

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Medizinische Fakultät



**Der zeitliche Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration in drei
Gehirnregionen der Maus während des Erlernens und der
Extinktion von Furcht**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

am Institut für Physiologie

Betreuer:

Prof. Dr. rer. nat. V. Leßmann

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Medizinische Fakultät

Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg

Verfasser:

Aaron Voß

geb. am 23.10.1988 in Berlin

Bibliografische Angabe:

Voß, Aaron:

Der zeitliche Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration in drei Gehirnregionen der Maus während des Erlernens und der Extinktion von Furcht. Diss., Magdeburg, 2025, - 77 Seiten, 20 Abb., 9 Tab.

Kurzreferat

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*-Proteinexpression in drei verschiedenen Gehirnregionen auf die Bildung und Modifikation des Furchtgedächtnisses von Mäusen untersucht. Anhand der Lernmodelle zur Konditionierung und Extinktion von Furcht wurden Wildtypmäuse Verhaltensversuchen unterzogen und gruppenweise im zeitlichen Abstand von 0 bis 120 Minuten nach dem Training Gewebeproben aus der Amygdala, dem dorsalen Hippocampus und dem Präfrontalkortex entnommen. Die Proben wurden mittels ELISA auf den BDNF-Proteingehalt hin untersucht. Obwohl BDNF-Signalwege in der Amygdala bekanntermaßen bei der Ausbildung des Furchtgedächtnisses beteiligt sind, ließ sich nach der Furchtkonditionierung in der Amygdala überraschenderweise keine signifikante Änderung der BDNF-Proteinkonzentration nachweisen. Sowohl im Hippocampus als auch im Präfrontalkortex zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der BDNF-Konzentration im Vergleich zu naiven Mäusen. Nach dem Furchtextinktionstraining konnte in der Amygdala hingegen 60 min nach dem Training eine signifikante Erhöhung von BDNF um 12 % gemessen werden. Im Präfrontalkortex ließ sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls ein beginnender Anstieg von BDNF feststellen, der 90 min nach dem Extinktionstraining weiter zunahm und zu einer signifikanten Erhöhung von 30 % im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Die nicht signifikanten Veränderungen im dorsalen Hippocampus nach der Furchtextinktion legen dagegen eine unterschiedliche Einbindung des dorsalen und ventralen Hippocampus in die Modifikation des Furchtgedächtnisses nahe. Somit konnten unsere Experimente die lerninduzierte BDNF-Proteinexpression, die erfolgreichem Furchtextinktionslernen zugrunde liegt, weiter aufklären, einen entsprechenden BDNF-Anstieg in der Amygdala bestätigen und erstmals einen signifikanten Anstieg im Präfrontalkortex nach 90 min nachweisen.

Schlüsselwörter

BDNF – ELISA – Amygdala – Hippocampus – Präfrontalkortex

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	3
1.1. Posttraumatische Belastungsstörungen	3
1.2. Konditionierung und Extinktion im Rahmen des Furchtlernens	4
1.2.1. Furchtkonditionierung und beteiligte Gehirnareale	4
1.2.2. Furchtextinktion und beteiligte Gehirnareale	10
1.3. BDNF als Protein der synaptischen Plastizität	13
1.4. Ziele der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Versuchstiere	17
2.2. Verhaltensversuche	18
2.2.1. Furchtkonditionierungssystem	18
2.2.2. Furchtkonditionierung	18
2.2.3. Furchtextinktion	20
2.3. Präparation und Gewinnung der Gehirnproben	22
2.4. Bestimmung der BDNF-Konzentration im ELISA	24
2.5. Chemikalien	26
2.6. Statistische Auswertung	27
3. Ergebnisse	28
3.1. Furchtkonditionierung	28
3.1.1. Verhaltensversuche	28
3.1.2. Einfluss des Präparationszeitpunktes auf die BDNF-Proteinkonzentra- tion bei naiven Versuchstieren	29
3.1.3. BDNF-Proteinkonzentration in den untersuchten Gehirnregionen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Furchtlernens	30
3.2. Furchtextinktion	33
3.2.1. Verhaltensversuche	33
3.2.2. BDNF-Proteinkonzentration in den untersuchten Gehirnregionen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Furchtextinktionslernens	37

4. Diskussion	42
4.1. Ergebnisse Verhaltensversuche	42
4.1.1. Furchtlernen	42
4.1.2. Furchtextinktionslernen	43
4.2. Vergleich verschiedener Verfahren zur BDNF-Bestimmung	44
4.3. BDNF-Konzentrationsänderungen im Tagesverlauf	46
4.4. BDNF-Konzentrationsänderungen während des Furchtlernens in verschiedenen Gehirnarealen	47
4.5. BDNF-Konzentrationsänderungen während des Extinktionslernens in verschie- denen Gehirnarealen	51
5. Zusammenfassung	55
Literaturverzeichnis	56
Abbildungsverzeichnis	64
Tabellenverzeichnis	65
A. Anlagen	70
A.1. Versuchsprotokolle	70
A.2. Abbildungen	76
A.3. Tabellarische Darstellung der BDNF-Konzentrationen	77

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
BA	basale Amygdala
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BLA	basolaterale Amygdala
BMA	basomediale Amygdala
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CeL	lateraler Teil der zentralen Amygdala
CeM	medialer Teil der zentralen Amygdala
cm	Zentimeter
CS	konditionierter Stimulus
CR	konditionierte Reaktion
dB	Dezibel
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
Fa.	Firma
GABA	γ -Aminobuttersäure
IL	infralimbischer Kortex
ITC	interkalierte Zellen
kHz	Kilohertz
LA	laterale Amygdala
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M	mol/l
mA	Milliampere
MAP	<i>Mitogen-activated Protein</i>

mM	Millimolar
mm	Millimeter
mPFC	medialer Präfrontalkortex
N	Nervus
NGF	Nervenwachstumsfaktor
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p75NTR	p75-Neurotrophin-Rezeptor
PI-3	Phosphoinositid-3
PL	prälimbischer Kortex
PLC	Phospholipase C
PTBS	posttraumatische Belastungsstörung
s	Sekunde
TrkB	<i>Tropomyosin-related Kinase B</i>
US	unkonditionierter Stimulus
UR	unkonditionierte Reaktion

1. Einführung

1.1. Posttraumatische Belastungsstörungen

Menschen werden im Laufe ihres Lebens häufig mit belastenden Lebensereignissen konfrontiert. Opfer von Krieg, Folter oder Missbrauch, deren Erlebnisse sich durch eine besondere Schwere auszeichnen, können im Rahmen einer unvollständigen Bewältigung vorübergehende oder sogar bleibende Krankheitsbilder entwickeln. Zu der zweiten Kategorie gehört die posttraumatische Belastungsstörung (PTBS), die per Definition meist mehr als sechs Monate nach dem Ereignis auftritt und häufig einer langwierigen Therapie bedarf. In Deutschland liegt die 12-Monatsprävalenz dieser Erkrankung bei 2,3% mit einer deutlichen Verschiebung in Richtung des weiblichen Geschlechts (Jacobi et al., 2014).

Kennzeichnend für die PTBS sind sogenannte Flashbacks, die die betroffenen Personen immer wieder in die belastenden Situationen zurückversetzen. Häufig wird dies durch Ereignisse ausgelöst, die in bestimmten Teilen dem ursprünglich belastenden Erlebnis ähneln und somit im weiteren Verlauf von den Betroffenen gezielt vermieden werden. Die wiederkehrenden Erinnerungen auf solche Triggerreize werden als fehlerhafter Lernprozess gewertet (Andero und Ressler, 2012), bei dem der entsprechende Reiz nicht mehr als ungefährlich eingestuft werden kann, sondern dauerhaft mit dem belastenden Erlebnis assoziiert bleibt. Im Rahmen der experimentellen Verhaltensforschung wird die klassische Konditionierung als ein Modell für die Assoziation zwischen dem traumatischen Erlebnis und dem vormals unspezifischen Reiz betrachtet. In diesem Modell stellen dementsprechend die wiederkehrenden Flashbacks die Unfähigkeit des Individuums zur Extinktion des erlernten Verhaltens (z. B. Vermeidungsverhalten, aber auch vegetative Veränderungen) dar. Mit dem Begriff der Extinktion wird hier die Abschwächung bzw. Hemmung der Verknüpfung von Trauma und Triggerreizen beschrieben, die in der Theorie beim PTBS gestört ist und somit als eine mögliche Ursache für eine Belastungsstörung angesehen wird (Milad et al., 2009).

Ziel aktueller Forschungsuntersuchungen ist es, die Mechanismen, die der Extinktion dieses Furchtverhaltens zugrunde liegen, genauer zu verstehen und im zweiten Schritt diese Extinktionsmechanismen gezielt zu verstärken, um langfristig eine effektivere extinktionsbasierte Therapie der betroffenen Patienten zu ermöglichen.

1.2. Konditionierung und Extinktion im Rahmen des Furchtlernens

1.2.1. Furchtkonditionierung und beteiligte Gehirnareale

Die klassische Konditionierung wurde erstmals 1905 durch Iwan Pavlov beschrieben. Der russische Physiologe präsentierte dazu Hunden wiederholt kurz vor der Futtergabe einen Tonreiz, sodass diese nach einiger Zeit schon allein beim Hören des Tonreizes eine ausgeprägte Speichelproduktion zeigten. Im Rahmen der klassischen Konditionierung wird ein sogenannter un konditionierter Stimulus (US), der eine ungelernte, d. h. un konditionierte Reaktion (UR) hervorruft, mit einem neutralen nicht in Verbindung zum US stehenden Stimulus wiederholt kombiniert. Dadurch wird aus dem neutralen Reiz ein konditionierter Stimulus (CS), dessen alleinige Präsentation dann die konditionierte Reaktion (CR) auslösen kann. In Pavlovs ursprünglichen Versuchen entspricht die Futtergabe dem US, der die Speichelproduktion als UR auslöst. Durch die gleichzeitige Präsentation des Tonreizes mit der Futtergabe wird dieser zum CS, der dann alleine die Speichelproduktion als CR anregen kann. Da diese Form der Konditionierung von einem Stimulus bzw. einem Signal (engl. cue) abhängig ist, wird im Weiteren der gebräuchliche Ausdruck der *cue*-Konditionierung verwendet. Alternative Bezeichnungen, die ebenfalls häufig in der Literatur verwendet werden, sind *delay*- und Ton-Konditionierung.

Die neuronalen Prozesse, die der Konditionierung im Speziellen und der Gedächtnisbildung ganz allgemein zugrunde liegen, können in mehrere Abschnitte unterteilt werden, die allerdings nicht zwingend sequenziell, sondern auch parallel und in verschiedenen Gehirnarealen ablaufen können. Am Anfang steht die Gedächtnisakquisition, die zu initialen Veränderungen auf molekularer Ebene führt, gefolgt von der zusätzlich auf zellulärer Ebene sichtbaren Konsolidierung der Information, die bereits nach wenigen Minuten beginnt und unterschiedlich lange anhalten kann. Die Konsolidierung muss dabei nicht unbedingt im gleichen neuronalen Netzwerk ablaufen, in dem auch die Akquisition erfolgte. Häufig kommt es sogar im Rahmen der Konsolidierung zu einer Verschiebung der Information in andere Gehirnabschnitte, die initial nicht am Lernprozess beteiligt waren. Insofern müssen Gedächtnisbildung, Gedächtnisstabilisierung sowie der Abruf der Gedächtnisinhalte, der je nach zeitlichem Abstand zur initialen Gedächtnisbildung unterschiedliche Gehirnregionen mit einbeziehen kann, voneinander abgegrenzt werden (siehe z. B. Purves et al., 2012). Der Frage, wie der Organismus die gebildeten Gedächtnisinhalte modifizieren und neu verknüpfen kann, soll im nächsten Kapitel (Kap. 1.2.2) ab S. 10 nachgegangen werden.

Eine viel untersuchte und häufig genutzte Anwendung der klassischen Konditionierung ist die Furchtkonditionierung, deren zugrundeliegenden neuronalen Verschaltungen phylogenetisch sehr alt und hochgradig konserviert sind, wodurch das Verhalten der Versuchstiere und die zugrundeliegenden neurophysiologischen Prozesse in diesen Situationen speziesübergreifend relativ einheitlich sind (Pape und Pare, 2010). Aus diesem Grund können Furchtkonditionierung und Furchtextinktion – wenn auch mit Einschränkungen – als translationales

Tiermodell für die Erforschung und die Therapieoptimierung von Angststörungen beim Menschen herangezogen werden (Maren, 2011; Andero und Ressler, 2012).

Amygdala

Als eine zentrale Instanz für das Furchtlernen hat sich die Amygdala herauskristallisiert (zusammengefasst in Maren, 2011). Die auch als Mandelkern bezeichnete Hirnregion lässt sich in diverse Subareale unterteilen, die in **Abbildung 1.1** aufgeführt sind, um Missverständnisse aufgrund der teilweise divergierenden Nomenklatur auszuschließen. Im Folgenden soll wegen der Komplexität des amygdalären Netzwerkes zuerst der grobe Informationsfluss während des Furchtlernens dargestellt und daraufhin die Funktion der für diese Arbeit wichtigen Kerne genauer betrachtet werden.

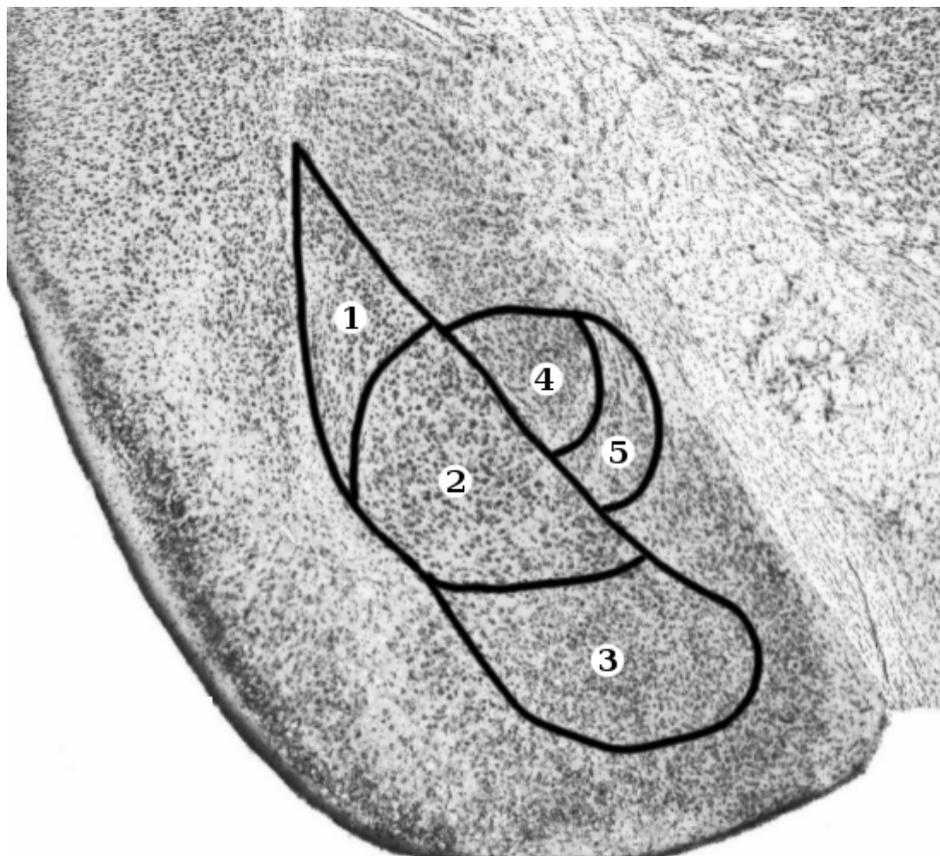


Abbildung 1.1. Coronarer Hirnschnitt bei Bregma -1,46 mm. Dargestellt ist die rechte Amygdala mit ihrem basolateralen Kernkomplex, der sich aus lateraler Amygdala (LA) (1), basolateraler Amygdala (BLA) (2) und basomedialer Amygdala (BMA) (3) zusammensetzt, sowie den zentralen Strukturen, die sich vereinfacht in lateralen (CeL) (4) und medialen Teil der zentralen Amygdala (CeM) (5) unterteilen lassen. Region 2 und 3 werden zudem zur basalen Amygdala (BA) zusammengefasst. Nicht dargestellt sind die interkalierten Zellen (ITC), die um mehrere Kernbereiche herum gelagert sind. Abgewandelt aus Franklin und Paxinos (2007)

Gemeinhin wird der laterale Kern der Amygdala (LA, Region 1 in **Abb. 1.1**) als Eingangsgebiet angesehen, in das die Afferenzen von kortikalen und thalamischen Neuronen projizieren (Rogan et al., 1997). Dazu gehören einerseits Anteile sämtlicher sensorischer Systeme, die die Amygdala über den Thalamus und die Assoziationscortices erreichen, als auch einige Fasern aus dem Hippocampus und entorhinalen Cortex, wodurch es zu einer Konvergenz verschiedenster Systeme kommt, die wiederum für die weiter unten dargestellten Lernprozesse entscheidend ist.

Die Efferenzen der Amygdala entspringen vorwiegend dem medialen Anteil des zentralen Kerngebietes (CeM, Region 5 in **Abb. 1.1**). Diese ziehen zu nachgeschalteten Bereichen im Hirnstamm und basalen Vorderhirn, die für die unterschiedlichen Reaktionen wie Freezing, Stress und Vermeidungsverhalten auf das Furchterleben verantwortlich sind. Das in dieser Arbeit für die Graduierung der Furchtexpression herangezogene Freezingverhalten, unter dem man das Erstarren während und nach der CS-Präsentation versteht, wird z.B. durch eine Aktivierung des ventralen periaquäduktalen Graus hervorgerufen, wobei anzumerken ist, dass das periaquäduktale Grau ebenso über Projektionen in die Amygdala verfügt (Johansen et al., 2010; Kim et al., 2013; Groessl et al., 2018) und somit nicht nur die Funktion einer rein nachgeschalteten Region einnimmt.

LA und CeM werden über eine Reihe zwischengeschalteter Kernbereiche verbunden, die wiederum untereinander, aber auch mit anderen Hirnregionen kommunizieren (zusammengefasst in Pare und Duvarci, 2012). Von der LA ziehen glutamaterge Verbindungen zur basalen Amygdala (BA, Region 2 und 3 in **Abb. 1.1**) und zum lateralen Teil der zentralen Amygdala (CeL, Region 4 in **Abb. 1.1**), wobei letztere über GABAerge Verbindungen zum CeM eine Rolle bei der Modulation des Furchtverhaltens sowohl nach Konditionierung als auch nach Extinktion spielt (Haubensak et al., 2010). Die BA ist über Verbindungen zum Hippocampus und prälimbischen Kortex allerdings mehr als nur eine Umschaltstation zwischen LA und CeM. Sie lässt sich noch in einen lateralen Teil (BLA), auf den sich die Forschung bisher hauptsächlich konzentriert hat, und einen medialen Teil (BMA), über dessen Einbindung in die Furchtverarbeitung bisher nur wenig bekannt ist, unterteilen. Gegenstand neuerer Forschungsarbeiten ist die Funktion einer weiteren Gruppe von GABAergen Neuronen, den sogenannten interkalierten Zellen (ITC), die für die Netzwerkregulation innerhalb der Amygdala von großer Bedeutung zu sein scheinen und im Abschnitt zur Furchtextinktion weiter behandelt werden (für eine Zusammenfassung siehe Ehrlich et al., 2009).

Bei der *cue*-abhängigen Furchtkonditionierung wird die Weiterleitung der Information von der LA über die BA zum CeM als Hauptverarbeitungsweg angesehen. Wenn nun die Präsentation eines Stromimpulses, der hier als US dient und zu einer Aktivierung von Neuronen in der LA führt, mit z. B. einem Sinuston gekoppelt wird, so kommt es zu molekularen und zellulären Veränderungen, die in diesem Fall die Verbindung von auditorischem Kortex bzw. Corpus geniculatum mediale und den Zielzellen in der LA so verändern, dass in Zukunft bereits die alleinige Tonpräsentation für eine Aktivierung der LA ausreichend ist – der Ton ist

im Modell der Furchtkonditionierung zum CS geworden (LeDoux, 2000). Die Arbeitsgruppe von Prof. LeDoux konnte so zum Beispiel durch die Implantation von Elektroden in die LA *in vivo* während des Furchtlernens Signale ableiten, die ähnliche Veränderungen zeigen, wie sie bei der Langzeitpotenzierung zu beobachten sind (Rogan et al., 1997) und somit auf Gedächtnisbildungsprozesse in der Amygdala hindeuten. Weitere Arbeiten konnten nachweisen, dass die Gedächtnisbildung von der Proteinsynthese in der LA abhängig ist (Maren et al., 2003) und durch die Applikation eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden kann (Miserendino et al., 1990). Die glutamatergen Rezeptoren scheinen darüber hinaus eine große Rolle bei der Furchtexpression zu spielen, da die Injektion des entsprechenden Antagonisten in die LA das konditionierte Freezing aufhebt (Fendt, 2001). Zusammengefasst spielt die LA im Rahmen des Furchtverhaltens nicht nur bei der Gedächtnisakquisition, sondern auch beim Gedächtnisabruf eine entscheidende Rolle.

Der nächste Kern, der nach der Konvergenz von US und CS in der LA aktiviert wird, ist die BA, die sich, wie bereits erwähnt, aus BLA und BMA zusammensetzt. Sie ist für einen Großteil der reziproken Verbindungen zum Hippocampus (Pitkänen et al., 2000) und zum prälimbischen Kortex (Gabbott et al., 2006) verantwortlich. Es ist naheliegend, dass die Bildung und Konsolidierung des Furchtgedächtnisses durch diese Vernetzungen weiter modifiziert werden kann. Jedoch sind diese Verbindungen zur BA zumindest für die Furchtakquisition anscheinend genauso wenig zwingend notwendig wie die Funktion des Kerns an sich: So führt eine Inaktivierung der BA vor der Furchtkonditionierung bei intakter LA zu keinen Einschränkungen der Gedächtnisbildung (Nader et al., 2001). Deshalb sind in Zusammenschau mit den Erkenntnissen zur LA alternative Verarbeitungswege innerhalb der Amygdala wahrscheinlich, die genutzt werden, sobald der bevorzugte Weg über die BA nicht mehr zur Verfügung steht. Speziell innerhalb des BLA wurden außerdem zwei Untergruppen von Neuronen gefunden, deren Aktivität davon abhängig war, ob das Versuchstier gerade eine Furchtkonditionierung oder -extinktion durchlief (Herry et al., 2008). Interessanterweise gehen Änderungen in der Aktivität der jeweiligen Neuronengruppe Veränderungen im Verhalten zeitlich voraus. Ferner kamen Herry und Kollegen zu dem Ergebnis, dass eine transiente Inaktivierung der BLA die Furchtexpression nicht beeinflusst. Wurde jedoch die gesamte BA nach dem Training inaktiviert, so scheint dieser Kern für den Gedächtnisabruf unverzichtbar zu sein (Anglada-Figueroa und Quirk, 2005). Diesem vermeintlichen Widerspruch zwischen den Ergebnissen von Herry und Kollegen sowie Anglada-Figueroa ging die Arbeitsgruppe von Denis Paré weiter nach: Sie konnte zeigen, dass BLA und BMA redundante Funktionen ausüben, da die Inaktivierung eines einzelnen Kerns zu keinen Veränderungen während des Gedächtnisabrufes führte (Amano et al., 2011). In der gleichen Arbeit wurden durch die Ableitung von Feldpotentialen aber auch Unterschiede in der Aktivität der beiden Teilkernne festgestellt. So bleiben einige Neurone in der BMA über das Ende der CS-Präsentation hinaus aktiv, weshalb dieser Kern mehr als eine einfache Relaisstation zu sein scheint. Die Bedeutung, die der lateralen und basalen Amygdala bei der langfristigen Speicherung des

Furchtgedächtnisses zukommt, wird durch eine Studie deutlich, in der nach Ausschaltung der beiden Kernbereiche selbst nach einem Intervall von 16 Monaten zur Furchtkonditionierung noch eine massive Verschlechterung des Gedächtnisabrufes festgestellt wurde (Gale et al., 2004).

Von der BA aus erfolgt die Informationsweiterleitung über exzitatorische Neurone zum CeM, der zusätzlich noch hemmende Afferenzen vom CeL und interkalierten Zellen erhält. Zunächst war unklar, wie sich die GABAergen Neurone im CeM nach der *cue*-Konditionierung gegenüber dem CS verhalten. Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass sie ihren inhibitorischen Einfluss auf die nachgeschalteten Strukturen in anderen Gehirnbereichen bei einer erneuten Präsentation des konditionierten Stimulus verstärken (Duvarci et al., 2011). Das exprimierte Furchtverhalten des Versuchstieres hängt somit ausgesprochen stark von der Aktivität des CeM ab.

