

Fakultät für Medizin - Technische Universität München

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Technischen
Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Johann Förstl)

in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Forschungsgruppe für Neuronale Plastizität
(Leiter: Priv.-Doz. Dr. Carsten T. Wotjak)

Die Rolle des dopaminergen Systems im medialen präfrontalen Cortex bei der Extinktion konditionierter Furcht am Mausmodell

Linda Falkenthal

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/-r: Prof. Dr. Wilko Weichert
Prüfende/-r der Dissertation: 1. Prof. Dr. Johann Förstl
2. Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Die Dissertation wurde am 21.08.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.02.2020 angenommen.

*“My mother's afraid of the subway
It's a living bad dream
I hold her hand as the doors close
And she pales and stifles a scream*

*Ali's afraid of Ad-libbing
Of improvising at jams
She is not very happy right now
And spends all her money on grams*

[...]

*There is usually one thing that keeps
Us off track
It is fear, it is fear, it is fear”*

Sia: “Fear”

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Wege aus der Angst	2
1.1.1 Furchtextinktion und Expositionstherapie	2
1.1.2 Beteiligte Hirnstrukturen	5
1.1.3 Neurotransmitter und Einsatz modulierender Medikamente in der Therapie	7
1.2 Das dopaminerge System.....	8
1.2.1 Neurotransmitter Dopamin – Synthese, Funktion, Elimination	9
1.2.2 Dopaminrezeptoren	10
1.2.3 Afferente dopaminerge Bahnen und emotionales Verhalten	11
1.2.4 Dopamin und Lernen	11
1.3 Methoden zur Erforschung lokaler Transmittersysteme.....	12
1.3.1 In vivo-Mikrodialyse	13
1.3.2 Intracerebrale Mikroinjektion pharmakologisch wirksamer Substanzen	14
1.4 Aufgabenstellung.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Tiere und Tierhaltung.....	16
2.2 Testapparaturen zur Durchführung der Konditionierungs- und Extinktionssitzungen	16
2.3 Verhaltensanalyse	18
2.4 Experimente.....	19
2.4.1 Überprüfung der Furchtextinktion im Heimkäfig	20

2.4.2	Dopaminerge Transmission im mPFC während der Furchtextinktion (In-vivo-Mikrodialyse)	22
2.4.3	Einfluss einer transienten, pharmakologischen Inaktivierung von D1/D2-Rezeptoren im mPFC auf die Extinktion konditionierter Furcht.....	27
2.5	Histologische Kontrolle	29
2.6	Statistik	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Extinktion im Heimkäfig.....	32
3.2	Dopamin im mPFC während der Furchtextinktion (In-vivo-Mikrodialyse).....	35
3.3	Intra-mPFC-Sulpirid-Effekt auf die Furchtextinktion	37
3.4	Intra-mPFC-SCH23390-Effekt auf die Furchtextinktion	39
4	Diskussion.....	42
4.1	Effektivität der Furchtextinktion im Heimkäfig	42
4.2	Die dopaminerge Transmission im mPFC während der Furchtextinktion	43
4.3	Effekte lokal applizierter D1- und D2-Antagonisten im mPFC auf die Furchtextinktion.....	44
4.4	Limitationen	46
4.5	Ausblick	48
	Literaturverzeichnis	52
	Danksagung	55

Abkürzungsverzeichnis

Acb	Nucleus accumbens
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variances</i>)
cAMP	cyclisches Adenomonophosphat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CR	konditionierte Reaktion (<i>Conditioned Reaction</i>)
CREB	<i>Response Element Binding Protein</i>
CS	konditionierter Reiz (<i>Conditioned Stimulus</i>)
DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Transporter
DCS	D-Cycloserin, partieller NMDA-Rezeptor-Agonist
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
GABA	γ -Aminobuttersäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HVA	Hormonvanillinsäure
IL	infralimbischer präfrontaler Cortex
L-Dopa	Levodopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)
MAO	Monoaminoxidase
mPFC	medialer präfrontaler Cortex
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PE	Vorhersagefehler (<i>Prediction Error</i>)
PFC	präfrontaler Cortex
PrL	prälimbischer präfrontaler Cortex
PTSD	posttraumatische Belastungsstörung (<i>Posttraumatic Stress Disorder</i>)
SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
UR	unkonditionierte Reaktion (<i>Unconditioned Reaction</i>)
US	unkonditionierter Reiz (<i>Unconditioned Stimulus</i>)
VTA	ventrales Tegmentum (<i>Ventral Tegmental Area</i>)

SI-Einheiten sowie gebräuchliche Abkürzungen von laborchemischen Substanzen und gebräuchliche medizinische Abkürzungen sind der Übersichtlichkeit halber nicht aufgeführt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht der Phasen von Konditionierung und Extinktion.....	3
Abbildung 2: Wiederauftreten der konditionierten Furchtreaktion (CR).....	4
Abbildung 3: Anatomie des mPFC der Maus.	6
Abbildung 4: Übersicht über die Synthese und den Abbau von Dopamin.	10
Abbildung 5: In- vivo-Mikrodialyse bei Mäusen: Schematische Darstellung und Fotodokumentation.....	14
Abbildung 6: Graphische Darstellung der Korrelation der Verhaltensanalysen.	19
Abbildung 7: Übersicht des Versuchsprotokolls zur Untersuchung der Extinktion im Heimkäfig.	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung der zwei verwendeten Extinktionsprotokolle.	22
Abbildung 9: Darstellung der Schädelnähte am Mäuseschädel.	23
Abbildung 10: Schematische Übersicht über die einzelnen Schritte des Mikrodialyseexperiments.	24
Abbildung 11: Probengewinnung der Mikrodialyse an den Versuchstagen 1-3.....	25
Abbildung 12: Verwendete HPLC-Komponenten und Einstellungen.....	26
Abbildung 13: Schematische Übersicht über die einzelnen Schritte der Mikroinjektionsversuche.	28
Abbildung 14: Intra-PFC Sonden-/Kanülenposition für die Mikrodialyse- und Mikroinjektionsversuche.	30
Abbildung 15: Heimkäfigextinktion an den Versuchstagen 1-4 (<i>Within- und Between-Session-Extinction</i>).....	34
Abbildung 16: Immobilität während der jeweils ersten Tonpräsentation (<i>Between-Session-Extinction</i>)	35
Abbildung 17: Prozentuale Veränderungen der extrazellulären DA-Konzentration an den Tagen 1-3.	37

Abbildung 18: Furchtextinktion (Tag 1-3) unter unilateraler intra-mPFC Sulpirid-Injektion (Tag 1 und 2).	38
Abbildung 19: <i>Between-Session-Extinction</i> unter intra-mPFC Sulpirid-Injektion (Tag 1 und 2).....	39
Abbildung 20: Furchtextinktion (Tag 1-3) unter unilateraler intra-mPFC SCH23390-Injektion (Tag 1 und 2).....	40
Abbildung 21: <i>Between-Session-Extinction</i> unter intra-mPFC SCH23390- Injektion (Tag 1 und 2).	41

Zusammenfassung

Laut der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) litten 2015 weltweit ca. 264 Millionen Menschen an einer Angststörung. Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten umfassen vor allem kognitive Verhaltenstherapien. Um diese in ihrer Effektivität zu unterstützen, werden bereits verschiedene Medikamente eingesetzt. Für eine gezielte supportive Therapie ist jedoch ein genaueres Verständnis der neurobiochemischen Mechanismen und Interaktionsprozesse der kognitiven Angstkontrolle erforderlich. Das Monoamin Dopamin, welches als Botenstoff in den für die Furchtakquisition, -expression und -extinktion essentiellen Hirnstrukturen vorkommt, scheint hierbei besonders interessant. Eine Vielzahl von Studien legt nahe, dass der Botenstoff mit seinen verschiedenen Rezeptoren ein wichtiger Neuromodulator für verschiedene Aspekte des affektiven Lernens und Gedächtnisses ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher im Mausmodell mit der dopaminergen Transmission und Funktion im mPFC, welcher bereits mit furchtassoziierten Verarbeitungsprozessen in Verbindung gebracht wurde. Nach Etablierung eines geeigneten Verhaltensprotokolls wurden zunächst die Veränderungen der DA-Konzentration im mPFC bei männlichen C57BL/6-Mäusen während der Furchtextinktion mittels Mikrodialyse untersucht. Hierbei ergab sich kein Hinweis auf eine spezifische Beteiligung an Prozessen der Furchtexpression und -extinktion. Allerdings war bei den Versuchsgruppen ein DA-Anstieg festzustellen, der mit dem Einsetzen der Lichtpräsentation als möglicher salienter Stimulus assoziiert war. Somit ist eine modulatorische Funktion auf das Extinktionslernen nicht komplett auszuschließen. In den weiterführenden Experimenten erfolgte die Mikroinjektion des D1-Antagonisten SCH23390 und des D2-Antagonisten Sulpirid (je 0,5 µl mit 0,5 mg/0,5 µl) in den rechten mPFC, um so einen möglichen Einfluss der selektiven D1-Rezeptor- oder D2-Rezeptor-Antagonisierung zu untersuchen. Hier konnte kein Effekt auf die Furchtextinktion nachgewiesen werden.

Zusammengefasst ergibt sich damit auf Grundlage der dargestellten Versuche kein Hinweis auf eine spezifische Beteiligung von DA im mPFC an der Furchtextinktion. Ob und in welchem Ausmaß eine modulatorische Wirkung, z.B. i.S. einer verbesserten *Signal-to-Noise Ratio*, besteht, kann nicht eindeutig geklärt werden und erfordert weitere Untersuchungen.

1 Einleitung

Angststörungen zählen mit einer Lebenszeitprävalenz bis 28,8% zu den häufigsten psychischen Erkrankungen (Michael et al. 2007). Die verschiedenen Subtypen werden in den beiden Klassifikationssystemen ICD-10 (*World Health Organisation, WHO, 2017*) und DSM-V (*American Psychiatric Association, 2013*) zusammengefasst. Generell wird zwischen spezifischen und sozialen Phobien, generalisierten Angststörungen, Panikstörungen, Agoraphobie (mit und ohne Panikstörung) und Zwangsstörungen unterschieden. Darüber hinaus gehen auch akute Belastungsreaktionen und posttraumatische Belastungsstörungen (*Posttraumatic Stress Disorder, PTSD*) mit Angstsymptomen einher. Gemeinsames Merkmal ist generell eine Überexpression der natürlichen Angst. Betroffene erfahren durch die in ihrer Intensität und/oder Dauer unangemessene oder generalisiert auftretende Angst oft eine tiefgreifende Einschränkung ihres individuellen Lebens. Nicht selten entwickeln sich physische oder psychische Komorbiditäten.

Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, die sich mit den Ursachen von Angststörungen beschäftigen. Ähnlich der affektiven Störungen scheinen dabei ebenfalls Alterationen in neuronalen Transmittersystemen eine Rolle in der multifaktoriellen Genese zu spielen. Das genaue Zusammenspiel der beteiligten Hirnstrukturen und deren Interaktion über Neurotransmitter sind jedoch bisher noch nicht vollends bekannt. Das mesocorticolimbische System mit seinen dopaminergen Afferenzen zu den Basalganglien und corticalen Strukturen scheint hierbei jedoch unter anderem eine wichtige Rolle zu spielen.

1.1 Wege aus der Angst

Bei der Therapie der Angsterkrankungen spielen bisher vor allem psychotherapeutische Behandlungsstrategien eine Rolle, insbesondere die Expositionstherapie. Hierbei wird durch wiederholte Konfrontation mit dem Angstauslöser eine Reduktion der Angstreaktion erreicht. Grundlage ist das Extinktionslernen.

1.1.1 Furchtextinktion und Expositionstherapie

Extinktion beschreibt einen Lernprozess, infolge dessen bedingte bzw. instrumentelle Reaktionen abgeschwächt werden. Im Fall der Furchtextinktion führt eine wiederholte Präsentation eines konditionierten Angststimulus (*Conditioned Stimulus, CS*) ohne

Verbindung zu einem aversiven Reiz (*Unconditioned Stimulus*, US) zu einer Reduktion der konditionierten Furchtreaktion (*Conditioned Reaction*, CR). Dabei handelt es sich nicht nur um das einfache Auslöschen des ursprünglichen Angstgedächtnisses, sondern um die Ausbildung einer neuen, inhibierenden Gedächtnisspur. Wie bei den meisten Lernformen werden dabei drei Phasen durchlaufen. Diese sind in Abbildung 1 dargestellt:

- 1) Akquisition – das initiale Lernen, welches sich während der Sitzung in einer Abnahme der Angstreaktion zeigt.
- 2) Konsolidierung – die darauffolgende Ausbildung eines entsprechenden Langzeitgedächtnisses der neuen Extinktionsassoziation über verschiedene physiologische und molekulare Mechanismen.
- 3) Retrieval – der Abruf des Extinktionsgedächtnisses, infolge dessen es bei einer erneuten Präsentation des CS zu einer anhaltend abgeschwächten oder gar ausbleibenden Angstreaktion kommt. Dabei spricht eine schwache CR für ein gutes Extinktionsgedächtnis, eine starke CR hingegen für ein weniger suffizientes Extinktionslernen.

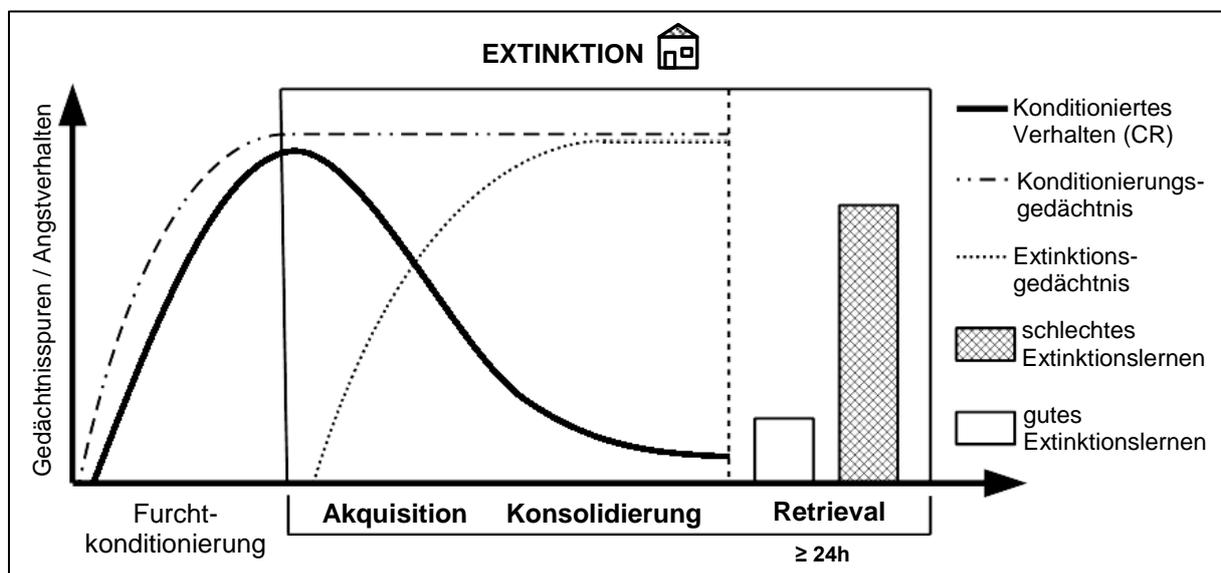


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Phasen von Konditionierung und Extinktion.

Mit Bildung des Konditionierungsgedächtnisses nimmt das konditionierte Verhalten (CR) zu. Die Gedächtnisspur bleibt auch im weiteren Verlauf bestehen. Während des Extinktionstrainings bildet sich eine zweite, inhibitorische Gedächtnisspur (Extinktionsgedächtnis), die zu einer regredienten Expression der CR führt. Im Retentionstest wird das Extinktionsgedächtnis abgerufen (Retrieval). Dadurch lässt sich der Erfolg des Extinktionslernens überprüfen.

(Modifiziert nach Quirk und Mueller, 2008)

Auch nach erfolgreichem Extinktionslernen kann es zu einem Wiederauftreten der Angstreaktion kommen (Abbildung 2). Dies geschieht z.B., wenn die CS-Präsentation in einer anderen Umgebung als dem ursprünglichen Extinktionskontext erfolgt (*Renewal*) – Extinktion ist kontextabhängig. Der Umgebung wird zumindest eine modulatorische Komponente im Extinktionslernen zugeschrieben. Weitere Situationen, die ein Wiederauftreten der CR bedingen, sind das unsignalisierte, also CS-unabhängige Präsentieren eines US (*Reinstatement*), sowie die CS-Konfrontation nach längerer Zeit – das Extinktionsgedächtnis ist nicht permanent (*Spontaneous Recovery*). Nicht zuletzt aufgrund dieser Tatsache gilt das Extinktionslernen als Mechanismus des Neulernens und nicht nur als einfache Auslöschung der ursprünglichen Angsterinnerung.

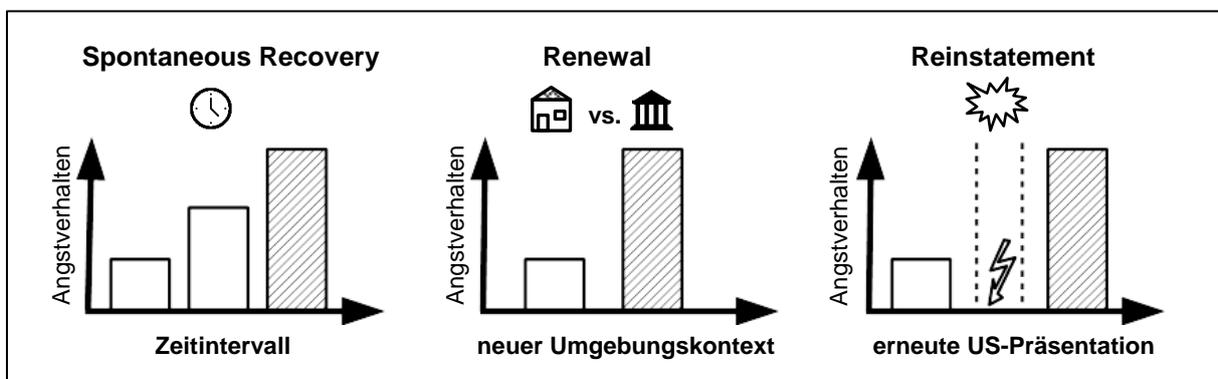


Abbildung 2: Wiederauftreten der konditionierten Furchtreaktion (CR).

Da es sich beim Extinktionslernen nicht um ein einfaches Löschen der Gedächtnisspur der zuvor konditionierten Angstreaktion handelt, sondern um die Ausbildung einer neuen, inhibierenden Gedächtnisspur (s. Abb. 1), kann es unter verschiedenen Bedingungen zu einem Wiederauftreten des konditionierten Verhaltens kommen. Dabei spielt z.B. der zeitliche Aspekt (*Spontaneous Recovery*), die Umgebung (*Renewal*), aber auch die erneute Präsentation eines aversiven Reizes (*Reinstatement*) eine Rolle.

(Modifiziert nach Myers und Davis, 2007)

Neben dem beschriebenen assoziativen Lernprozess werden auch nicht-assoziative Mechanismen wie habituationsähnliche Prozesse oder eine eventuelle reaktive Inhibition im Sinne einer Antwortermüdung diskutiert, einen gewissen Anteil zur Extinktion konditionierter Furcht beizutragen (Myers und Davis 2007, Kamprath und Wotjak 2004).

Als weiterer möglicher Therapieansatz kann neben der eigentlichen Extinktion die Beeinträchtigung der Rekonsolidierung des Angstgedächtnisses genutzt werden – insbesondere bei der PTSD. Entscheidend ist hierbei der Zeitpunkt der Behandlung. Fällt diese in den Zeitraum der Rekonsolidierung des Angstgedächtnisses, kann eine

langanhaltende und stimuluspezifische Reduktion der Angstreaktion beobachtet werden (Schiller et. al, 2010). Es wird diskutiert, ob dieser Effekt auf der Ausbildung einer hemmenden Gedächtnisspur beruht, wie sie für die Extinktion konditionierter Furcht beschrieben wird, oder ob es in dieser Zeit zu einer Konversion der ursprünglichen Angsterinnerung in eine Sicherheitserinnerung kommt (Monfils, 2009).

Psychopharmaka können unterstützend zur Expositionstherapie angewendet werden. Ziel ist es dabei, die Behandlung effektiver zu machen – d.h. einen Therapieerfolg mit weniger Konfrontationssitzungen und langfristig ohne Rückfall zu erreichen. Zudem können negative Empfindungen durch Medikamente reduziert werden, um den Leidensdruck der Patienten zu reduzieren (Orsini und Maren 2012, Singewald et al. 2015).

