

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie I
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape-

**Generelle Ängstlichkeit und konditionierte Furcht
bei Mäusen mit heterozygoter genetischer Defizienz
von Glutamat-Decarboxylase 65.**

**Eine kombinierte Verhaltens- und
elektrophysiologische Studie.**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Veismann, Anne

aus Dortmund

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichtstatter: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Dr. Katharina Domschke

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Neurophysiologie
-Direktor: Univ.-Prof. Hans-Christian Pape-
Referent: Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape
Koreferent: Prof. Dr. Dr. Katharina Domschke

ZUSAMENFASSUNG

Generelle Ängstlichkeit und konditionierte Furcht
bei Mäusen mit heterozygoter genetischer Defizienz von Glutamat-Decarboxylase 65.
Eine kombinierte Verhaltens- und elektrophysiologische Studie.

Veismann, Anne

Entstehung und Äußerung von genereller Ängstlichkeit und Furcht sind unter anderem abhängig von γ -Aminobuttersäure (GABA), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS, der mithilfe der Glutamat-Decarboxylase (GAD, 65kDa und 67kDa Isoform) synthetisiert wird.

In dieser Arbeit wurden generelle Ängstlichkeit, Furchtgedächtnis und neuronale Aktivitäten vor und während der Furchtkonditionierung bei GAD65 defizienten Mäusen (GAD65^{+/-}, GAD65^{+/+}, GAD65^{-/-}) analysiert und mit C57B/6J-Kontrollmäusen verglichen.

Es stellte sich vor allem die Frage, inwiefern sich bei heterozygot defizienten GAD65 Mäusen die Aktivität des intakten Allels auf das Gesamtgenprodukt und somit auf das Verhalten dieser Tiere auswirkt.

Ein Light-Dark- / Dark-Light-Test und ein Elevated-Plus-Maze Test dienten der Beurteilung und dem Vergleich der generellen Ängstlichkeit der Tiere. Die Ausprägung von Konsolidierung, Furchtgedächtnis-Abruf (Retrieval) und Extinktion wurde mithilfe der Furchtkonditionierung ermittelt. Im elektrophysiologischen Teil dieser Arbeit, wurden mithilfe von implantierten Elektroden in der lateralen Amygdala (LA), der CA1-Region des Hippocampus (CA1) und dem präfrontalem Kortex (PFC), spontane Feldpotentialaktivitäten während des Retrievals und der Extinktion, 24 Stunden nach Furchtkonditionierung, analysiert.

Die Ergebnisse der Verhaltenstests, der Furcht-Konditionierung und der Analyse der neuronalen Aktivitäten der GAD65^{+/-} Mäuse zeigten, dass der Mangel an GAD65 bei GAD65^{+/-} Mäusen durchaus relevant ist. Bezüglich der neuronalen Aktivitäten scheint heterozygote genetische Defizienz von GAD65 zu anderen Veränderungen zu führen als das komplette Fehlen von GAD65.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Relevanz des GAD65-Enzymmangels und damit indirekt die Bedeutung von GABA für die Ausprägung von Ängstlichkeit und erlernter Furcht.

Die Tierexperimente wurden genehmigt durch die Bezirksregierung Münster; Aktenzeichen: 50.0835.1.0 (G 53/2005)

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2010

*Wäre unser Gehirn so einfach, dass wir es verstehen
könnten, wären wir so einfach, dass wir es nicht verstehen
könnten.*

(Emerson M. Pugh, 1977)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	γ -Aminobuttersäure (GABA) und die Glutamat-Decarboxylase (GAD)	2
1.1.1	Genetische Defizienz von GAD	3
1.2	Verhaltenstests	4
1.3	Furcht-Konditionierung	4
1.4	Das limbische System	5
1.4.1	Amygdala	6
1.4.1.1	Die Rolle der Amygdala bei der Furcht-Konditionierung	8
1.4.2	Hippocampus	12
1.4.2.1	Die Rolle des Hippocampus bei der Furcht-Konditionierung	13
1.4.3	Präfrontaler Kortex (PFC)	15
1.4.3.1	Die Rolle des PFC bei der Furcht-Konditionierung	15
1.5	Feldpotential-Aktivitäten	16
1.5.1	Feldpotential-Aktivitäten in LA, CA1 und PFC	17
2	Ziel der Arbeit	19
3	Material /Methoden	20
3.1	Tiere	20
3.2	Verhaltenstests	20
3.2.1	Light-Dark-Test / Dark-Light-Test	20
3.2.2	Elevated – Plus – Maze – Test	21
3.3	Implantation der Elektroden	22
3.4	Furcht - Konditionierung	24
3.4.1	Kontext	24
3.4.2	Adaptation	24
3.4.3	Training	25
3.4.4	Abruf des Furchtgedächtnisses (,Retrieval')	25
3.4.5	Extinktions-Training	26
3.4.6	„Extinktions-Recall’	27
3.4.7	Reinstatement	27
3.5	Ungepaarte Konditionierung	27

3.6	Elektrophysiologische Aufnahmen und Analyse	28
3.7	Histologie	30
3.8	Statistik	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Verhaltenstests	31
4.1.1	Light-Dark – Test	31
4.1.2	Dark-Light – Test	34
4.1.3	Elevated-Plus-Maze - Test	36
4.2	Konditioniertes Furchtverhalten	39
4.2.1	Ungepaarte Konditionierung	39
4.2.2	Furcht-Konditionierung	39
4.3	Elektrophysiologische Aktivitäten	47
4.3.1	Frequenzen	47
4.3.2	LA-CA1	48
4.3.3	LA-PFC	50
4.3.4	PFC-CA1	53
4.3.5	Freezing-bezogene Korrelationen	57
5	Diskussion	58
5.1	Generelle Ängstlichkeit bei GAD65 ^{+/-} Mäusen	58
5.1.1	Die Rolle von GABA und GAD65 bei genereller Ängstlichkeit	60
5.1.2	Generelle Ängstlichkeit bei GAD65 ^{+/+} und C57B/6J-Kontrollmäusen ..	62
5.2	Konditionierte Furcht bei GAD65 ^{+/-} Mäusen	63
5.2.1	Die Rolle von GABA und GAD65 bei konditionierter Furcht	64
5.3	Neuronale Aktivitäten der GAD65 ^{+/-} Mäuse	66
6	Ausblick	71
7	Zusammenfassung	72
8	Literaturverzeichnis	74
9	Eigenständigkeitserklärung	85
10	Danksagung	86
11	Lebenslauf	87

Abkürzungen

ACC	anterior cingulärer Kortex
AID	dorsaler agranulärer Inselkortex
AIV	ventraler agranulärer Inselkortex
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoaxazolpropionsäure
AP5	2-Amino-5-Phosphonovalonsäure
BLA	basolaterale Amygdala
CA	Cornu Ammonis
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat (engl.: 'cyclic adenosine monophosphate')
CE	Nucleus centralis der Amygdala
CPP	3,2-Carboxypiperazin-propyl-1-Phosphat
CREB	cAMP response element binding protein
CS	konditionierter Stimulus
DCS	D-Cycloserin
E1	Extinktions-Recall
EPM	Elevated-Plus-Maze
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
IB	„intrinsic bursting“
ICD	International Classification of Diseases and Related Health Problems
IL	infralimbischer Kortex
IPSCs	inhibitorische postsynaptische Ströme (engl.: 'inhibitory postsynaptic currents')
LA	laterale Amygdala
LO	lateral orbitaler Kortex
LTP	Langzeit-Potenzierung (engl.: 'long-term potentiation')
MO	medial-orbitaler Kortex
mPFC	medialer präfrontaler Kortex
MAPK	mitogen-aktivierende Proteinkinasen
NIB	„non inactivating bursting“

NMDA	n-Methyl-d-Aspartat
PLP	Pyridoxal 5'-Phosphat
PrL	prälimbischer Kortex
PrC	präzentraler Kortex
R1	Retrieval
R2-R5	Extinktions-Training
Rein	Reinstatement
RS	„regular spiking“
s	Sekunde
SEM	Standardfehler (engl.: ‚Standard Error of the Mean‘)
UCS	unkonditionierter Stimulus
VGCC	spannungsabhängige Calcium-Kanäle (engl.: ‚voltage-gated calcium channel‘)
vmPFC	ventro-medialer präfrontaler Kortex
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VLO	ventral-lateral-orbitaler Kortex
VO	ventral-orbitaler Kortex

1 Einleitung

Ängste und Phobien bestimmen den Alltag vieler Menschen. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge sind Angsterkrankungen mit einer Lebenszeitprävalenz von ca. 28,8% neben den depressiven Störungen die häufigsten psychischen Erkrankungen. Frauen sind dabei doppelt so häufig betroffen wie Männer (Kessler et al., 2005). Doch was bedeutet überhaupt ‚Angst‘? ‚Angst‘ ist ein unangenehm empfundener, eine Bedrohung oder Gefahr signalisierender emotionaler Gefühlszustand mit Anstieg von Puls- und Atemfrequenz, verstärkter Darm- und Blasenaktivität, Übelkeit, Zittern und Schweißausbruch (Pschyrembel, 2004). Laut ICD-10 (International Classification of Diseases and Related Health Problems) kann man Angststörungen in zwei Kategorien einteilen: ‚phobische Störungen‘ (ICD10-F40) und ‚andere Angststörungen‘ (ICD10-F41). Bei den ‚phobischen Störungen‘ werden Ängste durch im Allgemeinen ungefährliche Situationen bzw. Objekte außerhalb der betreffenden Person hervorgerufen. Zu den ‚phobischen Störungen‘ zählen die ‚Agoraphobie‘, die ‚Sozialphobie‘ und ‚spezifische Phobien‘ (z.B. die ‚Tierphobie‘). Bei den ‚anderen Angststörungen‘ erscheint die Angst unabhängig von Umgebungssituationen. Sie tritt für die Betroffenen spontan in verschiedenen Situationen auf. Hierzu gehören ‚Panikstörungen‘ und ‚generalisierte Angststörungen‘.

Die Begriffe ‚Angst‘ und ‚Furcht‘ werden häufig synonym verwendet. Genau genommen ist die Furcht allerdings rational begründbar und somit eine objektbezogene Angst, die sich z.B. als Reaktion auf eine konkrete Bedrohung bzw. Gefahr einstellt. Sie wird deshalb auch als ‚Realangst‘ bezeichnet (Pschyrembel, 2004).

Innovationen der Therapie für Angstpatienten bedürfen genauesten Verständnisses aller physiologischen, neuronalen und molekularen Vorgänge, die sich hinter einem gestörten Angstverhalten verbergen.

Betrachtet man die Ätiologie der Angsterkrankungen spielen neben der genetischen Prädisposition und psychosozialen Faktoren besonders neurobiologische Faktoren eine große Rolle. Die Regulation der Angst durch verschiedene Neurotransmitter wie Serotonin, Noradrenalin, Adenosin und γ -Aminobuttersäure (GABA) ist von besonderer Wichtigkeit (Zwanzger und Deckert, 2007). Die Erforschung aller Einzelheiten in diesem Zusammenhang erfordert noch sehr viele Studien, bei denen Tierexperimente vorab unerlässlich sind.

Verhaltenstests wie der Light-Dark-Test und der Elevated-Plus-Maze-Test überprüfen dabei die ‚generelle‘ Ängstlichkeit der Tiere, während die Furcht-Konditionierung ‚konditioniertes Furchtverhalten‘ als Teil des Furcht-Gedächtnisses testet.

Diese Arbeit soll die Forschung im Bereich des Angst- und Furchtverhalten bezüglich der Beteiligung des GABAergen Systems ein Stück voranbringen.

1.1 γ -Aminobuttersäure (GABA) und die Glutamat-Decarboxylase (GAD)

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem. Seine Effekte werden größtenteils über GABA_A Rezeptoren vermittelt. GABA_A Rezeptoren sind pentamere Chlorid-Kanäle, welche aus Kombinationen von 18 Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die Bindung von GABA an den Rezeptor hat eine erhöhte Chlorid-Leitfähigkeit zur Folge, was zur Hyperpolarisation und somit zur reduzierten Erregbarkeit der Zelle führt (Rudolph et al., 2001). Im Gegensatz zu dem ionotropen GABA_A Rezeptor ist der GABA_B Rezeptor metabotrop und G-Protein-gekoppelt an Kalium- und Calcium-Kanäle (Bowery et al., 2002).

Entstehung und Äußerung des Furcht-Gedächtnisses sind abhängig von GABA-Funktionen, besonders in der Amygdala (Obata, 1977). In der basolateralen Amygdala (BLA) existiert eine tonische GABAerge Hemmung (Sanders und Shekhar, 1995; Shekhar et al., 2003). Durch lokale Verabreichung von GABA_A Rezeptor - Agonisten (z.B. Muscimol) in die Amygdala wird die Furcht-Konditionierung unterdrückt und durch GABA_A Rezeptor – Antagonisten (z.B. Bicuculline) noch verstärkt (Fanselow und Kim, 1992; Muller et al., 1997).

Synthetisiert wird GABA durch α -Decarboxylierung von Glutamat mithilfe des Enzyms Glutamat-Decarboxylase (GAD). Von dieser existieren eine 65kDa und eine 67kDa Isoform, die auf zwei voneinander unabhängigen Genen kodiert werden (Erlander, 1991). GAD67 ist vor allem im Zytoplasma des Zellkörpers zu finden; GAD65 ist hauptsächlich in den Axonterminalen lokalisiert und reversibel an die Membranen der synaptischen Vesikel gebunden (Reetz et al., 1991). Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) gilt als Kofaktor der GAD. Mindestens 50% der GAD im Gehirn sind PLP-freie-Apoenzyme und können bei Bedarf aktiviert werden (Itoh et al., 1981), wobei GAD65 hier den größeren Anteil einnimmt. Die Mehrheit der GAD67 ist mit PLP gesättigt. Man geht davon aus, dass GAD67 mit einem 90%igen Produktionsanteil von GABA stets für ein basales GABA-Level zuständig ist, während GAD65 vor allem bei gesteigertem Verbrauch zum Einsatz kommt und somit für die Feinabstimmungen zuständig ist (Martin et al., 1991).

1.1.1 Genetische Defizienz von GAD

Die gezielte Deaktivierung von bestimmten Genen zur Herstellung von Mäusen mit genetisch determinierten Defizienzen ist eine etablierte Methode, um die Funktion der Gene im Zusammenhang des Gesamtorganismus zu untersuchen. Es wird unterschieden zwischen homozygot defizienten Mäusen, bei denen ein bestimmtes Gen auf seinen beiden Allelen ausgeschaltet wurde, und heterozygot defizienten Mäusen, bei denen das Gen nur auf einem Allel deaktiviert wurde. Heterozygot defiziente Mäuse geben somit Aufschluss über das Maß für die Stärke der Wirkung des noch intakten, verbliebenen Allels.

Da viele menschliche Krankheiten auf eine gestörte Genfunktion zurückzuführen sind, stellen diese so genannten ‚Knockout-Mäuse‘ ein ideales Krankheitsmodell dar, welches hilft Aussagen über die Rolle bestimmter Gene bei Krankheiten und ihren Behandlungen machen zu können.

Auch in der Forschung im Bereich des Angst- und Furchtverhaltens spielen Mäuse mit genetischer Defizienz eine große Rolle.

Bei GAD67^{-/-} bzw. GAD65^{-/-} Mäusen sind die Gene für die Glutamat-Decarboxylase auf beiden Allelen ‚ausgeknockt‘ worden.

GAD67 ist besonders in sehr frühen Entwicklungsphasen entscheidend. GAD67 defiziente Mäuse besitzen daher eine Gaumenspalte und sind aufgrund der Unterentwicklung ihrer Lungen nicht lebensfähig (Asada et al., 1997).

GAD65 scheint vor allem bei der GABA-Synthese in der späteren Entwicklung des ZNS eine zentrale Rolle einzunehmen. GAD65 defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine morphologischen Veränderungen. Die basale GABA-Konzentration ist zunächst ebenfalls nicht verändert, allerdings besitzen sie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen 50% weniger PLP-freie-Apoenzyme. Nach der Geburt bleibt bei den GAD65 defizienten Mäusen ein GABA-Anstieg, der bei Wildtyp-Mäusen zu beobachten ist, aus. Somit ergeben sich GABA-Defizite vor allem in Amygdala und Hypothalamus (Stork et al., 2000). Die homozygoten GAD65 defizienten Mäuse zeichnen sich durch verändertes Angstverhalten aus: Bei ihnen ist das ‚Freezing‘ als Ausdruck der Angst reduziert und das Fluchtverhalten stärker ausgeprägt (Stork et al., 2000). Bei der Furchtkonditionierung zeigten GAD65^{-/-} Mäuse einen ausgeprägten Generalisierungseffekt bezüglich ihres Furchtgedächtnisses im Vergleich zu GAD65^{+/+} Mäusen (Bergado-Acosta et al. 2008).

Bezüglich neuronaler Aktivitäten beobachtete man bei den homozygoten GAD65 defizienten Mäusen eine erhöhte Sterberate aufgrund vermehrt auftretender spontaner epileptischer Anfälle (Kash et al., 1997).

Bei heterozygoten GAD65 Mäusen ist nur ein Allel des GAD65 Gens ‚ausgeknockt‘. Sie zeigten ebenfalls einen leicht reduzierten GABA-Spiegel in der Amygdala, allerdings nur in den

ersten 2-3 Lebensmonaten (Stork et al., 2000). Zum Angst- und Furchtverhalten bei GAD65^{+/-} Mäusen gibt es bis dato noch wenig explizite, verwertbare Ergebnisse. In den wenigen untersuchten Fällen, zeigten sie außer einem reduziertem aggressivem Verhalten keine weiteren Verhaltensauffälligkeiten (Stork et al., 2000).

1.2 Verhaltenstests

Spezifische Verhaltenstests wie der Elevated-Plus-Maze-Test (EPM) oder der Light-Dark-Test dienen der Beurteilung des generellen Angstverhaltens bei Kleinnagern. Sie basieren auf einem Konflikt zwischen Explorationsverhalten und natürlicher Furcht vor offenen bzw. hellen Gebieten. Solche Tests sind wichtig, um die Gesundheit, die Beweglichkeit und die sensorischen Funktionen der einzelnen Tiere beurteilen zu können. Durch das geschickte Kombinieren von verschiedenen Verhaltenstests kann das Risiko für falsch negative und falsch positive Ergebnisse verringert werden (Karl et al., 2003).

Diese speziellen Verhaltenstests bezüglich des generellen Angstverhaltens eignen sich insbesondere sehr gut für die Beurteilung und den Vergleich von verschiedenen Genotypen, deren Neurotransmitterhaushalt unterschiedlich stark beeinträchtigt ist.

1.3 Furcht-Konditionierung

Um Angst- und Furchtverhalten näher zu untersuchen und zu beurteilen, hat sich die Furchtkonditionierung, eine Form der klassischen Konditionierung, begründet von dem russischen Physiologen Pawlow (* 14. September 1849; † 27. Februar 1936), bewährt.

Eines der bekanntesten Forschungsobjekte Pawlows war der ‚Pawlowsche Hund‘. Hierbei läutete Pawlow jedes Mal kurz bevor er seinen Hund fütterte eine Glocke. Schon bald beobachtete er, dass sich die Speichelsekretion, die normalerweise erst beim Anblick der Nahrung eintrat, schon durch das Läuten der Glocke auslösen ließ. Der Hund hatte gelernt das Läuten der Glocke mit der Nahrungsaufnahme zu assoziieren.

Das Prinzip Pawlows wurde insbesondere im Forschungsbereich der Angst übernommen: Einem natürlichen, meist angeborenen Reflex wird ein neuer, bedingter Reflex hinzugefügt. Ein konditionierender Stimulus (CS; z.B. ein Ton) wird mit einem unkonditionierten, aversiven Stimulus (UCS; z.B. elektrischer Fußschock) gepaart, so dass das Tier nach der Konditionierung schon beim Präsentieren des CS Furchtverhalten, zum Beispiel in Form der ‚Furchtstarre‘ oder ‚Schreckstarre‘ (= ‚Freezing‘ = komplette Bewegungsstarre mit Ausnahme von Atembewegungen), zeigt.

Wird nachfolgend ein CS wiederholt ohne einen aversiven Reiz dargeboten, sinkt die Angst vor diesem Signal. Diesen hemmenden Lernprozess nennt man auch Extinktion. Hierbei kompetieren die hemmenden Erinnerungen, die während der Extinktion erlernt werden mit den exzitatorischen Erinnerungen der vorangegangenen Konditionierungsprozesse (Bouton et al., 1993). Obwohl die Furcht nach der Extinktion sinkt, ist das Furcht-Gedächtnis nicht gelöscht. Die Extinktion ist relativ kurzlebig und kontextabhängig (Quirk, 2002).

Tritt im Laufe eines Extinktionsvorgangs plötzlich wieder die eine starke Reaktion bezüglich des CS auf, spricht man von einem ‚Recovery‘ bzw. einer ‚spontanen Erholung‘ (Mietzel 1998). Unter ‚Reinstatement‘ versteht man eine erneute, unerwartete Darbietung des CS in Kombination mit dem aversiven Reiz nach wiederholten Extinktionstrainings. Das Furchtgedächtnis wird hierdurch wieder aufgefrischt.

Die Extinktion hat besonders im Umgang mit traumatisierten Patienten auch im klinischen Alltag eine große Bedeutung. Durch ein verbessertes Verständnis der exakten Abläufe der Extinktion könnte diesen Patienten auf Dauer effizienter geholfen werden.

Die Furcht-Konditionierung dient somit zum einen nähere Erkenntnisse im Zusammenhang von Emotionen und Verhalten zu erlangen, und zum anderen die Mechanismen, die das Lernen und Gedächtnis unterstützen, weiterhin zu erforschen und beeinflussen zu können (Fendt und Fanselow, 1999).

1.4 Das limbische System

Der Term „limbisches System“ leitet sich vom lateinischen *limbus* (= Rand, Saum) ab. Schon 1664 beschrieb Willis rein deskriptiv anhand der Lokalisation einiger archikortikaler Strukturen ein Hirnareal, welches sich zwischen Hirnstamm und Neokortex wie ein Saum um das *Corpus callosum* legt, als den *Limbus*. 1937 wurde von James W. Papez der ‚Papez-Kreis‘, bestehend aus *Hippocampus*, *Fornix*, *Corpora mamillaria*, *Gyrus cinguli* und dem *entorhinalen Kortex*, als neuronale Grundlage von Emotionen beschrieben. Der Begriff des ‚Limbischen Systems‘ entstand durch die Ausgestaltung des Papez-Modells durch Paul MacLean Mitte des 20. Jahrhunderts. MacLean erkannte den Zusammenhang zwischen den Elementen des Papez’schen Kreises und denen des Broca’schen *Lobus limbicus* und beschrieb das limbische System als ‚das Netzwerk des emotionalen Gedächtnisses‘, da es nun eine funktionelle Einheit bildete.

Gefühle wie die Angst finden demnach ihren Ursprung im limbischen System. Neuesten Erkenntnissen zu Folge werden heutzutage neben Amygdala, Hypothalamus, Hippocampus, Hirnstamm, Gyrus cinguli, Nucleus accumbens und dem Septum ebenfalls Teile des Assoziationskortex und der präfrontale Kortex zum limbischen System gezählt (Verwer et al.,

1996; Pape, 2004a). Das Zusammenspiel zwischen Amygdala, Hypothalamus, Hirnstamm und autonomem Nervensystem auf der einen Seite und Amygdala, frontalem und limbischem Kortex auf der anderen Seite bildet die Grundlage für die Wahrnehmung und Verarbeitung von emotionalen Erlebnissen (Kandel et al., 1996).

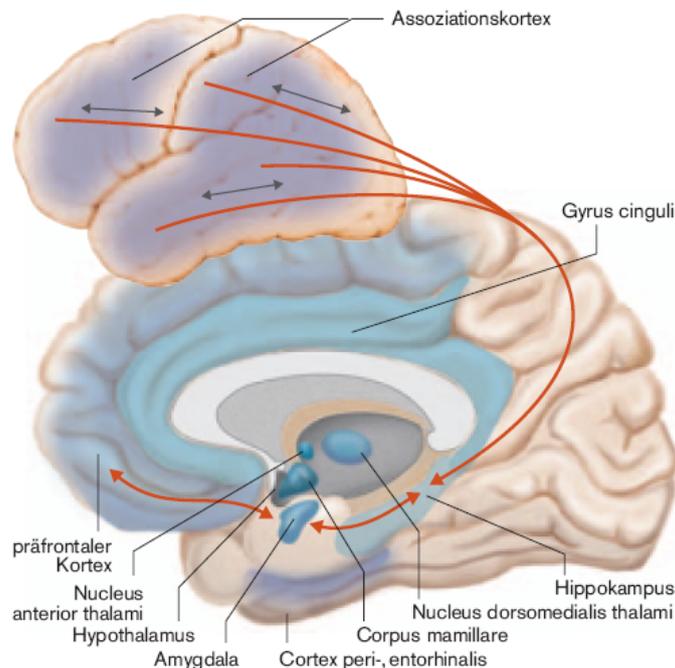


Abbildung 1: Erweitertes Konzept des limbischen Systems. Schema der Wechselwirkungen limbischer Schlüsselstrukturen mit dem präfrontalen Kortex und dem Assoziationskortex. (Pape, 2004a)

In dieser Arbeit stehen vor allem drei Strukturen des limbischen Systems im Vordergrund: Amygdala, Hippocampus und präfrontaler Kortex. Als die drei zentralen Strukturen des limbopräfrontalen Systems stehen sie in enger reziproker Verbindung zueinander und steuern Furchtreaktion, Furchtkontrolle und Furchtgedächtnis. Im Nachfolgenden werden diese Strukturen, ihre Verbindungen untereinander und ihre jeweilige Rolle bei der Fruchtkonditionierung detailliert beschrieben.

1.4.1 Amygdala

Die Amygdala stellt ein Kerngebiet im medialen Temporallappen dar und wurde 1819 von dem Anatomen Burdach (* 12. Juni 1776; † 16. Juli 1847) zuerst beschrieben. Ihre mandelförmige Zellmasse gab der Amygdala ihren Namen: ‚Amygdala‘ leitet sich aus dem Griechischem ab und bedeutet ‚Mandelkern‘. Die Amygdala ist die wichtigste Struktur des limbischen Systems in Verbindung mit der Verarbeitung emotionaler Einflüsse, dem Angstverhalten und der Fruchtkonditionierung.

EINLEITUNG

Hinweise, dass die Amygdala eine Schlüsselrolle bei emotionalem und sozialem Verhalten einnimmt, erbrachte die bilaterale Resektion des Temporallappens beim Affen: das so genannte ‚Klüver-Bucy-Syndrom‘ ist charakterisiert durch Angstreduktion und Änderungen bezüglich des Sexual- und Essverhaltens (Klüver und Bucy, 1934, 1937).

Läsionsstudien der Amygdala zeigten, dass Einschränkungen der Amygdala den Erwerb bzw. die Expression von vielen Aspekten der Furchtantwort blockieren (File et al., 1998). Eine elektrische Stimulation der Amygdala ruft hingegen Verhaltensmuster hervor, welche jenen ähneln, die durch Stress oder furchtvolle Stimuli produziert werden (Chapman et al., 1954; Feindel und Penfield, 1954).

Beim Menschen wurden Amygdalaläsionen auch mit der Verminderung des Gedächtnisses für Gesichter und Defiziten in der Erkennung von Emotionen auf Gesichtern assoziiert (Adolphs et al., 1999).

Anatomisch und funktionell besteht die Amygdala aus 13 unterschiedlichen Nuklei. Die einzelnen Kerne lassen sich nach ihrem cytoarchitektonischem Aufbau drei Gruppen zuordnen: den tiefen Kernen, den oberflächlichen Kernen und den übrigen Kernen (Pitkänen, 2000). Eine Übersicht der wichtigsten Kerne gibt der dargestellte Nissl-gefärbte Querschnitt durch den temporalen Pol eines Mäusehirns in Abbildung 2.

Von den 13 Kernen der Amygdala sind bei der Furchtverarbeitung und Verhaltenssteuerung drei Kerne von besonderer Bedeutung: der laterale Kern (LA), der basolaterale Kern (BLA) und der zentrale Kern (CE) der Amygdala (LeDoux, 1996). Die laterale Amygdala und der BLA werden auch unter dem Begriff basolateraler Komplex zusammengefasst und gehören zur Gruppe der tiefen Kerne. Der zentrale Kern wird zu den übrigen Kernen gezählt.

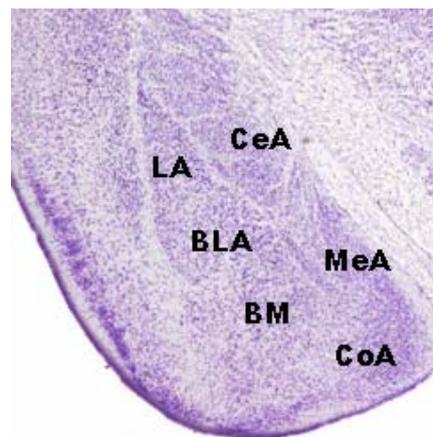


Abbildung 2: Amygdala der Maus. Dargestellt ist ein Nissl-gefärbter Frontalschnitt durch den temporalen Pol eines Mäusehirns. LA =Lateraler Nukleus, BLA = basolateraler Nukleus, BM = Basomedialer Nukleus, CoA =Cortikale Nuklei, MeA =medialer Nukleus, CeA = zentraler Nukleus. (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2001)

Die LA spielt bei Angst- und Furchtverhalten eine zentrale Rolle und bildet die primäre sensorische Zwischenstation der Amygdala, in der Afferenzen von subkortikalen und kortikalen sensorischen Regionen konvergieren. Der Hippocampus, vor allem der entorhinale Kortex und das Subiculum, besitzt dichte reziproke Verbindungen zur LA ebenso wie der präfrontale Kortex, dessen Verbindungen mit der BLA allerdings noch ausgeprägter sind (Pitkänen et al., 2000).

Die LA ist direkt und, über den basolateralen und basomedialen Nukleus, indirekt mit dem Nucleus centralis (CE) verbunden, der als ‚Output-Region‘ bezeichnet wird (Pitkänen et al., 2000; Sah et al., 2003). Der CE erhält ebenfalls Afferenzen aus sensiblen Kortexarealen, der Hippocampusformation und dem präfrontalen Kortex, projiziert aber nicht in die kortikalen Gebiete zurück (Pitkänen et al., 1997). Er stellt eine wichtige Zwischenstation bei der Expression von emotionalem Verhalten dar, da er zu Zielgebieten im Hypothalamus und Hirnstamm projiziert, welche direkt bei der Generierung von Furchtantworten involviert sind.

Hauptneuronentypen in der LA sind Projektionsneurone und Interneurone. Der Transmitter der pyramidenförmigen Projektionsneurone ist Glutamat. Die Interneurone sind für die Vorwärts- bzw. Rückwärts-Hemmung der Projektionsneurone verantwortlich und benutzen GABA als Transmitter (McDonald, 1992). Projektionen des medialen präfrontalen Kortex (mPFC) zu GABAergen Zellen der LA führen beispielsweise nach der Extinktion zu einer erhöhten Aktivität in GABAergen Zellen und damit zu einer Reduktion der Zellaktivitäten in anderen Teilen der Amygdala (Rosenkranz et al., 2003; Quirk et al., 2003).

1.4.1.1 Die Rolle der Amygdala bei der Furcht-Konditionierung

Bei der Furcht-Konditionierung stellt die Amygdala den zentralen Verschaltungsort dar: Die Informationen über den akustischen Reiz des CS gelangen von den Sinneszellen des Corti-Organes über den Hirnstamm zum auditorischen Thalamus. Von hier werden die Informationen auf zwei Wegen zur Amygdala geleitet. Zum einen monosynaptisch auf direktem Weg zur LA (Doron und LeDoux, 1999), wodurch die schnelle Reaktion auf potentiell gefährliche Stimuli ermöglicht wird (LeDoux, 1998). Zum anderen tonotopisch geordnet über kortikale Strukturen, deren Efferenzen aus dem auditorischen Assoziationskortex zur LA gelangen (Romanski und LeDoux, 1993). Die Informationen des Fußschocks (UCS) gelangen zum somatosensorischen Thalamus und von hier ebenfalls direkt und indirekt über thalamo-amygdaläre bzw. thalamo-kortikale und kortiko-amygdaläre Strukturen zur LA (siehe Abb. 3). Es ist entscheidend, dass die Informationen von CS und UCS in der LA konvergieren. Bei Schädigung der LA ist die Furcht-Konditionierung stark eingeschränkt (LeDoux et al., 2004). Der CS führt in den Zellen der LA zur Ausschüttung von Glutamat aus der Präsynapse, welches an verschiedene

Rezeptoren der Postsynapse bindet. Neben dem α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoaxazolpropionsäure (AMPA) Rezeptor spielt hier vor allem der N-methyl-d-aspartate (NMDA) Rezeptor eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um einen Glutamat-Rezeptor, der durch Magnesium moduliert wird. Er öffnet nur wenn Glutamat während einer Depolarisation bindet (Mayer et al., 1984). So wurde z.B. gezeigt, dass die Infusion von 2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), einem NMDA- Rezeptor Antagonisten, in die BLA zur Blockade des Lernvorganges führt, solange es vor dem Training appliziert wird (Maren et al., 1996).