Hippocampus

Neben der Amygdala wurden in der vorliegenden Arbeit Proben aus dem Hippocampus gewonnen, der über seine herausragenden Rolle während der expliziten Gedächtniskonsolidierung Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten war und ist. Insbesondere dient der Hippocampus als Untersuchungsobjekt für die während der Gedächtnisbildung ablaufenden molekularen Prozesse und das darauf aufbauende Modell der Langzeitpotenzierung. Auf die einzelnen anatomischen Substrukturen wie Gyrus dentatus oder Cornu ammonis soll hier nicht weiter eingegangen werden, allerdings lässt sich der Hippocampus funktional in einen ventralen und einen dorsalen Abschnitt unterteilen (Details in Fanselow und Dong, 2010). Dem dorsalen Teil wird so z.B. eine größere Rolle beim räumlichen Lernen zugeschrieben, während der ventrale Hippocampus über ausgeprägte Verbindungen zur Amygdala (insbesondere der BLA) und zum infralimbischen Kortex stärker in die der Furchtverarbeitung zugrundeliegenden Netzwerke eingebunden sein soll (Pitkänen et al., 2000; Godsil et al., 2013) und dabei für die Integration komplexer (zeitlicher) Abläufe verantwortlich ist (Cox et al., 2013).

Der dorsale Hippocampus scheint während der *cue*-abhängigen Furchtkonditionierung eher eine untergeordnete Rolle zu spielen und „nur“ für die Verarbeitung der Kontextinformationen zuständig zu sein. Eine Inaktivierung des dorsalen Teils führte so zwar zu einem Gedächtnisdefizit nach kontextabhängiger Furchtkonditionierung, bei der die Umgebung im Vordergrund steht; das Verhalten nach *cue*-Konditionierung blieb jedoch unbeeinflusst (Kim und Fanselow, 1992; Phillips und LeDoux, 1992). Die Beteiligung des ventralen Hippocampus bei der *cue*-Konditionierung ist dagegen noch nicht abschließend geklärt. Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass eine Inaktivierung vor der *cue*-Konditionierung die Furchtakquisition erschwert bzw. verhindert hat (Bast et al., 2001; Maren und Holt, 2004). In der letztgenannten Untersuchung kamen Maren und Holt außerdem zu dem Ergebnis, dass eine Ausschaltung des ventralen Hippocampus kurz vor dem Gedächtnisabruf keinen Einfluss auf das Furcht-

verhalten nach *cue*-Konditionierung hat – im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Prof. Quirk (Sierra-Mercado et al., 2011), laut der die Hemmung des ventralen Hippocampus vor dem Gedächtnisabruf zu einem geringeren Freezingverhalten führt. Während die Rolle dieser Gehirnregion beim Gedächtnisabruf demnach noch nicht eindeutig geklärt scheint, gibt es erste Studien, die eine wichtige Funktion bei der weiteren Konsolidierung des Furchtgedächtnisses zeigen (Maren und Holt, 2004; Raza et al., 2017).

Medialer Präfrontalkortex

Die dritte Gehirnregion, die während des Furchtlernens eine wichtige Rolle spielt, ist der mediale Präfrontalkortex (mPFC). Er liegt bei Nagern weit rostral und verfügt gerade im ventralen Teil über eine Reihe von Verbindungen zum Hippocampus und zu Kerngebieten der Amygdala. Die an der Furchtverarbeitung besonders beteiligten prälimbischen (PL) und infralimbischen Areale (IL) des mPFC erhalten ihre Afferenzen unter anderem vom Hippocampus und dem basalen Amygdalakern (Hoover und Vertes, 2007). Die Efferenzen des mPFC wiederum enden in Abhängigkeit von der jeweiligen Funktion in unterschiedlichen Kerngebieten der Amygdala. In frühen Studien zur Beteiligung am Furchtgedächtnis wurde häufig jedoch keine Unterscheidung zwischen IL und PL vorgenommen, weswegen es zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen kam. Es gilt heute als gesichert, dass beide Subareale vollkommen unterschiedliche Aufgaben bei der Verarbeitung von Furchtsignalen wahrnehmen: Der PL des mPFC scheint im Allgemeinen eine furchtverstärkende Wirkung zu haben, während der IL des mPFC bei der Furchtextinktion vonnöten ist. Deshalb soll im Folgenden die Rolle des PL beschrieben und der IL im Zusammenhang mit der Furchtextinktion in Kapitel 1.2.2 behandelt werden.

Der PL des mPFC wird bei der Furchtverarbeitung zum einen für den Gedächtnisabruf benötigt, solange während der Gedächtnisakquisition keine höheren kognitiven Funktionen wie z. B. das Erkennen von zeitlichen Zusammenhängen vonnöten sind (Runyan et al., 2004; Corcoran und Quirk, 2007). Die Arbeitsgruppe von Prof. Ressler hat außerdem zwei Arbeiten veröffentlicht, die zeigen, dass der PL des mPFC für die Konsolidierung des Furchtgedächtnisses benötigt wird (Choi et al., 2010; Choi et al., 2012). In einer weiteren Studie zeigten Ratten während und einen Tag nach einer Stimulation des PL über Mikroelektroden, die mit einer CS-Präsentation kombiniert wurde, ein relativ hohes Freezing, woraus zusammenfassend gefolgert wird, dass der PL das Furchtgedächtnis stabilisiert und das Extinktionslernen behindert (Vidal-Gonzalez et al., 2006). Das erscheint insofern nachvollziehbar, da direkte Efferenzen des PL zum basolateralen Kern der Amygdala bekannt sind (Vertes, 2004). Gerade für die klinische Intervention dürfte eine Studie von Stern und Kollegen interessant sein, die zu dem Ergebnis kam, dass der PL im Präfrontalkortex für die Rekonsolidierung, die die erneute Verarbeitung der Information nach ihrem Abruf beschreibt, von großer Bedeutung ist. Inaktiviert man die Region kurz nach dem Abruf des Furchtgedächtnisses, so zeigen die Tiere eine deutlich abgeschwächte Reaktion auf die CS-Präsentation, die im Gegensatz zur

Extinktion auch über einen längeren Zeitraum auf einem niedrigen Niveau verbleibt und somit nicht den unerwünschten Eigenschaften der Extinktion (s. Kapitel 1.2.2) unterliegt (Stern et al., 2014).

1.2.2. Furchtextinktion und beteiligte Gehirnareale

Da der Organismus auf veränderte Umgebungsbedingungen reagieren können muss, stellt sich nunmehr die Frage, wie die während der Furchtkonditionierung erworbenen Gedächtnisinhalte modifiziert werden können. Bereits Pavlov hatte festgestellt, dass sich die konditionierte Reaktion von Tieren auf einen konditionierten Stimulus (CS) nach und nach abschwächt, wenn er oft genug ohne den US präsentiert wurde. Dieses Phänomen wird als Extinktion bezeichnet, auch wenn der Name etwas unglücklich gewählt wurde, denn inzwischen weiß man, dass das Furchtgedächtnis bei der Extinktion im Allgemeinen eben nicht gelöscht, sondern von anderen Gedächtnisinhalten gehemmt und modifiziert wird. Anhand der folgenden drei Phänomene kann man das sehr gut erkennen (Myers und Davis, 2007):

- Wiedereinsetzen (engl. *reinstatement*): Wird das Versuchstier nach der Extinktion erneut nur dem US ausgesetzt, so kommt es bei der nachfolgenden CS-Präsentation in der gleichen Umgebung zu einer verstärkten Furchtreaktion.
- Erneuerung (engl. *renewal*): Wird das Versuchstier nach einer erfolgreichen Extinktion, die in Kontext A stattfand, in einem anderen Kontext (Kontext B) erneut dem CS ausgesetzt, ist das furchtspezifische Verhalten ausgeprägter als in Kontext A.
- Spontanerholung/spontane Wiederkehr (engl. *spontaneous recovery*): Wenn der CS nach einer längeren Zeit nach der Extinktion erneut präsentiert wird, so kommt es wieder zu einer verstärkten Furchtreaktion. Das Furchtgedächtnis scheint demnach deutlich stabiler zu sein als das Extinktionsgedächtnis.

Durch das Übertragen dieser Phänomene auf Menschen, die an einer Angststörung oder PTBS leiden, bietet sich ein Erklärungsansatz, warum die Therapie der genannten Erkrankungen so langwierig und mit zahlreichen Rezidiven verbunden ist. So erfolgt die Behandlung oftmals in einem spezifischen Kontext, in dem das Individuum vielleicht lernt, mit der Erkrankung umzugehen. Allerdings genügt dann ein Triggerreiz in einer anderen Umgebung, um die Symptome wiederkehren zu lassen.

Wie bereits beim Modell für die Furchtkonditionierung so wird auch für das Modell der Extinktion die Beteiligung mehrerer Gehirnregionen postuliert (Übersicht in Quirk und Mueller, 2008). Die Regionen, die für das Extinktionslernen von besonderer Bedeutung sind, sind die Amygdala, der Hippocampus und der mediale Präfrontalkortex, deren Rolle deshalb in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden soll.

Hippocampus

Im Kapitel zur Furchtkonditionierung wurde bereits geschildert, dass vor allem der ventrale Anteil des Hippocampus über seine Verbindungen zur Amygdala in die Bildung des Furchtgedächtnisses involviert ist. Demgegenüber existieren einige ältere Studien zum dorsalen Anteil des Hippocampus, die zu dem Ergebnis kamen, dass dieser Teil im Rahmen des Extinktionslernens eine Rolle spielen muss. So konnten Corcoran und Kollegen (2005) zeigen, dass eine Inaktivierung dieser Gehirnregion die Furchtextinktion behindert. Allerdings scheint der dorsale Hippocampus vor allem für die Integration von Kontextinformationen zuständig zu sein. Neuere Arbeiten konzentrieren sich somit verstärkt auf den ventralen Hippocampus und dessen Beteiligung an der Extinktion von Furcht.

Beim Extinktionslernen steht jedoch nicht die Verbindung vom ventralen Hippocampus zur Amygdala, sondern zum IL des mPFC im Vordergrund. Diese Efferenzen des Hippocampus scheinen die molekularen Prozesse, die während des Extinktionslernens im IL ablaufen, deutlich zu verstärken (Peters et al., 2010).

In einer weiteren Untersuchung der Arbeitsgruppe von Prof. Quirk (Sierra-Mercado et al., 2011) wurde dabei deutlich, dass der ventrale Hippocampus an der Akquisition des Extinktionsgedächtnisses beteiligt sein muss und dass die molekularen Prozesse, die für die weitere Konsolidierung verantwortlich sind, bereits während des Extinktionstrainings beginnen.

Medialer Präfrontalkortex

Wie bereits im vorherigen Kapitel auf Seite 9 beschrieben, wurden die einzelnen Bereiche im medialen Präfrontalkortex in den Experimenten lange Zeit nicht differenziert, was auch für die Forschung zur Furchtextinktion zutrifft. Nach und nach wurde der infralimbische Kortex (IL) als der Bereich des mPFC identifiziert, der an der Furchtextinktion beteiligt ist und somit einen funktionellen Gegenpart zum PL bildet (erste Ergebnisse siehe z.B. Quirk et al., 2000). Neben den hippocampalen Afferenzen, die insbesondere Umgebungsinformationen übermitteln, projizieren auch Neurone der BA von der Amygdala in den IL (Hoover und Vertes, 2007). Vom IL aus projizieren wiederum zahlreiche Neurone in die Amygdala und enden dort insbesondere in der BA und den ITC (Vertes, 2004).

Dabei scheint der IL im Präfrontalkortex von besonderer Bedeutung für das Extinktionslernen zu sein, auch wenn verschiedene Arbeiten – wahrscheinlich durch unterschiedliche Methoden – im Detail zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen: Sierra-Mercado und Kollegen (2011) konnten z. B. nachweisen, dass eine vorübergehende Hemmung des IL während des Extinktionstrainings das unmittelbare Extinktionslernen deutlich reduziert. Wird dagegen eine dauerhafte Läsion erzeugt, so kann zwar während des Extinktionstrainings ein abnehmendes Freezing beobachtet werden, allerdings wird die langfristige Speicherung des Extinktionsgedächtnisses unterbunden (Milad und Quirk, 2002). Es scheint demnach kaum alternative Verarbeitungswege zu geben, da Sierra-Mercado und Kollegen das reduzierte Ex-

tinktionsverhalten Tage später ebenfalls nachweisen konnten. Besonders interessant ist dabei noch ein Experiment aus der bereits erwähnten Arbeit von Milad und Quirk, bei dem eine elektrische Stimulation des IL während einer CS-Präsentation ein langfristiges Extinktionsverhalten auslöste (Milad und Quirk, 2002). Zusammengefasst muss der IL eine entscheidende Rolle bei der Konsolidierung des Extinktionsgedächtnisses spielen.

Amygdala

Es wurde bereits erwähnt, dass die Amygdala für die Langzeitspeicherung des Furchtgedächtnisses von essentieller Bedeutung ist (Gale et al., 2004), woraus gefolgert werden kann, dass eine Modifikation desselben wahrscheinlich ebenfalls die Amygdala mit einbezieht. Obwohl während der Extinktion ein Großteil der Informationen aus dem Hippocampus und dem mPFC erst in der BA und nachgeschalteten Strukturen der Amygdala integriert wird, zeigten einige Studien, dass bereits in der LA Veränderungen stattfinden. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass Neurone in der LA, bei denen die Furchtkonditionierung zu einer gesteigerten Antwort auf den CS führte, durch die Extinktion zumindest teilweise wieder in ihrer Aktivität abfallen (Hobin et al., 2003; An et al., 2012).

Die BA ist wie schon bei der Furchtkonditionierung von besonderem Interesse. Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, führt eine Inaktivierung der BA nach Furchtkonditionierung kurz vor der erneuten CS-Präsentation zu einer verringerten Furchtexpression. Allerdings wird damit auch das Extinktionslernen gehemmt, da Versuchstiere beim Test des Extinktionsgedächtnisses am Folgetag ein deutlich erhöhtes Freezing zeigten (Sierra-Mercado et al., 2011). Dabei manifestiert sich sogar ein Lerndefizit, wenn lediglich einer der beiden Teilkern inaktiviert wird (Amano et al., 2011). Diese Studien verdeutlichen, dass die BA bei der Akquisition des Extinktionsgedächtnisses unverzichtbar ist und anscheinend keine hinreichend effektiven sekundären Verarbeitungswege existieren, die ähnlich der Furchtkonditionierung ein Defizit ausgleichen könnten.

Analog zur Furchtkonditionierung konnten innerhalb der BLA und BMA eine Neuronenpopulation nachgewiesen werden, die dauerhaft ihre Aktivität bei der Präsentation eines bereits extinguierten CS erhöht (Herry et al., 2008; Amano et al., 2011). Für die BLA konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen im Vergleich zu den bei Furchtexpression aktiven Neuronen über eine abweichende Verteilung der Verbindungen zu anderen Hirnregionen verfügen: Sie erhalten Afferenzen und bilden Efferenzen zum mPFC, zeigen allerdings keinerlei Verbindung zum Hippocampus (Herry et al., 2008). Bisher ist allerdings unklar, ob sich die Zielneurone auch in ihrer räumlichen Dissemination unterscheiden, sich also z. B. die mit den Extinktionsneuronen in der BA verbundenen Nervenzellen des mPFC im IL konzentrieren oder gleichmäßig verteilt sind.

Der zweite Kern der Amygdala, der mit dem Extinktionslernen in Zusammenhang gebracht wird, gehört zum Netzwerk der interkalierten Zellen (ITC). Das relevante Gebiet liegt zwischen BA und CeM und erhält Afferenzen vom IL und von der BA (Berretta et al., 2005;

Marowsky et al., 2005) und inhibiert über GABAerge Synapsen unter anderem den CeM. Im Rahmen des Furchtextinktionslernens werden die Afferenzen von der BA durch die Afferenzen vom IL potenziert (Berretta et al., 2005), sodass die inhibitorische Wirkung der ITC verstärkt wird. Dadurch kommt es letztlich im CeM zu einer Unterdrückung des Furchtverhaltens (Likhtik et al., 2008).

1.3. BDNF als Protein der synaptischen Plastizität

Das Protein *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) gehört zu einer Gruppe strukturell ähnlicher neuronaler Wachstumsfaktoren, auch Neurotrophine genannt. Weitere bekannte Vertreter dieser Gruppe sind Neurotrophin 4/5 und der Nervenwachstumsfaktor (NGF). Seit vielen Jahren ist BDNF bereits Gegenstand intensiver Forschung und konnte im Gehirn mit verschiedenen Effekten, die letztlich zu strukturellen und funktionellen Änderungen führen, in Verbindung gebracht werden (Übersicht z. B. in Edelman et al., 2014). Dazu gehört zum einen die neuronale Differenzierung im Rahmen der Hirnentwicklung. Während dieser Zeit unterstützt BDNF auch das Zellwachstum und verhindert, insbesondere im Zusammenhang mit einer Verstärkung der synaptischen Übertragung, die Apoptose von Nervenzellen (McAllister et al., 1995; Hu et al., 2005). Ähnliche Prozesse finden an adulten Neuronen statt und bilden einen Teil der bei der Langzeitpotenzierung (LTP) ablaufenden Mechanismen (Korte et al., 1995 bzw. zusammengefasst in Gottmann et al., 2009). Unter LTP werden dabei sämtliche Vorgänge zusammengefasst, die Synapsen langfristig so verändern, dass eine Übertragung von Axon auf Dendrit effektiver wird und somit die synaptische Übertragung verstärkt wird. Die Langzeitpotenzierung wird als ein entscheidendes molekulares Korrelat des Lernens angesehen. Initial wurde LTP an hippocampalen Neuronen erforscht, allerdings konnten die Mechanismen der LTP inzwischen auch in der Amygdala nachgewiesen werden (Maren und Fanselow, 1995; Rogan et al., 1997; Meis et al., 2012).

Das zunächst synthetisierte Vorläuferprotein proBDNF wird über mehrere Modifikationsstufen in BDNF umgewandelt. Ein entscheidender Schritt ist dabei die Abspaltung der pro-Domäne durch Endopeptidasen, durch die proBDNF in reifes BDNF umgewandelt wird (Zusammenfassung in Lessmann und Brigadski, 2009). Während BDNF vornehmlich an *Tropomyosin-related-Kinase B* (TrkB, alternativ Tyrosin-Kinase-Rezeptor B) bindet, geschieht die Signalweiterleitung des Vorläuferproteins proBDNF vor allem über den p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR). Über TrkB können dabei prinzipiell drei Signalkaskaden ausgelöst werden (MAP-Kinase, PI-3-Kinase und PLC γ), die z. B. in der Arbeit von Segal (2003) näher beschrieben sind. Für zwei dieser Signalwege (PI-3-Kinase, PLC γ) wurde eine unterschiedliche Rolle während der Akquisition und der Konsolidierung von Furchtgedächtnisinhalten nachgewiesen (Musumeci et al., 2009). Letztlich führt die TrkB-Aktivierung sowohl zu schnellen posttranslationalen (z. B. Rezeptorphosphorylierung (Levine et al., 1995))

und langfristigen (auf Genexpressionsebene (Alder et al., 2003)) Änderungen. Während eine Aktivierung des TrkB über die genannten Signalwege vereinfacht gesagt zu Zellwachstum, neuronaler Differenzierung und LTP führt, hat eine Aktivierung des p75NTR entgegengesetzte Effekte und führt z. B. zum Zelltod und Langzeitdepression (LTD) (Cowansage et al., 2010). Da proBDNF im Vergleich zu BDNF eine wesentlich höhere Affinität zum p75NTR besitzt (Teng et al., 2005), erklärt sich die Bedeutung der oben beschriebenen Spaltung des Vorläuferproteins und ihrer Regulation.

Während der Furchtkonditionierung und -extinktion ist BDNF scheinbar das einzige Neurotrophin, das in relevantem Maße an der Konsolidierung der neuen Gedächtnisinhalte beteiligt ist (Rattiner et al., 2004). Eine (genetisch) bedingte globale verringerte Synthese von BDNF hat somit drastische Auswirkungen auf die dabei ablaufenden Prozesse und reduziert in der Folge die Fähigkeit zur Gedächtniskonsolidierung (Endres und Lessmann, 2012; Psotta et al., 2013; Meis et al., 2018). Dabei sind insbesondere ältere Tiere betroffen, die gegenüber Jungtieren eine nochmals verringerte BDNF-Synthese aufweisen.

Für die BA der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass das Furchtlernen von der lokalen BDNF-Synthese und -Expression abhängig ist und eine entsprechende Hemmung zum Verlust der Konsolidierung des Furchtgedächtnisses führt (Heldt et al., 2014). Bereits vorher hatten dies Ou und Kollegen (2010) an einem Rattenmodell für die gesamte Amygdala nachweisen können, ohne allerdings eine Differenzierung zwischen LA und BA vorzunehmen. Dabei fanden sie einen zweigipfligen Verlauf der BDNF-Konzentration mit Spitzen bei einer und 12 Stunden nach der Furchtkonditionierung, wobei beide Zeitpunkte für die Konsolidierung des Furchtgedächtnisses von Bedeutung waren.

Es wurde bereits geschildert, dass die Bedeutung des Hippocampus bei der *cue*-abhängigen Furchtkonditionierung nicht eindeutig ist. So gibt es Arbeiten, die bei Ratten keine Änderung der BDNF-mRNA-Konzentration im dorsalen Hippocampus fanden (Rattiner et al., 2004) bzw. als Korrelat einer Stressreaktion sogar einen Abfall der BDNF-mRNA nachweisen konnten. Anders sieht es im Präfrontalkortex aus: Hier hatte bereits die im Kapitel 1.2.1 erwähnte Arbeit von Choi und Kollegen (2010) anhand eines Mausmodells gezeigt, dass BDNF im PL für die Konsolidierung des Furchtgedächtnisses vonnöten ist. An dieser Stelle sei explizit daraufhingewiesen, dass in der Arbeit von Choi und Kollegen die Aktivierung des TrkB-Rezeptors (auch BDNF-unabhängig) der entscheidende Faktor für das Furchtlernen war. Die Aktivierung des TrkB-Rezeptors erfolgt *in vivo* aber bereits durch das in Vesikeln vorgehaltene BDNF, während die gesteigerte Transkription und Translation von BDNF (sprich, erhöhte BDNF-mRNA- und BDNF-Proteinkonzentrationen) Ausdruck von Gedächtniskonsolidierungsprozessen sein dürfte.

Die molekularen Prozesse, die in der Amygdala und insbesondere in der BA für die Konsolidierung des Extinktionslernen verantwortlich zeichnen, beruhen nach Chhatwal (2006) ebenfalls auf einer verstärkten BDNF-Expression. So konnten sie bei Ratten zum einen eine erhöhte BDNF-mRNA-Expression nach der Extinktion von Furcht nachweisen. Auf der

anderen Seite wiesen Tiere, bei denen der BDNF-TrkB-Signalweg gehemmt wurde, über mehrere Tage hinweg ein wesentlich stärker ausgeprägtes Furchtverhalten auf. Die primäre Gedächtnisakquisition läuft dabei BDNF-unabhängig ab und wurde bei den Experimenten von Chhatwal und Kollegen nicht beeinträchtigt. Neben dem BDNF-TrkB-Signalweg scheint auch der proBDNF-p75NTR-Signalweg eine wichtige Rolle beim Extinktionslernen zu spielen. Unsere Arbeitsgruppe konnte dabei nachweisen, dass nicht nur die Konsolidierung, sondern auch die Akquisition des Extinktionsgedächtnisses von der Sekretion des BDNF-Vorläuferproteins abhängig ist (Ma et al., 2022).

Die entscheidende Rolle des Neurotrophins BDNF im Hippocampus während der Furchtextinktion hatten bereits Heldt und Kollegen (2007) bei Mäusen aufgezeigt. In ihren Experimenten kamen sie außerdem wie die Arbeitsgruppe um Prof. Ressler (2004) zu dem Ergebnis, dass für die Furchtkonditionierung eine BDNF-abhängige synaptische Plastizität im Hippocampus nicht notwendig ist. Besonders erwähnenswert erscheint in diesem Zusammenhang die Arbeit von Peters und Kollegen (2010). Sie konnten bei Ratten, die ein effektiveres Extinktionslernen aufwiesen, auch signifikant höhere BDNF-Konzentrationen im Hippocampus nachweisen. In weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe gelang es, durch die alleinige Infusion von BDNF in den Hippocampus Extinktionslernen auslösen. Dieser Effekt wurde wiederum unterbunden, wenn zeitgleich ein BDNF-Antikörper in den IL des medialen Präfrontalkortex eingebracht wurde, woraus geschlossen wurde, dass BDNF aus dem Hippocampus seinen Effekt hauptsächlich über Efferenzen zum IL entfaltet.

Obwohl die Rolle des infralimbischen Kortex bei der Furchtextinktion eindeutig belegt ist, rückte die Bedeutung von BDNF in dieser Region erst in den letzten Jahren in den Fokus. So verwundert es nicht, dass es bezüglich der Rolle von BDNF teilweise widersprüchliche Ergebnisse gibt. Unsere Arbeitsgruppe konnte anhand eines Mausmodells zeigen, dass eine global reduzierte BDNF-Konzentration im mPFC mit einem geringeren Extinktionslernen assoziiert ist (Psotta et al., 2013). Bredy und Kollegen (2007) konnten zudem an einem Mausmodell auf RNA-Ebene nach zwei Stunden einen Anstieg im IL beobachten, während die Arbeitsgruppe von Prof. Quirk (Rosas-Vidal et al., 2014) bei Ratten auf Proteinebene keine Änderung feststellte. In letztgenannter Arbeit wurde aber gleichzeitig durch die Applikation eines BDNF-Antikörpers in den IL die Konsolidierung des Extinktionsgedächtnisses beeinträchtigt, womit die Bedeutung des Neurotrophins in dieser Gehirnregion während der Extinktion von Furcht unterstrichen wird.