1.1.2 Beteiligte Hirnstrukturen

Die Extinktion von Angst ist ein Lernprozess, der verschiedene Hirnstrukturen involviert. Zu den zentralen Strukturen zählen u.a. (Johansen et al. 2011):

- Amygdala: Mit seinen basolateralen, lateralen und zentralen Anteil ist der Mandelkern an der Verarbeitung multipler emotionaler Prozesse beteiligt. Bezüglich des Furchtgedächtnisses vermittelt er die Kopplung zwischen CS und impliziertem Gedächtnis. Er ist Teil des limbischen Systems und befindet sich paarig im medialen Temporallappen.
- Hippocampus: Die Hippocampusformation, bestehend aus dem Gyrus dentatus, dem Cornu Ammonis und dem Subiculum, ist entscheidend an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt. Zudem werden hier kontextspezifische Informationen integriert. Der Hippocampus ist ebenfalls paarig angelegt und liegt am jeweils inneren Rand des Temporallappens.
- Präfrontaler Cortex (PFC): Der präfrontale Cortex ist eine der Kernstrukturen bei Gedächtnis- und Lernprozessen. Läsionen oder Dysfunktionen können zu schweren Beeinträchtigungen des Lernvermögens führen (Puig et al. 2014). Das bilateralsymmetrische, corticale Areal im Bereich des Frontalhirns kann anatomisch in verschiedene Subregionen eingeteilt werden – bei Menschen in den orbitofrontalen, den dorsolateralen, den ventrolateralen und den medialen PFC (Ko 2017). Teil des medialen Anteils ist zudem der anteriore cinguläre

Cortex (ACC) als transitorische Region zwischen corticalen und limbischen Strukturen (Perry et al. 2011). Die Unterteilung bei Nagetieren erfolgt aufgrund der vollständig agranulären Zytoarchitektur anhand der Afferenzen und Efferenzen. Generell kann zwischen einem medialen und orbitalen Netzwerksystem unterschieden werden. Der mPFC besteht aus verschiedenen Subregionen, welche in Abbildung 3 dargestellt sind. Die neuronale Struktur wird u.a. mit Vorgängen des Extinktionslernen (Peters et al. 2009) in Verbindung gebracht, aber v.a. auch mit Funktionen kognitiver Kontrolle und Prozessen des Arbeitsgedächtnisses.

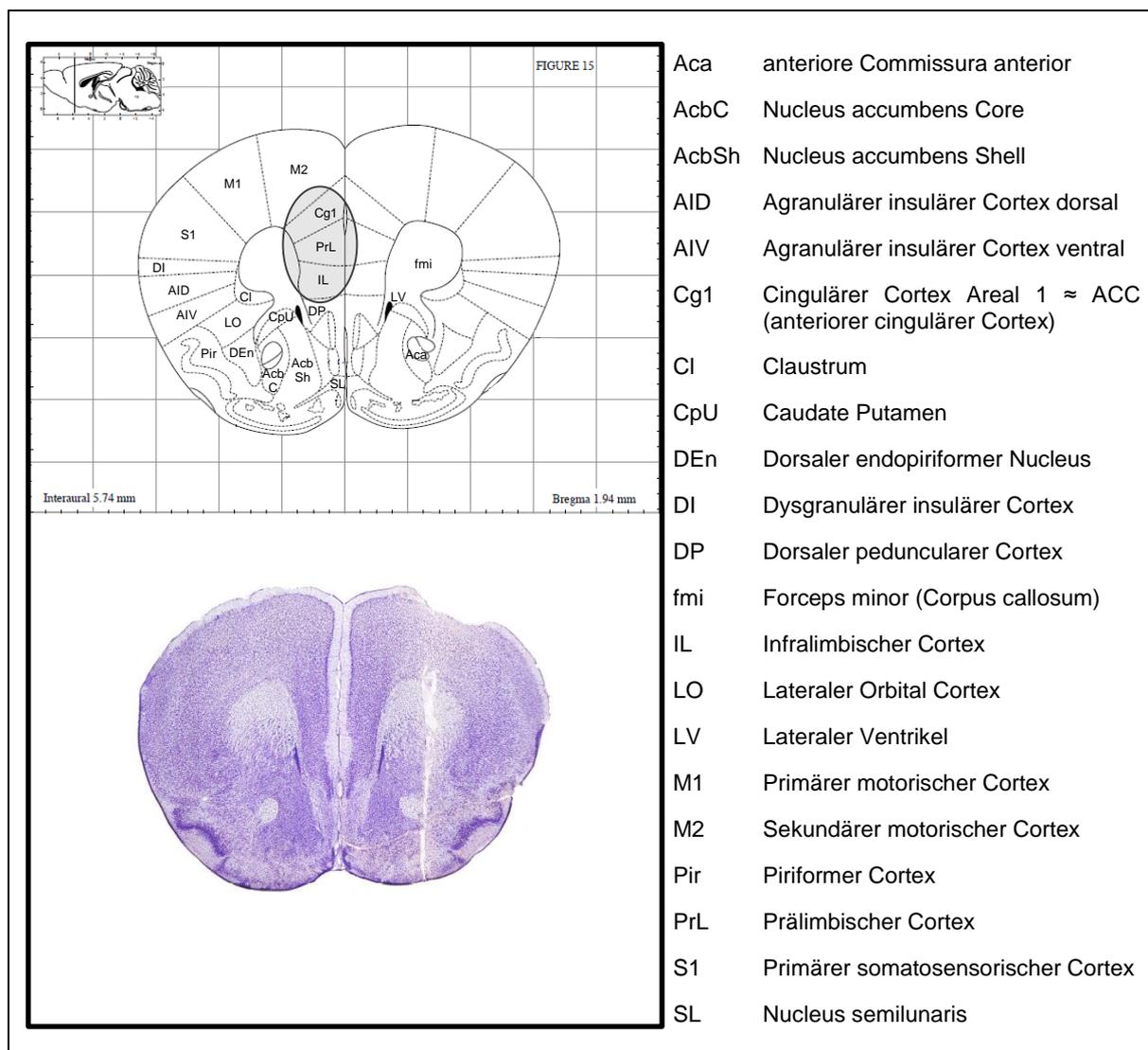


Abbildung 3: Anatomie des mPFC der Maus.

Der dorsale mPFC der Maus setzt sich aus dem IL und dem PrL zusammen. Beide sind an der Furchtextinktion beteiligt – der IL wird dabei mit einer verminderten, der PrL mit einer vermehrten Angstreaktion in Verbindung gebracht. Das cinguläre Cortexareal 1 (Cg1) entspricht dem humanen ACC und wird ebenfalls zum mPFC gezählt.

(Modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2001)

- Nucleus accumbens (Acb): Der Nucleus accumbens ist ein Teil des basalen Vorderhirns und umfasst anterior-striatale und erweiterbare Amygdala-Territorien. Innerhalb der zwei Hauptkomponenten, dem medioventral gelegenen Core und dem dorsolateralen Shell, lassen sich anatomisch und funktionell weitere Subregionen unterscheiden. Als wichtiger Bestandteil des mesocortico- limbischen Systems ist der Acb an neuronalen Prozessen im Zusammenhang mit Belohnung und Motivation beteiligt. Darüber hinaus lassen sich aber auch Hinweise auf das Mitwirken an der Verarbeitung aversiver Stimuli und adaptiver Verhaltensweisen finden, möglicherweise als Prozessionsort des *Prediction Errors* (PE), welcher bzgl. des Extinktionslernens durch Ausbleiben eines erwarteten aversiven Stimulus die neuronalen Vorgänge der Furchtextinktion auslösen könnte.

Neben den genannten neuronalen Strukturen sind auch weitere corticale Hirnregionen wie z.B. der sensorische Cortex oder das zentrale Höhlengrau an der Extinktion konditionierter Furcht beteiligt.

1.1.3 Neurotransmitter und Einsatz modulierender Medikamente in der Therapie

Ebenso vielfältig wie die beteiligten Hirnstrukturen sind die an der Furchtextinktion mitwirkenden Neurotransmitter und -modulatoren. Zu den bedeutsamsten zählen Glutamat, dessen exzitatorische Wirkung über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird, und GABA als wichtigster inhibitorischer Botenstoff. Aber auch für die endogenen Opiode und Cannabinoide sowie das „Stresshormon“ Cortisol und Noradrenalin konnte eine relevante Beteiligung an der Furchtextinktion gezeigt werden. Dopamin (DA) ist in großer Variation in Gedächtnis- und Lernprozesse involviert und findet sich ebenfalls in den an der Furchtextinktion beteiligten neuronalen Netzwerken. Der Botenstoff gilt als modulierendes Agens und kann je nach aktiviertem Rezeptortyp stimulierend oder inhibierend auf seine Zielstruktur wirken.

Unterstützend zu der psychotherapeutischen Behandlung kommen mitunter verschiedene pharmakologische Substanzen zum Einsatz. Bei Panikstörungen, sozialen Phobien und PTSD werden beispielsweise selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) verwendet. Temporär können auch Benzodiazepine zur Angstreduktion verabreicht werden. In Kombination mit einer Expositionstherapie

kommen diese jedoch nicht infrage, da dies nachweislich das Extinktionslernen beeinträchtigt und damit zu einem unzureichenden Therapieerfolg führt (Leão et al. 2016, Singewald et al. 2015). Zur PTSD-Behandlung kommt zudem auch die Gabe von Betablockern in Frage. Patienten mit einer starken adrenergen Reaktion zeigen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PTSD. Die pharmakologische Reduktion der adrenergen Reaktion soll die Ausbildung einer emotional starken Erinnerung an das traumatische Ereignis verhindern und damit der Ausbildung einer PTSD entgegenwirken (Pitman et al. 2002, Vaiva et al. 2003). Aktuellere Studien konnten den Effekt aber nicht hinreichend belegen (Wood et al. 2015).

Neuere experimentelle Ansätze zielen auf die Konsolidierung des Extinktionsgedächtnisses ab und versuchen diese zu unterstützen. Von besonderer Bedeutung dabei ist die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängiger Calciumkanäle, um die entsprechenden intrazellulären Prozesse (z.B. CREB-Aktivierung) auszulösen. Für partielle NMDA-Rezeptor-Agonisten, wie z.B. D-Cycloserin (DCS), wurde in verschiedenen tierexperimentellen Studien gezeigt, dass diese die Extinktion erleichtern können (u.a Walker et al. 2002). Die Substanzen sind dabei nicht selbst anxiolytisch und müssen in Verbindung mit einer entsprechenden Expositionstherapie eingesetzt werden. Ein positiver Effekt konnte bereits auch in Studien am Menschen beobachtet werden (Davis et al. 2006, Klass et al. 2017). Weitere pharmakologische Substanzen, die Gegenstand der Forschung zur Furchtextinktion sind und supportiv wirken könnten, sind z.B. Yohimbine (alpha-2-Rezeptor-Antagonist) und Cannabinoide sowie Calcium-Kanal-Agonisten (L-type VCCG-Agonisten) (Garakani et al. 2006, Fitzgerald 2014).

1.2 Das dopaminerge System

Auch für DA ist ein Einfluss auf die Furchtextinktion bekannt (Abraham et al. 2014). Dabei sind der genaue Wirkort und die Funktion des Botenstoffes nicht vollständig aufgeklärt. Pharmakologische Studien weisen jedoch darauf hin, dass ein erhöhter dopaminerges Tonus durch eine entsprechende Medikation eine weitere Therapieoption für die supportive Behandlung von Angsterkrankungen darstellen könnte (Whittle et al. 2016).

1.2.1 Neurotransmitter Dopamin – Synthese, Funktion, Elimination

DA gehört zu den biogenen Aminen und entsteht durch Hydroxylierung (durch das Enzym Tyrosinhydroxylase) und nachfolgende Decarboxylierung (durch die Aromatische L-Amino-Decarboxylase) aus der Aminosäure Tyrosin. Im Gehirn stellt es einen wichtigen Neurotransmitter dar, der u.a. maßgeblich an der Kontrolle der Willkürmotorik, aber auch an emotionalen Verarbeitungsprozessen beteiligt ist.

Außerhalb des Gehirns wird DA als Zwischenstufe bei der Synthese von Adrenalin und Noradrenalin im Nebennierenmark und in postganglionären sympathischen Nervenzellen gebildet. Als Katecholamin wirkt es, wie seine beiden katecholaminergen Folgeprodukte, dosisabhängig sympathogen und findet als synthetisch hergestelltes Sympathomimetikum z.T. auch heute noch klinische Anwendung in der Intensivmedizin.

Nach der Synthese wird DA in synaptischen Vesikeln dopaminerger Neurone gespeichert und calciumabhängig bei Depolarisierung freigesetzt. Die Inaktivierung erfolgt durch Wiederaufnahme über spezifische Dopamintransporter (DAT) und anschließenden enzymatischen Abbau oder Wiederauffüllung der synaptischen Vesikel. Für den Abbau von DA sind im Wesentlichen zwei Enzyme von Bedeutung: die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und die Monoaminoxidase (MAO), von der zwei Subtypen (MAO-A und -B) existieren. Die MAO findet sich in vielen verschiedenen Zellen in der äußeren Mitochondrienmembran – Typ A kommt sowohl im zentralen Nervensystem als auch in sympathischen Ganglienzellen vor sowie in intestinalen und plazentaren Mukosazellen, Typ B hingegen nur im zentralen Nervensystem sowie in Thrombo- und Lymphozyten. Die COMT ist ubiquitär und größtenteils im Zytoplasma der Zellen zu finden, nicht jedoch in katecholaminergen Neuronen. Präsynaptisch erfolgt der enzymatische Abbau damit nur durch die MAO, während postsynaptisch zusätzlich die COMT zur Verfügung steht. Beim Abbau von Dopamin entstehen die beiden Hauptmetabolite Homovanillinsäure (HVA) und 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC). HVA wird als Endprodukt über den Urin ausgeschieden. In Abbildung 4 ist die Synthese und der Abbau von DA schematisch zusammengefasst.

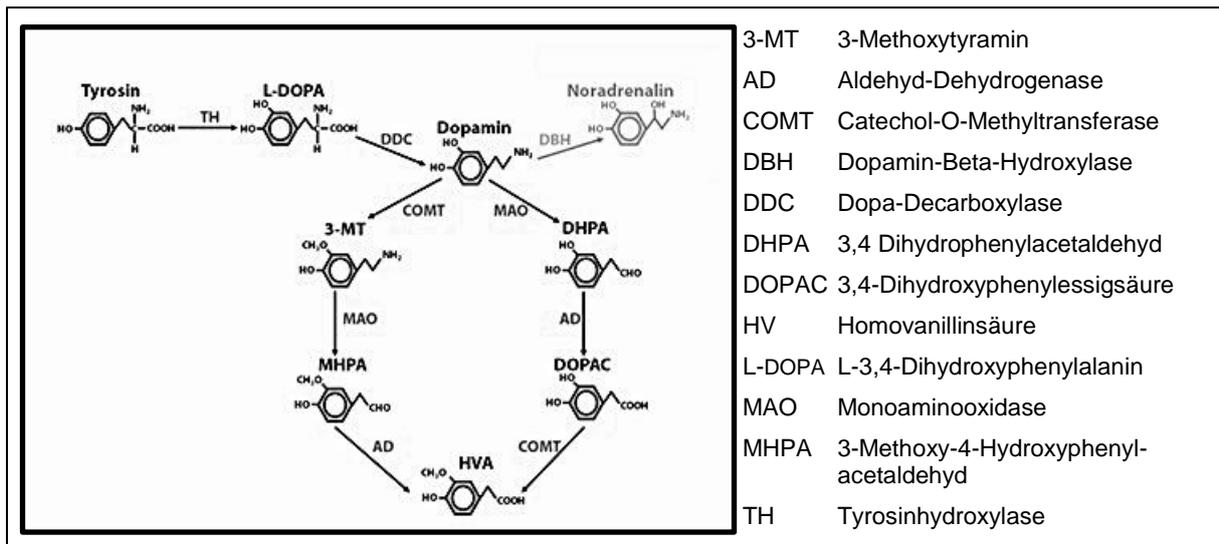


Abbildung 4: Übersicht über die Synthese und den Abbau von Dopamin.

(Modifiziert nach Laatikainen et al., 2013)

1.2.2 Dopaminrezeptoren

DA-Rezeptoren bestehen aus sieben membrandurchspannenden Peptidketten (Alpha-Helices) und wirken über G-Protein-gekoppelte Mechanismen. Bisher sind fünf verschiedene Subtypen (D1 bis D5) bekannt. Anhand ihrer Transduktionsmechanismen und pharmakologischen Eigenschaften lassen sie sich in zwei Gruppen unterteilen.

Zur D1-Gruppe gehören der D1- und D5-Rezeptor. Bei Bindung von Dopamin erfolgt die Aktivierung eines stimulatorischen G-Proteins, wodurch das membranständige Enzym Adenylatcyclase zur Bildung von cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) angeregt wird. Der sekundäre Botenstoff cAMP wiederum bedingt eine Aktivierung von Proteinkinasen und kann dadurch verschiedene intrazelluläre Prozesse initiieren.

Die Rezeptorsubtypen D2-D4 werden zur D2-Gruppe gezählt. Sie bewirken die Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins, welches zur Inaktivierung der Adenylatcyclase führt. Durch die reduzierte cAMP-Synthese wird der entsprechende Signalweg gehemmt.

DA kann somit auf unterschiedliche Weise wirksam werden, entscheidend ist die Expression des jeweiligen Rezeptortyps an der Zielstruktur.

1.2.3 Afferente dopaminerge Bahnen und emotionales Verhaltens

Im Gehirn von Säugetieren existieren im Wesentlichen drei wichtige dopaminerge Bahnen:

Das nigrostriatale System projiziert über dopaminerge Afferenzen aus der Substantia nigra (Pars compacta) zu neostriatalen Neuronen und trägt über das Prinzip der Disinhibition des Thalamus zur Kontrolle der extrapyramidalen Motorik und Modulation der Willkürmotorik bei. Klinisch bedingt hier eine Degeneration der dopaminergen Neuronen das Auftreten der typischen Symptome der Parkinson'schen Erkrankung.

Über das tuberoinfundibuläre System mit seinen dopaminergen Afferenzen aus dem Nucleus infundibularis des Hypothalamus wird letztendlich endokrin die Prolaktinsekretion der Adenohypophyse tonisch gehemmt.

Das mesocorticolimbische System ist an der Modulation emotionalen Verhaltens beteiligt. Es lässt sich in zwei Subsysteme unterteilen – dem mesolimbischen und dem mesocorticalen System. Beide Projektionsbahnen haben ihren Ursprung in dopaminergen Neuronen des ventralen Tegmentums (*Ventral Tegmental Area*, VTA). Die mesocorticale Bahn projiziert v.a. in den PFC und scheint für kognitive Funktionen (z.B. Aufmerksamkeit, soziales Verhalten) eine Rolle zu spielen. Die mesolimbischen dopaminergen Neurone der VTA projizieren zu limbischen Strukturen, v.a. dem Acb. Eine Dysregulation der DA-Transmission im mesocorticolimbischen System wurde bereits mit verschiedenen pathophysiologischen Zuständen, z.B. Drogenabhängigkeit und psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie, in Verbindung gebracht.

1.2.4 Dopamin und Lernen

Eine viel diskutierte Theorie bezüglich der Rolle von DA in Lernprozessen ist die Funktion in der Vermittlung des PE und dadurch ausgelöster adaptiver Verhaltensänderungen. In ihren klassischen Versuchen demonstrierten Schultz und seine Kollegen, dass v.a. die Diskrepanz zwischen dem erwarteten und dem tatsächlichen Auftreten einer Belohnung die Aktivität von dopaminergen Neuronen, vorwiegend der VTA, verändert (Steinberg 2013, Schultz 1998). Im Sinne einer bidirektionalen Kodierung wurden dabei eine erhöhte Aktivität bei Übertreffen der erwarteten Belohnung (positiver Vorhersagefehler) und eine verminderte Aktivität bei

Ausbleiben der erwarteten Belohnung (negativer Vorhersagefehler) beobachtet. Diese Veränderungen können dabei nicht nur von dem belohnenden Substrat selbst, sondern auch durch konditionierte Stimuli ausgelöst werden, wobei das genaue Antwortmuster der dopaminergen Neurone hierbei davon abhängt, ob, in welchem Ausmaß und in welchem zeitlichen Abstand die Belohnung folgt. Die so veränderte DA-Transmission soll assoziative Lernprozesse auslösen und so zu einer optimierten Verhaltensantwort führen. Das Ausbleiben eines aversiven Reizes könnte in diesem Zusammenhang als Belohnung gewertet werden und DA dadurch als „*Teaching Signal*“ theoretisch ebenfalls Lernprozesse i.S. einer Furchtextinktion auslösen.

Die Rolle von DA in Bezug auf furchtassoziierte Lernmechanismen und andere komplexere Lernformen scheint jedoch vielfältiger zu sein. Einige dopaminerge Populationen reagieren nachweislich auch auf saliente und aversive Stimuli sowie entsprechende aversiv konditionierte Reize. Verschiedene Forschungsgruppen gehen daher eher von einer modulatorischen Funktion der mesocorticolimbischen DA-Transmission in der Informationsverarbeitung aus (u. a. Bromberg-Martin et al. 2010). Die zwei gängigsten Theorien hierzu, welche durchaus miteinander vereinbar erscheinen, beschreiben für DA zum einen eine Art Taktungsfunktion (*Gating*) eintreffender Informationssignale, zum anderen eine Verbesserung der *Signal-to-Noise-Ratio*, also einer Unterdrückung hintergründiger „Störsignale“ zu Gunsten der relevanten Stimulusinformation. Es wird angenommen, dass zum Zeitpunkt der DA-Freisetzung aktive synaptische Signale verstärkt werden, indem die Exzitation der entsprechenden Neurone unterstützt wird, während nicht relevante neuronale Aktivitäten gehemmt werden. So kann es zu einer Synchronisation neuronaler Aktivitäten kommen und die weitere Informationsverarbeitung beeinflusst werden.

1.3 Methoden zur Erforschung lokaler Transmittersysteme

Um die dynamischen Veränderungen in lokalen Transmittersystemen, z.B. der DA-Freisetzung im mPFC während der Furchtextinktion, zu erfassen, stehen verschiedene wissenschaftliche Methoden zur Verfügung. Neben histologischen und bildgebenden Untersuchungstechniken besteht mit dem Verfahren der Mikrodialyse oder elektrochemischen Detektionsmethoden wie der Voltammetrie die Möglichkeit, Transmitter- und Metabolitkonzentrationen *in vivo* zu bestimmen. Neben der Bestimmung von Gewebekonzentrationen ist die lokale Applikation pharmakologisch

wirksamer Substanzen eine weitere Option, Hirnstrukturen zu untersuchen. Durch Mikroinjektion von Transmitter-Agonisten oder -Antagonisten kann der Einfluss bestimmter Botenstoffe in definierten Hirnarealen selektiv untersucht werden.

