nähe des Männchens halten [84] und weibliches Kopulationsverhalten erleichtern [85].

Von Whitney et al. wurde die Hypothese formuliert [86], dass Männchen balzen, indem sie die von neugeborenen Mäusen emittierten USV imitieren. Diese USV werden von den Weibchen als attraktiv bzw. beruhigend wahrgenommen, und so wird aggressives Verhalten reduziert. Auch wurde postuliert, dass Weibchen die USV nutzen könnten, um Informationen über die Männchen zu erhalten [87-89], und somit die Verpaarung mit genetisch zu ähnlichen oder auch zu verschiedenen Artgenossen verhindern [90-92]. Weibchen könnten somit die genetische Kompatibilität ihrer Partner verbessern, Inzucht vermeiden und damit die Lebensfähigkeit ihrer Nachkommen erhöhen [93, 94].

Die Aufnahme der Vokalisation bei erwachsenen Tieren ist bis heute nicht standardisiert. Was beispielsweise die Art des weiblichen Stimulus betrifft, variieren die Versuchsprotokolle: es wird die Exposition von männlichen Mäusen mit lebendigen Weibchen, mit betäubten Weibchen oder mit weiblichem Urin eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass frischer Urin hierbei effizienter als zuvor eingefrorener Urin wirkt [95]. Es ist auch bekannt, dass die vorherigen sexuellen bzw. sozialen Erfahrungen der Männchen eine positive Wirkung auf die USV Produktion haben. Jedoch gibt es auch hier Unterschiede im genauen Ablauf: die Gewöhnung an Weibchen wird je nach Labor über mehrere Minuten bis zu mehreren Tagen [96] durchgeführt.

Zu Beginn der USV-Studien wurde der Östrogenzyklus der Weibchen in einigen Arbeitsgruppen gesteuert, in anderen wurde hierauf verzichtet. Neuere Studien zeigen, dass die weibliche Zyklusphase sowohl weibliche als auch männliche Vokalisationen beeinflusst [97].

1.3.3 Die Silbe: Erkennung und Klassifizierung

Für eine standardisierte Datenanalyse ist eine automatische Erkennung der USV zu empfehlen. Eine Automatisierung ist für klare Audio-Aufnahmen gut möglich, wie zum Beispiel bei „isolation calls“. Einschränkungen ergeben sich aus Hintergrundgeräuschen, die beispielsweise bei der freien Interaktion zwischen zwei erwachsenen Mäusen in einem Käfig mit Streu entstehen. Um dies zu verhindern, werden heutzutage mehrere Studien mit Hilfe von visueller Erkennung durchgeführt. Die Klassifizierung von Ultraschalllautäußerungen erscheint relativ schwierig und subjektiv, da es sich um ein scheinbar willkürlich abgestuftes System handelt [98]. Zwei Arten der Klassifizierung von Ultraschall-Lauten werden heute verwendet, die im Folgenden vorgestellt werden.

1.3.3.1 Visuelle Aufteilung der USV in verschiedene Silbenarten

Eine erste Tendenz war, die verschiedenen Silbenarten in verschiedene Kategorien zu unterteilen, um subtile kontext-, alters-, geschlechts-, und stammesspezifische Veränderungen im Ultraschall-Repertoire der Mäuse abzubilden. Diese Aufteilung führte zu einem Dutzend Vokalisationstypen basierend auf Kriterien wie Dauer, Frequenzmodulation und Frequenzsprüngen [99, 100]. Diese Klassifizierung ist subjektiv und die festgelegten Schwellenwerte variieren in jeder Studie, was den Vergleich der Ultraschall-Repertoires über verschiedene Studien hinweg schwierig macht.

Hierzu sollten verschiedene Begriffe definiert werden:

- Spektrogramm: Ein Spektrogramm stellt die Zusammensetzung eines Signals (zum Beispiel eines Klangs oder gesprochener Sprache) aus einzelnen Frequenzen im zeitlichen Verlauf dar.
- Frequenzsprung („step“): Zwei Elemente, die sich innerhalb einer Silbe um mindestens 10 kHz ohne zeitliche Trennung unterscheiden [70, 100].
- Amplitudenschwellenwert: Dieser in Prozent der Maximalamplitude anzugebende Schwellenwert bestimmt, ab welcher Amplitude ein Element innerhalb des Spektrogramms als solches erkannt wird. Der Schwellenwert sollte sorgfältig gewählt werden, um alle gewünschten Ereignisse zu erfassen, ohne dass jedoch irrelevante Störgeräusche die Aufzeichnung verzerren.
- Haltezeit: Immer wenn der eingestellte Schwellenwert überschritten wurde, wird eine neue Silbe erkannt. Die Datenaufzeichnung erfolgt mindestens für die hier angegebene Haltezeit. Wird der Schwellenwert innerhalb dieser Haltezeit nochmals überschritten, verlängert sich die Aufzeichnungsdauer der aktuellen Silbe entsprechend. Die Haltezeit sollte entsprechend der Struktur der aufzuzeichnenden Ereignisse so kurz wie möglich eingestellt werden, um Silben auseinander zu halten.
- Bandbreite (Bandwidth): Die Bandbreite ist eine Kenngröße in der Signalverarbeitung, die die Breite des Intervalls in einem Frequenzspektrum festlegt, in dem die dominanten Frequenzanteile eines zu speichernden Signals liegen.

1.3.3.2 Klassifizierung durch Cluster-Analyse.

Eine immer bedeutsamere Art der Analyse ist die Verwendung von Clustern (2-Schritt-Clusteranalyse) zur Definition von Silbenkategorien. Mit dieser Methode erlauben die computergesteuerten akustischen Analysen eine feine Charakterisierung der akustischen Struktur der Ultraschalllautäußerungen [70, 101]. Diese Kategorisierung ermöglicht eine statistisch objektive Einstufung auf der Grundlage der akustischen Struktur der USVs, mit automatischem Vergleich innerhalb einer Studie und weniger Verzerrung durch Ausreißer. Nichtlineare Phänomene (z.B. Größe der Frequenzsprünge, Lage der Frequenzsprünge innerhalb der Silbe) können berücksichtigt werden, sobald sie durch die akustische Analyse charakterisiert sind. Allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse dieser Klassifizierung je nach den jeweils festgelegten Variablen.

1.4 Fragestellung der Arbeit

USV in Tiermodellen stellen eine wertvolle phänotypische Dimension dar und bieten einen innovativen Einblick in die soziale und sexuelle Kommunikation von Mäusen. Einige der bisher publizierten Studien zeigen, dass USV zum größten Teil stamm-spezifisch angeboren und nur zu einem begrenzten Teil erworben sind [102-105]. In den letzten Jahren wurden neuartige statistische Verfahren entwickelt, um Silben in robuste und nicht willkürliche Repertoires zu klassifizieren.

Es sind bereits mehrere Studien veröffentlicht, die sich mit den Auswirkungen von PNS auf „isolation calls“ befassen. Eine Abnahme [57-59] bzw. eine Zunahme [60-63] der Silbenanzahl wurde nach PNS-Exposition bei den Nachkommen beobachtet. Borges et al. wiesen eine Zunahme von aversiven USV bei erwachsenen Ratten

nach pränataler Dexamethason-Injektionen in der späten Schwangerschaft nach [106]. Die Arbeitsgruppe zeigte in einem ähnlichen Experiment die Abnahme von USV in sozialen Situationen bei jugendlichen und erwachsenen Ratten nach pränataler Kortisolinjektion [107].

Nunez et al. (1984) zeigten eine deutliche Abnahme der Produktion von Paarungsgesängen nach der Kastration bei Swiss-Webster-Mäusen, aber eine erhöhte USV-Produktion nach der täglichen Behandlung mit entweder Testosteron, DHT oder Östradiol [84].

Des Weiteren wurden USV auch als Marker der Kommunikationsfähigkeit bei einem Knockout Modell für Autismus verwendet: Jamain et al. (2008) beobachteten z.B. eine erhöhte Latenzzeit und eine deutlich reduzierte Anzahl an „mating songs“ in NL-4-Knockout-Mäusen [108]. GR heterozygote Mäuse, die in unserer Studie verwendet wurden, wurden nach unserer Literaturrecherche bisher nicht in Bezug auf die Produktion von „mating songs“ untersucht.

In der vorliegenden Arbeit nahmen wir „mating songs“ bei männlichen, erwachsenen Nachkommen von GR +/+ und GR +/- Mäusen auf, die jeweils im 2. oder 3. Trimenon pränatalem Stress ausgesetzt wurden. Zusätzlich wurden der basale Testosteron- und Kortikosteron-Serumspiegel bestimmt. Dies ist außerdem die erste Arbeit, welche die Auswirkungen von PNS in Wechselwirkung mit GR-Heterozygotie bezüglich Quantität und Qualität der USV im Erwachsenenalter untersucht.

Die drei zentralen Fragestellungen unseres Projekts sind:

- Kann eine neue Art der Clusteranalyse für die Klassifikation von USV etabliert werden?
- Welchen Einfluss hat PNS im zweiten bzw. dritten Trimenon auf „mating songs“ von männlichen Tieren im jungen Erwachsenenalter?
- Spielt die GR-Mutation in diesem Rahmen eine verstärkende oder abschwächende Rolle?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Versuchsdesign

2.1.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit männlichen Mäusen der Linie C57BL/6N (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. 26 GR-heterozygote (GR +/-) und 32 Nachkommen vom Wildtyp (GR +/+) wurden während der Testperiode in standardisierten Einzelkäfigen (Macrolon-Käfige Typ 2) und unter einem regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden-Intervall zwischen sieben Uhr morgens und 7 Uhr abends) gehalten. Futter und Wasser sowie Nestbaumaterial waren für die Mäuse frei zugänglich. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Nicht mehr als ein heterozygotes oder Wildtyp-Männchen wurde pro Wurf verwendet, um den sog. „litter-effect“ [61] zu verhindern. Das Alter der Versuchstiere betrug zwischen 8 und 12 Wochen, das als junges Erwachsenenalter bei Mäusen gilt.

Alle tierexperimentellen Prozeduren wurden in Übereinstimmung mit den Tierschutzrichtlinien der Europäischen Union (EU) 2010/63/EU durchgeführt und vom lokalen Regierungspräsidium (RP Karlsruhe) genehmigt (Tierschutzantrag AZ 35-9185.81/G-225/12).

2.1.2 Zucht und Verfahren der PNS-Exposition

In der Zucht wurden weibliche GR +/+ und männliche GR +/- Mäuse eingesetzt.

Vaginal-Plugs wurden täglich überprüft und als Tag 0 des embryonalen Lebens definiert (E0), wenn diese positiv waren. Im zweiten (E7 bis E12) oder dritten (E13 bis E17) Trimenon wurden die Weibchen pränatalem Stress ausgesetzt, indem man sie dreimal täglich in einen transparenten 250 ml Glaszylinder (zwischen 8.00 und 10.00 Uhr, 12.00 Uhr und 14.00 Uhr und 16.00 Uhr und 18.00 Uhr) für je 45 Minuten platzierte. Die Zylinder waren bis zu einer Höhe von 5 mm mit kaltem Leitungswasser gefüllt und sie wurden hellem Licht von 6000 Lux ausgesetzt [59]. Die Weibchen der Kontrollgruppe wurden ungestört in ihren Käfigen gehalten.

Die schwangeren Mäuse wurden per Kaiserschnitt an Tag E18 entbunden. Das Verfahren wurde in 10-20 min (11,5 min im Durchschnitt) mit Hilfe einer Anästhesie aus Xenon und Isofluran durchgeführt, um die Nachkommen vor Hypoxie-induzierten Hirn- und Herzschäden [60] zu schützen.

Nach dem Kaiserschnitt wurden die Muttertiere geopfert und Ammen für die Jungtiere eingesetzt. Die Ammen hatten ihren eigenen Wurf 1-3 Tage (2,3 Tage im Durchschnitt) vor dem Austausch der Würfe geboren. Die Übertragung in das Nest der stillenden Ammen fand statt, nachdem die Jungtiere innerhalb 10 Minuten nach der Geburt zur Kennzeichnung tätowiert worden waren. Die tätowierten Mäuse wurden mit den ursprünglichen Nachkommen in der hohlen behandschuhten Hand gemischt, so dass sie deren Geruch annahmen.