Durch den UCS werden die Zellen depolarisiert, während Glutamat an den NMDA-Rezeptoren gebunden ist, was neben Natrium- und Kalium- vor allem auch einen Calcium- (Ca^{2+}) Einstrom durch die NMDA-Rezeptor-Kanäle ermöglicht. Durch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} - Stroms wird eine Second-Messenger-Kaskade aktiviert. Diese beinhaltet u.a. die Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinasen und mitogen-aktivierende Proteinkinasen (MAPK), die dann wiederum zu einen andere Glutamatrezeptoren phosphorylieren und dadurch deren Sensitivität für Glutamat erhöhen und zum anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das CREB (cyclic adenosine monosphosphate response element binding protein), aktivieren, welches zu entscheidenden Modulationen der Genexpression führt (Silva et al., 1998).

Für das Langzeitgedächtnis ist ein weiterer Ca^{2+} -Einstrom über spannungsabhängige Ca^{2+} -Känale (VGCCs; voltage-gated calcium channel) nötig. Die Applikation von Verapamil, einem VGCC-Antagonisten, in die LA blockiert das Langzeitgedächtnis, während das Kurzzeitgedächtnis unbeeinträchtigt bleibt (Bauer et al., 2002).

Der CE erhält direkt und, über den basolateralen und basomedialen Nukleus, indirekt Informationen aus der LA und reguliert seinerseits mit Projektionen zu anderen Hirnarealen, wie das zentrale Grau und den lateralen und paraventriculären Hypothalamus, Furchtantworten wie die Schreckstarre sowie Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz. So führt eine Läsion des CE zur Behinderung aller Expressionen der Furchtantworten (Gentile et al, 1986), während eine Läsion eines Zielgebiets des CE sich selektiv auf die Expression von einzelnen Antworten auswirkt. Störungen im lateralen Hypothalamus beeinflussen beispielsweise nur den Blutdruck und nicht das ‚Freezing‘ (LeDoux et al., 1988).

Abbildung 3 zeigt die Beteiligung der verschiedenen Hirnstrukturen bei der Furcht-Konditionierung mit der Amygdala als zentralen Verschaltungsort.

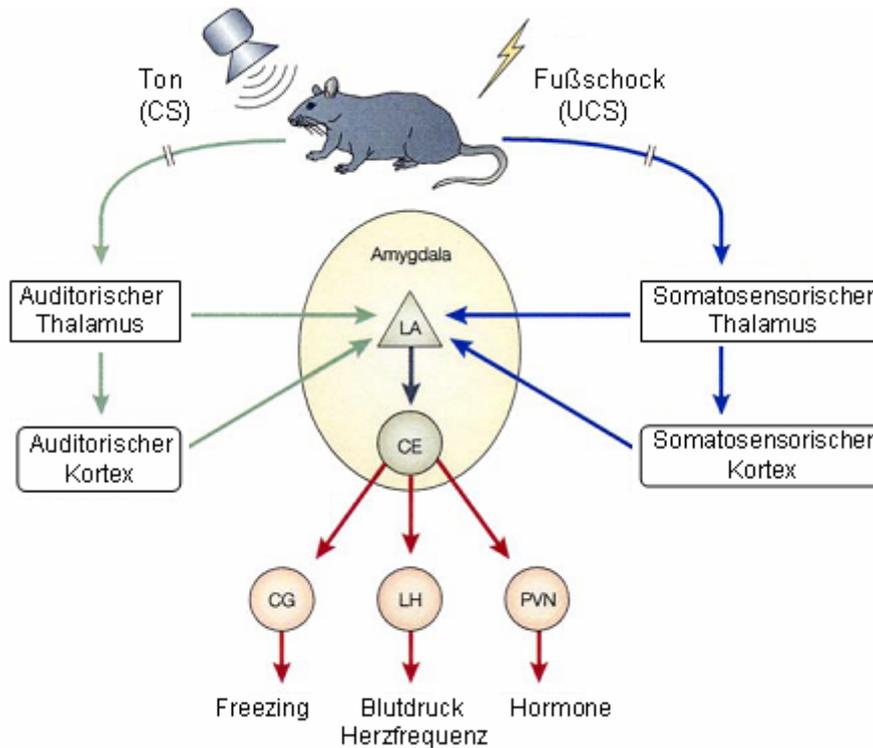


Abbildung 3: Beteiligung von verschiedenen Hirnstrukturen bei der Furcht-Konditionierung. Die Abbildung zeigt die Amygdala als zentralen Verschaltungsort. Die Informationen des konditionierten Stimulus (CS, auditorischer Stimulus) und des unkonditionierten Stimulus (UCS, Fußschock) konvergieren als Afferenzen aus Thalamus und Kortex in der lateralen Amygdala (LA). Der Nucleus lateralis ist u.a. direkt und indirekt mit dem Nucleus centralis (CE) der Amygdala verbunden. Von hier aus können über das zentrale Graue (CG), den lateralen Hypothalamus (LH) und den paraventriculären Hypothalamus (PVN) Furchtantworten wie das ‚Freezing‘ und Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz reguliert werden. (modifiziert nach Medina et al., 2002)

Während die Furcht-Konditionierung bei den Neuronen der LA zu erhöhten Zellaktivitäten führt (Quirk 1995, Paré und Collins, 2000), beobachtet man nach der Extinktion in den meisten Neuronen der LA eine Reduktion der Zellaktivitäten (s. Abb. 4), was somit zu einer verminderten Furchtantwort führt (Maren und Quirk, 2004). Diese Reduktion ist auf eine Hemmung des CE durch Projektionen des medialen präfrontalen Kortex (mPFC) zu GABAergen Zellen der LA zurückzuführen (Rosenkranz et al., 2003; Quirk et al., 2003).

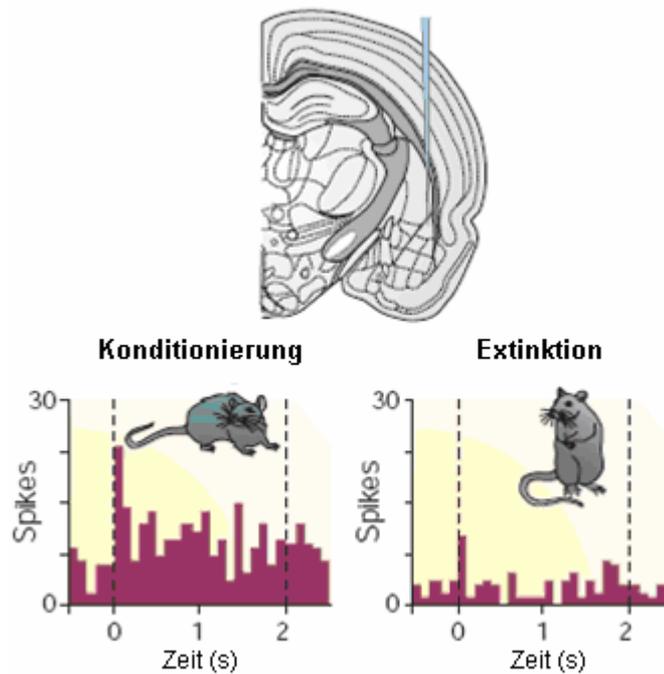


Abbildung 4: Neuronale Aktivitäten in der Amygdala während der Konditionierung und nach der Extinktion. Zu beobachten ist die deutliche Abnahme der Zellaktivität („Spikes“). (modifiziert nach Maren und Quirk, 2004)

Dass die Amygdala während der Extinktion ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt, zeigt auch die lokale Infusion von AP5 in die Amygdala, da dies die Extinktion verhindert (Falls et al., 1992). D-Cycloserin (DCS), ein NMDA-Rezeptor Agonist, beschleunigt hingegen die Extinktion bei Ratten (Walker et al., 2002). Die Anwendung von DCS zeigt in einer Pilotstudie auch bei phobischen Angstpatienten erste Erfolge (Ressler et al., 2004).

1.4.2 Hippocampus

Der Hippocampus liegt im Temporallappen, wo er die mediale Wand des Seitenventrikels bildet. Mit seinem Endstück formt er dort eine tatzenähnliche Struktur, den *Pes hippocampi*. Die gebogene Form des Hippocampus gab ihm seinen Namen: ‚Hippocampus‘ leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet Seepferdchen.

Der Hippocampus übernimmt im Bereich Emotionen, Lernen und Gedächtnis sehr vielfältige Aufgaben. Als Teil des Papez-Kreis, den er mit *Fornix*, *Corpora mamillaria*, *Gyrus cinguli* und dem *entorhinalen Kortex* bildet, wurde er schon früh als limbische Schlüsselstruktur erkannt.

Der Hippocampus spielt insbesondere beim deklarativen Gedächtnis und dem räumlichen Vorstellungsvermögen eine wichtige Rolle (Squire, 1992). Im Hippocampus fließen Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen, die verarbeitet und von dort zum Kortex zurückgesandt werden. Damit ist er unabdingbar für die Gedächtniskonsolidierung, der Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis. Menschen mit Hippocampusläsionen können keine neuen Erinnerungen formen und weisen somit eine anterograde Amnesie auf. Detaillierte Informationen über die Morphologie des Hippocampus bieten Amaral und Witter (1989), Bernard und Wheal (1994) sowie Patton und McNaughton (1995).

Die drei Hauptregionen des Hippocampus sind der *Gyrus dentatus*, das *Cornu ammonis* (=Ammonshorn, CA), welches man in CA1, CA2 und CA3 unterteilt, und das *Subiculum* (Kandel et al., 2000).

Der *Gyrus dentatus* stellt eine der wichtigsten Eingangsstationen des Hippocampus dar. Seine erregenden, glutamatergen Körnerzellen erhalten wichtige Informationen über den so genannten *Tractus perforans*. Die Axone der Körnerzellen verlaufen als *Moosfasern* zur CA3. Abzweigungen von Axonen von Pyramidenzellen verknüpfen von hier aus die Kette weiter bis in die CA1-Region, von wo aus Efferenzen zum anterioren olfaktorischen Nukleus, zum basalen Nukleus der Amygdala sowie zu anterioren und dorsomedialen hypothalamischen Arealen und zum präfrontalen Kortex ziehen. Entorhinaler Kortex, Gyrus Dentatus, CA3 und CA1 bilden somit durch den Tractus perforans, die Mossfasern und die Schaffer-Kollateralen eine exzitatorische trisynaptische Kaskade (s. Abb. 5).

Neben den Pyramiden- und Körnerzellen beherbergt der Hippocampus mehrere Klassen inhibitorischer Neurone, welche GABA als Neurotransmitter nutzen und durch Vorwärts- und Rückwärtshemmung das hippocampale Netzwerk modulieren.

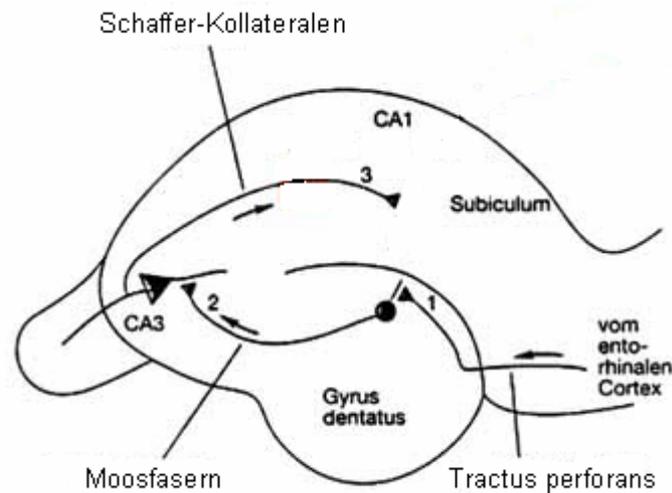


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines hippocampalen Transversalschnittes mit seinen wichtigsten neuronalen Elementen und intrinsischen Verschaltungen. Tractus perforans, Moosfasern und Schaffer-Kollaterale bilden eine exzitatorische trisynaptische Kaskade (1-3).

1.4.2.1 Die Rolle des Hippocampus bei der Furcht-Konditionierung

Die Rolle des Hippocampus bei der Furcht-Konditionierung ist sehr vielfältig. Eine mögliche rein sensorische Rolle des Hippocampus konnte ausgeschlossen werden, da Läsionen, die einige Zeit nach dem Training der Furcht-Konditionierung gesetzt wurden, den Konditionierungsvorgang nicht beeinträchtigten (Kim und Fanselow, 1992; Maren et al., 1997). Eine entscheidende Rolle spielt der Hippocampus vor allem bei der kontextabhängigen Konditionierung. Im Gegensatz zur Konditionierung mit einem spezifischen Hinweisreiz (hier Ton), nimmt bei der kontextabhängigen Konditionierung die Umgebung während der Konditionierung die Rolle des CS ein. Eine tonabhängige Konditionierung kann allerdings auch kontextabhängig sein, solange Training und Abruf des Furchtgedächtnisses im gleichen Kontext stattfinden. Läsionsstudien des Hippocampus zeigten eine Störung der kontextabhängigen Konditionierung, während die tonabhängige Konditionierung unbeeinträchtigt blieb (Phillips und LeDoux, 1992; Kim und Fanselow, 1992). Zum gleichen Ergebnis führte die lokale hippocampale Infusion von AP5, einem NMDA-Rezeptor Antagonisten (Young et al., 1994). Der Hippocampus bearbeitet die Informationen des Kontexts und sendet sie an die Amygdala weiter, wo sie dann mit dem UCS (z.B. Fußschock) assoziiert werden (Rudy et al., 2004).

Die Gedächtnisrolle des Hippocampus bei der kontextabhängigen Konditionierung scheint

allerdings zeitlimitierend zu sein. So zeigten Läsionen, die lange Zeit nach dem Training der Konditionierung durchgeführt wurden, im Gegensatz zu Läsionen kurz nach dem Training, keinen Einfluss auf das kontextabhängige Verhalten von Ratten. Die Rolle des Hippocampus wird somit eher auf die Formation und Konsolidierung des kontextabhängigen Gedächtnisses beschränkt (Anagnostaras et al., 1999). Weiterhin wird vermutet, dass der Hippocampus in seiner Funktion durch den Neokortex ersetzt werden kann, solange die Läsion vor dem Training durchgeführt wurde (Fanselow, 2000).

Bei der Extinktion ist die Rolle des Hippocampus noch nicht ganz geklärt. Diskutiert wird er als ein möglicher Modulator des mPFC, der bei der Extinktion eine entscheidende Rolle einnimmt. Vorübergehende Inaktivierung des Hippocampus mit Muscimol, einem GABA_A Rezeptor - Agonisten, vermindert die Erneuerung der Furcht als Antwort auf einen gelöschten CS (Maren et al., 2001). Elektrische Stimulationen des Hippocampus führen zu explosionsartigen Entladungen der Zellen im ventro-medialem PFC (vmPFC) (Tierney et al., 2004) und modulieren die Antwort der vmPFC Neurone zur BLA (Ishikawa und Nakamura, 2003).

1.4.3 Präfrontaler Kortex (PFC)

Der präfrontale Kortex (PFC) ist ein Teil des Frontallappens der Großhirnrinde.

Durch seine direkte Verbindung mit der Amygdala wird der PFC nach neusten Theorien ebenfalls zum (erweiterten) limbischen System gezählt (Verwer et al., 1996).

Der präfrontale Kortex lässt sich in 3 Hauptgebiete einteilen. Das erste Gebiet, der mediale Bereich des PFC, besteht dorsal aus präzentralem Kortex (PrC) und anteriorem cingulärem Kortex (ACC), und ventral aus prälimbischem (PrL), infralimbischem (IL) und medial-orbitalem Kortex (MO). Das zweite Gebiet, der orbitale Bereich, umfasst die dorsale und ventrale agranuläre Insular (AID, AIV) sowie den lateralen orbitalen Kortex (LO). Das dritte Gebiet setzt sich aus dem ventral-orbitalem (VO) und dem ventral-lateral-orbitalem (VLO) Kortex zusammen (Dalley et al., 2004).

Klinische Untersuchungen und Läsionsstudien ergaben eine funktionelle Beteiligung des PFC bei der zeitlichen Strukturierung von Verhaltensweisen und Lernvorgängen (Kolb, 1984). Ebenso wird ihm eine Schlüsselrolle beim Arbeitsgedächtnis, das eine besondere Form des Kurzzeitgedächtnisses darstellt und sowohl für die Bildung als auch für den Abruf von Informationen, vor allem des deklarativen Gedächtnisses, erforderlich ist, zugeschrieben (Kesner, 2000).

Anatomisch ist der präfrontale Kortex hoch organisiert und erhält Informationen von subkortikalen Strukturen wie Amygdala, Hippocampus, Substantia nigra, ventralem Tegmentum, lateralem Hypothalamus und kortikalen Strukturen wie dem posteriorem Parietalcortex sowie kortikalen sensorischen Gebieten (Groenewegen et al., 1997). Ebenso sendet er zu all diesen Strukturen auch Efferenzen. Weitere Ziele des PFC sind noradrenerge Zellen des zentralen Grau, dopaminerge Neurone im ventralen Tegmentum, serotonerge Neurone der Raphé-Kerne und cholinerge Neurone im Vorderhirn (Guldin et al., 1981; Groenewegen et al., 1997).

1.4.3.1 Die Rolle des PFC bei der Furcht-Konditionierung

Im Bezug auf das Thema Furcht nimmt der präfrontale Kortex, insbesondere die Region des IL, bei der Extinktion eine Schlüsselrolle ein. Die Stimulationen des medialen PFC (mPFC) führt zur Abschwächung der Zellaktivitäten im Nucleus centralis (CE) der Amygdala, welcher für die furchtabhängigen Verhaltensänderungen zuständig ist (Quirk et al., 2003) und bewirkt somit z.B. eine Verminderung der Schreckstarre (Milad und Quirk, 2002). Ebenso wurde bei Ratten mit einer mPFC Läsion eine erhöhte Resistenz gegenüber der Extinktion beobachtet (Morgan et

al., 1993). Inzwischen ist bekannt, dass die Neurone des mPFC, durch die exzitatorischen Projektionen zu GABAergen Zellen der basolateralen Amygdala (BLA), hemmenden Einfluss auf den CE der Amygdala zeigen (Rosenkranz et al., 2003; Quirk et al., 2003; Likhtik et al., 2005). 24 Stunden nach der Extinktion zeigt der mPFC daher erhöhte Zellaktivität (Milad et al., 2002; Maren und Quirk, 2004).

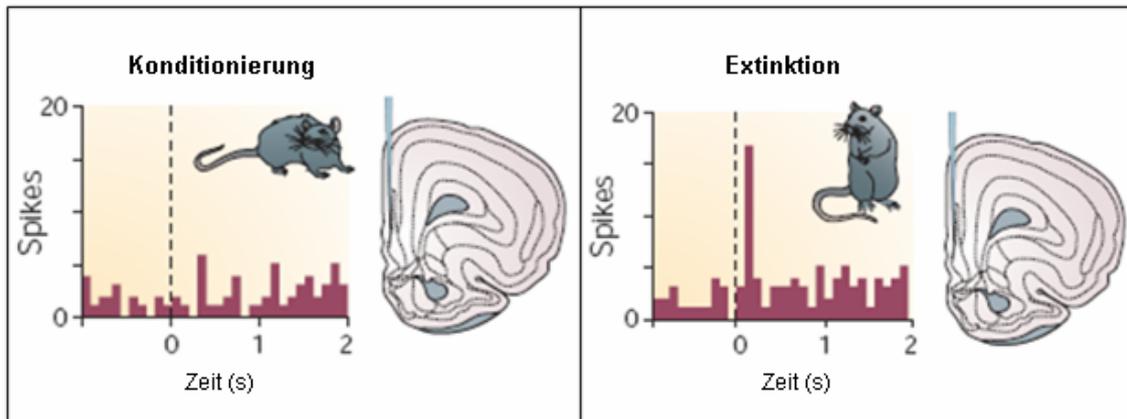


Abbildung 6: Neuronale Aktivitäten im medialen präfrontalen Kortex (mPFC) während der Konditionierung und der Extinktion. Zu beobachten ist die deutliche Zunahme der Zellaktivität (,Spikes') während der Extinktion. (modifiziert nach Maren und Quirk, 2004)

Neuste Studien zeigen weitere Erkenntnisse bezüglich der NMDA-Rezeptor-abhängigen Konsolidierung der Extinktion im mPFC. Die Infusion von 3,2-Carboxypiperazin-propyl-1-phosphat (CPP), einem NMDA-Rezeptor Antagonisten, in den ventral-medialen PFC (vmPFC) vor bzw. sofort nach dem Extinktionstraining hat keinen Einfluß auf das Extinktionstraining direkt, verhindert jedoch den Abruf des Extinktionsgedächtnisses 24 Stunden später. Weiterhin wurde durch systemische CPP Injektion eine selektive Abnahme von schnellen, plötzlichen Entladungssalven (,burst firing') im vmPFC beobachtet, was dafür sprechen könnte, dass diese spezifische Entladung der Zellen für die Konsolidierung der Extinktion unabdingbar ist (Burgos-Robles et al., 2007).

1.5 Feldpotential-Aktivitäten

Die Grundlage eines jeden Organismus ist die Kommunikation von Zellen. Die Kommunikation zwischen einzelnen kortikalen Neuronen wird mithilfe von Synapsen ermöglicht, die den Neuronen als Kontaktstellen dienen. Unter einem Feldpotential versteht man den Spannungsabfall am Widerstand des Extrazellulärraumes (Pape, 2004b). Feldpotentiale werden von extrazellulären Strömen erzeugt und können im Zwischenzellraum der Zellen des ZNS abgeleitet werden. Sie stehen vor allem mit der synaptischen Aktivität der Zellen des ZNS in Verbindung und erlauben daher Rückschlüsse auf die Kommunikation der Zellen untereinander

(Speckmann und Walden, 1991). Feldpotential-Aktivitäten können mit Hilfe von implantierten Elektroden am freibeweglichen Tier abgeleitet werden.

1.5.1 Feldpotential-Aktivitäten in LA, CA1 und PFC

Extrazellulär abgeleitete Summenpotentiale von Neuronen oder Neuronengruppen (sog. Feldpotentiale), die durch erregende und hemmende synaptische Aktivitäten generiert werden, dienen der Charakterisierung neuronaler Aktivitäten spezifischer Hirnregionen.

Wie sich das Furchtverhalten in den neuronalen Aktivitäten widerspiegelt, kann am freibeweglichen Tier durch implantierte Elektroden aufgezeichnet werden.

So wurden konditionierungsabhängige Änderungen in den Feldpotentialen in verschiedenen Hirnbereichen wie z.B. Amygdala, Thalamus und Kortex festgestellt (Kamikawa et al., 1964, O'Brien et al., 1969). Man hat beobachtet, dass durch CS hervorgerufene Signale in der LA nach der CS-UCS Paarung größer sind als Signale durch ungepaarte CS- bzw. UCS-Darbietung (Oleson et al., 1975). Furcht-Konditionierung führt beispielsweise zu erhöhten auditorisch-evozierten Feldpotentialen in der LA von Ratten (Rogan et al., 1997).

Im zentralen Nervensystem sind rhythmisch-synchronisierte Aktivitäten um 2-15 Hz ein weit verbreitetes Phänomen (Klimesch, 1996) und können als neuronales Kommunikationselement zwischen verschiedenen Hirnstrukturen angesehen werden. Diese ‚Theta-Frequenzen‘ sind in fast allen limbischen Strukturen vorherrschend (Alonsa und Llinas, 1989; Klink und Alonsa, 1993; Buzsaki und Draguhn, 2004). Man vermutet, dass durch synchrone neuronale Aktivitäten verschiedene Hirnregionen spezifische Verhaltensweisen exprimieren und kognitive Prozesse, wie Lernen und Gedächtnis generieren (Ventriglia F., 2008; Buzsaki G., 2005).

Mögliche zelluläre Korrelate in der Amygdala stellen die Projektionsneurone der basolateralen und lateralen Kerne der Amygdala dar, welche 2 Typen langsamer Oszillationen generieren: Unter niedrigschwelliger Aktivierung sind Frequenzen von ca. 1-3,5 Hz zu beobachten (Pape et al., 1998). Die Blockade der niedrigschwelligen Schwingungen und Unterdrückung der Na-Spikes brachte die hochschwelligen Schwingungen mit sich, deren Frequenzen im Mittel zwischen 2 und 6 Hz liegen. Die Mehrheit dieser Projektionszellen in der LA generiert langsame Membranpotential-Schwingungen um ca. 2-10 Hz (Pape et al., 1995; Pape et al., 1998). Während die niedrigschwelligen Schwingungsaktivitäten von Natrium- und M-type Kalium-Strömen moduliert werden, wirken Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} -abhängige Kalium-Kanäle bei den hochschwelligen Schwingungen mit (Pape und Driesang, 1998; Pape und Stork, 2003).

Im Hippocampus von Kaninchen konnten schon 1938 Jung und Kornmüller Oszillationen im Bereich von 5-6 Hz ableiten, welche sie als Theta-Aktivitäten beschrieben. Die CA1-Region des Hippocampus stellt einen besonders geeigneten Ableitungsort dar, da hier die Frequenz der

Theta-Schwingungen am regelmäßigsten und die Amplitude am höchsten ist (Bullock et al., 1990). Die Theta-Aktivitäten im Hippocampus sind abhängig vom Verhalten und werden oft mit Lernvorgängen assoziiert, z.B. wenn Ratten eine bestimmte Gegend erkunden (Vanderwolf, 1969). In Abhängigkeit von der Aktivität der Tiere unterscheidet man: Type-1 Theta mit einer Frequenz von 8-14 Hz, die bei explorativem Verhalten überwiegt, und Type-2 Theta mit einer Frequenz von 4-8 Hz, die in Ruhe vorherrschend ist (Kemp und Kaada, 1975).

Im PFC unterscheidet man abhängig von ihrer Aktivitätsrate drei verschiedene Typen von Pyramidenzellen: Die ‚regular spiking‘ (RS), die ‚intrinsic (inactivating) bursting‘ (IB), und die ‚non inactivating bursting‘ (NIB) Zellen. Die vorherrschende Frequenz aller Zellen ist wiederum die Theta-Frequenz. Bei Aufgaben bezüglich des räumlichen Gedächtnisses zeigte sich eine synchronisierte Theta-Aktivität zwischen PFC und Hippocampus (Jones und Wilson, 2005).

Weiterführend wurde gezeigt, dass Theta-Aktivitäten zwischen der LA und der CA1 Region des Hippocampus insbesondere nach der Furcht-Konditionierung während des ‚Freezing‘-Verhaltens hoch korrelieren (Seidenbecher et al., 2003). Dies lässt darauf schließen, dass LA und CA1 mit ihren Theta-Aktivitäten besonders zur synaptischen Modifikation beim Furchtgedächtnis und der Expression von furchtabhängigem Verhalten beitragen. Im Gegensatz zum CA1-LA-Netzwerk bleibt die Theta-Synchronisation im PFC-LA- und im PFC-CA1-Netzwerk während des Extinktionslernens erhalten (Narayanan et al., 2007a). Der präfrontale Kortex nimmt folglich innerhalb des LA-PFC-CA1 Netzwerkes eine vermittelnde funktionelle Rolle während der Furchtgedächtniskonsolidierung und der Extinktion ein (Pape et al., 2005).

2 Ziel der Arbeit

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist als wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter des Zentralnervensystems unabdingbar für die Beibehaltung des sensiblen Gleichgewichts aus Exzitation und Inhibition bei der Entstehung und Expression von Angst und konditionierter Furcht. GABA wird mithilfe des Enzyms Glutamat-Decarboxylase (GAD) synthetisiert, von dem zwei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, GAD65 und GAD67, existieren. Durch gezielte Deaktivierung des GAD-kodierenden Gens können Defizite im Organismus entstehen, die Rückschlüsse auf die Funktion des Enzyms zulassen. Besonders im Bereich des Angst- und Furchtverhaltens können durch eine Veränderung im Stoffwechsel von GABA und GAD Defizite auftreten. Hier gilt es, die generelle Ängstlichkeit und konditionierte Furcht sowohl auf Verhaltens-, als auch auf elektrophysiologischer Ebene zu untersuchen. Besonders über die Aufgabe der kleineren Isoform der Glutamatdecarboxylase, GAD65, ist noch wenig bekannt. Die Auswirkung der Deletion des Gens auf nur einem Allel wurde bisher kaum untersucht. Es stellt sich die Frage, ob heterozygote GAD65 defiziente Tiere das Fehlen des einen Allels für GAD65 ausreichend kompensieren können oder ob Defizite auftreten, wie sie von homozygoten GAD65 defizienten Tieren bekannt sind.

Im Hinblick auf die Funktionstüchtigkeit nur eines intakten Allels der GAD65 soll in dieser Arbeit die Bedeutung von GABA und GAD65 für 1.) generelle Ängstlichkeit in verschiedenen Verhaltenstests (Light-Dark-Test, Dark-Light-Test, Elevated-Plus-Maze-Test) 2.) Furchtlernen, unter besonderer Berücksichtigung von Furchtgedächtnis-Abruf („Retrieval“), Extinktion und Abruf des Extinktionsgedächtnisses nach auditorischer Furcht-Konditionierung und 3.) neuronale Aktivitäten (Theta-Synchronisation) im dreiseitigem Netzwerk Amygdala-Hippocampus-Präfrontaler Kortex während Retrieval und Extinktion untersucht und analysiert werden.

Zum Vergleich der heterozygoten GAD65^{+/-} Genotypen mit den homozygoten GAD65^{-/-} bzw. GAD65^{+/+} Genotypen sowie mit C57B/6J-Kontrollmäusen werden für den elektrophysiologischen Teil dieser Arbeit Ergebnisse aus aktuellen Studien von Dr. S. Sangha und Dr. R. Narayanan herangezogen.

3 Material /Methoden

3.1 Tiere

Für die Versuche wurden männliche GAD65^{+/-}, GAD65^{-/-}, GAD65^{+/+} u. C57B/6J-Kontrollmäuse im Alter von 2 – 6 Monaten verwendet.

Aufgezogen wurden die Mäuse in Gruppen von 4-6 Mäusen in Standardkäfigen (37,5cm x 21,5cm x 18cm). Etwa eine Woche bevor die Untersuchungsreihe begann, wurden sie in Einzelboxen (22cm x 16cm x 14cm) untergebracht.

Die Mäuse erhielten Futter und Wasser *ad libitum* und unterlagen einem 12/12 Stunden – Tag – Nacht – Rhythmus. Die Experimente fanden immer zwischen 9 und 17 Uhr statt.

Für die Tierversuche lag eine Genehmigung des Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Münster vor (G53/2005; ‚Neurophysiologische Korrelate von Furchtverhalten und Furchtgedächtnis in dem Schaltkreis Amygdala-Hippokampus-Präfrontaler Kortex‘).

3.2 Verhaltenstests

Das Verhalten der Maus wurde während der einzelnen Tests grundsätzlich auf Video aufgezeichnet und diente der Analyse der generellen, natürlichen Ängstlichkeit der Tiere.

3.2.1 Light-Dark-Test / Dark-Light-Test

Die Apparatur des Light-Dark- bzw. Dark-Light-Test besteht aus einem hellen und einem dunklen Kompartiment. Beide Kompartimente sind jeweils 16cm x 16cm x 16cm groß und mit einem 5cm x 5cm Durchgang verbunden (s. Abb. 7).

Das Verhalten der Maus wird über einen Zeitraum von fünf Minuten beobachtet. Zu Beginn wird das Tier zuerst entweder in das helle (Light-Dark-Test) oder das dunkle Kompartiment (Dark-Light-Test) gesetzt.

Das ‚FCS-Programm‘ (Furcht-Konditionierungs-System; Kat.-Nr. 303410, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) misst mithilfe von Lichtschranken, wann sich das Tier wo aufhält. Registriert und analysiert wurden: die Aufenthaltsdauer und die lokomotorische Aktivität im hellen und im dunklen Kompartiment; die Gesamtaktivität bezüglich der Laufstrecke in cm sowie die Anzahl der Wechsel zwischen den Kompartimenten.



Abbildung 7: Maus in der Box für den Light-Dark bzw. Dark-Light Test.

3.2.2 Elevated – Plus – Maze – Test

Die Apparatur des Elevated – Plus – Maze (EPM) besteht aus vier erhöhten Armen, welche in einem Kreuz 70cm über dem Boden angeordnet sind (s. Abb. 8). Zwei der gegenüberliegenden Arme besitzen hohe Seitenwände und werden daher als geschlossene Arme bezeichnet, während die anderen beiden Arme keine Wände haben und daher als offene Arme bezeichnet werden (je 5cm x 30cm). In der Mitte befindet sich eine zentrale Plattform, von der aus das Tier in jeden der vier Arme gelangen kann. Das Verhalten der Maus wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten beobachtet. Registriert und analysiert wurden: Aufenthaltsdauer und Anzahl der Eintritte in offene und geschlossene Arme, sowie die Gesamtaktivität der Tiere bezüglich der Laufstrecke in cm.



Abbildung 8: Die Elevated – Plus – Maze Apparatur.