1.3.1 In vivo-Mikrodialyse

Die Mikrodialyse ist ein etabliertes wissenschaftliches Verfahren, welches u.a. in der Neurowissenschaft zur Detektion von Neurotransmittern genutzt wird. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden, wie z.B. der postmortalen Hirnsektion und histologischen Analyse oder PET-Verfahren, besteht in der Möglichkeit, die Transmission neuronaler Botenstoffe bestimmter Hirnareale direkt während der Verhaltensexpression an lebenden, sich frei bewegenden Versuchstieren erfassen zu können. Dazu wird bei den Versuchstieren eine Mikrodialysesonde, eventuell unter Verwendung einer zuvor implantierten Führungskanüle, in die zu untersuchende Hirnregion eingebracht. Die Sonde besteht aus einem zuführenden und ableitenden Schlauchsystem sowie einer semipermeablen Membran an der Spitze. Über das zuführende System wird kontinuierlich ein liquides Dialysemedium, welches in der Zusammensetzung möglichst der cerebralen Extrazellulärflüssigkeit entspricht, in die Sonde geleitet. Über die semipermeable Membran können nun je nach chemisch-physikalischen Eigenschaften Moleküle wie z.B. Neurotransmitter entlang ihres Konzentrationsgradienten in das Perfusionsmedium diffundieren. Über das ableitende System gelangt das Dialysat zur Probengewinnung nach außen. Zur anschließenden Analyse des Dialysats stehen je nach Fragestellung und zu detektierenden Substanzen verschiedene Methoden zur Verfügung, z.B. die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Dabei ist die zeitliche Auflösung v.a. durch die zur Analyse notwendige Dialysatmenge und die begrenzte Perfusionsrate limitiert.

Das Verfahren der In vivo-Mikrodialyse wurde in der neurowissenschaftlichen Forschung der letzten 30 Jahre bereits sehr erfolgreich und zahlreich an Ratten durchgeführt. Mäuse hatten sich als Versuchstiere für diese Methode initial als weniger praktikabel erwiesen, da diese nach Implantation der Mikrodialysesonde eine längere Rehabilitationsphase von ca. einer Woche benötigen (Wotjak et al. 2008). Zudem ist die Versuchstechnik aufgrund der kleineren Anatomie zur Vermeidung interferierender Gewebeschäden auf größere Hirnareale beschränkt gewesen. In den letzten Jahren findet die Methode aber auch bei Mäusen

zunehmende Anwendung zur experimentellen Erforschung neurologischer und psychiatrischer Krankheitsbilder, bei denen durch Verwendung der Mikrodialyse Einblicke in die Dynamik von Neurotransmittern während Verhaltensversuchen gewonnen werden können.

In der folgenden Abbildung 5 wird die Methode der Mikrodialyse genauer dargestellt.

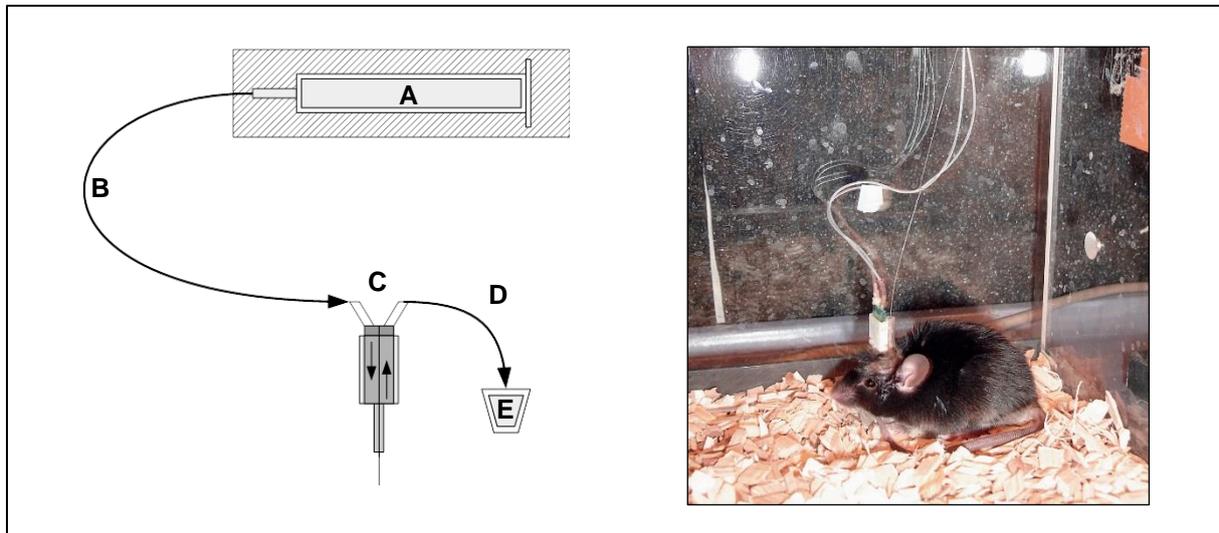


Abbildung 5: In- vivo-Mikrodialyse bei Mäusen: Schematische Darstellung und Fotodokumentation.

- a) Über einen Perfusor (A) wird das Dialysemedium kontinuierlich mit einer definierten Laufgeschwindigkeit in den zuführenden Schenkel (B) des Mikrodialysesystems gepumpt und von dort in die Mikrodialysesonde (C) geleitet. An deren Spitze befindet sich eine semipermeable Membran, über die der Übertritt von molekularen Stoffen entsprechend ihres Konzentrationsgradienten vom cerebralem Extrazellularraum in das Medium erfolgt. Das Dialysat wird anschließend über den abführenden Schenkel (D) in ein Probengefäß (E) befördert. Die zeitliche Auflösung hängt dabei von der Dauer der einzelnen Probengewinnung ab.
- b) Versuchstier mit implantierter Mikrodialysesonde. Zu- und abführender Schenkel des Mikrodialysesystems sind mit einer speziellen Vorrichtung an der Schädelkalotte befestigt und jeweils mit einer entsprechenden Markierung gekennzeichnet.

1.3.2 Intracerebrale Mikroinjektion pharmakologisch wirksamer Substanzen

Durch die Mikroinjektion pharmakologisch wirksamer Substanzen in bestimmte Hirnareale über zuvor implantierte Führungskanülen lassen sich diese, je nach Expression von Transmitterrezeptoren, gezielt beeinflussen. So kann z.B. durch Muscimol, einen GABA-Rezeptor-Agonist, eine transiente Inaktivierung erfolgen. Zur Untersuchung lokaler dopaminerger Systeme bieten sich selektive DA-Agonisten und -Antagonisten an, z.B. SCH23390 (selektiver D1-Rezeptorantagonist) und Sulpirid (selektiver D2-Rezeptorantagonist). Injektionen können dabei abhängig von der Fragestellung uni- oder bilateral erfolgen.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen der dopaminergen Transmission im mPFC und der Extinktion konditionierter Furcht zu untersuchen. Untersucht werden sollte dabei nicht nur, ob es im Rahmen der Furchtextinktion zu einer Dopaminfreisetzung im mPFC kommt, sondern auch welche DA-Rezeptortypen eine Rolle spielen. Dazu wurden verschiedene Verhaltensversuche durchgeführt, die sich im Einzelnen wie folgt darstellen:

- 1) Etablierung eines geeigneten Extinktionsprotokolls für die Furchtextinktion im Heimkäfig
- 2) Messung der DA-Konzentration im mPFC während der Furchtkonditionierung und -extinktion via Mikrodialyse
- 3) Untersuchung der Effekte der lokalen Injektion von Sulpirid (D2-Antagonist) und SCH23390 (D1-Antagonist) in den rechten mPFC auf die Furchtextinktion

2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Materialien und Methoden erläutert. Alle Tierexperimente wurden im Einklang mit den EU-Richtlinien für den sorgfältigen Umgang mit Versuchstieren (86/609/EEC) und nach Genehmigung der zuständigen Behörde bei der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

2.1 Tiere und Tierhaltung

Für die im Rahmen der experimentellen Arbeit durchgeführten Versuche wurden männliche C57BL/6-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die bei Anlieferung sechs bis acht Wochen alten Tiere wurden direkt nach der Ankunft in separaten Käfigen (Makrolon Typ II) untergebracht, welche mit Einstreu und Nistmaterial aus Holzwohle ausgestattet waren. Zudem war den Versuchstieren der Zugang zu Futter und Leitungswasser uneingeschränkt möglich. Sowohl in den Verhaltenslaboren, in denen die Versuche durchgeführt wurden, als auch in den Tierhaltungsräumen herrschten kontrollierte, konstante Laborbedingungen (inverser Lichtzyklus, 12h:12h, Licht an um 21:00 Uhr, Ausnahme: Mikrodialyseversuche mit Licht an um 09:00 Uhr; Raumtemperatur $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$). Nach einer Eingewöhnungsphase von mindestens einer Woche wurde mit den Experimenten begonnen. Alle Versuche wurden mit Ausnahme der Mikrodialyseexperimente in der Aktivitätsphase der Tiere (Dunkelphase, bei inversem Lichtzyklus 09:00 Uhr bis 21:00 Uhr) absolviert.

2.2 Testapparaturen zur Durchführung der Konditionierungs- und Extinktionssitzungen

Die nachfolgend beschriebenen Versuche zur Furchtkonditionierung und Extinktion konditionierter Furcht wurden in speziell dafür eingerichteten Verhaltenslaboren durchgeführt. Die Versuchstiere wurden mindestens einen Tag vor Beginn der Experimente in das Verhaltenslabor transportiert. Die Unterbringung zwischen den einzelnen Versuchssitzungen erfolgte in den jeweiligen Heimkäfigen in speziellen, platzsparenden Halterungssystemen. Dieser Bereich war von dem Teil des Labors, in dem sich die Versuchapparaturen befanden, durch einen schwarzen, licht- und geräuschundurchlässigen Vorhang räumlich getrennt. Dadurch war es möglich, mit

einem Teil der Versuchstiere Verhaltensexperimente durchzuführen, ohne dass die restlichen Tiere im Bereich des anderen Raumkompartiments beeinträchtigt wurden.

Beim Mikrodialyseexperiment erfolgte die Unterbringung und Versuchsdurchführung im Mikrodialyselabor. Die hier stattfindenden Experimente wurden, im Gegensatz zu den übrigen Versuchen, aufgrund der besonderen Komplexität in der Lichtphase, also der eigentlichen Inaktivitätsphase der Versuchstiere, durchgeführt. Am Tag vor Beginn des Experiments wurden die Tiere in das Labor transportiert, wo zunächst die Implantation der Mikrodialysesonde erfolgte. Danach wurden die Tiere in ihren Heimkäfigen bereits in die Versuchsvorrichtungen platziert, so dass an den folgenden Tagen keine zusätzliche Manipulation durch einen erneuten Transfer erforderlich war.

Konditionierungskammer

Die Konditionierung der Versuchstiere erfolgte in speziellen Konditionierungskammern für Mäuse (ENV-307A, MED Associates). Diese hatten eine rechteckige Grundfläche (19 cm x 14 cm) mit zwei Seitenwänden aus Metall und zwei Seitenwänden aus durchsichtigem Plexiglas. Die Höhe der Seitenwände betrug 30 cm. Der Boden bestand aus einem Metallgitter (ENV-407, MED Associates), über das unter Verwendung eines angeschlossenen Fußschockgenerators (ENV-414, MED Associates) die Applikation eines Elektroschocks erfolgte. Darunter befand sich eine kleine Metallschublade, die während der Versuche mit der gleichen Einstreu wie in den Heimkäfigen befüllt war. Zudem war jede Konditionierungskammer mit einer Lichtquelle (ca. 10 Lux, ENV-215M, MED Associates) ausgestattet. Nach jedem Durchgang wurden die Versuchsaapparaturen mit Ethanol 70 % gereinigt und die Metallschublade mit frischer Einstreu befüllt.

Zylinder für Extinktionstraining und/oder Retentionstest

Die Versuchsaapparaturen für das Extinktionstraining bestanden aus durchsichtigen Plexiglaszylindern (Durchmesser 15 cm, Höhe 30 cm) mit abnehmbaren Kunststoffböden, die während der Versuche ebenfalls mit Einstreu befüllt wurden. Die Beleuchtung, mit der die Zylinder ausgestattet waren, entsprach der in den Konditionierungskammern. Die Reinigung der Versuchsaapparaturen erfolgte nach jedem Durchgang mit Essigsäure 1 %, um eine mögliche olfaktorische Assoziation zur Konditionierungssituation zu vermeiden.

Mikrodialyse-Käfige

Für das Mikrodialyseexperiment wurden zur Unterbringung der Versuchstiere spezielle Käfige verwendet. Diese hatten ähnlich der Konditionierungskammern eine quadratische Grundfläche (16 cm x 16 cm) und Seitenwände aus Plexiglas (Höhe 32 cm). Der abnehmbare Kunststoffboden war ebenfalls mit Einstreu bedeckt. Futter und Leitungswasser waren den Tieren auch hier stets zugänglich. Während der Durchführung der Mikrodialyse wurden neben den Käfigen Haltevorrichtungen positioniert, über welche die Mikrodialyseschläuche so fixiert wurden, dass den Versuchstieren eine entsprechende Mobilität in den Käfigen möglich war, ohne sich in den Schläuchen zu verfangen.

Schallisolierte Versuchsboxen

Zur Durchführung der Verhaltensexperimente wurden die jeweiligen Konditionierungs- bzw. Versuchsapparaturen in schallisolierten, mit zusätzlichem Isoliermaterial aus Schaumstoff (Conrad Electronics, Hirschau, Deutschland) ausgekleideten Boxen (ENV-018M, MED Associates) platziert. An der Decke der Boxen befanden sich Lautsprecher (DTW 110 NG, Visaton), die mit einem Tongenerator (ANL-926, MED Associates) verbunden waren. Darüber war das Einspielen von Tönen unterschiedlicher Qualität und Dauer möglich. An den Rückwänden der Boxen waren kleine CCD-Kameras (Conrad Electronics, Hirschau, Deutschland) angebracht, über welche die bildliche Dokumentation des Verhaltens der Versuchstiere erfolgte. Dazu waren diese an DVD-Rekordern (DMR-EH56, Panasonic) angeschlossen. Zur Koordination des Versuchsablaufes wurde eine spezielle Software (MED-PC für Windows v2.16) verwendet. Dadurch konnte über eine entsprechende Schnittstelle (DIG 715, MED Associates) und Steuereinheit (SG 215, MED Associates) die kontrollierte Licht-, Ton- und ggf. Schockapplikation gemäß des ausgewählten Computerprotokolls erfolgen. Die Aufzeichnung der Experimente mittels Kamera und DVD-Rekorder wurde manuell koordiniert.

2.3 Verhaltensanalyse

Die Analyse des Freezingverhaltens der Versuchstiere während der Experimente wurde anhand der Videodokumentation durchgeführt. Dazu wurde das Computerprogramm „EVENTLOG“ (Robert Hendersohn, 1986) verwendet, mit dessen Hilfe die jeweiligen Freezingzeiten erfasst wurden. Die Zeitmessungen erfolgten dabei durch

das Betätigen definierter Tasten auf der Computertastatur. Als Freezing oder auch Angststarre wurde dabei die absolute Immobilität des Versuchstieres – ausgenommen Bewegungen durch Atemexkursionen – definiert. Die so erfassten Rohdaten wurden mithilfe der Software „Winrat“ (Heinz Barthelmes, MPIP) für die endgültige Analyse weiterverarbeitet.

Alle Experimente zur Furchtkonditionierung und deren Extinktion wurden in gleicher Weise und in Unkenntnis der Versuchsgruppen von derselben Person (Verfasserin der Arbeit) ausgewertet. Zur Gewährleistung einer möglichst exakten Analyse des Freezingverhaltens wurde vor Beginn der Experimente die Genauigkeit der individuellen Auswertung überprüft. Dazu wurden ausgewählte, bereits von einem erfahrenen Beobachter ausgewertete Verhaltensdaten erneut analysiert und eine Korrelation der Ergebnisse der beiden Untersucher erstellt. Die inter- und intraindividuelle Übereinstimmung in der Auswertung der Daten lag dabei bei über 94 % (Abbildung 6).

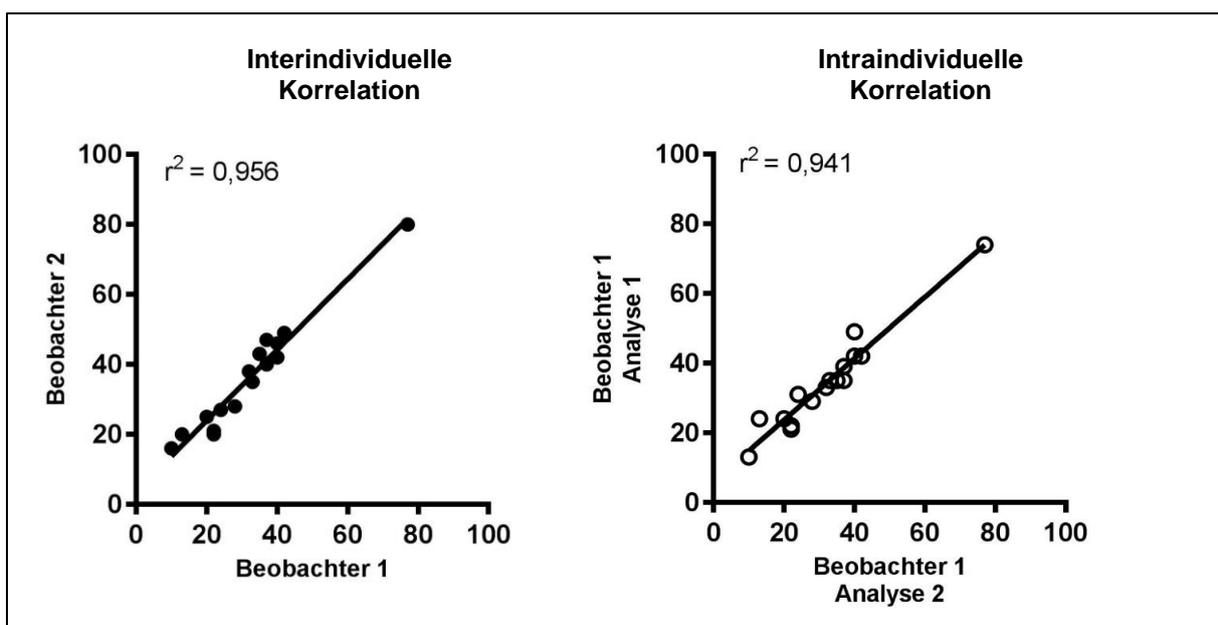


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Korrelation der Verhaltensanalysen.

2.4 Experimente

Es wurden insgesamt vier tierexperimentelle Versuche durchgeführt. Im ersten Experiment wurde ein Verhaltensprotokoll etabliert, auf dessen Grundlage der darauffolgende Mikrodialyseversuch umgesetzt wurde. In den letzten beiden

Experimenten erfolgten die Mikroinjektionen von D1-/D2-Rezeptorantagonisten in den mPFC.

2.4.1 Überprüfung der Furchtextinktion im Heimkäfig

Als potentiell problematisch für die Durchführung des Mikrodialyseexperimentes stellte sich die Anfälligkeit der Methode gegenüber Störfaktoren im Rahmen des Verhaltensversuches dar, z.B. die Interaktion mit den Versuchstieren beim Umsetzen der Tiere in die jeweiligen Versuchsapparaturen. Um eine derartige Interaktion zumindest während des Extinktionstrainings zu vermeiden, wurde in einem Vorexperiment überprüft, ob das Extinktionslernen bezüglich konditionierter Furcht auch im eigenen Heimkäfig zu beobachten ist und somit ein Transfer zwischen den Versuchsapparaturen vermieden werden kann. Eine Übersicht über den Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt. Das beschriebene Experiment wurde wie der spätere Mikrodialyseversuch während der Lichtphase durchgeführt. Somit konnte gleichzeitig die Effektivität des Extinktionslernens während der eigentlichen Inaktivitätsphase der Versuchstiere überprüft werden.

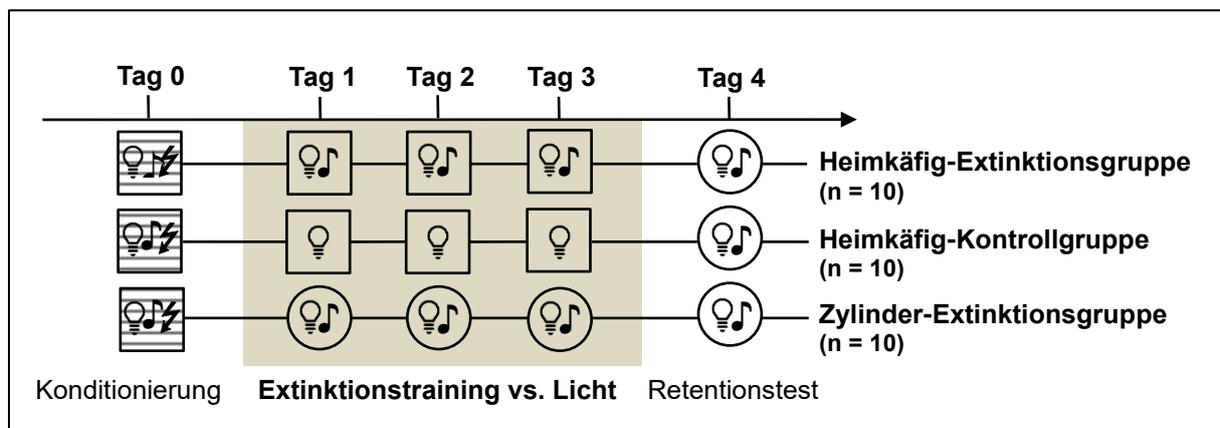


Abbildung 7: Übersicht des Versuchsprotokolls zur Untersuchung der Extinktion im Heimkäfig.