Während die Bedeutung von BDNF für das Extinktionslernen in der Amygdala und im Hippocampus somit recht eindeutig ist und hier insbesondere Detailfragen zum zeitlichen Verlauf interessant erscheinen, sind die Ergebnisse der bisherigen Studien zum IL teilweise widersprüchlich.

1.4. Ziele der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien durchgeführt, die sich mit einzelnen Aspekten der Bedeutung von BDNF für das Furchtgedächtnis beschäftigt haben. Dabei kamen unterschiedlichste Methoden zum Einsatz, sodass sich insbesondere im Hinblick auf die verwendeten Versuchstiere die Ergebnisse unter Umständen nicht übertragen lassen. In dieser Arbeit sollten deswegen bereits vorhandene Erkenntnisse an einem Wildtypmausmodell überprüft und in einem zweiten Schritt erweitert werden.

Im Einzelnen sollte für die Furchtkonditionierung ein Versuchsprotokoll entwickelt werden, das zu einer vornehmlich tonreizspezifischen Konditionierung führt und nicht den Kontext in den Vordergrund stellt. Mithilfe dieses Protokolls wurden im Anschluss die Versuchstiere trainiert, um die entsprechenden Lernvorgänge in Gang zu setzen. In dieser Arbeit war dabei der zeitliche Ablauf der frühen Lernvorgänge von besonderem Interesse. Als Markerprotein diente dabei BDNF, da es – wie weiter oben dargelegt – von entscheidender Bedeutung für die synaptische Plastizität ist. Es wurde in drei für das Furchtgedächtnis und die Furchtextinktion besonders wichtigen Gehirnregionen die BDNF-Konzentration zu vordefinierten Zeitpunkten mit dem Ziel bestimmt, einen spezifischen Verlauf nachweisen zu können. Wir erwarteten im Rahmen der Furchtkonditionierung auf der Grundlage früherer Forschungsergebnisse zumindest in der Amygdala und im Präfrontalkortex einen Anstieg der BDNF-Konzentration im Zeitfenster 30 bis 120 Minuten nach dem Verhaltenstraining.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Beteiligung mehrerer Gehirnregionen an der Furchtextinktion untersucht werden. Dafür musste zuerst ein Versuchsprotokoll entwickelt werden, das zu einer stabilen Extinktion während des einmaligen Verhaltenstrainings führte. Von den so trainierten Versuchsmäusen sollten in zeitlich vorgegebenen Abständen Proben aus dem Hippocampus, dem Präfrontalkortex und der Amygdala gewonnen und für die BDNF-Proteinbestimmung verwendet werden. Bisherige Arbeiten zur Furchtextinktion haben sich in den meisten Fällen auf Ratten bezogen und lieferten, wie in den vorherigen Kapiteln dargelegt wurde, teilweise widersprüchliche Resultate in Bezug auf die Beteiligung der erwähnten Gehirnareale. Insbesondere dem zeitlichen Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration wurde bisher kaum Beachtung geschenkt. Darüber hinaus lagen die Untersuchungsintervalle häufig im Bereich von mehreren Stunden bis Tagen, sodass der zeitliche Rahmen, in dem zielgerichtete Interventionen sinnvoll erscheinen würden, momentan unklar ist. Diese Widersprüche und Lücken sollten mit der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für sämtliche Versuchsreihen männliche Tiere des Wildtypmausstammes C57BL/6J (Fa. Charles River, Sulzfeld) verwendet, die drei Monate alt waren. Der C57BL/6J-Stamm ist ein weit verbreiteter und genetisch gut untersuchter Mausstamm, der sich u. a. durch ein gutes Lernverhalten auszeichnet.

Die Haltung erfolgte in Typ II Käfigen in Gruppen von 3 bis 4 Tieren in einem klimatisierten Raum (22 °C, 50 % relative Luftfeuchtigkeit) mit einem künstlichen Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden (Licht an um 7 Uhr). Darüber hinaus standen den Mäusen Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Die Durchführung der Tierversuche erfolgte unter dem Aktenzeichen 42502-2-1191 UniMD.

Die Tiere wurden vor den Verhaltensversuchen in die folgenden vier Gruppen eingeteilt: Konditionierung, Extinktion, Kontrollgruppe für die Konditionierung und Kontrollgruppe für die Extinktion. Innerhalb dieser Gruppen wurden die Tiere verschiedenen Präparationszeitpunkten zugeordnet, an denen die Tiere nach Abschluss der Verhaltensversuche präpariert werden sollten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Tiere eines Käfigs (also sehr eng verwandte Mäuse) auf möglichst unterschiedliche Präparationszeitpunkte aufgeteilt wurden. Für die Gruppen der Konditionierung und Extinktion waren dies die fünf Zeitpunkte 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach dem entsprechenden Verhaltensexperiment, für die jeweils mindestens fünf Versuchstiere vorbereitet wurden.

2.2. Verhaltensversuche

2.2.1. Furchtkonditionierungssystem

Für die Durchführung der Verhaltensversuche wurde das Conditioning System der Fa. TSE (TSE-Systems, Bad Homburg) mit der Software TSE Fear Conditioning System 9.02 eingesetzt. Die verwendeten Versuchsparameter sind in **Tabelle 2.1** angegeben.

Tabelle 2.1. FCS-Parameter

pulsierender E-Reiz (Fuß)	0,40 mA
Tonintensität	80 dB
Tonhöhe	8 kHz
Tondauer	30 s
Freezingschwelle	> 4 s

Das System besteht aus einer Steuereinheit und einer verschließbaren schallisolierten Box, in der sich 24 eng zusammenliegende und parallel verlaufende Metallstreben befinden, über die ein Stromreiz appliziert werden kann. Begrenzt werden die Metallstreben von einem Lichtschrankensystem mit einem Innendurchmesser von 24 x 24 cm², das die Registrierung der Aktivität der Versuchstiere in allen drei Ebenen erlaubt. Während der Versuche wurde zusätzlich ein zum Boden und nach oben hin offener Kunststoffbehälter im Innenbereich aufgestellt, um ein Entfliehen der Mäuse zu unterbinden. Dadurch ergab sich ein effektiver Versuchsbereich von 23 x 23 cm². Das System ist beispielhaft in **Abbildung 2.1** dargestellt.

Da die Tiere während der Verhaltensversuche neben dem Ton auch Kontextinformationen verarbeiten (Maren, 2001; Maren et al., 2013), in der vorliegenden Arbeit aber speziell das *cue*-abhängige Furchtlernen untersucht werden sollte, wurde der Ton sehr laut präsentiert um etwaige Kontextinformationen möglichst in den Hintergrund zu rücken. Wenn ein Versuchstier mehrfach in das Conditioning System verbracht wurde (z. B. bei den Extinktionsversuchen mit vorheriger Konditionierung), wurde die Umgebung so weit wie möglich verändert. Dazu standen ein schwarzer und ein durchsichtiger Kunststoffbehälter zur Verfügung. Zusätzlich konnte die Lichtintensität und das verwendete Reinigungsmittel und somit der Umgebungsduft beeinflusst werden. Außerdem konnte in diesem Zusammenhang auf die Metallstreben eine ebene Kunststoffplatte gelegt werden. Durch diese Maßnahmen sollte gewährleistet werden, dass der Sinuston von den Versuchstieren als alleiniger Hinweis (CS) auf den möglicherweise bevorstehenden Stromreiz verwendet wird.

2.2.2. Furchtkonditionierung

Konditionierungsgruppe

Die Verhaltensversuche wurden nach dem Grundgedanken der klassischen Konditionierung durchgeführt, wobei als unbedingter Reiz (US) ein gepulster elektrischer Reiz mit 0,40 mA



Abbildung 2.1. Dargestellt ist das Konditionierungssystem. Im unteren Bildbereich sind die Lichtschranken und die Metallstreben erkennbar. Außerdem wurde der durchsichtige Kunststoffbehälter eingesetzt.

und als bedingter Reiz (CS) ein 8-kHz-Sinuston mit einer Lautstärke von etwa 80 dB gewählt wurden. Während der Konditionierung erfolgte die fünfmalige Darbietung des Sinustons über jeweils 30 Sekunden, an dessen Ende für eine Sekunde die parallele Applikation des Stromreizes stand. Zwischen den Reizpaarungen befanden sich unterschiedlich lange reizfreie Intervalle von ein bis zwei Minuten. Der genaue Aufbau des insgesamt 12,5 Minuten langen Protokolls ist in der **Tabelle A.1** auf Seite 70 im Anhang dargestellt. Zur Veranschaulichung kann die **Abbildung 2.2** herangezogen werden.

Nachfolgend wurden die Tiere für eine vorher festgelegte Zeitspanne in ihre Heimatkäfige zurückgesetzt, um dann zum entsprechenden Zeitpunkt präpariert zu werden (siehe Abschnitt Präparation und Gewinnung der Gehirnproben auf S. 22).

Die Reinigung sämtlicher Oberflächen, mit denen die Tiere in Kontakt kamen, erfolgte mit 70%igem Alkohol. Als weitere Umgebungsvariable wurde das Licht am Conditioning System „hell“ (11 Lux) eingestellt und der durchsichtige Kunststoffbehälter verwendet.

Tag 1

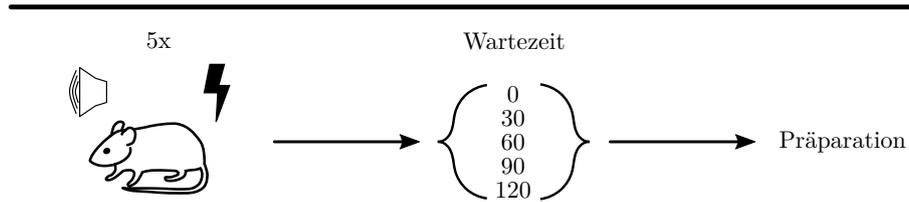


Abbildung 2.2. Furchtkonditionierung: Nach einer zweiminütigen Habituationsphase wurde (verteilt über 10,5 Minuten) ein Tonreiz fünfmal für jeweils 30 Sekunden präsentiert, an dessen Ende für eine Sekunde ein Stromreiz appliziert wurde. Anschließend wurden die Versuchstiere für einen vorher definierten Zeitraum (Angaben in Minuten) in die Heimatkäfige zurückgesetzt und nachfolgend präpariert.

Kontrollgruppe für die Konditionierung

Die Kontrollgruppe wurde aus naiven Tieren gebildet. Sie absolvierten keinerlei Verhaltensversuche, wurden aber nochmals in zwei Gruppen aufgeteilt, um etwaige tageszeitliche Schwankungen in der BDNF-Konzentration zu untersuchen, wie sie bereits teilweise bei Ratten nachgewiesen werden konnten (Schaaf et al., 2000; Ou et al., 2010). Für die Zuordnung zur jeweiligen Versuchsgruppe war die Tageszeit der Präparation entscheidend: Bei der ersten Gruppe entspricht die Präparationszeit dem Beginn der Verhaltensversuche bei den konditionierten Tieren (früher Vormittag, 8:00–9:00), wohingegen die zweite Gruppe zu dem Zeitpunkt präpariert wurde, zu dem auch die konditionierten Tiere präpariert wurden (später Vormittag und Mittagszeit, 12:00–13:00).

2.2.3. Furchtextinktion

Extinktionsgruppe

Um die Frage nach der Änderung der BDNF-Konzentration in verschiedenen Gehirnanaren nach dem Extinktionslernen zu beantworten, wurde eine Versuchsgruppe gebildet, deren Training über zwei Tage erfolgte (s. **Abbildung 2.3**): Am ersten Tag wurden die Mäuse einer klassischen Furchtkonditionierung unterzogen. Die genutzten Parameter und Kontextbedingungen entsprachen jenen in Kapitel 2.2.2. Nach dem Training wurden die Tiere jedoch bis zum nächsten Tag in die Ausgangskäfige zurückgesetzt. Am Folgetag erfolgte dann das Extinktionstraining. Sie wurden dazu nach einem Extinktionsprotokoll (Anhang **Tabelle A.2** S. 71) insgesamt 30-mal dem CS ausgesetzt, ohne aber einen weiteren Stromreiz zu erhalten. Auch hier wurden die Tiere für einen bestimmten Zeitraum wieder in ihre Käfige zurückgesetzt und zum jeweiligen Zeitpunkt präpariert.

Für den Versuchsabschnitt am zweiten Tag wurde ein anderer Kontext gewählt, um kontextabhängige Einflüsse im Rahmen der Extinktion der *cue*-abhängigen Furcht zu minimieren. Dazu wurde das Licht abgedunkelt (7,7 Lux) sowie Descosept AF (Dr. Schumacher GmbH)

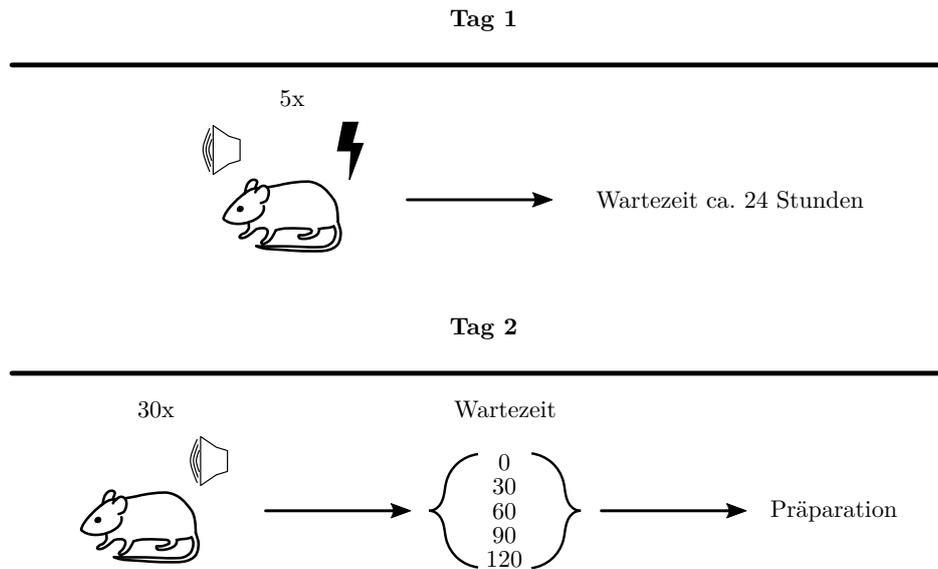


Abbildung 2.3. *Furchtextinktion: Nach einer zweiminütigen Habituationsphase wurde (verteilt über 10,5 Minuten) ein Tonreiz fünfmal für jeweils 30 Sekunden präsentiert, an dessen Ende für eine Sekunde ein Stromreiz appliziert wurde. Anschließend wurden die Versuchstiere für 24 Stunden in die Käfige zurückgesetzt. Am 2. Tag wurde in einem vollständig veränderten Kontext innerhalb von 19,5 Minuten 30-mal der Ton präsentiert und die Tiere nach einer vorher definierten Wartezeit (Angabe in min) präpariert.*

als Reinigungsmittel, ein schwarzer Kunststoffbehälter und eine plane Kunststoffplatte zur Abdeckung des Bodengitters verwendet.

Kontrollgruppe für die Extinktion

Diese Gruppe diente zur Überprüfung der Ergebnisse der extingierten Tiere. Dabei ging es um den Nachweis, dass Veränderungen der BDNF-Konzentration in der Verumgruppe allein durch das Extinktionstraining hervorgerufen werden, weswegen die Versuchstiere wie in der Extinktionsgruppe am ersten Tag eine normale Konditionierung durchliefen (siehe Furchtkonditionierung auf S. 18), am zweiten Tag jedoch kein Extinktionstraining absolvierten. Stattdessen wurden die Kontrolltiere für einen vergleichbaren Zeitraum lediglich dem Kontext der Extinktion ausgesetzt, ohne dabei den konditionierten Reiz zu präsentieren. Um die Zahl der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurde diese Kontrollgruppe erst erstellt, als die ersten Ergebnisse der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Messungen der Extinktionsgruppe vorlagen. Die Kontrolltiere wurden dann nur zu den Zeitpunkten 30, 60 und 90 Minuten präpariert, da es bei ihnen Hinweise auf Veränderungen in der BDNF-Konzentration gab.

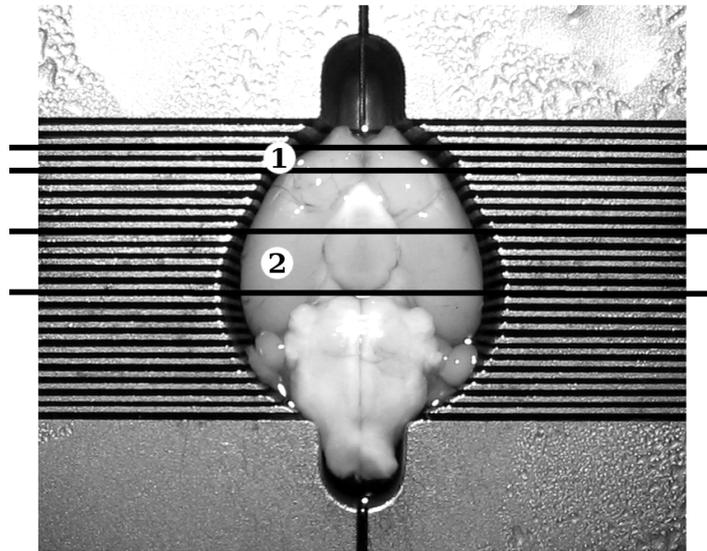


Abbildung 2.4. Mithilfe der Gehirnmatrixe wurden die Schnittebenen für die jeweiligen Gehirnregionen festgelegt und sind hier beispielhaft markiert (1 = mPFC, 2 = Amygdala und Hippocampus).

2.3. Präparation und Gewinnung der Gehirnproben

Nach Abschluss der Verhaltensversuche wurden die Tiere für den jeweils vorher festgelegten Zeitraum – also 0 bis 120 Minuten – zurück in die Heimatkäfige gesetzt. Anschließend wurden sie einzeln in einem separaten Raum präpariert. Dazu wurden die Mäuse mittels Isofluran in einem Glasbehälter anästhesiert und unter der Narkose decapitiert. Im nächsten Schritt wurde die dorsale Schädeldecke vorsichtig entfernt, sodass das Gehirn von dieser Seite aus herausgelöst werden konnte, wozu meistens noch die Durchtrennung des N. opticus mithilfe einer anatomischen Pinzette notwendig war. Der entnommene Gehirnteil bestand aus Cerebrum, Cerebellum und Teilen des Hirnstamms. Das gewonnene Gewebe wurde zur Verminderung von Abbauprozessen mit einer eisgekühlten ACSF-Lösung umspült und in eine gekühlte Gehirnmatrixe (Fa. AgnTho's, Lidingö/Schweden, **Abb. 2.4**) gelegt. Die Gehirnmatrixe ist ein Metallblock mit vorgeformter Vertiefung für das mit der dorsalen Seite nach unten hineingelegte Gehirn und Schnittmarkierungen am Rand.

Leicht kaudal des Chiasma opticum etwa in Höhe Bregma -0,7mm erfolgte dann durch eine Matrizenklinge der erste coronale Gehirnschnitt, von dem aus 2,5mm weiter kaudal ein zweiter Schnitt durchgeführt wurde, womit der Gehirnabschnitt, in dem sich Amygdala und Hippocampus befinden, getrennt werden konnte. Ähnlich erfolgte im Anschluss die Präparation des Präfrontalcortex: Dazu wurden zwei Klingen ca. 1,8 bzw. 2,8mm weiter rostral eingebracht. Beide Hirnschnitte wurden entnommen und – nach Betrachtung unter einem Binokularmikroskop zur Überprüfung der Schnittlokalisation und -qualität – auf einem Aluminiumblock angefroren. Um aus den gefrorenen Gehirnschnitten den lateralen Teil der Amygdala (bilateral), den dorsalen Hippocampus (bilateral) und infralimbischen bzw.

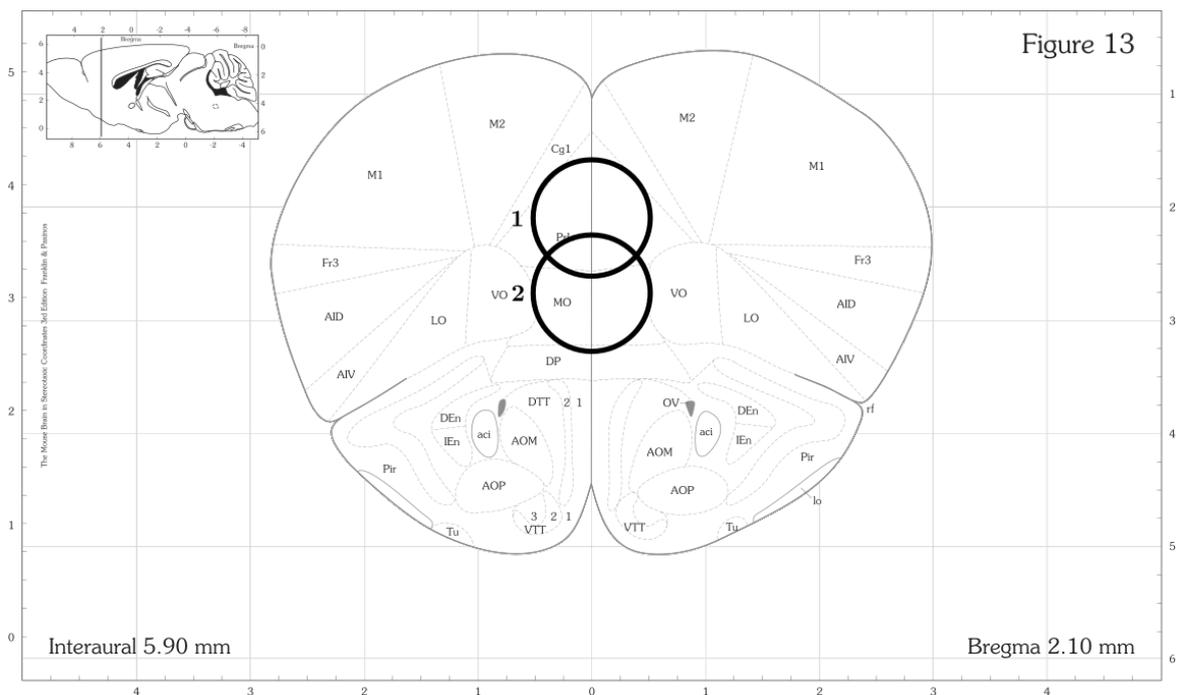


Abbildung 2.6. *Coronaler Schnitt bei Bregma 2,1 mm mit Markierung der Regionen, in denen Proben nach Konditionierung (1) und Extinktion (2) gewonnen wurden. Nach Franklin und Paxinos (2007)*

2.4. Bestimmung der BDNF-Konzentration im ELISA

Die quantitative Bestimmung der BDNF-Konzentration in den gewonnenen Gehirnproben wurde mit Hilfe des free-BDNF-Sandwich-ELISA-Kits der Fa. R&D-Systems (Wiesbaden) nach den Herstellerangaben durchgeführt. In Vorbereitung für die ELISA-Messung wurde das Probenmaterial zuerst mithilfe eines Lysepuffers lysiert, sodass die Zellen aufgeschlossen wurden und das intrazelluläre BDNF für die Messung verfügbar wurde. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert. Für den Sandwich-ELISA wurde der Probenüberstand auf eine mit monoklonalen Antikörpern, die in diesem Fall das BDNF-Protein binden und fixieren, beschichtete Platte gegeben. Im zweiten Schritt wurde ein weiterer monoklonaler BDNF-spezifischer Antikörper zugefügt, der eine Meerrettich-Peroxidase trägt. Nach dem Entfernen nicht gebundener Antikörper wurde Tetramethylbenzidin hinzugegeben, das mit Wasserstoffperoxid durch die antikörpergebundene Peroxidase reduziert wird. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag, der proportional zum vorhandenen BDNF in der Probenlösung ist und somit über eine Absorptionsmessung dessen Quantifizierung erlaubt. Für die Erstellung der Standardkurve wurde rekombinantes humanes BDNF verwendet.

