

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Chronische unilaterale Hemmung der GABA-Synthese in der  
Amygdala erhöht die Spezifität konditionierter Furcht bei Ratten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Rami Sebastian El Matine
aus	Paderborn
Magdeburg	2023

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

El Matine, Rami Sebastian

Chronische unilaterale Hemmung der GABA-Synthese in der Amygdala erhöht die Spezifität konditionierter Furcht bei Ratten

2023. 56 Bl.: 12 Abb., 1 Anl.

### Kurzreferat:

Die neuronale Aktivität der Amygdala ist für Furchtlernen, auch Furchtkonditionierung genannt, von entscheidender Bedeutung. Bei Patienten mit Angststörungen wird häufig eine bilaterale Hyperaktivität der Amygdala beobachtet. Diese Hyperaktivität begünstigt Furchtkonditionierung und/oder eine Übergeneralisierung konditionierter Furcht. Im Gegensatz dazu schwächt eine Hypoaktivität der Amygdala, beispielsweise durch pharmakologisches Eingreifen, die Konditionierung von Furcht ab oder blockiert sie völlig. Bislang ist wenig darüber bekannt, wie verschiedene Aktivitätszustände der neuronalen Erregbarkeit der Amygdala die Spezifität oder Generalisierung von Furcht beeinflussen. Daher wurde in der vorliegenden Studie durch chronische Hemmung der GABA-Synthese in der Amygdala die Erregbarkeit dieser gesteigert und die Auswirkungen auf die Spezifität von Furchtkonditionierung untersucht. Hierzu wurden Ratten unilateral intrakranielle Kanülen in die Amygdala implantiert. Die Kanülen waren mit subkutan implantierten osmotischen Minipumpen verbunden, die entweder den GABA-Synthesehemmer L-Allylglycin oder sein inaktives Enantiomer D-Allylglycin abgaben. Eine Woche später wurden die Ratten einem diskriminativen Furchtkonditionierungsprotokoll unterzogen. Darüber hinaus wurde in *Light-Dark Box* (LDB) Tests angstähnliches Verhalten der Ratten gemessen. Die erhobenen Daten zeigen, dass chronische unilaterale L-AG-Infusionen in die Amygdala die Spezifität konditionierter Furcht verbessern, *Safety*-Lernen unterstützen und Angst sowie die Generalisierung von Furcht mindern. Folglich legen die Ergebnisse dieser Arbeit also nahe, dass eine mäßige Erhöhung der Erregbarkeit der Amygdala sich positiv auf die Spezifität konditionierter Furcht auswirken kann und verdeutlichen die potenzielle Anwendung für therapeutische Interventionen.

**Schlüsselwörter:** Angst, Furcht, Furchtkonditionierung, Furchtgedächtnis, *Safety*-Lernen, Generalisation, Amygdala, GABA, Spezifität.

# Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt .....	II
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Veröffentlichung .....	VII
1 Einführung .....	1
2 Material und Methoden .....	5
2.1 Tiere und Haltungsbedingungen.....	5
2.2 Versuchsablauf .....	5
2.3 <i>Light-Dark Box Test</i> .....	7
2.4 Operation und pharmakologische Manipulation.....	8
2.5 Diskriminative Furchtkonditionierung.....	12
2.5.1 <i>Startleapparatur</i> .....	12
2.5.2 Konditionierungsprotokoll.....	13
2.6 Histologie .....	15
2.7 Statistische Auswertung.....	16
3 Ergebnisse.....	17
3.1 Injektionsstellen.....	17
3.2 Verhalten im <i>Light-Dark Box Test</i> .....	19
3.3 Modulation der Schreckreaktion durch den Kontext.....	20
3.4 Modulation der Schreckreaktionsamplitude durch CS+, CS- und deren gleichzeitiger Präsentation ( <i>CS+/CS- Compound</i> ) .....	21
3.5 Spezifität der Furchtreaktion.....	24
4 Diskussion .....	25
5 Schlussfolgerung.....	32
6 Zusammenfassung.....	33
Literaturverzeichnis.....	34
Danksagung .....	44
Ehrenerklärung .....	45
Bildungsweg.....	46
Anlagen .....	49

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsablauf .....	6
Abbildung 2: Light-Dark Box Apparatur.....	7
Abbildung 3: Operations-Setup .....	9
Abbildung 4: Osmotische Minipumpe mit Kunststoffschlauch und konnektierter Injektionskanüle .....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung neuronaler Prozesse nach Operation .....	11
Abbildung 6: Startleapparatur .....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der transkardialen Perfusion.....	15
Abbildung 8: Hirnschnitt mikroskopisch und schematisch .....	18
Abbildung 9: Verhalten im Light-Dark Box Test .....	20
Abbildung 10: Auswirkungen des Kontexts auf die Schreckreaktionsamplitude (Startle magnitude) vor und nach diskriminativer Furchtkonditionierung.....	21
Abbildung 11: Auswirkung von CS+, CS- und des CS+/CS- Compound auf die Schreckreaktionsamplitude vor und nach diskriminativer Furchtkonditionierung .....	23
Abbildung 12: Unterschiede der Z-Scores zeigen die Spezifität der konditionierten Furchtreaktion ....	24