3.3 Implantation der Elektroden

Vor der Narkose wurde die Maus gewogen. Für die Narkose wurde 0,25mg/kg Narkoren i.p. injiziert. Die Mäuse wurden in Narkose stereotaktisch eingespannt mit horizontaler Lage von Bregma und Lambda der Schädelkalotte.



Abbildung 9: Maus in stereotaktischer Apparatur zur Implantation der Elektroden.

Nach der Fixation wurden die Haare der Schädeloberfläche und die Kopfhaut in einem Durchmesser von ca. 1cm entfernt. Mit H₂O₂ wurde die Schädeldecke gründlich gesäubert und die Koordinaten für die Elektrodenpositionen zur Messung spontaner Feldpotential-Aktivitäten in PFC, LA und CA1 Region des Hippocampus wurden nach dem stereotaktischen Atlas von Paxinos und Franklin (2001) für jede Maus von Bregma ausgehend berechnet (s. Abb. 10).

PFC:	AP: 2,0 mm;	ML: 0,3 mm;	DV: 2,3 mm
LA:	AP: -1,7mm;	ML: 3,8 mm;	DV: 3,0 mm
CA1:	AP: -1,9 mm;	ML: 1,2 mm;	DV: 1,2 mm

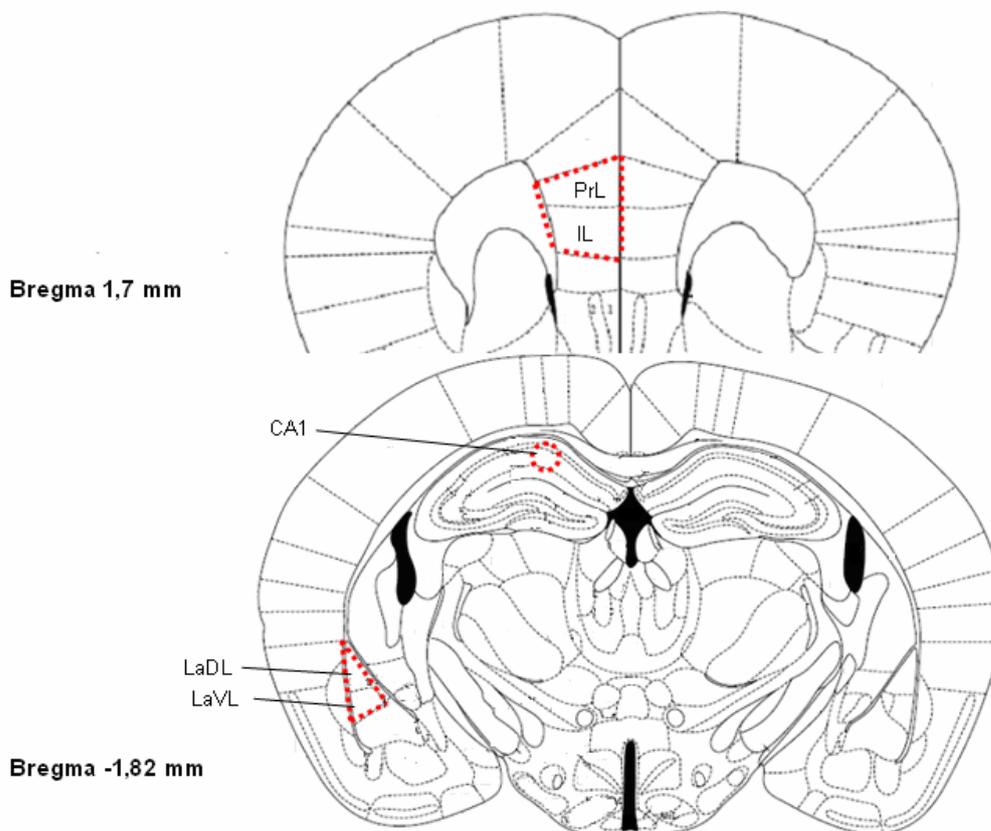


Abbildung 10: Frontal-Schnitte durch das Mäusegehirn in Höhe von Bregma 1,7mm und Bregma -1,82mm. Die rotumrandeten Bereiche stellen die gewünschten Elektrodenlokalisationen dar: Präfrontaler Kortex, Hippokampus (CA1) und Laterale Amygdala. PrL: Prälimbischer Kortex; IL: Infralimbischer Kortex; LaDL: dorsolateraler Teil der lateralen Amygdala; LaVL: ventrolateraler Teil der lateralen Amygdala. (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2001)

An den vorbestimmten Punkten wurde mithilfe eines Trepanationsbohrers die Schädeldecke trepaniert (\varnothing 1mm). Für die intracerebralen Messungen wurden Elektroden aus Teflon-isoliertem Edelstahldraht (\varnothing 125 μ m) der Firma ‚Franco Corradi‘ verwendet.

Zusätzlich wurden Tepanationen für die Erdungs- (AP -2,3mm; ML 2,5mm) und die Referenzelektrode (AP 1,9mm; ML 1,8mm) aus Silberdraht angefertigt.

Nach der Implantation wurden die Elektroden mit Dentalzement fixiert. Anschließend wurden sie durch einen Gummisockel gezogen und erneut mit Dentalzement befestigt.

In der postoperativen Erholungsphase (3-4 Tage) unterlagen die Tiere in Einzelhaltung bei Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* einem geordneten Tag-Nacht-Rhythmus (12/12h).

3.4 Furcht - Konditionierung

3.4.1 Kontext

Zur Kontrolle kontextueller Einflüsse auf das Verhalten wurden zwei unterschiedliche Kontextbedingungen in jeweils unterschiedlichen Räumen geschaffen („Schock-Kontext“ s. Abb. 11; „neutraler Kontext“ s. Abb. 14). Die Kontexte unterschieden sich bezüglich der Untergrundbeschaffung (Gitterrost vs. Streu), Käfiggröße (21cm x 36cm x 21,5cm vs. 22cm x 16cm x 14cm), Belichtung (200Lux „Käfiglicht“ vs. 900Lux „Raumlicht“), Hintergrundgeräuschen (60dB nur im „Schock-Kontext“) und Geruch (mit Ethanol gesäuerter Käfig vs. Streugeruch). Adaptation und Training fanden im „Schock-Kontext“ statt, während die Tiere sich bei dem Abruf des Furchtgedächtnisses („Retrieval“) und bei der Extinktion im „neutralen Kontext“ aufhielten.

3.4.2 Adaptation

3-4 Tage nach dem chirurgischen Eingriff begann die Furcht-Konditionierung mit zwei Adaptationssitzungen zur Gewöhnung der Tiere an die Trainingsapparatur. Eine Adaptationssitzung dauerte sechs Minuten. Sechs 2,5kHz –Töne („CS-“, 85dB, je 10s) wurden im Abstand von 20 Sekunden präsentiert. Vor und nach den Tönen verbrachte das Tier 120 bzw. 140 Sekunden in der Trainingsapparatur (s. Abb. 12). Der „CS-“ –Ton dient als sogenannter neutraler Reiz, der nicht aversiv konditioniert wird, zur Kontrolle. Im Abstand von drei Stunden erfolgte eine zweite Adaptationssitzung.

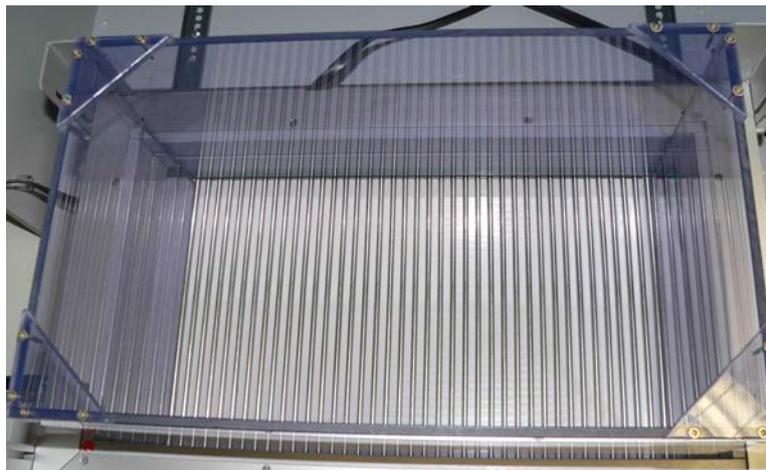


Abbildung 11: Die Trainingsapparatur als „Schock-Kontext“ für die Adaptation und das Training der Furcht-Konditionierung.

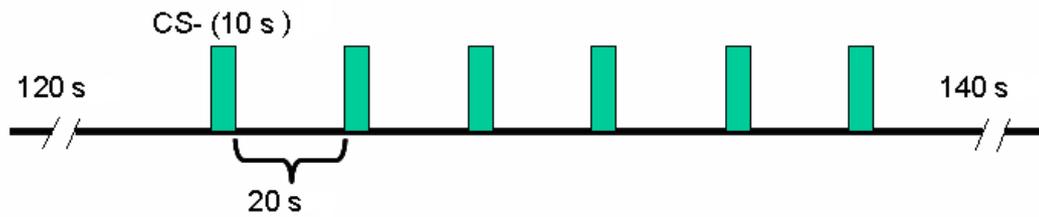


Abbildung 12: Tonabfolge während der Adaptation. Sechs CS- Töne (2,5kHz; 85dB) werden im Abstand von 20 Sekunden appliziert.

3.4.3 Training

24 Stunden nach der ersten Adaptation folgte ein erstes Training. Hierbei wurden mit einer Verzögerung von 120 Sekunden im Abstand von 20 Sekunden drei 10kHz-Töne (,CS+', 85dB, je 9s) jeweils mit einem elektrischem Fußreiz (UCS; 0,4mA; 1s) gepaart (s. Abb. 13). Vorher und nachher verbrachte das Tier 120 bzw. 140 Sekunden in der Trainingsapparatur. Dies wurde in einem zweiten Training, wiederum 24 Stunden später, wiederholt. Der Fußschock wurde über das Bodengitter der Trainingsapparatur gegeben.

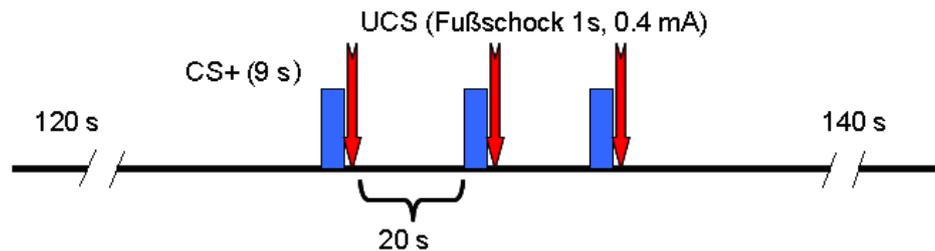


Abbildung 13: Abfolge von Ton und Fußschock während des Trainings. Jeweils drei CS+ Töne (10kHz) werden mit einem 0,4mA Fußschock gepaart.

3.4.4 Abruf des Furchtgedächtnisses (,Retrieval')

24 Stunden nach dem zweiten Training erfolgte das Abrufen des Furchtgedächtnisses (,Retrieval') im ,neutralen Kontext' (s. Abb. 14). Nach 60 Sekunden wurde zunächst vier Mal der Kontrollton (,CS-') mit 20 Sekunden Pause nach jedem Ton präsentiert und nach 40 Sekunden folgte vier Mal der konditionierte Stimulus (,CS+') mit ebenfalls 20 Sekunden Pause nach jedem Ton. Im Anschluss wurden weitere 60 Sekunden aufgezeichnet (s. Abb. 15).



Abbildung 14: Maus während des Retrievals. Unter Verwendung eines ‚Swivels‘ können Feldpotential-Aktivitäten in PFC, LA und CA1 am freibeweglichem Tier aufgezeichnet werden.

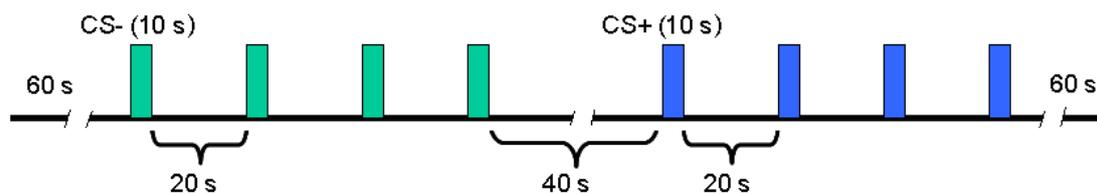


Abbildung 15: Tonabfolge während des Retrievals. Auf vier CS- Töne (2,5kHz) folgen vier CS+ Töne (10kHz).

Das Verhalten wurde beobachtet und mithilfe von folgenden Kategorien registriert:

- ‚Freezing‘ = ‚Schreckstarre‘; komplette Bewegungsstarre mit Ausnahme von Atembewegungen als Ausdruck starker Furcht;
- ‚Flight‘ = schnelle Exploration als Ausdruck eines Fluchtversuches
- ‚Risk-assessment‘ = aufmerksames Umherschauen als Zeichen der Gefahrenabschätzung;
- ‚Exploration‘ = Tiere erkunden die Käfigumgebung;
- ‚Rearing‘ = Aufrichten auf die Hinterbeine;
- ‚Sleeping/Resting‘ = Schlaf bzw. Ruhe

3.4.5 Extinktions-Training

Nach dem ersten Retrieval (R1) wurde die Tonabfolge des Retrievals im Abstand von jeweils 30 Minuten noch fünf Mal wiederholt (R2-R6 = Extinktions-Training).

3.4.6 ‚Extinktions-Recall‘

24 Stunden nach dem ersten Retrieval wurde die gleiche Tonabfolge zwei Mal mit 30 Minuten Abstand erneut dargeboten, um das Extinktionsgedächtnis zu überprüfen.

3.4.7 Reinstatement

Nach den beiden Durchgängen des ‚Extinktions-Recalls‘ und weiteren 30 Minuten Pause erfolgte ein ‚Reinstatement‘ durch einen somato-sensiblen Stimulus (mechanische Stimulation des Mäuseschwanzes). Im Anschluss wurden ein letztes Mal die Töne des Retrievals appliziert.

3.5 Ungepaarte Konditionierung

Um sensorisches Antwortverhalten von konditioniertem Antwortverhalten unterscheiden zu können und unspezifische Einflüsse zu differenzieren, wurde eine sogenannte ungepaarte Konditionierung in einer separaten Gruppe von Mäusen durchgeführt.

Die Kontrollgruppe durchlief das gleiche Schema wie die konditionierten Mäuse, mit dem Unterschied, dass den Kontroll-Mäusen beim Training der Fußschock (UCS; 0,4mA; 1s) und der ‚CS+‘-Ton (10kHz; 85dB; 10s) ohne zeitliche Koinzidenz („ungepaart“) voneinander dargeboten wurden (s. Abb. 16). Mit einer Verzögerung von 120 Sekunden wurde zunächst der Fußschock im Abstand von 20 Sekunden drei Mal appliziert und danach folgte mit einer Pause von 120 Sekunden drei Mal der ‚CS+‘-Ton ebenfalls im Abstand von je 20 Sekunden. Im Anschluss verbrachte das Tier weitere 140 Sekunden in der Trainingsapparatur.

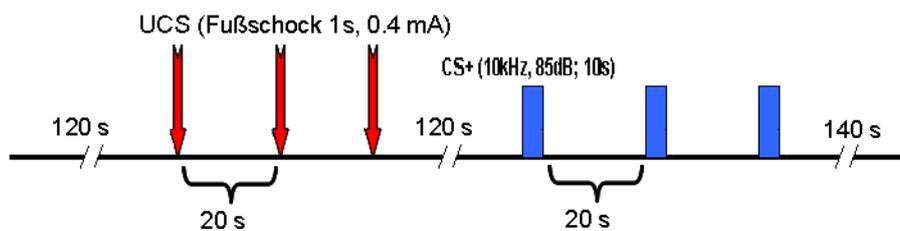


Abbildung 16: Abfolge von Fußschock und ‚CS+‘- Ton während des Trainings der Kontrollgruppe. Bei dieser ‚ungepaarten Konditionierung‘ werden Fußschock und ‚CS+‘- Ton zeitlich getrennt von einander dargeboten.

3.6 Elektrophysiologische Aufnahmen und Analyse

Die Feldpotentiale in den einzelnen Hirnarealen wurden mithilfe eines Differentialverstärkers (EPMS07, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland; Filter: 1-30Hz) und einer 1kHz Sampling Rate erfasst, mit einem A/D-Wandler transformiert (CED Power 1401, Cambridge Electronics Design limited, Cambridge, UK) und sowohl auf Videoband als auch auf einem Computer gespeichert. Das Verhalten der Tiere wurde analog dazu genauestens beobachtet und notiert.

Mithilfe von ‚Spike 2‘ (Spike2 version 5.06, Cambridge Electronics Design limited, Cambridge, UK) konnten die gesammelten Daten bezüglich des PFC-LA-CA1 Netzwerkes analysiert und Kreuzkorrelogramme zwischen LA-CA1, LA-PFC und PFC-CA1 erstellt werden. Als Referenzwert galt jeweils der zweite positive Gipfel im Kreuzkorrelogramm, der als Korrelationswert abgelesen wurde. Kreuzkorrelogramme wurden mithilfe der Feldpotential-Aktivitäten jeweils sowohl 10 Sekunden vor der Präsentation des CS+ (‚Baseline‘), als auch während der 10 Sekunden des CS+ (‚Stimulus bezogen‘) und während des Freezings (über mindestens 3 Sekunden) erstellt und interpretiert.

Fast-Fourier-Spektrogramme, zur Veranschaulichung des Frequenzbereiches der Feldpotential-Aktivitäten, wurden mithilfe von ‚Matlab‘ (Version 6.5.0.180913a Release 13, The MathWorks, Inc., USA) erstellt. Ein Beispiel zur Datenerfassung und Analyse von Originalspuren zeigt Abbildung 17.

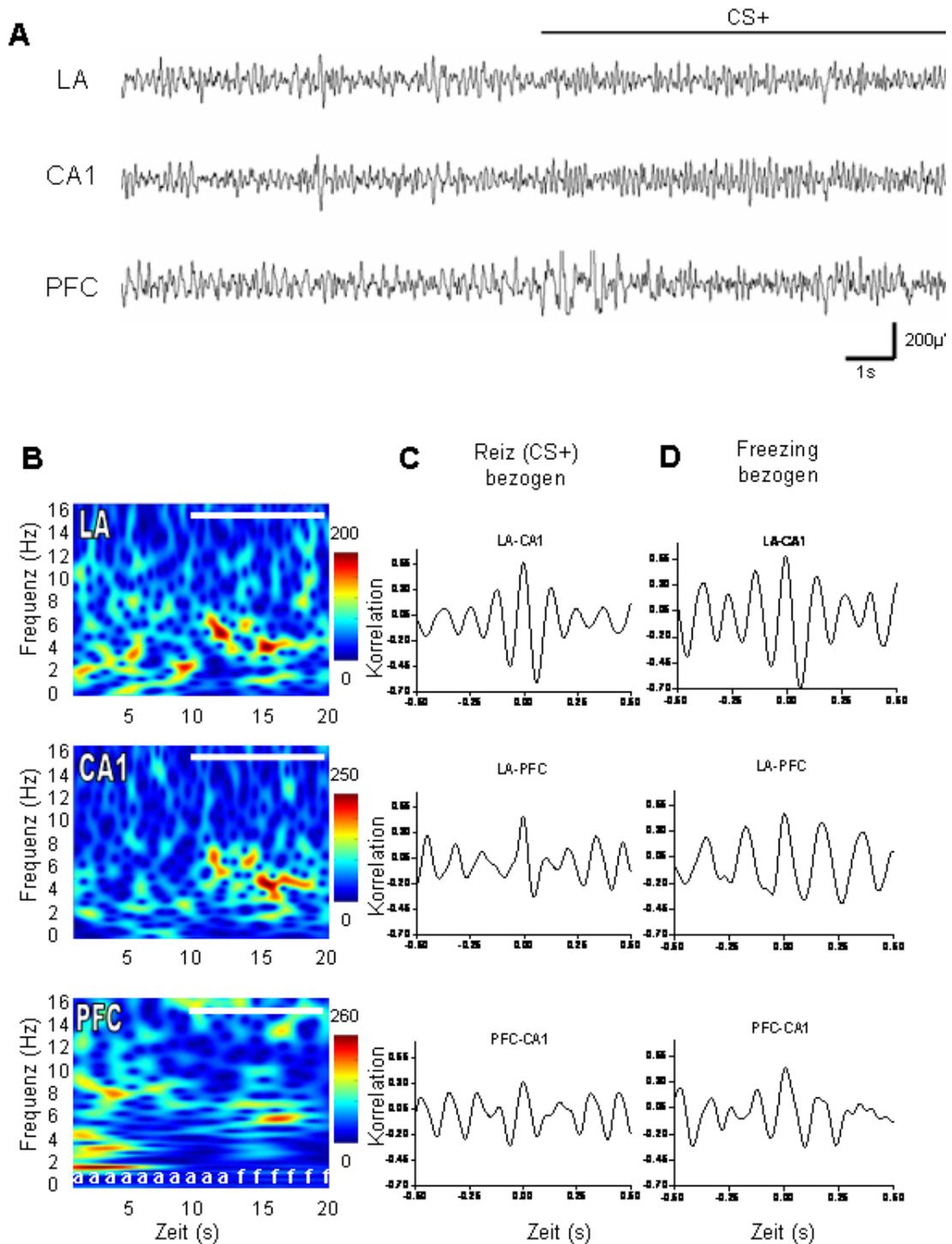


Abbildung 17: Neuronale Aktivitäten in LA, PFC und CA1 Region des Hippocampus. (A) Originalspuren von Feldpotentialen aus LA, PFC und CA1-Region des Hippocampus 10 Sekunden vor dem CS+ („Baseline“) und während der Präsentation des CS+. (B) Fast-Fourier-Spektrogramme der Originalspuren in A. Zu erkennen sind Aktivitäten im Theta-Frequenz-Bereich (der horizontale weiße Balken steht für die Dauer der Präsentation des CS+). (C) Kreuz-Korrelationen zwischen LA-CA1, LA-PFC und PFC-CA1 bezogen auf den CS+. (D) Kreuz-Korrelationen zwischen LA-CA1, LA-PFC und PFC-CA1 bezogen auf die Zeit des Freezings während des CS+. a, ‚risk assessment‘; f, ‚Freezing‘.

3.7 Histologie

Nach Versuchsende wurden die Mäuse durch eine Überdosis Isofluran getötet. Zur Verifizierung der Elektrodenposition (s. Abb. 18) wurden über die implantierten Elektroden elektrolytische (15 x 4mA; 1s) Läsionen gesetzt. Anschließend wurde das Hirn entnommen und für 6-7 Tage in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (pH 7,4) fixiert. Nach weiteren 3 Tagen in 30%iger Sucroselösung wurde das Gehirn mit einem Gefriermikrotom in 60µm Schnitte aufgearbeitet, auf einen Objektträger aufgezogen, mit Cresyl Violet (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) angefärbt und eingedeckelt.

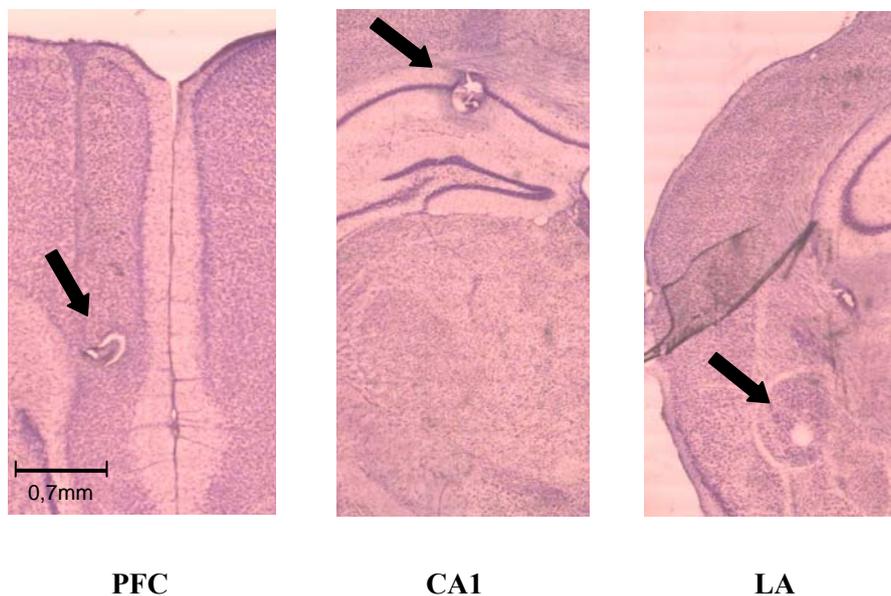


Abbildung 18: Ausschnitte von Cresyl Violet angefärbten Hirnschnitten im Bereich von PFC, CA1 und LA mit markierten Läsionen (Pfeile) an den Stellen, an denen die Elektroden zur Ableitung der Feldpotential-Aktivitäten gesessen haben.

3.8 Statistik

Die statistische Analyse der Verhaltens- und elektrophysiologischen Daten wurden mithilfe von GraphPad Prism 4 (Version 4.03) durchgeführt. Signifikante Abweichungen wurden mithilfe des Mann-Whitney und des Students-t-Tests überprüft (Signifikanzniveau $p < 0.05$). Getestet wurden die Ergebnisse der verschiedenen Genotypen untereinander als auch die Ergebnisse innerhalb der einzelnen Gruppen bezüglich Retrieval, Extinktions-Trainings, Extinktion-Recall und Reinstatement. Ebenso wurden signifikante Abweichungen bezüglich der synchronisierten neuronalen Aktivitäten für die Baseline (10 Sekunden vor dem CS+) und während des CS+ überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Verhaltenstests

4.1.1 Light-Dark – Test

In diesem Versuch gab es bezüglich der Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment keine signifikanten Abweichungen zwischen den GAD65-Genotypen (s. Abb. 19). Tendenziell verbrachten GAD65^{-/-} Mäuse mehr Zeit im hellen Kompartiment, gefolgt von GAD65^{+/-} und GAD65^{+/+}. Im Vergleich zu den C57B/6J-Kontrollmäusen (104,4 ± 24,5s) war die Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment sowohl bei den GAD65^{+/-} (144,7 ± 51,6s; $p < 0,05$) als auch GAD65^{-/-} Genotypen (162,0 ± 50,6s; $p < 0,05$) signifikant länger.

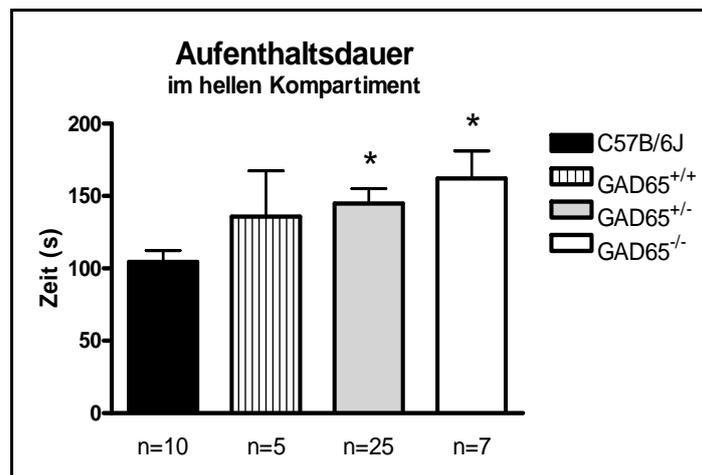


Abbildung 19: Genotypenvergleich hinsichtlich der Aufenthaltsdauer (Zeit in s) im hellen Kompartiment während des Light-Dark-Tests (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber den C57B/6J-Kontrollmäusen, $p < 0,05$).

Die lokomotorische Aktivität aller GAD65-Mäuse, sowohl im Hellen als auch im Dunkeln, zeigte ebenfalls keine signifikanten Abweichungen (s. Abb. 20/21). Im hellen Kompartiment lag diese zwischen 31% und 43% der gesamten Beobachtungszeit, wobei sie tendenziell von GAD65^{+/+} nach GAD65^{-/-} zunahm. Im Dunkeln betrug die lokomotorische Aktivität im Mittel zwischen 37% und 43%. Tendenziell nimmt sie von GAD65^{+/+} nach GAD65^{-/-} ab.

Ein signifikanter Unterschied bestand jeweils bei den GAD65^{+/-} (38,8 ± 11,6% bzw. 41,4 ± 13,2%, $p < 0,05$) und GAD65^{-/-} (42,7 ± 7,8% bzw. 37,2 ± 13,9%; $p < 0,05$) Genotypen gegenüber den C57B/6J Kontrollmäusen (29,7 ± 6,8% bzw. 53,2 ± 7,0%).

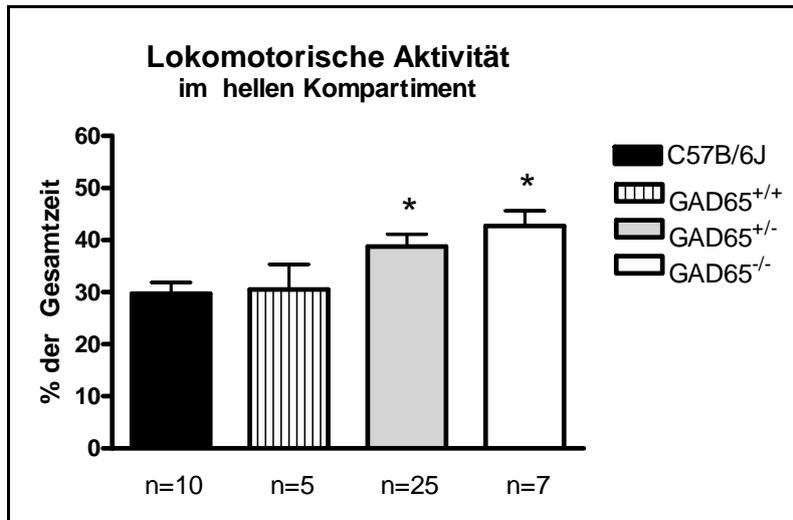


Abbildung 20: Lokomotorische Aktivität im hellen Kompartiment (in % der Gesamtzeit) während der fünfminütigen Beobachtung im Light-Dark-Test (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, $p < 0.05$).

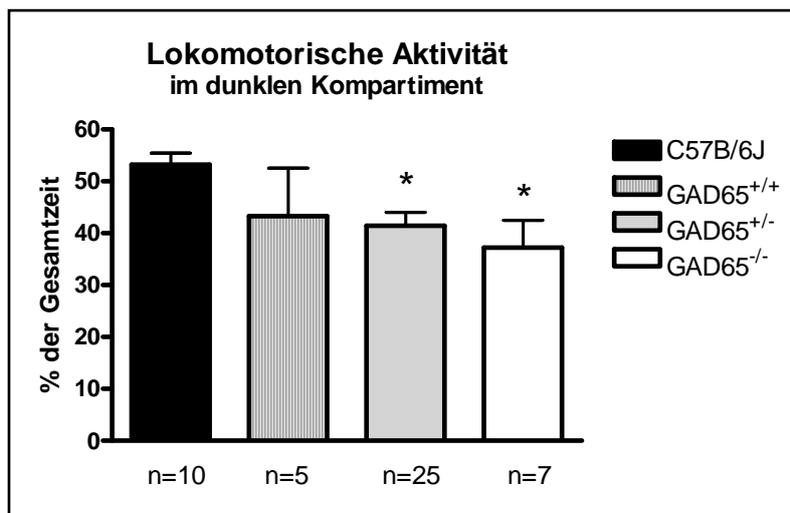


Abbildung 21: Lokomotorische Aktivität im dunklen Kompartiment (in % der Gesamtzeit) während der fünfminütigen Beobachtung im Light-Dark-Test (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, $p < 0.05$).

In der Gesamtaktivität (Laufstrecke in cm; s. Abb. 22) zeigte sich eine signifikante Abweichung von GAD65^{+/-} (8770 ± 1183 cm; $p < 0.05$) gegenüber GAD65^{-/-} (10570 ± 1872 cm). Die C57B/6J-Kontrollmäuse (10585 ± 1148 cm; $p < 0.05$) waren ebenfalls signifikant aktiver als die GAD65^{+/-}Mäuse.

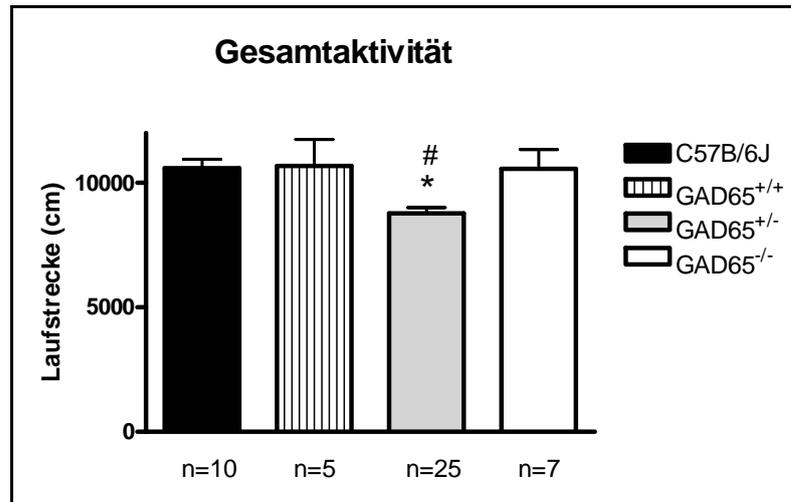


Abbildung 22: Gesamtaktivität (Laufstrecke in cm) während des Light-Dark-Tests (Mittelwerte + SEM, * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen; # signifikant abweichend gegenüber GAD65^{-/-}, $p < 0.05$).