Es ergaben sich folgende experimentelle Gruppen:

GR +/+ ohne PNS	n = 18
GR +/+ mit PNS im 2. Trimenon	n = 9
GR +/+ mit PNS im 3. Trimenon	n = 5
GR +/- ohne PNS	n = 7
GR +/- mit PNS im 2. Trimenon	n = 11
GR +/- mit PNS im 3. Trimenon	n = 8

Tabelle 1 - Übersicht Experimentelle Gruppen

2.1.3 Genetisch veränderte Tiermodelle: gewebspezifische Inaktivierung des Glukokortikoid-Rezeptors (GR)

Der gehirnspezifische Knockout von GR wurde mittels Rekombination in embryonalen Stammzellen generiert. Die detaillierte Vorgehensweise zur Erzeugung des hier untersuchten Mausmodells wurde von Tronche et al. (1999) beschrieben [109]. GR +/- Mäuse zeigen erhöhte Hilflosigkeit nach Stressbelastung und weisen, ähnlich wie depressive Patienten, eine gestörte HPA-Achse und pathologische Dexamethason- und CRH-Tests auf [69].

2.2 Standardisierte soziale und sexuelle Erfahrung

Um eine vergleichbare soziale und sexuelle Erfahrung für alle männlichen Versuchstiere zu garantieren, wurden sie im Alter von 25 bis 31 Wochen für 24 Stunden mit einer weiblichen Artgenossin in einen Einzelkäfig verbracht. Dies geschah 7 Tage vor Aufnahme der Ultraschallvokalisationen [85]. Dem Verfahren folgten sechs Tage isolierte Haltung, bevor das Männchen während des Experiments mit weiblichem Urin in Kontakt gebracht wurde [72].

2.3 Sammlung des Urins

Da das Einfrieren von Urin dessen Wirksamkeit als Stimulus männlicher USV vermindert, wurde für diese Arbeit nur frischer, nicht zuvor eingefrorener Urin verwendet [95]. Für die Uringewinnung wurden weibliche Mäuse für wenige Sekunden am Nacken über eine Aluminiumfolie gehalten. Dies reichte in der Regel aus, um eine Miktion auszulösen. Falls dies nicht der Fall war, erwies sich das sanfte Streicheln des Abdomens in anteroposteriorer Richtung in der Regel als wirksam [88]. Der Urin auf der Folie wurde sofort gesammelt und mindestens 60 µl wurden direkt von der Aluminiumoberfläche in ein Eppendorf Mikroreaktionsgefäß (Lagerung ≤ 15 min) pipettiert.

2.4 Ultraschall Vokalisationen

2.4.1 USV-Aufnahmen

Alle Aufnahmen wurden in einer isolierenden Kammer aus Styropor aufgezeichnet. Im von den Heimkäfigen getrennten Aufnahmeraum befanden sich keine weiteren Tiere. Die Lautproduktion jedes der 58 einzelnen Männchen wurde für 180 Sekunden aufgezeichnet. Die USV wurden mit zwei UltraSoundGate Kondensatormikrofonen aufgenommen (15-180 kHz, flache Frequenz, ± 6 dB), die mittig, ca. 12 cm oberhalb des Käfigdeckels, befestigt waren. Eine integrierte PC-basierte Hardware und Software für Aufnahme und Wiedergabe (Avisoft Bioakustik, Berlin, Deutschland) und eine externe Soundkarte (Edirol UA-101, 24-Bit / 192 kHz 10-in /-out 10 Halo-Speed USB-Audio-Schnittstelle for multitrack Computer-Aufnahme) wurden verwendet. Die Sampling Rate wurde bei 500 kHz im 16-bit Format eingestellt.

Zu Beginn jeder Aufzeichnungssitzung wurde ein Männchen in seinem eigenen Käfig in den Aufnahmeraum, der mit infrarotem Licht beleuchtet war, gebracht. Der Käfig wurde dann in der Mitte der Aufnahmekammer platziert. Nach einer 5-minütigen Eingewöhnungszeit wurde die Aufnahme durch die Einführung des Stimulus in Form von frischem weiblichen Urin eingeleitet.

Die Urinprobe wurde, unabhängig von der Östrusphase, aus den Proben von fünf unbekanntem Weibchen gemischt und dem Männchen auf einem Baumwolltuch präsentiert.

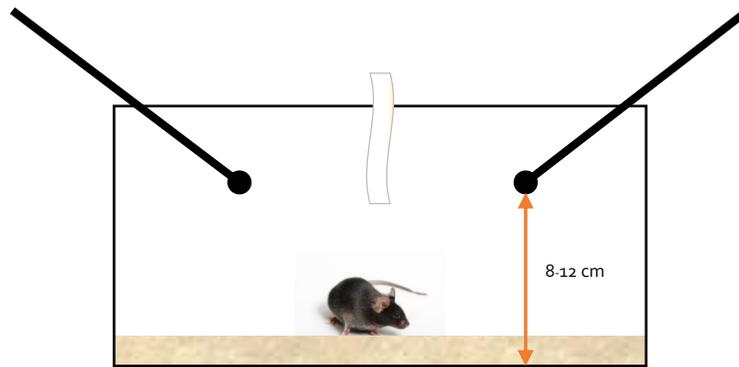


Abb. 1 Schematische Darstellung Versuchsaufbau

Die Aufzeichnung begann unmittelbar nach der Positionierung des Stimulus und dauerte jeweils 180 Sekunden.

Vor jeder Sitzung wurde die Aufzeichnungskammer mit einer 70% Ethanol-Lösung gereinigt. Alle Aufnahmen fanden zwischen 9.00 und 17.00 Uhr in der dunklen - und damit aktiven - Phase im zirkadianen Zyklus der Mäuse statt.

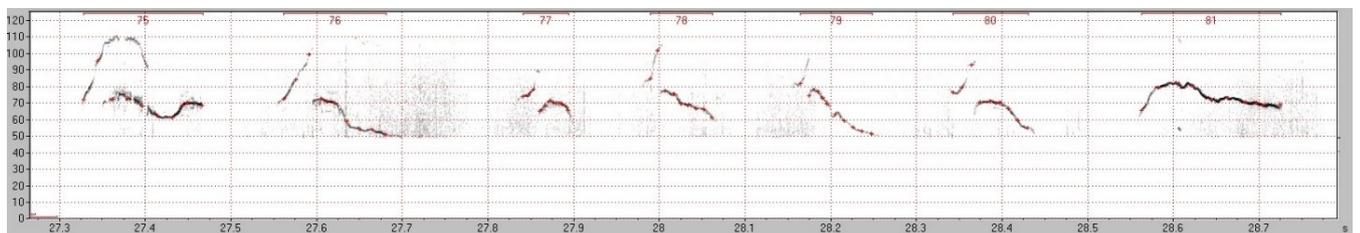


Abb. 2 Beispiel einer Abfolge von Silben. Die Silben sind automatisch durchnummeriert (75-81).

2.4.2 USV-Analysen

Die Vokalisationen wurden mit Hilfe des Programms SASLab Pro analysiert (Version 5.2.05, Avisoft Bioacoustics).

Der Beginn und das Ende der einzelnen Silben von C57/BL6 Mäuse wurden mit der „single line threshold“-Methode innerhalb der automatisierten Parametermessungen von SASLab erkannt. Signale mit Amplituden, die mehr als 10dB über dem Grundrauschen lagen, wurden mit einer 5 ms Haltezeit festgestellt, um die

Erkennung kürzerer Periode mit geringerer Intensität innerhalb einer Silbe zu ermöglichen. Haltezeit bedeutet hierbei, dass das Programm nach jeder registrierten Silbe für weitere 5ms empfindlich bleibt, um das Ende der Silbe nicht zu verpassen, falls die USV kurzzeitig unter der Registrierungsschwelle lag. Die berechneten Marker wurden visuell überprüft und alle umliegenden akustischen Signale, die durch die Bewegung einer Maus entstanden waren, entfernt.

Für jede Silbe wurde eine Vielzahl an Informationen erfasst. Dies geschah durch eine automatisierte Berechnung der Parameter in einem beschränkten Frequenzbereich (40-130kHz) des Spektrogramms (Hamming-Fenster, FFT-Länge = 1024, Rahmengröße = 100% Überlappung = 98,43%). Beispielsweise wurde die Frequenzkontur jeder Silbe mit den automatisierten Parametermessungen, einer Funktion der SASLab-Software, analysiert. Die dominante Frequenz (F0) von markierten Silben wurde automatisch an neun gleichmäßig verteilten Zeitpunkten gemessen. Diese Daten, zusammen mit der Silbendauer, Startzeit und der mittleren Grundfrequenz, wurden automatisch gespeichert.



Abb. 3 Die Neun-Punkte-Frequenzkontur wurde verwendet, um die Anzahl der diskontinuierlichen Frequenzschritte, die innerhalb einer Silbe auftreten, zu erkennen. Die roten Kreuze zeigen die automatische Messung der Neun-Punkte-Frequenzkontur

2.4.3 Statistische Auswertung mittels Cluster-Analyse

Insgesamt wurden 20.220 Silben auf der Grundlage ihrer spektro-temporalen Eigenschaften in verschiedene Kategorien eingeteilt. Als Kriterium für die diskontinuierlichen Frequenzschritte diente die Verteilung der Frequenzübergänge (FT). Die Kriterien für diese Frequenzschritte wurden für unsere Arbeit von Grimsley et al. in einer Untersuchung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Frequenzübergänge zwischen benachbarten Punkten entlang der Frequenzkontur bestimmt. Hierbei wurden keine genauen Werte für Frequenzsprünge oder für positiv bzw. negativ gerichtete Frequenzmodulation (FM) festgelegt. Um zu zeigen, dass die Übergänge bimodal verteilt sind, wurde ein Kolmogorov-Smirnov Test benutzt. Ferner wurde eine Zwei-Schritt-Clusteranalyse auf die Frequenzübergänge angewandt, was zu vier verschiedenen Gruppen oder „clustern“ führte:

- Gruppe 1: „flat calls“ – diese Kategorie enthält Silben mit einer geringen FT
- Gruppe 2: „down calls“ mit einer mittleren FT und einer negativen FM
- Gruppe 3: „stepped calls“ mit einer hohen FT
- Gruppe 4: „up calls“ – diese Kategorie umfasst alle Silben mit einer mittleren FT und einer positiven FM

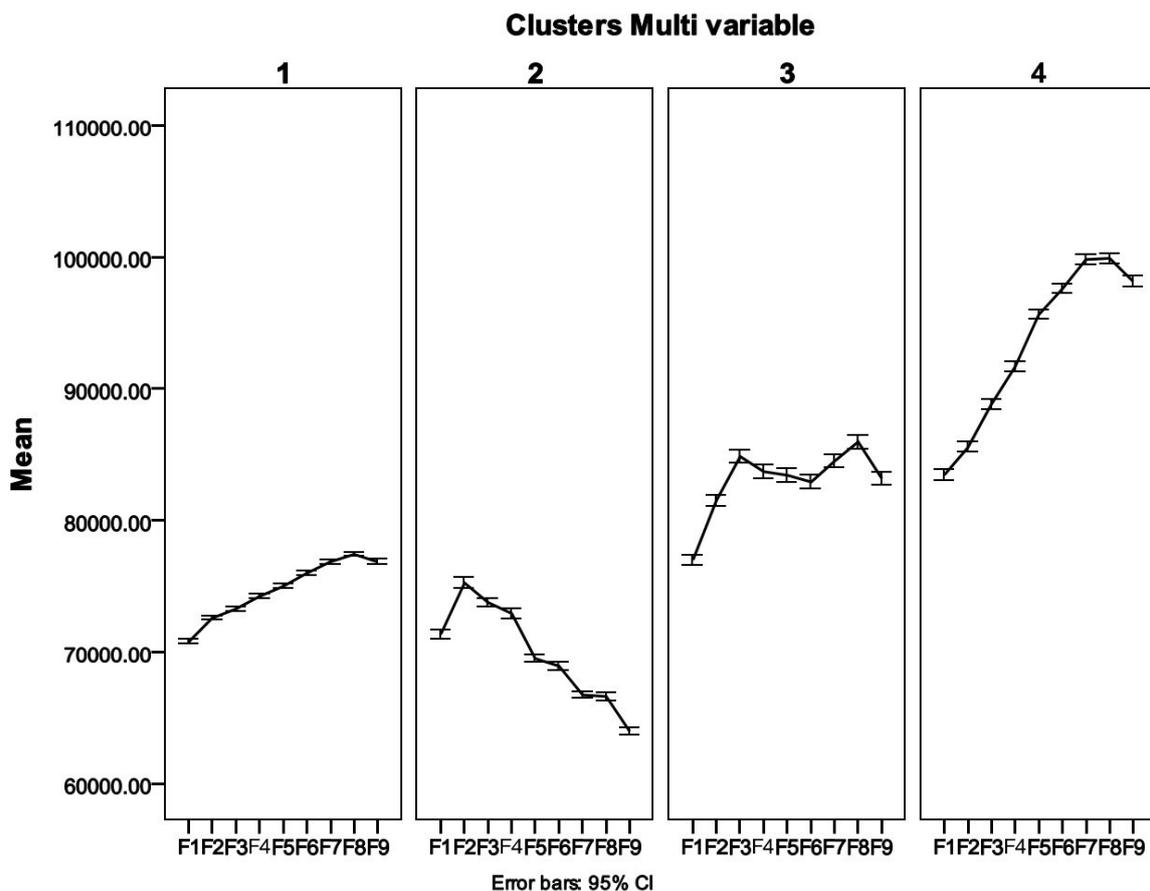


Abb. 4 Jede Silbe enthält durchschnittlich neun Punktfrequenz Konturen, mit 95% Konfidenzintervall für die vier Cluster nach der zweistufigen Cluster-Analyse.