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu$ l	<i>Mikroliter</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ASR	<i>Akustische Schreckreaktion</i>
BMP	<i>Basomediale Amygdala, hinterer Teil (posterior)</i>
BNST	<i>Bed nucleus of the stria terminalis</i>
CA	<i>Zentrale Amygdala</i>
CS+	<i>Conditioned stimulus (fear)</i>
CS-	<i>Conditioned stimulus (pseudo/safety)</i>
CS+/CS- Compound	<i>Simultane Präsentation von CS+ und CS- (Mischung)</i>
D	<i>Tag</i>
D-AG	<i>D-Allylglycin</i>
dB	<i>Dezibel</i>
DPX	<i>Einschlussmittel auf Toluolbasis</i>
FPS	<i>Furchtpotenzierte Schreckreaktion</i>
g	<i>Gramm</i>
GABA	<i><math>\gamma</math>-Aminobuttersäure</i>
GAD	<i>Glutamatdecarboxylase</i>
GAD67	<i>Glutamatdecarboxylase Isoform 67</i>
GAT1	<i>GABA Transporter Typ 1</i>
h	<i>Hour</i>
ISI	<i>Interstimulusintervall</i>
kg	<i>Kilogramm</i>
LA	<i>Laterale Amygdala</i>
L-AG	<i>L-Allylglycin</i>
LDB	<i>Light-Dark Box</i>
lx	<i>Lux</i>
M	<i>Molare Masse</i>
mg	<i>Milligramm</i>
mM	<i>Millimolar</i>
ms	<i>Millisekunde</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>

nmol	<i>Nanomol</i>
NR1	<i>NMDAR1 (Untereinheit zeta-1 des NMDA Rezeptors (N-Methyl-D-aspartate receptor))</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
Post	<i>Posttest</i>
Pre	<i>Pretest</i>
s.c.	<i>Subcutan</i>
SPL	<i>Schalldruckpegel (Sound Pressure Level)</i>
SR-LAB	<i>Startle Response System</i>
tDCS	<i>Transkranielle Gleichstromstimulation</i>
TI	<i>Temporale Interferenz</i>
TMS	<i>Transkranielle Magnetstimulation</i>
US	<i>Unconditioned stimulus</i>
W	<i>Watt</i>

## Veröffentlichung

Die vorliegende Dissertation wurde in einer gekürzten Fassung auf Englisch zur Publikation in der Fachzeitschrift *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* eingereicht und am 10. Februar 2023 zur Publikation akzeptiert.

El Matine R, Kreutzmann JK & Fendt M (2023)

Chronic unilateral inhibition of GABA synthesis in the amygdala increases specificity of conditioned fear in a discriminative fear conditioning paradigm in rats.

*Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 124: 110732

Doi: 10.1016/j.pnpbp.2023.110732

Autoren-Anteile:

R.E.M., formale Analyse, Untersuchung, Visualisierung, Schreiben - ursprünglicher Entwurf, Überprüfung und Bearbeitung; J.K., Betreuung, Schreiben - Überprüfung und Bearbeitung; M.F., Konzeptualisierung, formale Analyse, Visualisierung, Ressourcen, Betreuung, Schreiben - ursprünglicher Entwurf, Überprüfung und Bearbeitung.

# 1 Einführung

Als eine der sechs Basisemotionen wird Furcht von allen Menschen ähnlich erlebt, unabhängig von kulturellen oder soziologischen Einflüssen (Ekman et al., 1969; Ekman & Friesen, 1971). Sie wird als unangenehmes und unbehagliches Gefühl empfunden, das auf ein potenziell bedrohliches Ereignis folgt oder in Erwartung eines solchen empfunden wird. Zusätzlich zu dem Gefühl der Furcht werden verschiedene physiologische und verhaltensbezogene Reaktionen ausgelöst, die dazu dienen, solche bedrohlichen Ereignisse im Ernstfall zu überleben. Zu diesen Reaktionen gehören Flucht-, Versteck- oder Kampfreaktionen (Öhman, 2007), aber auch die Verstärkung von defensiven Reflexen wie der *Acoustic Startle Response* (akustische Schreckreaktion) (Fendt & Koch, 2013; Jovanovic et al., 2020; Robison-Andrew et al., 2014; Yeomans et al., 2002). Die *Startle Response* (Schreckreaktion) ist die Reaktion auf einen Schreckreiz (*Startle*) und wird über Neurone im Hirnstamm ausgelöst. Zweck der Schreckreaktion ist es, besonders verletzbare Körperteile wie bspw. Hals, Nacken und Augen zu schützen und potentielle Verletzungen zu minimieren bzw. abzuwenden. Hierbei kommt es im Zuge der Schreckreaktion u.a. zur Kontraktion der Nackenmuskulatur, zum Lidschluss sowie zu Reaktionen, die wie oben erwähnt eine Flucht aus der gefährlichen Situation begünstigen (Koch, 1999). Das vorangestellte Adjektiv *Acoustic* bezieht sich auf den Charakter des Auslösers, der hierbei ein akustischer Reiz ist (Jovanovic et al., 2020; Robison-Andrew et al., 2014; Yeomans et al., 2002). Neben den oben beschriebenen Reaktionen werden verschiedene körperliche Anpassungsvorgänge wie Pupillenerweiterung, Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz als auch das Freisetzen von Hormonen ausgelöst, um die oben genannten Verhaltensreaktionen vorzubereiten oder zu optimieren (Eleftheriou, 1972; Fendt & Fanselow, 1999; Öhman, 2007). Da diese Reaktionen die Überlebenschancen in gefährlichen Situationen erhöhen, hat sich Furcht als Emotion mit den damit verbundenen vegetativen- und Verhaltensreaktionen evolutionär durchgesetzt (Damasio & Carvalho, 2013). Auch wenn Furcht ubiquitär ähnlich erlebt wird, sind die Auslöser von Furcht verschieden. Grob können sie in angeborene Auslöser, wie z. B. die Anwesenheit eines Raubtiers oder auf Raubtier bezogene Reize wie bestimmte Gerüche oder Geräusche und gelernte Auslöser unterteilt werden (Ren & Tao, 2020). Letztere entstehen durch klassische Konditionierung. Der Prozess wird dementsprechend Furchtkonditionierung genannt und beinhaltet die Assoziation eines zuvor neutralen Reizes mit einem aversiven Ereignis (Davis, 1989; LeDoux, 1998; Pavlov, 2010). Dies wird beispielsweise erreicht, indem die Präsentation des aversiven, unconditionierten Reizes (US) unmittelbar nach Präsentation des neutralen Reizes erfolgt. Beide Reize werden nach nur wenigen Präsentationen miteinander assoziiert, sodass das Versuchstier dann Furcht erfährt, wenn es zu einem späteren Zeitpunkt mit dem zuvor neutralen Reiz konfrontiert wird. Dieser wird nun als konditionierter Furchtreiz (CS) und der Prozess als *cued fear learning* bezeichnet (Davis, 1989; Fendt & Fanselow, 1999). Zusätzlich zu