Nach Konditionierung aller drei Versuchsgruppen in der Konditionierungskammer an Tag 0 durchliefen nur Gruppe 1 im Heimkäfig und Gruppe 2 im Zylinder ein tägliches Extinktionstraining (EX10D1 bzw. EX10D2 in alternierender Reihenfolge). An Tag 4 wurden alle Versuchsgruppen im Zylinder getestet (EX10D2).

Konditionierung

Alle Versuchstiere wurden an Tag 0 entsprechend dem Konditionierungsprotokoll C01 mit einem Sinuston (20 s, 9 kHz, 80 dB) als CS und einem koterminierten Fußschock (2 s, 0,7 mA) als US konditioniert. Dazu wurden die Versuchstiere einzeln aus dem Nebenraum, in dem die Tiere im experimentalfreien Intervall untergebracht

waren, in das Mikrodialyselabor gebracht und in die dafür vorgesehene Konditionierungskammer gesetzt. Wie bereits beschrieben erfolgte nach einem Zeitintervall von drei Minuten die Tonpräsentation und mit einer Verzögerung von 18 s die Schockapplikation. Danach verblieben die Tiere jeweils eine weitere Minute ohne weitere Manipulation bei weiterhin eingeschaltetem Licht in der Konditionierungskammer, bevor sie zurück in ihre Heimkäfige gesetzt und zurück in den Tierhaltungsraum gebracht wurden.

Extinktionstraining

Für die Beurteilung der Furchtextinktion wurden die Versuchstiere anschließend in drei Gruppen eingeteilt. Abgeleitet von dem Standardprotokoll, das in der Arbeitsgruppe für das Extinktionslernen konditionierter Furcht verwendet wurde, gab es primär zwei Gruppen. Gruppe 1 erhielt an den Versuchstagen 1-3 jeweils ein Extinktionstraining mit je zehn, 20 s andauernden Tonpräsentationen im Heimkäfig, während die Versuchstiere der Gruppe 2 täglich eine entsprechende Zeitdauer bei eingeschaltetem Licht ohne Tonpräsentationen in ihren Heimkäfigen verbrachten. Als Heimkäfige dienten in Anlehnung an den folgenden Mikrodialyseversuch die beschriebenen Mikrodialysekäfige. Zusätzlich wurde eine dritte Gruppe gegenübergestellt, die an den Tagen 1-3 das Extinktionstraining mit je zehn Tonpräsentationen im Plexiglaszylinder erhielt.

Retentionstest

An Tag 4 wurde bei allen Versuchstieren ein Extinktionstraining mit je zehn Tonpräsentationen im Plexiglaszylinder durchgeführt, um zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß ein Extinktionslernen stattgefunden hatte.

Extinktionsprotokolle

Bei den Gruppen 1 und 3 wurden an den Tagen 1-3 abwechselnd die Protokolle „EX10D1“ und „EX10D2“ verwendet, welche eine unterschiedliche Abfolge der Tonsignale enthielten (siehe Abbildung 8). Bei Gruppe 2 wurde an den Tagen 1-3 das Protokoll „1250seclight“ angewandt, welches lediglich die konstante Präsentation von Licht, nicht aber akustische Signale enthielt. Für das Extinktionstraining aller Versuchstiere an Tag 4 wurde entsprechend der alternierenden Reihenfolge das Protokoll „EX10D2“ verwendet. Alle genannten Stimulusprotokolle hatten eine Gesamtdauer von ca. 21 Minuten.

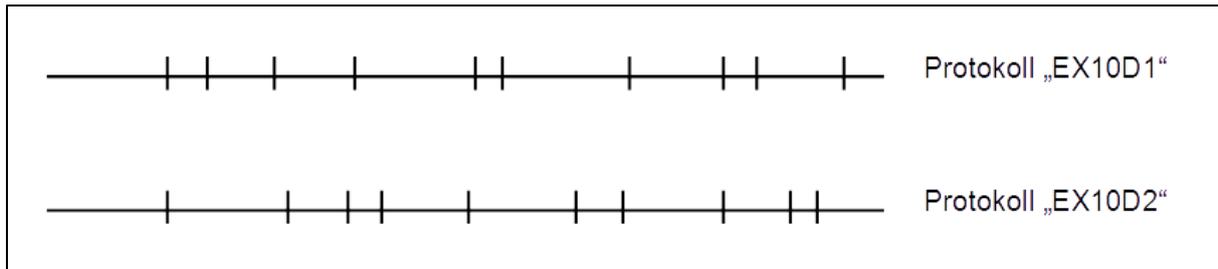


Abbildung 8: Schematische Darstellung der zwei verwendeten Extinktionsprotokolle.

Über einen Zeitraum von insgesamt 1250 s wurden jeweils zehn akustische Signale (Sinuston, 9 kHz, 80 dB, 20 s) in unterschiedlichen Abständen abgespielt, beginnend nach einer Adaptionszeit von 3 Minuten, in welcher lediglich das Licht in der Versuchseinrichtung eingeschaltet war. In der Abbildung entspricht eine Markierung auf der X-Achse jeweils einem akustischen Signal.

2.4.2 Dopaminerge Transmission im mPFC während der Furchtextinktion (In-vivo-Mikrodialyse)

Zur Untersuchung der dopaminergen Transmission im mPFC während der Furchtextinktion wurde die Technik der In vivo-Mikrodialyse verwendet. Aufgrund des besonderen Aufwandes in Kombination mit dem Verhaltensexperiment wurde der Versuch in mehreren Durchgängen mit jeweils vier Versuchstieren durchgeführt. Das Verhaltensprotokoll wurde bei suffizientem Extinktionslernen im Heimkäfig innerhalb von drei Sitzungen im Vgl. zum Vorversuch um einen Tag reduziert, um Komplikationen in der Probengewinnung zu vermeiden.

Operationen: Implantation der Führungskanüle (Tag -7) und der Mikrodialysesonde (Tag -1)

Eine Woche vor Beginn des Versuches erfolgte die unilaterale Implantation (rechts) einer Führungskanüle (MAB4.15.IC, Microbiotech/se AB, Schweden), über die später die Mikrodialysesonde eingeführt wurde. Zur Analgesie wurde den Versuchstieren ca. 45 bis 60 Minuten vor Operationsbeginn Meloxicam (0,5 mg/kg; Metacam®, Boehringer Ingelheim, Deutschland) i.p. injiziert. Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (2 % v/v in O₂; Abbott, Indien) und nach Feststellung der chirurgischen Toleranz erfolgte die Platzierung im Stereotakten (TSE Systems Inc., MO, USA). Die Körpertemperatur wurde während des Eingriffes kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde gemessen und mithilfe eines Heizkissens (Harvard Apparatus, MA, USA) bei 36 °C gehalten. Durch einen ca. 1 cm großen sagittalen Hautschnitt im Bereich der Mittellinie wurde die Kopfhaut eröffnet. Mithilfe des Stereotakts wurden

zunächst die Zielkoordinaten (1,9 mm rostral, 0,35 mm lateral; ausgehend von Bregma) rechtsseitig mit einem feinen Filzschreiber auf der Schädelkallotte markiert. Abbildung 9 zeigt einen Mäuseschädel mit den Schädelnähten und entsprechenden Orientierungspunkten.

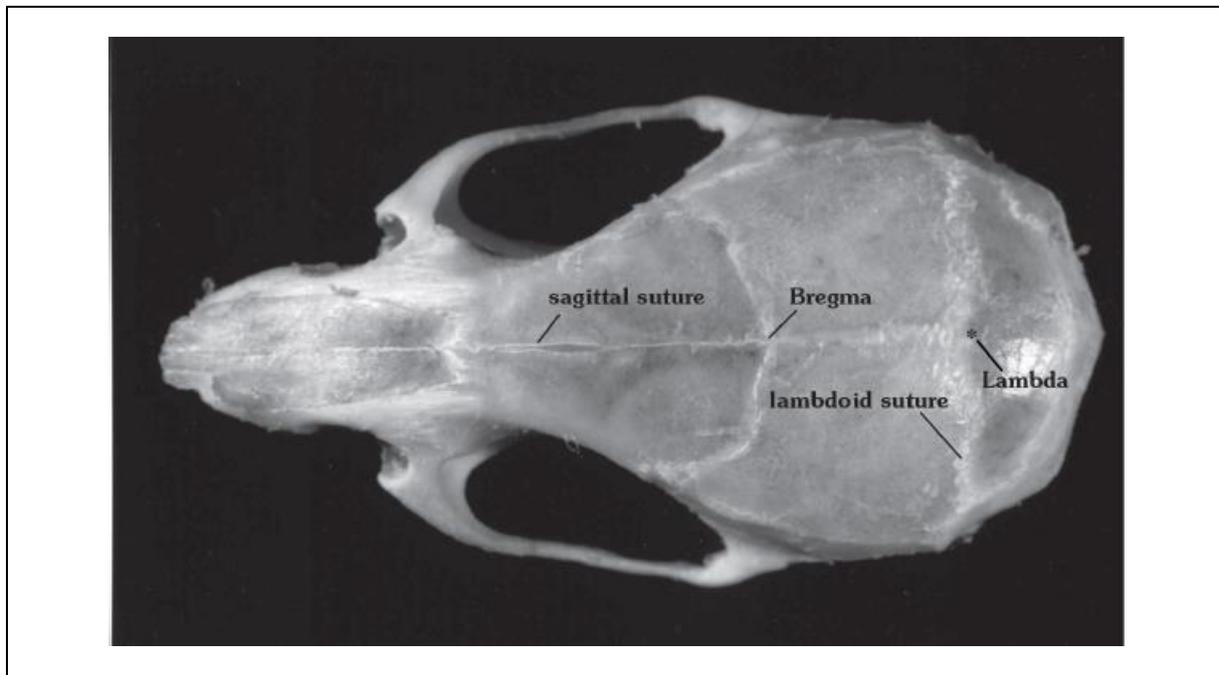


Abbildung 9: Darstellung der Schädelnähte am Mäuseschädel.

Insbesondere Bregma, der Schnittpunkt zwischen Sagittalnaht und Frontalnaht, dient als Orientierungshilfe bei der Implantation von Führungskanülen oder Sonden im Rahmen neurowissenschaftlicher Untersuchungen.

(Paxinos und Franklin, 2001)

Diese waren im Vorfeld anhand anatomischer Aufzeichnungen (Paxinos und Franklin, 2001) ermittelt und durch mehrere Probeingriffe für die Versuchstiere verifiziert worden. Anschließend wurde im Bereich der Markierung ein Loch gebohrt und die Führungskanüle eingebracht (1,5 mm ventral). Die Fixierung erfolgte mittels in den Schädel eingebrachter kleiner Schrauben und Zahnzement (Paladur, Heraeus Kutzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland). Zusätzlich wurde auf Höhe der Mittellinie einige Millimeter hinter der Führungskanüle ein kleines Metallstäbchen mit einem Loch im oberen Drittel angebracht, welches später als Fixierung für einen Metalldraht dienen sollte, der die Bewegung des Tieres auf ein Rotationssystem (Swivel) übertrug und somit ein Verdrehen der Schläuche verhinderte. Die Kopfhaut wurde mit zwei bis drei Einzelknopfnähten adaptiert und die Versuchstiere in die speziellen Mikrodialysekäfige gesetzt. Die Eingriffe dauerten 30 bis 45 Minuten. Zur

postoperativen Analgesie wurde das Trinkwasser der Tiere für weitere drei Tage mit Meloxicam (0,25 mg/100 ml) versetzt, und die Erholungsphase der Tiere täglich verfolgt.

Einen Tag vor der Konditionierung (Tag -1) erfolgte die Implantation der Mikrodialyse-sonde (MAB4.15.2.Cu., Microbiotech SE, Stockholm, Schweden). Zur Vorbereitung der Sonde wurde diese bereits zwei Stunden zuvor über dünne Kunststoffschläuche mit dem afferenten und efferenten Schenkel an das Perfusionssystem angeschlossen und mit der Perfusionslösung durchgespült. Als Perfusionslösung wurde Ringerlösung (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) gewählt, da diese eine ähnliche Ionenzusammensetzung wie die cerebrale Extrazellulärflüssigkeit besitzt und bereits in vorherigen Mikrodialyseversuchen der Forschungsgruppe erfolgreich verwendet wurde. Die nur wenige Minuten dauernde Implantation der Mikrodialyse-sonde wurde in erneuter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Die Perfusion des Mikrodialyse-systems wurde mit einer Flussrate von 0,5 µl/min fortgesetzt. Die Versuchstiere wurden ohne weitere Manipulationen zurück in ihre Mikrodialysekäfige gesetzt. Während dieser Zeit fand keine Probengewinnung statt. Abbildung 10 zeigt eine Übersicht des Mikrodialyseexperiments.

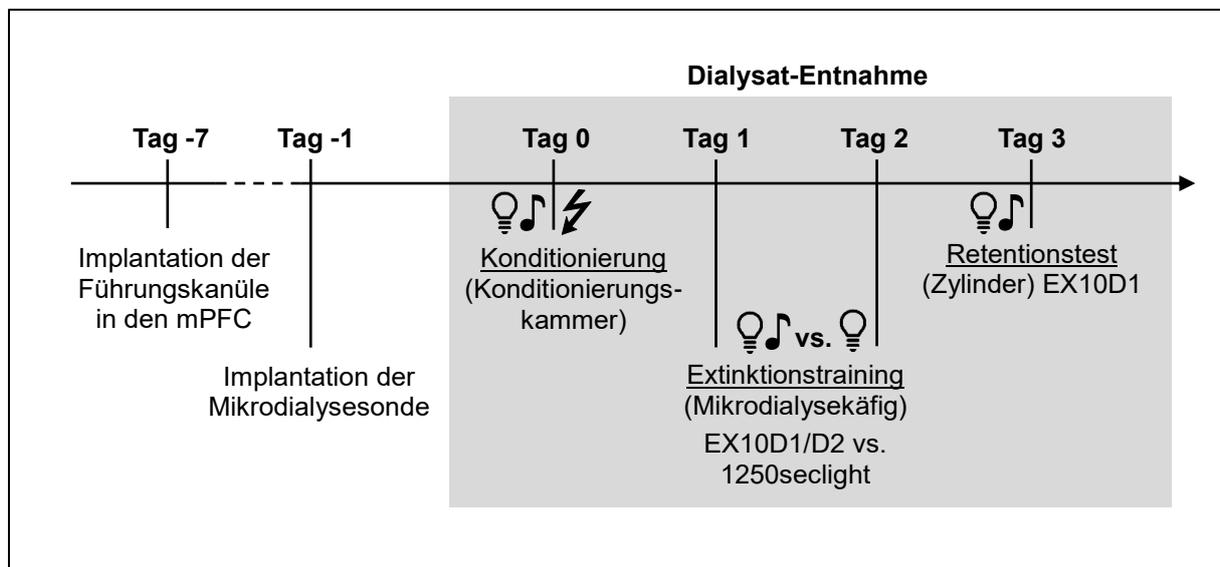


Abbildung 10: Schematische Übersicht über die einzelnen Schritte des Mikrodialyseexperiments.

Eine Woche vor Beginn des kombinierten Mikrodialyse-Verhaltensversuches erfolgte rechtsseitig die Implantation der Führungskanüle (1,9 mm rostral, 0,35 mm lateral, 1,5 mm ventral). Die Implantation der Mikrodialyse-sonde wurde am Tag -1 durchgeführt. Am Konditionierungstag (Tag 0) wurden zunächst drei Basalproben pro Tier entnommen, bevor die CS-US-Konditionierung der Versuchstiere erfolgte. An Tag 0 wurden keine weiteren Proben gewonnen. An den folgenden drei Versuchstagen wurden 3 Basalproben und nach dem Extinktionstraining bzw. nach dem Retentionstest jeweils sieben „stimulierte“ Proben asserviert.

Probengewinnung:

Zu Beginn des Konditionierungstages (Tag 0) wurde zunächst die Flussrate auf 2,0 µl/min gesteigert. Nach zwei Stunden wurde mit der Entnahme der Dialysatproben begonnen. Um das Totvolumen des abführenden Schenkels mit entsprechendem englumigen Mikrodialyseschlauch von 20 µl zu kompensieren, wurde mit der Entnahme der entsprechenden Proben zehn Minuten verzögert begonnen. Von jedem Versuchstier wurden am Konditionierungstag drei Basisproben und an den Versuchstagen 1-3 jeweils zusätzlich sieben „stimulierte“ Fraktionen im zeitlichen Abstand von je 20 Minuten gewonnen. Die Sammelgefäße (Vial Plastic 300 µl; CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden) befanden sich in einem automatischen, kühlenden Probeannahmegerät (Univentor 820 Microsampler, Univentor, Malta). Nach Beendigung der Verhaltensversuche wurde die Perfusor-Laufrate bis zum Folgetag auf 0,5 µl/min reduziert. Die entnommenen Proben wurden zunächst bei -80 °C gelagert und innerhalb der nächsten zwei bis drei Wochen analysiert. Die Probengewinnung wird in Abbildung 11 detailliert dargestellt.

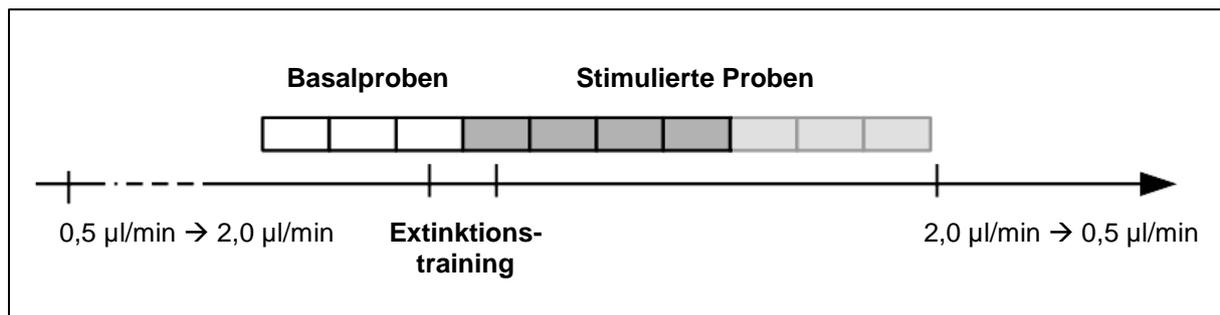


Abbildung 11: Probengewinnung der Mikrodialyse an den Versuchstagen 1-3.

An der x-Achse sind die Laufgeschwindigkeiten der Perfusoren, über welche die Mikrodialysesonden mit Ringerlösung perfundiert wurden, sowie der Zeitraum des Extinktionstrainings vermerkt. Die Perfusionsrate wurde zur Probengewinnung zwei Stunden vor Beginn erhöht und nach Gewinnung der letzten Probe wieder auf die Basislaufgeschwindigkeit reduziert. Die Mikrodialysatproben wurden im zeitlichen Abstand von 20 Minuten gewonnen. Entsprechend des geschätzten Totvolumens des abführenden Schlauchsystems (ca. 20 µl) wurde mit dem Verhaltensversuch 10 Minuten vor Sammelbeginn der ersten „stimulierten“ Probe begonnen, um hier eine korrekte zeitliche Korrelation zu erreichen. Von den ursprünglich 10 gesammelten Dialysaten pro Versuchstier gingen lediglich die ersten 7 Proben in die statistische Analyse ein, da es vereinzelt zu Probenausfällen kam und so eine statistische Auswertung nicht sinnvoll möglich gewesen wäre.

Verhaltensversuch:

Das Verhaltensexperiment wurde simultan zur Mikrodialyse durchgeführt. Wie bereits im Vorversuch wurden die Tiere zuvor in zwei Gruppen eingeteilt, die an den Versuchstagen 1-3 entweder ein Extinktionstraining mit je zehn Tonpräsentationen

(10 x 20 s Sinuston, 9 kHz, 80 dB; alternierend Protokoll „EX10D1“ und „EX10D2“) oder eine konstante Lichtpräsentation (Protokoll „1250seclight“) in ihren Mikrodialysenkäfigen erhielten.

Probenanalyse:

Die Analyse der gewonnenen Mikrodialysatproben erfolgte mittels HPLC. Dabei wurden die Konzentrationen von DA elektrochemisch detektiert.

HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren, mit denen Substanzen nicht nur getrennt, sondern auch über Standards identifiziert und quantifiziert werden können. Die Apparatur besteht aus folgenden Hauptkomponenten: Pumpe, Injektor, Entgaser, Trennungssäule, Temperaturregler, Detektor und einem Rechnersystem zur Datenverarbeitung. Außerdem wird ein Eluent (mobile Phase) benötigt – eine flüssige Substanz als Laufmittel.

Die verwendeten Komponenten und Einstellungen sind in Abbildung 12 aufgelistet. Zur Analyse wurde jeweils ein Injektionsvolumen von 20 µl verwendet. Die Detektionsgrenze für DA lag bei 0,02 pg/µl (0,18 nM). Die Retentionszeit betrug 5,5 Minuten.