Die Absorptionsmessung erfolgte in einem Infinite F200 Plattenlesegerät der Fa. Tecan Deutschland (Crailsheim), der die Lichtabsorption jeweils bei 450 nm und bei 570 nm gemessen hat. Der zweite Messwert diente dabei der Verringerung von Störeinflüssen durch die

ELISA-Platte selbst und wurde dazu von den Absorptionswerten bei 450 nm subtrahiert. Sämtliche Proben wurden in einer Doppelbestimmung gemessen, von der dann der Mittelwert gebildet wurde. Sollten sich bei der Doppelbestimmung Abweichungen von mehr als 10 % zum Mittelwert aus der Doppelbestimmung ergeben, wurde das jeweilige Ergebnis verworfen. In diesem Fall konnte zumindest bei den Proben aus dem Hippocampus und der Amygdala auf die kontralaterale Seite zurückgegriffen werden. Bei den Messungen für die beiden Hirnregionen wurde außerdem darauf geachtet, dass die ausgewählten Proben möglichst gleichmäßig aus beiden Hemisphären stammten. Die gemessenen BDNF-Konzentrationen wurden abschließend zur besseren Darstellung auf das Probengewicht bezogen.

2.5. Chemikalien

Für die Verhaltensversuche und die Präparation wurden die in **Tabelle 2.2** aufgeführten Chemikalien genutzt.

Tabelle 2.2. *Verwendete Chemikalien*

96%iger Alkohol (auf 70 % verdünnt)	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Descosept AF	Fa. Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld-Beiseförth
Isofluran	Fa. Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Die fertige ACSF-Lösung, die während der Präparation eine etwaige Degeneration der Neurone verringern sollte, wurde aus einer Stocklösung und weiteren Substanzen hergestellt. Die genaue Zusammensetzung ist in **Tabelle 2.3** dargestellt.

Tabelle 2.3. *ACSF-Zusammensetzung*

Stocklösung 10-fach	125 mM NaCl 2,5 mM KCl 0,8 mM NaH ₂ PO ₄
weitere Substanzen	26 mM Glukose 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂
versetzt mit Carbogen	95 % O ₂ , 5 % CO ₂

Der Lysepuffer, der vor der ELISA-Bestimmung genutzt wurde, um die Zellen in den Gewebeproben zu lysieren und damit das intrazelluläre BDNF freizusetzen, setzte sich aus den in **Tabelle 2.4** genannten Chemikalien zusammen.

Tabelle 2.4. *Lysepuffer-Zusammensetzung*

NP-40
1 M NaCl
0,5 M Tris-HCl
80%iges Glycerol
200 mM PMSF
0,2%iges Aprotinin
0,1%iges Leupeptin

2.6. Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit der Software R (The R Foundation for Statistical Computing, Wien/Österreich) in Version 4.2 analysiert. Für den statistischen Vergleich von zwei Gruppen wurde ein zweiseitiger T-Test verwendet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Außerdem wurde bei der Auswertung mehrerer trainierter Gruppen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein Post-hoc-Dunnett-Test durchgeführt. Ein Ergebnis wurde dann als statistisch signifikant angenommen, wenn $P \leq 0,05$ war. Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

3. Ergebnisse

In diesem Abschnitt sollen zunächst die Ergebnisse der Tiere dargestellt werden, bei denen die BDNF-Proteinexpression nach der Furchtkonditionierung bestimmt wurde. Im zweiten Teil werden dann die Ergebnisse der BDNF-Proteinbestimmungen nach dem Extinktionstraining von Furcht dargestellt. Es werden jeweils zuerst die Verhaltensdaten genauer betrachtet, um im Anschluss näher auf die BDNF-Proteinbestimmung in den einzelnen Gehirnarealen unter Einbeziehung naiver Kontrolltiere einzugehen. Sämtliche Konzentrationsangaben wurden im Anhang in den **Tabellen A.4** und **A.5** zusammengefasst.

3.1. Furchtkonditionierung

3.1.1. Verhaltensversuche

Für die Auswertung der Verhaltensdaten, die während der Furchtkonditionierung gewonnen wurden, können mehrere Parameter herangezogen werden, die allesamt automatisiert erfasst worden sind. Um zu überprüfen, ob ein Stromreiz erfolgreich appliziert wurde, können z. B. die Anzahl der Sprünge sowie Veränderungen in der Bewegungsgeschwindigkeit untersucht werden. Außerdem ist zu erwarten, dass die Versuchstiere im Verlaufe des Konditionierungstrainings ein zunehmendes Freezingverhalten zeigen. Tiere, die dieses Verhalten nur unzureichend zeigten, wurden von der Proteinbestimmung mittels ELISA ausgeschlossen.

Insgesamt wurden 44 Versuchstiere für die Gruppe der Furchtkonditionierung trainiert, wovon 7 von der weiteren Proteinbestimmung ausgeschlossen wurden: Bei sechs nacheinander trainierten Tieren zeigte sich eine deutlich erniedrigte Anzahl an Sprüngen während und nach der US-Reizapplikation sowie ein niedriges Freezingniveau (Freezing während CS-Präsentation 4 und 5 $< 20\%$), sodass hier eine Fehlfunktion der Konditionierungsapparatur wahrscheinlich erscheint. Beim siebten Tier erfolgte eine falsche Gruppenzuordnung. Die 37 ausgewählten Tiere zeigten während der zweiminütigen Habituationsphase kein Freezing. Im Rahmen des Verhaltenstrainings nahm dieser Wert auf durchschnittlich $38,1\% \pm 3,8\%$ während der letzten beiden jeweils 30-sekündigen Tonpräsentationen zu. Dem detaillierten zeitlichen Verlauf in **Abbildung 3.1** kann außerdem entnommen werden, dass das Freezing innerhalb der Pausenzeiten auf ein vergleichbares Niveau wie bei der CS-Präsentation ansteigt.

Die Furchtkonditionierung sollte als standardisiertes Protokoll über alle Versuchstiere und damit alle Gruppen hinweg zu ähnlichen Freezingraten führen. Um etwaige Unterschiede

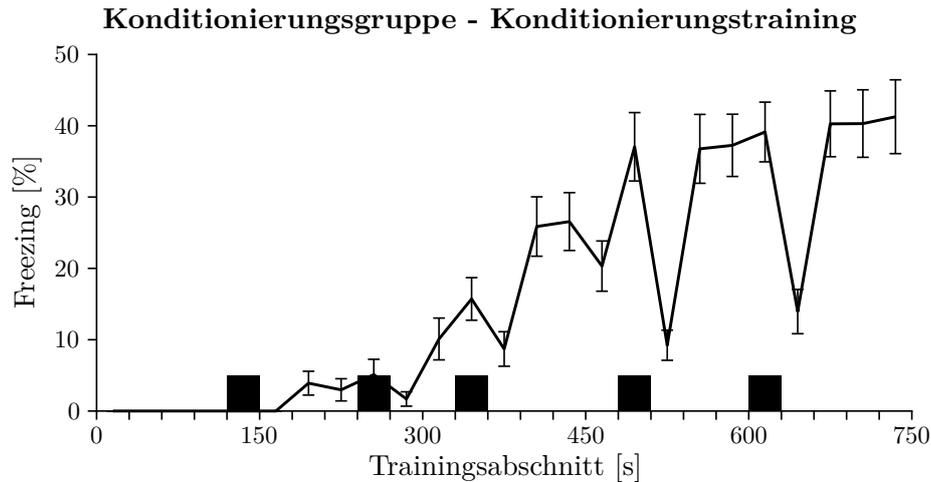


Abbildung 3.1. Dargestellt ist das Verhalten der Konditionierungsgruppe während der Furchtkonditionierung mit insgesamt 5 Ton-US-Präsentationen. Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme des Freezings im Laufe des Experimentes. Die schwarzen Flächen kennzeichnen die insgesamt 5 Tonpräsentationen, an deren Ende der US für eine Sekunde appliziert wurde. Das Freezing wird als Prozentanteil bezogen auf die Gesamtdauer des jeweiligen Abschnittes angegeben.

zwischen den den jeweiligen Zeitpunkten der Proteinbestimmung zugeordneten Gruppen aufzudecken, wurde eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. Sie ergab für die Interaktion von Zeitpunkt der BDNF-Bestimmung und Freezingdauer während der letzten beiden CS-Präsentationen keinen signifikanten Unterschied ($F_{(4,32)} = 1,88$, $p = 0,14$) und stützt somit die vorangegangenen Überlegungen.

3.1.2. Einfluss des Präparationszeitpunktes auf die BDNF-Proteinkonzentration bei naiven Versuchstieren

Wie bereits im Methodenteil dargestellt, sollte mit zwei naiven Gruppen getestet werden, inwieweit die BDNF-Proteinkonzentration in den jeweiligen Gehirnregionen vom Präparationszeitpunkt abhängt. In der Amygdala zeigte sich zwischen den beiden Gruppen zu acht bzw. fünf Tieren kein signifikanter Unterschied ($t_{(11)} = 0,81$, $p = 0,43$), der auf eine größere Änderung der BDNF-Proteinkonzentration am Vormittag hingewiesen hätte. Der BDNF-Proteingehalt lag somit in der Gruppe mit den gegen 8:00 präparierten naiven Tieren mit $106,5 \pm 2,6$ ng/g nur unwesentlich höher als in der Gruppe mit den später im Tagesverlauf (ca. 12:00) präparierten Tieren *naiv_{spät}* ($c_{BDNF} = 103,1 \pm 3,4$ ng/g).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für den Hippocampus zeigte sich ebenfalls, dass die BDNF-Proteinkonzentration zwischen den früher ($n = 7$) und den später präparierten Tiere ($n = 5$) nicht signifikant verschieden ist ($c_{BDNF} = 132,9 \pm 14,0$ ng/g vs. $142,6 \pm 1,1$ ng/g, $t_{(10)} = 0,74$, $p = 0,47$).

Für die Untersuchung des mPFC standen sieben Tiere für die früh und fünf für die spä-

ter präparierte Kontrollgruppe zur Verfügung. Wie schon in den anderen Regionen ergab sich hinsichtlich der BDNF-Proteinkonzentration zwischen den beiden Kontrollgruppen kein signifikanter Unterschied ($c_{BDNF} = 53,4 \pm 1,8$ ng/g vs. $49,5 \pm 3,9$ ng/g, $t_{(10)} = 0,99$, $p = 0,34$).

Zusammenfassend konnte somit bei der genutzten Gruppengröße keine statistisch signifikante Veränderung der BDNF-Proteinkonzentration für den Zeitraum vom frühen Vormittag bis zum Mittag nachgewiesen werden.

3.1.3. BDNF-Proteinkonzentration in den untersuchten Gehirnregionen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Furchtlernens

Amygdala

Für die Proteinbestimmung im ELISA standen Proben von insgesamt 27 konditionierten Tieren zur Verfügung. Dabei entfielen 5 Tiere auf die Gruppe, die sofort nach dem Training präpariert wurde. Weitere 5 Tiere standen jeweils für die Zeitpunkte 30 und 120 Minuten zur Verfügung. Jeweils 6 Tiere konnten für die Messpunkte 60 und 90 genutzt werden. Hinzu kamen fünf Tiere für die Kontrollgruppe mit naiven Wildtypmäusen. Das Probengewicht lag im Bereich von 1,1 bis 1,9 mg, allerdings wurden von vornherein schlecht lokalisierte oder vom Gewicht her deutlich abweichende ($m < 0,9$ mg oder $m > 2,0$ mg) Proben ausgeschlossen.

Zur besseren Darstellung des zeitlichen Verlaufes wurden die Konzentrationsangaben aller konditionierten Tiere zu den jeweiligen Testzeitpunkten auf das Ergebnis der naiven Mäuse ($naiv_{spät}$) bezogen. Hier zeigt sich ein im zeitlichen Verlauf gleichmäßiger Abfall der BDNF-Proteinkonzentration auf schließlich 86 % (s. **Abbildung 3.2**). Eine signifikante generelle Veränderung der BDNF-Konzentration ist mit einer ANOVA nicht nachweisbar, es zeigte sich allerdings eine Tendenz ($F_{(5,26)} = 2,11$, $p = 0,10$). Aufgrund dieser statistischen Tendenz wurde dennoch ein Dunnett post-hoc-Test gerechnet, um auf signifikante Veränderungen im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe hin zu testen.

Wird der Dunnett-Test – unter Beachtung des nicht signifikanten Ergebnisses der ANOVA – durchgeführt, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den naiven Tieren und den Tieren zum Zeitpunkt 90 min nach dem Training ($P = 0,04$). Bei den anderen Testgruppen zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede zur naiven Kontrollgruppe.

Hippocampus

Analog zum Vorgehen bei der Amygdala konnten für den Hippocampus Proben von 35 Versuchstieren und fünf naiven Kontrollmäusen verwendet werden. Bei den konditionierten Tieren standen 7 Mäuse für den Zeitpunkt 0, jeweils 6 für die Zeitpunkte 30 und 60, 7 für den Zeitpunkt 90 und 9 für den Zeitpunkt 120 nach der Konditionierung für die finale Auswertung zur Verfügung. Auch hier wurden Proben ausgeschlossen, deren Gewicht nicht im Bereich von 0,9 mg bis 2,0 mg lag.

Furchtkonditionierung - BDNF-Werte in der Amygdala

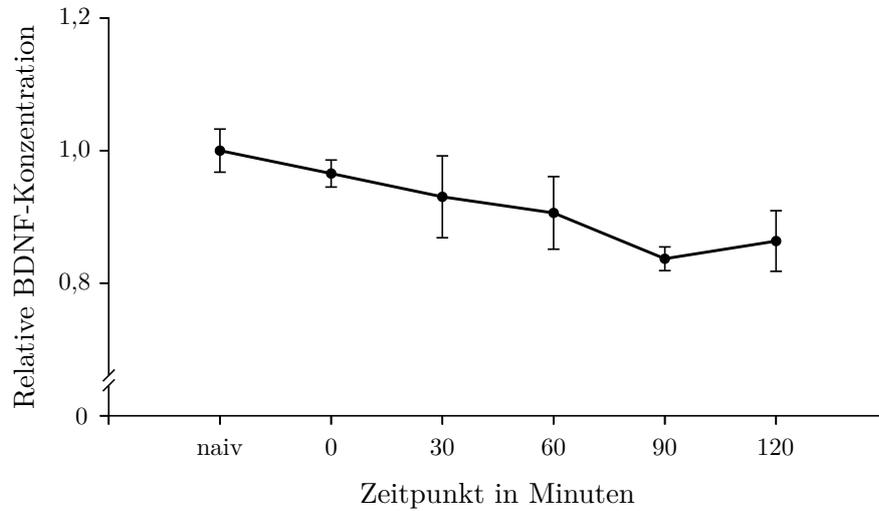


Abbildung 3.2. Dargestellt ist der Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration in der Amygdala zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Furchtkonditionierung. Die Daten wurden dabei auf die naiven Kontrolltiere normiert. Eine signifikante Veränderung der BDNF-Konzentration war mit einer ANOVA nicht nachweisbar, es zeigte sich lediglich eine Tendenz ($p = 0,10$).

Furchtkonditionierung - BDNF-Werte im Hippocampus

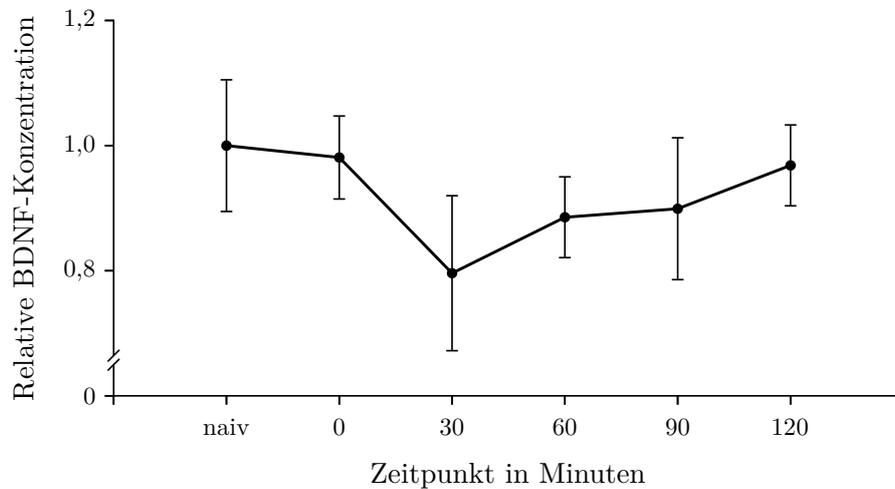


Abbildung 3.3. Dargestellt ist der Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Furchtkonditionierung. Die Daten wurden dabei auf die naiven Kontrolltiere normiert. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen ($p = 0,65$).

Wie schon bei den naiven Kontrolltieren zeigten sich zu den jeweiligen Präparationszeiten teilweise größere Schwankungen der BDNF-Proteinkonzentration bei den einzelnen Proben ohne deutliche Mittelwertveränderungen. Dementsprechend ergab die Varianzanalyse kei-

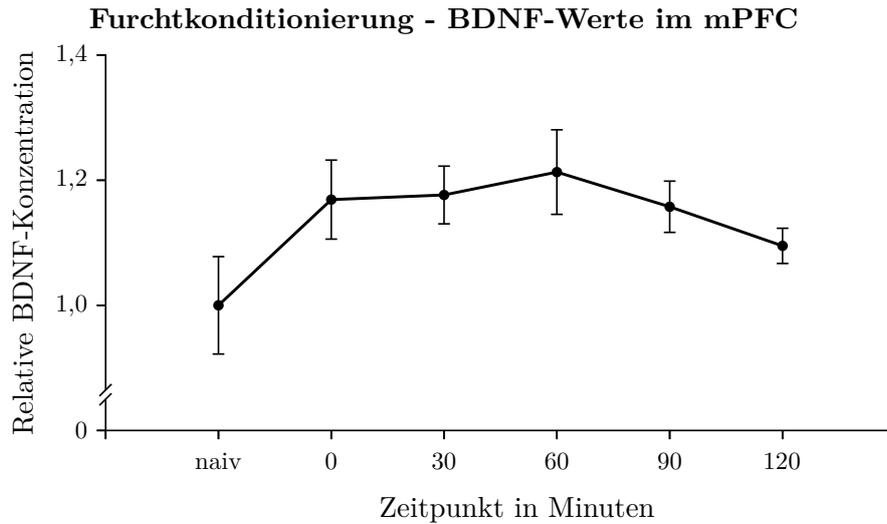


Abbildung 3.4. Dargestellt ist der Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration im mPFC zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Furchtkonditionierung. Die Daten wurden dabei auf die naiven Kontrolltiere normiert. In der Varianzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,16$).

ne Hinweise auf signifikante Änderungen der BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus ($F_{(5,34)} = 0,67$, $p = 0,65$). Der genaue zeitliche Verlauf ist in **Abbildung 3.3** dargestellt.

Medialer Präfrontalkortex

Für den mPFC waren bedingt durch die geringere Schichtdicke und eines damit einhergehenden geringeren Probengewichtes nur Proben eingeschlossen worden, deren Gewicht zwischen 0,3 mg und 1,0 mg lag. Im Gegensatz zum Hippocampus und der Amygdala konnte im mPFC pro Tier jeweils nur eine Probe gewonnen werden, womit etwaige Präparationsfehler zum Ausschluss des Tieres führten. Durch die Eingrenzung des Probengewichtes entfielen primär nur zwei Proben, allerdings gestaltete sich die Präparation und noch mehr die korrekte Lokalisation im Präfrontalkortex deutlich schwieriger als in den anderen beiden Gehirnregionen, sodass die Proben von fünf weiteren Tieren ausgeschlossen werden mussten, da sie nicht exakt die Zielregion enthielten. Für den mPCF standen schließlich die Proben von wiederum fünf Kontrolltieren und 30 konditionierten Tieren zur Verfügung. Die finale Gruppengröße lag bei $n_0 = 7$, $n_{30} = 6$, $n_{60} = 5$, $n_{90} = 5$, $n_{120} = 7$.

Bei der Betrachtung der Daten der konditionierten Tiere fällt auf, dass die BDNF-Proteinkonzentration bereits direkt nach dem Verhaltenstraining (also zum Zeitpunkt 0) um 17% ansteigt und in den weiteren Testreihen bis zum Zeitpunkt 60 in etwa auf diesem Niveau bleibt. Wie der **Abbildung 3.4** entnommen werden kann, beginnt sie danach langsam wieder abzufallen. Insgesamt bleiben die Veränderungen der BDNF-Konzentration unterhalb der Signifikanzschwelle ($F_{(5,29)} = 1,74$, $p = 0,16$).

3.2. Furchtextinktion

3.2.1. Verhaltensversuche

Furchtkonditionierung der Extinktionsgruppe

Die Versuchstiere für die Extinktionsgruppe wurden in einem zweitägigen Versuchsaufbau zuerst nach dem bereits verwendeten Konditionierungsprotokoll (**Tab. A.1**) trainiert und am Folgetag einer Furchtextinktion unterzogen. Das Konditionierungstraining wurde insgesamt an 98 Tieren (22 davon für die Kontrollgruppe) durchgeführt. Im Unterschied zu den Tieren der Furchtkonditionierungsgruppe (siehe 3.1.1) konnte bei diesen Tieren aber im Rahmen des Extinktionstrainings der Lernerfolg der Konditionierung überprüft werden. Dies erlaubte es, die Tiere auszuschließen, bei denen kein langfristiges Furchtlernen stattfand. Das genaue Verfahren für die Auswahl der Versuchstiere wird im Abschnitt zur Furchtextinktion auf Seite 35 beschrieben.

In die Extinktionsgruppe flossen nach der finalen Auswertung schließlich die Verhaltensdaten von 51 Tieren ein. Bei der Kontrollgruppe wurden drei der 22 Versuchstiere ausgeschlossen, wobei eine Maus keinerlei Freezing während der Konditionierung zeigte und die beiden anderen Tiere während der nachfolgenden Exposition im neuen Kontext (s. 2.2.3) ein dauerhaft hohes Freezing zeigten.

Für die Extinktionsgruppe wurde das Freezing der Tiere während des Konditionierungstrainings in **Abb. 3.5** aufgetragen. Dabei nimmt das Freezing während des Trainings kontinuierlich auf durchschnittlich $26,7\% \pm 2,7\%$ während der 4. und 5. Tonpräsentation zu. Abschließend soll noch eine Betrachtung der einzelnen Präparationsgruppen innerhalb der Extinktionsgruppe folgen, um statistische Abweichungen auszuschließen: Dazu wurde analog zur Konditionierungsgruppe eine zweifaktorielle ANOVA zur Interaktion des Freezings während der CS-Präsentation 4/5 mit dem späteren Präparationszeitpunkt durchgeführt. Im Endeffekt ergibt sich ein knapp nicht signifikantes Ergebnis ($F_{(4,46)} = 2,42, p = 0,06$).

Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten während der Furchtkonditionierung prinzipiell ein ähnliches Verhalten, allerdings war das absolute Freezing im zeitlichen Verlauf deutlich niedriger. Mit $12,0\% \pm 4,0\%$ während der letzten beiden CS-Präsentationen lag es signifikant ($t_{(68)} = 2,89, p = 0,005$) unter den Werten der Extinktionsgruppe. Es sei bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich statistisch kein Zusammenhang zwischen dem Verhalten während der Konditionierung und dem Lernerfolg im Rahmen des Extinktionstrainings nachweisen lässt. Weitere Ausführungen dazu finden sich im nächsten Kapitel. Da die Freezingwerte der Kontrollgruppe über den gesamten Trainingszeitraum hinweg unter den Werten der Extinktionsgruppe lagen (s. **Abb. 3.5**), stellt sich zumindest die Frage, ob die Tiere der Kontrollgruppe durch einen unbekanntem Einflussfaktor generell ein höheres Bewegungsniveau aufweisen.

Der Parameter Freezing ist jedoch ein Ausdruck von Furcht und dementsprechend nicht

Extinktionsgruppe sowie Kontrollgruppe Konditionierungstraining

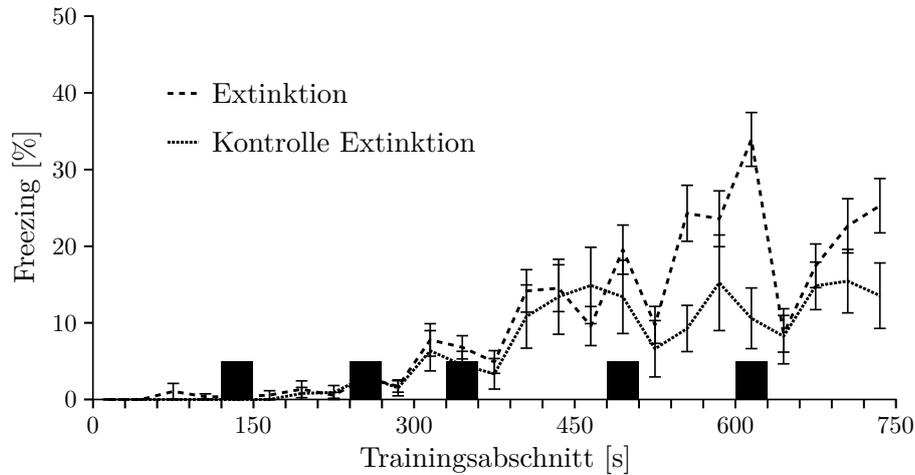


Abbildung 3.5. Dargestellt ist das Verhalten der Extinktions- und der zugehörigen Kontrollgruppe während der Furchtkonditionierung mit insgesamt 5 Ton-US-Präsentationen. Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme des Freezings in der Extinktionsgruppe. Im Vergleich dazu stieg die Freezingdauer in der Kontrollgruppe innerhalb des Experimentes langsamer an und lag während der letzten beiden Tonpräsentationen signifikant unter der Extinktionsgruppe ($p = 0,005$). Die schwarzen Flächen kennzeichnen die 5 Tonpräsentationen, an deren Ende der US für eine Sekunde appliziert wurde. Das Freezing wird als Prozentanteil bezogen auf die Gesamtdauer des jeweiligen Abschnittes angegeben.

geeignet, das Bewegungsverhalten während der Exploration einer (neuen) Umgebung zu erfassen, das als Maß für die Grundaktivität der Tiere herangezogen werden kann. Die Erkundung findet natürlich vor allem in der zweiminütigen Habituationsphase am Anfang der Furchtkonditionierung statt und kann über die zurückgelegte Strecke bzw. die daraus errechnete Durchschnittsgeschwindigkeit untersucht werden. Bei Durchschnittsgeschwindigkeiten von $v_{Extinktion} = 15,1 \pm 0,4$ cm/s gegenüber $v_{Kontrolle} = 15,3 \pm 0,6$ cm/s war kein signifikanter Unterschied nachweisbar ($t_{(68)} = -0,24$, $p = 0,81$).