Anschließend wurden alle unten beschriebenen ANOVAs unter Verwendung des allgemeinen linearen Modells (GLM) durchgeführt. Für den Fall, dass die Annahme parametrischer Statistiken nicht nach einer graphischen Auswertung bzgl. Homoskedastizität und Ausreißern erfüllt waren, wurden die Rohdaten nach der Box-Cox-Methode transformiert [110]. Auf der Basis eines 2x3 faktoriellen Designs wurden alle Tests unter Verwendung von zweifaktoriellen ANOVAs mit dem

Zwischensubjektfaktor "pränataler Stresszustand", bestehend aus den drei Stufen "kein Stress", "Stress im 2. Trimenon" und "Stress im 3. Trimenon" sowie dem zweiten Zwischensubjektfaktor "Genotyp" mit GR +/- und GR +/+ Männchen durchgeführt.

Für die USV-Parameter wurde mit den abhängigen Variablen "Cluster 1", "Cluster 2", "Cluster 3", "Cluster 4", "one frequency step", "multiple frequency steps", "high frequency", "low frequency", "mean duration", "bandwidth" und "number of syllables" eine multivariate Varianzanalyse (MANOVA) durchgeführt.

2.5 Kortikosteron (CORT)- und Testosteronspiegel

2.5.1 CORT-Spiegel

Alle Tiere wurden im Alter von 24 bis 36 Wochen durch Enthauptung zwischen 8.00 und 11.00 Uhr morgens getötet und ihr Rumpfblood wurde innerhalb von 30 s nach der Tötung gesammelt. Der Kortikosteron-Grundspiegel im Serum - ohne akuten Stress vor der Probenentnahme - wurde unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay-Kits (ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland) wie zuvor beschrieben bestimmt [111].

2.5.2 Testosteronspiegel

Das gesammelte Blut wurde zentrifugiert und das entstandene Serum bei - 80°C bis zur Bestimmung des Testosteronspiegels aufgehoben. Die biochemische Analyse erfolgte mit immunoradiometrischer Technik (WHO / Sigma Asso-RTGS- 768/98).

2.5.3 Statistische Analyse der CORT- und Testosteronspiegel

Für die Kortikosteron- und Testosteronspiegel wurden zweifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Aufgrund der teilweise ungleichen Stichprobengrößen wurde die Scheffé-Prozedur für die Post-hoc-Testung der Stress-Bedingung gewählt. Um zu testen, ob der Stresseffekt in einem bestimmten Genotyp signifikant auffällig war, wurden einfaktorielle univariate ANOVAs jeweils für Wildtyp- und GR +/- Tiere durchgeführt. Bei Ungleichheit der Varianzen (durch signifikante Levene-Tests angegeben) wurde stattdessen der Welch-Test verwendet. Um herauszufinden, ob der Genotyp eine signifikante Wirkung in einer der Stressgruppen hat, wurde eine zusätzliche Analyse mittels zweiseitigen t-Tests durchgeführt.

Falls erforderlich, wurden Bonferroni-Holmes Korrekturen durchgeführt.

Ein Fisher-Test wurde durchgeführt, um die Rate an Nicht-Sängern zu beurteilen.

Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde für die Berechnung von Zusammenhängen verwendet.

Als Grenzwert für statistische Signifikanz wurde in allen Tests ein p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des SPSS 21.0 Software-Pakets für Windows durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse USV

Insgesamt konnte ein signifikanter, multivariater Einfluss von pränatalem Stress auf die Qualität von „matings songs“ gefunden werden, der sich in der konsistenten Veränderung unterschiedlicher USV-Parameter widerspiegelt ($p=0,037$, Wilk's Lambda).

Der anschließend durchgeführte zweifache, einfaktorielle ANOVA-Test ergab signifikante Effekte der pränatalen Stressexposition auf die Emission folgender Vokalisationsparameter: „prozentueller Anteil an Cluster 1 Silben“ ($F_{5,51}=4,014$, $p=0,024$), „prozentueller Anteil an Cluster 3 Silben“ ($F_{5,51}=5,582$, $p=0,006$), „prozentueller Anteil an multiplen Frequenzsprüngen“ ($F_{5,51}=3,870$, $p=0,027$), „prozentueller Anteil an Niedrigfrequenzsilben“ ($F_{5,51}=4,185$, $p=0,021$) und Bandbreite ($F_{5,51}=6,051$, $p=0,004$) (Abb. 5 A-E).

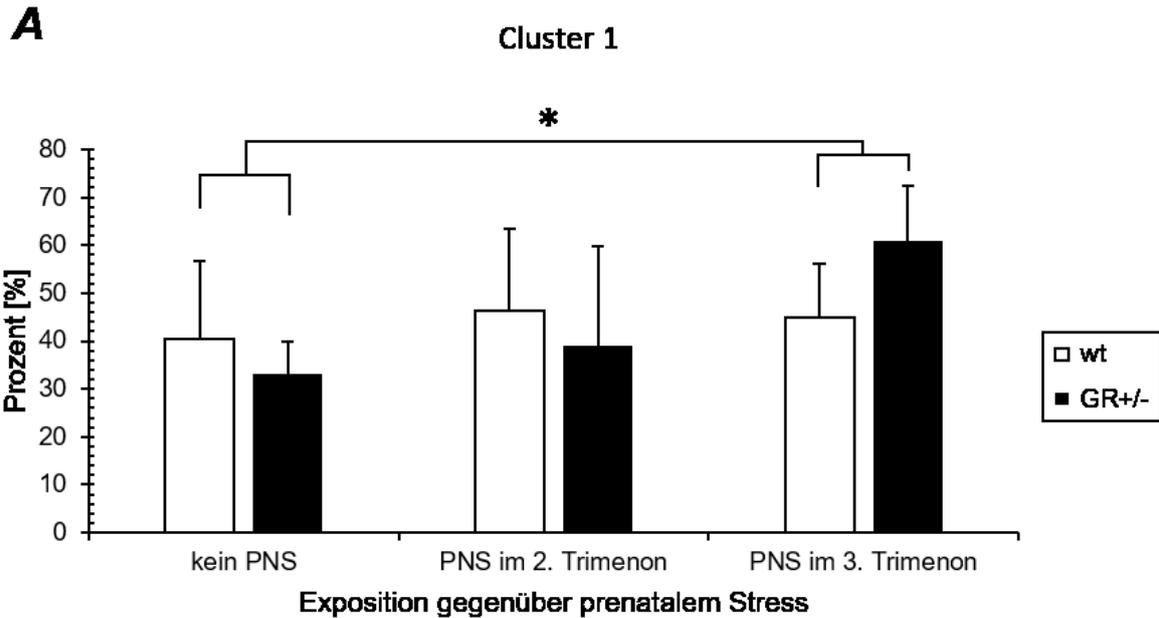


Abb. 5.A Cluster 1: Pränataler Stress hat einen wesentlichen Einfluss auf den prozentuellen Anteil von Cluster 1 Silben ($F_{5,51} = 4,014$; $p = 0,024$). Im 3. Trimenon gestresste Männchen zeigten einen signifikant höheren Prozentsatz an Cluster 1 Silben als die Kontrollgruppe (post-hoc Scheffé -Test: $p = 0,014$).

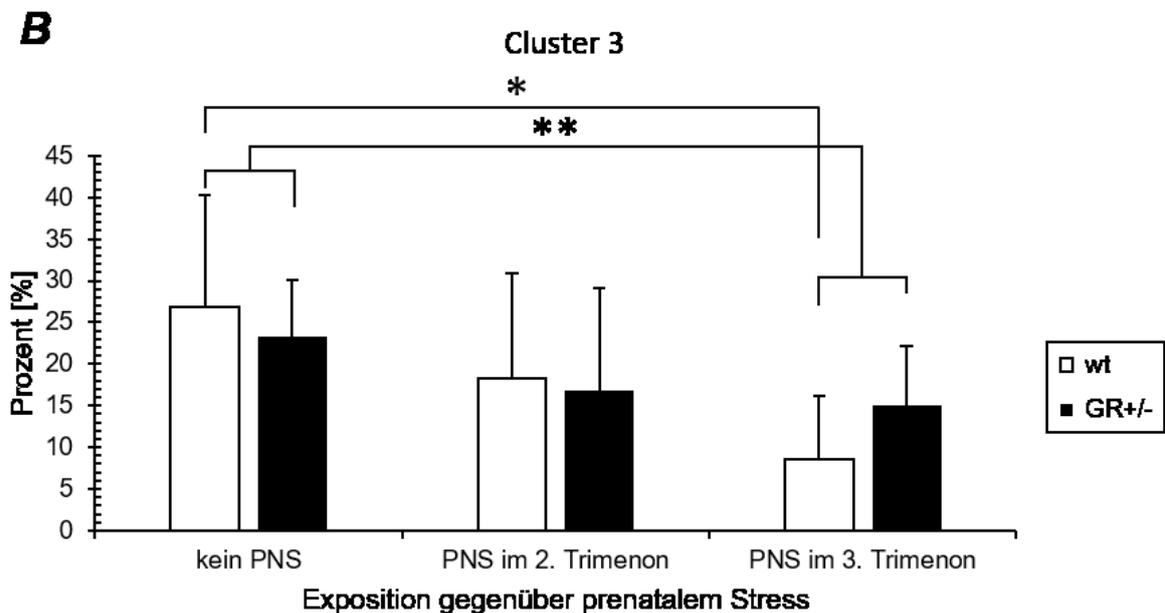


Abb. 5.B Cluster 3: PNS hat einen wesentlichen Einfluss auf die Häufigkeit von Cluster 3 Silben ($F_{5,51} = 5,582$; $p = 0,006$). Der Scheffé Post-hoc-Test zeigte, dass Mäuse mit 3. Trimenon PNS einen deutlich geringeren Anteil an Cluster 3 Silben produzieren als Tiere ohne PNS ($p = 0,005$). Dieser Unterschied war stärker ausgeprägt bei den Wildtypen als bei GR heterozygoten Tieren ($F_{2,28} = 4,567$, $p = 0,019$), die eine signifikant geringere Produktion von Cluster 3 Silben aufwiesen, wenn sie PNS im 3. Trimenon ausgesetzt waren (post-hoc Scheffé Test: $p = 0,026$).