Pumpe:	Sunflow 100 (SunChrom, Germany)
Entgaser:	Degasys Populaire
Schwingungsdämpfer:	SS1 Pulse Damper
Filter:	Nylonfilter 0,22 µm
Trennsäule:	YMC PackPRO C18 (150 mm x 3,3 mm, Partikelgröße 3 µm; YMC Europe GmbH, Schermbeck, Deutschland)
Detektor:	Decade (Antec Leyden, Zoeterwoude, Niederlande)
Detektionspotential:	+650 mV gegen Ag/AgCl-Elektrode
Flussrate:	0,6 ml/min
Eluent:	0,09 M Natriumphosphat, 0,05 M Natriumcitrat, 1,7 mM Natriumoctansulfat, 0,05 mM Na ₂ -EDTA, 10 % Acetonitril (v/v), 10 M NaOH pH 3,0

Abbildung 12: Verwendete HPLC-Komponenten und Einstellungen.

2.4.3 Einfluss einer transienten, pharmakologischen Inaktivierung von D1/D2-Rezeptoren im mPFC auf die Extinktion konditionierter Furcht

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Dopamin im mPFC auf die Extinktion konditionierter Furcht wurden nachfolgend unilaterale Mikroinjektionsversuche mit SCH-23390-Hydrochlorid und Sulpirid in neuen Gruppen von Tieren durchgeführt.

Die Stammlösungen (1 mg/ml) wurden bei -20 °C aufbewahrt. Als D2-Rezeptor-antagonist wurde 1 mg (RS)-(\pm)-Sulpiride (Tocris Bioscience, United Kingdom) in 10 μ l Essigsäure 1 % gelöst und später mit steriler Kochsalzlösung auf die benötigte Konzentration verdünnt. Der D1-Rezeptor-Antagonist R(+)-SCH-23390-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurde direkt in Kochsalzlösung gelöst.

Operation: unilateral Implantation der Führungskanülen (Tag -7)

Die Implantation der Mikroinjektionskanülen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Implantation der Mikrodialyseführungskanülen. Dazu wurden durch die institutseigene Werkstatt silikonisierte, rostbeständige Stahlkanülen angefertigt (Länge 10 mm, Außendurchmesser 0,46 mm, Innendurchmesser 0,3 mm), die vor der Implantation mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert wurden. Die Implantation erfolgte ebenfalls in der rechten Hemisphäre (Koordinaten: 1,9 mm rostral, 0,35 mm lateral, 2,0 mm ventral). Wie auch die Mikrodialysekanülen wurden diese mit Zahnzement am Schädel fixiert, allerdings entfiel das zusätzliche Anbringen eines Metallstäbchens zur Fixierung des Metalldrahtes (s.o.). Um Okklusionen vor Beginn des Verhaltensexperimentes zu vermeiden wurde direkt nach Implantation der Führungskanüle ein passender Stahldraht (Durchmesser 0,2 mm) eingeführt. Die Tiere verblieben anschließend für sieben Tage ohne weitere Manipulationen zur Erholung in ihren Heimkäfigen. Zur Analgesie wurde lediglich das Trinkwasser der Tiere in den ersten drei Tagen mit Metacam (0,25 mg/100 ml) versetzt. Abbildung 13 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Schritte des Mikroinjektionsversuches.

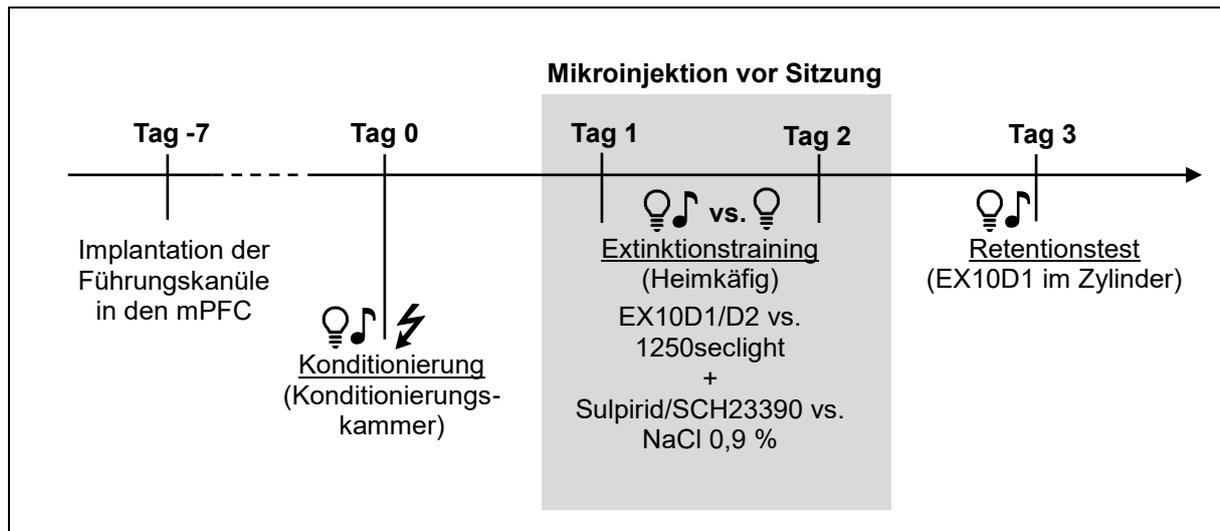


Abbildung 13: Schematische Übersicht über die einzelnen Schritte der Mikroinjektionsversuche.

Eine Woche vor Beginn des Verhaltensversuches wurde ebenfalls im Bereich der rechten Hemisphäre eine Führungskanüle (1,9 mm rostral, 0,35 mm lateral, 2,0 mm ventral) implantiert. An Tag 0 erfolgte die Konditionierung aller Versuchstiere, an den Versuchstagen 1 und 2 entsprechend der Randomisierung der Versuchstiere das Extinktionstraining. 25 bis 30 Minuten vor Beginn der Sitzung wurde den Tieren unilateral ein Dopaminrezeptorantagonist oder NaCl 0,9 % injiziert.

Versuchsdurchführung: Konditionierung (Tag 0) und Extinktionstraining (Tag 1-2)

Alle Versuchstiere wurden zu Beginn des Verhaltensversuches (Tag 0) mit einem Sinuston (20 s, 9 kHz, 80 dB) als CS und einem koterminierten Fußschock (2 s, 0,7 mA) als US konditioniert.

An den folgenden Versuchstagen 1 und 2 erfolgte 25 bis 30 Minuten vor Beginn des Extinktionstrainings je nach Versuchsgruppe die unilaterale Injektion der DA-rezeptorantagonistenlösung (0,5 mg/0,5 µl) oder Kochsalzlösung. Für die zwei bis drei Minuten andauernde Prozedur wurden die Versuchstiere inhalativ mit Isofluran sediert. Die Injektion wurde mithilfe einer Mikroliterspritze (65RNR 5,0 µl SYR, Hamilton Bonaduz AG, Switzerland) durchgeführt, welche mittels eines Schlauchsystems mit der Injektionskanüle (Außendurchmesser 0,26 mm) verbunden war. Diese wurde in die Führungskanüle eingeführt. Das Ende der Injektionskanüle reichte dabei 1 mm tiefer in das Gewebe, sodass der mPFC als Zielstruktur erreicht wurde. Über 45 bis 60 Sekunden wurden dann 0,5 µl der Injektionslösung manuell appliziert. Die Injektionskanüle wurde anschließend für weitere 60 Sekunden in dieser Position belassen, um eine vollständige Diffusion zu ermöglichen. Die Versuchstiere wurden zurück in ihre Heimkäfige gesetzt, wo sie nach ein bis zwei Minuten wieder zu Bewusstsein kamen.

Nach Gebrauch wurden die Mikrospritzen sorgfältig mit Ethanol 70 % und destillierten Wasser gespült, bevor diese erneut verwendet wurden. Für die Injektion der Dopaminrezeptorantagonisten- und der Kochsalzlösung wurden unterschiedliche Spritzen benutzt.

Nach erfolgter Injektion und kurzer Rehabilitation wurden die Versuchstiere entsprechend ihrer zuvor erfolgten Randomisierung entweder einem Extinktionstraining mit Licht- und Tonpräsentation (täglich abwechselnd Protokoll „EX10D1“ und EX10D2“) unterzogen oder lediglich einer Lichtpräsentation von gleicher Zeitdauer („1250seclight“). Am letzten Versuchstag (Tag 3) wurde als Retentionstest das Extinktionsprotokoll „EX10D1“ bei allen Versuchstieren im Zylinder ohne vorhergehende Mikroinjektionen durchgeführt.

2.5 Histologische Kontrolle

Zur Lagekontrolle der Mikrodialysesonden bzw. der Mikroinjektionen wurden nach Beendigung des entsprechenden Experiments Hirnschnitte angefertigt und mikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Mäuse nach Abschluss des Versuches zunächst mit Isofluran tief sediert und dekaptiert. Das Gehirn wurde sorgfältig präpariert und in gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren. Anschließend wurden die Präparate bei -80 °C gelagert. Die Gehirne wurden im gefrorenen Zustand an einem Kryostaten geschnitten. Die 40 µm dünnen Koronarschnitte wurden manuell auf Objektträger (SuperFrost®Plus; Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und anschließend mit Kresylviolett angefärbt (Nisslfärbung). Orientierungshilfe für die Anfertigung und Sammlung der Hirnschnitte waren dabei zum einen die makroskopisch sichtbaren Strukturen, zum anderen die von außen erkennbaren Einstichstellen der Führungskanülen.

Die Hirnschnitte wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop untersucht. Versuchstiere mit nicht korrekt platzierten Führungskanülen oder Mikrodialysesonden wurden von den weiteren Datenanalysen ausgeschlossen. Bezüglich der Mikrodialysedaten fanden sich keine signifikanten Unterschiede der basalen DA-Konzentrationen in Abhängigkeit der Sondenposition innerhalb der mPFC-Subregionen. In Abbildung 14 sind die Positionen der Mikrodialysesonden und Mikroinjektionskanülen eingezeichnet.

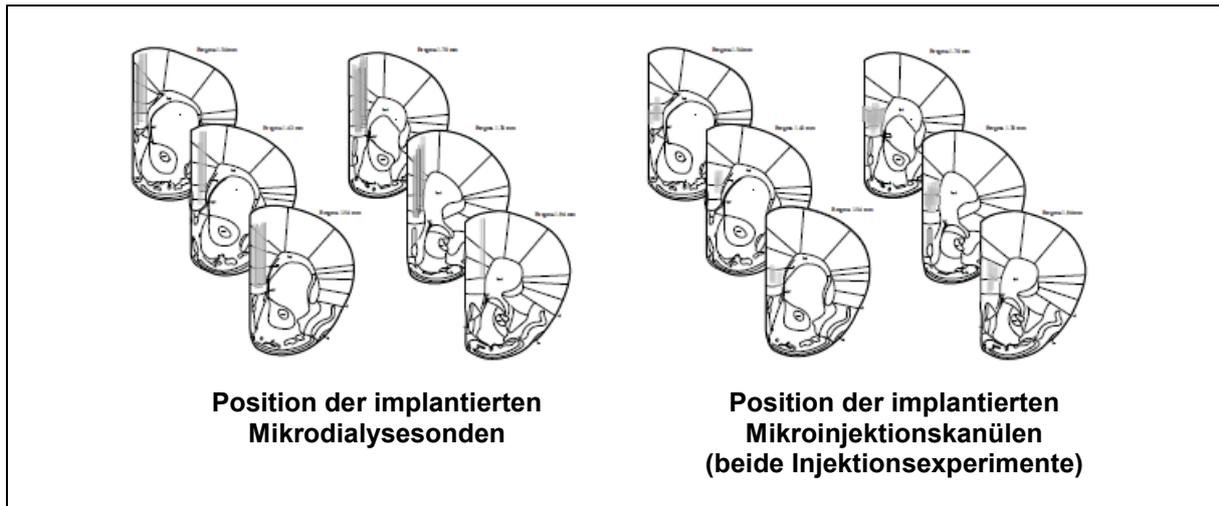


Abbildung 14: Intra-PFC Sonden-/Kanülenposition für die Mikrodialyse- und Mikroinjektionsversuche.

Dargestellt sind die jeweiligen Positionen der Mikrodialyse-sonden bzw. der Führungskanülen für die Mikroinjektionen in koronaren Schnitten, basierend auf dem Computer-basierten Atlas von Paxinos und Franklin (2001).

2.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mittels SPSS Software (PC-Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ definiert.

Die originalen HPLC-Daten wurden mittels Clarity Software (Version 2.8.2.648, DataApex Ltd, Tschechische Republik) ausgewertet. Die Veränderungen der DA-Basalkonzentrationen wurden mit einer 2-Weg-ANOVA (Analysis of Variance, Varianzanalyse; Tag, Ton) evaluiert, die assoziiert mit den Extinktionssitzungen erhobenen DA-Daten wurden standardisiert und als prozentuale Veränderung ausgehend von dem jeweiligen Grundwert pro Tier und Versuchstag (= 100 %) dargestellt. Der Grundwert wurde hierbei aus den drei Basalwerten, welche vor den Extinktionssitzungen ermittelt wurden, berechnet. Da es vereinzelt zu Probenausfällen kam, wurden die Basalwerte teilweise extrapoliert, d.h. für die fehlenden Messwerte wurde für die weiteren Analysen ein Wert von 100 % angenommen. Die Darstellung und statistische Auswertung der DA-Veränderungen erfolgten als prozentuale Abweichung ausgehend von dem jeweiligen Basalwert des jeweiligen Versuchstages.

Zur Auswertung der Verhaltensdaten der Mikroinjektionsversuche wurde für die erste Tonpräsentation zur Darstellung der Langzeitextinktion eine 2-Weg-ANOVA (Behandlung, Protokoll) durchgeführt, da diese das eigentliche Extinktionslernen über die verschiedenen Versuchstage (*Between-Session-Extinction*) ohne Interferenz mit einer Answerermüdung während des Extinktionstrainings (*Within-Session-Extinction*) am besten abbildet (Plendl und Wotjak, 2010).

3 Ergebnisse

Ziel der durchgeführten Versuche war es festzustellen, ob und über welche Rezeptoren DA im mPFC an der Extinktion konditionierter Furcht beteiligt ist. Zudem sollte untersucht werden, ob das Extinktionslernen mit der Ausprägung der DA-Transmission korreliert.

3.1 Extinktion im Heimkäfig

Im Vorfeld der Hauptversuche wurde zur Etablierung eines geeigneten Extinktionsprotokolls ein Verhaltensexperiment durchgeführt, welches die Furchtextinktion im Heimkäfig untersuchte, um herauszufinden, ob in der gewohnten, vermeintlich sicheren Umgebung auch ein Extinktionslernen erfolgen kann. Hierzu wurden drei Versuchsgruppen untersucht: zum einen wurde der Heimkäfig-Extinktionsgruppe, welche an den ersten drei Tagen ein Extinktionstraining im Heimkäfig erhielt, eine entsprechende Heimkäfig-Kontrollgruppe gegenübergestellt, welche in diesem Zeitraum lediglich einer Lichtpräsentation ausgesetzt war. Um das Extinktionslernen im Vgl. zu dem üblichen Extinktionsprotokoll, in dem das Extinktionstraining im Zylinder stattfindet, zu überprüfen, wurde als drittes die Zylinder-Extinktionsgruppe eingeführt. Mithilfe des vorliegenden Experiments konnte bewiesen werden, dass die Extinktion konditionierter Furcht bei Mäusen auch in der gewohnten Umgebung möglich ist. Die beiden Extinktionsgruppen zeigten nach entsprechender Furchtkonditionierung (Tag 0) eine initial hohe Immobilitätsrate bei den Tonpräsentationen an Versuchstag 1 mit einer darauffolgenden, adäquaten Abnahme an den folgenden Versuchstagen. Im Vergleich dazu zeigte die Kontrollgruppe an den ersten drei Versuchstagen ohne Tonpräsentationen kaum Immobilität. Beim Retentionstest an Tag 4, der für alle Versuchsgruppen im Zylinder stattfand, trat bei diesen Tieren erwartungsgemäß ein deutliches Freezingverhalten auf. Diese Zunahme der Immobilität konnte bei den anderen zwei Versuchsgruppen, die an den vorherigen Tagen ein Extinktionstraining erhalten hatten, nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse stellen sich im Detail wie folgt dar und sind graphisch in Abbildung 15 veranschaulicht:

Am ersten Versuchstag waren mittels 2-Weg-ANOVA ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Protokoll: $F_{2,26} = 76,49$, $p < 0,001$) und eine signifikante Änderung des Immobilitätsverhaltens über die zehn

Tonpräsentationen (Zeit: $F_{9,234} = 5,21$, $p < 0,001$) nachweisbar. Eine statistisch signifikante Protokoll-Zeit-Interaktion bestand nicht (Protokoll x Zeit: $F_{18,234} = 0,97$, $p = 0,50$). Insgesamt zeigten beide Extinktionsgruppen ein erhöhtes Immobilitätslevel mit einer ähnlichen Abnahme über den Verlauf der Tonpräsentationen (*Within-Session-Extinction*). Bei der Kontrollgruppe war keine Immobilität zu beobachten.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch an den folgenden zwei Versuchstagen. Am zweiten Versuchstag waren sowohl ein Unterschied zwischen den Gruppen (Protokoll: $F_{2,23} = 12,73$, $p < 0,001$), als auch ein Zeiteffekt (Zeit: $F_{9,207} = 2,98$, $p = 0,002$) statistisch signifikant, am dritten Versuchstag lediglich der Zeiteffekt (Zeit: $F_{9,243} = 5,43$, $p < 0,001$; Protokoll: $F_{2,27} = 3,24$, $p = 0,055$). Im Gegensatz zum ersten Versuchstag waren die Ergebnisse für die Protokoll-Zeit-Interaktion an diesen Tagen statistisch hochsignifikant (Protokoll x Zeit: Tag 2: $F_{18,207} = 3,88$, $p < 0,001$; Tag 3: $F_{18,243} = 2,65$, $p < 0,001$). Bei den beiden Extinktionsgruppen war an diesen Versuchstagen ein unterschiedlicher Verlauf ihres Immobilitätsverhaltens mit einer deutlichen Zunahme in der Heimkäfiggruppe zum Ende der Sitzung zu beobachten. Hierbei handelte es sich jedoch nicht eindeutig um Freezingverhalten. Freezing-typische Begleitreaktionen wie z.B. intermittierende schreckhafte Bewegungen oder eine erhöhte Atemfrequenz fehlten und die Immobilität bestand auch zwischen den Tonpräsentationen fort. Aufgrund dessen sind für dieses Verhalten auch andere Mechanismen, wie z.B. Habituationsprozesse mit verminderter Wachsamkeit, zu diskutieren. Das gleiche Verhalten war bei der Kontrollgruppe zum Ende der Sitzung an Tag 3 zu beobachten. Wie auch in Abbildung 15 ersichtlich, ist eine Unterscheidung dieser Immobilität gegenüber dem Freezingverhalten mit der gewählten Auswertungsmethode nicht eindeutig möglich.

Der vierte Versuchstag diente der Überprüfung des Extinktionslernen (Retentionstest). Sowohl die Verhaltensunterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Protokoll: $F_{2,27} = 37,65$, $p < 0,001$), als auch der Zeiteffekt (Zeit: $F_{9,243} = 5,00$, $p < 0,001$) und die Interaktion zwischen Tonpräsentationen und Versuchsgruppen (Protokoll x Zeit: $F_{18,243} = 5,64$, $p < 0,001$) waren statistisch signifikant. Die Extinktionsgruppen zeigten gemäß einem erfolgreichen Extinktionslernen ein ähnlich geringes Immobilitätsverhalten, während die Kontrollgruppe erwartungsgemäß initial ein starkes Freezingverhalten mit deutlicher *Within-Session-Extinction* präsentierte.

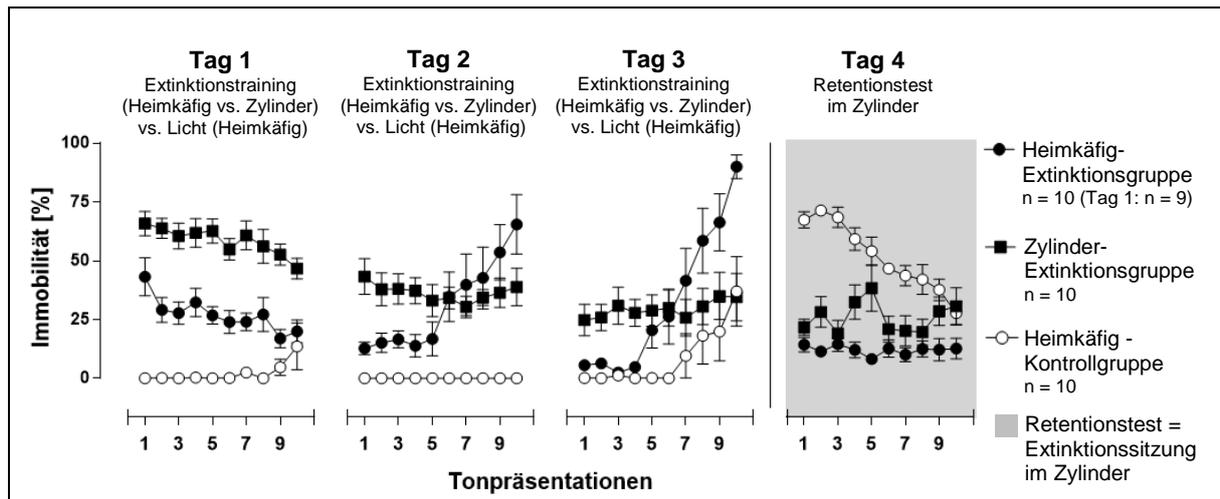


Abbildung 15: Heimkäfigextinktion an den Versuchstagen 1-4 (*Within- und Between-Session-Extinction*).