diesem spezifischen Reiz assoziiert das Versuchstier auch die Umgebung, in der das aversive Ereignis stattgefunden hat mit diesem. Analog zur Furchtkonditionierung auf einen spezifischen Reiz erfolgt also gleichzeitig eine Konditionierung auf die Umgebung. Das Versuchstier lernt diese als sogenannten kontextuellen Furchtreiz wahrzunehmen (Cushman & Fanselow, 2012; Gewirtz et al., 2000). Wie oben beschrieben kann konditionierte Furcht sehr spezifisch sein. Hohe Spezifität bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Reiz, der das aversive Ereignis am besten vorhersagt, die meiste konditionierte Furcht auslöst, während Reize, die das aversive Ereignis nicht entsprechend gut vorhersagen oder sogar dessen Abwesenheit signalisieren, keine konditionierte Furcht auslösen und somit weniger spezifisch sind. Dem gegenüber steht die Generalisierung von Furcht. Im Gegensatz zur spezifischen Furcht bedeutet eine Generalisierung, dass andere Stimuli, vor allem solche, die dem ursprünglich assoziierten Stimuli ähnlich sind, ebenfalls konditionierte Furcht auslösen (Dunsmoor & Paz, 2015; Jasnow et al., 2017; Shepard, 1987). Typischerweise ist konditionierte Furcht kurz nach der Konditionierung noch sehr spezifisch, wird aber im Laufe der Zeit immer weiter generalisiert (Bouton et al., 1999; McAllister & McAllister, 1963; Perkins & Weyant, 1958). Eine solche Verallgemeinerung von Furcht kann vorteilhaft sein, da ein breiteres Spektrum an potenziell gefährlichen Situationen erkannt werden kann. Es ist jedoch wichtig, dass das Individuum weiterhin in der Lage ist, zwischen Stimuli, die Gefahr signalisieren und solchen, die ungefährlich sind, zu unterscheiden, da dies sowohl für das Überleben als auch für die psychische Gesundheit entscheidend ist. Kommt es zu einer sehr starken Generalisierung, die auch als Übergeneralisierung bezeichnet wird, können bedrohliche- und Sicherheit suggerierende Reize nicht mehr ausreichend voneinander differenziert werden. Die fehlende Fähigkeit, diese zu unterscheiden, ist ein typisches Symptom vieler Angststörungen des Menschen (Dunsmoor & Paz, 2015; Lissek et al., 2010; Lissek, 2012; Lopresto et al., 2016; Morey et al., 2015). Im Alltag häufig synonym gebraucht, werden Angst und Furcht in den Neurowissenschaften anhand des Focus' ihrer Auslöser unterschieden. Furcht liegt eine eher konkrete, klar zuordenbare Bedrohung zugrunde, während Angst ein ungerichtetes, häufig unbegründetes Gefühl der Beunruhigung bspw. auf eine unbekannte Situation ist (Boland, 2021). Entsprechend werden die Begriffe im Folgenden verwendet. Angststörungen sind die häufigsten psychischen Erkrankungen des Menschen und die Komorbidität zu anderen psychischen Erkrankungen wie Depression ist hoch (Canu et al., 2015; Dattani et al., 2021; Hofmeijer-Sevink et al., 2012). Ein gutes Verständnis der Symptome und der damit verbundenen Veränderungen im Gehirn der Betroffenen ist wichtig, um bestehende Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern und neue zu schaffen (Canu et al., 2015). In den vergangenen Jahrzehnten wurden die neuronalen Strukturen und Verbindungen, die der Furchtkonditionierung zugrunde liegen, intensiv untersucht (Davis, 1992; LeDoux, 2000). Beigetragen dazu hat u.a., dass Furchtkonditionierung ein gut zu etablierendes Modell darstellt, an dem sich