Ein weiterer Vorteil der Betrachtung der Bewegungsgeschwindigkeit in den einzelnen Trainingsphasen besteht darin, dass über einen deutlichen Anstieg während der Stromreizapplikation überprüft werden kann, ob sowohl der Ton als auch der US vom Versuchstier registriert wurden und damit die Voraussetzungen für Furchtlernen gegeben sind. Statistisch gesehen ergibt sich für den Parameter Durchschnittsgeschwindigkeit während der fünf US-Präsentationen kein Hinweis für einen Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ($F_{(2,104)} = 0,35$, $p = 0,71$), wobei der Vollständigkeit halber auch noch die Daten der Furchtkonditionierungsgruppe aus Kap. 3.1.1 mit ausgewertet wurden. Der Verlauf der Durchschnittsgeschwindigkeit wurde für alle relevanten Gruppen in der **Abbildung 3.6** aufgetragen.

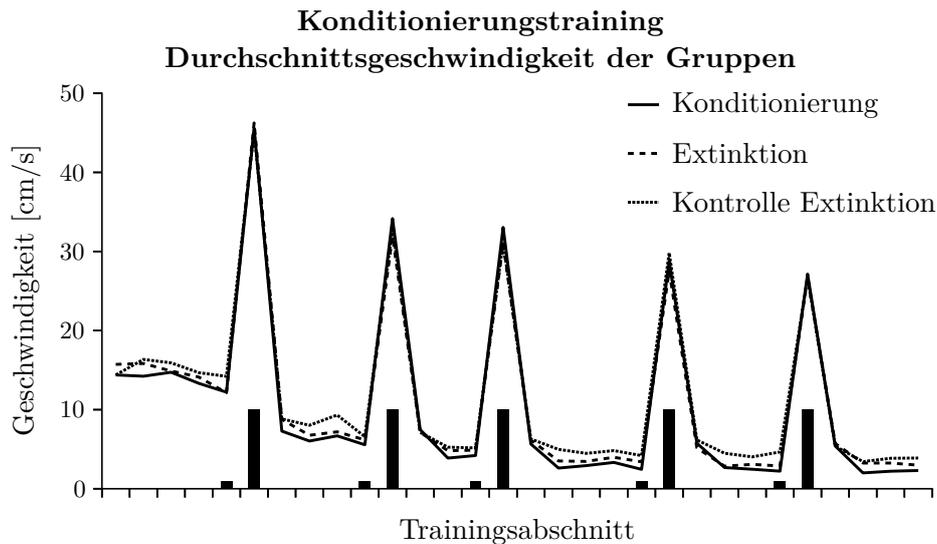


Abbildung 3.6. Dargestellt sind die Durchschnittsgeschwindigkeiten während des Konditionierungstrainings für die Tiere der Konditionierungs- und Extinktionsgruppe sowie der Kontrollgruppe der Extinktionsgruppe. Es wird deutlich, dass die Tiere im Durchschnitt keine unterschiedliche Grundaktivität zu Beginn des Experimentes aufweisen und die Reaktion auf die Stromreizapplikation gruppenübergreifend sehr ähnlich ausfällt. Auf die Angabe von Fehlerbalken wurde aus Übersichtsgründen verzichtet. Die kleinen schwarzen Flächen geben die Phasen der Tonpräsentation und die großen schwarzen Flächen die der Stromreizapplikation an.

Furchtextinktion der Extinktionsgruppe

Einen Tag nach der Konditionierung erfolgte das Extinktionstraining, an dessen Anschluss die Gehirnproben zu den vorher festgelegten Zeitpunkten gewonnen wurden. Im vorherigen Kapitel wurde bereits erwähnt, dass ein gewisser Anteil der trainierten Tiere nach Auswertung der Extinktionsdaten von der BDNF-Proteinbestimmung im ELISA ausgeschlossen wurde. Grundgedanke war dabei, dass nur bei den Tieren eine lernrelevante Änderung in der BDNF-Proteinkonzentration zu erwarten war, die ein Extinktionslernen während des Trainings zeigten – im Verlaufe der wiederholten CS-Präsentation also ein abnehmendes Freezing aufwiesen. In der Regel zeigte sich während der ersten drei CS-Präsentationen ein hohes Freezing, welches im weiteren Verlauf abnahm und nach etwa 10 Tonpräsentationen in eine Plateauphase überging. Somit wurde der Mittelwert der Freezingzeiten zwischen der 10. und 21. Tonpräsentation ermittelt und anschließend vom Mittelwert während der ersten bis dritten CS-Präsentation subtrahiert. Es wurden nur die Tiere eingeschlossen, deren Freezing absolut gesehen um mehr als 10 % abnahm (entspricht einem Δ Freezing ≥ 4 Sekunden).

Durch diese Selektion blieben 51 Tiere übrig, deren Verhaltensdaten in **Abb. 3.7** aufgetragen sind. Während der zweiminütigen Habituationsphase ist in der neuen Umgebung so gut wie kein Freezing nachweisbar, das dann während der ersten drei Tonpräsentationen auf durchschnittlich über 40 % ansteigt. Nach der achten CS-Präsentation verbleibt ein Rest-

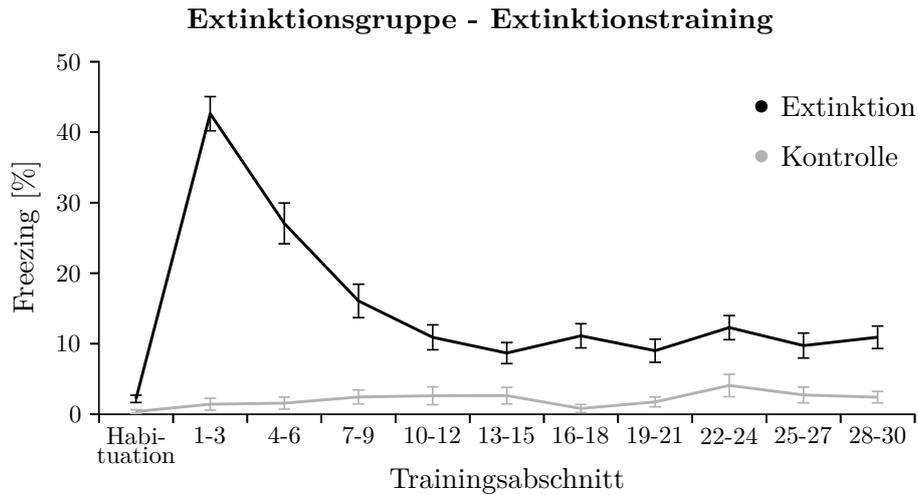


Abbildung 3.7. Dargestellt ist das Verhalten der Extinktionsgruppe während der Furchtextinktion beginnend mit der zweiminütigen Habituationsphase und den Mittelwerten von jeweils drei CS-Blöcken á 30s. Tonfreie Intervalle wurden entfernt. Dabei zeigt sich ein ausgeprägtes Freezing während der ersten CS-Präsentationen und ein deutlicher Abfall im weiteren Verlauf. Zusätzlich sind die Verhaltensdaten der Kontrollgruppe im neuen Kontext eingefügt, die verdeutlichen, dass das Freezing in der Extinktionsgruppe spezifisch aufgrund der Tonpräsentation erfolgte. Das Freezing wird als Prozentanteil bezogen auf die Gesamtdauer des jeweiligen Abschnittes angegeben.

Freezing von ca. 10 %.

Die einzelnen Gruppen der später zu unterschiedlichen Zeitpunkten präparierten Mäuse zeigten dabei ein ähnliches Extinktionsverhalten. Eine ANOVA konnte mit $F_{(4,46)} = 1,09$, $p = 0,38$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen.

Wie zuvor erwähnt, entspricht der Beginn des Extinktionstrainings einem Gedächtnisabruf, weswegen sich in der sehr umfangreichen Extinktionsgruppe die Frage stellt, ob ein Zusammenhang zwischen dem Freezingverhalten am Ende der Furchtkonditionierung und dem Freezing zu Beginn des Extinktionstrainings besteht. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson liegt bei $r = 0,36$. Das ergibt im T-Test einen signifikanten Unterschied ($t_{(49)} = 2,66$, $p = 0,01$), woraus geschlossen werden kann, dass Tiere, die während der Furchtkonditionierung ein höheres Freezingverhalten zeigen, auch beim Gedächtnisabruf ein stärkeres Freezing präsentieren (s. auch **Abb. A.1** im Anhang). Interessanterweise lässt das Freezingverhalten am Ende der Furchtkonditionierung aber keine Rückschlüsse auf das eigentliche Extinktionslernen zu ($r = 0,22$, $t_{(49)} = 1,61$, $p = 0,11$). Letztgenannte Daten wurden zusätzlich zur Veranschaulichung in **Abb. A.2** aufgetragen.

Anhand dieser Ergebnisse könnte postuliert werden, dass in der Kontrollgruppe aufgrund des geringeren Freezingverhaltens während der Konditionierung eine weniger effektive Furchtkonditionierung erfolgte. Im vorherigen Kapitel wurde allerdings anhand der gemessenen Bewegungsgeschwindigkeit nachgewiesen, dass die Tiere in allen trainierten Gruppen den Strom-

reiz, der am Ende der Tonpräsentation appliziert wurde, ähnlich wahrgenommen haben. Damit ist die Kontingenzt als wichtige Voraussetzung für das Konditionierungslernen gegeben, weswegen postuliert werden kann, dass auch in der Kontrollgruppe aufgrund der phylogenetisch konservierten Gedächtnisstrukturen ein Furchtgedächtnis angelegt werden müsste.

Für das Extinktionsexperiment ist nun vor allem das Verhalten der Tiere am 2. Tag des Versuchsaufbaus relevant, nämlich die Diskrimination der unterschiedlichen Umgebungen. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden an diesem Tag über die gleiche Zeitspanne nur dem neuen Kontext, jedoch nicht dem CS ausgesetzt. Dabei zeigten zwei Versuchstiere schon während der Habituationsphase mit fast 15 % ein hohes Freezing, das über den gesamten Trainingszeitraum anhielt und folglich zum Ausschluss führte. Erwartungsgemäß zeigten die restlichen Tiere der Kontrollgruppe über den gesamten Trainingsabschnitt hinweg aber nahezu kein Freezing. Der Unterschied zur Extinktionsgruppe lässt sich in **Abb. 3.7** gut erkennen. Somit scheint eine ausreichende Diskrimination zwischen dem jeweiligen Kontext während der Konditionierung und Extinktion gegeben zu sein, sodass das Verhalten der Extinktionsgruppen spezifisch für die Tonpräsentation zu sein scheint.

3.2.2. BDNF-Proteinkonzentration in den untersuchten Gehirnregionen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Furchtextinktionlernens

Amygdala

Von den Proben der 51 Tiere, die nach Auswertung der Furchtextinktionsdaten eingeschlossen wurden, mussten die Proben von 9 Tieren verworfen werden, da sie entweder ein nicht plausibles Probengewicht aufwiesen (analog zu den im Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Ausschlusskriterien für die Konditionierungsgruppe) oder die Doppelbestimmungen im ELISA zu stark voneinander abwichen ($> 10\%$ Abweichung vom Mittelwert der Doppelbestimmung). Letztlich wurden die Proben von 42 Mäusen in die finale Auswertung eingeschlossen (5 für Zeitpunkt 0, 15 für Zeitpunkt 30, je 7 für die Zeitpunkte 60 und 90, 8 für den Zeitpunkt 120). Hinzu kamen die Proben von 19 Kontrolltieren, die zu den Zeitpunkten 30 (7 Tiere), 60 (7 Tiere) und 90 Minuten (5 Tiere) nach dem Verhaltenstraining präpariert wurden. Während bei der BDNF-Proteinbestimmung nach dem Furchtlernen in Kap. 3.1 die Verumgruppe mit einer naiven Kontrollgruppe verglichen wurde, wurde bei den Experimenten zur Furchtextinktion eine spezielle Kontrollgruppe gebildet, die genau wie die Verumgruppe am ersten Tag des Experimentes eine Furchtkonditionierung durchlief. Am zweiten Tag des Experimentes wurden die Kontrolltiere dem neuen Kontext des Extinktionsexperimentes ausgesetzt und dann zeitlich passend zur Verumgruppe präpariert. Der Grund für dieses Vorgehen liegt in den nicht vollständig geklärten Prozessen, die bei den Kontrolltieren in diesem Zeitraum noch ablaufen könnten.

Die Gruppe der zum Zeitpunkt 30 präparierten Tiere ist besonders umfangreich, da eine erste Auswertung der ELISA-Daten eine mögliche Tendenz zeigte, weswegen die Testgruppe

Furchtextinktion - BDNF-Werte in der Amygdala

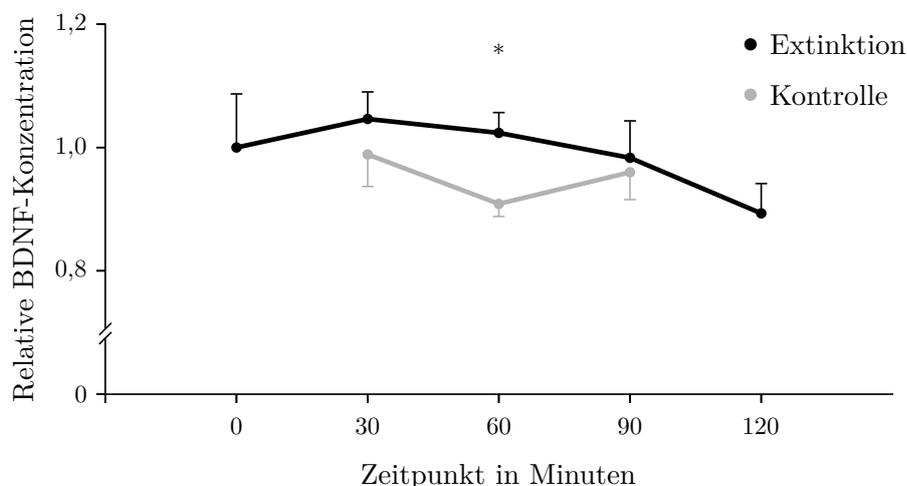


Abbildung 3.8. Dargestellt ist der Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration in der Amygdala zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Furchtextinktion zusammen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe. Die Daten wurden dabei auf die Werte der Tiere, die direkt nach dem Training präpariert wurden, normiert. Im T-Test ergab sich zum Zeitpunkt 60 ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,01$).

vergrößert und eine Kontrollgruppe erstellt wurden. Der Anstieg der BDNF-Konzentration zu diesem Zeitpunkt erwies sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe jedoch als nicht signifikant. Dies ergibt sich erst bei der Messung 30 Minuten später (Zeitpunkt 60: $t_{(12)} = 2,97, p = 0,01$), wobei der absolute Effekt eher gering erscheint, zumal die Kontrollgruppe hier eine niedrigere Proteinkonzentration aufweist als zu den anderen Präparationszeiten (s. **Abb. 3.8**). Zum Zeitpunkt 90 ist der Effekt bereits nicht mehr signifikant. Wie in der Abbildung dargestellt, fällt weiterhin mit zunehmenden Zeitabstand zum Extinktionstraining die gemessene BDNF-Konzentration recht gleichmäßig von $92,6 \pm 8,0$ ng/g direkt nach dem Training auf $82,7 \pm 4,5$ ng/g zum Zeitpunkt 120 ab.

Hippocampus

Bei der Präparation des Hippocampus mussten immer wieder Proben verworfen werden, da sich bei der Lokalisation der Hirnschnitte unter dem Binokularmikroskop zu große Abweichungen von den Vorgaben zeigten. Das lässt sich wahrscheinlich durch die Präparationstechnik erklären: Die Zielregion liegt hierbei vom primären Orientierungspunkt für die Schnittebenen – dem Chiasma opticum – aus betrachtet auf der gegenüberliegenden Seite des Gehirns. Ein leicht schräg erfolgter Schnitt durch das Gehirn kann somit zu relevanten Abweichungen im Hippocampusgebiet führen. Nach Auswertung der Daten wurden die Messergebnisse von 37 trainierten Tieren eingeschlossen $n_0 = 8, n_{30} = 7, n_{60} = 7, n_{90} = 8, n_{120} = 7$. Allerdings wurde von vornherein nur für die Zeitpunkte 60 und 90 Minuten nach dem Extinktionstraining

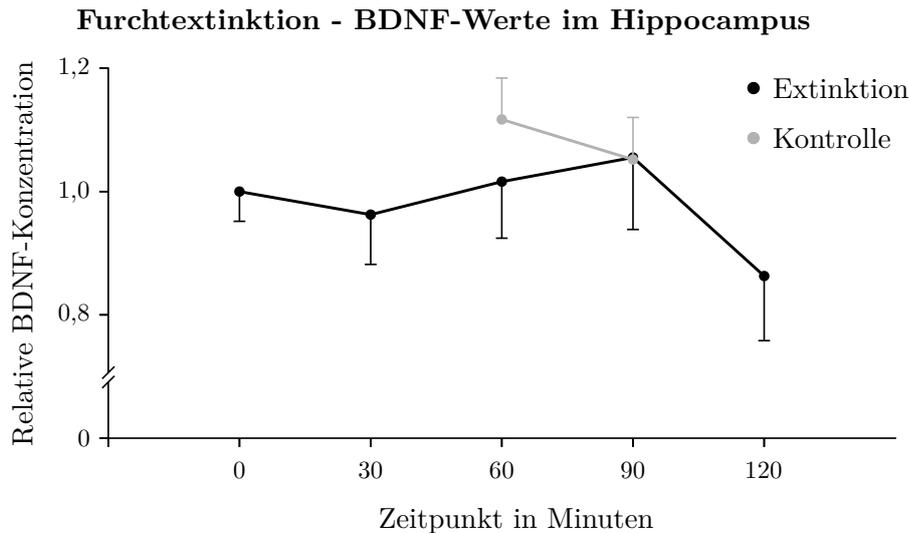


Abbildung 3.9. Dargestellt ist der Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Furchtextinktion zusammen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe, die hier allerdings nur die Zeitpunkte 60 und 90 umfasst. Die Daten wurden dabei auf die Werte der Tiere, die direkt nach dem Training präpariert wurden, normiert. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den extinguierten Tieren und der jeweiligen Kontrollgruppe ($p = 0,41$ und $0,98$).

eine Kontrollgruppe gebildet, die somit nur 11 Tiere (6 + 5 Mäuse) umfasst.

Die BDNF-Konzentration liegt direkt nach dem Extinktionstraining bei $100,0 \pm 4,8$ ng/g. Sie steigt bis zum Zeitpunkt 90 leicht auf $105,5 \pm 11,7$ ng/g an, um danach auf $86,3 \pm 10,5$ ng/g abzufallen. Der zeitliche Verlauf ist in **Abbildung 3.9** aufgetragen – zusammen mit den beiden Kontrollgruppen. Dabei ist unter anderem zu erkennen, dass innerhalb der Kontrollgruppen ebenfalls relativ hohe Streuungen auftraten, sodass letztlich zu den Zeitpunkten 60 und 90 kein signifikanter Unterschied bei der BDNF-Konzentration zwischen den extinguierten Tieren und der jeweiligen Kontrollgruppe besteht (Zeitpunkt 60: $t_{(11)} = -0,86$, $p = 0,41$, Zeitpunkt 90: $t_{(11)} = 0,02$, $p = 0,98$).

Medialer Präfrontalkortex

Wie schon bei den Tieren, die nach der Furchtkonditionierung präpariert wurden, gestaltete sich die Probengewinnung aus dem Präfrontalkortex schwierig. Insbesondere die geringe Schichtdicke der Gehirnschnitte, aus denen die Proben ausgestanzt wurden, führte sowohl zu Fehlern beim Ausstanzen als auch zu größeren Schwankungen des Probengewichtes. Das Problem betraf Testgruppe und Kontrollgruppe gleichermaßen. In der Extinktionsgruppe konnten folgende Tiere eingeschlossen werden: $n_0 = 9$, $n_{30} = 6$, $n_{60} = 7$, $n_{90} = 7$, $n_{120} = 9$. Somit stehen hier insgesamt 38 Proben zur Verfügung. Eine Kontrollgruppe wurde jeweils für die Zeitpunkte 60 ($n = 6$) und 90 Minuten ($n = 5$) gebildet.

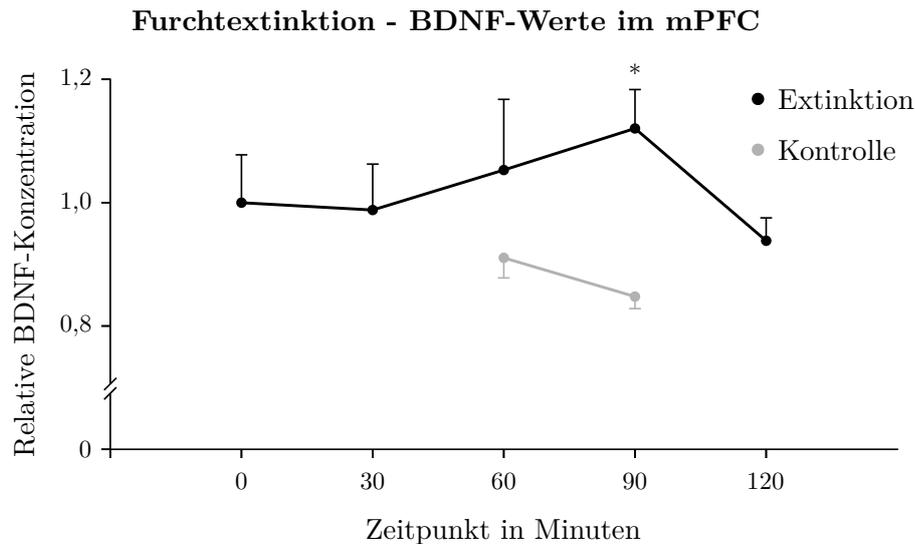


Abbildung 3.10. Dargestellt ist der Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration im mPFC zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Furchtextinktion zusammen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe, die hier zu den Zeitpunkten 60 und 90 gebildet wurde. Die Daten wurden dabei auf die Werte der Tiere, die direkt nach dem Training präpariert wurden, normiert. Im T-Test ergab sich zum Zeitpunkt 90 ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,006$).

Auch im Präfrontalkortex kommt es nach dem Extinktionstraining bis zu 90 Minuten nach dem Training zu einem Anstieg der BDNF-Konzentration von $58,5 \pm 4,5$ ng/g auf $65,6 \pm 3,7$ ng/g. Bei der letzten Messung zeigt sich die Proteinkonzentration mit $54,9 \pm 2,2$ ng/g wieder deutlich niedriger. Auffällig ist der Verlauf in Zusammenschau mit der BDNF-Konzentration in der Kontrollgruppe: Während sich 60 Minuten nach dem Training statistisch noch kein Unterschied ($t_{(11)} = 1,11$, $p = 0,29$) nachweisen lässt, wird dies zum Zeitpunkt 90 mit $t_{(10)} = 3,52$, $p = 0,006$ signifikant (siehe **Abb. 3.10**). Für diesen Zeitpunkt liegen außerdem die BDNF-Konzentrationen von drei Tieren vor, die das Extinktionstraining durchliefen, dabei aber nur einen ungenügenden Abfall der Freezingzeiten während des Trainings und damit keinen Lernerfolg zeigten und deshalb in der Extinktionsgruppe nicht weiter berücksichtigt wurden (siehe auch 3.2.1). Diese Daten sind in **Abb. 3.11** mit den Ergebnissen der BDNF-Bestimmung für die Extinktionsgruppe und die Kontrollgruppe gegenübergestellt. Mit $p = 0,03$ ($t_{(8)} = -2,55$) zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu den Tieren, die eine Veränderung im Furchtverhalten während des Extinktionstrainings aufwiesen und unterstützt somit die Theorie, dass ein erfolgreiches Furchtextinktionslernen 90 Minuten später zu einem Anstieg der BDNF-Proteinkonzentration im medialen Präfrontalkortex führt.