Dargestellt sind die Immobilitätsraten der Heimkäfig- und Zylinder-Extinktionsgruppen sowie der Kontrollgruppe während den einzelnen Ton- und Lichtpräsentationen (Heimkäfig- und Zylinder-Extinktionsgruppe an den Tagen 1-3, alle Gruppen an Tag 4) bzw. nur der Lichtpräsentation (Kontrollgruppe an den Tagen 1-3). Die Immobilität wurde in Relation zu dem jeweiligen Beobachtungsintervall (20 s) gesetzt (%). Im Retentionstest ist das erfolgreiche Extinktionslernen deutlich zu sehen: beide Extinktionsgruppen zeigen ein deutlich niedrigeres Immobilitätslevel als zu Beginn des Experimentes (*Between-Session-Extinction*), während die Kontrollgruppe eine hohe Immobilitätslevel mit Abnahme innerhalb der Sitzung (*Within-Session-Extinction*, vgl. auch Extinktionsgruppen an Tag 1) aufweist.

(Statistik siehe Text)

Abbildung 16, welche die Immobilität während der jeweils ersten Tonpräsentation an den verschiedenen Versuchstagen darstellt (*Between-Session-Extinction*), verdeutlicht das Extinktionslernen der unterschiedlichen Versuchsgruppen nochmals. Die statistische Analyse der Verhaltensdaten ergab hierbei signifikante Ergebnisse für die Versuchsgruppen (Protokoll: $F_{2,22} = 5,45$, $p = 0,012$), den Zeiteffekt ($F_{3,66} = 11,67$, $p < 0,001$) und die Ton-Gruppen-Interaktion (Protokoll x Zeit: $F_{6,66} = 12,78$, $p < 0,001$).

Durch das Experiment konnte bewiesen werden, dass ein Extinktionslernen konditionierter Furcht auch in einer gewohnten Umgebung möglich ist und dieses Versuchsprotokoll somit für die Folgeversuche verwendet werden konnte.

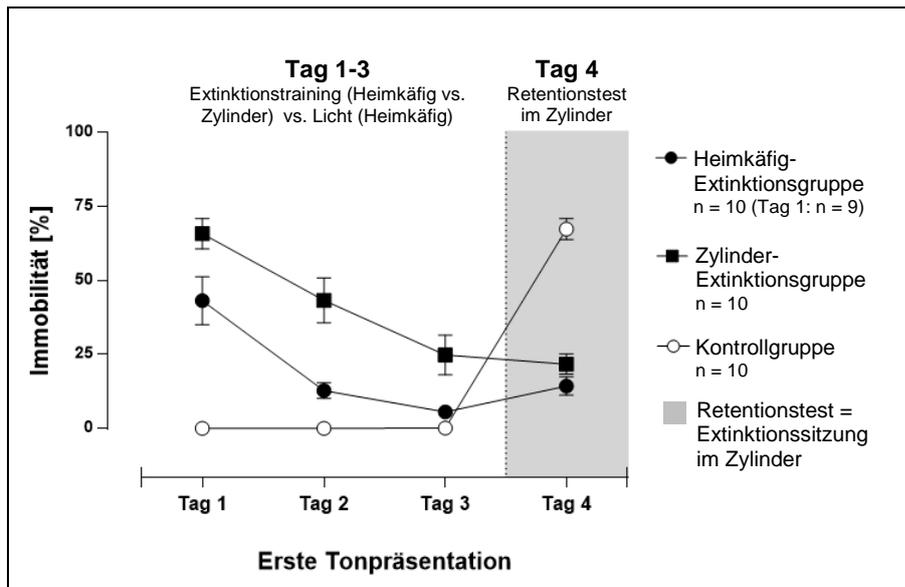


Abbildung 16: Immobilität während der jeweils ersten Tonpräsentation (*Between-Session-Extinction*)

Darstellung der Immobilität als prozentualer Anteil im Beobachtungsintervall (20 s) während der jeweils ersten Ton-Lichtpräsentation (Extinktionsgruppen an den Tagen 1-3, alle Gruppen an Tag 4) bzw. äquivalent der Lichtpräsentation (Kontrollgruppe an den Tagen 1-3). Hier wird das Extinktionslernen bei den Extinktionsgruppen mit einer schrittweisen Abnahme der Immobilität von Tag zu Tag (*Between-Session-Extinction*) besonders deutlich.

(Statistik siehe Text)

3.2 Dopamin im mPFC während der Furchtextinktion (*In-vivo-Mikrodialyse*)

Nachdem im Vorexperiment ein adäquates Extinktionslernen im Heimkäfig nachgewiesen werden konnte, wurde in gleicher Vorgehensweise das Mikrodialyseexperiment zur Bestimmung der extrazellulären DA-Transmission während der Furchtextinktion durchgeführt. Allerdings wurde bei bereits deutlichem Extinktionseffekt ab dem zweiten Versuchstag das Protokoll um einen Tag gekürzt, um Fehlmessungen aufgrund technischer Probleme, wie z.B. bei perifokalen Narbenbildungen oder Okklusionen, zu vermeiden.

Die Gesamtanalyse der Basisproben ergab, dass die Dopaminkonzentration von Tag zu Tag sowohl in der Extinktionsgruppe als auch der Kontrollgruppe leicht anstieg. Die Mittelwerte variierten dabei von 0,38 nM (Tag 0) bis 0,56 nM (Tag 3). Dabei zeigte sich in der statistischen Analyse mittels 2-Weg-ANOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Statistik nicht dargestellt). Ausgehend von den mittleren Basalwerten des jeweiligen Versuchstages wurden die weiteren Analysen und graphischen Abbildungen als prozentuale Veränderungen aufgearbeitet.

Aufgrund fehlender Ergebnisse für einige Basalproben wurde vereinzelt eine Extrapolation der Basalwerte für die weitere Analyse vorgenommen.

Abbildung 17 stellt die prozentualen DA-Veränderungen an den Tagen 1-3 dar. In beiden Versuchsgruppen gingen die Extinktionssitzungen bzw. die Lichtpräsentationen mit einer extrazellulären Akkumulation von Dopamin einher. Mittels 2-Weg-ANOVA (Zeit, Gruppe) konnte am ersten Versuchstag eine signifikante Veränderung des DA-Levels über die Zeit nachgewiesen werden (Zeit: $F_{6,54} = 9,628$, $p < 0,0001$). Die extrazelluläre DA-Konzentration stieg dabei direkt während des Extinktionstrainings um ca. 40 % an, um anschließend sukzessive auf das Ausgangsniveau zurückzukehren. Dieser Effekt war bei beiden Versuchsgruppen zu beobachten, wobei die DA-Konzentration bei der Kontrollgruppe, die lediglich eine Lichtpräsentation erhielt, für ca. eine Stunde erhöht blieb und erst dann abfiel. Statistisch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Protokoll: $F_{1,9} = 0,7433$, $p = 0,4110$; Zeit x Protokoll: $F_{6,54} = 1,5$, $p = 0,1957$). Am zweiten Versuchstag zeigte sich in beiden Versuchsgruppen lediglich die Tendenz eines DA-Anstieges während des Extinktionstrainings bzw. der Lichtpräsentation ohne statistische Signifikanz (Zeit: $F_{3,34} = 2,189$, $p = 0,0998$; Protokoll: $F_{1,10} = 0,08688$, $p = 0,7742$; Zeit x Protokoll: $F_{6,60} = 0,3863$, $p = 0,8850$). Am dritten Versuchstag war bei beiden Versuchsgruppen während der Tonpräsentationen im Zylinder erneut ein statistisch signifikanter DA-Anstieg (Zeit: $F_{3,23} = 6,156$, $p = 0,0024$) zu beobachten. Bei der Extinktionsgruppe war dieser mit ca. 60 % etwas stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, bei der ein leicht verzögerter Anstieg auf ca. 30 % des Basalwertes zu beobachten war. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Protokoll: $F_{1,7} = 0,4537$, $p = 0,5222$; Zeit x Protokoll: $F_{6,42} = 1,687$, $p = 0,1480$).

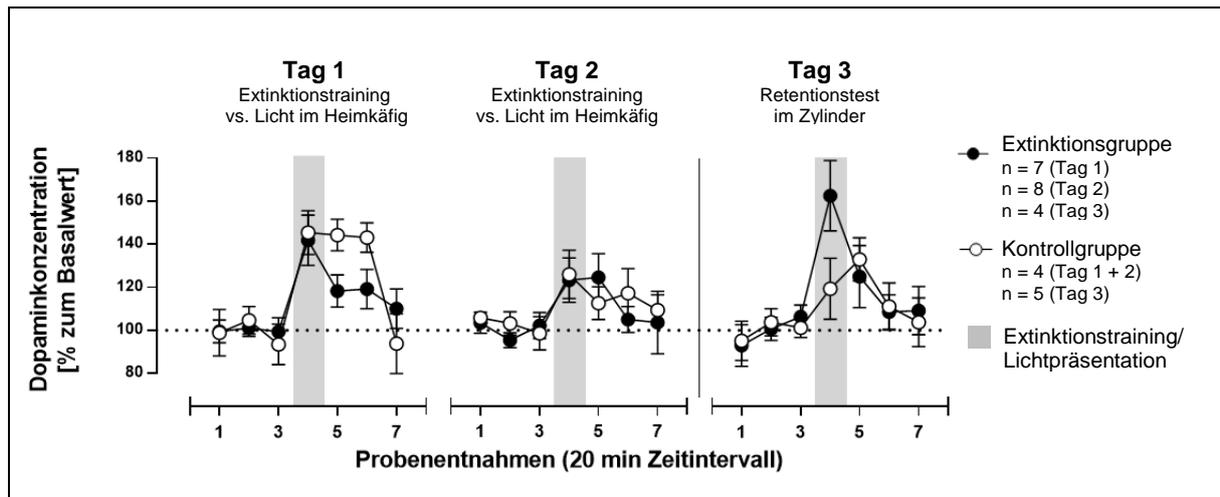


Abbildung 17: Prozentuale Veränderungen der extrazellulären DA-Konzentration an den Tagen 1-3.

Dopaminkonzentrationen in den Mikrodialysaten aus dem mPFC bezogen auf die mittleren Basalwerte des jeweiligen Versuchstieres am entsprechenden Versuchstag (gestrichelte Linie). Grau unterlegt sind die jeweiligen Zeitintervalle der Extinktionssitzungen (Extinktionsgruppe an den Tagen 1-2, beide Gruppen an Tag 3) bzw. Lichtpräsentationen (Kontrollgruppe an den Tagen 1-2). Die Mikrodialyseproben (je ca. 40 µl) wurden jeweils im Abstand von 20 Minuten für die spätere Analyse asserviert.

(Statistik siehe Text)

3.3 Intra-mPFC-Sulpirid-Effekt auf die Furchtextinktion

Bei der Auswertung der Verhaltensdaten des Sulpirid-Versuches fiel auf, dass die Tiere, welche an den ersten beiden Versuchstagen ca. 30 Minuten vor Beginn des Experimentes eine Mikroinjektion mit Sulpirid in den rechten mPFC erhielten, eine hohe Immobilität zeigten – und zwar (v.a. am zweiten Versuchstag) unabhängig von der Extinktionsbehandlung sowohl bei der Sulpirid-Extinktionsgruppe als auch der Sulpirid-Kontrollgruppe. Diese Beobachtung ist am ehesten durch einen unspezifischen Substanzeffekt, welcher generell die Aktivität der Tiere beeinträchtigt hat, zu werten. Eine eindeutige Differenzierung zwischen Immobilität ausgelöst durch konditionierte Furcht und der Bewegungslosigkeit durch eine eingeschränkte Lokomotion ist dabei nicht möglich. Die Beurteilung der Furchtexpression und Furchtextinktion ist daher unter Sulpirid-Behandlung nicht zuverlässig möglich, weshalb auf eine statistische Analyse verzichtet wurde.

Am dritten Versuchstag erfolgte ohne vorherige Injektion der Retentionstest im Zylinder, bei welchem alle Versuchsgruppen gemäß dem Extinktionsprotokolls Licht- und Tonpräsentationen erhielten. Hierbei sollte überprüft werden, ob die Sulpiridinjektionen an den vorherigen Tagen einen Einfluss auf die Langzeitextinktion

haben. Beide Extinktionsgruppe zeigten eine im Vgl. zu den Kontrollgruppen geringere Immobilität i.S. einer erfolgreichen *Between-Session-Extinction*, wobei zwischen den beiden Extinktionsgruppen und zwischen den Kontrollgruppen jeweils kein wesentlicher Unterschied zu beobachten war. Bei allen Versuchstieren trat eine Abnahme der Immobilität innerhalb der Extinktionsitzung i.S. einer *Within-Session-Extinction* auf. Abbildung 18 spiegelt den detaillierten Verlauf des Immobilitätsverhaltens wider:

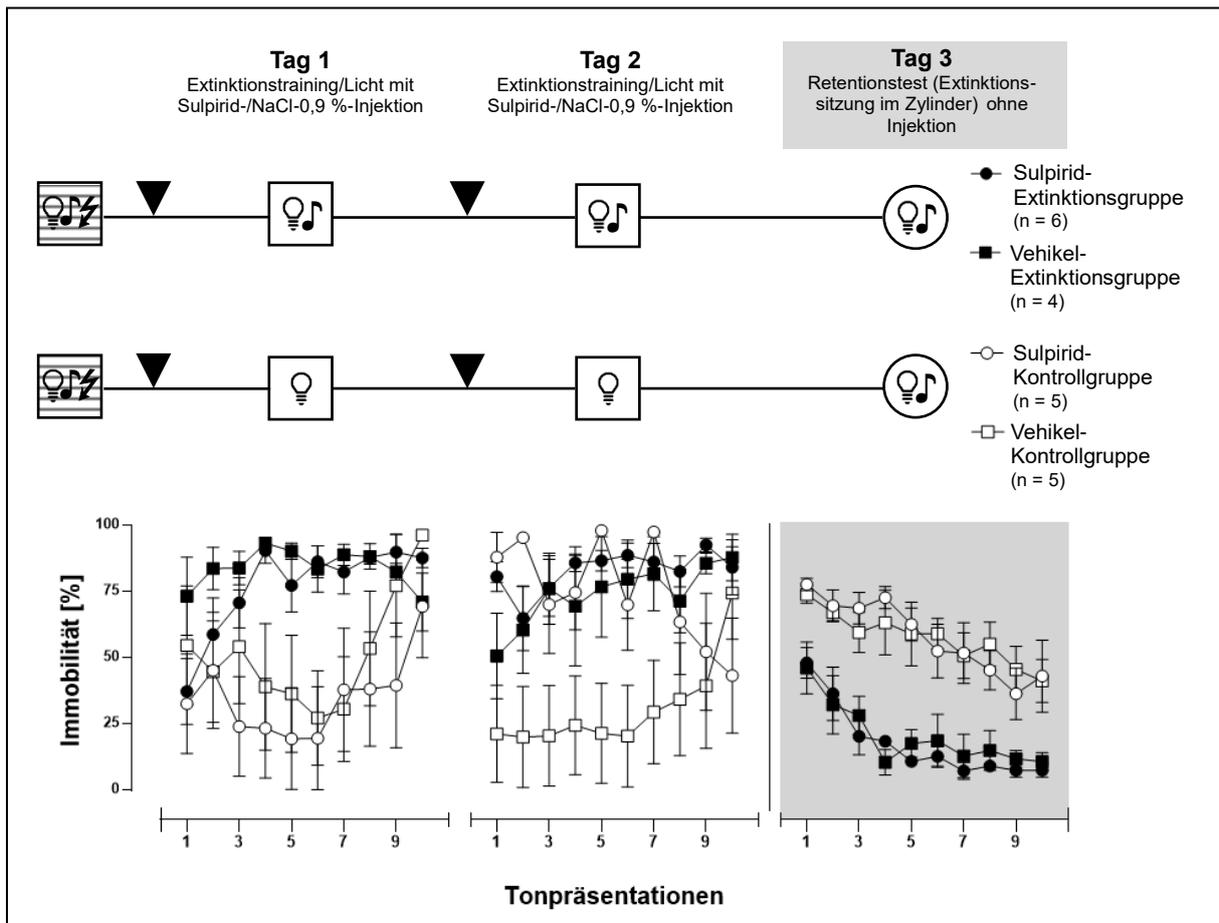


Abbildung 18: Furchtextinktion (Tag 1-3) unter unilateraler intra-mPFC Sulpirid-Injektion (Tag 1 und 2).

Übersicht über das Immobilitätsverhalten der Extinktions- und Kontrollgruppen während dem Extinktionstraining/der Lichtpräsentation unter Sulpirid- bzw. NaCl-0,9 %-Injektion 30 Minuten vor Testbeginn an den Tagen 1 und 2 sowie während des injektionsfreien Retentionstests an Tag 3. Wie bereits zuvor wurde die Immobilität in Relation zu dem jeweiligen Beobachtungsintervall (20 s) gesetzt. Auffällig ist die deutlich erhöhte Immobilitätsrate beider Sulpiridgruppen an Tag 2. Im Retentionstest zeigten beide Extinktionsgruppen ein suffizientes Extinktionslernen ohne Hinweis auf eine Beeinträchtigung durch die Substanzinjektion an den vorherigen beiden Tagen.

(Statistik nicht gezeigt)

Abbildung 19 zeigt das Immobilitätsverhalten während der jeweils ersten Tonpräsentation an den Versuchstagen 1-3. Bezogen auf die erste Freezingantwort

am Tag des Retentionstests (*Between-Session-Extinction*) ergab die Analyse mittels 2-Weg-ANOVA am dritten Versuchstag einen statistisch signifikanten Effekt der Extinktionsbehandlung (Protokoll: $F_{1,16} = 25,620$; $p < 0,001$) und keine statistisch nachweisbare Wirkung der Sulpirid-Injektionen (Behandlung: $F_{1,16} = 0,220$, $p = 0,645$; Behandlung x Protokoll: $F_{1,16} = 0,026$, $p = 0,873$).

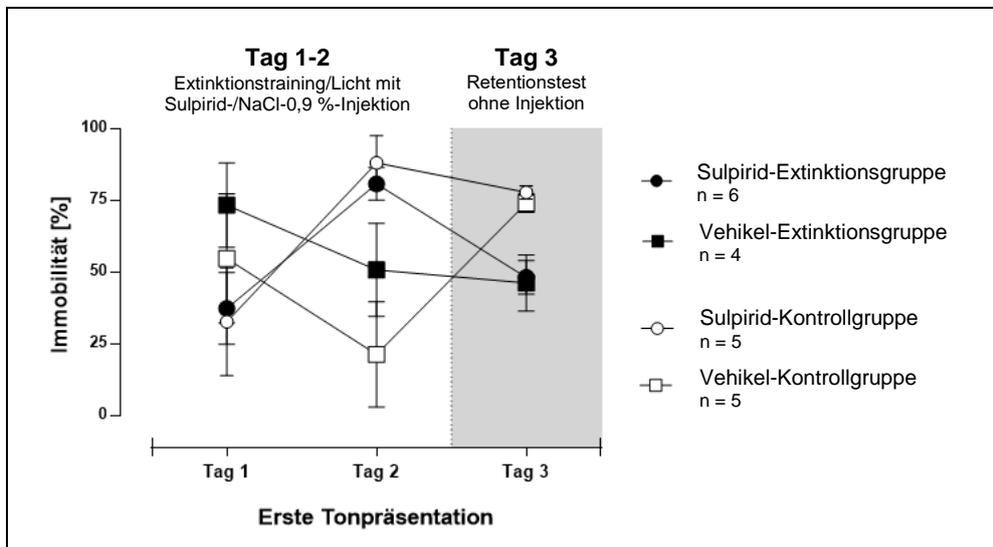


Abbildung 19: *Between-Session-Extinction* unter intra-mPFC Sulpirid-Injektion (Tag 1 und 2).

Immobilitätsraten während des jeweils ersten Beobachtungsintervalls der Versuchstage 1-3 (Sulpirid bzw. NaCl-0,9 %-Injektion 30 Minuten vor Testbeginn an den Tagen 1 und 2). Im Retentionstest an Tag 3 zeigt sich keine Beeinträchtigung der Langzeitextinktion (*Between-Session-Extinction*) durch die Sulpirid-Behandlungen an den vorhergehenden Versuchstagen.

(Statistik siehe Text)

Die Analyse der Verhaltensänderungen nach unilateraler intra-mPFC Sulpirid-Mikroinjektionen legt nahe, dass eine Blockade der D2-Rezeptoren in den rechten mPFC keinen Einfluss auf die Furchtextinktion hat.