Das Wechseln von einem Kompartiment in das andere variierte im Mittel zwischen 11 und 13 (s. Abb. 23). Signifikante Abweichungen oder Tendenzen bezüglich der Genotypen wurden nicht gefunden (C57B/6J, $y = 14,3 \pm 4,4$; GAD65^{+/+}, $y = 11,0 \pm 3,0$; GAD65^{+/-}, $y = 13 \pm 3,8$; GAD65^{-/-}, $y = 12,7 \pm 6,3$).

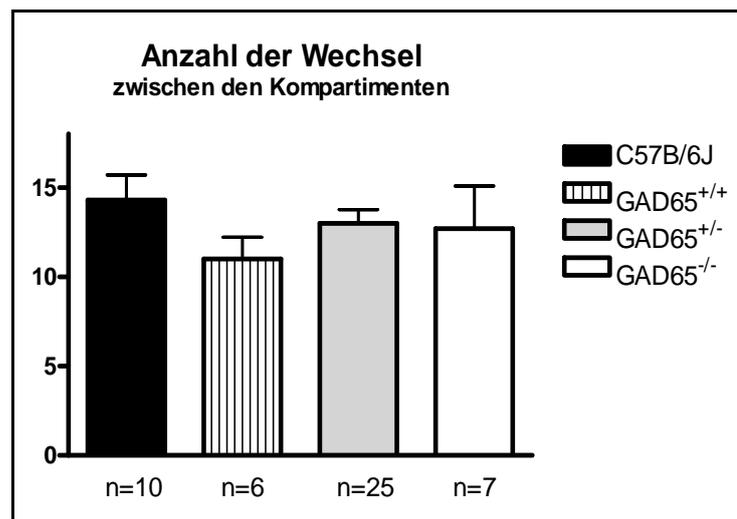


Abbildung 23: Anzahl der Wechsel von einem in das andere Kompartiment während des Light-Dark-Tests (Mittelwerte + SEM). Keine signifikanten Abweichungen.

ERGEBNISSE

4.1.2 Dark-Light – Test

Die Ergebnisse des Dark-Light-Tests bestätigten die Tendenzen der Ergebnisse des Light-Dark - Tests. Bezüglich der Zeit, die im hellen Kompartiment verbracht wurde, gab es keine signifikanten Abweichungen zwischen den GAD65-Genotypen (s. Abb. 24). Tendenziell verbrachten GAD65^{-/-} Mäuse mehr Zeit im hellen Kompartiment, gefolgt von GAD65^{+/-} und GAD65^{+/+}. Im Vergleich zu den C57B/6J-Kontrollmäusen (91,0 ± 31,1s) war die Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment sowohl bei den GAD65^{+/-} (139,3 ± 69,6s; p < 0,05) als auch GAD65^{-/-} Genotypen (167,7 ± 32,8s; p < 0,05) signifikant länger.

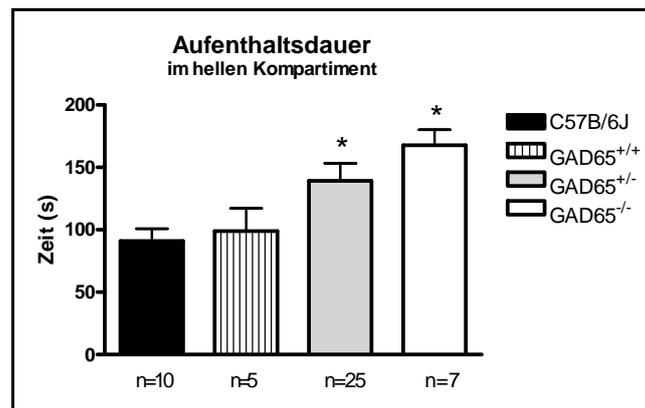


Abbildung 24: Genotypenvergleich hinsichtlich der Aufenthaltsdauer (Zeit in s) im hellen Kompartiment während des Dark-Light-Tests (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, p < 0.05).

Die lokomotorische Aktivität im Hellen zeigte ebenfalls von GAD65^{+/+} nach GAD65^{-/-} eine aufsteigende Tendenz (s. Abb. 25). Im Dunkeln war die Tendenz von GAD65^{+/+} nach GAD65^{-/-} absteigend.

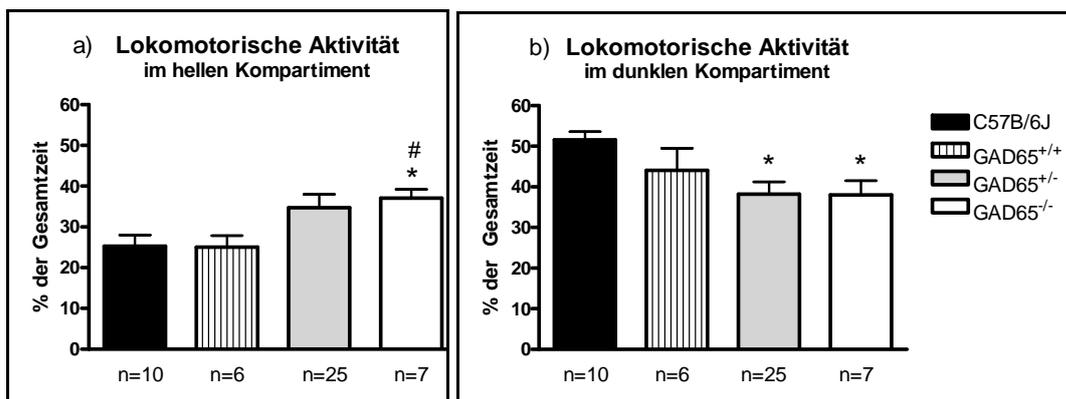


Abbildung 25: Locomotorische Aktivität im hellen (a) und im dunklen (b) Kompartiment (in % der Gesamtzeit) während der fünfminütigen Beobachtung im Dark-Light-Test (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, # signifikant abweichend gegenüber GAD65^{+/+}, p < 0.05).

ERGEBNISSE

In der Gesamtaktivität (Laufstrecke in cm) zeigten sich weder signifikante Abweichung noch Tendenzen zwischen den GAD65-Genotypen (s. Abb. 26).

GAD65^{+/-} (7684,8 ± 1795,9cm; p < 0.05) und GAD65^{-/-} (8077,9 ± 1367,0cm, p < 0.05) legten signifikant kürzere Strecken zurück als C57B/6J-Kontrollmäuse (10175,9 ± 1619,0cm).

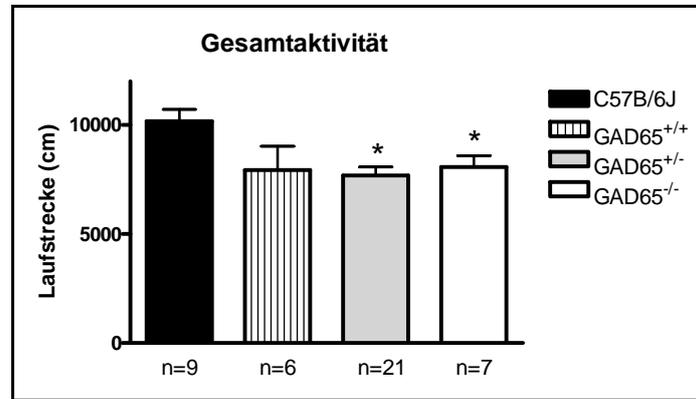


Abbildung 26: Gesamtaktivität (Laufstrecke in cm) während des Dark-Light-Tests (Mittelwerte + SEM, * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, p < 0.05).

Bei der Anzahl der Wechsel von einem in das andere Kompartiment gab es weder Tendenzen noch signifikante Abweichungen (C57B/6J, y = 12,8 ± 4,1; GAD65^{+/+}, y = 8,0 ± 3,2; GAD65^{+/-}, y = 11,5 ± 5,6; GAD65^{-/-}, y = 11,0 ± 3,0).

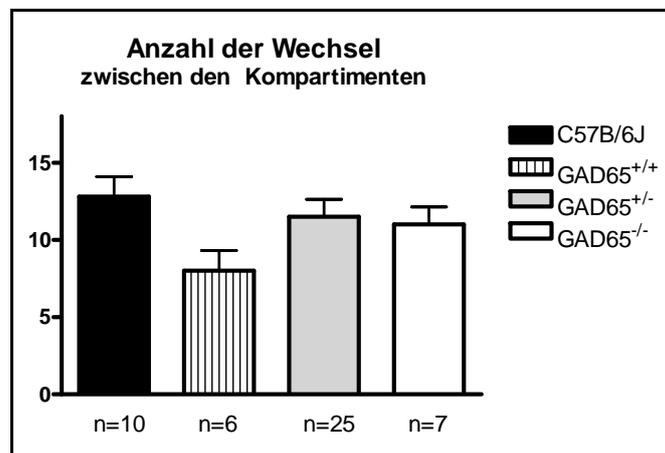


Abbildung 27: Anzahl der Wechsel von einem in das andere Kompartiment während des Dark-Light - Tests (Mittelwerte + SEM). Keine signifikanten Abweichungen.

4.1.3 Elevated-Plus-Maze - Test

Dieser Versuch zeigte bezüglich der Zeit, die auf den offenen Armen verbracht wurde, keine signifikanten Abweichungen zwischen den GAD65-Genotypen (s. Abb. 28; GAD65^{+/+}, 24,3 ± 19,5s; GAD65^{+/-}, 21,1 ± 19,9s; GAD65^{-/-}, 34,8 ± 18,1s). Alle GAD65-Genotypen verbrachten signifikant weniger Zeit auf den offenen Armen als C57B/6J-Kontrollmäuse (70,0 ± 25,9s; $p < 0.05$).

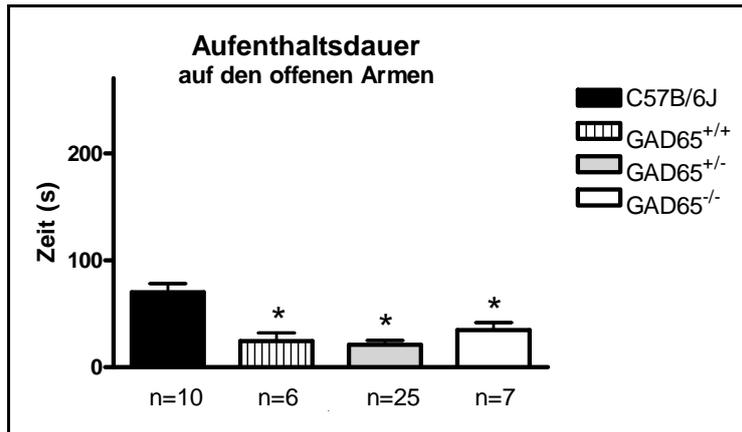


Abbildung 28: Aufenthaltsdauer (Zeit in s) auf den offenen Armen während des fünfminütigen Elevated-Plus-Maze-Tests (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, $p < 0.05$).

Analog dazu verbrachten GAD65^{+/+} (243,9 ± 24,14s; $p < 0.05$) und GAD65^{+/-} (250,0 ± 22,6s; $p < 0.05$) signifikant mehr Zeit auf den geschlossenen Armen als C57B/6J-Kontrollmäuse (178,1 ± 49,4s). GAD65^{-/-} Mäuse (221,0 ± 19,7s; $p < 0.05$) verbrachten signifikant weniger Zeit auf den geschlossenen Armen als GAD65^{+/-} Mäuse.

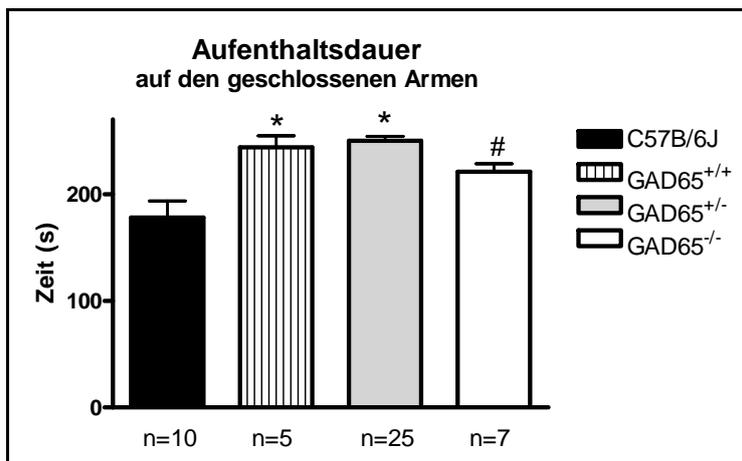


Abbildung 29: Aufenthaltsdauer (Zeit in s) auf den geschlossenen Armen während des fünfminütigen Elevated-Plus-Maze-Tests (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, # signifikant abweichend gegenüber GAD65^{+/-}, $p < 0.05$).

ERGEBNISSE

Die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme war bei $GAD65^{+/-}$ Mäusen ($y = 3,5 \pm 2,0$; $p < 0,05$) signifikant geringer als bei $GAD65^{+/+}$ ($y = 6,5 \pm 1,6$) und $GAD65^{-/-}$ Mäusen ($y = 5,7 \pm 2,5$). Alle $GAD65$ -Genotypen betraten signifikant ($p < 0,05$) weniger die offenen Arme im Vergleich zu C57B/6J-Kontrollmäuse ($y = 11,1 \pm 2,5$).

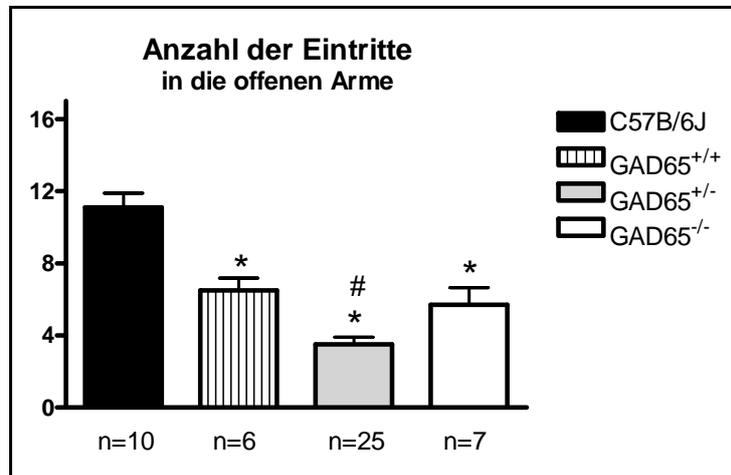


Abbildung 30: Anzahl der Eintritte in die offenen Arme während des fünfminütigen Elevated-Plus-Maze-Tests (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber C57B/6J-Kontrollmäusen, # signifikant abweichend gegenüber $GAD65^{+/+}$ und $GAD65^{-/-}$, $p < 0,05$).

Vergleicht man die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme (s. Abb. 31), betraten die $GAD65^{-/-}$ Mäuse ($y = 15,3 \pm 1,8$) diese signifikant häufiger als die $GAD65^{+/-}$ ($y = 11,5 \pm 4,2$) und $GAD65^{+/+}$ Mäuse ($y = 9,0 \pm 2,4$).

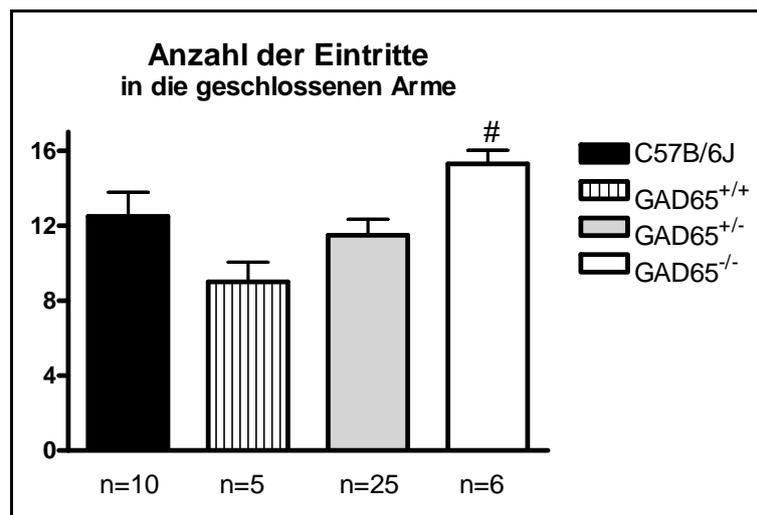


Abbildung 31: Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme während des fünfminütigen Elevated-Plus-Maze-Tests (Mittelwerte + SEM; # signifikant abweichend gegenüber $GAD65^{+/+}$ und $GAD65^{+/-}$, $p < 0,05$).

ERGEBNISSE

Bezüglich der Gesamtaktivität der Tiere (Laufstrecke in cm) waren im Elevated-Plus-Maze-Test die GAD65^{-/-} Mäuse (1001,0 ± 108,0cm; p < 0.05) die signifikant aktivsten Mäuse innerhalb der GAD65-Genotypen. Tendenziell nahm die zurückgelegte Strecke von GAD65^{-/-} über GAD65^{+/-} nach GAD65^{+/+} ab.

Sowohl GAD65^{+/+} (667,1 ± 235,2cm; p < 0.05) als auch GAD65^{+/-} (747,7 ± 190,3cm; p < 0.05) zeigten eine signifikant niedrigere Gesamtaktivität als die C57B/6J-Kontrollmäuse (899,0 ± 148,4cm).

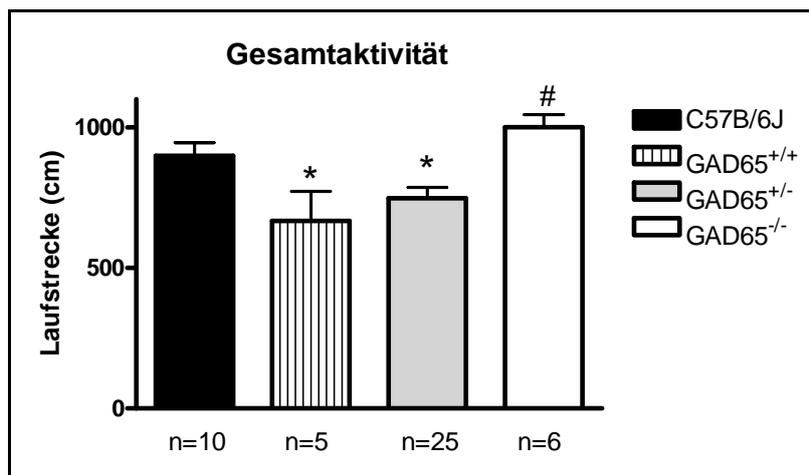


Abbildung 32: Gesamtaktivität (Laufstrecke in cm) während des Elevated-Plus-Maze-Tests (Mittelwerte + SEM; * signifikant abweichend gegenüber den C57B/6J-Kontrollmäusen, # signifikant abweichend gegenüber GAD65^{+/+} und GAD65^{+/-}, p < 0.05).

4.2 Konditioniertes Furchtverhalten

Zunächst wurde die konditionierte Furcht zu der Verhaltensexpression anhand des ‚Freezings‘ in den unterschiedlichen Gruppen (ungepaarte Konditionierung, Furcht-Konditionierung) und Sitzungen (Retrieval, Extinktion, Reinstatement) analysiert. In nächsten Schritten wurde das konditionierte Furchtverhalten in den GAD65-Genotypen vergleichend betrachtet.

4.2.1 Ungepaarte Konditionierung

Die ungepaarte Konditionierung, als Kontrolle der Furcht-Konditionierung, rief bei den GAD65^{+/-} Mäusen weder bei der Präsentation der CS-Töne (60.-170. Sekunde) noch bei der Präsentation der CS+ Töne (200.-310. Sekunde) signifikantes Freezingverhalten hervor.

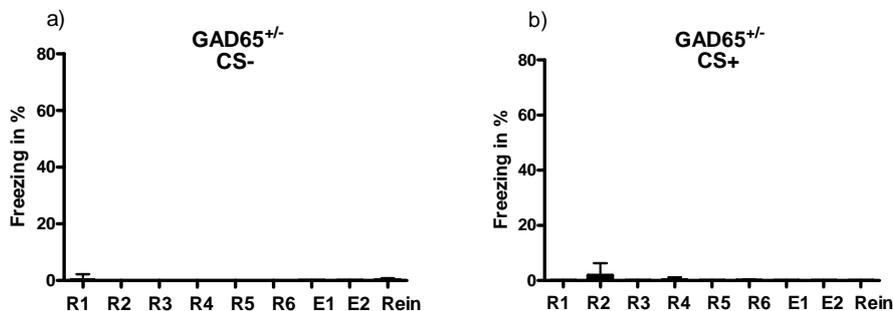


Abbildung 33: Freezing der GAD65^{+/-} Mäuse 24 Stunden nach der ungepaarten Konditionierung a) während der Präsentation der CS- Töne b) während der Präsentation der CS+ Töne (Mittelwerte in Prozent + SEM, n=7; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement).

4.2.2 Furcht-Konditionierung

Einen Tag nach der Furcht-Konditionierung lag die Dauer der Furchtexpression, gemessen als ‚Freezing‘, während der Präsentation des CS- sowohl während des Retrievals als auch während des Extinktions-Trainings immer unter 7% der Gesamtzeit. Während der Präsentation der CS+ Töne lag der Freezinganteil während des Retrievals bei ca. 40% und sank dann ab auf ca. 15%. Die erste signifikante Verringerung des Freezinganteils verglichen mit R1 ($37,2 \pm 15,1\%$) lag bei R5 ($17,7 \pm 21,6\%$; $p < 0.05$).

ERGEBNISSE

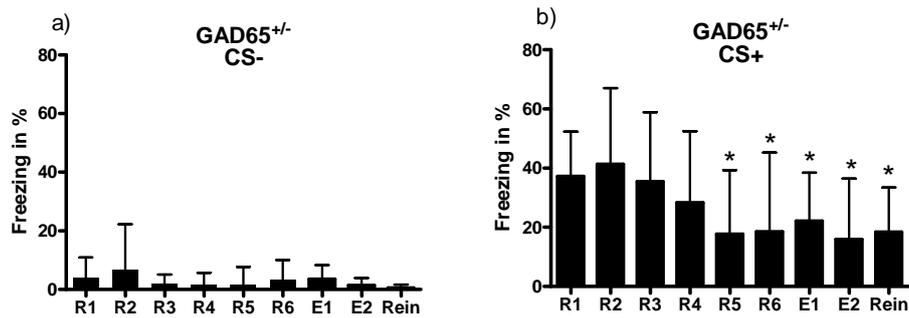
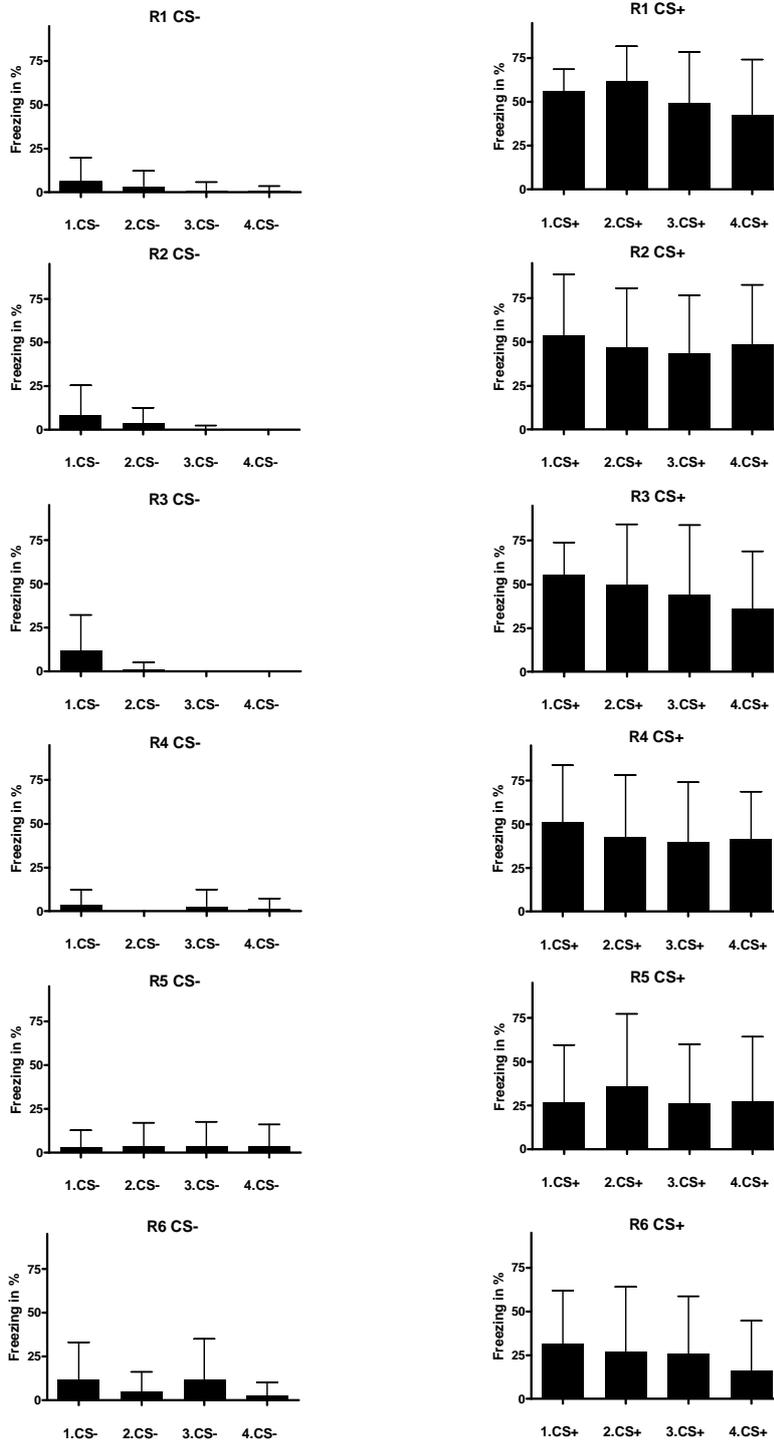


Abbildung 34: Freezing der GAD65^{+/-} Mäuse 24 Stunden nach der gepaarten Konditionierung (R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement) a) während der CS- Präsentation b) während der CS+ Präsentation (Mittelwerte in Prozent + SEM, n=13; * signifikant abweichend (p<0.05) gegenüber R1).

Die Dauer des Freezingverhaltens der GAD65^{+/-} Mäuse während der Präsentation der einzelnen CS- bzw. CS+ Töne, die jeweils aufeinander folgend vier Mal appliziert wurden, zeigte von R1 bis zum Reinstatement jeweils zwischen dem 1.-4. CS Ton, mit Ausnahme des 1.CS- in E1 ($16,4 \pm 17,1\%$; $p < 0,05$), keine signifikanten Abweichungen (s. Abb. 35a,b).

a) **GAD65^{+/-}**



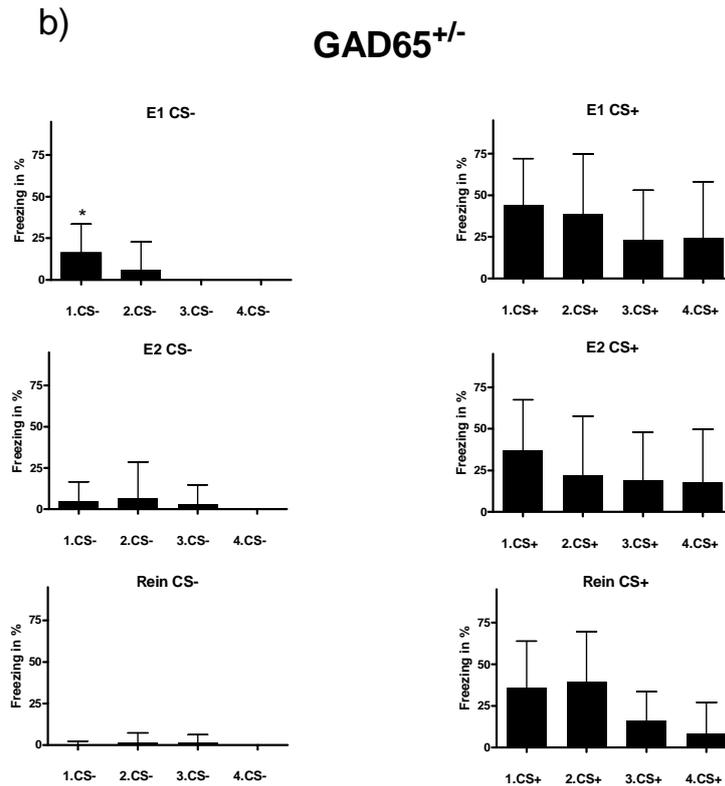


Abbildung 35: Freezing der GAD65^{+/-} Mäuse während der Präsentation des 1.-4. CS- und 1.-4.CS+ (R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall, Rein: Reinstatement) a) R1-R6 b) E1-Rein (Mittelwerte in Prozent + SEM, n=13; * signifikant abweichend ($p < 0.05$) gegenüber dem 3. und 4.CS-).

Zum Vergleich der Ergebnisse der Furcht-Konditionierung der GAD65^{+/-} Mäuse werden an dieser Stelle Daten aus Versuchsreihen von Dr. S. Sangha und Dr. R. Narayanan bezüglich des Freezingverhaltens von GAD65^{+/+}, GAD65^{-/-} und C57B/6J-Kontrollmäusen hinzugezogen. Verglichen wird jeweils der prozentuale Freezinganteil während der Präsentation des 1. CS- und 1. CS+ in R1-R6, E1 und Reinstatement (s. Abb. 36). Im Gegensatz zu C57B/6J-Kontrollmäusen und GAD65^{+/+} Mäusen zeigten GAD65^{-/-} Mäusen während der Präsentation des 1.CS- ein deutliches Freezingverhalten in R1 ($54,6 \pm 14,6\%$), R2 ($42,7 \pm 12,4\%$), E1 ($43,1 \pm 10,5\%$) und Reinstatement ($21,3 \pm 15,6\%$). Die GAD65^{+/-} Mäuse zeigten nur in E1 ($16,4 \pm 17,2\%$; $p < 0.05$) ein signifikantes Freezing gegenüber dem Reinstatement ($0,54 \pm 1,9\%$). Eine signifikante Verminderung des Freezings während der Präsentation des 1.CS+ Tons zeigte sich bei den GAD65^{+/+} und den C57B/6J-Kontrollmäusen schon in R4 ($14,0 \pm 5,9\%$; $p < 0.05$). Bei den GAD65^{+/-} ist dies in R5 ($22,8 \pm 31,3\%$; $p < 0.05$) der Fall und bei den GAD65^{-/-} Mäusen ist ein signifikanter Abfall des Freezings erst in R6 ($5,7 \pm 3,6\%$; $p < 0.05$) zu verzeichnen. Eine erneute Zunahme des Freezings in E1 zeigten nur GAD65^{+/+} ($38,1 \pm 10,9\%$; $p < 0.05$) und GAD65^{-/-} ($75,7 \pm 2,9\%$; $p < 0.05$) signifikant gegenüber R6. Ein signifikanter Abfall ($p < 0.05$)

ERGEBNISSE

des Freezings in E1 gegenüber R1 ist in allen Gruppen, außer bei den GAD65^{+/-} Mäusen (R1; 56,4 ± 12,2%; E1; 44,1 ± 28%), zu erkennen.