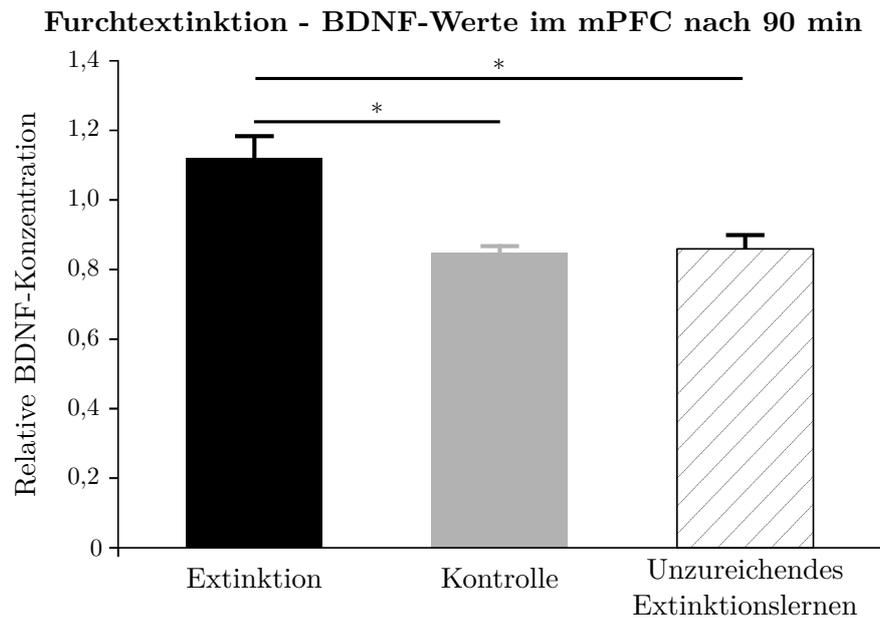


Abbildung 3.11. Dargestellt ist die BDNF-Proteinkonzentration im mPFC 90 Minuten nach Extinktionstraining (Extinktion), nach Kontrollexperiment (Kontrolle) und für die Tiere, die während des Extinktionstrainings kein ausreichendes Extinktionslernen zeigten (Unzureichendes Extinktionslernen). Die Daten wurden dabei auf die Werte der Tiere, die direkt nach dem Extinktionstraining präpariert wurden, normiert. Die Tiere, die das Extinktionslernen erfolgreich durchliefen, zeigten signifikant höhere BDNF-Werte im Vergleich zu den anderen Gruppen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten anhand eines Wildtypmausmodells die frühen Lernvorgänge, die nach der Konditionierung und Extinktion von Furcht einsetzen, näher untersucht werden. Als Markerprotein diente dabei BDNF, das für seine zentrale Rolle bei der synaptischen Plastizität gut untersucht ist, wie bereits in der Einleitung näher dargelegt wurde. Die BDNF-Proteinkonzentration wurde in Proben aus Gehirnregionen, für die eine Beteiligung am Furchtlernen bekannt ist, zu unterschiedlichen Zeitpunkten kurz nach dem jeweiligen Verhaltenstraining gemessen. Dabei ließen sich nach der Furchtkonditionierung in der Amygdala, im Hippocampus und im medialen Präfrontalkortex keine signifikanten BDNF-Konzentrationsanstiege nachweisen. Im Unterschied dazu zeigten sich nach den Extinktionsexperimenten signifikante Unterschiede im Vergleich zu einer Kontrollgruppe: So konnten in der Amygdala 60 Minuten nach dem Ende des Extinktionstrainings und im medialen Präfrontalkortex zum Zeitpunkt 90 signifikante Anstiege der BDNF-Proteinkonzentration nachgewiesen werden.

In den folgenden Abschnitten werden zuerst die Ergebnisse der Verhaltensversuche diskutiert. Anschließend folgt eine kritische Auseinandersetzung mit der verwendeten Methode zur BDNF-Bestimmung und danach sollen die Ergebnisse der BDNF-Proteinbestimmung gesondert für die verschiedenen Gehirnregionen diskutiert werden.

4.1. Ergebnisse Verhaltensversuche

4.1.1. Furchtlernen

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der BDNF-Proteinkonzentration während des Furchtlernens die Tiere furchtkonditioniert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und Proben der Gehirngebiete zur späteren BDNF-Proteinbestimmung mittels ELISA entnommen. Für die Furchtkonditionierung wurde ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll verwendet (Endres und Lessmann, 2012), das in ähnlicher Form auch in vielen anderen Arbeitsgruppen genutzt wird (z. B. Sartori et al., 2016; Whittle et al., 2021) und zu einem stabilen Furchtgedächtnis führt. Durch die gesetzte Fragestellung mit dem daraus folgenden zeitlichen Ablauf des Experimentes konnte der Erfolg des Furchtlernens bei den trainierten Tieren nicht überprüft werden, da jedes Abrufen des Furchtgedächtnisses in Abwesenheit des US zu Extinktionsprozessen führt (Rescorla und Wagner, 1972) und dadurch direkt die Proteinexpression beeinflussen kann. Daher konnte das Furchtlernen

nur anhand indirekter Parameter sichergestellt werden. Hierzu wurde die Veränderung der Durchschnittsgeschwindigkeit während der Stromreizapplikation, die am Ende der Tonpräsentationen stand, überprüft, da das zeitgleiche Registrieren von US und CS eine Grundvoraussetzung für das Furchtlernen darstellt. Dabei zeigten die Tiere aller Versuchsgruppen, die einer Furchtkonditionierung unterzogen wurden, ein sehr ähnliches Verhalten. Als weiteres Maß für das Furchtlernen wurde die Zunahme des Freezings analysiert. Hier zeigte sich bei den Tieren der Konditionierungsgruppe und der Extinktionsgruppe ein deutlicher Anstieg des Freezings bei der 4. und 5. Tonpräsentation.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass sich eine Zunahme des Freezings während der Furchtkonditionierung nicht klar der unkonditionierten oder konditionierten Reaktion zuordnen lässt. Insofern ist das Verhalten der Extinktionsgruppe zu Beginn des Extinktionlernens interessant, da dieser Teil des Experimentes einem Gedächtnisabruf gleichkommt. Dabei zeigte sich dann auch eine direkte Korrelation zwischen dem Freezing am Ende des Konditionierungsexperimentes und dem Gedächtnisabruf am Folgetag, wie ihn schon andere Arbeitsgruppen nachweisen konnten (Ponder et al., 2007; Kreutzmann et al., 2021).

4.1.2. Furchtextinktionslernen

Zur Bestimmung der BDNF-Proteinkonzentration nach der Extinktion des Furchtgedächtnisses wurden in der vorliegenden Arbeit Wildtypmäuse zunächst einer Furchtkonditionierung unterzogen. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Furchtextinktion, in deren Nachgang die Gehirnproben entnommen wurden. Das dafür genutzte Protokoll wurde in leicht abgewandelter Form bereits in unserer Arbeitsgruppe genutzt (Psotta et al., 2013; Ma et al., 2022). Andere Arbeitsgruppen nutzen grundsätzlich einen ähnlichen Versuchsaufbau, wenn auch teilweise mit einer abweichenden Anzahl an CS-Präsentationen (Choi et al., 2010; Whittle et al., 2021).

Bezüglich des Extinktionstrainings zeigten die für die vorliegende Arbeit genutzten Tiere ein vergleichbares Lernverhalten wie in anderen Veröffentlichungen (Choi et al., 2010; Ma et al., 2022). Das erhöhte Freezing-Verhalten der Tiere zu Beginn des Extinktionstrainings lässt darauf schließen, dass ein effektives und spezifisches Furchtlernen erfolgte: Während der ersten 3 Tonpräsentation im Extinktionstraining lag der Anteil des Freezings wie in den Arbeiten von Choi (2010) oder Psotta und Kollegen (2013) bei ca. 40%. Während der vorangegangenen Habituationsphase trat nahezu kein Freezingverhalten auf, sodass das nachfolgende Furchtverhalten spezifisch für den Tonreiz sein muss. Da in der vorliegenden Arbeit die Gehirnproben umgehend nach dem Extinktionstraining gewonnen werden mussten, konnte keine Überprüfung des Extinktionsgedächtnisses stattfinden. Die beiden oben genannten Arbeiten konnten aber zeigen, dass das Verhalten beim Abruf des Extinktionsgedächtnisses (meist einen Tag nach dem Extinktionslernen getestet) mit dem Lernerfolg während des Extinktionsexperimentes zusammenhängt. Deshalb wurde in dieser Arbeit als Parameter für die unmittelbare Gedächtnisakquisition auf den Abfall des Freezings während des Extinktionsex-

perimentes zurückgegriffen und Tiere mit einer unzureichenden Lernleistung ausgeschlossen.

Im Ergebnisteil wurde im Kapitel 3.2.1 bereits darauf hingewiesen, dass die Kontrollgruppe für das Extinktionsexperiment im Vergleich zu den anderen konditionierten Gruppen am Ende der Furchtkonditionierung ein signifikant geringeres Freezing zeigte, das nicht auf eine insgesamt erhöhte Grundaktivität zurückzuführen war. Die Analyse der Bewegungsgeschwindigkeit als Surrogatparameter für die Stromreizwahrnehmung hat jedoch ergeben, dass die Tiere der Kontrollgruppe auf den Stromreiz unmittelbar die gleiche Reaktion zeigten wie die anderen Gruppen. Zudem fällt bei der Betrachtung der gemessenen BDNF-Proteinkonzentrationen auf, dass die Werte der Kontrollgruppe in der Amygdala und im Hippocampus unter den Konzentrationen liegen, die bei den naiven Tieren gemessen wurden. Da die Werte der Extinktionsgruppe eine ähnliche Tendenz aufweisen, könnte dies als Hinweis auf Lernprozesse in der Kontrollgruppe gewertet werden. Auf der anderen Seite konnte in der eigenen Arbeit die Kontrollgruppe natürlich keiner Testung des Furchtgedächtnisses unterzogen werden, wie dies am Anfang des Extinktionstrainings bei der Extinktionsgruppe möglich war. Es konnten (und wurden) lediglich die Tiere ausgeschlossen, die ein inadäquates generalisiertes Furchtverhalten zeigten. Dadurch wäre theoretisch eine Verzerrung der gemessenen BDNF-Konzentrationen in der Kontrollgruppe möglich, die sich aber in den Daten aufgrund der sehr geringen Streuung (s. **Tabelle A.5**) nicht erkennen lässt. Insgesamt konnte somit zwar ein statistischer Unterschied im Freezing-Verhalten der Extinktionsgruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe nachgewiesen werden, allerdings dürfte dies keinen Einfluss auf die weitere BDNF-Bestimmung gehabt haben.

4.2. Vergleich verschiedener Verfahren zur BDNF-Bestimmung

In dieser Arbeit wurde für die BDNF-Messung ein ELISA verwendet, mit dem die BDNF-Proteinkonzentration direkt bestimmt werden konnte. Im Gegensatz dazu bauen viele frühere Experimente auf einer In-situ-Hybridisierung und damit der Bestimmung der BDNF-mRNA auf (Rasmusson et al., 2002; Chhatwal et al., 2006; Heldt et al., 2007). Im Vergleich der beiden Methoden misst die In-situ-Hybridisierung die Menge der vorhandenen BDNF-mRNA in Soma und Dendriten (Colliva und Tongiorgi, 2021), während über den ELISA Veränderungen der BDNF-Proteinexpression in der gesamten Zelle und am Wirkort (und damit am Ort synaptischer Plastizität) erfasst werden können. Letzteres gilt ebenso für den Western Blot (Choi et al., 2010; Ou et al., 2010) und die Immunfluoreszenz (Ou et al., 2010; Chou et al., 2014), die ebenfalls in einigen Veröffentlichungen genutzt wurden.

Bei der Bestimmung der BDNF-mRNA mittels In-situ-Hybridisierung kann nicht mit letzter Sicherheit auf die tatsächlich gebildete Menge an maturem BDNF-Protein geschlossen werden. Zum einen ist unklar, inwieweit die gebildete mRNA tatsächlich zur Translation genutzt wird bzw. vorher Abbauprozesse greifen. Zum anderen ruft das Vorläuferprotein

proBDNF, wie in der Einleitung auf S. 13 näher dargelegt, über den p75NTR gänzlich andere Effekte als das mature BDNF hervor (Cowansage et al., 2010). Zusammengefasst können sich dadurch unterschiedliche räumliche und zeitliche Verteilungsmuster zwischen den Messungen auf mRNA- und Proteinebene ergeben.

In der Regel erfolgt bei der Proteinbestimmung mittels ELISA oder Western Blot die Messung in lysierten Gewebeprobe, sodass die gemessene BDNF-Konzentration vor allem vom intrazellulären Anteil bestimmt wird, während das extrazellulär lokalisierte BDNF einen deutlich geringeren Anteil ausmacht, da nur ein Bruchteil des synthetisierten BDNF ausgeschüttet wird (Edelmann et al., 2014). Gleichzeitig kann mittels ELISA der Anteil des präsynaptischen Bereiches an der BDNF-Proteinexpression nicht differenziert werden. So ist inzwischen bekannt, dass die Wirkung von BDNF im infralimbischen Kortex von der BDNF-Proteinexpression hippocampaler Neurone abhängt, die über in der Einleitung auf Seite 11 dargestellte Efferenzen mit dem mPFC in Verbindung stehen (vergleiche Peters et al., 2010).

Ein weiterer Punkt betrifft den Einfluss des BDNF-Rezeptors TrkB auf die BDNF-Proteinmessung. An den Rezeptor gebundenes BDNF sollte in der vorliegenden Arbeit zwar durch den Lysepuffer gelöst worden sein, allerdings gibt der Hersteller des ELISA-Kits R&D-Systems an, dass die Gegenwart des TrkB-Rezeptors zu einer dosisabhängigen Reduktion der gemessenen BDNF-Proteinmenge führt. Dadurch könnte theoretisch ein Abfall der BDNF-Proteinkonzentration gemessen werden, obwohl tatsächlich eine Aktivierung des BDNF-Signalweges stattgefunden hat. In einigen Studien wurde deswegen zusätzlich die Menge des phosphorylierten (und damit aktivierten) TrkB bestimmt. Rattiner und Kollegen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass ein Anstieg der BDNF-mRNA mit einer vermehrten TrkB-Phosphorylierung einhergeht (Rattiner et al., 2004), während Ou und Gean diesen Zusammenhang auf der Proteinebene zeigen konnten (Ou und Gean, 2005). In der vorliegenden Arbeit liegt die durch die Zellyse verfügbare Menge an BDNF-Protein vermutlich deutlich über der Konzentration des TrkB-Rezeptors, sodass der Einfluss gering ausfallen dürfte.

Das für diese Arbeit genutzte ELISA-Kit der Firma R&D-Systems weist zudem eine hohe Spezifität für das mature BDNF-Protein auf. Andere Neurotrophine führen zu keiner signifikanten Interferenz und selbst das Vorläuferprotein proBDNF führt laut Hersteller nur zu einer Kreuzreaktion von 13 %. Eine experimentelle Untersuchung von Lim und Kollegen (2015) wies für dieses ELISA-Kit allerdings eine Kreuzreaktivität gegenüber proBDNF von 30 % nach, wobei andere kommerziell erhältliche ELISA-Kits lt. den Autoren mit über 90 % Kreuzreaktivität deutlich höhere Werte aufweisen und damit nicht zwischen BDNF und seinem Vorläuferprotein unterscheiden können. Auch das häufig verwendete Chemikine-BDNF-Sandwich-ELISA-Kit der Fa. Millipore wird nach dieser Arbeit durch eine Kreuzreaktivität von über 50 % durch die Gegenwart von proBDNF stark beeinflusst. Der Hersteller selbst hat zu dieser Problematik interessanterweise keine Daten veröffentlicht.

Somit wird die durch den ELISA gemessene BDNF-Konzentration maßgeblich vom Verhältnis proBDNF : matures BDNF beeinflusst. Während bei Ratten proBDNF überwiegt (Lim

et al., 2015), so scheint das Verhältnis bei Mäusen zugunsten des muren BDNF verschoben zu sein: Ältere Arbeiten fanden im Hippocampus ein Verhältnis von 1:10 (Matsumoto et al., 2008), während unsere Arbeitsgruppe für Proben aus dem gesamten Gehirn ein Verhältnis von 1:2 ermitteln konnte (Leschik et al., 2019). Unter Berücksichtigung der verschiedenen Angaben zur Kreuzreaktivität gegenüber proBDNF lag der proBDNF-Anteil am gemessenen BDNF in der vorliegenden Arbeit im günstigsten Fall demnach bei 1 % und im ungünstigsten Fall bei 13 %.

Aufgrund der genannten Diskussionspunkte erscheint die Kombination verschiedener Messmethoden interessant, um sowohl Synthese- als auch Wirkort bewerten zu können sowie Aussagen zu gebundenem als auch freiem BDNF treffen zu können. Das für die Experimente genutzte BDNF-ELISA-Kit erscheint in Bezug auf die Kreuzreaktivität zu proBDNF durchaus verbesserungsfähig, besitzt aber im Vergleich mit anderen kommerziell verfügbaren ELISA-Kits eine gute Sensitivität und Spezifität.

4.3. BDNF-Konzentrationsänderungen im Tagesverlauf

Vor der BDNF-Messung im Rahmen der Lernexperimente stand die Frage nach einer tageszeitlichen Schwankung der Expression dieses Neurotrophins. Aufgrund der unterschiedlichen Dauer der einzelnen Verhaltensexperimente, der Entnahmezeitpunkte der Proben sowie aufgrund der studienbegleitenden Arbeit konnten für die Lernexperimente nicht alle Probenentnahmen zum gleichen Tageszeitpunkt erfolgen, weshalb wir ein Kontrollexperiment mit der Frage nach tageszeitlichen Schwankungen durchführten.

Dabei zeigte sich zwischen den Tieren, die am Vormittag (8:00–9:00) präpariert wurden und den Tieren, die um die Mittagszeit (12:00–13:00) präpariert wurden, in allen drei Gehirnregionen ein leichter Abfall der BDNF-Konzentration. Diese Differenz war jedoch in keinem Areal signifikant. In der Literatur finden sich einige Vergleichsarbeiten, die allerdings an Ratten durchgeführt wurden. Dabei lässt sich zunächst festhalten, dass der Verlauf der BDNF-Konzentration vom Tag-Nacht-Verhalten der Versuchstiere abhängt: Tagaktive Ratten weisen einen anderen Verlauf auf als ihre nachtaktiven Verwandten (Martin-Fairey und Nunez, 2014). Die für die Arbeit genutzten Wildtypmäuse sind zumeist nachtaktiv, haben aber auch einige tagaktive Phasen, weswegen Vergleichsarbeiten herangezogen wurden, die nachtaktive Ratten verwendeten. Zumindest für den Hippocampus ist die circadiane Rhythmik der BDNF-Proteinkonzentration inzwischen gut belegt (Bova et al., 1998; Schaaf et al., 2000) und wird vor allem auf die tageszeitabhängige Kortikosteronausschüttung zurückgeführt (Smith et al., 1995).

Die Gruppe um Schaaf (2000) hatte dabei Proben aus verschiedenen Regionen des Hippocampus gewonnen. Sie konnten eine circadiane Rhythmik letztlich nur im Gyrus dentatus nachweisen, wobei sich eine signifikante Erhöhung der BDNF-mRNA um die Mittagszeit fand, während die mRNA-Konzentration insbesondere in den Abendstunden deutlich niedriger lag.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte methodenbedingt keine Unterscheidung in die einzelnen Regionen des Hippocampus. Somit wäre es möglich, dass z. B. die tageszeitlichen Schwankungen im Gyrus dentatus nicht groß genug sind, um den BDNF-Gehalt im gesamten Hippocampus signifikant zu beeinflussen. In der Arbeit von Ou (2010), die im nächsten Kapitel noch genauer besprochen werden soll, wurden tageszeitliche Veränderungen von BDNF im basalen und lateralen Kerngebiet der Amygdala untersucht. Dabei wurde mittels ELISA-Testung ein signifikanter Abfall der BDNF-Konzentration vom Vormittag zum Nachmittag gemessen, wobei bedacht werden muss, dass die dabei getesteten Ratten einem gering abweichenden Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen waren (Tagesbeginn bereits um 6:00). Die Änderung der Proteinkonzentration lag dabei in einer Größenordnung von 20 %. Daten zur Mittagszeit liegen indes nicht vor, sodass nur spekuliert werden kann, ob zu diesem Zeitpunkt bereits ein Abfall der BDNF-Konzentration begonnen hat. Die Arbeit von Ou und Kollegen steht somit nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit und verdeutlicht die Bedeutung des Präparationszeitpunktes.

Für die Untersuchung zu den tageszeitlichen Schwankungen im Präfrontalkortex wurde in dieser Arbeit keine explizite Unterscheidung in die einzelnen Subareale getroffen. Dazu existiert eine Vergleichsstudie, die den mPFC ebenfalls als Ganzes betrachtete. In der Arbeit von Coria-Lucero (2016) wurde dabei ein zweigipfliger Verlauf der BDNF-mRNA mit je einem Maximum am Nachmittag und einem in der zweiten Nachthälfte nachgewiesen. Im Gegensatz dazu lag die Konzentration der BDNF-mRNA besonders am Morgen deutlich niedriger – ein Ergebnis, das sichtlich von den eigenen Messungen in dieser Arbeit abweicht. Allerdings stellt sich die Frage, wie weit beide Experimente vergleichbar sind, da die Arbeitsgruppe um Coria-Lucero Ratten nutzten, die keinem Tag-Nacht-Rhythmus unterworfen waren, sondern in einer rein dunklen Umgebung gehalten wurden.

Zusammengefasst sind die tageszeitlichen Schwankungen der BDNF-Konzentration in dem Zeitraum, in dem die Verhaltensexperimente für die vorliegende Arbeit stattfanden, den eigenen Messungen nach statistisch nicht relevant. Bei Betrachtung der oben genannten Studien hätten sich wahrscheinlich erst gegen Nachmittag bzw. Abend signifikante Konzentrationsabfälle gezeigt.

4.4. BDNF-Konzentrationsänderungen während des Furchtlernens in verschiedenen Gehirnarealen

Amygdala

Die BDNF-Proteinbestimmung innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Furchtkonditionierung erbrachte für die Amygdala mit LA und BLA als Zielgebiet keine signifikanten Änderungen. Dieses Ergebnis steht augenscheinlich im Widerspruch zu mehreren Arbeiten, die eine BDNF-Messung bei Ratten vorgenommen haben. Bereits 2004 konnten Rattiner und Kolle-

gen (2004) zwei Stunden nach der Furchtkonditionierung einen Anstieg der BDNF-mRNA vornehmlich im basolateralen Teil der Amygdala messen. Die Autoren hatten dabei die Frage aufgeworfen, ob der Anstieg der mRNA einem Anstieg der BDNF-Proteinmenge vorausgeht oder aber Ausdruck eines erhöhten BDNF-Umsatzes ist – sprich, nach der BDNF-Bindung an seinen Rezeptor stattfindet.

Direkte Messungen der BDNF-Proteinmenge mittels ELISA und Western Blot ergaben dann, dass die maximale BDNF-Konzentration mit einem Anstieg um ca. 60 % schon nach einer Stunde erreicht wird (Ou und Gean, 2005). Die Frage, ob die BDNF-Proteinkonzentration somit vor der BDNF-mRNA ansteigt, lässt sich damit allerdings nicht sicher beantworten, da in der Arbeit von Rattiner (2004) keine Vergleichsmessungen eine Stunde nach dem Training durchgeführt wurden. Die Arbeitsgruppe um Ou und Gean fand interessanterweise noch einen zweiten Gipfel bei der BDNF-Proteinkonzentration, der 12 Stunden nach dem Training lag (Ou et al., 2010). Für ihre Arbeiten nutzten Ou und Gean primär das Chemikine-ELISA-Kit, verifizierten die auffälligen Zeitpunkte aber mittels Western-Blot-Messungen, die jeweils koncordante Ergebnisse lieferten. Die abweichenden Effekte zwischen den genannten Studien und der hier vorliegenden Arbeit könnten zum einen auf Speziesunterschiede zwischen Mäusen und Ratten beruhen, sind aber vermutlich eher Ausdruck unterschiedlicher Präparationstechniken. Während LA und BLA aufgrund der Größe bei Ratten recht genau entnommen werden können, könnte die Probengewinnung mittels Biopsiestanzer bei Mäusen nicht spezifisch genug für diese Kerngebiete sein und umliegende Gehirnareale leicht miterfassen, wodurch Änderungen der BDNF-Konzentration in der Zielregion nicht mehr zu signifikanten Änderungen der BDNF-Proteinkonzentration in der gesamten Probe (Zielgebiet und umliegendes Gewebe) führen.