3.4 Intra-mPFC-SCH23390-Effekt auf die Furchtextinktion

Auch nach SCH23390-Injektion zeigte sich eine deutliche Veränderung des Immobilitätsverhaltens der entsprechenden Tiere an den ersten beiden Versuchstagen. Da sich auch hier v.a. am zweiten Versuchstag kein Unterschied zwischen der SCH23390-Extinktionsgruppe und der SCH23390-Kontrollgruppe abbildete, wurde das Verhalten ebenfalls als Folge eines unspezifischen Substanzeffektes gewertet, ohne eindeutige Hinweise auf eine Auswirkung auf die

Furchtexpression und -extinktion. Abbildung 20 stellt das Immobilitätsverhalten der Versuchstiere an den Tagen 1-3 im Einzelnen dar:

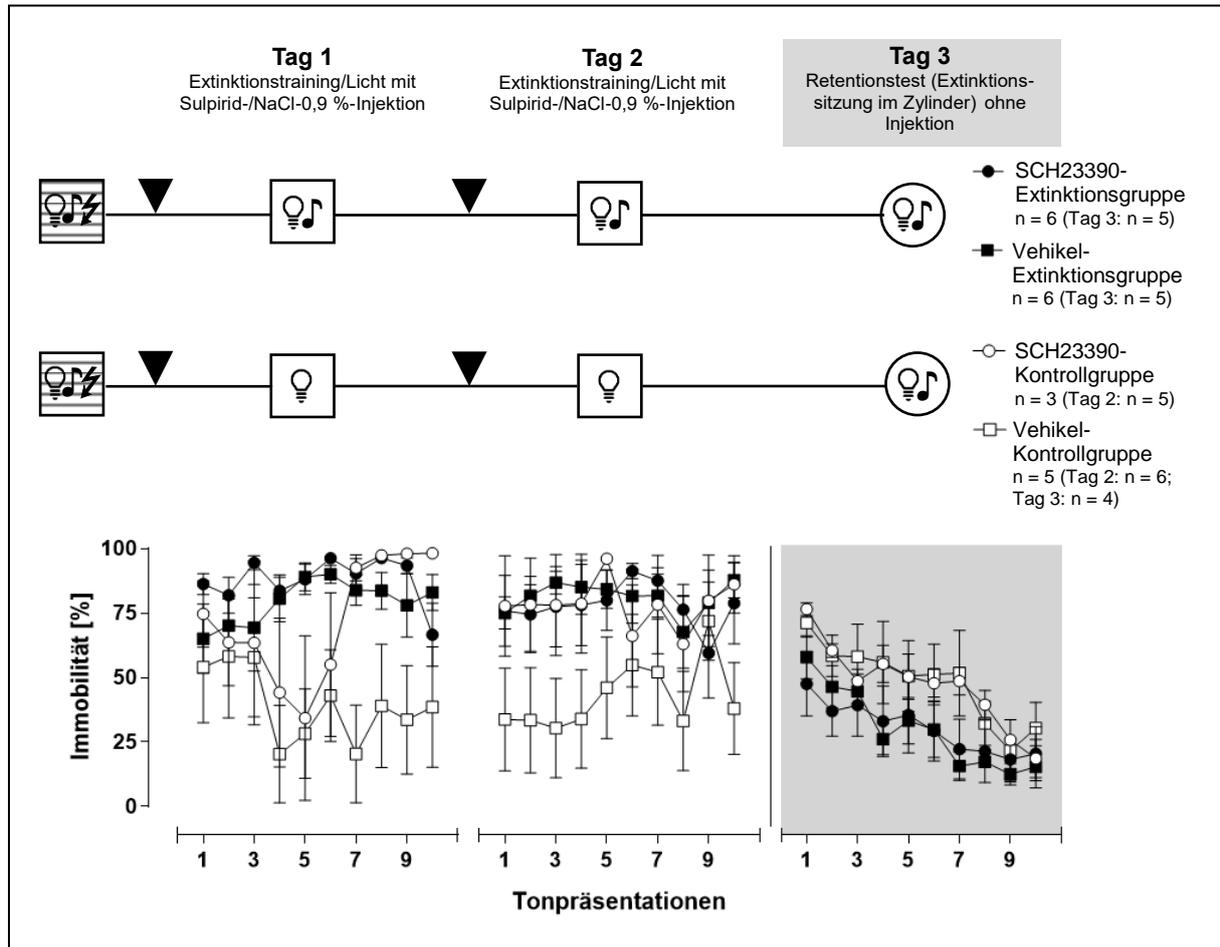


Abbildung 20: Furchttextinktion (Tag 1-3) unter unilateraler intra-mPFC SCH23390-Injektion (Tag 1 und 2).

Übersicht über das Immobilitätsverhalten der Extinktions- und Kontrollgruppen als prozentualer Anteil in Relation zum Beobachtungsintervall (20 s) während des Extinktionstrainings/der Lichtpräsentation; an den Tagen 1 und 2 unter SCH23390- bzw. NaCl-0,9 %-Injektion 30 Minuten vor Testbeginn, am Tag 3 ohne Injektionen. Ähnlich der mit Suplirid behandelten Tiere im vorherigen Versuch zeigen die Versuchstiere mit SCH23390-Injektion eine erhöhte Immobilität. Im Retentionstest ergibt sich im Vgl. zu den Kontrollgruppen ebenfalls kein eindeutiger Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Extinktionslernens.

(Statistik nicht gezeigt)

Die Analyse (2-Weg-ANOVA) der ersten Tonpräsentation am dritten Versuchstag zeigte lediglich den deutlichen Trend eines Extinktionseffektes knapp unter Signifikanzniveau (Protokoll: $F_{1,14} = 4,449$, $p = 0,053$) – möglicherweise auch bedingt durch die geringen Kohortengrößen – und keine Wirkung der SCH23390-Injektionen der vorherigen Tage (Behandlung: $F_{1,14} = 0,001$, $p = 0,973$). Einen Überblick über die *Between-Session-Extinction* bietet die folgende Abbildung 21.

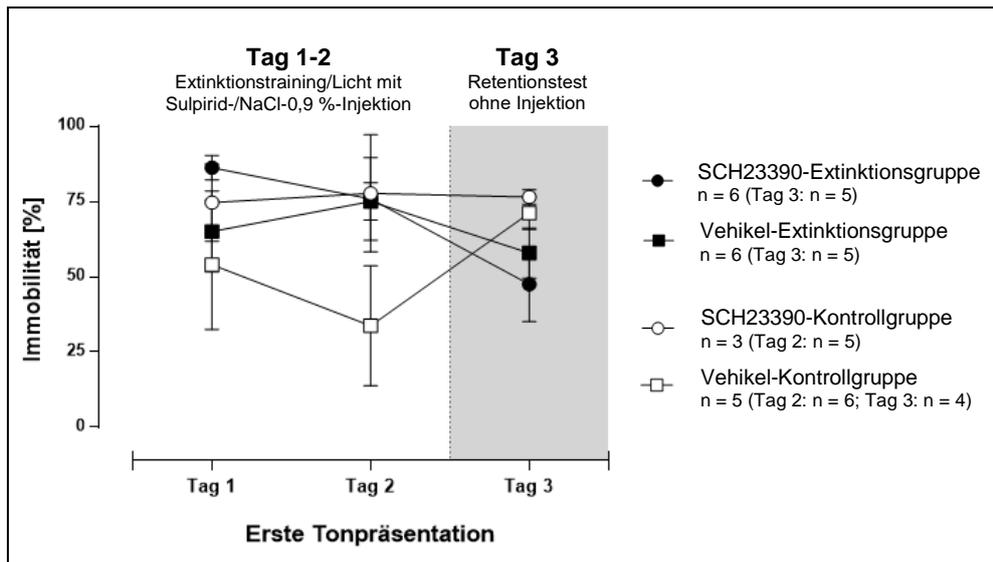


Abbildung 21: *Between-Session-Extinction* unter intra-mPFC SCH23390-Injektion (Tag 1 und 2).

Immobilitätsraten während des jeweils ersten Beobachtungsintervalls der Versuchstage 1-3 (SCH23390- bzw. NaCl-0,9 %-Injektion 30 Minuten vor Testbeginn an den Tagen 1 und 2). Im Retentionstest an Tag 3 zeigt sich bei beiden Extinktionsgruppen ein eher schlechtes Extinktionslernen, jedoch ohne wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Somit ergibt sich auch hier kein Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Langzeitextinktion (*Between-Session-Extinction*) durch die SCH23390-Behandlungen an den vorhergehenden Versuchstagen.

(Statistik siehe Text)

Insgesamt ergibt sich auch für gezielte, unilaterale D2-Rezeptorblockade durch SCH23390 kein Anhalt auf eine Veränderung der Furchtextinktion.

4 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die dopaminerge Transmission während der Extinktion konditionierter Furcht im mPFC, eine der wichtigsten Strukturen kognitiver Verarbeitungsprozesse. Zudem sollte durch die lokale Applikation von DA-Rezeptorantagonisten untersucht werden, ob und wenn ja welche DA-Rezeptoren im mPFC an Prozessen der Furchtextinktion beteiligt sind.

4.1 Effektivität der Furchtextinktion im Heimkäfig

Zur Untersuchung der dopaminergen Transmission im mPFC wurde die Methode der Mikrodialyse gewählt. Um unnötige Interaktionen mit den Versuchstieren und entsprechende, allein durch das Handling hervorgerufene Artefakte zu vermeiden, wurde zunächst an nicht operierten Mäusen ein geeignetes Verhaltensprotokoll mit Durchführung der Extinktionssitzungen im Heimkäfig etabliert. Hierdurch konnte bewiesen werden, dass eine suffiziente Extinktion konditionierter Furcht auch in der gewohnten Umgebung möglich ist. Auffällig bei dem Versuch war jedoch, dass die Versuchstiere der Heimkäfiggruppen zum Ende der Sitzungen an den Tagen zwei und drei eine ansteigende Immobilitätsrate zeigten – ein Phänomen, welches bei den Tieren, die ein volles Extinktionstraining mit Licht- und Tonpräsentation erhielten, sogar früher zu beobachten war als bei der Kontrollgruppe, die lediglich einer entsprechenden Lichtpräsentation im Heimkäfig ausgesetzt war. Eine Zunahme der Immobilität mit Dauer der Extinktionssitzung hatten auch Cain und Kollegen beobachtet (Cain et al. 2003), als sie die Effektivität von zeitlich gehäuften CS-Präsentationen untersuchten, am ehesten als Folge einer Kontexthabituatation. Ein Hinweis darauf ist, dass die betroffenen Versuchstiere in dem beschriebenen Experiment auch zwischen den Tonpräsentationen keine Bewegungen zeigten und freezingtypische Begleitreaktionen wie z.B. eine erhöhte Atemfrequenz fehlten. Ein möglicher begünstigender Faktor, der im gegebenen Versuchssetting zu einem vergleichsweise frühen Auftreten der nicht furchtinduzierten Immobilität geführt haben könnte, war die Durchführung des Experimentes in der Lichtphase. Obwohl dies grundsätzlich die Inaktivitätsphase der nachtaktiven Mäuse ist, wurde diese gewählt, um später ein komplikationsloses, manuelles Asservieren der Mikrodialyseproben zu ermöglichen. Letztendlich kann das vermeintlich nicht furchtassoziierte Verharren der Versuchstiere durch die gewählte Auswertungsmethode objektiv nicht

eindeutig vom Freezing abgegrenzt werden, weshalb in der Darstellung und Diskussion der Ergebnisse der allgemeinere Begriff „Immobilität“ gewählt wurde.

4.2 Die dopaminerge Transmission im mPFC während der Furchtextinktion

In dem beschriebenen Mikrodialyseversuch war interessanterweise sowohl in der Extinktionsgruppe als auch in der Kontrollgruppe trotz unterschiedlicher Furcht-expression und -extinktion ein ähnlicher Verlauf der DA-Transmission zu beobachten. Bei beiden Versuchsgruppen zeigte sich während der Extinktionssitzung bzw. der Lichtpräsentation ein Anstieg der mittleren DA-Konzentration um 20-60 % ausgehend von den mittleren Basalwerten des jeweiligen Versuchstages. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Extinktionslernen bzgl. der konditionierten Furcht nicht durch ein dopaminerges Signal im mPFC ausgelöst wird. Allerdings deutet der DA-Anstieg während unseres Experimentes auf Verarbeitungsprozesse im mPFC hin, die durch DA moduliert werden.

Beide Versuchsgruppen erhielten nach Gewinnung der drei Basalproben als sensorischen Stimulus eine 20-minütige Lichtpräsentation, die Extinktionsgruppe zusätzlich 10 Tonpräsentationen (Extinktionstraining). Diese Lichtpräsentation könnte i.S. einer DA-Freisetzung als Reaktion auf einen salienten Reiz zu den beobachteten DA-Anstieg im mPFC geführt haben und erklärt, warum dieser in beiden Versuchsgruppen beobachtet wurde. Eine darüber hinausgehende, durch die Tonpräsentation als aversiv konditionierten Stimulus ausgelöste DA-Freisetzung war in der Extinktionsgruppe nicht festzustellen. Dies steht durchaus in Konflikt mit anderen Studien, die eine solche DA-Freisetzung im mPFC als Antwort auf aversive Reize berichteten (u.a. Vander Weele et al. 2018, Bromberg-Martin et al. 2010), und zeigt, wie kontrovers die Rolle der dopaminergen Transmission in furchtassoziierten und aversiven Lernmechanismen zu diskutieren ist.

Auch wenn der DA-Anstieg in unserem Experiment bei beiden Versuchsgruppen beobachtet wurde und nicht durch den aversiven CS ausgelöst wurde, ist ein modulierender Effekt auf die Furchtextinktion als Lernprozess nicht ausgeschlossen. Übereinstimmend mit der Vorstellung zu *Gating*-Mechanismen und einer verbesserten *Signal-to-Noise-Ratio* (Vander Weele et al. 2019), könnte die Verarbeitung eines gleichzeitig eintreffenden aversiven CS-Signals unterstützt werden. Eine durch das DA-Signal synchronisierte neuronale Aktivität und

Aufrechterhaltung bestimmter Komponenten des Arbeitsgedächtnisses im mPFC könnten die Furchtextinktion supportiv beeinflussen.

Eine Beteiligung der DA-Transmission an der furchtassoziierten Verhaltens-expression selbst lässt sich durch unsere Experimente nicht vermuten, da der DA-Anstieg stets in beiden Versuchsgruppen zu beobachten war. Betrachtet man insbesondere den letzten Versuchstag, an dem das Retentionstraining zur Überprüfung der Langzeitextinktion stattfand, und stellt diesen die entsprechenden Verhaltensdaten des Heimkäfigextinktionsversuches gegenüber, so wird ersichtlich, dass der DA-Anstieg nicht mit dem Freezingverhalten der Versuchstiere korreliert. Im Gegenteil, der DA-Konzentrationsanstieg ist hier bei der Extinktionsgruppe sogar tendentiell höher als bei der Kontrollgruppe. Auch wenn man dadurch vermuten könnte, dass das DA-Signal mit der Expression des Extinktionsgedächtnisses einhergeht, welches in der Extinktionsgruppe aufgrund der vorhergehenden Trainingseinheiten stärker ausgeprägt sein sollte, so scheint diese Annahme in Anbetracht der vorherigen Versuchstage jedoch ebenfalls eher unwahrscheinlich. In diesem Fall wäre zu erwarten gewesen, dass die Extinktionsgruppe von Tag zu Tag eine Zunahme der DA-Freisetzung zeigt, während bei der Kontrollgruppe keine wesentlichen Veränderungen der DA-Konzentration zu bemerken sein sollten.

Zusammengefasst ergibt sich aus den Ergebnissen unseres Mikrodialyseexperimentes kein Hinweis auf eine selektive Beteiligung der DA-Transmission im mPFC an der Vermittlung der Furchtexpression und -extinktion. Ob und in welchem Ausmaß DA im mPFC Verarbeitungsprozesse moduliert, welche die Furchttextinktion beeinflussen, kann nicht geschlussfolgert werden.

4.3 Effekte lokal applizierter D1- und D2-Antagonisten im mPFC auf die Furchttextinktion

Wie genau DA eine Zielstruktur moduliert, hängt zum einen von der Rezeptorverteilung zum anderen aber auch von der Art der DA-Freisetzung ab. Generell kann zwischen einer phasischen und tonischen DA-Transmission unterschieden werden. Dabei wird angenommen, dass die durch eine schnelle, transiente, stimulusabhängige Aktivität dopaminerger Neurone ausgelöste, phasische DA-Freisetzung im mPFC Aktualisierungs- und Lernprozesse unterstützt, indem sie die Weiterleitung und Verarbeitung neuer, relevanter Signale fördert. Sie ist zeitlich begrenzt (100-

500ms) und wird vorwiegend über D2-Rezeptoren vermittelt (Cohen et al. 2002). Die tonische DA-Transmission wird mit der Stabilisierung neuronaler Netzwerke in Verbindung gebracht und soll so aktive synaptische Verbindungen aufrechterhalten. Dadurch könnten im mPFC z.B. bestimmte Komponenten des Arbeitsgedächtnisses in einem aktiven Status gehalten werden. Die Effekte der tonischen DA-Freisetzung sollen vorwiegend durch D1-Rezeptoren vermittelt werden (D'Ardenne et al. 2012).

Im PFC sind beide Rezeptorklassen exprimiert, wobei D1-Rezeptoren häufiger vorkommen. Um zu untersuchen, ob furchtassoziierte neuronale Prozesse durch die die Blockade dopaminerger Rezeptoren im mPFC beeinflusst werden, wurden die beschriebenen Mikroinjktionsversuche durchgeführt. Hierbei ergaben sich Hinweise, dass sowohl die unilaterale Blockade von D1- als auch von D2-Rezeptoren die Verhaltensexpression beeinflusst, während die Langzeitextinktion konditionierter Furcht keinerlei wesentliche Einschränkung zeigte. Die Immobilitätsraten aller Extinktionsgruppen waren dabei an den ersten beiden Versuchstagen ähnlich hoch und zeigten keine *Within-Session-Extinction*. Die fehlende Abnahme der Immobilität innerhalb der Versuchssitzungen lässt sich gut durch die Mikroinjktionen ca. 30 Minuten vor Beginn des Verhaltensprotokolls erklären, welche mutmaßlich eine stressinduzierende Wirkung auf die Versuchstiere hatten und dadurch zu vermehrten Freezingreaktionen auf die Tonpräsentationen geführt haben könnten. Bei den Kontrollgruppen war auffällig, dass sowohl bei den mit Sulpirid, als auch den mit SCH23390 behandelten Versuchstieren eine erhöhte Immobilität zu beobachten war – eine Tatsache, die eher auf eine generelle Substanzwirkung auf die Lokomotion zurückzuführen ist, als auf eine erhöhte Furchtantwort, da keine CS-Präsentation erfolgte. Das Immobilitätsverhalten ist, vor allem wenn man die Sulpirid-Kontrollgruppe an den ersten beiden Versuchstagen betrachtet, nicht konsistent. Diese Unterschiede lassen sich am ehesten durch veränderte Diffusionsverhältnisse erklären, die möglicherweise durch lokale Einblutungen und/oder Inflammationsprozesse auftreten können und zu einer nicht konsistenten Verteilung und Wirkung der Substanz geführt haben könnten. Wie bereits im Heimkäfigversuch war bei den anderen, mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppen zum Ende der jeweiligen Versuchssitzungen an den ersten beiden Tagen ein Anstieg der Immobilität zu beobachten, der ebenfalls nicht durch eine erhöhte Furchtreaktion, sondern eher durch eine Kontexthabituation begründet sein könnte.

Aus unseren Mikroinjektionsstudien ergibt sich kein Hinweis darauf, dass die Behandlung mit D1- oder D2-Antagonisten zu einer veränderten Langzeitextinktion führt. Offen bleibt, ob eine Kombination beider Antagonisten einen Einfluss haben könnte.

4.4 Limitationen

Zur Detektion der Furchtantwort in den Verhaltensversuchen sollte das Freezingverhalten bewertet werden. Als Freezing wurde hierbei die völlige Bewegungsfreiheit, ausgenommen der Atemexkursionen, definiert. Eine Abgrenzung von anderen Formen der Immobilität, wie z.B. ausgelöst durch Habituationsprozesse oder Substanzwirkungen, konnte dadurch nicht eindeutig getroffen werden. Aufschluss darüber könnte das Verhalten zwischen bzw. vor den Tonpräsentationen geben, welches jedoch nicht quantitativ ausgewertet wurde. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde daher der Begriff „Immobilität“ anstatt „Freezing“ verwendet.

Bezüglich der Mikrodialyse ergeben sich verschiedene Probleme: die Methode bietet nur eine geringe zeitliche Auflösung, da für ein ausreichendes Probenvolumen Zeitintervalle von mind. 10-20 Minuten erforderlich sind. Dadurch können schnelle Konzentrationsänderungen nicht detektiert werden. Da die Analyse aus dem Dialysat des Extrazellularraumes erfolgt, können zudem intrasynaptisch freigesetzte Substanzen, welche nicht in den Extrazellularraum diffundieren, nicht detektiert werden. Bezogen auf die DA-Transmission werden also im Allgemeinen eher nur tonische, extrazelluläre Konzentrationsänderungen erfasst. Im PFC ist es prinzipiell aber auch möglich, dass phasische DA-Signale miterfasst werden, da DAT hier kaum exprimiert sind (Sesack et al. 1998) und die DA-Elimination langsamer als in anderen Hirnarealen erfolgt (Vander Weele et al. 2018) mit konsekutiv weiterreichender Diffusion (Garris et al. 1994). Eine Unterscheidung zwischen beiden Formen der DA-Freisetzung ist durch die Mikrodialyse nicht möglich. Weitere Schwierigkeiten werden durch die Invasivität der Methode bedingt. Sowohl durch die Implantation der Führungskanüle als auch später der eigentlichen Mikrodialysesonde kommt es zu Gewebeverletzungen, evtl. auch zu Blutungen, wodurch entzündliche Prozesse und/oder Narbenbildungen verursacht werden können. Dies kann zu Beeinträchtigungen der Diffusionsprozesse an der Sonde führen oder die Sonde komplett blockieren und somit die Detektion der zu untersuchenden Substanzen

stören. In einem vorhergehenden Mikrodialyseexperiment hatten wir beobachtet, dass die Gewinnung ausreichender Proben mit zunehmender Dauer des Experimentes weniger zuverlässig möglich war. Aufgrund dieser Erfahrungen hatten wir das Versuchsprotokoll des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mikrodialyseversuchs bei nachgewiesener adäquater Extinktion nach zwei Versuchstagen um einen Tag gekürzt. Darunter kam es zu weniger Probenausfällen.