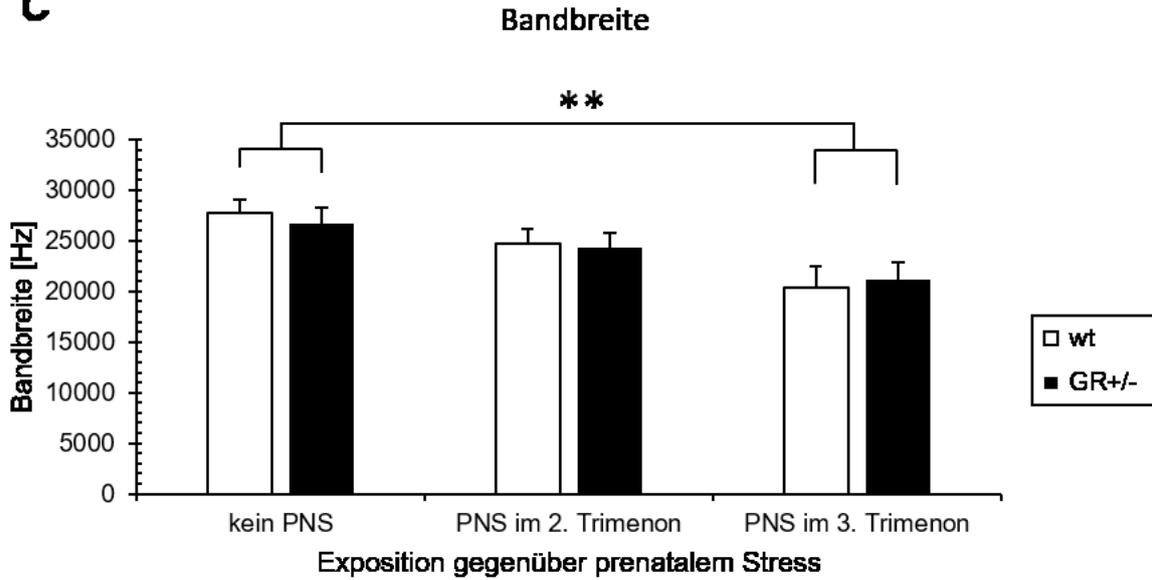
C

Abb. 5.C Bandbreite: PNS verändert die Bandbreite der männlichen „mating songs“ ($F_{5,51} = 6,051$, $p = 0,004$): bei Tieren mit 3. Trimenon PNS zeigte sich eine deutlich geringere Bandbreite als bei den Tieren ohne pränatalen Stress (post-hoc Scheffé Test: $p = 0,002$).

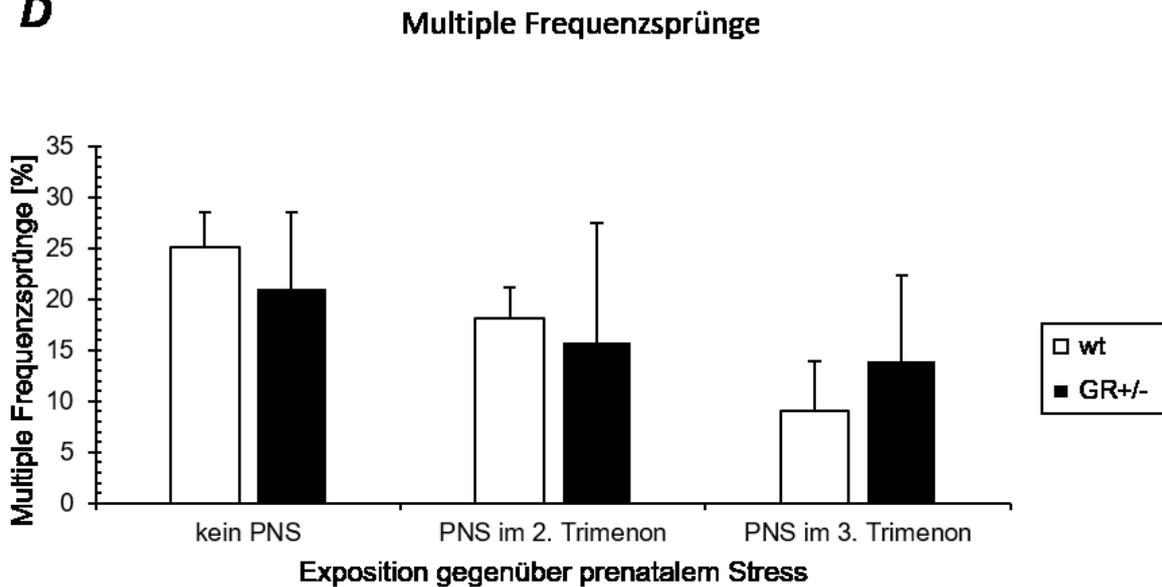
D

Abb. 5.D Multiple Frequenzsprünge: Der prozentuelle Anteil von Silben mit multiplen Frequenzsprüngen wurde signifikant durch PNS verringert ($F_{5,51}=3,870$; $p=0,027$).

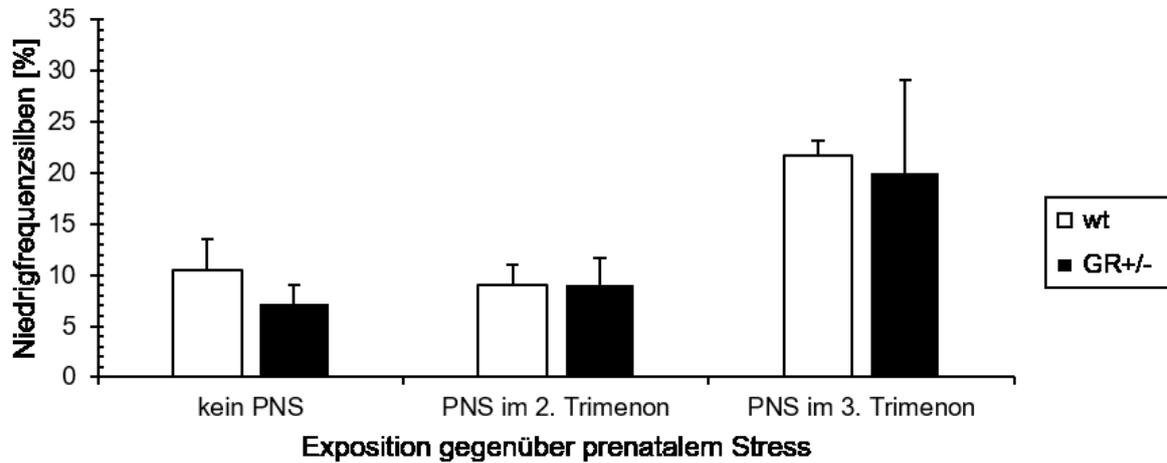
E**Niedrigfrequenzsilben**

Abb. 5.E Niedrigfrequenzsilben: PNS im 3. Trimenon führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl produzierter Silben mit niedriger Frequenz ($F_{5,51}=4,185$; $p=0,021$).

Für den Anteil an Cluster 2 Silben ($F_{5,51} = 0,307$, $p = 0,737$), Cluster 4 Silben ($F_{5,51} = 0,405$, $p = 0,669$), hochfrequenten Silben ($F_{5,51}=0,790$, $p=0,459$), Silben mit einem einzelnen Frequenzsprung ($F_{5,51}=0,158$, $p=0,854$) sowie die mittlere Silbendauer ($F_{5,51}=0,118$, $p=0,889$) wurden keine signifikanten Auswirkungen von Stress und GR Mutation festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Ein post-hoc Scheffé Test zeigte, dass Mäuse mit PNS im 3. Trimenon einen signifikant höheren Prozentsatz von Cluster 1 Silben, bestehend vorwiegend aus „flat calls“, produzieren als ihre pränatal unbelasteten Artgenossen (Mittelwert kein PNS=38,23%, Standardabweichung kein PNS=14,40, Mittelwert PNS 3. Trimenon=54,73%, Standardabweichung PNS 3. Trimenon=13,53; Zunahme=30,15%; $p=0,014$).

Post-hoc-Tests für die Cluster 3 Silben zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren mit PNS im 3. Trimenon, aber dieses

Mal zeigen die gestressten Tieren einen signifikant geringeren Prozentsatz an Cluster 3 Silben im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Mittelwert kein PNS=25,84%, Standardabweichung kein PNS=11,78, Mittelwert PNS 3. Trimenon=12,47%, Standardabweichung PNS 3. Trimenon=7,79; Abnahme=51,74%; $p=0,005$).

Dieser Unterschied ist bei den Wildtyp-Mäusen besonders stark ausgeprägt: eine anschließende einfache ANOVA zeigte hier eine signifikant niedrigere Produktion von Cluster 3 Silben bei den Mäusen mit PNS im 3. Trimenon ($F_{2,28} = 4,567$, $p = 0,019$) im Vergleich zu den nicht gestressten Tieren (Mittelwert kein PNS=26,86%, Standardabweichung kein PNS=13,38, Mittelwert PNS 3. Trimenon=8,48%, Standardabweichung PNS 3. Trimenon=7,61; Abnahme=68,43%; $p=0,026$).

Auch Tiere mit PNS im 2. Trimenon produzierten mehr Cluster 1 sowie weniger Cluster 3 Silben als ihre nicht gestressten Artgenossen, diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 5.A und 5.B).

Auch die Bandbreite der USVs wurde von pränatalem Stress beeinträchtigt, der Post-hoc-Scheffé Test zeigte eine Abnahme der Bandbreite bei Mäusen mit PNS im 3. Trimenon im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert kein PNS=27415,46 Hz, Standardabweichung kein PNS=5145,70, Mittelwert PNS 3. Trimenon=20869,85 Hz, Standardabweichung PNS 3. Trimenon=4207,34; Abnahme=23,88%; $p=0,002$). Wieder lagen die Ergebnisse der Tiere mit PNS im 2. Trimenon zwischen den beiden Gruppen und erreichten keine statistische Signifikanz (Abb. 5.C).

Der Anteil von Silben mit multiplen Frequenzsprüngen nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe ab und der Anteil an Silben mit niedriger Frequenz nahm zu, wenn die Tiere im 3. Trimenon gestresst wurden. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 5.D und 5.E).

Der Genotyp hatte keinerlei Einfluss auf die Gesamtanzahl von emittierten „mating songs“ Silben. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen PNS Bedingung und Genotyp gefunden werden.

Die jeweilige Rate an Nicht-Sängern, also die Rate von Tieren, die nach Stimulation mit dem Urin-Streifen keine USV produziert haben wurde berechnet. Ein Fisher-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen gestressten und nicht gestressten oder GR +/+ und GR +/- Tieren (Daten nicht gezeigt).

3.2 Hormone

3.2.1 Kortikosteron

Insgesamt zeigten GR +/- Tiere signifikant höhere Plasma-Kortikosteron-Spiegel als GR ++ Tiere (Mittelwert GR ++=80,53 ng/ml, Standardabweichung GR ++=71,44, Mittelwert GR +/-=153,33 ng/ml, Standardabweichung GR +/-=63,01, Zunahme=90,40%; $F_{5,47}=21,963$, $p<0,001$, siehe Abbildung 6.A).

Im anschließend durchgeführten t-Test konnten diese erhöhten Plasma-Kortikosteron-Spiegel bei GR +/- Männchen in der Subgruppe der im 3. Trimenon gestressten Tiere bestätigt werden (Mittelwert GR ++ PNS 3. Trimenon=38,05 ng/ml, Standardabweichung GR ++ PNS 3. Trimenon=29,00, Mittelwert GR +/- PNS 3. Trimenon=185,19 ng/ml, Standardabweichung GR +/- PNS 3. Trimenon=53,16; Zunahme=386,70%; $T(11)=-5,627$, $p<0,001$).

Auch GR +/- Tiere mit PNS im 2. Trimenon und die Kontrollgruppe zeigten erhöhte Plasma-Kortikosteron-Spiegel im Vergleich zu den GR ++ Artgenossen, allerdings erreichten diese Beobachtungen kein statistisches Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holmes Korrektur ($T(16)=-1,499$, $p=0,153$ bzw. $T(20)=2,145$, $p=0,044$).

Pränataler Stress an sich hatte keinen signifikanten Einfluss auf Kortikosteronlevel ($F_{5,47}=1,860$, $p=0,167$). Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen Kortikosteronlevel und den USV-Parametern.

Die einfaktorielle ANOVA für die Untergruppe der GR +/- Männchen zeigte jedoch eine signifikante Stresswirkung im Vergleich der PNS-Gruppen im 2. Trimenon vs. 3. Trimenon ($F_{2,21}=4,734$, $p=0,020$): Heterozygote Mäuse der 3. Trimenon PNS-

Gruppe hatten deutlich höhere Kortikosteronspiegel als heterozygote Tiere der 2. Trimenon PNS-Gruppe.