Furcht und damit verbundene Prozesse untersuchen lassen. Da auch Hirnfunktionen wie Lernen und die Bildung des Gedächtnisses an der Konditionierung von Furcht beteiligt sind, fand dieses Modell in diesen Bereichen der Hirnforschung großen Anklang, was die intensive Erforschung der Furchtkonditionierung begünstigte (Cushman & Fanselow, 2010; Lonsdorf et al., 2017; McDonald & Mott, 2017). Als wichtigste Struktur in diesem Zusammenhang stellte sich die Amygdala heraus, ein Kerngebiet im Temporallappen, das aus mehreren Unterkernen besteht. Die laterale Amygdala (LA) ist das Unterkerengebiet, in dem die Informationen über den aversiven und den zu assoziierenden Reiz konvergieren (Davis, 1992; Fendt & Fanselow, 1999; Janak & Tye, 2015; LeDoux, 2000; Sun et al., 2020). In der basolateralen Amygdala (BLA) finden anschließend die physiologischen und molekularen Veränderungen statt, auf denen der Lernprozess beruht (Silva et al., 2016; Sun et al., 2020), während die zentrale Amygdala (CA) Ausgangsstruktur furchtbedingter Verhaltens- und vegetativer Veränderungen ist und diese über Projektionen in das Mittelhirn und den Hirnstamm auslöst (Eleftheriou, 1972; Fendt & Fanselow, 1999; Iwata et al., 1987; LeDoux et al., 1988). Wegen ihrer zentralen Rolle bei der Verarbeitung von Furcht und Angst erscheint es nicht überraschend, dass bereits bei verschiedenen Angststörungen Dysfunktionen der Amygdala beschrieben wurden (Etkin & Wager, 2007; Godlewska et al., 2012; Rauch et al., 2003). Auch ist eine Dysfunktion höchstwahrscheinlich die Ursache dafür, dass aus einer zunächst spezifischen, konditionierten Furcht eine Übergeneralisierung entsteht (Cooper et al., 2018; Dunsmoor & Paz, 2015; Lissek & Grillon, 2010). Hierbei spielt unter anderem der Transmitter GABA eine wichtige Rolle, da Projektionen in und aus der Amygdala sowie innerhalb und zwischen den verschiedenen Unterkernen über GABAerge Neurone erfolgt (Ehrlich et al., 2009; Spampinato et al., 2011; Sun et al., 2020). Ziel der vorliegenden Studie war es, in die GABA-Transmission einzugreifen und zu untersuchen, wie sich eine erhöhte neuronale Erregbarkeit in der Amygdala auf die Spezifität von Furchtkonditionierung bei Laborratten auswirkt. Zu diesem Zweck wurde in diesem Versuch ein etablierter Ansatz zur Erhöhung neuronaler Erregbarkeit adaptiert (Horton et al., 1978; Sajdyk et al., 2008; Shekhar et al., 1996) und Ratten unilateral eine intrakranielle Kanüle, deren Ziel die basolaterale und zentrale Amygdala war, implantiert. Die Kanülen waren mit osmotischen Minipumpen verbunden, die entweder L-Allylglycin (L-AG), einen Inhibitor der GABA-Synthese oder sein inaktives Enantiomer D-Allylglycin (D-AG) enthielten (Orlowski et al., 1977). Nach Implantation kommt es durch einen osmotischen Gradienten zwischen dem Inneren der Pumpe und des die Pumpe umgebenden Gewebes zu einem Flüssigkeitseinstrom in diese, mit konsekutiver Komprimierung des Pumpenreservoirs. Dies führt zu einer konstanten Förderung des Inhalts und bewirkt somit einen gleichmäßigen Anstieg der Konzentration des GAD-Inhibitors L-AG bzw. seines inaktiven Enantiomers D-AG im Zielgebiet (Theeuwes & Yum, 1976). Frühere Studien zeigten, dass entsprechende lokale L-AG-Infusionen den GABA-Spiegel im Zielgebiet

senken (Horton et al., 1978; Sajdyk et al., 2008; Shekhar et al., 1996). Hierzu erhobene Daten deuten darauf hin, dass die unilaterale Infusion nicht direkt zu einer pathologischen Hyperaktivität der Amygdala führt, sondern zu einem eher moderaten Anstieg neuronaler Erregbarkeit (Johnson & Shekhar, 2006; Sajdyk et al., 2008). Einige Tage nach Kanülenimplantation wurden die Ratten einem diskriminativen Furchtkonditionierungsprotokoll unterzogen. Hierbei wird nur ein Reiz klassisch furchtkonditioniert (CS+), während ein zweiter, präsentierter Reiz neutral bleiben bzw. als Kontroll-/Safety-Reiz (CS-) als Referenz dienen soll. Dieses Vorgehen ermöglicht es, Aussagen über die Auswirkungen des Experiments auf die Diskriminationsfähigkeit der Tiere und somit auch über eine veränderte Spezifität des konditionierten Reizes zu treffen (Collins & Paré, 2000; Zhao et al., 2021). Die Spezifität der konditionierten Furcht wurde durch Messung der Reaktion auf den konditionierten Furchtreiz (CS+), den Kontroll-/Safety-Reiz (CS-), deren gleichzeitiger Präsentation (CS+/CS- *Compound*) und des experimentellen Kontexts (Gewirtz et al., 2000; McNish et al., 1997, 2000) anhand der Höhe der akustischen Schreckreaktion (ASR) bewertet (Jovanovic et al., 2020; Robison-Andrew et al., 2014; Yeomans et al., 2002). Eine Erhöhung der ursprünglich gemessenen Schreckreaktion durch Präsentation des CS+ wird als furchtpotenzierte Schreckreaktion (FPS) bezeichnet und dient der Quantifizierung der konditionierten Furcht (Davis et al., 1993; Falls, 2010). Zudem wurde anhand eines *Light-Dark Box* Tests ermittelt, ob einzelne Komponenten des Versuchs Einfluss auf angstähnliches Verhalten hatten. Basierend auf Literaturergebnissen, die zeigen, dass eine höhere neuronale Erregbarkeit die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Neuronen zu einer sogenannten Gedächtnisspur, d.h. einer vorübergehenden und/oder langfristigen strukturellen Veränderung im Gehirn, die Teil des Gedächtnisses ist, rekrutiert werden (Han et al., 2007; Lau et al., 2020; Yiu et al., 2014), erwarten wir durch die chronische unilaterale Infusion des GABA-Synthese-Inhibitors ein robusteres und spezifischeres Furchtgedächtnis in der Gruppe der L-AG-behandelten Ratten.