Chou und Kollegen (2014) veröffentlichten 2014 eine Arbeit, die sich im Gegensatz zu vielen anderen Studien mit der BDNF-Proteinexpression bei Mäusen befasste. Dabei wurde ein signifikanter Anstieg der BDNF-Konzentration in der basolateralen Amygdala auf bis zu 170 % eine Stunde nach dem Verhaltenstraining nachgewiesen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die zeitlichen Veränderungen in Anbetracht der Ergebnisse bei Ratten zwar plausibel erscheinen, jedoch die Proteinbestimmung mithilfe des Chemikine-ELISA-Kits erfolgte, das nur eine eingeschränkte Spezifität aufweist (s. Kapitel 4.2). Außerdem wurde das genaue Vorgehen zur Probengewinnung aus den Zielstrukturen nicht beschrieben, sodass unklar bleibt, wie weit u. U. einzelne Kernbereiche der Amygdala für die Konzentrationsänderungen verantwortlich sind. Interessanterweise haben Chou und Kollegen die Mäuse anhand ihres Verhaltens in sozialen Stresssituationen in zwei Gruppen unterteilt und konnten dabei zeigen, dass die Tiere, die ein ängstlicheres Verhalten aufwiesen, nach der Furchtkonditionierung eine wesentlich höhere BDNF-Proteinkonzentration entwickelten. Da die Tiere, die für diese Arbeit verwendet wurden, nicht auf diese Eigenschaft hin untersucht (sondern blind getestet) wurden, könnte dies ebenfalls dazu beigetragen haben, dass Veränderungen in der BDNF-Proteinkonzentration wesentlich geringer ausfielen und nicht die Signifikanzschwelle

erreichten.

Weitere, bisher noch nicht veröffentlichte Experimente aus unserer Arbeitsgruppe unterstützen die These, dass auch in Mäusen ca. 60 min nach der Furchtkonditionierung eine Aktivierung des BDNF-TrkB-Signalweges zur Konsolidierung des Furchtgedächtnisses notwendig ist. Dazu wurde um diesen Zeitpunkt herum ein Antagonist des Signalweges über Mikrokanülen in die Amygdala eingebracht und im Anschluss das Furchtverhalten überprüft, wobei die Verumgruppe ein signifikant geringeres Freezing aufwies.

Zusammenfassend existieren mehrere Arbeiten, die nachweisen konnten, dass ca. eine Stunde nach der Furchtkonditionierung die BDNF-Proteinkonzentration in der Amygdala (und speziell in der LA und BLA) ansteigt. Aus den weiter oben diskutierten möglichen Gründen, konnten diese Effekte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden.

Hippocampus

In der Einleitung wurde bereits dargelegt, dass der dorsale Teil des Hippocampus wahrscheinlich keine größere Bedeutung während der *cue*-abhängigen Furchtkonditionierung hat. Passend dazu zeigte die BDNF-Proteinmessung in dieser Arbeit keine signifikanten Änderungen innerhalb der ersten zwei Stunden nach dem Verhaltenstraining.

Erste Arbeiten, die sich mit BDNF-Änderungen im Hippocampus nach *cue*-abhängiger Furchtkonditionierung beschäftigen, wurden bereits 2002 veröffentlicht und wiesen für den Gyrus dentatus (vermutlich im dorsalen Hippocampus, aber nicht explizit ausgeführt) einen Abfall der BDNF-mRNA nach (Rasmusson et al., 2002). Rattiner und Kollegen (2004) fanden dagegen keine Veränderungen der BDNF-mRNA bei Ratten, hatten sich aber im Gegensatz zur zuvor genannten Arbeit mit dem dorsalen Hippocampus als Ganzes beschäftigt. Da bekannt ist, dass Stress – insbesondere vermittelt über die Ausschüttung von Glukokortikoiden – die BDNF-mRNA im Gyrus dentatus stark reduziert (Smith et al., 1995), könnten die Ergebnisse von Rasmusson (2002) somit auch als Stressantwort interpretiert werden.

Detaillierte Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration mittels ELISA- und Western-Blot-Messungen finden sich erneut bei der Arbeitsgruppe von Ou und Gean: Dabei konnten sie zunächst zeigen, dass es im Hippocampus bis 2 Stunden nach der Furchtkonditionierung zu keinem Anstieg – wenn nicht sogar einem tendenziellen Abfall – kommt (Ou und Gean, 2005). Später konnten sie außerdem nachweisen, dass auch 12 Stunden nach dem Training keine erhöhten BDNF-Werte auftreten (Ou et al., 2010). Einschränkend muss erwähnt werden, dass in beiden Arbeiten keine Differenzierung zwischen dem ventralen und dorsalen Hippocampus vorgenommen wurde bzw. keine genaue Beschreibung zur Probengewinnung aus dieser Gehirnregion vorliegt.

Die bereits im vorherigen Kapitel besprochene Arbeit von Chou (2014) konnte für die verwendeten C57BL/6J-Mäuse ebenfalls keine Veränderung der BDNF-Konzentration im Hippocampus nachweisen. Leider sind auch in dieser Arbeit keinerlei Aussagen zur Zielregion im Hippocampus enthalten.

Die hier durchgeführten BDNF-Messungen stützen somit die These, dass der dorsale Hippocampus im Rahmen der *cue*-abhängigen Furchtkonditionierung nicht an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt ist.

Medialer Präfrontalkortex

Die Neuronen des medialen Präfrontalkortex, die in das Furchtlernen eingebunden sind, liegen vor allem im prälimbischen Kortex (s. Einleitung Seite 9). Deshalb wurde bei der Proben-gewinnung primär der PL anvisiert, allerdings ist aufgrund der kleinen Zielstruktur davon auszugehen, dass in relevantem Maße Anteile des IL miterfasst wurden. Dennoch soll im folgenden Abschnitt – auch zur besseren Differenzierung – vom PL gesprochen werden.

Die Messungen der BDNF-Konzentration im prälimbischen Kortex zeigten zwar einen Anstieg nach der Furchtkonditionierung, allerdings ohne statistische Signifikanz. Dabei wurde bereits in der Einleitung dargelegt, dass der PL im Rahmen der *cue*-abhängigen Furchtkonditionierung sowohl an der Konsolidierung des Furchtgedächtnisses als auch am Gedächtnisabruf beteiligt ist. Choi und Kollegen (2010) konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass der Verlust von BDNF im Präfrontalkortex zwar nicht die unmittelbare Akquisition des Furchtgedächtnisses behindert, die Tiere aber eine und 24 Stunden nach dem Training ein deutlich gemindertes Freezing beim Gedächtnisabruf aufwiesen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass bereits kurz nach dem Verhaltenstraining der BDNF-Signalweg aktiviert wird.

In einer weiteren Veröffentlichung wurde explizit die unterschiedliche Beteiligung des PL im Rahmen der *delayed*- (als gebräuchlichste Form der *cue*-Konditionierung) als auch *trace*-Furchtkonditionierung untersucht (Runyan et al., 2004). Bei der *trace*-Konditionierung wird der US erst nach einer kurzen Pause (in der Arbeit von Runyan 20 s) nach dem CS appliziert und somit eine zeitliche Information hinzugefügt. Die *trace*-Furchtkonditionierung stellt damit eine seltener genutzte Form der *cue*-Konditionierung dar. Runyan und Kollegen konnten mit ihren Experimenten zeigen, dass es direkt nach der *trace*-Konditionierung zu einer Aktivierung von ERK kommt, die Teil der *Mitogen-activated Protein* (MAP)-Signalkaskade ist, die unter anderem durch BDNF aktiviert wird und zur Gedächtniskonsolidierung beiträgt (Schafe et al., 2000). Diese ERK-Aktivierung war bei den Versuchstieren, die nach einem ähnlichen Protokoll wie in der eigenen Arbeit konditioniert wurden, nicht zu beobachten.

In den eigenen Daten lässt sich eine unterschwellige und im Vergleich zu den anderen beiden Gehirnregionen gegensätzliche Tendenz zur leichten BDNF-Erhöhung in den ersten 90 Minuten nach dem Training beobachten. Nach den oben genannten Arbeiten würde ein Anstieg von BDNF in diesem Zeitraum durchaus plausibel erscheinen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass bei der Probenpräparation nur eine unzureichende Differenzierung zwischen PL und IL gelang und dadurch der Effekt die Signifikanzschwelle nicht erreicht.

4.5. BDNF-Konzentrationsänderungen während des Extinktionslernens in verschiedenen Gehirnarealen

Amygdala

Die BDNF-Proteinmessung nach der Furchtextinktion zeigte in der Amygdala nach 60 Minuten eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings fiel der Effekt mit knapp über 10 % relativ klein aus und wurde durch einen Abfall des BDNF-Gehaltes in der Kontrollgruppe begünstigt. Werden die absolut gemessenen Werte betrachtet, lag 30 min nach dem Training sogar eine leicht höhere BDNF-Konzentration vor als zum Zeitpunkt 60.

Wie bei den Untersuchungen zur Furchtkonditionierung stützten sich erste Arbeiten auf die Messung der BDNF-mRNA. So konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Ressler (Chhatwal et al., 2006) nachweisen, dass es zwei Stunden nach dem Extinktionstraining zu einem Anstieg im basolateralen Kerngebiet der Amygdala kommt. Diese Veränderung war sowohl 30 min als auch 4 Stunden nach dem Verhaltenstraining nicht nachweisbar. Direkte Messungen in Bezug auf die BDNF-Proteinveränderungen wurden 2014 durch die Arbeitsgruppe von Prof. Quirk veröffentlicht (Rosas-Vidal et al., 2014). Dabei konnte speziell für die BA gezeigt werden, dass es 2 h nach Furchtextinktion zu einem BDNF-Anstieg kommt. Die Messpunkte wurden allerdings relativ grob gewählt (1 und 2 Stunden nach dem Training) und erfolgten mittels Immunfluoreszenz. Experimente zur BDNF-Proteinbestimmung kurz nach dem Extinktionstraining über Verfahren wie ELISA oder Western Blot wurden bisher nicht durchgeführt.

Allerdings finden sich zwei Veröffentlichungen, die den BDNF-Proteingehalt 48 Stunden nach den Verhaltensversuchen untersucht und dabei zusätzlich noch Proben aus Hippocampus und teilweise Präfrontalkortex gewonnen haben (Yee et al., 2007; Peters et al., 2010). Beide Arbeiten nutzten dazu den Promega-Emax-ELISA, kamen dabei aber im Detail zu teils abweichenden Ergebnissen. So konnten Peters und Kollegen in der Amygdala keine Veränderungen der BDNF-Proteinkonzentration nachweisen, haben die untersuchten Kerngebiete der Amygdala aber nicht spezifiziert.

Für die Untersuchung von Yee (2007) wurde im Gegensatz zu den anderen genannten Arbeiten auf C57BL/6J-Mäuse zurückgegriffen, die eine Furchtkonditionierung durchliefen und anschließend über drei Tage für jeweils acht Minuten kontinuierlich dem CS ausgesetzt wurden, sodass von einem Extinktionslernen ausgegangen werden kann. Für die ELISA-Messungen wurde die gesamte Amygdala herauspräpariert. Die angegebenen absoluten BDNF-Proteinwerte liegen dabei eine Größenordnung unter den Messwerten dieser Arbeit und dürften auf das verwendete ELISA-Kit der Firma Promega zurückzuführen sein (Lim et al., 2015). Insgesamt zeigte sich in der Arbeit von Yee (2007) ein linearer Zusammenhang zwischen der Freezingdauer während des Extinktionstrainings und der gemessenen BDNF-Konzentration. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als dass ein hohes Freezingniveau über das gesamte Extinktionstraining eher auf ein eingeschränktes Extinktionslernen hinweist.

Die Arbeiten von Yee und Peters zeigen zusammenfassend keinen sicheren Anstieg der

BDNF-Proteinkonzentration zwei Tage nach der Furchtextinktion. Allerdings weist die Arbeit von Ou (2010) im Rahmen der Furchtkonditionierung (s. vorheriges Kapitel auf S. 47) darauf hin, dass ein später Anstieg des BDNF-Proteins zeitlich eng umschrieben sein könnte, weswegen an dieser Stelle weitere Studien mit einem feineren Testraster notwendig sind.

Der in dieser Arbeit gemessene BDNF-Anstieg nach 60 min, der bereits nach 30 min zu beginnen scheint, tritt im Vergleich zur Arbeit von Rosas-Vidal (2014) etwas früher auf. Andererseits liegt dieser Studie aber eine andere Messmethode zugrunde. Wie in der Einleitung dargelegt wurde, verfügt insbesondere die BA über eine Reihe von reziproken Verbindungen zum IL. Somit deuten unsere Daten darauf hin, dass dieser Teil der Amygdala gegenüber dem infralimbischen Kortex als vorgeschaltete Struktur fungiert. Dort treten diese Effekte erst 60 bis 120 min nach der Furchtextinktion auf, wie im übernächsten Abschnitt detailliert erläutert wird. Die aktuell nur gering nachweisbaren Veränderungen im Zeitfenster 30 bis 60 Minuten nach dem Training könnten auf ähnlichen Problemen beruhen, die bereits im Kapitel zu BDNF-Veränderungen in der Amygdala nach Furchtkonditionierung diskutiert wurden.

Hippocampus

Die BDNF-Proteinmessungen erbrachten im dorsalen Hippocampus in der Verum- und der Kontrollgruppe große interindividuelle Schwankungen, womit sich keine signifikanten Unterschiede ergaben (s. auch **Tabelle A.5** im Anhang).

Bereits in der Einleitung wurde erwähnt (s. S. 11), dass zwar einige Arbeiten zur Rolle des dorsalen Hippocampus während der Furchtextinktion existieren, in neuen Arbeiten aber der ventrale Hippocampus im Fokus steht. Die fehlende Fähigkeit zur Furchtextinktion nach Inaktivierung des dorsalen Hippocampus in der Arbeit von Corcoran (2005) und der BDNF-Proteinanstieg 48 Stunden nach Extinktionstraining in der Veröffentlichung von Peters (2010) deuten an, dass in dieser Gehirnregion auch kurzfristige Veränderungen, die in einem BDNF-Anstieg resultieren, ablaufen könnten. Peters und Kollegen haben in ihrer Arbeit zwar nicht die Zielregion im Hippocampus genannt, allerdings wurden für Infusionsexperimente Kanülen im dorsalen Bereich platziert, weswegen davon auszugehen ist, dass die BDNF-ELISA-Messungen ebenfalls in diesem Teil des Hippocampus stattfanden. Auf der anderen Seite konnten Yee und Kollegen (2007) im Gegensatz zur Amygdala keinen Zusammenhang zwischen Freezingdauer während der Furchtextinktion und BDNF-Level zwei Tage später nachweisen.

In der bereits vorher erwähnten Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Quirk (Rosas-Vidal et al., 2014) wurde dann der Verlauf der BDNF-Proteinexpression im ventralen Hippocampus und im Speziellen in der Region CA1 mittels Immunzytochemie untersucht. Dabei konnten die Autoren mittels Immunfluoreszenz nachweisen, dass der BDNF-Gehalt eine und zwei Stunden nach dem Training erhöht ist. Problematisch erscheinen in der Arbeit die großen Schwankungen der gemessenen BDNF-Werte, die in der Kontrollgruppe in mehreren Gehirnarealen auftreten, sowie die geringe zeitliche Diskrimination, da nur zu zwei Zeitpunkten

Messungen erfolgten. Dennoch ist gerade der BDNF-Anstieg nach einer Stunde schlüssig, da im IL, dem der Hippocampus im Rahmen des Extinktionslernens über unidirektionale Verbindungen vorgeschaltet ist, Veränderungen der BDNF-Konzentration erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten. In diesem Zusammenhang ist außerdem interessant, dass Peters und Kollegen mit ihrer Arbeit zeigen konnten, dass das im Hippocampus gebildete BDNF letztlich im IL wirkt, d. h. dort zur BDNF-Ausschüttung führt und dieser Effekt für die Furchtextinktion notwendig ist (Peters et al., 2010).

Die Rolle und die zeitliche Ausschüttung von BDNF im ventralen Hippocampus ist damit nicht abschließend geklärt und es sind weitere detailliertere BDNF-Proteinmessungen mittels ELISA oder Western Blot notwendig, die bisher aber von keiner Arbeitsgruppe veröffentlicht wurden. Ähnliche Probleme betreffen den dorsalen Hippocampus, zumal hier eine Unterscheidung in die einzelnen anatomischen Abschnitte interessant wäre, da nach Rosas-Vidal die BDNF-Konzentration im ventralen Hippocampus vor allem in der Region CA1 ansteigt. Theoretisch könnten im dorsalen Bereich die Veränderungen der BDNF-Konzentration auch nur auf eine Subregion zurückzuführen sein. Über kleine Abweichungen während der Präparation und Probengewinnung könnte dadurch auch die große Streuung der gemessenen BDNF-Proteinkonzentrationen in den eigenen Experimenten erklärt werden.

Medialer Präfrontalkortex

In dieser Arbeit wurden erstmals BDNF-Proteinbestimmungen mit hoher zeitlicher Auflösung nach der Extinktion von Furcht im infralimbischen Kortex durchgeführt. Es zeigte sich dabei 90 min nach dem Extinktionstraining ein signifikanter Anstieg des BDNF-Proteins. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag die Konzentration ca. 30 % höher und war im Vergleich zum Ausgangslevel immerhin noch um 10 % erhöht. Besonders plausibel erscheint dieser zeitliche Verlauf in Anbetracht der signifikant niedrigeren BDNF-Werte bei den Tieren, die ein unzureichendes Extinktionslernen aufwiesen (s. **Abb. 3.11**).

Erste BDNF-Proteinmessungen wurden in der Arbeit von Peters (2010) vorgestellt. Die mittels Promega-ELISA erhobenen Werte wurden allerdings 48 Stunden nach dem Extinktionstraining erhoben, zeigten dabei keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe und lassen auch keine Rückschlüsse auf BDNF-Effekte zu früheren Zeitpunkten zu. Damit bleibt unklar, ob im IL späte Konsolidierungseffekte stattfinden, wie sie für den Hippocampus als auch die Amygdala (hier allerdings nach Furchtkonditionierung) bereits gezeigt werden konnten (Ou et al., 2010; Peters et al., 2010).

Die bereits mehrfach erwähnte Studie von Rosas-Vidal und Kollegen (2014) hat mittels Immunfluoreszenzmessungen den Zeitraum kurz nach dem Extinktionstraining untersucht. Dabei konnten sie zu allen beiden untersuchten Zeitpunkten (60 und 120 Minuten) keine Veränderungen von BDNF im mPFC feststellen. Die Autoren merken selbst an, dass sie mit ihrer Methode nur intrazelluläres BDNF nachweisen können. Extrazelluläre Veränderungen oder an den TrkB-Rezeptor gebundenes BDNF wurden bei der Immunfluoreszenz nicht erfasst,

wobei der Anteil des intrazellulär gespeicherten BDNF deutlich überwiegen dürfte. In einer anderen Arbeit konnten Messungen zur BDNF-mRNA für den Zeitpunkt 2 Stunden nach dem Extinktionslernen einen deutlichen Anstieg nachweisen (Bredy et al., 2007). Allerdings sind detaillierte Aussagen über den zeitlichen Verlauf aus der Arbeit von Bredy nicht möglich, da nur für diesen einen Zeitpunkt Messungen durchgeführt wurden.

Die negativen Ergebnisse der Studie von Rosas-Vidal könnten auf deren geringe zeitliche Auflösung zurückgeführt werden, denn der BDNF-Peak, der in der eigenen Arbeit beobachtet wurde, trat 90 min nach dem Training auf. Zum Zeitpunkt 60 lag lediglich eine leichte, nicht signifikante Erhöhung an BDNF-Protein vor, womit der Anstieg zeitlich eng umschrieben war. Dieser Effekt könnte somit in der Arbeit von Rosas-Vidal gar nicht erfasst worden sein.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Messungen sind somit die ersten Daten, die ein detailliertes Bild der BDNF-Proteinexpression im IL kurz nach der Extinktion von Furcht zeichnen. Die anderen genannten Veröffentlichungen stützen diese Ergebnisse in einigen Aspekten oder können sie zumindest nicht widerlegen. Außerdem konkretisieren die Ergebnisse die Erkenntnis, dass die Aktivität von BDNF im IL für das Extinktionslernen zwingend notwendig ist (Rosas-Vidal et al., 2014). Zur weiteren Validierung könnten nun Experimente erfolgen, die zu den interessanten Messzeitpunkten antiBDNF-Antikörper in den mPFC einbringen und dann eine mögliche Einschränkung des Extinktionslernens überprüfen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, in wie weit und in welcher zeitlichen Abfolge die BDNF-Proteinexpression in bestimmten Gehirnregionen bei der Furchtkonditionierung und der Extinktion des Furchtgedächtnisses stattfindet. Dazu wurden zuerst für C57BL/6J-Wildtypmäuse verschiedene Versuchsprotokolle entwickelt, in denen zunächst ein Sinuston mit einem über Metallstreben applizierten aversiven Stromreiz gekoppelt wurde. Nach fünfmaliger Darbietung der beiden Reize konnte bei der überwiegenden Anzahl der Tiere ein Furchtverhalten – messbar als Freezing – induziert werden. Ein Teil der so trainierten Tiere wurden einen Tag später einer wiederholten Darbietung des Sinustones unterzogen, wodurch ein Extinktionslernen einsetzte.

Für den zweiten Teil der Arbeit wurden einmal bei naiven Tieren sowie im Abstand von 0 bis 120 min nach dem entsprechenden Trainingsabschnitt Proben aus der Amygdala, dem dorsalen Hippocampus sowie dem prälimbischen (nach Konditionierung) und dem infralimbischen (nach Extinktion) Präfrontalkortex gewonnen. In den Proben wurde mittels ELISA die Konzentration des neuronalen Wachstumsfaktors BDNF gemessen. Bei den naiven Tieren ergaben sich Werte von ca. 100 ng/g (Amygdala), 140 ng/g (Hippocampus) und 50 ng/g (mPFC). Im Vergleich mit diesen naiven Tieren konnten nach der Furchtkonditionierung in der Amygdala und im PL keine signifikanten Änderungen der BDNF-Konzentration gemessen werden. Andere Arbeiten an Ratten konnten in der Amygdala nach 60 min einen deutlichen Anstieg feststellen, während für den PL einige Arbeiten existieren, die eine Aktivierung des BDNF-Signalweges erwarten lassen. Die Differenzen zu diesen Untersuchungen sind am ehesten auf methodische Einschränkungen und mögliche Speziesunterschiede zurückzuführen. Der konstante BDNF-Spiegel im Hippocampus bestätigt dagegen Überlegungen, dass die Region bei frühen Konsolidierungsprozessen des Furchtgedächtnisses keine Rolle spielt.

In der dritten Versuchsreihe wurden die BDNF-Konzentrationen nach dem Extinktionslernen gemessen. Dabei konnte für den IL erstmals ein BDNF-Anstieg nach der Furchtextinktion gezeigt werden, der nach 90 min auftritt und zudem zeitlich sehr eng umgrenzt ist. Dieses Ergebnis kann als Grundlage für weitere Experimente dienen, die gezielt zu diesem Zeitpunkt in den BDNF-TrkB-Signalweg eingreifen. Außerdem wurde nach 60 min in der Amygdala ein geringer Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Hier sind weitere Arbeiten notwendig, die dann stärker auf die unterschiedlichen Kernbereiche der Amygdala eingehen sollten, da die bisher veröffentlichten Studien noch kein einheitliches Bild ergeben.

Literaturverzeichnis

Alder J, Thakker-Varia S, Bangasser DA, Kuroiwa M, Plummer MR, Shors TJ, Black IB (2003) Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of vgf in hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience* 23:10800–10808.

Amano T, Duvarci S, Popa D, Paré D (2011) The fear circuit revisited: contributions of the basal amygdala nuclei to conditioned fear. *The Journal of Neuroscience* 31:15481–15489.

An B, Hong I, Choi S (2012) Long-term neural correlates of reversible fear learning in the lateral amygdala. *The Journal of Neuroscience* 32:16845–16856.

Andero R, Ressler KJ (2012) Fear extinction and bdnf: translating animal models of ptsd to the clinic. *Genes, Brain and Behavior* 11:503–512.

Anglada-Figueroa D, Quirk GJ (2005) Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *The Journal of Neuroscience* 25:9680–9685.

Bast T, Zhang WN, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. *Experimental Brain Research* 139:39–52.

Berretta S, Pantazopoulos H, Caldera M, Pantazopoulos P, Pare D (2005) Infralimbic cortex activation increases c-fos expression in intercalated neurons of the amygdala. *Neuroscience* 132:943–953.

Bova R, Micheli MR, Qualadrucci P, Zucconi GG (1998) Bdnf and trkb mrnas oscillate in rat brain during the light–dark cycle. *Molecular Brain Research* 57:321–324.

Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M (2007) Histone modifications around individual bdnf gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learning & Memory* 14:268–276.

Chhatwal JP, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ (2006) Amygdala bdnf signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nature Neuroscience* 9:870–872.

Choi D, Gourley S, Ressler K (2012) Prelimbic bdnf and trkb signaling regulates consolidation of both appetitive and aversive emotional learning. *Translational Psychiatry* 2:e205.