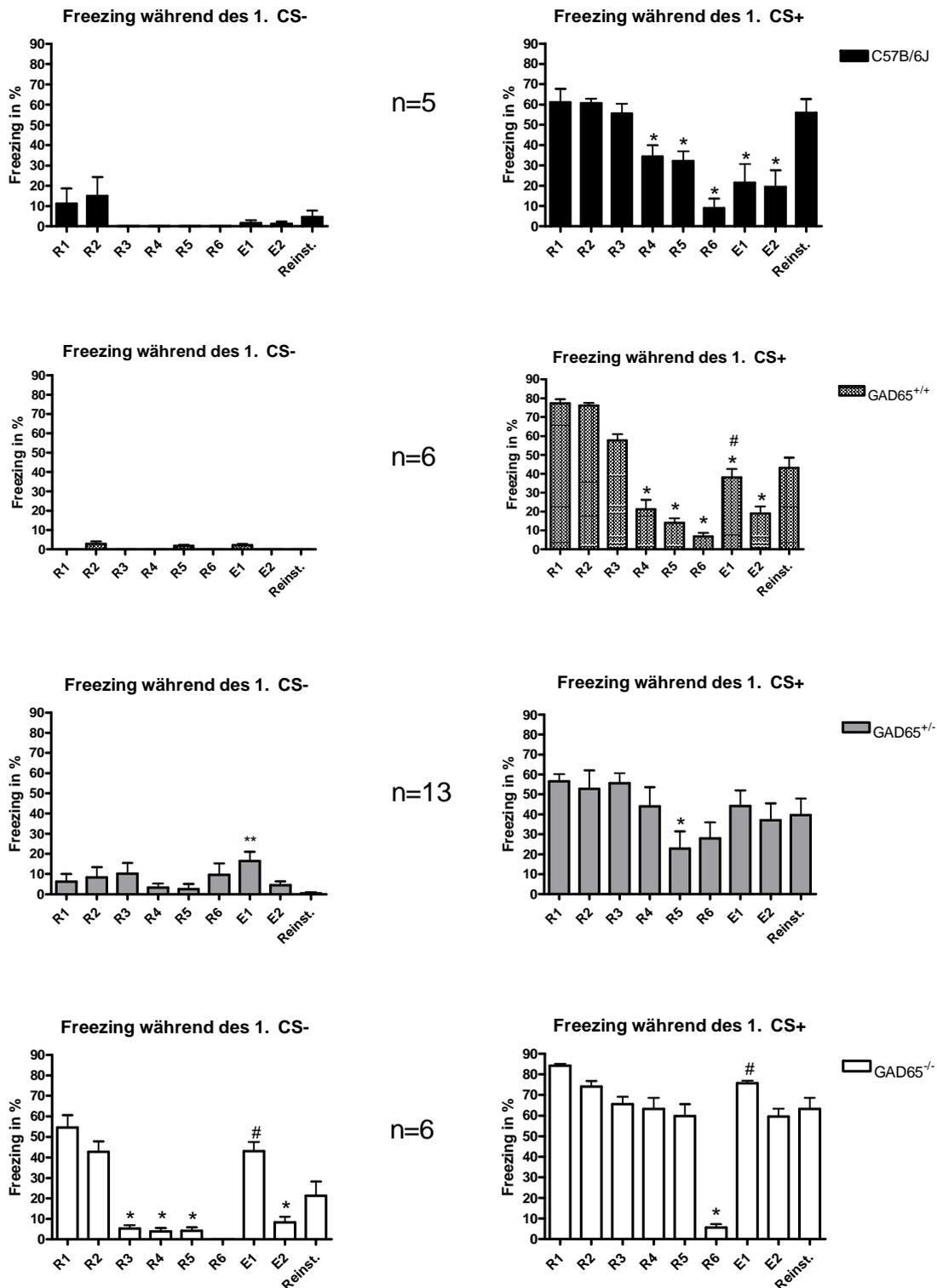


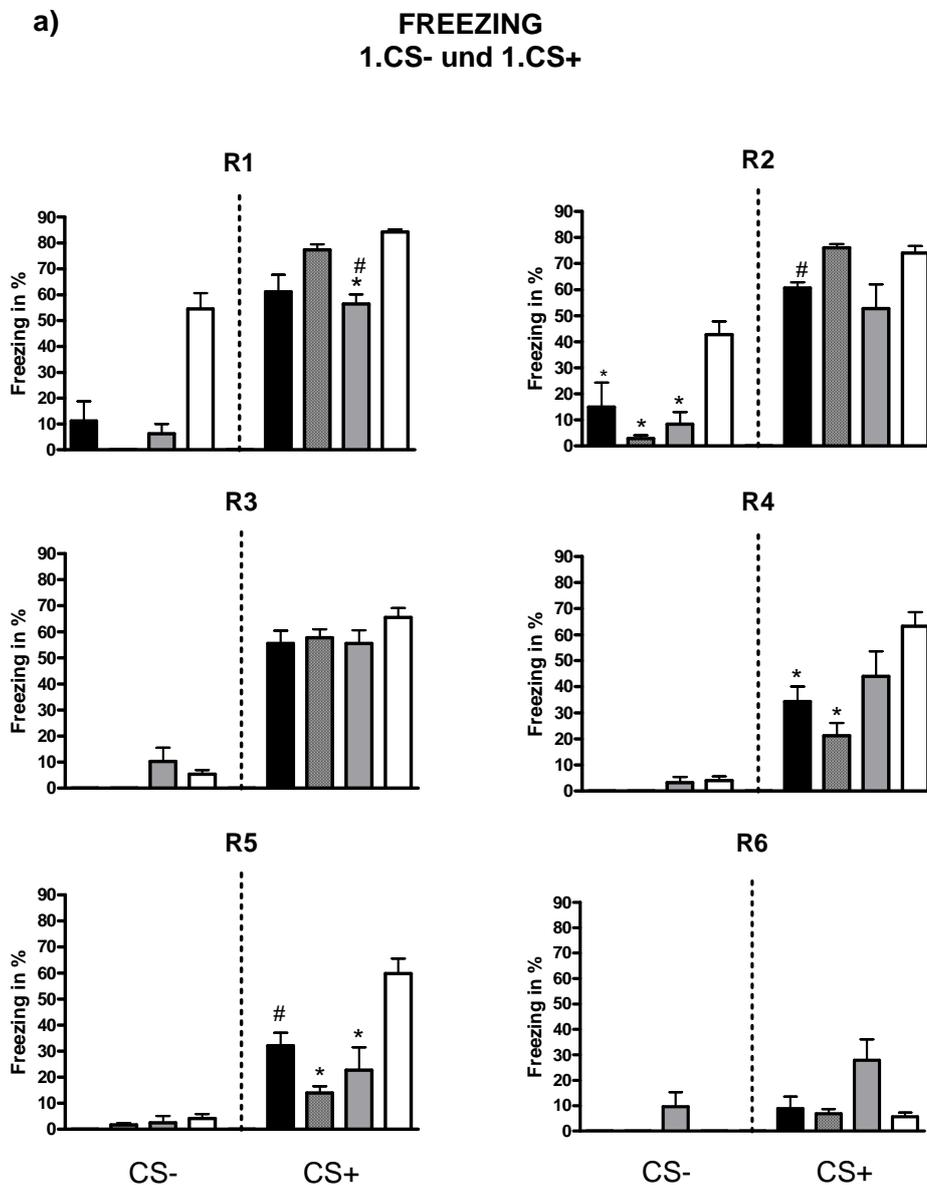
Abbildung 36: Freezing jeweils während der Präsentation des 1.CS- und 1.CS+ (Mittelwerte in Prozent + SEM; * signifikant abweichend ($p < 0.05$) gegenüber R1, # signifikant abweichend

ERGEBNISSE

($p < 0,05$) gegenüber R6, ** signifikant abweichend ($p < 0,05$) gegenüber Reinstatement; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-, Recall', Rein: Reinstatement).

Der Freezinganteil der verschiedenen Genotypen jeweils während der Präsentation des 1. CS- und des 1. CS+, zeigte sich in R1 für die GAD65^{+/-} Mäuse während des 1. CS+ (56,4 ± 12,2%; $p < 0,05$) im Vergleich zu GAD65^{+/+} (77,3 ± 4,9%) und GAD65^{-/-} (84,2 ± 2,4%) ein signifikant geringeres Freezingverhalten (s. Abb. 37).

In R5 war der Freezinganteil der GAD65^{-/-} Mäuse während der Präsentation des CS+ (59,7 ± 14,2%; $p < 0,05$) signifikant höher als bei GAD65^{+/-} (22,8 ± 31,3%) und bei GAD65^{+/+} Mäusen (14,0 ± 5,9%). In R6 war der Freezinganteil von den GAD65^{+/-} Mäusen (27,9 ± 29,3%) zwar sichtbar erhöht, gegenüber den anderen Genotypen ist dies jedoch nicht signifikant.



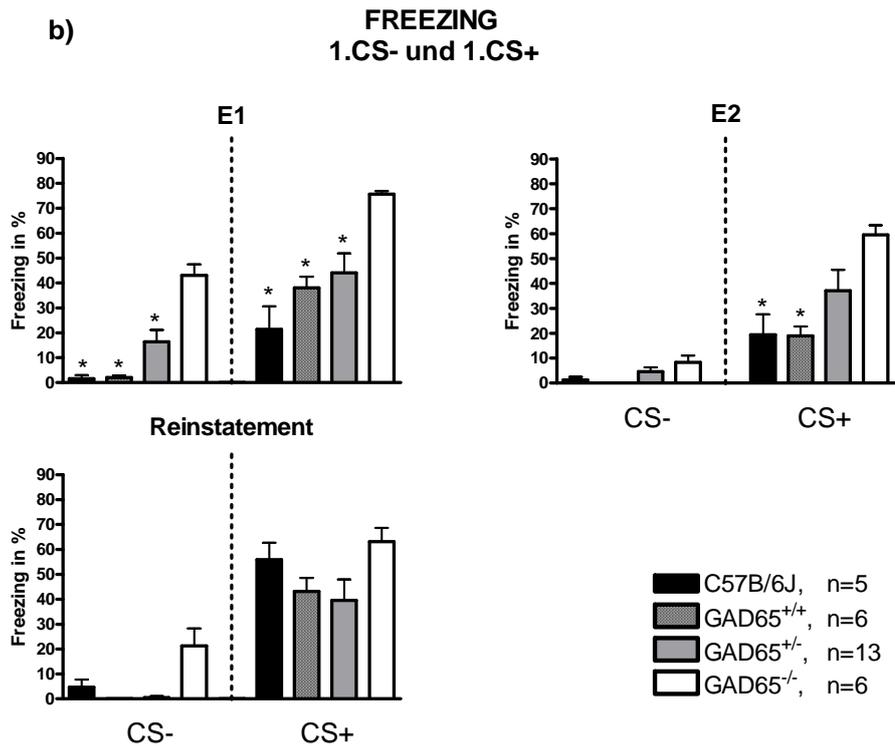


Abbildung 37: Freezing jeweils während der Präsentation des 1.CS- und 1.CS+(R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement) a) R1-R6 b) E1-Rein (Mittelwerte in Prozent + SEM; * signifikant abweichend ($p < 0,05$) gegenüber GAD65^{-/-}, # signifikant abweichend ($p < 0,05$) gegenüber GAD65^{+/+}).

Die Analyse der vorherrschenden Verhaltensreaktionen der GAD65^{+/-} Tiere während der Präsentation des 1.CS- und des 1. CS+ (s. Abb. 38) ergab, dass das ‚Risk assessment‘ während der Präsentation des 1. CS- in R1 ($80,7 \pm 25,3\%$; $p > 0,05$) dominierte. Bis R6 ($53,2 \pm 24,4\%$) reduzierte es sich allerdings bis fast auf die Hälfte und das ‚Resting/Sleeping‘ ($38,3 \pm 40,3\%$) übernahm ebenfalls eine dominierende Rolle.

Während der Präsentation des 1.CS+ in R1 standen das ‚Freezing‘ ($10,8 \pm 20,8\%$) und das ‚Risk assessment‘ ($80,7 \pm 25,3\%$) im Vordergrund. Darüber hinaus wurde Fluchtverhalten (‚Flight‘) in 7 der 13 GAD65^{+/-} Mäuse beobachtet. Dieses machte zwar mit $5,7 \pm 8,8\%$ einen nur kleinen zeitlichen Teil aus, der allerdings bei kurzer Dauer der Einzelreaktion eine starke aversive Antwort anzeigt.

In R6 stand während des 1.CS+ Tons das ‚Risk assessment‘ ($53,2 \pm 24,4\%$) neben dem ‚Freezing‘ ($27,9 \pm 29,3\%$) und dem ‚Resting/Sleeping‘ ($38,3 \pm 40,3\%$) im Vordergrund.

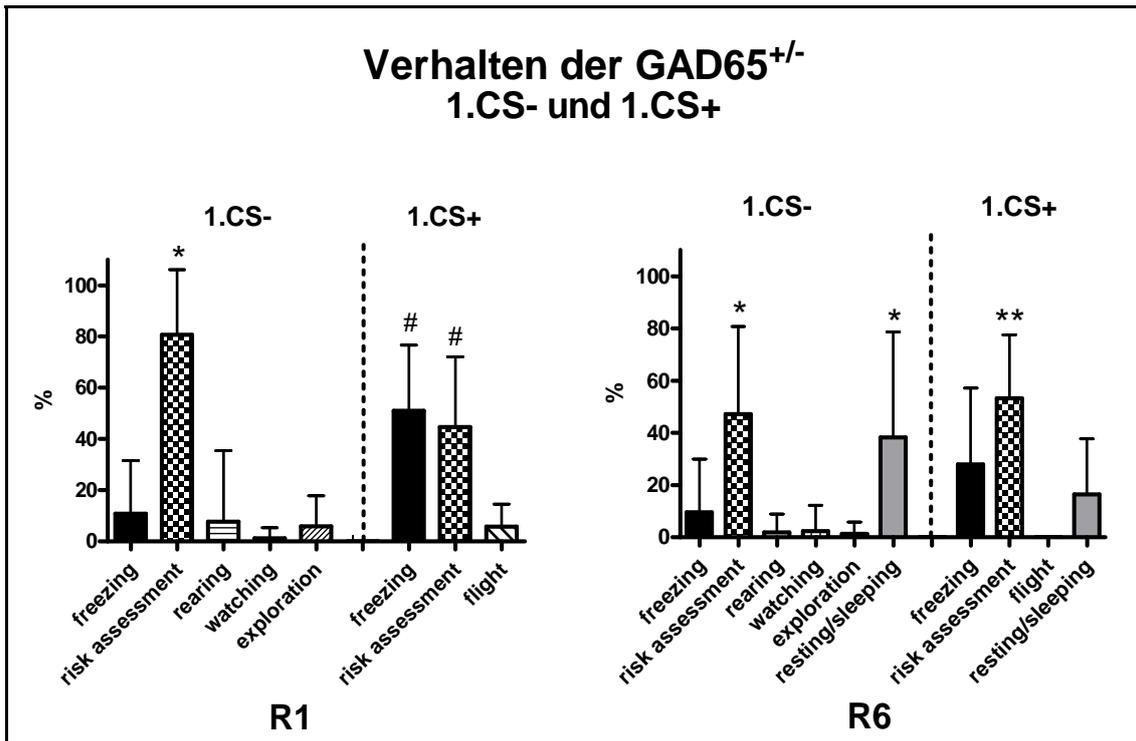


Abbildung 38: Vorherrschende Verhaltensreaktionen der GAD65^{+/-} Mäuse jeweils während der Präsentation des 1.CS- und des 1.CS+ in R1 und R6 (Mittelwerte + SEM, n=13; * p<0,05 ‚risk assessment‘ vs. ‚freezing‘, ‚rearing‘, ‚watching‘, ‚exploration‘; # signifikant abweichend (p<0.05) gegenüber ‚flight‘; **p<0.05 ‚risk assessment‘ vs. ‚freezing‘, ‚flight‘, ‚resting/sleeping‘).

4.3 Elektrophysiologische Aktivitäten

Für die Analyse der elektrophysiologischen Aktivitäten nach der Furchtkonditionierung wurden Feldpotentiale in LA, CA1 und PFC während der verschiedenen Stadien von Furchtgedächtnisabruf, Extinktions-Training und Reinstatement registriert. Das Ausmaß korrelierter Aktivität wurde mit Hilfe von Kreuz-Korrelogramm-Analysen erfasst. Zur Quantifizierung wurde der zweite positive Gipfelwert der Kreuz-Korrelogramme verwendet.

In einem ersten Schritt der Analyse wurden die vorherrschenden Frequenzen der korrelierten Aktivitäten ermittelt. In einem zweiten Schritt wurde die korrelierte Aktivität in Beziehung zur CS+ Präsentation gesetzt und in einem dritten wurde die korrelierte Aktivität in Beziehung zum Reiz (CS+) – induziertem Furchtverhalten gesetzt, das wiederum durch ‚Freezing‘ angezeigt wurde.

4.3.1 Frequenzen

Die aus den Kreuzkorrelationen zwischen LA-CA1, LA-PFC und PFC-CA1 ermittelten Frequenzen lagen bei den $GAD65^{+/-}$ Tieren mit 5,5 bis 8Hz im Theta-Frequenz-Bereich (s. Abb. 38). Signifikante Abweichungen gab es lediglich in E2 zwischen LA-PFC ($5,5 \pm 1,8\text{Hz}$; $p < 0.05$) und LA-CA1 ($7,7 \pm 1,0\text{Hz}$).

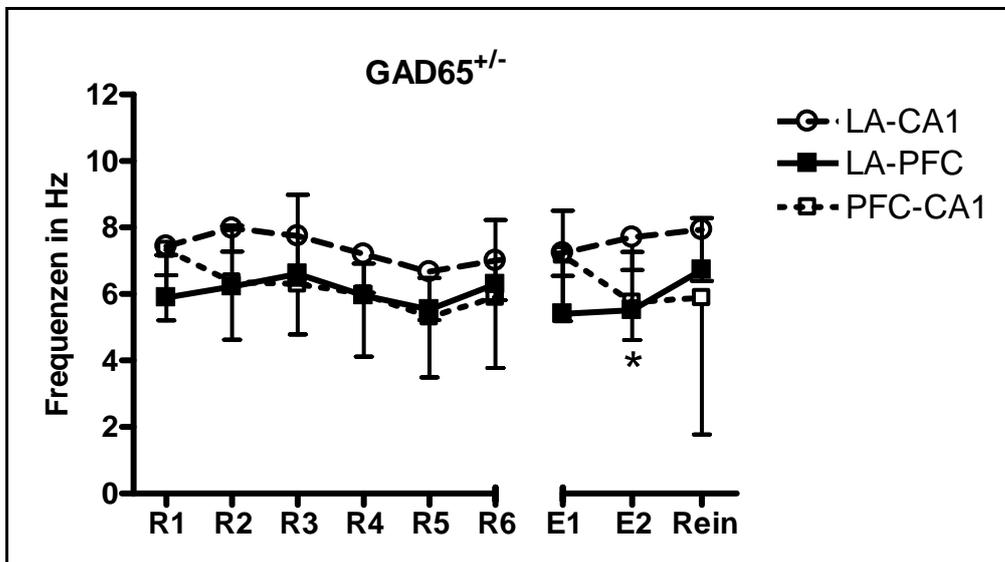


Abbildung 38: Vorherrschende Frequenzen (Hz) korrelierter neuronaler Aktivität in $GAD65^{+/-}$ Tieren (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; $*p < 0.05$; LA-PFC vs. LA-CA1; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement).

Die Frequenzen für $GAD65^{+/-}$ Mäuse lagen im Durchschnitt zwischen 5,8 und 8,5 Hz und die Frequenzen für die $GAD65^{-/-}$ Mäuse zwischen 5,4 und 7,7 Hz. Somit gab es hier keine relevanten Unterschiede zwischen den $GAD65$ - Genotypen.

4.3.2 LA-CA1

Die Synchronisation der neuronalen Aktivitäten von LA und CA1 zeigte bei den $GAD65^{+/-}$ Mäusen keine signifikanten Abweichungen während der Präsentation des 1.CS+ (s. Abb. 39). Die Korrelationswerte lagen stets zwischen $y=0,08$ und $y=0,13$ für den zweiten positiven Gipfel. Ein Vergleich der Korrelationen jeweils in den ersten 10 Sekunden vor dem 1.CS+ („Baseline“) erbrachte signifikante Abweichungen in R2 ($y = 0,13 \pm 0,03$; $p < 0,05$) und R5 ($y = 0,14 \pm 0,05$; $p < 0,05$). Tendenziell lagen die Korrelationswerte der Baseline deutlich unter den Werten der Korrelationen während der Präsentation des 1.CS+. Innerhalb der Baseline-Korrelationen lässt sich eine signifikante Abweichung von R6 ($y = 0,13 \pm 0,04$; $p < 0,05$) gegenüber R5 ($y = 0,05 \pm 0,03$) und E1 ($y = 0,06 \pm 0,03$) feststellen.

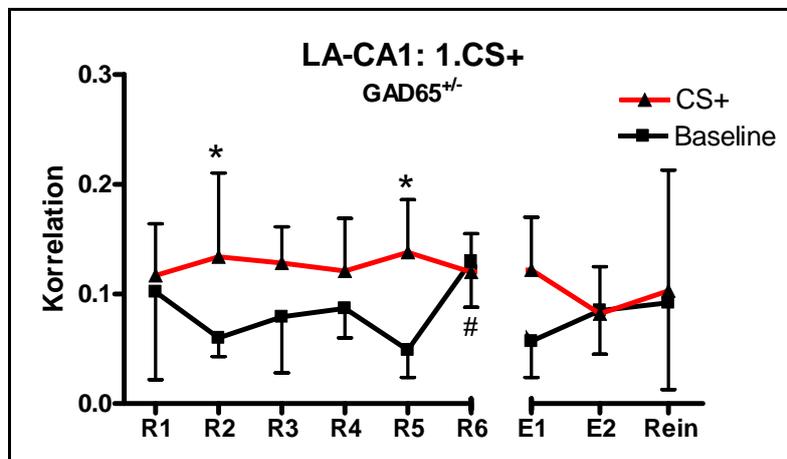


Abbildung 39: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und CA1 der $GAD65^{+/-}$ Tiere jeweils 10s vor der Präsentation des 1.CS+ (=Baseline) und während der Präsentation des 1.CS+ (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; * $p < 0,05$; Baseline vs. CS+; # $p < 0,05$ R6 Baseline vs. R5 Baseline und E1 Baseline; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement).

Im Vergleich zu den Korrelationen der Feldpotential-Aktivitäten der $GAD65^{+/+}$ und $GAD65^{-/-}$ Genotypen, zeigten die Ergebnisse der $GAD65^{+/-}$ Genotypen keine signifikanten Abweichungen (s. Abb. 40). Die Werte für die Korrelationen der $GAD65^{+/-}$ Genotypen lagen überwiegend zwischen den Werten der anderen Genotypen. Der fallende Trend der Korrelationswerte der $GAD65^{+/+}$ Genotypen von R1 nach R4 ist bei den $GAD65^{+/-}$ Tieren nicht zu beobachten. Innerhalb der Kurve für die $GAD65^{+/+}$ Genotypen war der Korrelationswert für R1 ($y = 0,16 \pm 0,01$; $p < 0,05$) signifikant abweichend gegenüber R2 ($y = 0,09 \pm 0,01$), R3 ($y = 0,09 \pm 0,01$), R4 ($y = 0,08 \pm 0,01$) und Reinstatement ($y = 0,08 \pm 0,01$).

ERGEBNISSE

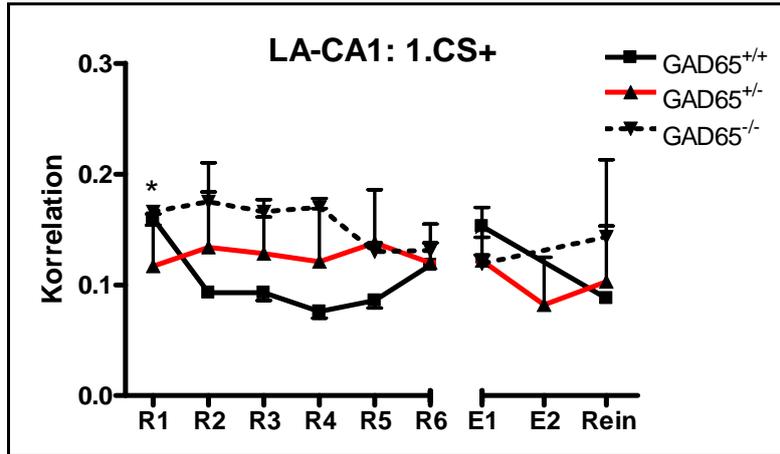


Abbildung 40: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und CA1 aller GAD65-Genotypen während der Präsentation des 1.CS+ (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; * $p<0.05$; GAD65^{+/+} R1 vs. R2, R3, R4 und Rein; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-Recall, Rein: Reinstatement).

Die korrelierten Feldpotential-Aktivitäten in den GAD65^{+/-} Tieren innerhalb von R1, R6, E1 und Reinstatement während der Präsentation des 1.-4.CS+ zeigten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen untereinander (s. Abb. 41).

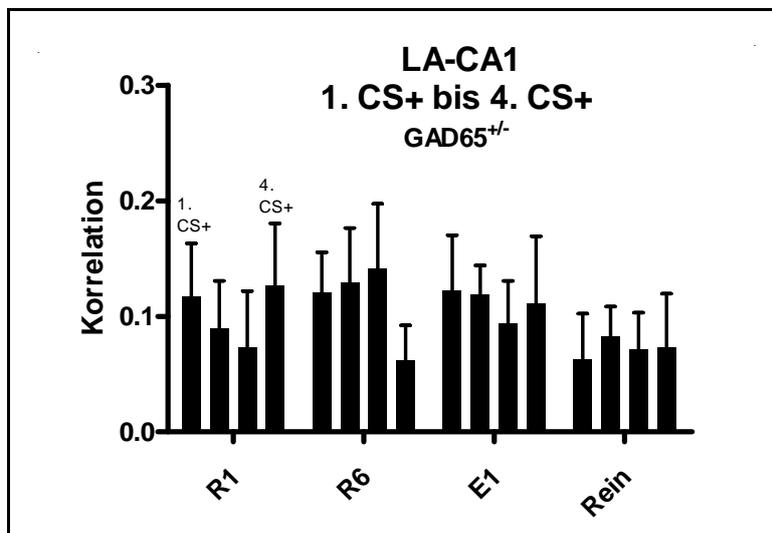


Abbildung 41: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und CA1 der GAD65^{+/-} Mäuse während der Präsentation des 1.-4.CS+ in R1, R6, E1 und Rein (Mittelwerte + SEM, $n=7$; R1: Retrieval, R6: Extinktions-Training 5 E1: Extinktions-Recall, Rein: Reinstatement).

Die Werte der GAD65^{+/-} Tiere für die korrelierte Aktivität innerhalb von R1, R6, E1 und Reinstatement während der Präsentation des 1.-4- CS+ ähneln den Werten für die GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} Korrelationen während der Präsentation des 1.-4.CS+ in R1, R6, E1 und Reinstatement (s. Abb. 42). Es ergaben sich keine signifikanten Abweichungen. Tendenziell

ERGEBNISSE

lagen die Werte der GAD65^{+/-} Genotypen in R1 allerdings ersichtlich unter den Werten für GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-}.

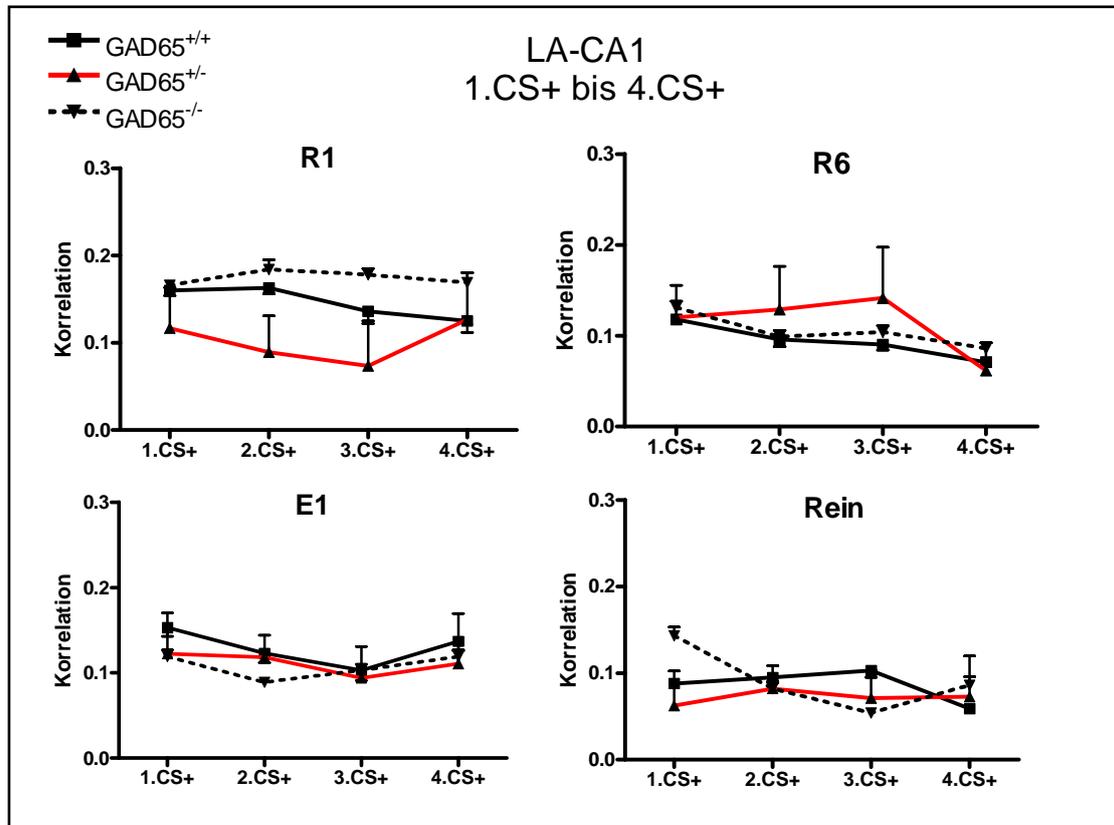


Abbildung 42: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und CA1 aller GAD65-Genotypen während der Präsentation des 1.-4.CS+ in R1, R6, E1 und Rein (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; R1: Retrieval, R6: Extinktions-Training 5 E1: Extinktions-Recall, Rein: Reinstatement).

4.3.3 LA-PFC

Die Korrelationen der neuronalen Aktivitäten von LA und PFC (s. Abb. 43) zeigten bei den GAD65^{+/-} Genotypen hohe Korrelationswerte vor allem in R2-R6 während der Präsentation des CS+. Der Korrelationswert beim Abrufen des Extinktionsgedächtnisses (Extinktions-,Recall', E1; $y = 0,1 \pm 0,06$; $p < 0,05$) und des Reinstatements ($y = 0,07 \pm 0,07$; $p < 0,05$) waren hingegen erheblich niedriger und signifikant abweichend gegenüber R5 ($y = 0,22 \pm 0,06$).

Im Vergleich zu den CS+ Werten waren die Baseline-Werte deutlich niedriger, jedoch aufgrund der großen Streuung nicht signifikant abweichend (R1; $y = 0,17 \pm 0,08$; R2; $y = 0,1 \pm 0,06$; R3; $y = 0,12 \pm 0,05$; R4; $y = 0,13 \pm 0,07$; R5; $y = 0,13 \pm 0,07$; R6; $y = 0,12 \pm 0,06$; E1; $y = 0,08 \pm 0,04$; E2; $y = 0,09 \pm 0,07$; Rein; $y = 0,06 \pm 0,06$).

ERGEBNISSE

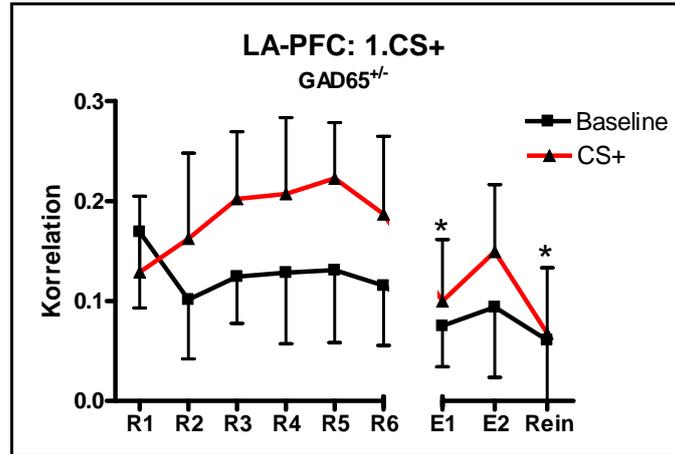


Abbildung 43: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und PFC der $GAD65^{+/-}$ Tiere, jeweils 10s vor der Präsentation des 1.CS+ (=Baseline) und während der Präsentation des 1.CS+ (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; * signifikant abweichend gegenüber R5; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement).

Im Vergleich zu den anderen GAD65 Genotypen gab es bezüglich der $GAD65^{+/-}$ keine signifikanten Abweichungen (s. Abb. 44). Der aufsteigende Trend der $GAD65^{+/-}$ von R1 bis R6 war auch bei den $GAD65^{+/+}$ zu erkennen. In R1 waren die Korrelationswerte von $GAD65^{+/-}$ ($y = 0,24 \pm 0,01$; $p < 0,05$) signifikant höher als die Werte für $GAD65^{+/+}$ ($y = 0,1 \pm 0,01$).

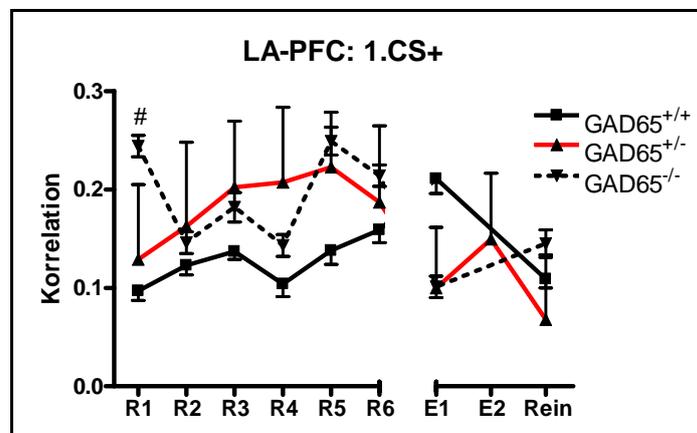


Abbildung 44: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und PFC aller GAD65-Genotypen während der Präsentation des 1.CS+ (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; # $p < 0,05$; $GAD65^{-/-}$ vs. $GAD65^{+/+}$; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement).