## 2 Material und Methoden

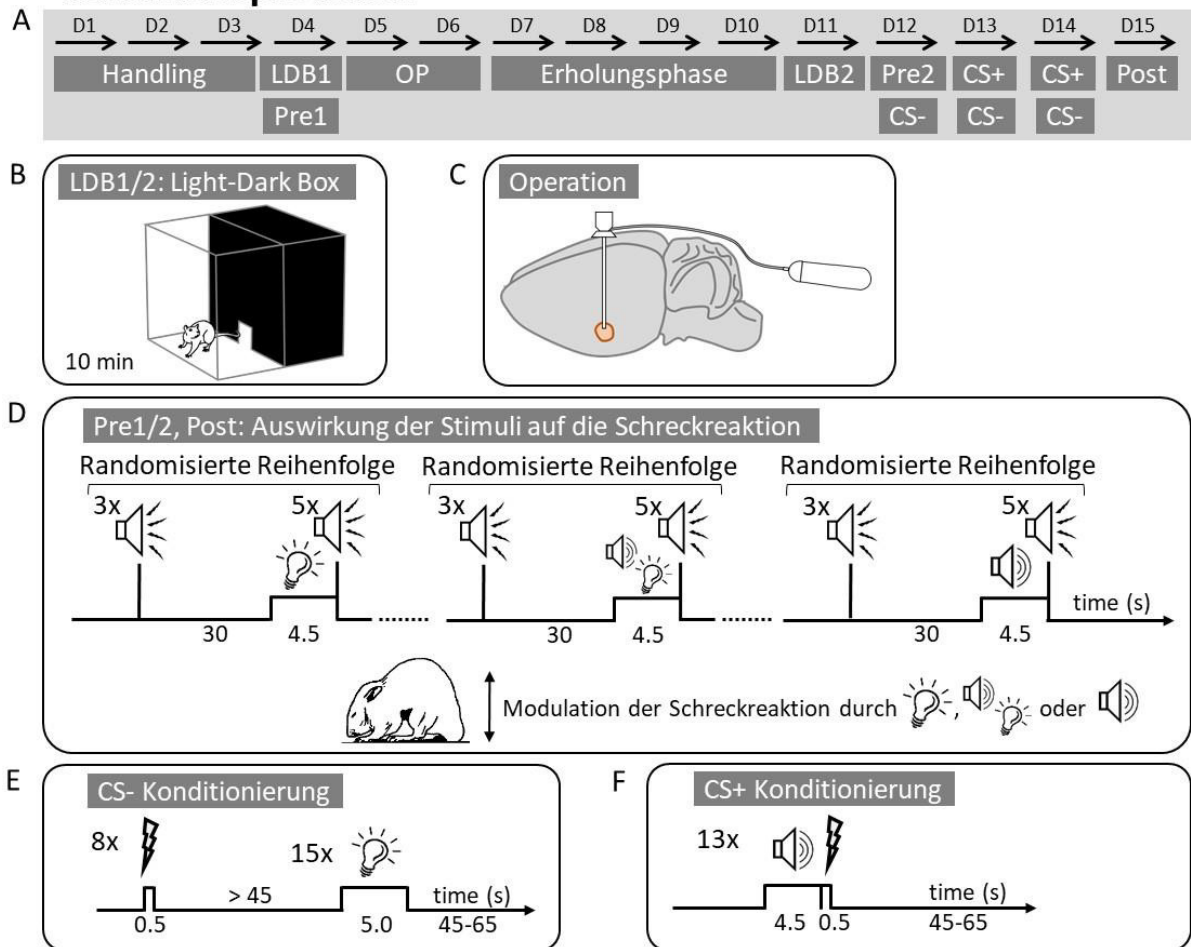
### 2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden insgesamt 30 männliche Wistar-Ratten verwendet, welche zum Zeitpunkt der Operation 300-400 g wogen und acht Wochen alt waren. Die Ratten stammten aus der Zucht der Tieranlage des *Instituts für Pharmakologie und Toxikologie* der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (ursprünglicher Zuchtstamm: Taconic, Dänemark). Untergebracht wurden die Ratten in transparenten Makrolon Typ IV Käfigen in Gruppen von drei bis sechs Tieren und unterlagen festen 12:12 Licht-Dunkel-Phasen, mit Beginn der Lichtphase um 6:00 Uhr morgens. Im Haltungsraum wurde eine Raumtemperatur von  $(22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$  und eine Luftfeuchtigkeit von  $(50 \pm 5\%)$  eingehalten. Die Käfige enthielten Holzspanstreu sowie ein bis zwei Papptunnel. Zugang zu Standardfutter (Ssniff® R/M-H, V1534-0) und Leitungswasser war durchgängig gewährleistet. Alle Versuche erfolgten in der Lichtphase. Sie entsprachen den internationalen Richtlinien für die Verwendung von Tieren in Versuchen (2010/63/EU) und wurden von den örtlichen Behörden rechtlich und ethisch genehmigt (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Az. 42502-2-1309 UniMD).

### 2.2 Versuchsablauf

An den ersten drei Tagen des Versuchs wurden die Ratten durch Aufenthalte in den Versuchsräumen/-geräten an die Umgebung gewöhnt (D1-3, Abb. 1). Dies diente der Reduktion von Stress und sollte einem Verfälschen der Ergebnisse entgegenwirken. Einen Tag später wurde der erste *Light-Dark Box* (LDB) Test durchgeführt. Am 5. und 6. Tag wurden den Ratten in Vollnarkose die intrakraniellen Kanülen sowie die osmotischen Minipumpen implantiert. Aufgrund der Gruppengröße waren pro Versuchsdurchlauf zwei Tage für die Operationen nötig. Es folgte eine vier- bis fünftägige Erholungsphase für die Ratten, in welcher die osmotischen Minipumpen begannen zu arbeiten. Am 11. Tag wurde ein zweiter LDB-Test durchgeführt. Am folgenden Tag begann die Konditionierungsphase, zu deren Beginn ein *Pretest* durchgeführt wurde. Dieser sollte Auskunft über vorbestehende unkontrollierte Auswirkungen der in der Konditionierung verwendeten Reize auf die Schreckreaktion der Ratten geben. Es folgten, verteilt auf 2,5 Tage, fünf Sitzungen zur diskriminativen Furchtkonditionierung nach folgendem Schema: D12 *Pretest, Safety*; D13 *Furcht, Safety*; D14 *Furcht, Safety* (Abb. 1; Details siehe unten). Zwischen den Sitzungen wurde stets eine Pause von mindestens zwei Stunden eingehalten. Auf die Konditionierungsphase folgte am 15. Tag der *Posttest*, der die Auswirkungen der nun konditionierten Reize auf die Schreckreaktion zeigt. Zur genaueren Auswertung wurden die Ratten eine Stunde nach Ende des *Posttests* perfundiert und die Gehirne zur histologischen Untersuchung entnommen.