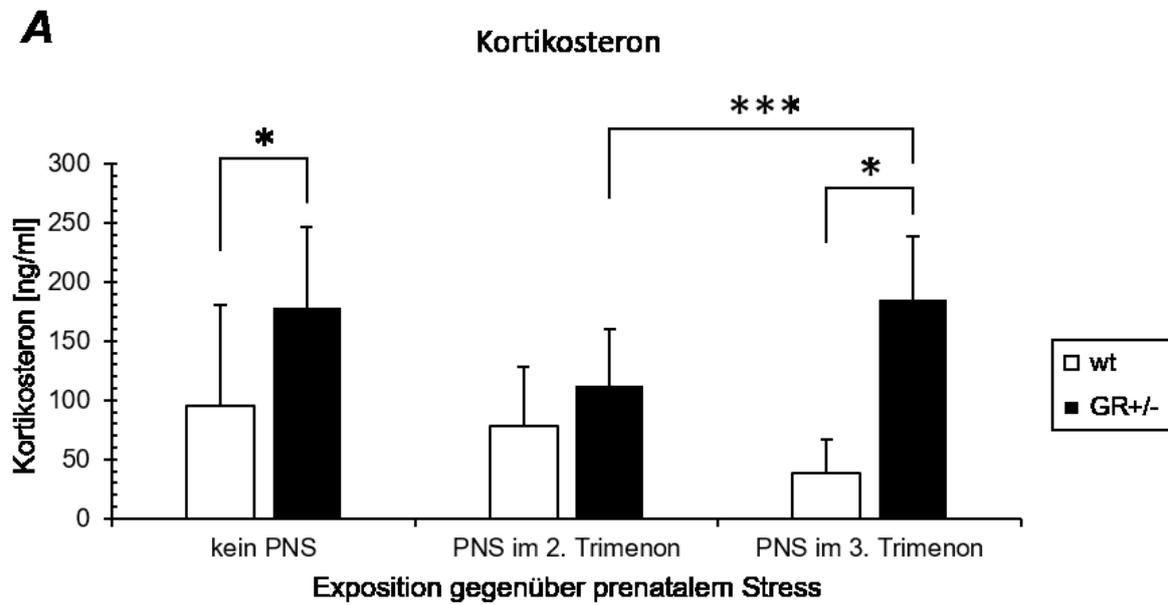


Abb. 6.A Kortikosteron: Insgesamt hatten GR +/- signifikant höhere Serum Kortikosteron Spiegel als GR +/+ Männchen ($F_{5,47} = 21,963$, $p = 0,000$). Dieser Unterschied war für die 3. Trimenon PNS Untergruppe besonders deutlich ($T(11) = -5,627$, $p = 0,000$).

3.2.2 Testosteron

Unsere Ergebnisse zeigten tendenziell höhere Testosteron-Plasmaspiegel bei GR +/- Männchen im Vergleich zu GR +/+ Tieren ($F_{5,50} = 3,216$, $p = 0,079$, s. Abb. 6.B). Weitere Analysen haben diese Tendenz besonders in der Gruppe mit PNS im 3. Trimenon bestätigt ($T(7,080) = -2,296$, $p = 0,055$) (Abb. 6.B).

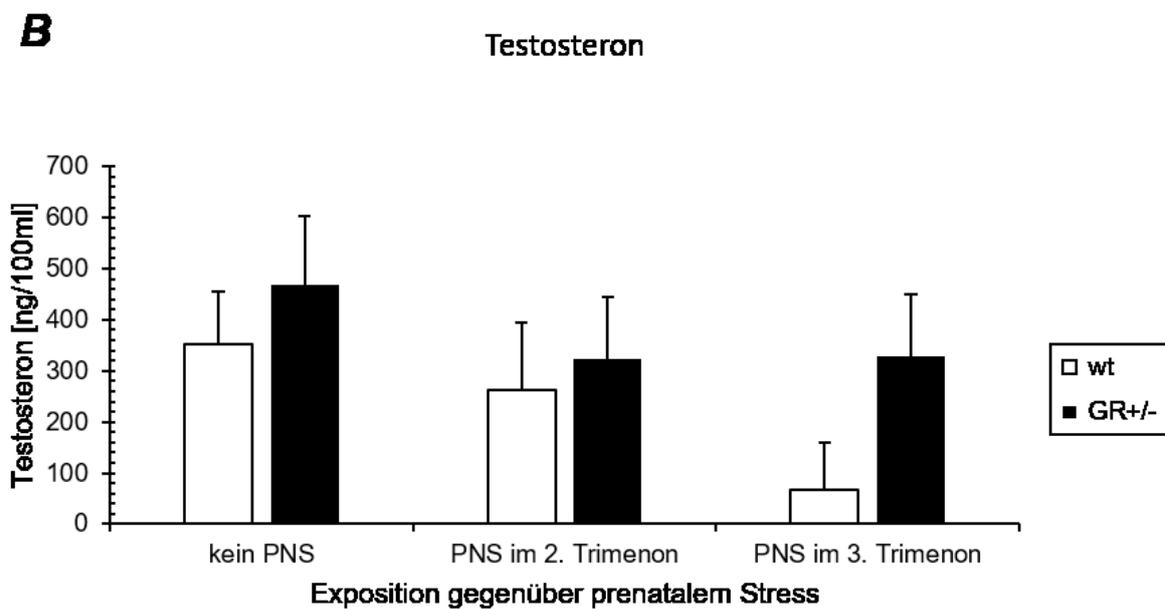


Abb. 6.B Testosteron: GR +/- Männchen haben tendenziell höhere Testosteronserumspiegel als GR +/+ Männchen ($F_{5,50} = 3,216$, $p = 0,079$), vor allem in der Untergruppe der Tiere, die im 3. Trimenon gestresst wurden ($T(7,080) = -2,296$, $p = 0,055$).

4 DISKUSSION

4.1 USV: Statistische Analyse

Die Erforschung vokaler Kommunikation in Tiermodellen bietet einen faszinierenden Weg, die neurogenetischen Grundlagen von Kommunikationsstörungen und emotionalen Störungen zu verstehen. Bisher fehlen in der Anwendung bei Mäusen jedoch standardisierte Methoden, was den Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Forschungslabore erschwert.

Nach gründlicher Literaturrecherche wurde für diese Studie eine innovative Clusteranalyse zur Klassifikation der USVs verwendet, um den Vergleich der emittierten USVs zu ermöglichen. Hiermit bauen wir auf die Arbeit von Grimsley et al. auf, die mit dieser Methode eine Alternative zur empirischen, visuellen USV-Klassifikation vorschlägt [101]. Unseres Wissens ist diese Studie die erste Arbeit, in der eine USV-Clusteranalyse bei erwachsenen Mäusen durchgeführt wird. Der Vorteil einer Clusteranalyse liegt darin, dass sich die statistische Analyse direkt an den Daten orientiert, ohne auf willkürlich definierte Kategorien angewiesen zu sein: sich ähnelnde USV-Patterns werden nach Auswertung in Clustern sortiert.

Hierbei muss bedacht werden, dass die Qualität der Clusteranalyse mit der Qualität der Tonaufnahme zusammenhängt. Das Aufnahmematerial und die Software von Avisoft-SASLab, welche für diese Arbeit verwendet wurden, sind weltweit als Standard für Tierversuche mit USV etabliert. Dennoch bleiben physikalische, materialunabhängige Variablen, die nicht kontrolliert werden können. Aus diesem Grund mussten alle Spektrogramme manuell kontrolliert und korrigiert werden. Häufige Fehler waren:

- Die erkannte Start/Stop Grenze einer automatisch erkannten Silbe variiert stark je nach ausgewähltem Amplitudenschwellenwert. Dies kann zu einer leicht verlängerten bzw. verkürzten Erfassung der Silbendauer führen.
- Silben, die weniger als 5 ms voneinander getrennt sind, werden als eine Silbe gruppiert (was zu einer falschen Cluster-Zuordnung führen kann).

Um eine statistische Kohärenz der Cluster zu erreichen, muss derzeit ein noch recht hohes Maß an Variabilität innerhalb eines Clusters akzeptiert werden. Vor diesem Hintergrund ist die in dieser Studie angewandte Methode der automatisierten Silbenklassifizierung mit manueller Korrektur die aktuell beste Möglichkeit, einen Einblick in die genetischen und physiologischen Mechanismen der Kommunikation von Mäusen zu gewinnen.

Dennoch ist die USV-Analyse ein junges und schnell wachsendes Forschungsfeld. Im Gegensatz zu den gut etablierten und standardisierten Verhaltenstests bei Mäusen fehlen bisher einheitlich verwendete Methoden und Standards. Fortwährend werden neue Analysetools entwickelt: es ist anzunehmen, dass es hier in den nächsten Jahren interessante neue Entwicklungen und eine Etablierung von Standardprozeduren geben wird.

Eine Alternative zu unserer Cluster-Methode wäre gewesen, einzelne Silben manuell zu klassifizieren. Diese Methode erschien uns jedoch zu uneinheitlich und subjektiv. Dass eine hierarchische Cluster-Analyse eine gute Wahl bei der Auswertung von USVs ist, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [112].

4.2 Das dritte Trimenon: Eine kritische Periode

In der vorliegenden Studie haben wir zum ersten Mal gezeigt, dass pränataler Stress im 3., nicht aber im 2. Trimenon zu einer qualitativen Veränderung der „mating songs“ der erwachsenen männlichen C57BL/6N Mäusenachkommen führt.

Tiere, die während des 2. Trimenons PNS ausgesetzt waren, zeigten für die meisten Parameter Werte, die zwischen denen nicht gestresster und im 3. Trimenon gestresster Tiere liegen. Dies deutet, dass der empfindlichste Zeitraum in der Entwicklung (bezüglich der späteren „mating songs“) das 3. Trimenon ist, leichte Effekte jedoch auch bei PNS im 2. Trimenon im Sinne eines intermediären Phänotyps auftreten.

Dies steht im Einklang mit dem Befund, den Koenig et al. in Rattenversuchen feststellten [113]: nur pränataler Stress im 3., nicht aber im 2. Trimenon führte zu einem Anstieg von Glukokortikoiden nach akutem Stress im Erwachsenenalter. Die Autoren erklären dieses Ergebnis damit, dass MR- und GR- Rezeptoren im Rattengehirn erst während der letzten Schwangerschaftswoche exprimiert werden [114]. Weiterhin zeigten Chung et al., dass beim „restraint“-Stress eine Dysregulation der HPA-Achse bei Mäusen mit einer Herunterregulation von MR- und GR-Rezeptoren assoziiert ist [115].

Es gibt zudem Hinweise darauf, dass es gegen Ende der Schwangerschaft bei Nagern zu einem steilen Anstieg, einem sogenannten „spike“, der ACTH- und Kortikosteron-Produktion kommt; bei Menschen und Meerschweinchen hingegen treten diese „spikes“ eher in den frühen postnatalen Stunden auf [116]. Auch dies

trägt dazu bei, das 3. Trimenon bei Mäusen als kritische Phase der Entwicklung anzusehen.

Die fetale Entwicklung des Mäusegehirns im dritten Trimenon entspricht etwa der Gehirnentwicklung des Menschen im zweiten Trimenon [117]. Ward und Weisz konnten zeigen, dass PNS bei Ratten den fetalen Testosteronanstieg im 3. Trimenon zeitlich nach hinten verschiebt [118]. Diese Verschiebung stört die normale Entwicklung der physiologisch nach rechts betonten Asymmetrie der Hirnrinde [119]. Chura et al. waren die ersten und bisher einzigen Forscher, die diese zeitliche Entwicklung beim Menschen untersuchten: interessanterweise zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen fetalem Testosteronlevel im zweiten Trimenon und Asymmetrie des Corpus callosum bei 8- bis 11-jährigen Jungen [120]. Der Isthmus des Corpus callosum ist wahrscheinlich bei der Entwicklung von Empathie und Sprache beteiligt, die auch bei der Produktion von „mating songs“ durch männliche Mäuse als relevante Funktionen in Betracht gezogen werden könnten.

4.3 PNS und für „mating songs“ wichtige anatomische Strukturen

Belnoue et al. zeigten, dass PNS weder auf das olfaktorische Kurzzeit-Gedächtnis, noch auf die olfaktorische Diskriminierung eine Wirkung ausübt [121]. Die Amygdala als Projektionsort olfaktorischer Reize hingegen wird durch PNS in ihrer Funktion gestört: PNS hat einen deutlichen Einfluss auf deren KCC2- und NKCC1-Transporter, die die GABAerge Funktion regulieren [122]. Amygdala-Läsionen wiederum verursachen eine gestörte USV-Produktion sowie ein vermindertes Kopulationsverhalten [123]. Die mediale präoptische Region bzw. der anteriore Hypothalamus (MPOA/HA) spielen eine Rolle bei der Motivation für sexuelles Verhalten und besitzen eine neuronale Verknüpfung mit der Amygdala [124].