Die LA-PFC Korrelation der $GAD65^{+/-}$ Tiere in R1, R6, E1 und Reinstatement während der Präsentation des 1.-4.CS+ zeigte keine signifikanten Abweichungen (s. Abb. 45).

ERGEBNISSE

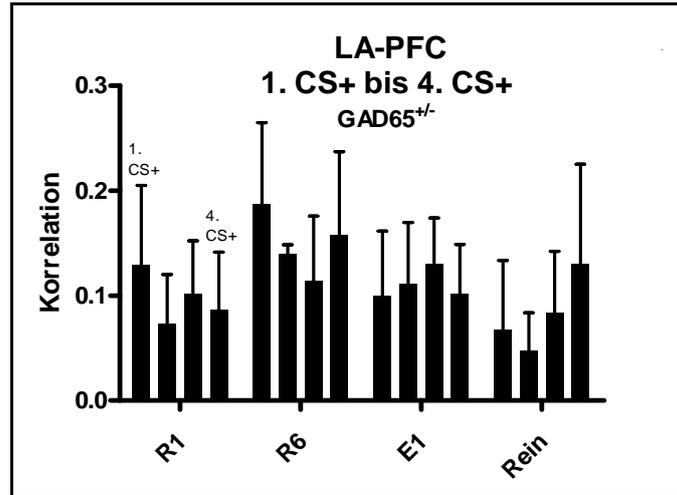


Abbildung 45: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und PFC der GAD65^{+/-} Genotypen während der Präsentation des 1.-4.CS+ in R1, R6, E1 und Rein (Mittelwerte + SEM, n=7; R1: Retrieval, R6: Extinktions-Training 5 E1: Extinktions-Recall, Rein: Reinstatement).

Im Vergleich zu den anderen GAD65 Genotypen waren die Werte der korrelierten Aktivitäten der GAD65^{+/-} zwischen LA und PFC während der Präsentation des 1.-4.CS+ in R1, R6, E1 und Reinstatement nicht wesentlich verschieden (s. Abb. 46). Tendenziell lagen die Werte für GAD65^{+/-} in R1 deutlich über den Werten der anderen Genotypen. Dies war für den 1.CS+ ($y = 0,24 \pm 0,01$; $p < 0,01$) signifikant gegenüber GAD65^{+/+} ($y = 0,1 \pm 0,01$).

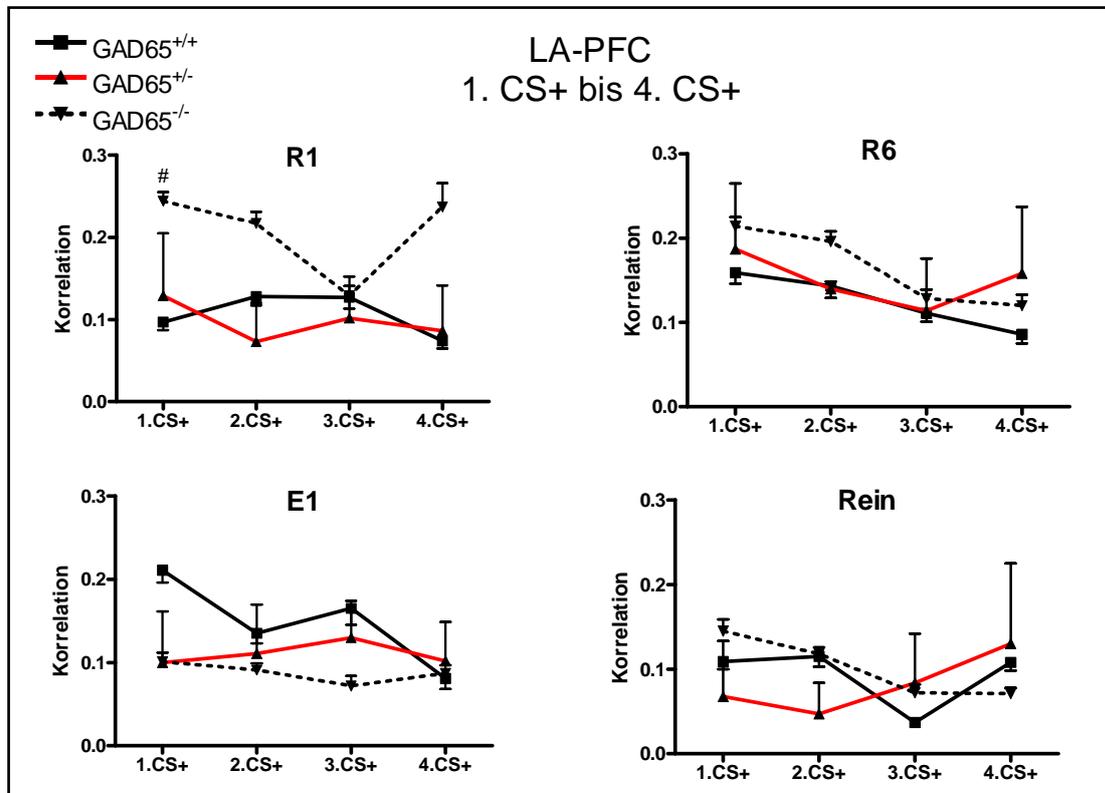


Abbildung 46: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und PFC aller GAD65-Genotypen während der Präsentation des 1.-4.CS+ in R1, R6, E1 und Rein (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; # $p<0.05$; GAD65^{+/+} vs. GAD65^{-/-}; R1: Retrieval, R6: Extinktions-Training 5 E1: Extinktions-Recall, Rein: Reinstatement).

4.3.4 PFC-CA1

Die Korrelationen der neuronalen Aktivitäten von PFC und CA1 zeigten ebenfalls erhöhte Werte während der Präsentation des 1.CS+ gegenüber den Baselinewerten (s. Abb. 47). R3 ($y = 0,19 \pm 0,06$; $p<0.05$) war gegenüber E1 ($y = 0,09 \pm 0,05$) signifikant abweichend.

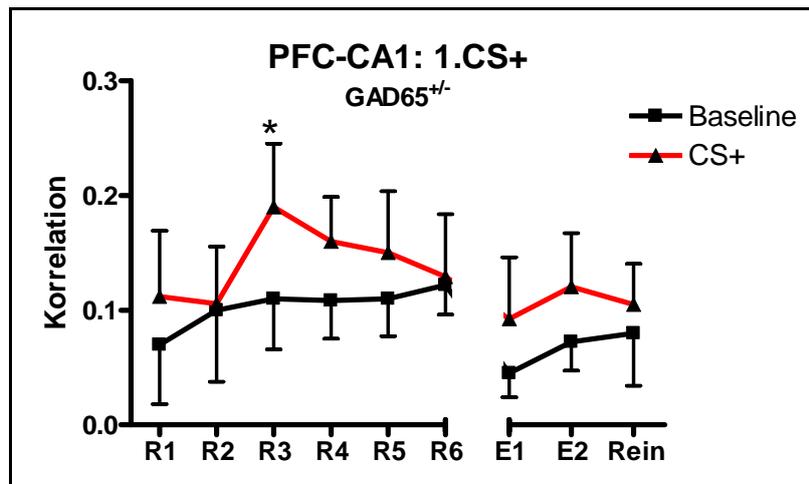


Abbildung 47: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen PFC und CA1 der GAD65^{+/-} Tiere, jeweils 10s vor der Präsentation des 1.CS+ (=Baseline) und während der Präsentation des 1.CS+ (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; * $p<0,05$; R3 vs. E1; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement).

Im Gegensatz zu den GAD65^{+/-} Genotypen lagen die Werte für die neuronalen Aktivitäten von PFC und CA1 bei den GAD65^{+/+} Genotypen für die PFC-CA1 Korrelation während der Präsentation des 1.CS+ von R2 ($y = 0,08 \pm 0,01$) bis R5 ($y = 0,09 \pm 0,01$) deutlich tiefer und in E1 ($y = 0,2 \pm 0,03$; $p<0.05$) signifikant höher (s. Abb. 48). Die Kurve der GAD65^{-/-} Werte ähnelt der Kurve der GAD65^{+/-} Werte.

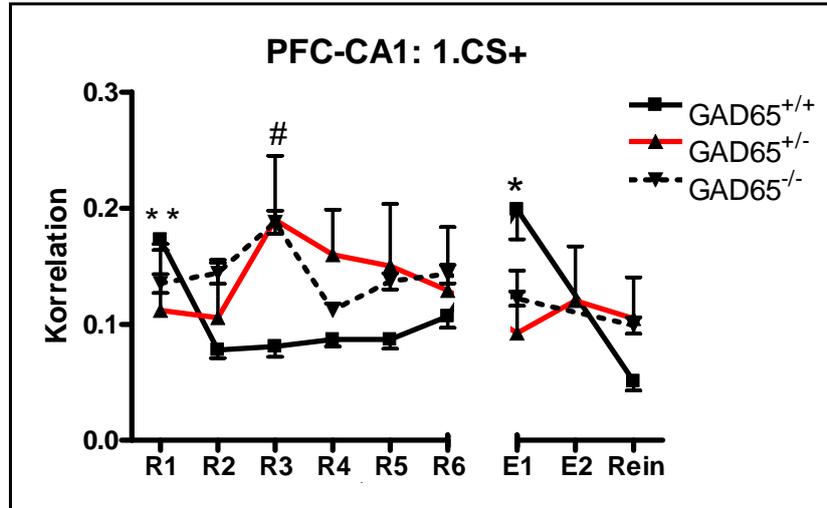


Abbildung 48: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen PFC und CA1 aller GAD65-Genotypen während der Präsentation des 1.CS+ (Mittelwerte + SEM, n=7; # $p < 0.05$; GAD65^{-/-} vs. GAD65^{+/+} und GAD65^{+/-} vs. GAD65^{+/+}; * $p < 0,05$; GAD65^{+/+} vs. GAD65^{+/-}; ** $p < 0,05$; GAD65^{+/+} R1 vs. GAD65^{+/+} R2 und R3; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall, Rein: Reinstatement).

Die synchronisierten neuronalen Aktivitäten zwischen PFC und CA1 während der Präsentation des 1.-4.CS+ der GAD65^{+/-} Tiere zeigten in R1, R6, E1 und Reinstatement keine signifikanten Abweichungen (s. Abb. 49).

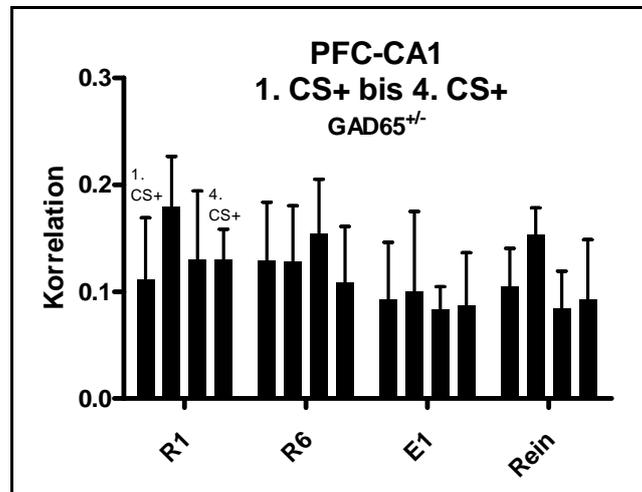


Abbildung 49: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen PFC und CA1 der GAD65^{+/-} Genotypen während der Präsentation des 1.-4.CS+ in R1, R6, E1 und Rein (Mittelwerte + SEM, n=7; R1: Retrieval, R6: Extinktions-Training 5 E1: Extinktions-Recall, Rein: Reinstatement).

Im Vergleich zu den anderen GAD65-Genotypen waren die synchronisierten neuronalen Aktivitäten zwischen PFC und CA1 der GAD65^{+/-} Mäuse nicht wesentlich verschieden (s. Abb. 50). In R1 waren die Korrelationswerte der GAD65^{+/+} während der Präsentation des 2.CS+ ($y = 0,1 \pm 0,004$; $p < 0.05$) signifikant niedriger als die Werte für GAD65^{+/-} ($y = 0,18 \pm 0,05$) und GAD65^{-/-} ($y = 0,16 \pm 0,01$). Im Reinstatement waren die Werte der GAD65^{-/-} Genotypen

ERGEBNISSE

während der Präsentation des 3.CS+ ($y = 0,16 \pm 0,01$; $p < 0,05$) signifikant höher als die Werte der $GAD65^{+/+}$ ($y = 0,06 \pm 0,01$) Genotypen.

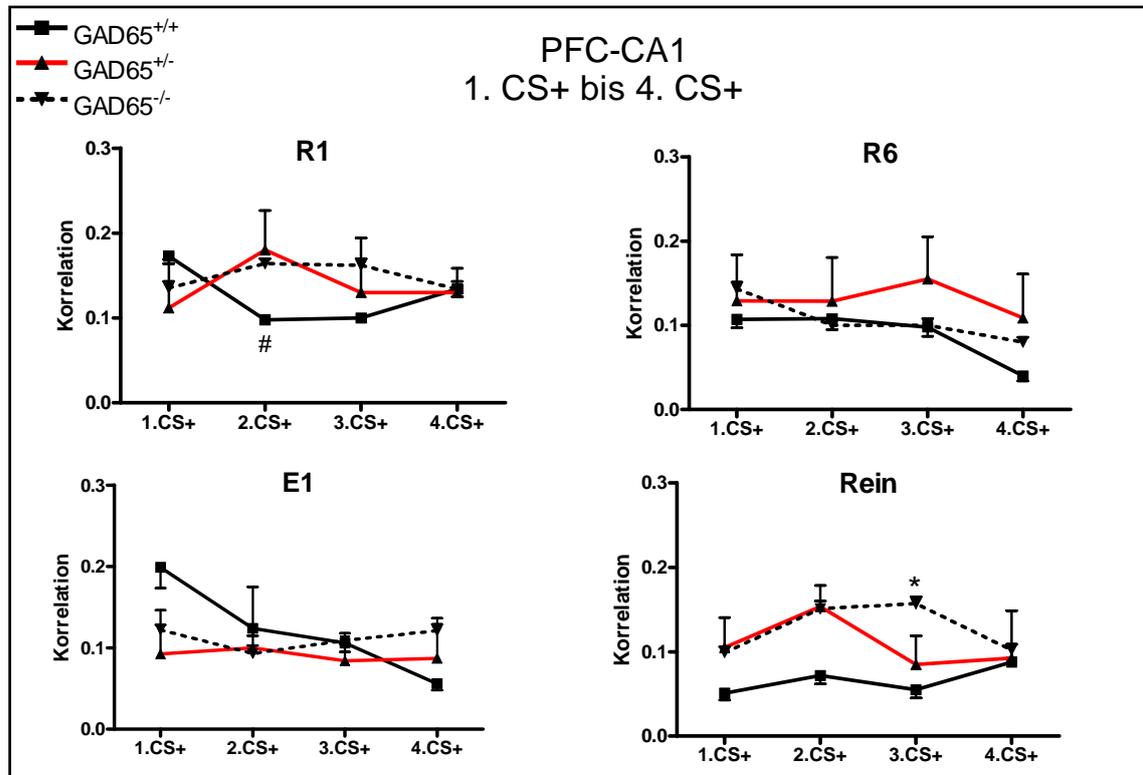


Abbildung 50: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen PFC und CA1 aller $GAD65$ -Genotypen während der Präsentation des 1.-4. CS+ in R1, R6, E1 und Rein (Mittelwerte \pm SEM, $n=7$; # $p < 0,05$; $GAD65^{+/+}$ vs. $GAD65^{+/-}$ und $GAD65^{+/+}$; * $p < 0,05$; $GAD65^{-/-}$ vs. $GAD65^{+/+}$; R1: Retrieval, R6: Extinktions-Training 5 E1: Extinktions-Recall, Rein: Reinstatement).

Zusammenfassend stellt Abbildung 51 eine Übersicht aller synchronen neuronalen Aktivitäten in Beziehung zur CS+ Präsentation sowohl der $GAD65$ -Genotypen als auch der Kontrollmäuse dar.

Auffällig ist vor allem der stetige Abfall der Korrelationswerte für die Kontrollmäuse im LA-CA1 Netzwerk im Vergleich zu den stetig niedrigen bleibenden Korrelationswerten aller $GAD65$ Genotypen.

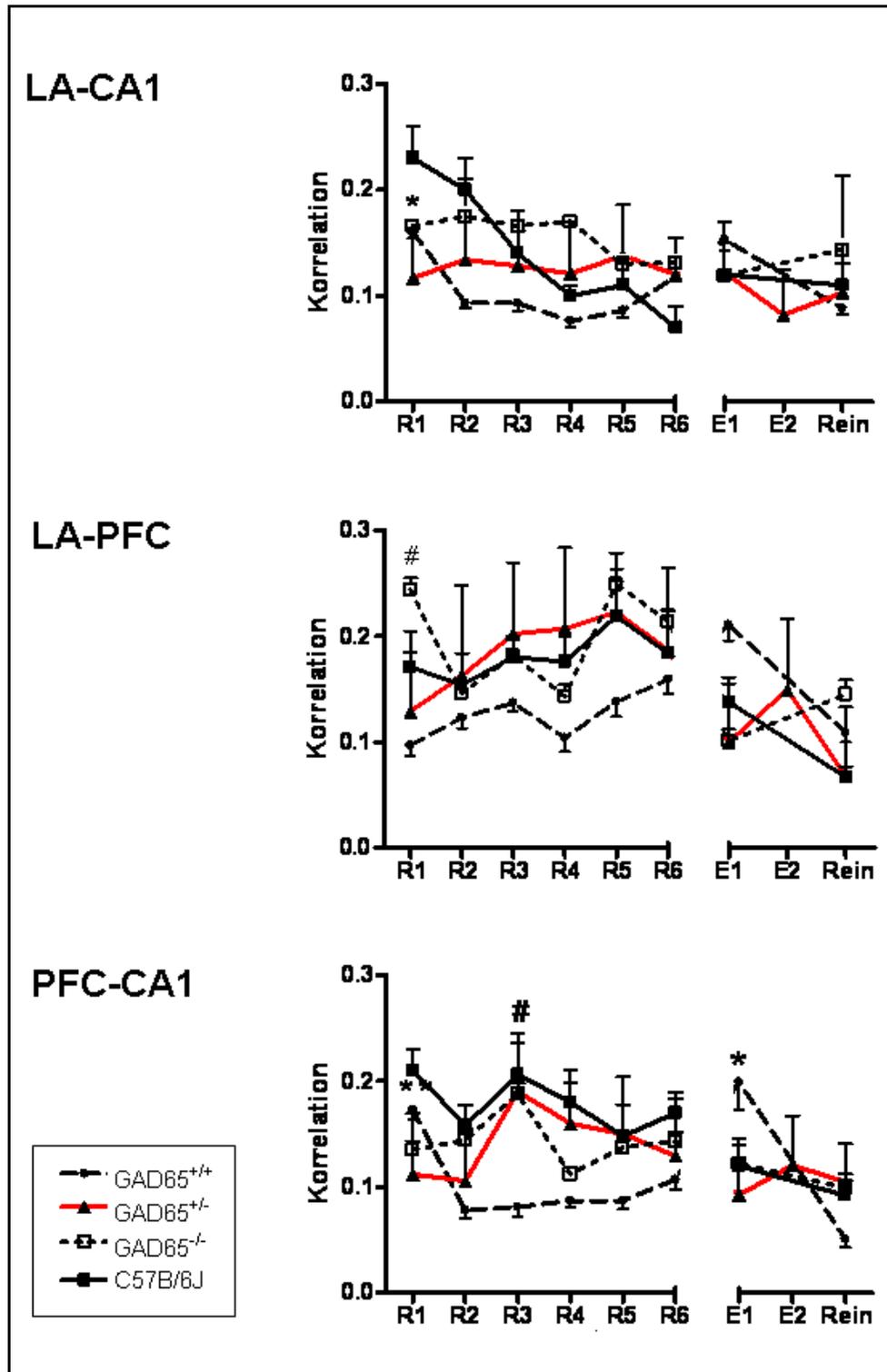


Abbildung 51: Synchronisierte neuronale Aktivitäten zwischen LA und CA1, LA und PFC und PFC und CA1 aller GAD65-defizienten Genotypen und den C57B/6JKontrollmäuse während der Präsentation des 1. CS+ (Mittelwerte \pm SEM, n=7; # $p < 0,05$; GAD65^{-/-} vs. GAD65^{+/+} und GAD65^{+/-} vs. GAD65^{+/+}; * $p < 0,05$; GAD65^{+/+} vs. GAD65^{+/-}; ** $p < 0,05$; GAD65^{+/+} R1 vs. GAD65^{+/+} R2 und R3; R1: Retrieval, R2-5: Extinktions-Training, E1: Extinktions-,Recall', Rein: Reinstatement).

4.3.5 Freezing-bezogene Korrelationen

Die Analyse der korrelierten Aktivität bezogen auf Reiz (CS+) – induziertem Furchtverhalten, welches durch ‚Freezing‘ angezeigt wurde, erwies sich als schwierig, da das Freezingverhalten im Verlauf der Extinktions-Trainings abnahm und längere Freezingabschnitte zur Analyse der neuronalen Abschnitte somit nicht mehr zur Verfügung standen. Lediglich in R1 ließen sich somit die jeweiligen Korrelationswerte vergleichen (s. Abb. 52). Die Freezing-bezogenen Werte der Kreuzkorrelationen zwischen LA-CA1 (C57B/6J; $y = 0,30 \pm 0,02$; GAD65^{+/+}; $y = 0,22 \pm 0,04$; GAD65^{+/-}; $y = 0,15 \pm 0,08$; GAD65^{-/-}; $y = 0,22 \pm 0,08$) LA-PFC (C57B/6J; $y = 0,29 \pm 0,01$; GAD65^{+/+}; $y = 0,20 \pm 0,08$; GAD65^{+/-}; $y = 0,20 \pm 0,09$; GAD65^{-/-}; $y = 0,25 \pm 0,12$) und PFC-CA1 (C57B/6J; $y = 0,27 \pm 0,01$; GAD65^{+/+}; $y = 0,16 \pm 0,08$; GAD65^{+/-}; $y = 0,14 \pm 0,02$; GAD65^{-/-}; $y = 0,16 \pm 0,09$) waren größtenteils höher als die CS+ bezogenen Werte (LA-CA1: C57B/6J; $y = 0,23 \pm 0,03$; GAD65^{+/+}; $y = 0,17 \pm 0,00$; GAD65^{+/-}; $y = 0,12 \pm 0,05$; GAD65^{-/-}; $y = 0,16 \pm 0,00$; LA-PFC: C57B/6J; $y = 0,17 \pm 0,01$; GAD65^{+/+}; $y = 0,10 \pm 0,01$; GAD65^{+/-}; $y = 0,13 \pm 0,08$; GAD65^{-/-}; $y = 0,24 \pm 0,01$; PFC-CA1: C57B/6J; $y = 0,21 \pm 0,02$; GAD65^{+/+}; $y = 0,17 \pm 0,01$; GAD65^{+/-}; $y = 0,11 \pm 0,06$; GAD65^{-/-}; $y = 0,14 \pm 0,01$). Für die Kontrollmäuse war dieser Unterschied immer signifikant, für die GAD65^{+/+} Mäuse war dies für LA-CA1 und LA-PFC der Fall, für GAD65^{+/-} und GAD65^{-/-} zeigten sich größtenteils nur Tendenzen.

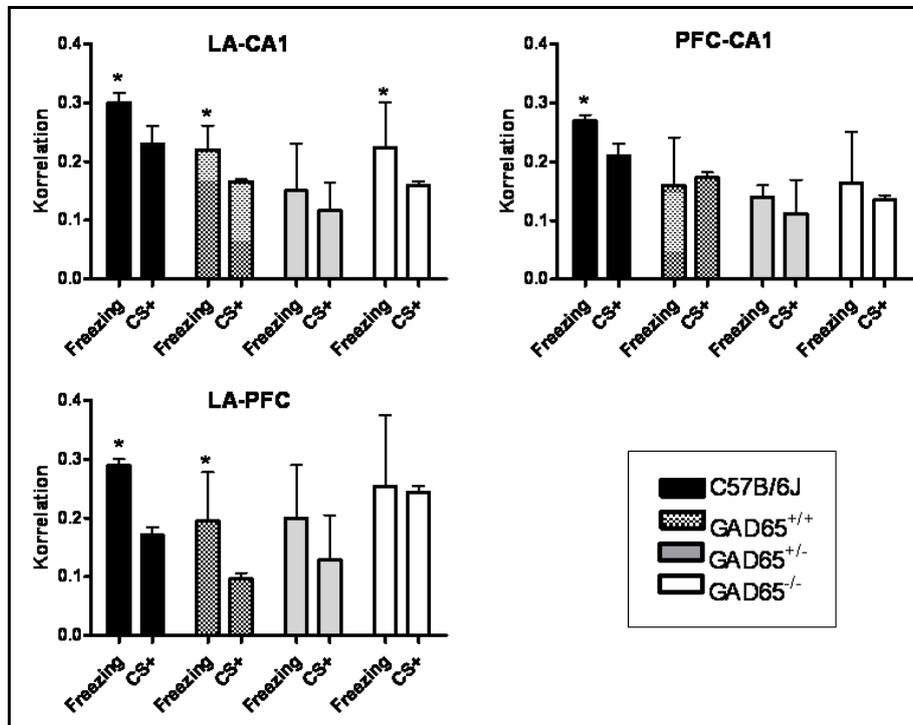


Abbildung 52: Freezing-bezogene Korrelationen vs. CS+ bezogene Korrelationen für LA-CA1, PFC-CA1 und LA-PFC aller GAD65-Genotypen und der C57B/6J Kontrollmäuse während R1 (Mittelwerte + SEM, n=7; * $p < 0.05$ Freezing vs. CS+).

5 Diskussion

Neurotransmitter sind als Botenstoffe Schlüsselemente neurobiologischer Funktionen im zentralen Nervensystem. Störungen des Gleichgewichts im Haushalt dieser Botenstoffe können zu schweren Angsterkrankungen und Phobien führen (Zwanzger und Deckert, 2007). GABA, der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, wird mit Hilfe des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD) synthetisiert. Von diesem Enzym existieren zwei Isoformen, GAD65 und GAD67. Die gezielte Deaktivierung beider Allele des GAD65 Gens in Mäusen führt zu homozygoten GAD65 defizienten ($GAD65^{-/-}$) Tieren, die ein verändertes Angstverhalten aufweisen (Stork, 2000, 2003). Die Deaktivierung des Gens auf nur einem Allel führt zu heterozygoten GAD65 defizienten Mäusen ($GAD65^{+/-}$). Bei heterozygoter Defizienz eines Gens wird die Restaktivität des entsprechenden Genprodukts durch das intakte Allel entscheidend beeinflusst (Routtenberg, 2002). Die Funktion dieser Restaktivität eines Genprodukts kann mit Hilfe verschiedener verhaltensphysiologischer Tests analysiert werden. Dabei müssen Verhaltenseigenschaften von Mäusen mit heterozygoter Defizienz für ein bestimmtes Gen nicht zwangsläufig zwischen homozygot defizienten Mäusen und $+/+$ (Wildtyp-) Mäusen, bei denen beide Allele des Gens aktiv sind, eingeordnet werden. Pathologische Alterationen bei heterozygot defizienten Mäusen im Gegensatz zu homozygot defizienten und $+/+$ Tieren sind durchaus bekannt (z.B. Lin et al., 2005; Frankland et al., 2001). Ob, beziehungsweise wie sich ein Mangel an GAD65 in $GAD65^{+/-}$ Mäusen phänotypisch bemerkbar macht, zeigt diese Studie. Ihr Ziel ist es insbesondere das Angst- und Furchtverhalten sowie neuronale Aktivitäten in Form von spontanen Feldpotentialen bei $GAD65^{+/-}$ Mäusen zu untersuchen und mit $GAD65^{+/+}$ und $GAD65^{-/-}$ Mäusen zu vergleichen.

5.1 Generelle Ängstlichkeit bei $GAD65^{+/-}$ Mäusen

Ergebnisse bezüglich des generellen Angstverhaltens heterozygoter GAD65 defizienter Mäuse gibt es bis dato nur sehr wenige. $GAD65^{+/-}$ Mäuse zeigten in früheren Studien bei verschiedenen Tests, wie zum Beispiel einem forcierten Schwimm-Test, kein verändertes Angstverhalten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Stork et al., 2000).

Zur Beurteilung der generellen Ängstlichkeit der Mäuse wurden in dieser Arbeit der Light-Dark-, Dark-Light- und der Elevated-Plus-Maze-Test (EPM) benutzt. Dabei zeigten die $GAD65^{+/-}$ Mäuse in abgeschwächter Form das veränderte Angstverhaltens der $GAD65^{-/-}$ Tiere. $GAD65^{+/-}$ Mäuse hielten sich im Light-Dark- und Dark-Light-Test länger im hellen Kompartiment auf und waren hier auch aktiver, während $GAD65^{+/+}$ Mäuse sowohl eine kürzere Aufenthaltsdauer als auch eine geringere lokomotorische Aktivität im hellen Kompartiment

zeigten. Eine signifikante Abweichung der GAD65^{+/-} Mäuse gab es lediglich bezüglich einer geringeren Gesamtaktivität gegenüber GAD65^{-/-} Mäusen im Light-Dark-Test. Dies wurde im Dark-Light-Test allerdings nicht bestätigt.

Im EPM zeigten GAD65^{+/-} Mäuse eine signifikant geringere Anzahl an Eintritten in die offenen Arme gegenüber GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-}. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Light-Dark- und des Dark-Light-Tests verbrachten GAD65^{-/-} Mäuse tendenziell, jedoch nicht signifikant, mehr Zeit auf den offenen Armen als GAD65^{+/-} und GAD65^{+/+}. Allerdings betraten GAD65^{-/-} Mäuse ebenfalls den geschlossenen Arm signifikant häufiger. Die lokomotorische Gesamtaktivität der GAD65^{-/-} Mäuse im EPM war signifikant höher als die Aktivität der GAD65^{+/-} und GAD65^{+/+} Mäuse.

Das Verhalten der Tiere im Light-Dark-Test, Dark-Light-Test und EPM kann als ein Konflikt zwischen Explorationsbestreben und natürlicher Angst vor hellen bzw. offenen Gebieten interpretiert werden. Die Bewertung der generellen Ängstlichkeit der Tiere mithilfe dieser Tests setzt voraus, dass sich ängstliche Mäuse weniger in dem hellen Kompartiment des Light-Dark-Tests beziehungsweise auf dem offenen Arm des EPM aufhalten. Gezeigt wurde dies in früheren Studien beispielsweise durch die Verabreichung von Diazepam, einem Benzodiazepin, durch dessen anxiolytische Wirkung Mäuse sich vermehrt auf den offenen Armen aufhielten (Pesold und Treit, 1994). Aufenthaltsdauer und lokomotorische Aktivität im hellen Kompartiment stellen folglich typische Indikatoren der generellen Ängstlichkeit dar (Crawley, 1981).

Die Ergebnisse der Verhaltenstests dieser Arbeit lassen daher auf eine verringerte generelle Ängstlichkeit bei GAD65^{-/-} Mäusen und in abgeschwächter Form bei GAD65^{+/-} Mäusen schließen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Studien, bei denen die GAD65^{-/-} Mäuse in Verhaltenstests eine erhöhte Ängstlichkeit zeigten (Kash et al., 1999; Stork et al., 2000).

Die Anzahl der Eintritte in die unterschiedlichen Arme des Elevated Plus Maze kann als Indikator für die generelle Aktivität der Versuchstiere angesehen werden (File, 2001). Bei diesem Test zeigten GAD65^{-/-} Mäusen eine hohe Anzahl an Eintritten in die geschlossenen Arme, was auf eine erhöhte lokomotorische Gesamtaktivität schließen lässt. GAD65^{+/-} Mäuse hingegen zeigten keine erhöhte Gesamtaktivität im Vergleich zu GAD65^{+/+} Mäusen. Die offenen Arme des EPM betraten die GAD65^{+/-} Tiere sogar signifikant weniger als GAD65^{-/-} und GAD65^{+/+} Mäuse.

Erhöhte lokomotorische Aktivitäten von GAD65^{-/-} Mäusen wurden schon in früheren Studien beschrieben. So beobachtete man bei diesen Tieren sowohl erhöhte Schwimm-Aktivitäten in einem forcierten Schwimm-Test als auch erhöhte lokomotorische Aktivitäten beim Retrieval

einer Furcht-Konditionierung. Für GAD65^{+/-} Mäuse wurden hier keine Auffälligkeiten verzeichnet (Stork et al., 2000, 2003).

5.1.1 Die Rolle von GABA und GAD65 bei genereller Ängstlichkeit

Erklärungsansätze für die verringerte generelle Ängstlichkeit, die sich bei GAD65^{-/-} und auch in abgeschwächter Form bei GAD65^{+/-} Mäusen zeigte, sowie für die erhöhte lokomotorische Aktivität der GAD65^{-/-} Mäuse, bietet die genaue Betrachtung der Rolle von GABA und GAD65 in diesem Zusammenhang. Es stellt sich die Frage, inwiefern es Unterschiede zwischen den einzelnen GAD65 Genotypen gibt, die das unterschiedliche Angstverhalten erklären könnten.