## Verhaltensprotokoll

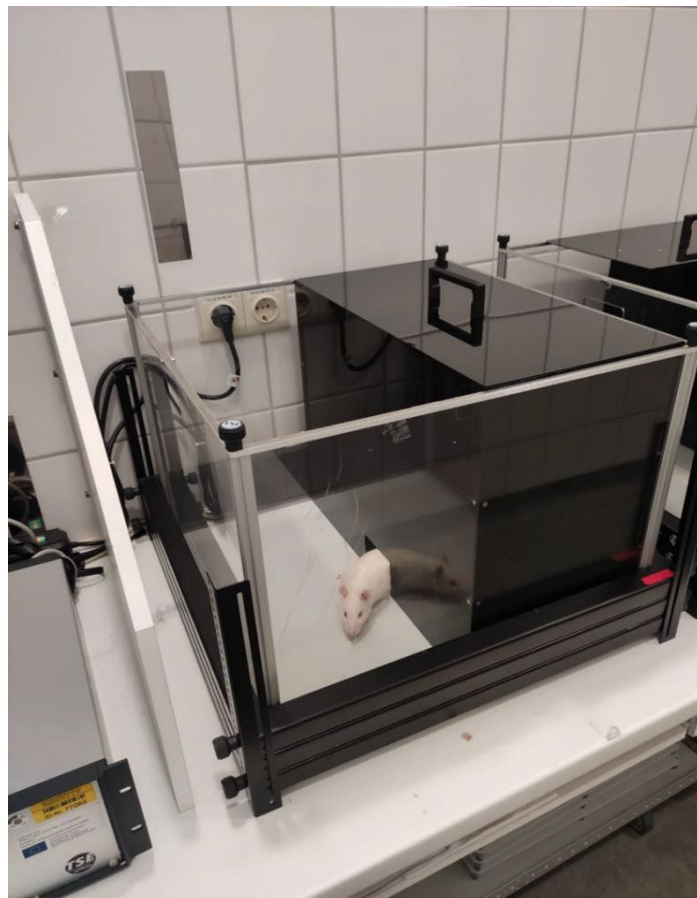


### Abbildung 1: Versuchsablauf

**(A)** Zeitplan und Verhaltensprotokoll: Nach dreitägiger Eingewöhnung (D1-3) wurde an Tag vier (D4) ein Light-Dark Box (LDB) Test durchgeführt, um angstähnliches Verhalten zu messen. Auf diesen folgte ein erster Pretest (Pre1), um die Auswirkungen des künftigen CS+ und CS- auf die Schreckreaktionsamplitude zu bewerten. Die Ratten wurden daraufhin anhand ihrer Schreckreaktionsamplitude und ihres angstähnlichen Verhaltens je einer Behandlungsgruppe zugeordnet. Am 5. oder 6. Tag wurden die intrakraniellen Kanülen und die osmotischen Minipumpen implantiert. Nach dreitägiger Erholungsphase (D7-10) von der Operation wurde ein zweiter LDB-Test durchgeführt (D11). Einen Tag später, nach einem zweiten Pretest (Pre2), wurden die Ratten Furcht- (CS+) und Pseudo-/Safety-konditioniert (CS-) (D12-D14). Zuletzt wurde ein Posttest (Post) durchgeführt, um die Auswirkungen von CS+, CS- und deren gleichzeitiger Präsentation (CS+/CS- Compound) auf die Schreckreaktion zu bewerten (Post, D15). **(B)** Schematische Darstellung des LDB-Tests, Dauer 10 Min. **(C)** Platzierung der Kanüle in der (zentralen, lateralen oder basolateralen) Amygdala mit angeschlossener osmotischer Minipumpe, die entweder D-AG oder L-AG enthält. **(D)** Ablauf des Pre1/2 und Posttests: Nach zehn Schreckreizen zur Habituation (nicht gezeigt) wurden die Auswirkungen von CS+, CS- und CS+/CS- Compound auf die Schreckreaktionsamplitude in separaten Blöcken gemessen. Im ersten Stimulusblock wurde der als am wenigsten aversiv zu erwartende Stimulus präsentiert (CS-), im nächsten der CS+/CS- Compound und im letzten Block der als am aversivsten zu erwartende Stimulus (CS+). In jedem dieser Blöcke wurde der Schreckreiz dreimal allein und fünfmal am Ende des jeweiligen Reizes in einer pseudo-randomisierten Reihenfolge präsentiert. **(E)** Pseudo-/Safety-Konditionierung (CS-): Explizit ungepaarte Darbietung des CS- und des aversiven unconditionierten Reizes (US, Blitzsymbol) mit einem minimalen Interstimulusintervall (ISI) von 45 s. **(F)** Furchtkonditionierung (CS+): Vorwärts gepaarte Darbietung von CS+ und US.

### 2.3 Light-Dark Box Test

Der durchgeführte LDB-Test gibt unter anderem Aufschluss über angeständliches Verhalten der getesteten Ratten. Die Apparatur (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) bestand aus vier getrennten Boxen (49,5 cm × 49,5 cm × 41,5 cm). Jede der Boxen war mittels Plastikwand in zwei Kompartimente geteilt, die durch eine Öffnung (8 cm × 6 cm) miteinander verbunden waren. Eines der Kompartimente war von transparenten Wänden umgeben und daher gut lichtzugänglich (135-310 lx), während das andere von dunklen Wänden umgeben sowie von oben abgedeckt war und somit nicht beleuchtet wurde (0,2-1,5 lx). Dadurch entstand ein *Light* (135-310 lx) und ein *Dark* (0,2-1,5 lx) Kompartiment in jeder Box (Abb. 2). Über Infrarot-Laser-Sensoren im Rahmen der Boxen (Abstand: 14 mm) konnte der Aufenthaltsort, die verbrachte Zeit und die zurückgelegte Strecke der Ratten in den beiden Kompartimenten gemessen werden. Zusätzlich wurde die Latenz, die die Ratten bis zum Eintritt in das *Light* Kompartiment brauchten und die Frequenz der Wechsel zwischen beiden Kompartimenten bestimmt. Sowohl für die Analyse als auch für die Messung wurde die Software „TSE PhenoMaster“ für Ratten verwendet. Alle Ratten begannen den Versuch im *Dark* Kompartiment (Abb. 1A: D4, D11; Abb. 1B). Von hier aus konnten sich die Ratten frei bewegen. Der Aufzeichnungszeitraum betrug zehn Minuten.