Der Hypothalamus und dessen Nuclei werden zwischen E10 und E16, also im dritten Trimenon, gebildet [125]. Es ist anzunehmen, dass PNS besonders große Auswirkungen zeigt, wenn er während der Entwicklung der für USV relevanten neuronalen Systeme stattfindet.

4.4 Kortikosteron und Testosteron

Entgegen unserer Erwartung wurde der Kortikosteronspiegel allein durch PNS nicht erhöht. Allerdings konnten wir einen signifikant erhöhten Kortikosteronspiegel bei GR +/- Männchen entdecken, wenn diese im dritten Trimenon gestresst wurden. Dies weist auf einen spezifischen Effekt von PNS bei GR heterozygoten Tieren hin und bestätigt frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass GR +/- Männchen eine erhöhte Stressempfindlichkeit zeigen [69].

Die Testosteronserumspiegel wurden nicht durch pränatalen Stress beeinflusst und zeigten lediglich eine tendenziell signifikante Korrelation mit zwei Parametern der USVs. Dennoch wurde, wie bei Kortikosteron, eine statistische Tendenz im Sinne einer Spiegelerhöhung bei GR +/- Männchen beobachtet, wenn diese im dritten Trimenon gestresst wurden. Auch hier lässt sich also eine spezifische Stresswirkung bei GR heterozygoten Mäusen vermuten.

Kortikosteron und Testosteron wurden in einer einmaligen Messung der Basalwerte ohne vorhergehenden akuten Stressor bestimmt. Die Ergebnisse – die keine signifikanten Veränderungen widerspiegeln – zeigen, dass die HPA-Achse in Wildtyp-Tieren unter Ruhebedingungen nicht gestört wird. Dies schließt jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass die hormonelle Achse unter akutem Stress durch PNS beeinflusst werden kann.

4.5 GR +/- Mäuse

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass GR +/- Männchen sich bezüglich der „mating songs“ nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheiden. Allerdings zeigten GR heterozygote Tiere, die im 3. Trimenon gestresst wurden, deutlich höhere Kortikosteronspiegel als Wildtyp-Tiere der gleichen Versuchsgruppe ($p = 0,000$). Dies ist ein bemerkenswertes Ergebnis: Ridder et al., die das Knockout-Modell als erste untersucht haben, maßen einen normal hohen basalen Kortikosteronspiegel in GR +/- Mäusen, der nur nach einer akuten Stressbelastung erhöht war [69]. Unsere Ergebnisse zeigen nun zusätzlich, dass diese Rückkopplungsstörung des HPA-Systems in GR +/- auch durch chronischen pränatalen „restraint“ Stress provoziert werden kann; nach PNS im 3. Trimenon sind erhöhte basale Kortikosteronwerte bis ins Erwachsenenalter messbar. Unsere Ergebnisse unterstützen damit die Annahme, dass dieses Tiermodell auch für Depressionsstudien geeignet ist.

Darüber hinaus steht unser Ergebnis im Einklang mit Beobachtungen von Tronche et al., die erhöhte basale Kortikosteronwerte in hirnspezifischen GR -/- Tieren gemessen haben, welche auch bei depressiven Patienten gefunden werden [109]. Boyle et al. entwickelten eine weitere Knockout-Mutante, die FBGRKO Mäuse, in denen GR nur im Vorderhirn im Alter von 4-6 Monaten ausgeschaltet wird. FBGRKO Mäuse zeigen einen deutlichen Anstieg des basalen Kortikosteronspiegels im Alter von 6 Monaten, und Kortikosteron-Spitzenlevel im Alter von 4 und 6 Monaten [126].

Erstaunlicherweise zeigten GR +/- Mäuse in unseren Versuchen nicht nur eine deutliche Steigerung der Kortikosteronwerte nach PNS im 3. Trimenon, sondern auch eine Tendenz zu erhöhten Testosteronspiegeln. Wie bereits erwähnt stören Glukokortikoide die HPG-Achse, und dies führt – neben anderen Effekten [46] – in der Regel zu einem niedrigeren Testosteronspiegel. Hagino et al. zeigten eine

Glukokortikoid-vermittelte Abnahme der Hypophysenempfindlichkeit gegenüber GnRH, und als Folge davon eine verringerte LH-Sekretion [127]. Eine mögliche Erklärung für die leicht erhöhten Serumtestosteronspiegel unserer GR-heterozygoten Tiere könnte demnach sein, dass die Glukokortikoid-Hypophysen-Interaktion durch die verminderte Expression von GR gestört ist und infolgedessen eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber GnRH nicht erfolgt.

4.6 Ausblick und Perspektive

Im Jahr 2014 haben Zampieri et al. [128] „mating songs“ in einem Down-Syndrom Ts65Dn-Knockout Modell untersucht. Sprech- und Sprachstörungen sind typische Merkmale dieser Erkrankung. Die Natur dieses Phänotyps sowie das Ausmaß, in dem sie durch oromotorische Dysfunktion und/oder Hördefizit verschärft werden, sind noch schlecht verstanden. Zampieris Gruppe fand ähnliche Ergebnisse wie wir bei unseren PNS Tieren: sowohl die minimalen, als auch die maximalen Spitzenfrequenzen von Ts65Dn-Silben waren niedriger bei den Knockout-Mäusen als bei den Kontrollmäusen. Ts65Dn-Tiere produzierten außerdem weniger „Multiple Frequenzsprünge“ als die Wildtyp-Gruppe.

Interessanterweise berichten ältere Studien mit erwachsenen menschlichen Down-Syndrom Patienten über niedrigere Grundfrequenzen im Vergleich zu Kontrollen [129, 130].

Die Mehrzahl der Studien, die die Wirkung von pränatalem Stress auf USV bei Mäusen messen, konzentrieren sich auf die sogenannten „isolation calls“ [100]. Studien, die „mating songs“ in Knock-out-Modellen für Autismus [108, 131] oder zum Beispiel bei hormoneller Manipulation [84] untersuchten, fanden vor allem eine

verminderte Quantität der USV (in Form einer gesenkten Gesamtzahl der produzierten Silben).

Matsumoto et al. demonstrierten 2009, dass Amygdala-Läsionen zu einer Reduzierung der mittleren Silbendauer sowie zu einer niedrigeren Rate an langen Silben in „mating songs“ bei C57/BL6-Mäusen führt. Die Autoren spekulieren, dass ein verringertes Kopulationsverhalten, welches in der Regel mit langen Silben in „mating songs“ zusammenhängt, sowie ein Mangel an Emotionalität aufgrund der Zerstörung der Amygdala die Ursache für die veränderten Ultraschallvokalisationen sind [123].

Die bisher einzige Studie, die den Einfluss von PNS auf „mating songs“ bei Mäusen untersucht, wurde von D'Amato durchgeführt: nach Kochsalz-Injektionen zur Stressinduktion während der Schwangerschaft zeigten die Nachkommen keine Änderung der USV-Quantität im Erwachsenenalter [87]. Diese frühe Studie hat allerdings die spectro-temporalen USV-Eigenschaften nicht berücksichtigt. Auch wir konnten keine quantitativen Veränderungen bei den „mating songs“ feststellen. Jedoch beobachteten wir in unserem Experiment signifikante qualitative Veränderungen nach pränatalem Stress im dritten Trimenon: ein erhöhter Anteil der „Cluster 1“-Silben, bestehend hauptsächlich aus flat calls, ein verringerter Prozentsatz der „Cluster 3“-Silben mit überwiegend gestuften Silben, und eine reduzierte Bandbreite an verschiedenen Silbenarten wurden gemessen. Pränataler Stress führte darüber hinaus zu einer Erhöhung des Anteils von Silben mit niedrigen Frequenzen und einer Erniedrigung des Anteils von Silben mit multiplen Frequenzsprüngen, wobei jedoch kein Signifikanzniveau erreicht wurde.

Da diese Studie die erste Arbeit ist, welche die USV-Silben erwachsener Mäuse mithilfe einer Clusteranalyse auswertet, ist ein direkter Vergleich der Cluster 1 und 3 mit anderen Studien nicht direkt möglich. Jedoch zeigt Cluster 1 viele Ähnlichkeiten

mit der bisher häufig verwendeten Kategorie der flachen Silben und Cluster 3 mit gestuften Silben [82, 100, 132].

Es kann angenommen werden, dass Veränderungen dieser Art von Silben in „mating songs“ spezifische Marker für PNS sind. Die in unserer Studie beobachtete reduzierte Anzahl von Silben mit „Multiplen Frequenzsprüngen“, die verminderte Bandbreite sowie das erhöhte Auftreten von „Niedrigfrequenzsilben“ in „mating songs“ nach PNS im 3. Trimenon wurden bisher nicht beschrieben. Jedoch zeigten Grimsley et al. eine größere Häufigkeit von „Niedrigfrequenzsilben“ (unterhalb 50 kHz) kurz nach akuter Stressbelastung, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt [133]. Der Anteil an „Niedrigfrequenzsilben“ könnte demnach als genereller Indikator für Stress in USV bei Mäusen dienen.

Auch die Anzahl von „Multiplen Frequenzsprüngen“ sowie die Bandbreite der Silben scheinen stressrelevante USV-Parameter darzustellen: während Grimsley et al. einen Anstieg der Parameter nach akutem Stress zeigten, beobachteten wir eine Reduktion nach PNS. Es wäre daher denkbar, dass die Parameter dem gleichen zeitlichen Verlauf wie die Hilflosigkeit folgen (z.B. im „forced swim test“) und einen Anstieg zu Beginn der Belastung sowie eine Abnahme über die Zeit zeigen.

In der Zukunft könnten die qualitativen Auswirkungen von PNS auf „matings songs“ auch über Videoüberwachung, z.B. des weiblichen Annäherungsverhaltens als Reaktion auf männliche „matings songs“ erfolgen. Auch Paarungserfolg könnte untersucht werden, indem beispielsweise das Kopulationsverhalten und die Befruchtungsraten männlicher Mäuse, welche veränderte USVs produzieren, beobachtet wird.

Insgesamt haben wir festgestellt, dass PNS während des dritten Trimenons zu qualitativen Veränderungen von „matings songs“ bei männlichen Mäusen im Erwachsenenalter führt. Dabei gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen

pränatalem Stress und veränderten neuroendokrinen Signalwegen (insbesondere für Serotonin, Östrogene und Androgene), der in der Zukunft näher untersucht werden sollte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Stress während der pränatalen Periode hat verschiedene Auswirkungen auf das soziale und sexuelle Verhalten bei den Nachkommen von Mensch und Tier. Die vorliegende Studie untersucht die Auswirkungen von chronischem „restraint“ Stress im zweiten versus dritten Trimenon der Schwangerschaft auf die Produktion von Ultraschallvokalisationen männlicher C57BL/6N Mäuse im Erwachsenenalter. Hierfür wurde eine neuartige Cluster Analyse entwickelt und genutzt. Außerdem wurde der Einfluss einer heterozygoten Mutation des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) auf die Vokalisation analysiert. Schließlich wurden auch Kortikosteron- und Testosteronspiegel gemessen.

Pränataler Stress im dritten, nicht aber im zweiten Trimenon führt zu einer signifikanten qualitativen Veränderung der Ultraschallvokalisationen der Mäuse, unabhängig von ihrem GR-Genotyp.

Der Kortikosteron-Serumspiegel bei pränatal im 3. Trimenon gestressten Tieren ist signifikant erhöht. Der Testosteron-Serumspiegel bei GR +/- Männchen ist im Vergleich zu Wildtypen tendenziell erhöht, während pränataler Stress hierauf keinen Einfluss zeigt.

Pränatale Stress-Exposition im dritten Trimenon ändert die "mating songs" erwachsener Männchen qualitativ und signifikant.