1.) Die Verabreichung von Diazepam, einem allosterischen Modulator des GABA_A-Rezeptors, der normalerweise zu einer Wirkungsverstärkung von GABA führt, zeigt sowohl bei GAD65^{-/-} als auch bei GAD65^{+/-} Mäusen keine Wirkung, während Diazepam bei GAD65^{+/+} Tieren anxiolytische Effekte hervorruft (Stork et al., 2000). 2.) Nach der Geburt bleibt bei GAD65^{-/-} Mäusen ein GABA-Anstieg, der bei Wildtyp-Mäusen zu beobachten ist, aus und es ergeben sich GABA-Defizite vor allem in Amygdala und Hypothalamus. GAD65^{+/-} Mäuse zeigen ebenfalls einen leicht reduzierten GABA-Spiegel in der Amygdala, allerdings nur in den ersten 2-3 Lebensmonaten (Stork et al., 2000). 3.) Die Feinabstimmung der GABA-Freisetzung erfolgt GAD65-abhängig (Kash et al., 1999). GAD65 liegt normalerweise zu 50% inaktiv als Apoenzym vor und kann in Zeiten erhöhten Energieverbrauchs aktiviert werden (Martin et al., 1991). Mäuse mit einem Mangel an GAD65 könnten demzufolge Schwierigkeiten haben unter Stress eine angemessene GABA-Ausschüttung zu gewährleisten, was zu einer verminderten Hemmung der exzitatorischen Impulse und somit zu einer gesteigerten Angstantwort bzw. erhöhter Ängstlichkeit führen könnte.

Entstehung und Äußerung von genereller Ängstlichkeit sind abhängig von GABA-Funktionen besonders in der Amygdala (Obata, 1977). Aufgrund der anxiolytischen Wirkung von GABA lassen sowohl ein niedriger GABA-Spiegel in der Amygdala als auch Schwierigkeiten bei der Anpassung des GABA-Levels unter Stress, zunächst eine erhöhte Ängstlichkeit bei GAD65^{-/-} Mäusen vermuten. Dies wurde auch in früheren Studien beschrieben, in denen GAD65^{-/-} Mäuse in verschiedenen Verhaltenstests erhöhte Ängstlichkeit zeigten (Kash et al., 1999; Stork et al., 2000).

In den Verhaltenstests dieser Arbeit wurden insbesondere Änderungen des Angstverhaltens bei GAD65^{+/-} Mäusen gezeigt. GAD65 spielt postnatal eine wichtige Rolle bei der Synthese von GABA (Stork et al., 2000). Der vorübergehend niedrige GABA-Spiegel bei GAD65^{+/-} Mäusen während der Entwicklung zeigt, dass die Restaktivität des intakten Allels der GAD65 das ausgeschaltete Allel nicht vollständig kompensieren kann. Eine reduzierte Gesamtmenge des

DISKUSSION

Genprodukts könnte für das veränderte Angstverhalten der GAD65^{+/-} Tiere verantwortlich sein. Allerdings zeigten sowohl GAD65^{-/-} als auch in abgeschwächter Form GAD65^{+/-} Mäuse in den Verhaltenstests dieser Arbeit reduziertes Angstverhalten. Die erhöhte lokomotorische Aktivität der GAD65^{-/-} Mäuse kann ebenfalls als anxiolytischer Effekt interpretiert werden (Shimada et al., 1995) und bekräftigt folglich die These des reduzierten Angstverhaltens.

Die zuvor beschriebene Wirkungslosigkeit von Diazepam, die sowohl bei GAD65^{-/-} als auch bei GAD65^{+/-} Mäusen beobachtet wurde, könnte zum einen ebenfalls durch eine verminderte GABA-Konzentration erklärt werden, da gezeigt wurde, dass Diazepam nur in Anwesenheit von GABA seine volle Wirkung entfalten kann (Crawley, 1981). Auf der anderen Seite können Modulationen an den Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung des reduzierten Angstverhaltens wäre eine durch vermindertes GABA kompensatorische Änderung der Dichte von postsynaptischen GABA-Rezeptoren, wodurch ein erhöhter GABA-Spiegel imitiert werden könnte. Für GABA_A-Rezeptoren konnte dies allerdings bereits widerlegt werden: Die Dichte postsynaptischer GABA_A-Rezeptoren in GAD65^{-/-} Mäusen ist gegenüber GAD65^{+/+} unverändert (Kash et al., 1999).

Eine andere Erklärung könnte die kompensatorische Hochregulation verschiedener Enzymsysteme sein. Neuste Studien zeigen, dass die Füllung von GABA-Vesikeln an der Präsynapse GAD65 defizienter Neurone durch eine kompensatorische Hochregulation des vesikulären GABA-Transporters (VGAT) gewährleistet wird (Wu et al., 2007). Weitere kompensatorische Hochregulationen sind denkbar und könnten so zu einer übersteigerten Wirkung von GABA und somit zu anxiolytischen Effekten bei GAD65 defizienten Tieren führen.

Unklar bleibt jedoch die Diskrepanz zu den Ergebnissen früherer Tests, bei denen GAD65^{-/-} Mäuse sich ängstlicher verhielten als GAD65^{+/+} Tiere. Dies könnte Folge von unterschiedlicher Haltung, Handhabung oder einer anderen Reihenfolge der durchgeführten Tests in den anderen Studien sein.

Ein Unterschied zwischen GAD65^{+/-} Mäusen und GAD65^{-/-} Mäusen zeigt sich in dieser Arbeit in Form der erhöhten lokomotorischen Aktivität der GAD65^{-/-} Mäuse. Diese Abweichung kann verschiedene Ursachen haben.

Erstens wäre es möglich, dass die zellulären Netzwerke, die für das Angstverhalten zuständig sind, sensitiver auf Änderungen der GABAergen Hemmung reagieren als diejenigen, die für die lokomotorische Aktivität verantwortlich sind. Die Restaktivität des intakten Allels bei den GAD65^{+/-} Tieren könnte demnach für die lokomotorische Aktivität ausreichend sein, während sie im Bezug auf das Angstverhalten zu Veränderungen führt. Zweitens sind bei GAD65^{-/-}

Mäusen im Gegensatz zu GAD65^{+/-} Mäusen häufig Krampfanfälle beobachtet worden (Kash et al., 1997). Durch diese Krampfanfälle könnten Hirnschäden entstehen (z.B. Strafstrom et al., 1993), die mit einer erhöhte Aktivität einhergehen. Drittens kann die Manipulation an einem einzigen Gen die Aktivität von anderen Enzymen beeinflussen (Routtenberg, 2002). So könnten die hier gefundenen Effekte durch kompensatorische Veränderungen von multiplen Genen verursacht worden sein, deren Erforschung noch viele weitere Studien bedürfen.

5.1.2 Generelle Ängstlichkeit bei GAD65^{+/+} und C57B/6J-Kontrollmäusen

Sowohl bei GAD65^{+/+} Mäusen als auch bei C57B/6J-Kontrollmäusen sind beide Allele des GAD65 Gens aktiv. Light-Dark- und Dark-Light-Test zeigten GAD65^{+/+} und C57B/6J-Kontrollmäuse als die ängstlicheren Mäuse, da sie im Vergleich zu GAD65^{+/-} und GAD65^{-/-} weniger Zeit im hellen Kompartiment verbrachten und ihre lokomotorischen Aktivitäten im Hellen geringer waren.

Die Ergebnisse des EPM zeigen allerdings signifikante Abweichungen zwischen GAD65^{+/+} Mäusen und C57B/6J-Kontrollmäusen. Die Kontrollmäuse verbrachten signifikant mehr Zeit auf den offenen Armen und betraten diese auch signifikant häufiger als die GAD65 Genotypen. Das unterschiedliche Verhalten von +/+ ‚Knock-out‘ Mäusen und C57B/6J-Kontrollmäusen könnte auf ihre unterschiedliche Herkunft zurückgeführt werden, da +/+ ‚Knock-out‘ Mäuse durch Kreuzung aus +/- ‚Knock-out‘ Mäusen hervorgegangen sind. Schon in anderen Studien wurde beobachtet, dass die Wahl des genetischen Hintergrundes große Auswirkungen auf die Entwicklung und das spätere Verhalten von Mäusen haben kann (Tonegawa et al., 1995; Crusio, 1996; Lipp und Wolfer, 1998).

Anlass zur Diskussion gibt allerdings die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des EPM und den Ergebnissen von Light-Dark- und Dark-Light-Test für Kontrollmäuse und GAD65^{+/+} Mäuse. Während die Ergebnisse des EPM die Kontrollmäuse im Vergleich zu den GAD65^{+/+} Mäusen als signifikant weniger ängstlich herauskristallisierten, wiesen sie im Light-Dark- und Dark-Light-Test die größere Ängstlichkeit auf.

Hier muss berücksichtigt werden, dass der Light-Dark-/ Dark-Light- Test und der EPM-Test nicht exakt das Gleiche messen. Der Light-Dark-/Dark-Light- Test basiert auf einem Konflikt zwischen Explorationsbestreben und der Furcht vor hellen Gebieten. Der EPM-Test basiert auf einem Konflikt zwischen Explorationsbestreben und Furcht vor offenen Gebieten. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass man zwischen der Furcht vor hellen und der Furcht vor offenen Gebieten unterscheiden muss. Außerdem wurden zwar alle Tests mit allen Mäusen in gleicher Reihenfolge und mit gleichem zeitlichen Abstand durchgeführt, es ist aber durchaus möglich, dass zum Beispiel die GAD65 Genotypen den Stress der Tests

schlechter verarbeiten können, was die erhöhte Ängstlichkeit gegenüber den Kontrollmäusen im EPM erklären würde, da Light-Dark- und Dark-Light-Tests immer an den Tagen vor dem EPM-Test stattgefunden haben. Trotz allem lässt die Widersprüchlichkeit der Testergebnisse allerdings Zweifel an der Spezifität der Tests aufkommen und sollte somit Anlass geben sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität der Tests erneut zu erfassen.

5.2 Konditionierte Furcht bei GAD65^{+/-} Mäusen

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verhaltenstests, die Aufschluss über die generelle Ängstlichkeit der Tiere geben, wird die Furcht-Konditionierung genutzt, um Eigenschaften des Furcht-Gedächtnisses zu untersuchen.

Nach Durchführung der Furcht-Konditionierung reagierten GAD65^{+/-} Mäuse bei alleiniger Präsentation des CS+ mit ‚Freezing‘-Verhalten. Dieses Verhalten als Reaktion auf die Präsentation des CS+ reduzierte sich im Laufe der Extinktions-Trainings. Das beobachtete Verhalten der Tiere während der Konditionierung bestätigt somit frühere Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau (z.B. Kamprath und Wotjak, 2004). Bei der ungepaarten Konditionierung zeigte sich ein Ausbleiben des Freezingverhaltens bei den Kontrolltieren, was die erfolgreiche gepaarte Konditionierung bestätigt.

Habituation kann definiert werden als das Nachlassen der Reaktion auf einen Stimulus, der mehrmals hintereinander dargeboten wird (Thompson und Spencer, 1966). Bei der Präsentation der 4 Stimuli (1. – 4. CS) zeigten die GAD65^{+/-} Mäuse in dieser Studie keine signifikante Reduktion des Freezingverhaltens. Eine Habituation konnte hier also nicht beobachtet werden.

Generalisierung bei der Furcht-Konditionierung äußert sich in einem Mangel an Differenzierung zwischen den applizierten Stimuli (Shepard, 1987). Ist der Generalisierungseffekt stark ausgeprägt, führt auch die Präsentation der CS- Töne, die nicht mit einem Fußschock gepaart wurden, zu einer ausgeprägten Furchtantwort.

Das Freezingverhalten der GAD65^{+/-} Mäuse im Hinblick auf den Generalisierungsprozess, den Extinktionsprozess und das Abrufen der Extinktion, lässt sich erneut zwischen den Ergebnissen für GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} einordnen.

GAD65^{+/+} Mäuse zeigten keinen Generalisierungseffekt, während er bei GAD65^{+/-} leicht und bei GAD65^{-/-} besonders in R1, R2 und E1 deutlich ausgebildet war.

Im Vergleich zu GAD65^{+/+} und GAD65^{+/-} Mäusen zeigten die GAD65^{-/-} Mäuse deutlich höhere prozentuale Freezinganteile während der Präsentation des 1.CS+ insbesondere in R1-R5 und E1, E2 und Reinstatement. Dies steht im Gegensatz zu dem in anderen Studien beobachteten Verhalten von GAD65^{-/-} Mäusen, in denen ein verringertes Freezingverhalten nach der Furcht-Konditionierung beschrieben wurde (Stork et al., 2003).

Der prozentuale Freezinganteil während des 1.CS+ in R1 war für GAD65^{+/-} signifikant geringer als für GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-}. Um diese Abweichung zu erklären, wurde das Verhalten der Tiere während der Zeit, in der die Tiere kein Freezingverhalten zeigten, analysiert. Neben dem dominierenden Freezingverhalten in R1 während der Präsentation des 1.CS+ konnte bei den Mäusen vermehrt ‚Risk-assessment‘ sowie ‚Flight‘-Verhalten in 7 der 13 Tiere beobachtet werden.

Stärker ausgeprägtes Fluchtverhalten wurde schon zuvor bei GAD65^{-/-} Mäusen beschrieben (Stork et al., 2002) und steht im Einklang mit der in dieser Arbeit beschriebenen erhöhten lokomotorischen Aktivität von GAD65^{-/-} Mäusen.

Während des Extinktionsprozesses zeigten die GAD65^{+/+} Mäuse eine signifikante Reduktion des Freezingverhaltens gegenüber R1 schon in R4, die GAD65^{+/-} Mäuse in R5 und die GAD65^{-/-} Mäuse erst in R6. Der verlängerte Extinktionsprozess, der bei den GAD65^{-/-} Tiere zu beobachten ist, zeigte sich demnach bei den GAD65^{+/-} Tieren in abgeschwächter Form.

24 Stunden nach dem Extinktions-Training war bei den GAD65^{+/+} Mäusen in E1 noch immer eine signifikante Abschwächung des Freezingverhaltens gegenüber R1 zu verzeichnen. Dagegen lag bei GAD65^{+/-} der Freezinganteil, gemessen an der Gesamtbeobachtungszeit, wieder im Durchschnitt bei 56% und bei GAD65^{-/-} sogar bei fast 80%.

5.2.1 Die Rolle von GABA und GAD65 bei konditionierter Furcht

Der ausgeprägte Generalisierungseffekt und der verlängerte Extinktionsprozess, den die GAD^{-/-} Mäuse vorweisen, zeigte sich bei den GAD65^{+/-} Mäusen in abgeschwächter Form. Erklärungsansätze hierzu bietet die genaue Betrachtung der Rolle von GABA und GAD65 in Bezug auf konditionierte Furcht.

Ein entscheidender Einfluss von GABA bei der Furcht-Konditionierung wurde in früheren Studien bewiesen: Es konnte gezeigt werden, dass die lokale Verabreichung eines GABA_A-Rezeptor-Agonisten (z.B. Muscimol) in die Amygdala zur Unterdrückung der Furcht-Konditionierung führt, während durch GABA_A-Rezeptor-Antagonisten die Furcht-Konditionierung noch verstärkt wird (Fanselow und Kim, 1992; Muller et al., 1997).

Eine mögliche Erklärung für den verstärkten Generalisierungseffekt bei Mangel von GAD65 liefert die Betrachtung der neuronalen Verschaltungen, die der Furcht-Konditionierung zugrunde liegen. Die Information des CS erreicht über zwei verschiedene Wege die Amygdala - zum einen auf direktem Wege vom auditorischen Thalamus, zum anderen indirekt vom auditorischen Thalamus über kortikale Strukturen. Dabei liefert der Weg, der über die kortikalen Strukturen verläuft, weitaus spezifischere und detailliertere Informationen bezüglich des CS (Doron und LeDoux, 1999; Romanski und LeDoux, 1993). Durch einen Mangel an GAD65

könnten direkt oder indirekt über GABA-Defizite wichtige Wachstumsreize während der Neuro- und Synaptogenese verändert sein. Denn während der Entwicklung stellt GABA – sonst bekannt als wichtiger inhibitorischer Transmitter – durch exzitatorische Wirkung einen wichtigen Wachstumsreiz für die Entwicklung unreifer Neurone dar (Gozlan und Ben-Ari, 2003; Get et al., 2006; Akerman und Cline, 2007). Dies könnte zu einer stärkeren Gewichtung des direkten, undetaillierten Weges der Information des CS führen. Dadurch würde die Differenzierung verschiedener Töne erschwert werden, was den Generalisierungseffekt bei GAD65 defizienten Mäusen erklären könnte. Durch die Restaktivität des intakten Allels bei GAD65^{+/-} könnte die abgeschwächte Generalisierung bei diesen Tieren zustande kommen.

Die genauere Betrachtung der neuronalen Verschaltungen, die der Extinktion zugrunde liegen, könnte die verlängerte Extinktion bei GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-} Mäusen erklären. Eine entscheidende Rolle bei der Extinktion spielt der mediale präfrontale Kortex (mPFC): Es konnte gezeigt werden, dass elektrische Läsionen im infralimbischen Kortex (IL) des mPFC den Abruf des Extinktionsgedächtnisses verhindern (Quirk et al., 2000). Stimulationen im mPFC führen zum Abfall von Aktivitäten im CE, der ‚Output-Region‘ der Amygdala (Quirk et al., 2003) und nach Aktivierung des IL wurde ein reduziertes Freezing-Verhalten beobachtet (Milad et al., 2004). Die Neurone des mPFC besitzen durch exzitatorische Projektionen zu GABAergen Zellen der basolateralen Amygdala, hemmenden Einfluss auf den CE der Amygdala. Dieser wiederum sorgt mit seinen Projektionen für eine Verminderung der Furchtantwort (Rosenkranz et al., 2003; Quirk et al., 2003; Likhtik et al., 2005).

Durch das Fehlen beziehungsweise durch die eingeschränkte Aktivität von GAD65 bei GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-} Mäusen könnte eine unzureichende Antwort der GABAergen Zellen, zum Beispiel in Form einer verminderten GABA-Freisetzung, zur Verlängerung des Extinktionsvorganges führen. Hierdurch könnte auch das erhöhte Freezingverhalten von GAD65^{-/-} 24 Stunden nach dem Extinktions-Training erklärt werden. Diese Interpretation wird durch neuste, noch unpublizierte Daten einer Studie von L. Paulukat. (‚Funktion GABAerger Synapsen in der Lateralen Amygdala GAD65 defizienter Mäuse‘, 2008) bekräftigt. Bei der Untersuchung von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSCs) an Projektionsneuronen als Reaktion auf eine Depolarisation afferenter Interneurone wurde hier gezeigt, dass die durchschnittliche Spannung, die für eine Transmitterfreisetzung benötigt wird, bei GAD65^{-/-} Interneuronen fast doppelt so hoch ist wie bei GAD65^{+/+} Interneuronen. Die benötigte Spannung bei GAD65^{+/-} Interneuronen war tendenziell ebenfalls erhöht. Ursache könnte eine erhöhte Schwelle zur Freisetzung von Vesikeln bei GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-} Interneuronen sein oder aber die Veränderung der auf das Projektionsneuron projizierenden inhibitorischen Synapsen, bedingt durch Veränderungen in der Neuro- oder Synaptogenese.

Neueste Studien der Furcht-Konditionierung nach Pawlow zeigten Änderungen der Expression von GABA-assoziierten Genen in der Amygdala bei C57B/6J Mäusen. Während der Furchtakquisition konnte eine Herunter-Regulation der mRNA von GABA_A-Rezeptor Subtypen und GAD67 beobachtet werden, während das Extinktionslernen eine Hoch-Regulation der mRNA von GABA_A-Rezeptor Subtypen und GAD67 induzierte (Heldt und Ressler, 2007). Eine mögliche Beteiligung von GAD65 ist auch hier nicht auszuschließen und könnte ebenfalls die verlängerte Extinktion bei GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-} Mäusen erklären.

Bei der Furcht-Konditionierung ist bei GAD65^{+/-} Mäusen der Freezinganteil während des 1. CS+ in R1 signifikant geringer als bei GAD65^{-/-} und GAD65^{+/+}. 7 der 13 GAD65^{+/-} Mäuse zeigten ‚Flight‘-Verhalten, ein Verhalten, welches auch bei GAD65^{-/-} Mäusen in früheren Studien beschrieben wurde. Eine mögliche Erklärung dieses verminderten Freezingverhaltens und des stärker ausgeprägten Fluchtverhaltens wäre eine Disinhibierung von excitatorischen Projektionen der Amygdala insbesondere zum medialen Hypothalamus und periaquäduktalen zentralen Grau als Modulatoren der Furchtantwort (Davis et al. 1994; Graeff et al. 1993). Es ist bekannt, dass durch elektrische Stimulationen des ventrolateralen und dorsalen periaquäduktalen Grau sowohl ‚Freezing‘- als auch ‚Flight‘- Verhalten hervorgerufen werden kann (Vianna et al., 2001). Hemmung der GABA-Synthese oder Blockade von GABA_A-Rezeptoren direkt im medialen Hypothalamus und periaquäduktalen Grau stimulieren demzufolge ‚Flight‘- und Fluchtverhalten (Brandao et al., 1986; Graeff et al., 1986). Durch diesen Effekt könnte auch das gesteigerte Fluchtverhalten von GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-} Mäusen erklärt werden.

Die Ergebnisse der verhaltensphysiologischen Tests dieser Studie bestätigen, dass GAD65^{+/-} Tiere ein verändertes Angst- und Furchtverhalten aufweisen, was eine nicht ausreichende Kompensation des Mangels an GAD65 vermuten lässt. Die Aktivität des intakten Allels der GAD65 führt in den determiniert heterozygot defizienten Mäusen zu einem unzureichenden Gesamtgenprodukt, dessen Mangelerscheinungen das Verhalten der GAD65^{+/-} Mäuse zumeist als Bindeglied zwischen GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} einordnen lassen.

5.3 Neuronale Aktivitäten der GAD65^{+/-} Mäuse

Beobachtungen früherer Studien zeigen, dass Theta-Aktivitäten kortikaler Neurone zumeist mit synaptischer Plastizität verbunden sind (Huerta und Lisman, 1993; Holscher et al., 1997). Dies wurde inzwischen durch viele Studien vor allem an wichtigen limbischen Strukturen wie LA, PFC und CA1 Region des Hippocampus bestätigt. Insbesondere während des Freezingverhaltens nach der Furcht-Konditionierung zeigen sich hohe Theta-Synchronisationen zwischen LA und CA1. Dies weist auf einen Beitrag von Theta-Aktivitäten in LA und CA1 für

die synaptische Modifikation bei der Bildung des Angstgedächtnisses und bei der Expression von angstabhängigem Verhalten hin (Seidenbecher et al., 2003). Theta-Synchronisationen im PFC-LA und PFC-CA1 Netzwerk blieben während des Extinktionslernens erhalten, was auf eine funktionelle Rolle des präfrontalen Kortex bei der Konsolidierung der Extinktion schließen lässt (unpublizierte Daten Narayanan et al.).

Auch in dieser Arbeit konnten in LA, PFC und CA1 der GAD65^{+/-} Mäuse Feldpotentiale im Thetafrequenzbereich abgeleitet werden. Die furchtassoziierten synchronen Aktivitäten zwischen CA1-LA, PFC-CA1 und PFC-LA lagen stets zwischen 5 und 8 Hz.

Aus der Höhe der Korrelation für den jeweils zweiten positiven Gipfelwert der erstellten Kreuz-Korrelogramme lässt sich auf die Synchronität der Feldpotentialaktivitäten in den beiden untersuchten Strukturen schließen. Hohe Werte sprechen für eine starke Interaktion der Strukturen. Die Korrelationswerte für die GAD65^{+/-} Mäuse in dieser Studie befinden sich mit 0,1-0,2 auf einem sehr niedrigen Niveau. Technische Schwachstellen können nicht völlig ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zu der neuronalen Aktivität der GAD65^{+/-} Mäuse 10 Sekunden vor der Präsentation des CS+ („Baseline“) zeigten sich während der Präsentation des CS+ sowohl zwischen LA und CA1 als auch zwischen LA und PFC und zwischen PFC und CA1 erhöhte Korrelationswerte. Dies zeigt, dass die erhöhten Korrelationen nicht per se vorhanden sind, sondern stimulusbezogen und somit in Verbindung mit konditionierter Furcht hervorgerufen werden.

Die Korrelationen während der Präsentation des 1.-4. CS+ zeigen keine signifikanten Abweichungen untereinander. Eine Habituation ist somit, analog zu dem beschriebenen Verhalten, auch in den neuronalen Aktivitäten nicht zu erkennen.

Betrachtet man die neuronalen Aktivitäten zwischen LA, CA1 und PFC fällt auf, dass die Korrelationen in R1 sich alle auf einem gleichen, niedrigen Niveau im Bereich von 0,1 befinden. Während die neuronalen Aktivitäten zwischen LA und CA1 über den gesamten Verlauf des Extinktions-Trainings auf diesem Niveau verblieben, nahmen die synchronisierten Theta-Aktivitäten zwischen PFC-CA1 und insbesondere zwischen LA-PFC zu und verblieben bis einschließlich R6 auf einem höheren Niveau.

Ältere Studien mit C57B/6J-Mäusen zeigten für Korrelationen in R1 zwar ebenfalls gleiche Ausgangswerte für die synchronen Aktivitäten aller drei Strukturen, allerdings auf höherem Niveau bei ca. 0,2. Während die Korrelationen zwischen LA und CA1 über den Verlauf des Extinktions-Trainings dann abnahmen, blieben hohe Korrelationswerte bezüglich des PFC-CA1 und LA-PFC- Netzwerkes bestehen (Narayanan et al., 2007).

Um die Ergebnisse der neuronalen Aktivitäten aller GAD65 Genotypen vergleichen und interpretieren zu können, ist es wichtig, sich die Beziehungen der einzelnen Strukturen untereinander vor Augen zu führen.

Anatomisch zeigen sich enge Verknüpfungen zwischen der lateralen Amygdala und der CA1 Region des Hippocampus (Fendt und Fanselow 1999; Pikkarainen et al. 1999). Die Amygdala ist dafür bekannt die Gedächtnisbildung im Hippocampus zu modulieren (McGaugh et al. 1996; McGaugh, 2000). Außerdem bearbeitet der Hippocampus bei der kontextabhängigen Konditionierung Informationen des Kontext und leitet diese an die Amygdala weiter (Rudy et al., 2004). Die hohe Theta-Phasensynchronisation zwischen LA und CA1 wurde allerdings auch bei der kontextunabhängigen Konditionierung gefunden und deutet somit auf ein Zusammenspiel dieser Strukturen bei der Akquisition von Furcht über die kontextabhängige Konditionierung hinaus hin. Neuste Studien zeigten, dass die hohen Korrelationen auf das Abrufen des Furchtgedächtnisses 24 Stunden nach dem Training beschränkt sind. Direkt nach dem Training wurden keine erhöhten Korrelationen gefunden (Narayanan et al., 2007a). Die hohen Korrelationen zwischen den neuronalen Aktivitäten von LA und CA1 scheinen also spezifisch in den Abruf des Angstgedächtnisses involviert zu sein und nicht generell mit der Expression von Furcht einherzugehen.

Die neuronalen Aktivitäten zwischen LA und CA1 bei den GAD65^{+/-} lassen sich zwischen den neuronalen Aktivitäten von GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} einordnen. Allerdings sind die Ausgangswerte sowohl bei GAD65^{+/+} als auch bei GAD65^{-/-} Mäusen in R1 höher. Während die Korrelationswerte der GAD65^{+/+} dann bereits in R2 auf ein niedriges Niveau abfallen, bleiben die Werte für GAD65^{-/-} bis R4 auf dem höheren Niveau.

Für die niedrigen Korrelationswerte zwischen LA und CA1 bei GAD65^{+/-} Mäusen gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Durch den GAD65 Mangel könnte es während der Entwicklung des Nervensystems zu Veränderungen der Menge oder des Haushaltes von GABA kommen, was unter Umständen zu Veränderungen von Anzahl, Art und Verknüpfungen der Synapsen und Neurone führen könnte. Das veränderte Furchtverhalten von GAD65^{+/-} Mäusen könnte demnach in Zusammenhang mit veränderten Beiträgen zur synaptischen Modifikation von Furchtgedächtnis und Expression von angstabhängigem Verhalten stehen.

Neben dem Freezingverhalten zeigten die GAD65^{+/-} Mäuse insbesondere in R1 viel Risk-assessment. Für Risk-assessment-assozierte Theta-Phasensynchronisationen wurden auch in früheren Studien niedrige Korrelationswerte gefunden (Seidenbecher et al., 2003). Freezing-bezogene Korrelationen bei GAD65^{+/-} Tieren wiesen höhere Korrelationswerte für die neuronalen Aktivitäten zwischen LA und CA1 auf. Das vermehrte Risk-assessment Verhalten

DISKUSSION

der GAD65^{+/-} Mäuse könnte folglich die verminderte Theta-Phasensynchronisation während der Präsentation des CS+ zwischen LA und CA1 erklären.

Bei den GAD65^{+/-} Tieren scheint besonders der PFC eine wichtige Rolle zu spielen. Über den Verlauf des Extinktions-Trainings lassen sich sowohl zwischen LA-PFC als auch CA1-PFC höhere Korrelationen verzeichnen als zwischen LA-CA1.

Die Ergebnisse der neuronalen Aktivitäten zwischen LA und PFC für GAD65^{+/-} gleichen in ihrem aufsteigendem Trend eher den Ergebnissen der GAD65^{+/+} als den Ergebnissen der GAD65^{-/-} Mäuse. Von der Höhe der Werte ähneln sie allerdings vielmehr den GAD65^{-/-} Mäusen, denn sowohl GAD65^{+/-} als auch GAD65^{-/-} Mäuse zeigten tendenziell einen Anstieg der Korrelationswerte von R1-R6.

Amygdala und PFC besitzen viele Verbindungen untereinander, insbesondere zwischen medialen und orbitalen Zonen des PFC und basolateralen Kernen der Amygdala (Amaral, 1986). Von besonderer Wichtigkeit für die Furcht-Konditionierung sind die Projektionen des mPFC zu GABAergen Zellen der BLA, durch die der PFC Aktivitäten in der LA inhibiert und somit den Extinktionsvorgang unterstützt (Rosenkranz et al., 2003; Quirk et al., 2003; Likhtik et al., 2005). Der Einfluss des PFC auf das Extinktionslernen kann nur durch Interaktionen mit der LA stattfinden. Auch in dieser Arbeit zeigt sich diese Interaktion in den erhöhten synchronisierten Aktivitäten zwischen PFC und LA bei den GAD65^{+/-} Mäusen während des Extinktions-Trainings.

Die Korrelationswerte sind bei GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-} Mäusen höher als die der GAD65^{+/+} Mäusen. Eine mögliche Erklärung wäre eine kompensatorisch erhöhte Kopplung zwischen LA und PFC, um eine durch GAD65-Mangel verursachte verminderte Antwort GABAerger Zellen auszugleichen. Dies steht im Einklang mit der beschriebenen erhöhten Stimulationsstärke, die für eine Transmitterausschüttung bei GAD65^{-/-} und GAD65^{+/-} Interneuronen benötigt wird (unpublizierte Daten von L. Paulukat, 2008).

Der Trend der neuronalen Aktivitäten zwischen PFC und CA1 der GAD65^{+/-} Mäuse gleicht ebenfalls den GAD65^{-/-} Mäusen. Im Gegensatz zu dem signifikanten Abfall von R1 nach R2 der neuronalen Aktivitäten zwischen PFC und CA1 der GAD65^{+/+} Mäuse, blieb sowohl bei GAD65^{+/-} als auch bei GAD65^{-/-} Mäusen die Theta Synchronisation während des Extinktionslernens erhalten.

PFC und Hippocampus weisen ebenfalls dichte reziproke Verbindungen auf. Ein wichtiger Faserzug verläuft von der CA1 Region des Hippocampus zum medial-orbitalen PFC (Thierry et al., 2000). Durch elektrische Stimulationen in der CA1 Region wurde LTP im prälimbischen

DISKUSSION

Kortex von Ratten induziert. Monosynaptische Projektionen vom Hippocampus zum PFC können demnach aktivitätsabhängig synaptische Plastizität bewirken (Jay et al., 1995). Aufgaben, die im Zusammenhang mit dem räumlichen Gedächtnis standen, führten zu synchronisierten Theta-Aktivitäten zwischen PFC und Hippocampus (Jones und Wilson, 2005). Risk-assessment beinhaltet den Lernprozess neue Informationen aus der Umgebung zu verarbeiten. Das zunehmende Risk-assessment Verhalten der GAD65^{+/-} Mäuse in R1 bis R6 könnte demnach mit der erhöhten Theta-Phasensynchronisation zwischen PFC und CA1 in Verbindung stehen.