**Abbildung 2: Light-Dark Box Apparatur**  
links Light Kompartiment, rechts Dark Kompartiment

## 2.4 Operation und pharmakologische Manipulation

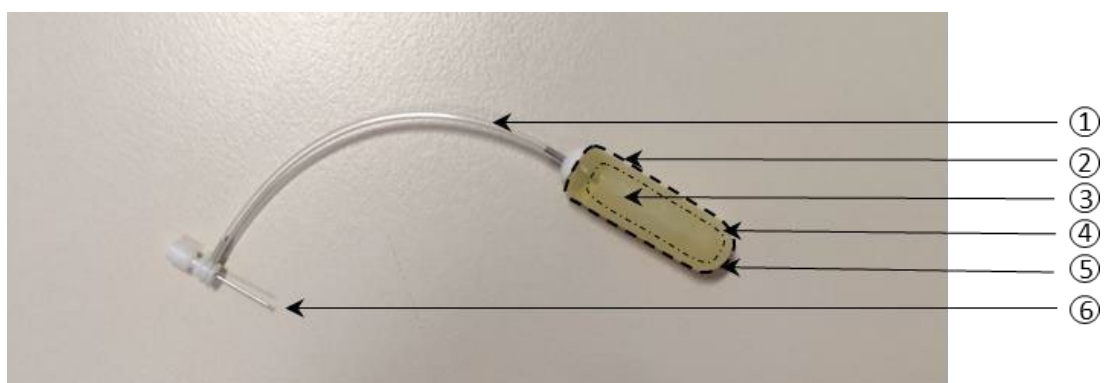
Ziel der Operation war die Kanülierung der Amygdala, um diese einer direkten pharmakologischen Beeinflussung zugänglich zu machen. Hierfür wurden die Ratten mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (5% Isofluran zur Induktion, 2,0-2,5% zur Aufrechterhaltung; Baxter, Deutschland) aus einem Isofluranvernebler (Rothacher Medical GmbH, Spisi, Schweiz) narkotisiert. Die Induktion erfolgte in einer Anästhesie-Induktionskammer (Rothacher Medical GmbH, Spisi, Schweiz). Zur Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose diente eine Maske. Dann wurden die Ratten mithilfe eines Stereotaktischen Apparats (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) fixiert und zur Vorbeugung vor Unterkühlung auf einer Heizdecke platziert (Temperature controller CMA/150 Schmidlin Labor & Service AG, Neuheim, Schweiz). Im Anschluss wurde den Ratten der Schädel bis in den Nacken hinein rasiert. Bei ausreichender Narkosetiefe erfolgte als nächstes die Eröffnung der Kopfschwarte mit einer Schere. Mit Pinzette, Schere und Skalpell wurde nun weiter Unterhaut sowie Sehnenhaube entfernt und die Schädelkalotte freipräpariert. Zur Entfernung letzter Sehnenreste und zur besseren Darstellung der Schädeluturen wurde ein mit Wasserstoffperoxid (10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) getränkter Wattetupfer verwendet. Mithilfe eines Mikroskops (M3Z, Leica WILD, Heerbrugg, Schweiz) wurde Bregma bestimmt und von hier aus die Lage der linksseitigen Amygdala anhand von Koordinaten aus einem Hirnatlas für Ratten (Paxinos & Watson, 2014) stereotaktisch ermittelt. Die Schädelkalotte wurde an dieser Stelle durchbohrt (Bohrer Nr. 1050, Nouvag, Goldach, Schweiz) und mit dem Stereotakt unilateral eine Injektionskanüle in die linke Amygdala implantiert, wobei folgende Koordinaten verwendet wurden: - 0,26 cm rostral, + 0,46 cm lateral und - 0,82 cm ventral zum Bregma (Paxinos & Watson, 2014). Fixiert wurde die Injektionskanüle (3300P/SPC OP connector 30 G; Plastics One Inc., Bilaney Consultants, Düsseldorf, Deutschland) mit zwei in die Schädelkalotte eingebrachten Verankerungsschrauben und Zahnzement (Paladur®, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland).



**Abbildung 3: Operations-Setup**

1. Filter; 2. Narkosegerät (Isofluranvernebler); 3. OP-Lampe; 4. Anästhesie-Induktionskammer; 5. Operationsmikroskop; 6. Digitale Anzeige der Koordinaten; 7. Stereotaktischer Apparat; 8. Bohrer

Die Injektionskanüle war über einen Kunststoffschlauch (Länge: ca. 5-6 cm; C312VT/PKG, Plastic One Inc. Bilaney Consultants, Düsseldorf, Deutschland) mit einer osmotischen Minipumpe (Modell 2002, Alzet, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) (Abb. 4) verbunden, die für einen Zeitraum von maximal 14 Tagen 7,0 nmol/0,5 µl/h freisetzte.