Die Problematik der Invasivität besteht ebenfalls für intracerebrale Mikroinjektionsversuche. Auch hier kommt es durch die Implantation der Führungskanüle, später auch durch die wiederholten Injektionen, zu Gewebeverletzungen und/oder Blutungen, die zu lokalen Gewebereaktionen führen. Dies kann die Diffusion der injizierten Substanzen innerhalb des Gewebes beeinflussen und eine veränderte Verteilung und entsprechend auch Wirkung bedingen. Die Invasivität mit den assoziierten Komplikationen ist einer der Gründe, warum in den vorliegenden Experimenten nur eine unilaterale Mikroinjektion in den rechten mPFC vorgenommen wurde. Aufgrund der Lage des mPFC nahe der Mittellinie ist zudem eine Diffusion auf die kontralaterale Seite möglich, sodass in gewissem Maße ein bilateraler Effekt vermutet werden kann. Inwiefern jedoch die Zielstruktur beidseits durch die Substanzen erreicht wurde, kann nicht eindeutig festgestellt werden.

Ein interessanter Aspekt, der im Zusammenhang mit cerebralen uni- oder bilateralen Injektionsversuchen bedacht werden sollte, ist die funktionale Lateralisation. Der Begriff beschreibt, dass bilateralsymmetrische neuroanatomische Strukturen eine ungleiche Funktionalität aufweisen können. Diese hemisphärische Spezialisierung wurde auch bei Nagern für den mPFC und die Kontrolle emotionaler Prozesse beschrieben. So wurde z.B. der rechte mPFC mit anxiogenen Effekten in Verbindung gebracht, die Aktivierung des linken mPFC hingegen mit Anxiolyse (Costa et al. 2016). In Hinblick auf unsere Mikroinjektionsstudien könnte es daher interessant sein, ob bei der linkshemisphärischen oder bilateralen Anwendung ebenfalls keine Effekte auf die Furchtexpression und -extinktion zu beobachten sind. Auch in Mikrodialysestudien wurde teilweise von hemisphärischen Unterschieden monoaminer Transmitter im mPFC berichtet. So hatten beispielsweise Staiti und Kollegen bei männlichen, adulten Ratten höhere DA-Basalkonzentrationen beobachtet (Staiti et al. 2011). Unterschiede fanden sich aber auch abhängig vom

Alter und Geschlecht der Versuchstiere, was auf zusätzliche hormonelle und entwicklungsbedingte Faktoren hindeutet.

Die Wahl der Substanzkonzentration ist ein weiterer kritischer Punkt bei der Durchführung von Mikroinjektionsstudien: bei einer zu gering gewählten Dosis kann die Behandlung ohne Wirkung bleiben, bei einer zu hohen Dosis überschießende, unerwünschte Effekte auftreten. Die Tatsache, dass bei den entsprechend behandelten Kontrollgruppen Verhaltenseffekte beobachtet wurden, spricht dafür, dass die injizierte Dosis ausreichend war. Insgesamt konnte kein Einfluss auf die Langzeitextinktion beobachtet werden. Da jeweils nur ein D1- oder ein D2-Antagonist injiziert wurde, kann ein Effekt durch eine kombinierte Blockade nicht vollständig ausgeschlossen werden. In Zusammenschau der Ergebnisse des vorherigen Mikrodialyseversuches, in dem weder die Furchtexpression noch die Furchtextinktion eindeutig und spezifisch mit einem Anstieg der extrazellulären DA-Konzentration im mPFC in Verbindung gebracht werden konnte, erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich.

Limitierend für einen Teil der beschriebenen invasiven Versuche ist sicherlich auch die Kohortengröße. Versuchstiere wurden hier nur in Abhängigkeit der korrekten Sonden-/Injektionsposition in die Studien eingeschlossen, sodass es hier bereits zu einer Reduktion der letztlich in die Analysen eingehenden Individuen kam. Bei der Mikrodialysestudie war es zudem vereinzelt zu Probenausfällen gekommen, was zu einer weiteren Reduktion der Stichprobengröße führte. Hier hätte mit einer höheren Fallzahl unter Umständen auch am zweiten Versuchstag ein statistisch signifikanter DA-Anstieg nachgewiesen werden können.

4.5 Ausblick

Ein genaues Verständnis der neurobiochemischen Mechanismen und Interaktionsprozesse, die der Furchtextinktion zugrunde liegen, kann die Entwicklung spezifischer supportiver Therapiemöglichkeiten bei Angsterkrankungen maßgeblich unterstützen. Es findet sich daher nach wie vor ein großes Interesse an der Erforschung der beteiligten Hirnstrukturen und Neurotransmittersysteme, insbesondere des mesocorticolimbischen DA-System. Pharmakologische Studien, Verhaltensexperimente mit Knock-out-Versuchstieren, immunhistochemische Untersuchungen und funktionelle Bildgebungsverfahren haben bereits umfangreiche

Einblicke in furchtassoziierte Lernmechanismen geben können. So konnte für den mPFC bei PTSD-Patienten eine verminderte Aktivität gezeigt werden (Francati et al. 2007, Milad et al. 2009), weshalb dieser u.a. mit aversiven bzw. furchtassoziierten Lernen in Verbindung gebracht wurde. Die Beteiligung des dopaminergen Systems im mPFC wird hierbei in der Literatur kontrovers diskutiert. In unseren beschriebenen Experimenten ließen sich weder eine eindeutig mit der Furchtexpression und der Furchtextinktion assoziierte DA-Transmission feststellen, noch konnte ein Langzeiteffekt unter lokaler D1- oder D2-Antagonisierung im mPFC gezeigt werden. Die Mikrodialyse als gut etabliertes neurochemisches In-vivo-Verfahren in Kombination mit dem Furchtextinktionprotokolls bot dabei prinzipiell die Gelegenheit, dynamische Veränderungen der DA-Konzentration während des Verhaltensversuches zu erfassen. Wie bereits zuvor erwähnt, ist die zeitliche Auflösung des Verfahrens zur Erfassung kurz andauernder Konzentrationsänderungen allerdings eingeschränkt, sodass z.B. phasische DA-Signale nicht adäquat erfasst werden können. Eine bessere zeitliche Auflösung bieten elektrochemische Detektionsmethoden, wie z.B. die *Fast-scan-cyclic-Voltammetrie*, welche auch Signale im Bereich von 100ms detektieren können und sowohl in vivo an sich frei bewegenden Versuchstieren als auch in vitro an Hirnschnitten angewendet werden können. Mithilfe der Ex vivo-Verfahren konnten grundlegende Erkenntnisse zur DA-Freisetzung, -Diffusion und -Wiederaufnahme/Eliminierung gewonnen werden. Durch die in vivo Anwendung konnten dynamische Veränderungen an interagierenden Individuen untersucht werden und so Rückschlüsse über mögliche Funktionen in bestimmten Hirnregionen gezogen werden, ergänzt durch lokale oder systemische pharmakologische Manipulationen durch Agonisten und Antagonisten sowie transiente oder irreversible Inaktivitätsstudien. Die teils widersprüchlichen Ergebnisse machen eine allgemein gültige Interpretation jedoch schwierig (Singewald et al. 2015).

Neuere Methoden wie die Chemo- (Campbell et al. 2018) und Optogenetik (Guru et al. 2015) versprechen eine präzisere Modulation spezifischer Neuronenpopulationen. Nach Implementierung chemo- oder lichtsensibler transmembraner Proteine durch virale Vektoren können die entsprechenden Zellen mithilfe chemischer Substanzen oder Lichteinwirkung in ihrer Aktivität vorwiegend aktiviert oder inhibiert werden. Durch Verwendung transgenerischer Versuchstiere in Kombination mit lokalen Applikationsmöglichkeiten lässt sich die Wirkung noch genauer auf bestimmte

Nervenzellareale, neuronale Projektionen und Nervenzelltypen beschränken. Zudem lassen sich die Verfahren auch mit anderen Methoden, wie beispielsweise elektrophysiologischen Messungen, kombinieren und können so z.B. Aufschlüsse darüber geben, inwiefern die Aktivität efferenter Zielstrukturen der modifizierten Neuronen beeinflusst werden. Dadurch haben sich in den letzten Jahren neue, vielversprechende Wege zur Untersuchung der komplexen Interaktionen von Transmittersystemen und neuronalen Strukturen ergeben. Die Entschlüsselung des exakten Zusammenspiels der multiplen Einflussfaktoren, die sich auf furchtassoziiertes Verhalten und Lernen auswirken, bleibt jedoch weiterhin schwierig, da nicht nur verschiedene Hirnstrukturen und Neurotransmittersysteme involviert sind, sondern auch hormonelle und nutritive Einflüsse (Stockhorst et al. 2015) sowie akuter oder chronischer Stress zu einer Veränderung der neuronalen Verarbeitungsprozesse führen (Refojo et al. 2011).

Auch wenn die genauen neuronalen Interaktionsmechanismen noch nicht im Einzelnen geklärt sind, haben sich für einen möglichen supportiven Einsatz von Medikamenten in der Therapie von Angsterkrankungen doch einige interessante Erkenntnisse ergeben. Bzgl. des dopaminergen Systems ist vor allem die Arbeit von Haaker und Kollegen (Haaker et al. 2003) hervorzuheben, in der sich gezeigt hat, dass ein erhöhter DA-Tonus die Extinktion begünstigt. Versuchspersonen, denen nach dem Extinktionstraining L-Dopa verabreicht wurde, zeigten im Vgl. zu unbehandelten Teilnehmern in den späteren Tests weniger Rückfälle von Angstreaktionen. In Hinblick darauf, dass L-Dopa bereits zur Therapie der Parkinson-Erkrankung angewandt wird und somit viele Erfahrungen bzgl. der Verträglichkeit und Nebenwirkungen bestehen, bietet diese Behandlungsoption in Bezug auf Angsterkrankungen ein hohes therapeutisches Potential. Weitere Substanzen außerhalb des DA-Systems, die in Zukunft eine bedeutsame Rolle in der medikamentösen Behandlung spielen könnten, sind u.a. der Wirkstoff Yohimbine, für den ein positiver Effekt in Kombination mit einer kognitiven Verhaltenstherapie bei Patienten mit Klaustrophobie und generalisierten Angststörungen gezeigt werden konnte (Singewald et al. 2015), und DCS, welcher eine verbesserte Extinktionskonsolidierung und eine Generalisierung des Extinktionseffektes bedingen soll. Bevor diese Erkenntnisse jedoch auch Einzug in Therapieleitlinien halten, sind noch einige weiterführende Untersuchungen erforderlich, die eine sichere und wirkungsvolle Anwendung ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-5 (op. 2013). 5th ed., 2nd printing. Washington (D.C.), London: American Psychiatric Publishing.
- ICD-10, the ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. Clinical descriptions and diagnostic guidelines (2017). Geneva: World Health Organization.
- Abraham, A. D.; Neve, K. A.; Lattal, K. M. (2014): Dopamine and extinction: a convergence of theory with fear and reward circuitry. In: *Neurobiology of learning and memory* 108, S. 65–77. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.11.007.
- Bromberg-Martin, E. S.; Matsumoto, M.; Hikosaka, O. (2010): Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. In: *Neuron* 68 (5), S. 815–834. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.11.022.
- Cain, C. K.; Blouin, A. M.; Barad, M. (2003): Temporally massed CS presentations generate more fear extinction than spaced presentations. In: *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 29 (4), S. 323–333. DOI: 10.1037/0097-7403.29.4.323.
- Campbell, E. J.; Marchant, N. J. (2018): The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: receptor variants, targeting approaches and caveats. In: *British journal of pharmacology* 175 (7), S. 994–1003. DOI: 10.1111/bph.14146.
- Cohen, J. D.; Braver, T. S.; Brown, J. W. (2002): Computational perspectives on dopamine function in prefrontal cortex. In: *Current opinion in neurobiology* 12 (2), S. 223–229.
- Costa, N. S.; Vicente, M. A.; Cipriano, A. C.; Miguel, T. T.; Nunes-de-Souza, R. L. (2016): Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? In: *Neuropharmacology* 108, S. 82–90. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.011.
- D'Ardenne, K.; Eshel, N.; Luka, J.; Lenartowicz, A.; Nystrom, L. E.; Cohen, J. D. (2012): Role of prefrontal cortex and the midbrain dopamine system in working memory updating. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (49), S. 19900–19909. DOI: 10.1073/pnas.1116727109.
- Davis, M.; Myers, K. M.; Chhatwal, J.; Ressler, K. J. (2006): Pharmacological treatments that facilitate extinction of fear: relevance to psychotherapy. In: *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 3 (1), S. 82–96. DOI: 10.1016/j.nurx.2005.12.008.
- Fitzgerald, P. J.; Seemann, J. R.; Maren, S. (2014): Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. In: *Brain research bulletin* 105, S. 46–60. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2013.12.007.
- Francati, V.; Vermetten, E.; Bremner, J. D. (2007): Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings. In: *Depression and anxiety* 24 (3), S. 202–218. DOI: 10.1002/da.20208.
- Garakani, A.; Mathew, S. J.; Charney, D. S. (2006): Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. In: *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 73 (7), S. 941–949.
- Garris, P. A.; Wightman, R. M. (1994): Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. In: *J. Neurosci.* 14 (1), S. 442–450. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-01-00442.1994.
- Guru, A.; Post, R. J.; Ho, Y.; Warden, M. R. (2015): Making Sense of Optogenetics. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 18 (11), S. pyv079. DOI: 10.1093/ijnp/pyv079.
- Haaker, J.; Gaburro, S.; Sah, A.; Gartmann, N.; Lonsdorf, T. B.; Meier, K. (2013): Single dose of L-dopa makes extinction memories context-independent and prevents the return of fear. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26), S. E2428–36. DOI: 10.1073/pnas.1303061110.
- Johansen, J. P.; Cain, C. K.; Ostroff, L. E.; LeDoux, J. E. (2011): Molecular mechanisms of fear learning and memory. In: *Cell* 147 (3), S. 509–524. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.009.

- Kamprath, K.; Wotjak, C. T. (2004): Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. In: *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.) 11 (6), S. 770–786. DOI: 10.1101/lm.86104.
- Klass, A.; Glaubitz, B.; Tegenthoff, M.; Lissek, Si. (2017): d-Cycloserine facilitates extinction learning and enhances extinction-related brain activation. In: *Neurobiology of learning and memory* 144, S. 235–247. DOI: 10.1016/j.nlm.2017.08.003.
- Ko, J. (2017): Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns. In: *Frontiers in neural circuits* 11, S. 41. DOI: 10.3389/fncir.2017.00041.
- Laatikainen, L. M.; Sharp, T.; Harrison, Paul J.; Tunbridge, E. M. (2013): Sexually dimorphic effects of catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibition on dopamine metabolism in multiple brain regions. In: *PloS one* 8 (4), S. e61839. DOI: 10.1371/journal.pone.0061839.
- Leão, A. H F F; Cabral, A.; Izídio, G. S.; Ribeiro, A. M.; Silva, R. H. (2016): Diazepam effects on aversive memory retrieval and extinction: Role of anxiety levels. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 141, S. 42–49. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.11.012.
- McNally, G. P.; Johansen, J. P.; Blair, H. T. (2011): Placing prediction into the fear circuit. In: *Trends in neurosciences* 34 (6), S. 283–292. DOI: 10.1016/j.tins.2011.03.005.
- Michael, T.; Zetsche, U.; Margraf, J. (2007): Epidemiology of anxiety disorders. In: *Psychiatry* 6 (4), S. 136–142. DOI: 10.1016/j.mpps.2007.01.007.
- Milad, M. R.; Pitman, R. K.; Ellis, C. B.; Gold, A. L.; Shin, L. M.; Lasko, N. B. et al. (2009): Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. In: *Biological psychiatry* 66 (12), S. 1075–1082. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.06.026.
- Myers, K. M.; Davis, M. (2007): Mechanisms of fear extinction. In: *Molecular psychiatry* 12 (2), S. 120–150. DOI: 10.1038/sj.mp.4001939.
- Orsini, C. A.; Maren, S. (2012): Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36 (7), S. 1773–1802. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.12.014.
- Paxinos, G.; Franklin, K. B. J (2013): *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier/AP.
- Perry, J.r L.; Joseph, J. E.; Jiang, Y.; Zimmerman, R. S.; Kelly, T. H.; Darna, M. et al. (2011): Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: translation to prevention and treatment interventions. In: *Brain research reviews* 65 (2), S. 124–149. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2010.09.001.
- Peters, J.; Kalivas, P. W.; Quirk, G. J. (2009): Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. In: *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.) 16 (5), S. 279–288. DOI: 10.1101/lm.1041309.
- Pitman, R. K.; Sanders, K. M.; Zusman, R. M.; Healy, A. R.; Cheema, F.; Lasko, N. B. et al. (2002): Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol. In: *Biological psychiatry* 51 (2), S. 189–192.
- Plendl, W.; Wotjak, C. T. (2010): Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (14), S. 4990–4998. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6038-09.2010.
- Puig, M. V.; Antzoulatos, E. G.; Miller, E. K. (2014): Prefrontal dopamine in associative learning and memory. In: *Neuroscience* 282, S. 217–229. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.026.
- Quirk, G. J.; Mueller, D. (2008): Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33 (1), S. 56–72. DOI: 10.1038/sj.npp.1301555.
- Refojo, D.; Schweizer, M.; Kuehne, C.; Ehrenberg, S.; Thoeringer, C.; Vogl, A. M. et al. (2011): Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6051), S. 1903–1907. DOI: 10.1126/science.1202107.
- Schiller, D.; Monfils, M.-H; Raio, C. M.; Johnson, D. C.; LeDoux, J. E.; Phelps, E. A. (2010): Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. In: *Nature* 463 (7277), S. 49–53. DOI: 10.1038/nature08637.

- Schultz, W. (1998): Predictive reward signal of dopamine neurons. In: *Journal of neurophysiology* 80 (1), S. 1–27. DOI: 10.1152/jn.1998.80.1.1.
- Sesack, S. R.; Hawrylak, V. A.; Matus, C.; Guido, M. A.; Levey, A. I. (1998): Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (7), S. 2697–2708.
- Singewald, N.; Schmuckermair, C.; Whittle, N.; Holmes, A.; Ressler, K. J. (2015): Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. In: *Pharmacology & therapeutics* 149, S. 150–190. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.12.004.
- Staiti, A. M.; Morgane, P. J.; Galler, J. R.; Grivetti, J. Y.; Bass, D. C.; Mokler, D. J. (2011): A microdialysis study of the medial prefrontal cortex of adolescent and adult rats. In: *Neuropharmacology* 61 (3), S. 544–549. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.04.005.
- Steinberg, E. E.; Keiflin, R.; Boivin, J. R.; Witten, I. B.; Deisseroth, K.; Janak, P. H. (2013): A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. In: *Nature neuroscience* 16 (7), S. 966–973. DOI: 10.1038/nn.3413.
- Stockhorst, U.; Antov, M. I. (2015): Modulation of Fear Extinction by Stress, Stress Hormones and Estradiol: A Review. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 9, S. 359. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00359.
- Vaiva, G.; Ducrocq, F.; Jezequel, K.; Averland, B.; Lestavel, P.; Brunet, A.; Marmar, C. R. (2003): Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. In: *Biological psychiatry* 54 (9), S. 947–949.
- Vander Weele, C. M.; Siciliano, C. A.; Matthews, G. A.; Namburi, P.; Izadmehr, E. M.; Espinel, I. C. et al. (2018): Dopamine enhances signal-to-noise ratio in cortical-brainstem encoding of aversive stimuli. In: *Nature* 563 (7731), S. 397–401. DOI: 10.1038/s41586-018-0682-1.
- Vander Weele, C. M.; Siciliano, C. A.; Tye, K. M. (2019): Dopamine tunes prefrontal outputs to orchestrate aversive processing. In: *Brain research* 1713, S. 16–31. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.11.044.
- Walker, D. L.; Ressler, K. J.; Lu, K.-T.; Davis, M. (2002): Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (6), S. 2343–2351.
- Whittle, N.; Maurer, V.; Murphy, C.; Rainer, J.; Bindreither, D.; Hauschild, M. et al. (2016): Enhancing dopaminergic signaling and histone acetylation promotes long-term rescue of deficient fear extinction. In: *Translational psychiatry* 6 (12), S. e974. DOI: 10.1038/tp.2016.231.
- World Health Organization (2017): *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wood, N. E.; Rosasco, M. L.; Suris, A. M.; Spring, J. D.; Marin, M.-F.; Lasko, N. B. et al. (2015): Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: three negative psychophysiological studies. In: *Psychiatry research* 225 (1-2), S. 31–39. DOI: 10.1016/j.psychres.2014.09.005.
- Wotjak, C. T.; Landgraf, R.; Engelmann, M. (2008): Listening to neuropeptides by microdialysis: echoes and new sounds? In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 90 (2), S. 125–134. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.03.017.

Danksagung

Für die Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit möchte ich gern einigen Personen danken, ohne die das Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst danke ich ganz herzlich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neuronale Plastizität, die mir im wissenschaftlichen Alltag stets kollegial zur Seite standen und mich im experimentellen Arbeiten angeleitet haben – insbesondere Dr. Elmira Anderzhanova, ohne die die Durchführung und Analyse der invasiven Versuche nicht möglich gewesen wäre und die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie PD Dr. Carsten Wotjak für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe dieses interessante Forschungsthema zu erarbeiten, für seine unerschöpfliche Geduld, die ansteckende Motivation und die vielen nützlichen Ratschläge. Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, gilt außerdem Kornelia Flachskamm aus der Arbeitsgruppe Kimura ein besonderer Dank für die Unterstützung in der HPLC-Analyse der Mikrodiälyseproben.

Desweiteren möchte ich Prof. Dr. Hans Förstl danken, der die universitäre Betreuung meiner Dissertation übernommen hat, – für seine Geduld und sein Verständnis über all die Jahre sowie zuletzt auch für die Anregungen, die maßgeblich zur Komplementierung der Arbeit beigetragen hat.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht und mich stets in allen Lebenslagen unterstützt haben, meiner Schwester für ihre unzähligen Motivations-Inputs und meinem Lebenspartner Daniel Goede dafür, dass er mir bis zuletzt den Rücken frei gehalten hat und mir bei allen Höhen und Tiefen zur Seite stand.