- Choi DC, Maguschak KA, Ye K, Jang SW, Myers KM, Ressler KJ (2010) Prelimbic cortical bdnf is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:2675–2680.
- Chou D, Huang CC, Hsu KS (2014) Brain-derived neurotrophic factor in the amygdala mediates susceptibility to fear conditioning. *Experimental Neurology* 255:19–29.
- Colliva A, Tongiorgi E (2021) Distinct role of 5'utr sequences in dendritic trafficking of bdnf mrna: additional mechanisms for the bdnf splice variants spatial code. *Molecular Brain* 14:10.
- Corcoran KA, Desmond TJ, Frey KA, Maren S (2005) Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *The Journal of Neuroscience* 25:8978–8987.
- Corcoran KA, Quirk GJ (2007) Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *The Journal of Neuroscience* 27:840–844.
- Coria-Lucero CD, Golini RS, Ponce IT, Deyurka N, Anzulovich AC, Delgado SM, Navigatore-Fonzo LS (2016) Rhythmic bdnf and trkb expression patterns in the prefrontal cortex are lost in aged rats. *Brain Research* 1653:51–58.
- Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Current Molecular Pharmacology* 3:12–29.
- Cox D, Czerniawski J, Ree F, Otto T (2013) Time course of dorsal and ventral hippocampal involvement in the expression of trace fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 106:316–323.
- Duvarci S, Popa D, Paré D (2011) Central amygdala activity during fear conditioning. *The Journal of Neuroscience* 31:289–294.
- Edelmann E, Lessmann V, Brigadski T (2014) Pre- and postsynaptic twists in bdnf secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 Pt C:610–627.
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciocchi S, Herry C, Lüthi A (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62:757–771.
- Endres T, Lessmann V (2012) Age-dependent deficits in fear learning in heterozygous bdnf knock-out mice. *Learning & Memory* 19:561–570.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7–19.

- Fendt M (2001) Injections of the nmda receptor antagonist aminophosphonopentanoic acid into the lateral nucleus of the amygdala block the expression of fear-potentiated startle and freezing. *The Journal of Neuroscience* 21:4111–4115.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2007) *The mouse brain in stereotaxic coordinates 3rd Edition* Academic press.
- Gabbott P, Warner T, Busby S (2006) Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 139:1039–1048.
- Gale GD, Anagnostaras SG, Godsil BP, Mitchell S, Nozawa T, Sage JR, Wiltgen B, Fanselow MS (2004) Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *The Journal of Neuroscience* 24:3810–3815.
- Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM (2013) The hippocampal–prefrontal pathway: The weak link in psychiatric disorders? *European Neuropsychopharmacology* 23:1165–1181.
- Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V (2009) Bdnf signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and gabaergic synapses. *Experimental Brain Research* 199:203–234.
- Groessl F, Munsch T, Meis S, Griessner J, Kaczanowska J, Pliota P, Kargl D, Badurek S, Kraitsy K, Rassoulpour A et al. (2018) Dorsal tegmental dopamine neurons gate associative learning of fear. *Nature Neuroscience* 21:952–962.
- Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Cioocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, Biag J, Dong HW, Deisseroth K, Callaway EM et al. (2010) Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature* 468:270–276.
- Heldt S, Stanek L, Chhatwal J, Ressler K (2007) Hippocampus-specific deletion of bdnf in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry* 12:656–670.
- Heldt SA, Zimmermann K, Parker K, Gaval M, Ressler KJ (2014) Bdnf deletion or trkb impairment in amygdala inhibits both appetitive and aversive learning. *The Journal of Neuroscience* 34:2444–2450.
- Herry C, Cioocchi S, Senn V, Demmou L, Müller C, Lüthi A (2008) Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454:600–606.
- Hobin JA, Goosens KA, Maren S (2003) Context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala represents fear memories after extinction. *The Journal of Neuroscience* 23:8410–8416.

- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure and Function* 212:149–179.
- Hu B, Nikolakopoulou AM, Cohen-Cory S (2005) Bdnf stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. *Development* 132:4285–4298.
- Jacobi F, Höfler M, Siegert J, Mack S, Gerschler A, Scholl L, Busch MA, Hapke U, Maske U, Seiffert I, Gaebel W, Maier W, Wagner M, Zielasek J, Wittchen HU (2014) Twelve-month prevalence, comorbidity and correlates of mental disorders in germany: the mental health module of the german health interview and examination survey for adults (degs1-mh). *International Journal of Methods in Psychiatric Research* .
- Johansen JP, Tarpley JW, LeDoux JE, Blair HT (2010) Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nature Neuroscience* 13:979–986.
- Kim EJ, Horovitz O, Pellman BA, Tan LM, Li Q, Richter-Levin G, Kim JJ (2013) Dorsal periaqueductal gray-amygdala pathway conveys both innate and learned fear responses in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:14795–14800.
- Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675–677.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8856–8860.
- Kreutzmann JC, Marin MF, Fendt M, Milad MR, Ressler K, Jovanovic T (2021) Unconditioned response to an aversive stimulus as predictor of response to conditioned fear and safety: A cross-species study. *Behavioural Brain Research* 402:113105.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* 23:155–184.
- Leschik J, Eckenstaler R, Endres T, Munsch T, Edelmann E, Richter K, Kobler O, Fischer KD, Zuschratter W, Brigadski T, Lutz B, Lessmann V (2019) Prominent postsynaptic and dendritic exocytosis of endogenous bdnf vesicles in bdnf-gfp knock-in mice. *Molecular Neurobiology* 56:6833–6855.
- Leßmann V, Brigadski T (2009) Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic bdnf secretion: an update. *Neuroscience Research* 65:11–22.
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR (1995) Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:8074–8077.

- Likhtik E, Popa D, Apergis-Schoute J, Fidacaro GA, Paré D (2008) Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature* 454:642–645.
- Lim Y, Zhong JH, Zhou XF (2015) Development of mature bdnf-specific sandwich elisa. *Journal of Neurochemistry* 134:75–85.
- Ma X, Vuyyuru H, Munsch T, Endres T, Lessmann V, Meis S (2022) Probdnf dependence of ltd and fear extinction learning in the amygdala of adult mice. *Cerebral Cortex* 32:1350–1364.
- Maren S (2001) Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience* 24:897–931.
- Maren S (2011) Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron* 70:830–845.
- Maren S, Fanselow MS (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *The Journal of Neuroscience* 15:7548–7564.
- Maren S, Ferrario CR, Corcoran KA, Desmond TJ, Frey KA (2003) Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of pavlovian fear conditioning in rats. *European Journal of Neuroscience* 18:3080–3088.
- Maren S, Holt WG (2004) Hippocampus and pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. *Behavioral Neuroscience* 118:97.
- Maren S, Phan KL, Liberzon I (2013) The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience* 14:417–428.
- Marowsky A, Yanagawa Y, Obata K, Vogt KE (2005) A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron* 48:1025–1037.
- Martin-Fairey CA, Nunez AA (2014) Circadian modulation of memory and plasticity gene products in a diurnal species. *Brain Research* 1581:30–39.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA (2008) Biosynthesis and processing of endogenous bdnf: Cns neurons store and secrete bdnf, not pro-bdnf. *Nature Neuroscience* 11:131–133.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15:791–803.
- Meis S, Endres T, Munsch T, Lessmann V (2018) The relation between long-term synaptic plasticity at glutamatergic synapses in the amygdala and fear learning in adult heterozygous bdnf-knockout mice. *Cerebral Cortex* 28:1195–1208.

- Meis S, Endres T, Lessmann V (2012) Postsynaptic bdnf signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents. *The Journal of Physiology* 590:193–208.
- Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, Zeidan MA, Handwerker K, Orr SP, Rauch SL (2009) Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry* 66:1075–1082.
- Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70–74.
- Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by nmda antagonists in the amygdala. *Nature* 345:716.
- Musumeci G, Sciarretta C, Rodríguez-Moreno A, Al Banhaabouchi M, Negrete-Díaz V, Costanzi M, Berno V, Egorov AV, und Halbach OvB, Cestari V et al. (2009) Trkb modulates fear learning and amygdalar synaptic plasticity by specific docking sites. *The Journal of Neuroscience* 29:10131–10143.
- Myers K, Davis M (2007) Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry* 12:120–150.
- Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learning & Memory* 8:156–163.
- Ou LC, Gean PW (2005) Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. *Neuropsychopharmacology* 31:287–296.
- Ou LC, Yeh SH, Gean PW (2010) Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 93:372–382.
- Pape HC, Pare D (2010) Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews* 90:419–463.
- Pare D, Duvarci S (2012) Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. *Current Opinion in Neurobiology* 22:717–723.
- Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ (2010) Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic bdnf. *Science* 328:1288–1290.
- Phillips R, LeDoux J (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 106:274.

- Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat: A review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 911:369–391.
- Ponder C, Kliethermes C, Drew M, Muller J, Das K, Risbrough V, Crabbe J, Gilliam TC, Palmer A (2007) Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. *Genes, Brain and Behavior* 6:736–749.
- Psotta L, Lessmann V, Endres T (2013) Impaired fear extinction learning in adult heterozygous bdnf knock-out mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 103:34–38.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia AS, White L (2012) *Neuroscience. 5th Edition* Sinauer Associates, Massachusetts USA.
- Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56–72.
- Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000) The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *The Journal of Neuroscience* 20:6225–6231.
- Rasmusson AM, Shi L, Duman R (2002) Downregulation of bdnf mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology* 27:133–142.
- Rattiner LM, Davis M, French CT, Ressler KJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor b involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *The Journal of Neuroscience* 24:4796–4806.
- Raza SA, Albrecht A, Çalışkan G, Müller B, Demiray YE, Ludewig S, Meis S, Faber N, Hartig R, Schraven B et al. (2017) Hipp neurons in the dentate gyrus mediate the cholinergic modulation of background context memory salience. *Nature Communications* 8:1–15.
- Rescorla RA, Wagner AR (1972) *Classical Conditioning II: Current Research and Theory*, chapter A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement, pp. 64–99 Number 2 in Century psychology series. Appleton-Century-Crofts.
- Rogan MT, Stäubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390:604–607.
- Rosas-Vidal LE, Do-Monte FH, Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2014) Hippocampal–prefrontal bdnf and memory for fear extinction. *Neuropsychopharmacology* .
- Runyan JD, Moore AN, Dash PK (2004) A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning. *The Journal of Neuroscience* 24:1288–1295.

- Sartori SB, Maurer V, Murphy C, Schmuckermair C, Muigg P, Neumann ID, Whittle N, Singewald N (2016) Combined neuropeptide s and d-cycloserine augmentation prevents the return of fear in extinction-impaired rodents: Advantage of dual versus single drug approaches. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 19.
- Schaaf MJ, Duurland R, de Kloet ER, Vreugdenhil E (2000) Circadian variation in bdnf mrna expression in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research* 75:342–344.
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE (2000) Activation of erk/map kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *The Journal of Neuroscience* 20:8177–8187.
- Segal RA (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual Review of Neuroscience* 26:299–330.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36:529–538.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 15:1768–1777.
- Stern CA, Gazarini L, Vanvossen AC, Hames MS, Bertoglio LJ (2014) Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learning & Memory* 21:753–759.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS et al. (2005) Probdnf induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75^{ntr} and sortilin. *The Journal of Neuroscience* 25:5455–5463.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ (2006) Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning & Memory* 13:728–733.
- Whittle N, Fadok J, MacPherson KP, Nguyen R, Botta P, Wolff SBE, Müller C, Herry C, Tovote P, Holmes A, Singewald N, Lüthi A, Ciochi S (2021) Central amygdala microcircuits mediate fear extinction. *Nature Communications* 12:4156.
- Yee B, Zhu SW, Mohammed A, Feldon J (2007) Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety-and fear-related behaviour in c57bl6 mice. *Journal of Neural Transmission* 114:431–444.

Abbildungsverzeichnis

1.1. Übersicht über die Kerngebiete der Amygdala	5
2.1. Darstellung des Konditionierungssystems	19
2.2. Schematische Darstellung des Protokolls zur Furchtkonditionierung	20
2.3. Schematische Darstellung des Protokolls zur Furchtextinktion	21
2.4. Gehirnmatrize mit eingezeichneten Schnittebenen	22
2.5. Schnittbild Amygdala und Hippocampus	23
2.6. Schnittbild Präfrontalcortex	24
3.1. Verhaltensdaten der Konditionierungsgruppe	29
3.2. BDNF-Proteinkonzentration in der Amygdala nach Konditionierung	31
3.3. BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus nach Konditionierung	31
3.4. BDNF-Proteinkonzentration im mPFC nach Konditionierung	32
3.5. Verhaltensdaten der Extinktionsgruppe und der Kontrollgruppe während der Konditionierung	34
3.6. Durchschnittsgeschwindigkeiten sämtlicher trainierter Gruppen während der Konditionierung	35
3.7. Verhaltensdaten der Extinktionsgruppe während der Extinktion und der Kon- trollgruppe im Extinktionskontext	36
3.8. BDNF-Proteinkonzentration in der Amygdala nach Extinktion	38
3.9. BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus nach Extinktion	39
3.10. BDNF-Proteinkonzentration im mPFC nach Extinktion	40
3.11. BDNF-Proteinkonzentration im mPFC je nach Erfolg des Extinktionstrainings	41
A.1. Freezing während Konditionierung und Gedächtnisabruf für die Tiere der Ex- tinktionsgruppe	76
A.2. Freezing während Konditionierung und Extinktion für die Tiere der Extinkti- onsgruppe	76

Tabellenverzeichnis

2.1. FCS-Parameter	18
2.2. Verwendete Chemikalien	26
2.3. ACSF-Zusammensetzung	26
2.4. Lysepuffer-Zusammensetzung	26
A.1. Protokoll Konditionierung	70
A.2. Protokoll Extinktion	71
A.3. Protokoll Kontrolle für Extinktion	73
A.4. BDNF-Konzentrationen nach Furchtkonditionierung	77
A.5. BDNF-Konzentrationen nach Furchtextinktion	77

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Volkmar Leßmann für die Vergabe des Themas bedanken. Mein besonderer Dank gilt PD Thomas Endres für die langjährige und ausgesprochen geduldige Unterstützung sowohl bei theoretischen als auch praktischen Fragen. Außerdem möchte ich Margit Schmidt und Colette Obst für die technische Unterstützung im Labor danken. Weiterhin muss hier Evelyn Friedl erwähnt werden – ohne sie wäre eine Arbeit mit so vielen Versuchstieren nicht möglich gewesen. Auch den anderen hier nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktorandinnen und Doktoranden, die ich im Laufe der Zeit am Institut für Physiologie kennenlernen durfte, möchte ich für die anregenden Diskussionen danken. Die Arbeit wurde weiterhin durch ein Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gefördert. Mein abschließender Dank gilt meiner Familie und dabei insbesondere meiner Frau Franziska: für die vielen geopferten Urlaube und Feierabende, für die Motivation und die entgegengebrachte Liebe.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Der zeitliche Verlauf der BDNF-Proteinkonzentration in drei Gehirnregionen der Maus während des Erlernens und der Extinktion von Furcht

am Institut für Physiologie

mit Unterstützung durch **Prof. Dr. rer. nat. V. Leßmann**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 4. März 2024

Aaron Voß

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die
Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den 4. März 2024

Aaron Voß

Bildungsweg

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

A. Anlagen

A.1. Versuchsprotokolle

Tabelle A.1. *Protokoll für die Konditionierung: Sinuston = 8 kHz mit der Intensität 80, Stromreiz = 0,40 mA*

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
1	30	kein
2	30	kein
3	30	kein
4	30	kein
5	29	Sinuston
6	1	Sinuston + Stromreiz
7	30	kein
8	30	kein
9	30	kein
10	29	Sinuston
11	1	Sinuston + Stromreiz
12	30	kein
13	30	kein
14	29	Sinuston
15	1	Sinuston + Stromreiz
16	30	kein
17	30	kein
18	30	kein
19	30	kein
20	29	Sinuston
21	1	Sinuston + Stromreiz
22	30	kein
23	30	kein
24	30	kein
25	29	Sinuston
26	1	Sinuston + Stromreiz

Fortsetzung Tabelle A.1

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
27	30	kein
28	30	kein
29	30	kein
30	30	kein

Tabelle A.2. Protokoll für die Extinktion nach vorheriger Konditionierung: Sinuston = 8 kHz mit der Intensität 80

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
1	30	kein
2	30	kein
3	30	kein
4	30	kein
5	30	Sinuston
6	5	kein
7	30	Sinuston
8	5	kein
9	30	Sinuston
10	5	kein
11	30	Sinuston
12	5	kein
13	30	Sinuston
14	5	kein
15	30	Sinuston
16	5	kein
17	30	Sinuston
18	5	kein
19	30	Sinuston
20	5	kein
21	30	Sinuston
22	5	kein
23	30	Sinuston
24	5	kein
25	30	Sinuston

Fortsetzung Tabelle A.2

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
26	5	kein
27	30	Sinuston
28	5	kein
29	30	Sinuston
30	5	kein
31	30	Sinuston
32	5	kein
33	30	Sinuston
34	5	kein
35	30	Sinuston
36	5	kein
37	30	Sinuston
38	5	kein
39	30	Sinuston
40	5	kein
41	30	Sinuston
42	5	kein
43	30	Sinuston
44	5	kein
45	30	Sinuston
46	5	kein
47	30	Sinuston
48	5	kein
49	30	Sinuston
50	5	kein
51	30	Sinuston
52	5	kein
53	30	Sinuston
54	5	kein
55	30	Sinuston
56	5	kein
57	30	Sinuston
58	5	kein
59	30	Sinuston
60	5	kein
61	30	Sinuston

Fortsetzung Tabelle A.2

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
62	5	kein
63	30	Sinuston
64	5	kein

Tabelle A.3. Protokoll für die Kontrollgruppe der Extinktion: kein Sinuston, kein Stromreiz

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
1	30	kein
2	30	kein
3	30	kein
4	30	kein
5	30	kein
6	5	kein
7	30	kein
8	5	kein
9	30	kein
10	5	kein
11	30	kein
12	5	kein
13	30	kein
14	5	kein
15	30	kein
16	5	kein
17	30	kein
18	5	kein
19	30	kein
20	5	kein
21	30	kein
22	5	kein
23	30	kein
24	5	kein
25	30	kein
26	5	kein
27	30	kein

Fortsetzung Tabelle A.3

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
28	5	kein
29	30	kein
30	5	kein
31	30	kein
32	5	kein
33	30	kein
34	5	kein
35	30	kein
36	5	kein
37	30	kein
38	5	kein
39	30	kein
40	5	kein
41	30	kein
42	5	kein
43	30	kein
44	5	kein
45	30	kein
46	5	kein
47	30	kein
48	5	kein
49	30	kein
50	5	kein
51	30	kein
52	5	kein
53	30	kein
54	5	kein
55	30	kein
56	5	kein
57	30	kein
58	5	kein
59	30	kein
60	5	kein
61	30	kein
62	5	kein
63	30	kein

Fortsetzung Tabelle A.3

Abschnitt	Dauer in s	Stimulus
64	5	kein

A.2. Abbildungen

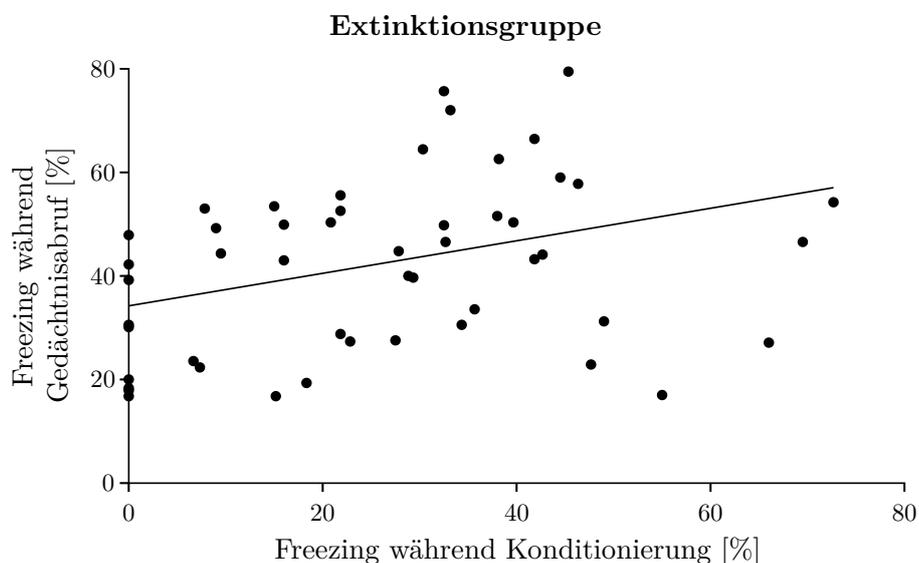


Abbildung A.1. Schwache Korrelation zwischen der Freezingdauer während der 4. und 5. Tonpräsentation während der Furchtkonditionierung und zu Beginn des Extinktionstrainings für die Tiere der Extinktionsgruppe ($r = 0,36$, $p = 0,01$). Der Abschnitt zu Beginn des Extinktionstrainings kommt dabei einem Gedächtnisabruf gleich. Die Freezingdauer wurde jeweils prozentual auf einen 30-s-Block bezogen.

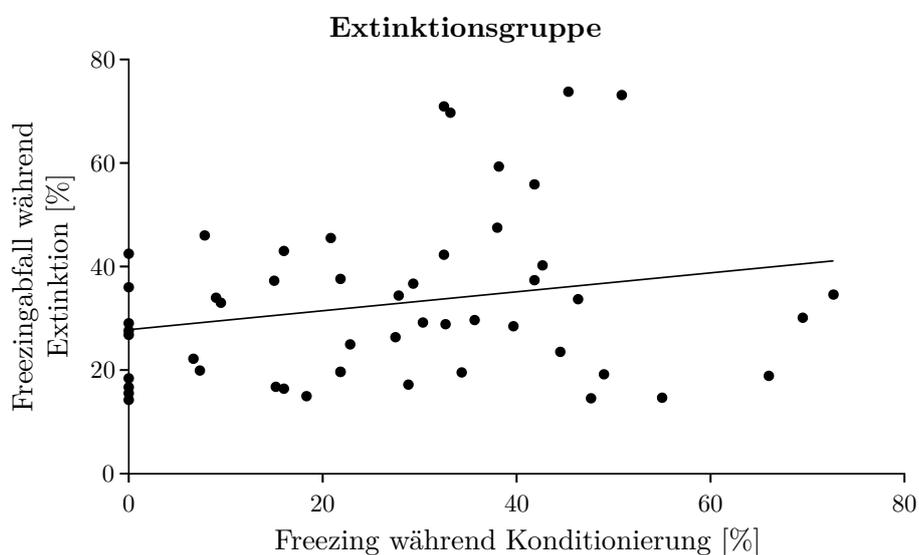


Abbildung A.2. Verhältnis der Freezingdauer während der 4. und 5. Tonpräsentation während der Furchtkonditionierung und der Abnahme des Freezingverhaltens während des Extinktionstrainings (Differenz des durchschnittlichen Freezings bei CS-Präsentation 1-3 und CS-Präsentation 10-21) für die Tiere der Extinktionsgruppe ($r = 0,22$, $p = 0,11$). Die Freezingdauer wurde jeweils prozentual auf einen 30-s-Block bezogen.

A.3. Tabellarische Darstellung der BDNF-Konzentrationen

Tabelle A.4. *Tabellarische Darstellung der BDNF-Konzentration nach Furchtkonditionierung sowie in der Kontrollgruppe. Die Angabe erfolgt in ng/g \pm Standardfehler.*

Zeitpunkt	Amygdala	Hippocampus	mPFC
naiv _{früh}	106,52 \pm 2,63	142,63 \pm 1,07	53,37 \pm 1,81
naiv _{spät}	103,07 \pm 3,35	132,88 \pm 13,98	49,54 \pm 3,86
ZP 0	99,51 \pm 2,10	130,36 \pm 8,81	57,92 \pm 3,13
ZP 30	95,89 \pm 6,36	105,77 \pm 16,46	58,29 \pm 2,29
ZP 60	93,38 \pm 5,65	117,66 \pm 8,58	60,10 \pm 3,35
ZP 90	86,25 \pm 1,85	119,47 \pm 15,08	57,35 \pm 2,03
ZP 120	89,01 \pm 4,71	128,68 \pm 8,59	54,26 \pm 1,39

Tabelle A.5. *Tabellarische Darstellung der BDNF-Konzentration nach Furchtextinktion und nach Kontrollexperiment. Die Angabe erfolgt in ng/g \pm Standardfehler.*

Zeitpunkt	Amygdala	Hippocampus	mPFC
ZP 0	92,60 \pm 8,04	100,01 \pm 4,83	58,52 \pm 4,54
ZP 30	96,89 \pm 4,06	96,27 \pm 8,07	57,82 \pm 4,36
ZP 60	94,80 \pm 3,06	101,62 \pm 9,17	61,62 \pm 6,71
ZP 90	91,06 \pm 5,54	105,54 \pm 11,67	65,57 \pm 3,69
ZP 120	82,71 \pm 4,47	86,31 \pm 10,50	54,91 \pm 2,17
Kontrolle ₃₀	91,56 \pm 4,81	–	–
Kontrolle ₆₀	84,13 \pm 1,88	111,71 \pm 6,72	53,29 \pm 1,90
Kontrolle ₉₀	88,88 \pm 4,11	105,21 \pm 6,83	49,61 \pm 1,15