Zuletzt zeigen wir erstmals erhöhte basale Kortikosteronspiegel in GR +/- Männchen nach pränatalem Stress, was darauf hindeutet, dass das GR +/- Mausmodell der Depression auch als Modell für pränatalen Stress bei männlichen Nachkommen dienen könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Weinstock, M., *Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring*. Progress in Neurobiology, 2001.
2. Mueller, B.R. and T.L. Bale, *Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent*. Physiol Behav, 2007. **91**(1): p. 55-65.
3. Coulon, M., et al., *Effects of prenatal stress and emotional reactivity of the mother on emotional and cognitive abilities in lambs*. 2015(1098-2302 (Electronic)).
4. Akatsu, S., et al., *Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice*. Neurosci Res, 2015.
5. Ellis, L. and S. Cole-Harding, *The effects of prenatal stress, and of prenatal alcohol and nicotine exposure, on human sexual orientation*. Physiol Behav, 2001. **74**(1-2): p. 213-26.
6. Pawluski, J.L., et al., *Effects of stress early in gestation on hippocampal neurogenesis and glucocorticoid receptor density in pregnant rats*. Neuroscience, 2015. **290**: p. 379-388.
7. Vallée, M.M., S.; Dellu, F., *long term effect of prenatal stress*. 1999.
8. Weinstock, M., *The long-term behavioural consequences of prenatal stress*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(6): p. 1073-86.
9. Ward, I.L., et al., *Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors*. Behav Neurosci, 1994. **108**(6): p. 1188-95.
10. Ward, O.M.E., *Naltrexone Blocks the Effects of Prenatal Stress on Sexual Behavior Differentiation in Male Rats*. 1986.
11. Ward, I.L. and J. Reed, *Prenatal stress and prepubertal social rearing conditions interact to determine sexual behavior in male rats*. Behav Neurosci, 1985. **99**(2): p. 301-9.
12. Lee, P.R., et al., *Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin*. Brain Res, 2007. **1156**: p. 152-67.
13. Vallée, M.M., W., *Prenatal Stress Induces High Anxiety and Postnatal Handling*. The Journal of Neuroscience, 1997.

14. Kofman, O., *The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders*. Neuroscience and biobehavioral reviews, 2002.
15. Ellis, L., et al., *Sexual Orientation of Human Offspring May Be Altered by Severe Maternal Stress during Pregnancy*. The Journal of Sex Research, 1988. **25**(1): p. 152-157.
16. Kaiser, S. and N. Sachser, *Social stress during pregnancy and lactation affects in guinea pigs the male offsprings' endocrine status and infantilizes their behaviour*. Psychoneuroendocrinology, 2001. **26**(5): p. 503-19.
17. Bailey, J.M., L. Willerman, and C. Parks, *A test of the maternal stress theory of human male homosexuality*. Arch Sex Behav, 1991. **20**(3): p. 277-93.
18. de Weerth, C., Y. van Hees, and J.K. Buitelaar, *Prenatal maternal cortisol levels and infant behavior during the first 5 months*. Early Hum Dev, 2003. **74**(2): p. 139-51.
19. Huizink, A.C., et al., *Psychological measures of prenatal stress as predictors of infant temperament*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2002. **41**(9): p. 1078-85.
20. Rieger, M., et al., *Influence of stress during pregnancy on HPA activity and neonatal behavior*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1032**: p. 228-30.
21. St James-Roberts, I. and S. Conroy, *Do pregnancy and childbirth adversities predict infant crying and colic? Findings and recommendations*. Neurosci Biobehav Rev, 2005. **29**(2): p. 313-20.
22. Gutteling, B.M., et al., *The effects of prenatal stress on temperament and problem behavior of 27-month-old toddlers*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2005. **14**(1): p. 41-51.
23. O'Connor, T.G., et al., *Maternal antenatal anxiety and children's behavioural/emotional problems at 4 years. Report from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children*. Br J Psychiatry, 2002. **180**: p. 502-8.
24. O'Connor, T.G., et al., *Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: a test of a programming hypothesis*. J Child Psychol Psychiatry, 2003. **44**(7): p. 1025-36.
25. Van den Bergh, B.R., et al., *High antenatal maternal anxiety is related to impulsivity during performance on cognitive tasks in 14- and 15-year-olds*. Neurosci Biobehav Rev, 2005. **29**(2): p. 259-69.
26. Niederhofer, H., *A longitudinal study: some preliminary results of association of prenatal maternal stress and fetal movements, temperament factors in early*

- childhood and behavior at age 2 years.* Psychol Rep, 2004. **95**(3 Pt 1): p. 767-70.
27. Glover, V., et al., *Antenatal maternal anxiety is linked with atypical handedness in the child.* Early Hum Dev, 2004. **79**(2): p. 107-18.
 28. Obel, C., et al., *Psychological factors in pregnancy and mixed-handedness in the offspring.* Dev Med Child Neurol, 2003. **45**(8): p. 557-61.
 29. Lee, C.Y., Y.Y. Chang, and F.W. Lung, *The marriage-related risk factors during maternal pregnancy in children with attention-deficit hyperactivity disorder.* Child Care Health Dev, 2006. **32**(2): p. 205-11.
 30. Rodriguez, A. and G. Bohlin, *Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children?* J Child Psychol Psychiatry, 2005. **46**(3): p. 246-54.
 31. Van den Bergh, B.R. and A. Marcoen, *High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8- and 9-year-olds.* Child Dev, 2004. **75**(4): p. 1085-97.
 32. van den Bergh, B.R., et al., *ADHD deficit as measured in adolescent boys with a continuous performance task is related to antenatal maternal anxiety.* Pediatr Res, 2006. **59**(1): p. 78-82.
 33. Buitelaar, J.K., et al., *Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants.* Neurobiol Aging, 2003. **24 Suppl 1**: p. S53-60; discussion S67-8.
 34. Gutteling, B.M., et al., *Does maternal prenatal stress adversely affect the child's learning and memory at age six?* J Abnorm Child Psychol, 2006. **34**(6): p. 789-98.
 35. Mennes, M., et al., *Long-term cognitive sequelae of antenatal maternal anxiety: involvement of the orbitofrontal cortex.* Neurosci Biobehav Rev, 2006. **30**(8): p. 1078-86.
 36. Laplante, D.P., et al., *Stress during pregnancy affects general intellectual and language functioning in human toddlers.* Pediatr Res, 2004. **56**(3): p. 400-10.
 37. Hines, M., et al., *Prenatal Stress and Gender Role Behavior in Girls and Boys: A Longitudinal, Population Study.* Hormones and Behavior, 2002. **42**(2): p. 126-134.
 38. Ishikawa, M., et al., *Plasma corticosterone response of rats with sociopsychological stress in the communication box.* Physiol Behav, 1992. **52**(3): p. 475-80.

39. Murmu, M.S., et al., *Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(5): p. 1477-87.
40. van den Hove, D.L., et al., *Differential effects of prenatal stress in 5-Htt deficient mice: towards molecular mechanisms of gene x environment interactions*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22715.
41. Arnold, A.P. and S.M. Breedlove, *Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: A reanalysis*. Hormones and Behavior, 1985. **19**(4): p. 469-498.
42. Corbier, P., et al., *Changes in Testicular Weight and Serum Gonadotropin and Testosterone Levels before, during, and after Birth in the Perinatal Rat*. Endocrinology, 1978. **103**(6): p. 1985-1991.
43. Baum, M.J., P.J. Woutersen, and A.K. Slob, *Sex difference in whole-body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females*. Biol Reprod, 1991. **44**(5): p. 747-51.
44. Colciago, A., et al., *Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats*. Developmental Brain Research, 2005. **155**(2): p. 107-116.
45. Tilbrook, A.J., I.J. Turner Ai Fau - Clarke, and I.J. Clarke, *Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences*. (1359-6004 (Print)).
46. Rivier, C., J. Rivier, and W. Vale, *Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor*. Science, 1986. **231**(4738): p. 607-9.
47. Handa, R.J., et al., *Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis*. Horm Behav, 1994. **28**(4): p. 464-76.
48. Viau, V., *Functional Cross-Talk Between the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal and -Adrenal Axes*. Journal of Neuroendocrinology, 2002. **14**(6): p. 506-513.
49. Ngun, T.C., et al., *The genetics of sex differences in brain and behavior*. Front Neuroendocrinol, 2011. **32**(2): p. 227-46.
50. Morris, J.A., C.L. Jordan, and S.M. Breedlove, *Sexual differentiation of the vertebrate nervous system*. Nat Neurosci, 2004. **7**(10): p. 1034-9.
51. Ceccatelli, S., et al., *Coexistence of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity with neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus*. Exp Brain Res, 1989. **78**(1): p. 33-42.

52. Uht, R.M., et al., *Demonstration of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in glucocorticoid-sensitive vasopressin and corticotropin-releasing factor neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus.* J Neurosci Res, 1988. **19**(4): p. 405-11, 468-9.
53. Persengiev, S., L. Kanchev, and G. Vezenkova, *Circadian patterns of melatonin, corticosterone, and progesterone in male rats subjected to chronic stress: effect of constant illumination.* J Pineal Res, 1991. **11**(2): p. 57-62.
54. De Boer, S.F., et al., *Effects of fasting on plasma catecholamine, corticosterone and glucose concentrations under basal and stress conditions in individual rats.* Physiol Behav, 1989. **45**(5): p. 989-94.
55. Collu, R., W. Gibb, and J.R. Ducharme, *Effects of stress on the gonadal function.* J Endocrinol Invest, 1984. **7**(5): p. 529-37.
56. Gonzalez-Quijano, M.I., et al., *Naltrexone does not reverse the inhibitory effect of chronic restraint on gonadotropin secretion in the intact male rat.* Neuroendocrinology, 1991. **54**(5): p. 447-53.
57. Collu, R., W. Gibb, and J.R. Ducharme, *Role of catecholamines in the inhibitory effect of immobilization stress on testosterone secretion in rats.* Biol Reprod, 1984. **30**(2): p. 416-22.
58. Torrellas, A., et al., *Adrenal hormones and brain catecholamines responses to morning and afternoon immobilization stress in rats.* Physiol Behav, 1981. **26**(1): p. 129-33.
59. Elias, A.N., et al., *Corticotropin releasing hormone and gonadotropin secretion in physically active males after acute exercise.* Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1991. **62**(3): p. 171-4.
60. Rivest, S. and C. Rivier, *Influence of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the alteration of neuroendocrine functions induced by intermittent footshock or interleukin.* Endocrinology, 1991. **129**(4): p. 2049-57.
61. Lesniewska, B., et al., *Sex differences in adrenocortical structure and function. XXVII. The effect of ether stress on ACTH and corticosterone in intact, gonadectomized, and testosterone- or estradiol-replaced rats.* Res Exp Med (Berl), 1990. **190**(2): p. 95-103.
62. Xu, L., et al., *Prenatal restraint stress is associated with demethylation of corticotrophin releasing hormone (CRH) promoter and enhances CRH transcriptional responses to stress in adolescent rats.* Neurochem Res, 2014. **39**(7): p. 1193-8.
63. Rodríguez, N., N. Mayer, and H.F. Gauna, *Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity.* Biocell, 2007. **31**(1): p. 67-74.

64. Sousa, N., J.J. Cerqueira, and O.F. Almeida, *Corticosteroid receptors and neuroplasticity*. Brain Res Rev, 2008. **57**(2): p. 561-70.
65. Chourbaji, S. and P. Gass, *Glucocorticoid receptor transgenic mice as models for depression*. Brain Res Rev, 2008. **57**(2): p. 554-60.
66. Anacker, C., et al., *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* Psychoneuroendocrinology, 2011. **36**(3): p. 415-25.
67. Chourbaji, S., M.A. Vogt, and P. Gass, *Mice that under- or overexpress glucocorticoid receptors as models for depression or posttraumatic stress disorder*. 2007. **167**: p. 65-77.
68. Kronenberg, G., et al., *Reduced hippocampal neurogenesis in the GR(+/-) genetic mouse model of depression*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2009. **259**(8): p. 499-504.
69. Ridder, S., et al., *Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6243-50.
70. Holy, T.E. and Z. Guo, *Ultrasonic songs of male mice*. PLoS Biol, 2005. **3**(12): p. e386.
71. Searcy, W.A., et al., *Female response to song reflects male developmental history in swamp sparrows*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2010. **64**(8): p. 1343-1349.
72. Hoffmann, F., K. Musolf, and D.J. Penn, *Spectrographic analyses reveal signals of individuality and kinship in the ultrasonic courtship vocalizations of wild house mice*. Physiol Behav, 2012. **105**(3): p. 766-71.
73. Ryan, M.J., et al., *Sexual selection for sensory exploitation in the frog *Physalaemus pustulosus**. Nature, 1990. **343**(6253): p. 66-7.
74. Haack, B., Markl, H. & Ehret G., *Sound communication between parents and offspring*. The Auditory Psychobiology of the Mouse, 1983: p. 57-97.
75. Lahvis, G.P., E. Alleva, and M.L. Scattoni, *Translating mouse vocalizations: prosody and frequency modulation*. Genes Brain Behav, 2011. **10**(1): p. 4-16.
76. Behr, O. and O. von Helversen, *Bat serenades—complex courtship songs of the sac-winged bat (*Saccopteryx bilineata*)*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 2004. **56**(2): p. 106-115.
77. Payne, R.S. and S. McVay, *Songs of humpback whales*. Science, 1971. **173**(3997): p. 585-97.