Die Ergebnisse für die neuronalen Aktivitäten geben Anlass den Mangel an GAD65 bei GAD65^{+/-} Mäusen durchaus als relevant zu betrachten. Es scheint als führe dieser Mangel sogar zu veränderten Beiträgen synaptischer Plastizität. Größtenteils standen die Ergebnisse für die GAD65^{+/-} Tiere zwischen den Ergebnissen für GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} und konnten keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden. Man kann allerdings bezüglich der neuronalen Aktivitäten nicht von einer ‚abgeschwächten Form der GAD65^{-/-} Tiere‘ per se sprechen. Vielmehr scheint der Teilmangel an GAD65 zu anderen Veränderungen zu führen als das komplette Fehlen von GAD65.

6 Ausblick

Mit dieser Arbeit soll ein Grundstein zum Verständnis des Angst- und Furchtverhaltens sowie der neuronalen Aktivitäten bei $GAD65^{+/-}$ Tieren gelegt werden. Gleichzeitig eröffnen die hier erhobenen Befunde neue Fragestellungen, die es in weiteren Arbeiten zu klären gilt. Zum Beispiel könnte es sehr interessant sein, altersabhängige Effekte in $GAD65$ defizienten Tieren und insbesondere $GAD65^{+/-}$ Mäusen zu untersuchen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass ein postnataler GABA-Anstieg bei $GAD65^{+/-}$ Mäusen verzögert stattfindet, was ein leichtes GABA-Defizit in der Amygdala während der ersten 2-3 Monate zur Folge hat (Stork et al., 2003).

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Beteiligung eines definierten Transmittersystems (GABA) an der Ausprägung von genereller Ängstlichkeit und konditionierter Furcht und leistet somit einen aktiven Beitrag zum verbesserten Verständnis der neuronalen Mechanismen und Prozesse bei der Steuerung von Furcht. Langfristig könnten diese Erkenntnisse dazu beitragen therapeutische Maßnahmen für Menschen, deren Alltag durch Ängste und Phobien bestimmt ist, zu verbessern.

7 Zusammenfassung

Neurotransmitter spielen neben der genetischen Prädisposition und psychosozialen Faktoren eine wichtige Rolle bei der Ätiologie von Angsterkrankungen. Entstehung und Äußerung des Furcht-Gedächtnisses sind unter anderem abhängig von γ -Aminobuttersäure (GABA), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS. GABA wird mithilfe der Glutamat-Decarboxylase (GAD), von der eine 65kDa und eine 67kDa Isoform existieren, synthetisiert.

In dieser Arbeit wurde das Angst- und Furchtverhalten sowie die neuronalen Aktivitäten (spontane Feldpotentiale in lateraler Amygdala, CA1-Region des Hippocampus und präfrontalem Kortex) während des Abrufes des Furchtgedächtnisses („Retrieval“) und der Extinktion insbesondere bei heterozygot defizienten GAD65 Mäusen, bei denen nur ein Allel des GAD65 Gens deaktiviert wurde, untersucht. Es stellte sich die Frage, inwiefern sich die Aktivität des intakten Allels der GAD65 bei diesen GAD65^{+/-} Mäusen auf das Gesamtgenprodukt und somit auf das Verhalten der Tiere auswirkt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden ein Light-Dark-Test, ein Dark-Light-Test und ein Elevated-Plus-Maze Test mit GAD65^{+/-}, GAD65^{+/+}, GAD65^{-/-} und C57B/6J-Kontrollmäusen durchgeführt, um die generelle Ängstlichkeit der Tiere beurteilen und vergleichen zu können. Die Ausprägung von Konsolidierung, Retrieval und Extinktion von Furcht wurde mithilfe der Furcht-Konditionierung ermittelt, wobei die Ergebnisse für die GAD65^{+/-} Tiere hierbei mit Ergebnissen für GAD65^{+/+}, GAD65^{-/-} und C57B/6J-Kontrollmäusen aus aktuellen Studien von Dr. S. Sangha und Dr. R. Narayanan verglichen wurden.

Amygdala, Hippocampus und präfrontaler Kortex sind als zentrale Strukturen des limbopräfrontalen Systems maßgeblich an Konsolidierung, Retrieval und Extinktion von Furcht beteiligt. So wurden in dem elektrophysiologischen Teil dieser Arbeit, mithilfe von implantierten Elektroden in der lateralen Amygdala (LA), der CA1-Region des Hippocampus und im präfrontalen Kortex (PFC), Feldpotential-Aktivitäten nach der Furcht-Konditionierung aufgezeichnet, um neuronale Korrelate bei GAD65^{+/-} Mäusen, insbesondere in Bezug auf das LA-CA1-PFC Netzwerk, zu analysieren.

Die Ergebnisse der Verhaltenstests, der Furcht-Konditionierung und der Analyse der neuronalen Aktivitäten der GAD65^{+/-} Mäuse zeigten, dass der Mangel an GAD65 bei GAD65^{+/-} Mäusen durchaus relevant ist. Ein verändertes Angstverhalten bei den heterozygot GAD65 defizienten Mäusen lässt eine nicht ausreichende Kompensation des Mangels an GAD65 vermuten. Dieses veränderte Angstverhalten äußerte sich überwiegend in abgeschwächter Form gegenüber dem Verhalten der GAD65^{-/-} Mäuse und lässt somit das Verhalten der GAD65^{+/-} Mäuse zumeist als Bindeglied zwischen dem Verhalten von GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} einordnen. Tendenziell

ZUSAMMENFASSUNG

erwiesen sich die GAD65^{-/-} Tiere im Light-Dark-Test, Dark-Light-Test und Elevated-Plus-Maze Test als die am wenigsten ängstlichen Tiere gefolgt von GAD65^{+/-} und schließlich GAD65^{+/+}. Eine erhöhte lokomotorische Aktivität, die bei GAD65^{-/-} Tieren beobachtet wurde, konnte bei den GAD65^{+/-} Tieren nicht verzeichnet werden.

Als Reaktion auf die Furcht-Konditionierung zeigten die GAD65^{+/-} Mäuse ein verringertes Freezingverhalten und ein stärker ausgeprägtes Fluchtverhalten als die GAD65^{+/+} Mäuse. Der starke Generalisierungseffekt und der verlängerte Extinktionsprozess, den die GAD65^{-/-} Mäuse vorwiesen, zeigte sich bei den GAD65^{+/-} Tieren in abgeschwächter Form.

Die Analyse der neuronalen Korrelate (Feldpotential-Aktivitäten) ergab, dass die Werte der GAD65^{+/-} Tiere ebenfalls größtenteils zwischen den Ergebnissen für GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} lagen. Bezüglich der neuronalen Aktivitäten kann allerdings nicht eine ‚abgeschwächte Form der GAD65^{-/-} Tiere‘ per se geschlussfolgert werden, viel mehr scheint der Teilmangel an GAD65 zu anderen Veränderungen zu führen als das komplette Fehlen von GAD65. Zuvor beobachtete synchrone Theta-Aktivitäten zwischen LA und CA1 konnten bei den GAD65^{+/-} Mäusen nur auf sehr niedrigem Niveau gefunden werden, während neuronale Aktivitäten zwischen PFC und CA1 sowie zwischen PFC und LA höhere Korrelationswerte annahmen, was eine wichtige Rolle bezüglich der Verknüpfungen mit dem PFC bei diesen Tieren vermuten lässt.

Somit wurde mit dieser Arbeit die Lücke zwischen GAD65^{+/+} und GAD65^{-/-} durch grundlegende Ergebnisse für GAD65^{+/-} Mäuse gefüllt.

Ein besseres Verständnis der neuronalen Mechanismen und Prozesse von Angstverhalten und Furchtgedächtnis trägt dazu bei die Steuerung der Angst genauer zu verstehen und somit die Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen für Patienten mit gestörtem Angstempfinden und veränderter Angstregulation zu verbessern.

8 Literaturverzeichnis

1. Adolphs, R., Tranel, D., Hamann, S., Young, A.W., Calder, A.J., Phelps, E.A., Anderson, A., Lee, G.P. & Damasio, A.R. (1999) Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage. *Neuropsychologia* 37, 1111-1117.
2. Akerman, C.J. & Cline, H.T. (2007) Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. *Trends Neurosci.* 30, 382-389.
3. Alonso, A. & Llinas, R.R. (1989) Subthreshold Na⁺-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 342, 175-177.
4. Amaral, D.G. (1986) Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain. *Adv.Exp.Med.Biol.* 203, 3-17.
5. Amaral, D.G. & Witter, M.P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.
6. Anagnostaras, S.G., Maren, S. & Fanselow, M.S. (1999) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J.Neurosci.* 19, 1106-1114.
7. Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T. & Obata, K. (1997) Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 6496-6499.
8. Bauer, E.P., Schafe, G.E. & LeDoux, J.E. (2002) NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J.Neurosci.* 22, 5239-5249.
9. Bergado-Acosta, J.R., Sangha, S., Narayanan, R.T., Obata, K., Pape, H.C. & Stork, O. (2008) Critical role of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase in consolidation and generalization of Pavlovian fear memory. *Learn.Mem.* 15, 163-171.
10. Bernard, C. & Wheal, H.V. (1994) Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. *Hippocampus* 4, 497-529.
11. Bouton, M.E., Rosengard, C., Achenbach, G.G., Peck, C.A. & Brooks, D.C. (1993) Effects of contextual conditioning and unconditional stimulus presentation on performance in appetitive conditioning. *Q.J.Exp.Psychol.B* 46, 63-95.
12. Bowery, N.G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J.P., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T.I. & Enna, S.J. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol.Rev.* 54, 247-264.
13. Brandao, M.L., Di, S.G., Bouchet, M.J. & Schmitt, P. (1986) Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 24, 497-501.

LITERATURVERZEICHNIS

14. Bullock, T.H., Buzsaki, G. & McClune, M.C. (1990) Coherence of compound field potentials reveals discontinuities in the CA1-subiculum of the hippocampus in freely-moving rats. *Neuroscience* 38, 609-619.
15. Burdach, K.F. (1819) *Vom Baue und Leben des Gehirns*. Leipzig.
16. Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E. & Quirk, G.J. (2007) Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53, 871-880.
17. Buzsaki, G. & Draguhn, A. (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926-1929.
18. Buzsaki, G. (2005) Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus* 15, 827-840.
19. Chapman, W.P., Schroeder, H.R., Geyer, G., Brazier, M.A., Fager, C., Poppen, J.L., Solomon, H.C. & Yakovlev, P.I. (1954) Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science* 120, 949-950.
20. Corbett, R., Fielding, S., Cornfeldt, M. & Dunn, R.W. (1991) GABA-mimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plus maze procedures. *Psychopharmacology (Berl)* 104, 312-316.
21. Crawley, J.N. (1981) Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 15, 695-699.
22. Crawley, J.N. & Davis, L.G. (1982) Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Res.Bull.* 8, 609-612.
23. Crusio, W.E. & Schmitt, A. (1996) Prenatal effects of parity on behavioral ontogeny in mice. *Physiol Behav.* 59, 1171-1174.
24. Dalley, J.W., Cardinal, R.N. & Robbins, T.W. (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 28, 771-784.
25. Davis, M., Rainnie, D. & Cassell, M. (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci.* 17, 208-214.
26. Davis, M. & Whalen, P.J. (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Mol.Psychiatry* 6, 13-34.
27. Degenetais, E., Thierry, A.M., Glowinski, J. & Gioanni, Y. (2002) Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb.Cortex* 12, 1-16.
28. Doron, N.N. & LeDoux, J.E. (1999) Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J.Comp Neurol.* 412, 383-409.
29. Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N. & Tobin, A.J. (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7, 91-100.

30. Falls, W.A., Miserendino, M.J. & Davis, M. (1992) Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J.Neurosci.* 12, 854-863.
31. Fanselow, M.S. & Kim, J.J. (1992) The benzodiazepine inverse agonist DMCM as an unconditional stimulus for fear-induced analgesia: implications for the role of GABAA receptors in fear-related behavior. *Behav.Neurosci.* 106, 336-344.
32. Fanselow, M.S. (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav.Brain Res.* 110, 73-81.
33. Feindel, W. & Penfield, W. (1954) Localization of discharge in temporal lobe automatism. *AMA.Arch.Neurol.Psychiatry* 72, 603-630.
34. Fendt, M. & Fanselow, M.S. (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 23, 743-760.
35. File, S.E., Gonzalez, L.E. & Gallant, R. (1998) Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 19, 397-405.
36. File, S.E. (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav.Brain Res.* 125, 151-157.
37. Frankland, P.W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A. & Silva, A.J. (2001) Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* 411, 309-313.
38. Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L. & Song, H. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589-593.
39. Gentile, C.G., Jarrell, T.W., Teich, A., McCabe, P.M. & Schneiderman, N. (1986) The role of amygdaloid central nucleus in the retention of differential pavlovian conditioning of bradycardia in rabbits. *Behav.Brain Res.* 20, 263-273.
40. Goosens, K.A., Hobin, J.A. & Maren, S. (2003) Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? *Neuron* 40, 1013-1022.
41. Gozlan, H. & Ben-Ari, Y. (2003) Interneurons are the source and the targets of the first synapses formed in the rat developing hippocampal circuit. *Cereb.Cortex* 13, 684-692.
42. Graeff, F.G., Brandao, M.L., Audi, E.A. & Schutz, M.T. (1986) Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behav.Brain Res.* 22, 173-180.
43. Graeff, F.G., Silveira, M.C., Nogueira, R.L., Audi, E.A. & Oliveira, R.M. (1993) Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav.Brain Res.* 58, 123-131.
44. Groenewegen, H.J., Wright, C.I. & Uylings, H.B. (1997) The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J.Psychopharmacol.* 11, 99-106.

45. Guillot, P.V. & Chapouthier, G. (1998) Intermale aggression, GAD activity in the olfactory bulbs and Y chromosome effect in seven inbred mouse strains. *Behav.Brain Res.* 90, 203-206.
46. Guldin, W.O., Pritzel, M. & Markowitsch, H.J. (1981) Prefrontal cortex of the mouse defined as cortical projection area of the thalamic mediodorsal nucleus. *Brain Behav.Evol.* 19, 93-107.
47. Heldt, S.A. & Ressler, K.J. (2007) Training-induced changes in the expression of GABAA-associated genes in the amygdala after the acquisition and extinction of Pavlovian fear. *Eur.J.Neurosci.* 26, 3631-3644.
48. Herbison, A.E., Augood, S.J. & McGowan, E.M. (1992) Expression of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in rat medial preoptic area neurones during the oestrous cycle and after ovariectomy. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 14, 310-316.
49. Holmes, A., Yang, R.J. & Crawley, J.N. (2002) Evaluation of an anxiety-related phenotype in galanin overexpressing transgenic mice. *J.Mol.Neurosci.* 18, 151-165.
50. Holscher, C., Anwyl, R. & Rowan, M.J. (1997) Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. *J.Neurosci.* 17, 6470-6477.
51. Huerta, P.T. & Lisman, J.E. (1993) Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* 364, 723-725.
52. Ishikawa, A. & Nakamura, S. (2003) Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. *J.Neurosci.* 23, 9987-9995.
53. Itoh, M. & Uchimura, H. (1981) Regional differences in cofactor saturation of glutamate decarboxylase (GAD) in discrete brain nuclei of the rat. Effect of repeated administration of haloperidol on GAD activity in the substantia nigra. *Neurochem.Res.* 6, 1283-1289.
54. Jay, T.M., Burette, F. & Laroche, S. (1995) NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat. *Eur.J.Neurosci.* 7, 247-250.
55. Jones, M.W. & Wilson, M.A. (2005) Theta Rhythms Coordinate Hippocampal-Prefrontal Interactions in a Spatial Memory Task. *PLoS.Biol.* 3, e402.
56. Kamikawa, K., McIlwain, J.T. & Adey, W.R. (1964) Response patterns of Thalamic Neurons during classical conditioning. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 17, 485-496.
57. Kamprath, K. & Wotjak, C.T. (2004) Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn.Mem.* 11, 770-786.
58. Kandel, E.R., Scharf, J.h. & Jessel, R.M. (1996) Emotionale Zustände. In *Neurowissenschaften*, pp. 608-623.
59. Kandel, E.R., Kupfermann, I. & Iversen, S. (2000) Learning and memory. In *Principles of Neural Science*, pp. 1226-1246. New York.

60. Karl, T., Pabst, R. & von Horsten S. (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp.Toxicol.Pathol.* 55, 69-83.
61. Kash, S.F., Johnson, R.S., Tecott, L.H., Noebels, J.L., Mayfield, R.D., Hanahan, D. & Baekkeskov, S. (1997) Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 14060-14065.
62. Kash, S.F., Tecott, L.H., Hodge, C. & Baekkeskov, S. (1999) Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 1698-1703.
63. Kemp, I.R. & Kaada, B.R. (1975) The relation of hippocampal theta activity to arousal, attentive behaviour and somato-motor movements in unrestrained cats. *Brain Res.* 95, 323-342.
64. Kesner, R.P. (2000) Behavioral analysis of the contribution of the hippocampus and parietal cortex to the processing of information: interactions and dissociations. *Hippocampus* 10, 483-490.
65. Kessler, R.C., Chiu, W.T., Demler, O., Merikangas, K.R. & Walters, E.E. (2005) Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch.Gen.Psychiatry* 62, 617-627.
66. Kim, J.J. & Fanselow, M.S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675-677.
67. Klimesch, W. (1996) Memory processes, brain oscillations and EEG synchronization. *Int.J.Psychophysiol.* 24, 61-100.
68. Klink, R. & Alonso, A. (1993) Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J.Neurophysiol.* 70, 144-157.
69. Klüver, H. & Bucy, P.C. (1934) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch.Neurol.Psychiatr.* 42, 979-1000.
70. Klüver, H. & Bucy, P.C. (1937) "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am.J.Physiol.* 119, 352-353.
71. Kolb, B. (1984) Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res.* 320, 65-98.
72. Korte S. & De Boer, S.F. (2003) A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur.J.Pharmacol.* 463, 163-175.
73. LeDoux, J. (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol.Psychiatry* 44, 1229-1238.
74. LeDoux, J.E., Iwata, J., Cicchetti, P. & Reis, D.J. (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J.Neurosci.* 8, 2517-2529.

LITERATURVERZEICHNIS

75. LeDoux, J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu.Rev.Neurosci.* 23:155-84., 155-184.
76. LeDoux, J.E., Schafe, G.E. & Rodrigues, S. (2004) Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44, 75-91.
77. Likhtik, E., Pelletier, J.G., Paz, R. & Pare, D. (2005) Prefrontal control of the amygdala. *J.Neurosci.* 25, 7429-7437.
78. Lin, C.H., Hansen, S., Wang, Z., Storm, D.R., Tapscott, S.J. & Olson, J.M. (2005) The dosage of the neuroD2 transcription factor regulates amygdala development and emotional learning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 14877-14882.
79. Lipp, H.P. & Wolfer, D.P. (1998) Genetically modified mice and cognition. *Curr.Opin.Neurobiol.* 8, 272-280.
80. MacLean, P.D. (1955) The limbic system („visceral brain“) and emotional behavior. *Archives of Neurology and Psychiatry* 73, 130-134.
81. Maren, S., Aharonov, G., Stote, D.L. & Fanselow, M.S. (1996) N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav.Neurosci.* 110, 1365-1374.
82. Maren, S., Aharonov, G. & Fanselow, M.S. (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav.Brain Res.* 88, 261-274.
83. Maren, S. & Corcoran, K.A. (2001) Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J.Neurosci.* 21, 1720-1726.
84. Maren, S. & Quirk, G.J. (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat.Rev.Neurosci.* 5, 844-852.
85. Martin, D.L., Martin, S.B., Wu, S.J. & Espina, N. (1991) Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J.Neurosci.* 11, 2725-2731.
86. Mayer, M.L., Westbrook, G.L. & Guthrie, P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261-263.
87. McDonald, A.J. (1992) Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res.Bull.* 28, 179-185.
88. McGaugh, J.L., Cahill, L. & Roozendaal, B. (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 13508-13514.
89. McGaugh, J.L. (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248-251.
90. Medina, J.F., Christopher, R.J., Mauk, M.D. & LeDoux, J.E. (2002) Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. *Nat.Rev.Neurosci.* 3, 122-131.
91. Mietzel, Gerd (1998) Wege in die Psychologie. Stuttgart: Klett-Cotta, 170.

LITERATURVERZEICHNIS

92. Milad, M.R. & Quirk, G.J. (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420, 70-74.
93. Milad, M.R., Vidal-Gonzalez, I. & Quirk, G.J. (2004) Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behav.Neurosci.* 118, 389-394.
94. Mora, F., Segovia, G. & Del, A.A. (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res.Rev.* 55, 78-88.
95. Morgan, M.A., Romanski, L.M. & LeDoux, J.E. (1993) Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci.Lett.* 163, 109-113.
96. Muller, J., Corodimas, K.P., Fridel, Z. & LeDoux, J.E. (1997) Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav.Neurosci.* 111, 683-691.
97. Narayanan, R.T., Seidenbecher, T., Sangha, S., Stork, O. & Pape, H.C. (2007a) Theta resynchronization during reconsolidation of remote contextual fear memory. *Neuroreport* 18, 1107-1111.
98. Narayanan, R.T., Seidenbecher, T., Kluge, C., Bergado, J., Stork, O. & Pape, H.C. (2007b) Dissociated theta phase synchronization in amygdalo- hippocampal circuits during various stages of fear memory. *Eur.J.Neurosci.* 25, 1823-1831.
99. O'Brien, J.H. & Fox, S.S. (1969) Single-cell activity in cat motor cortex. I. Modifications during classical conditioning procedures. *J.Neurophysiol.* 32, 267-284.
100. Obata, K. (1977) Biochemistry and Physiology of Amino Acid Transmitters. In *Handbook of Physiology*, ed. Kandel, E.R., pp. 625-650.
101. Okada, Y., Taniguchi, H. & Shimada, C. (1976) High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194, 620-622.
102. Oleson, T.D., Ashe, J.H. & Weinberger, N.M. (1975) Modification of auditory and somatosensory system activity during pupillary conditioning in the paralyzed cat. *J.Neurophysiol.* 38, 1114-1139.
103. Pape, H.C., Pare, D. & Driesang, R.B. (1998) Two types of intrinsic oscillations in neurons of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala. *J.Neurophysiol.* 79, 205-216.
104. Pape, H.C. & Stork, O. (2003) Genes and mechanisms in the amygdala involved in the formation of fear memory. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 985, 92-105.
105. Pape, H.C. (2004a) Integrative Funktionen des Gehirns. In *Physiologie*, eds. Klinke, R., Pape, H.C. & Silbernagel, S., pp. 801-834.
106. Pape, H.C. (2004b) Rhythmen des Gehirns. In *Physiologie*, eds. Klinke, R., Pape, H.C. & Silbernagel, S., pp. 836-837.

LITERATURVERZEICHNIS

107. Pape, H.C., Narayanan, R.T., Smid, J., Stork, O. & Seidenbecher, T. (2005) Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to long-term fear memory. *Hippocampus* 15, 874-880.
108. Papez, J.W. (1937) A proposed mechanism of emotion. *Archives of Neurology and Psychiatry* 38, 725-743.
109. Pare, D., Pape, H.C. & Dong, J. (1995) Bursting and oscillating neurons of the cat basolateral amygdaloid complex in vivo: electrophysiological properties and morphological features. *J.Neurophysiol.* 74, 1179-1191.
110. Pare, D. & Collins, D.R. (2000) Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *J.Neurosci.* 20, 2701-2710.
111. Patton, P.E. & McNaughton, B. (1995) Connection matrix of the hippocampal formation: I. The dentate gyrus. *Hippocampus* 5, 245-286.
112. Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. (2001) *The mouse brain*. sec. edition.
113. Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. & Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J.Neurosci.Methods* 14, 149-167.
114. Pesold, C. & Treit, D. (1994) The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* 638, 295-301.
115. Petsche, H., Stumpf, C. & Gogolák, G. (1962) The significance of the rabbit's septum as a relay station between midbrain and the hippocampus:I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 14, 202-211.
116. Phillips, R.G. & LeDoux, J.E. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav.Neurosci.* 106, 274-285.
117. Pikkarainen, M., Ronkko, S., Savander, V., Insausti, R. & Pitkanen, A. (1999) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J.Comp Neurol.* 403, 229-260.
118. Pitkänen, A., Savander, V. & LeDoux, J.E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* 20, 517-523.
119. Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N. & Ylinen, A. (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 911, 369-391.
120. Pschyrembel (2004) *Klinisches Wörterbuch*. 260 edition.
121. Quirk, G.J., Reppas, C. & LeDoux, J.E. (1995) Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15, 1029-1039.

-
122. Quirk, G.J., Armony, J.L. & LeDoux, J.E. (1997) Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19, 613-624.
 123. Quirk, G.J., Russo, G.K., Barron, J.L. & Lebron, K. (2000) The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *J.Neurosci.* 20, 6225-6231.
 124. Quirk, G.J. (2002) Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn.Mem.* 9, 402-407.
 125. Quirk, G.J., Likhtik, E., Pelletier, J.G. & Pare, D. (2003) Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J.Neurosci.* 23, 8800-8807.
 126. Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K. & De, C.P. (1991) GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J.* 10, 1275-1284.
 127. Repa, J.C., Muller, J., Apergis, J., Desrochers, T.M., Zhou, Y. & LeDoux, J.E. (2001) Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat.Neurosci.* 4, 724-731.
 128. Ressler, K.J., Rothbaum, B.O., Tannenbaum, L., Anderson, P., Graap, K., Zimand, E., Hodges, L. & Davis, M. (2004) Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Arch.Gen.Psychiatry* 61, 1136-1144.
 129. Rogan, M.T., Staubli, U.V. & LeDoux, J.E. (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390, 604-607.
 130. Romanski, L.M. & LeDoux, J.E. (1993) Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb.Cortex* 3, 515-532.
 131. Rosenkranz, J.A., Moore, H. & Grace, A.A. (2003) The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *J.Neurosci.* 23, 11054-11064.
 132. Routtenberg, A. (2002) Targeting the "species gene ensemble". *Hippocampus* 12, 105-108.
 133. Rudolph, U., Crestani, F. & Mohler, H. (2001) GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 188-194.
 134. Rudy, J.W., Huff, N.C. & Matus-Amat, P. (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 28, 675-685.
 135. Sah, P., Faber, E.S., Lopez de, A.M. & Power, J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev.* 83, 803-834.
 136. Sanders, S.K. & Shekhar, A. (1995) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 52, 701-706.

137. Seidenbecher, T., Laxmi, T.R., Stork, O. & Pape, H.C. (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301, 846-850.
138. Shekhar, A., Sajdyk, T.J., Gehlert, D.R. & Rainnie, D.G. (2003) The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 985, 308-325.
139. Shepard, R.N. (1987) Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science* 237, 1317-1323.
140. Shimada, T., Matsumoto, K., Osanai, M., Matsuda, H., Terasawa, K. & Watanabe, H. (1995) The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. *Gen.Pharmacol.* 26, 205-210.
141. Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W. & Kida, S. (1998) CREB and memory. *Annu.Rev.Neurosci.* 21, 127-148.
142. Solimena, M., Aggujaro, D., Muntzel, C., Dirx, R., Butler, M., De, C.P. & Hayday, A. (1993) Association of GAD-65, but not of GAD-67, with the Golgi complex of transfected Chinese hamster ovary cells mediated by the N-terminal region. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 3073-3077.
143. Speckmann, E.J. & Walden, J. (1991) Mechanisms underlying the generation of cortical field potentials. *Acta Otolaryngol.Suppl* 491, 17-23.
144. Squire, L.R. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol.Rev.* 99, 195-231.
145. Stafstrom, C.E., Chronopoulos, A., Thurber, S., Thompson, J.L. & Holmes, G.L. (1993) Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia* 34, 420-432.
146. Stork, O., Ji, F.Y., Kaneko, K., Stork, S., Yoshinobu, Y., Moriya, T., Shibata, S. & Obata, K. (2000) Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. *Brain Res.* 865, 45-58.
147. Stork, O., Ji, F.Y. & Obata, K. (2002) Reduction of extracellular GABA in the mouse amygdala during and following confrontation with a conditioned fear stimulus. *Neurosci.Lett.* 327, 138-142.
148. Stork, O., Yamanaka, H., Stork, S., Kume, N. & Obata, K. (2003) Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice. *Genes Brain Behav.* 2, 65-70.
149. Thierry, A.M., Gioanni, Y., Degenetais, E. & Glowinski, J. (2000) Hippocampoprefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10, 411-419.
150. Thierry, A.M., Gioanni, Y., Degenetais, E. & Glowinski, J. (2000) Hippocampoprefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10, 411-419.

151. Thompson, R.F. & Spencer, W.A. (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol.Rev.* 73, 16-43.
152. Tierney, P.L., Degenetais, E., Thierry, A.M., Glowinski, J. & Gioanni, Y. (2004) Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex. *Eur.J.Neurosci.* 20, 514-524.
153. Tonegawa, S., Li, Y., Erzurumlu, R.S., Jhaveri, S., Chen, C., Goda, Y., Paylor, R., Silva, A.J., Kim, J.J., Wehner, J.M. & . (1995) The gene knockout technology for the analysis of learning and memory, and neural development. *Prog.Brain Res.* 105, 3-14.
154. Vanderwolf, C.H. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 26, 407-418.
155. Ventriglia, F. (2008) The engram formation and the global oscillations of CA3. *Cogn Neurodyn.* 2, 335-345.
156. Verwer, R.W., Van Vulpen, E.H. & Van Uum, J.F. (1996) Postnatal development of amygdaloid projections to the prefrontal cortex in the rat studied with retrograde and anterograde tracers. *J.Comp Neurol.* 376, 75-96.
157. Vianna, D.M., Graeff, F.G., Brandao, M.L. & Landeira-Fernandez, J. (2001) Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. *Neuroreport* 12, 4109-4112.
158. 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. *J.Neurosci.* 22, 2343-2351.
159. Wilensky, A.E., Schafe, G.E. & LeDoux, J.E. (1999) Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J.Neurosci.* 19, RC48.
160. Willis, T. (1664) *Cerebri anatome: cui accessit nervorum descriptio et usus.* London.
161. Wu, H., Jin, Y., Buddhala, C., Osterhaus, G., Cohen, E., Jin, H., Wei, J., Davis, K., Obata, K. & Wu, J.Y. (2007) Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles-Evidence from GAD65-knockout mice studies. *Brain Res.* 1154, 80-83.
162. Yang, C.R., Seamans, J.K. & Gorelova, N. (1996) Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *J.Neurosci.* 16, 1904-1921.
163. Young, S.L., Bohenek, D.L. & Fanselow, M.S. (1994) NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav.Neurosci.* 108, 19-29.
164. Zwanzger, P. & Deckert, J. (2007) [Anxiety disorders : Causes, clinical picture and treatment.]. *Nervenarzt* 78 , 349-360.

9 Eigenständigkeitserklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Generelle Ängstlichkeit und konditionierte Furcht bei Mäusen mit heterozygoter genetischer von Glutamat-Decarboxylase 65. Eine kombinierte Verhaltens- und elektrophysiologische Studie.“ in dem Institut für Physiologie I der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster unter Anleitung von Univ.-Prof. Dr. Hans-Christian Pape

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 15. November 2010

(Anne Veismann)

10 Danksagung

LEBENS LAUF



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herr
Prof. Dr. rer. nat. Hans – Christian Pape
Institut für Physiologie I und
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung
Robert – Koch – Str. 27a

48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 6-7
48143 Münster
Telefon: 0251 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-2115
Raum: C 211
Auskunft erteilt:
Herr Skoff
E-Mail:
Dez50@brms.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 53/2005)

September 2005

Tierschutz; Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 14.07.2005

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Pape,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der zur Zeit gültigen Fassung (BGBl. I S. 1105, 1818) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

" Neurophysiologische Korrelate von Furchtverhalten und Furchtgedächtnis in den Schaltkreisen Amygdala-Hippocampus-Präfrontaler Cortex"

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. rer. nat. Hans-Christian Pape
Institut für Physiologie I und
Institut für Experimentelle Epilepsieforschung
Robert – Koch – Str. 27a
48149 Münster

Herr
Dr. Rer. nat. Thomas Seidenbecher
Institut für Physiologie I
Robert – Koch – Str. 27a
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum **30.09.2008**.

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de
Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300
ÖPNV - Haltestellen:
Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20
Raphaelsklinik, Linien 2, 10, 11, 12 (Haus K)
Albrecht-Thaer-Straße, Linie 17 (Haus N)
Hauptbahnhof, ca. 100 m zu Fuß (Haus S)

Konten der Landeskasse	Deutsche Bundesbank - Filiale Münster	WestLB AG Münster
BLZ:	400 000 00	400 500 00
Konto:	40 001 520	61 820
IBAN:	DE34 4000 0000 0040 0015 20	DE65 4005 0000 0000 0618 20
BIC:	MARKDEF1400	WELADE3M

1/2

Gem. TierSchG sind max. 3 Jahre genehmigungsfähig. Die Genehmigung kann 2 mal um 1 Jahr verlängert werden.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

Maximal 300 Mäuse p.a.
Maximal 250 Ratten p.a.

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung

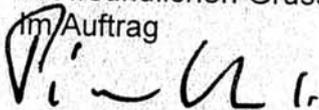
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

im Auftrag



Dr. Pionkowski