78. D'Amato, F.R. and A. Moles, *Ultrasonic vocalizations as an index of social memory in female mice*. 2001(0735-7044 (Print)).
79. Moles, A., et al., *Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice: a possible index of sociability?* 2007(0166-4328 (Print)).
80. Wang, H., et al., *Ultrasonic vocalizations induced by sex and amphetamine in M2, M4, M5 muscarinic and D2 dopamine receptor knockout mice*. 2008(1932-6203 (Electronic)).
81. White, N.R., et al., *40- and 70-kHz vocalizations of mice (*Mus musculus*) during copulation*. 1998(0031-9384 (Print)).
82. Hammerschmidt, K., et al., *Female mice respond to male ultrasonic 'songs' with approach behaviour*. *Biology Letters*, 2009. **5**(5): p. 589-592.
83. Nyby, J., et al., *Male mouse (*Mus musculus*) ultrasonic vocalizations to female urine: why is heterosexual experience necessary?* *Behav Neural Biol*, 1983. **38**(1): p. 32-46.
84. Nunez, A.A. and D.T. Tan, *Courtship ultrasonic vocalizations in male Swiss-Webster mice: effects of hormones and sexual experience*. *Physiol Behav*, 1984. **32**(5): p. 717-21.
85. Nyby J Fau - Bigelow, J., et al., *Male mouse (*Mus musculus*) ultrasonic vocalizations to female urine: why is heterosexual experience necessary?* 1983(0163-1047 (Print)).
86. Whitney G Fau - Coble, J.R., et al., *Ultrasonic emissions: do they facilitate courtship of mice*. 1973(0021-9940 (Print)).
87. D'Amato, F.R., et al., *Prenatal antagonism of stress by naltrexone administration: early and long-lasting effects on emotional behaviors in mice*. *Dev Psychobiol*, 1988. **21**(3): p. 283-92.
88. Nyby, J., et al., *Pheromonal regulation of male mouse ultrasonic courtship (*Mus musculus*)*. *Anim Behav*, 1977. **25**(2): p. 333-41.
89. Warburton, V.L., S.R. Sales Gd Fau - Milligan, and S.R. Milligan, *The emission and elicitation of mouse ultrasonic vocalizations: the effects of age, sex and gonadal status*. (0031-9384 (Print)).
90. Carroll, L.S., W.K. Penn Dj Fau - Potts, and W.K. Potts, *Discrimination of MHC-derived odors by untrained mice is consistent with divergence in peptide-binding region residues*. 2002(0027-8424 (Print)).

91. Bradbury, J.W. and S.L. Vehrencamp, *Economic models of animal communication*. (0003-3472 (Print)).
92. Drickamer, L.C., P.A.F.A.U.H. Gowaty, and C.M. Holmes, *Free female mate choice in house mice affects reproductive success and offspring viability and performance*. 2000(0003-3472 (Print)).
93. Asaba, A., et al., *Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice*. *Front Neurosci*, 2014. **8**: p. 231.
94. Montero, I., M. Teschke, and D. Tautz, *Paternal imprinting of mating preferences between natural populations of house mice (*Mus musculus domesticus*)*. *Mol Ecol*, 2013. **22**(9): p. 2549-62.
95. Hoffmann, F., D.J. Musolf K Fau - Penn, and D.J. Penn, *Freezing urine reduces its efficacy for eliciting ultrasonic vocalizations from male mice*. 2009(0031-9384 (Print)).
96. Rouillet, F.I., M. Wöhr, and J.N. Crawley, *Female urine-induced male mice ultrasonic vocalizations, but not scent-marking, is modulated by social experience*. *Behav Brain Res*, 2011. **216**(1): p. 19-28.
97. Hanson, J.L. and L.M. Hurley, *Female presence and estrous state influence mouse ultrasonic courtship vocalizations*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40782.
98. Fischer, J. and K. Hammerschmidt, *Ultrasonic vocalizations in mouse models for speech and socio-cognitive disorders: insights into the evolution of vocal communication*. *Genes Brain Behav*, 2011. **10**(1): p. 17-27.
99. Chabout, J., et al., *Adult male mice emit context-specific ultrasonic vocalizations that are modulated by prior isolation or group rearing environment*. 2012(1932-6203 (Electronic)).
100. Scattoni, M.L., J. Crawley, and L. Ricceri, *Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009. **33**(4): p. 508-15.
101. Grimsley, J.M., J.J. Gadziola Ma Fau - Wenstrup, and J.J. Wenstrup, *Automated classification of mouse pup isolation syllables: from cluster analysis to an Excel-based "mouse pup syllable classification calculator"*. 2013(1662-5153 (Electronic)).
102. Arriaga, G. and E.D. Jarvis, *Mouse vocal communication system: are ultrasounds learned or innate?* *Brain Lang*, 2013. **124**(1): p. 96-116.
103. Choi, H., S. Park, and D. Kim, *Two genetic loci control syllable sequences of ultrasonic courtship vocalizations in inbred mice*. *BMC Neurosci*, 2011. **12**: p. 104.

104. Kikusui, T., et al., *Cross fostering experiments suggest that mice songs are innate*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17721.
105. Sugimoto, H., et al., *A role for strain differences in waveforms of ultrasonic vocalizations during male-female interaction*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22093.
106. Borges, S., et al., *Glucocorticoid programming of the mesopontine cholinergic system*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 190.
107. Borges, S., et al., *Dopaminergic modulation of affective and social deficits induced by prenatal glucocorticoid exposure*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(10): p. 2068-79.
108. Jamain, S., et al., *Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1710-5.
109. Tronche, F., et al., *Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 99-103.
110. Box, G.E.P.C., D. R., *An Analysis of Transformations*. Journal of the Royal Statistical Society, 1964. **26**(No. 2): p. 211-252.
111. Mueller, B.R. and T.L. Bale, *Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy*. J Neurosci, 2008. **28**(36): p. 9055-65.
112. Burkett, Z.D., et al., *VoICE: A semi-automated pipeline for standardizing vocal analysis across models*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10237.
113. Koenig, J.I., et al., *Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia*. Behav Brain Res, 2005. **156**(2): p. 251-61.
114. Cintra, A., et al., *Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1994. **62**(3): p. 843-97.
115. Chung, S., et al., *Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring*. Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 3202-10.
116. Boudouresque, F., et al., *Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses*. Neuroendocrinology, 1988. **48**(4): p. 417-22.

117. Clancy, B., et al., *Extrapolating brain development from experimental species to humans*. Neurotoxicology, 2007. **28**(5): p. 931-7.
118. Ward, I.L. and J. Weisz, *Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males*. Science, 1980. **207**(4428): p. 328-9.
119. Fleming, D.E., et al., *Effects of prenatal stress on sexually dimorphic asymmetries in the cerebral cortex of the male rat*. Brain Res Bull, 1986. **16**(3): p. 395-8.
120. Chura, L.R., et al., *Organizational effects of fetal testosterone on human corpus callosum size and asymmetry*. Psychoneuroendocrinology, 2010. **35**(1): p. 122-32.
121. Belnoue, L., et al., *Prenatal stress inhibits hippocampal neurogenesis but spares olfactory bulb neurogenesis*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72972.
122. Ehrlich, D.E., et al., *Prenatal stress, regardless of concurrent escitalopram treatment, alters behavior and amygdala gene expression of adolescent female rats*. Neuropharmacology, 2015. **97**: p. 251-8.
123. Matsumoto, Y.K., K. Okanoya, and Y. Seki, *Effects of amygdala lesions on male mouse ultrasonic vocalizations and copulatory behaviour*. Neuroreport, 2012. **23**(11): p. 676-80.
124. Paredes, R.G., *Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation*. 2003(0036-5564 (Print)).
125. Shimogori, T., et al., *A genomic atlas of mouse hypothalamic development*. (1546-1726 (Electronic)).
126. Boyle, M.P., et al., *Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 473-8.
127. Hagino, N., M. Watanabe, and J.W. Goldzieher, *Inhibition by adrenocorticotrophin of gonadotrophin-induced ovulation in immature female rats*. Endocrinology, 1969. **84**(2): p. 308-14.
128. Zampieri, B.L., et al., *Ultrasonic vocalizations during male–female interaction in the mouse model of Down syndrome Ts65Dn*. Physiology & Behavior, 2014. **128**(0): p. 119-125.
129. Montague Jc Jr Fau - Hollien, H. and H. Hollien, *Perceived voice quality disorders in Down's syndrome children*. (0021-9924 (Print)).

130. Moran Mj Fau - Gilbert, H.R. and H.R. Gilbert, *Speaking fundamental frequency characteristics of institutionalized adults with Down's syndrome*. (0002-9351 (Print)).
131. Scattoni, M.L., et al., *Unusual Repertoire of Vocalizations in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism*. PLoS ONE, 2008. **3**(8): p. e3067.
132. Grimsley, J.M., J.J. Monaghan Jj Fau - Wenstrup, and J.J. Wenstrup, *Development of social vocalizations in mice*. 2011(1932-6203 (Electronic)).
133. Grimsley, J.M., et al., *Contextual Modulation of Vocal Behavior in Mouse: Newly Identified 12 kHz "Mid-Frequency" Vocalization Emitted during Restraint*. Front Behav Neurosci, 2016. **10**: p. 38.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Lapert
Vorname	Florian
Geburtsdatum	31. Oktober 1984
Geburtsort	Mont-Saint-Aignan
Familienstand	ledig
Vater	Patrick Lapert
Mutter	Josiane Lapert

Schulischer Werdegang

1996-2002	Collège Jean-Jacques Rousseau, Lycée Pierre Corneille
Juni 2002	Baccalauréat

Universitärer Werdegang

Hochschulausbildung Medizin

2009-2016	Studium der Humanmedizin an Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
08.2011	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2015	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.2016	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Weitere Hochschulausbildung

2002-2005	Studium Filmwissenschaft (Bachelor) Bachelor an der Universität Paris III Sorbonne Nouvelle
-----------	--

Publikation

Schmidt, M., Lapert, F. (2017). "Prenatal stress changes courtship vocalizations and bone mineral density in mice." *Psychoneuroendocrinology* 75: 203-212.

7 DANKSAGUNG

Mein allerherzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Peter Gass für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Dissertation und die stets freundschaftliche Unterstützung.

Ich möchte meiner Betreuerin Dr. med. Michaela Schmidt ganz besonders dafür danken, dass sie mir als erfahrene und vortreffliche Wissenschaftlerin bei der Planung und Durchführung der Experimente immer hilfsbereit zur Seite stand und mich außerdem beim Verfassen wissenschaftlicher Aufsätze sowie der vorliegenden Dissertation vorbildlich und außerordentlich geduldig angeleitet hat.

Zudem möchte ich mich sehr herzlich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Psychiatrische Tiermodelle des Zentralinstituts für Seelische Gesundheit in Mannheim für die zuvorkommende Hilfe und freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt hier der medizinisch-technischen Assistentin Frau Christiane Brandwein für ihre außerordentlich wertvolle, selbstlose und freundschaftliche Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei der Tierpflegerin Frau Madeleine Saitta ganz herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung und gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei meinen Eltern Josie und Patrick sowie bei meinem Bruder Aurélien möchte ich mich für die liebenswerte und ausdauernde Unterstützung und ihre stets ermutigende, Kraft gebende Haltung bedanken.

Ein riesen Dankeschön an die ganze Familie Wahjudi für ihr ständiges Vertrauen.

Sarah, Lucie und Florian, euch habe ich die Langzeitgeschichte hinter dieser Doktorarbeit zu verdanken. Von Filmwissenschaft zur Medizin und dann zur Frauenheilkunde - ihr habt mit Leidenschaft und Liebe meine Bewegungen unterstützt und verfolgt.

Mathilde, Julia, Noémie, Damien, Matthias, Josef, Steffen, Jan, Julien und Julien: eure sicheren Freundschaften waren und sind für mich ein endloses Energiereservoir auf diesem langen Weg.

Meine Lebenspartnerin Leonie, du hast alles miterlebt und mitbewirkt: diese Arbeit gehört jetzt zu dem Relief unserer Geschichte.