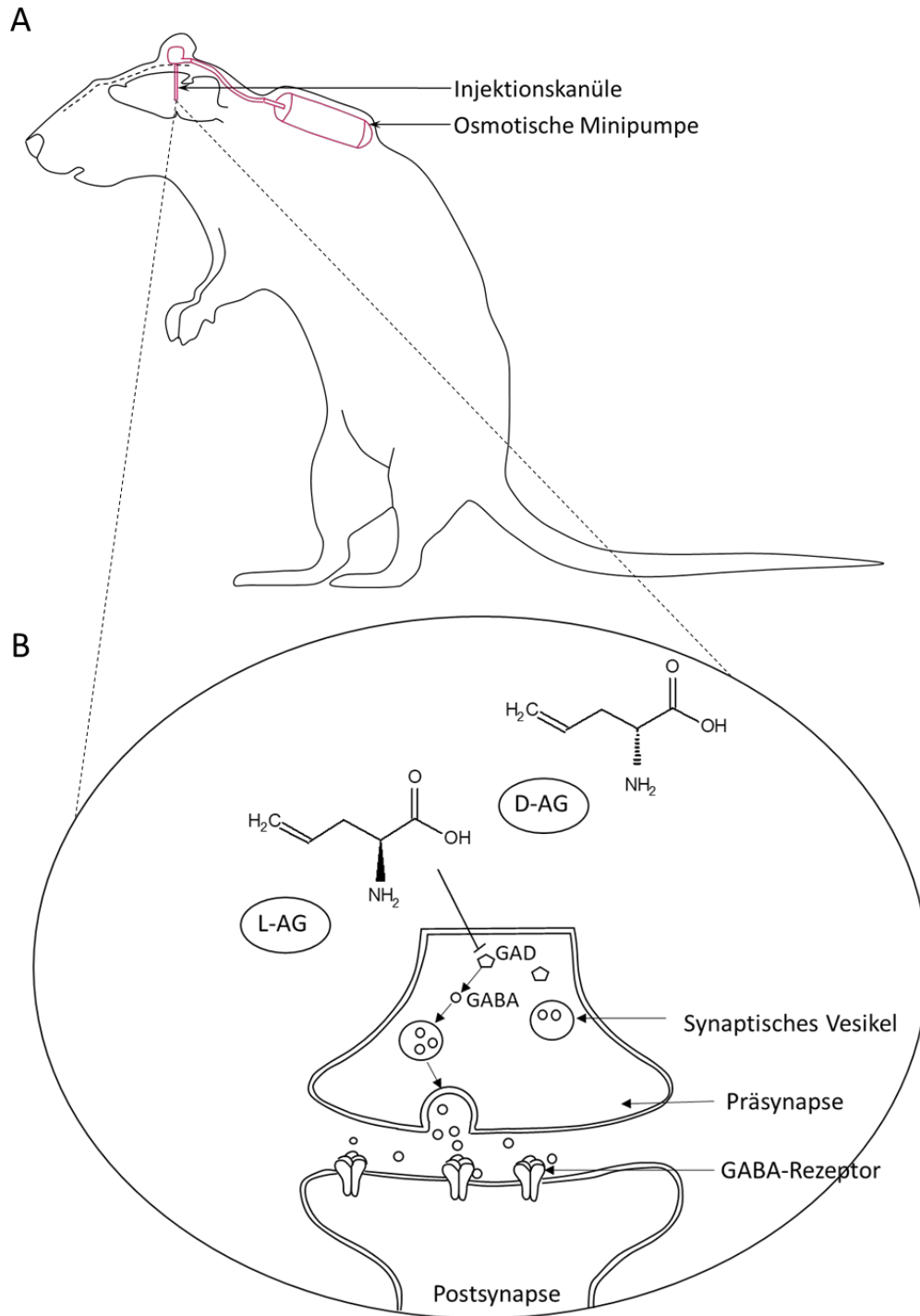


**Abbildung 4: Osmotische Minipumpe mit Kunststoffschlauch und konnektierter Injektionskanüle**

1. Kunststoffschlauch; 2. Osmotische Minipumpe; 3.-5. Komponenten der osmotischen Minipumpe von innen nach außen: 3. Impermeables Reservoir (mittig, das Reservoir längs durchziehend, flow moderator (nicht eingezeichnet) für die kontinuierliche Abgabe des Agens'); 4. Osmotisch wirksame Schicht; 5. Semipermeable Membran; 6. Injektionskanüle



Die Minipumpen enthielten entweder eine Lösung aus 14 mM L-Allylglycin (L-AG, ChemCruz sc-255236, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland; aufgelöst in 0,9% Kochsalzlösung) oder 14 mM D-Allylglycin (D-AG, ChemCruz sc-218013, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland; aufgelöst in 0,9% Kochsalzlösung). L-AG ist ein Inhibitor der Glutamat-Decarboxylase (GAD) und inhibiert so die GABA-Synthese. D-AG ist das inaktive Enantiomer und beeinflusst die Aktivität der GAD nicht (Abb. 5B) (Orlowski et al., 1977). Die verminderte Konzentration des hemmenden Neurotransmitters GABA im Zielgebiet führt so zu einer Enthemmung der neuronalen Aktivität (Horton et al., 1978; Sajdyk et al., 2008; Shekhar et al., 1996). Mit einem Skalpell wurde der Schnitt auf der Schädelkalotte in den Nackenbereich fortgesetzt und mithilfe eines Nadelhalters eine subkutane Tasche lateral der Wirbelsäule geformt. In dieser wurden Minipumpe und ein Großteil des Schlauches platziert (Abb. 5A). Der Wundverschluss erfolgte mit einer Einzelknopfnah. Zur Prophylaxe postoperativer Schmerzen wurde den Ratten subkutan Carprofen (Rimadyl; 5mg/kg s.c., Zoetis, Berlin, Deutschland) injiziert. Nach erfolgreicher Beendigung der Operation wurden die Ratten aus dem Stereotaktischen Apparat befreit und bis zur Wiedererlangung des Bewusstseins überwacht. Den verbleibenden Tag und die folgende Nacht verbrachten die operierten Ratten zum Schutz der Operationswunde in Einzelkäfigen und wurden am nächsten Morgen, bei entsprechend gutem Zustand, wieder in den Gemeinschaftskäfig gegeben. Im Anschluss an die Operation folgte eine vier- bis fünftägige Erholungsphase (D7-D10, Abb. 1).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung neuronaler Prozesse nach Operation**

**(A)** Ratte mit subkutan implantierter osmotischer Minipumpe und in der Amygdala platzierter Injektionskanüle.

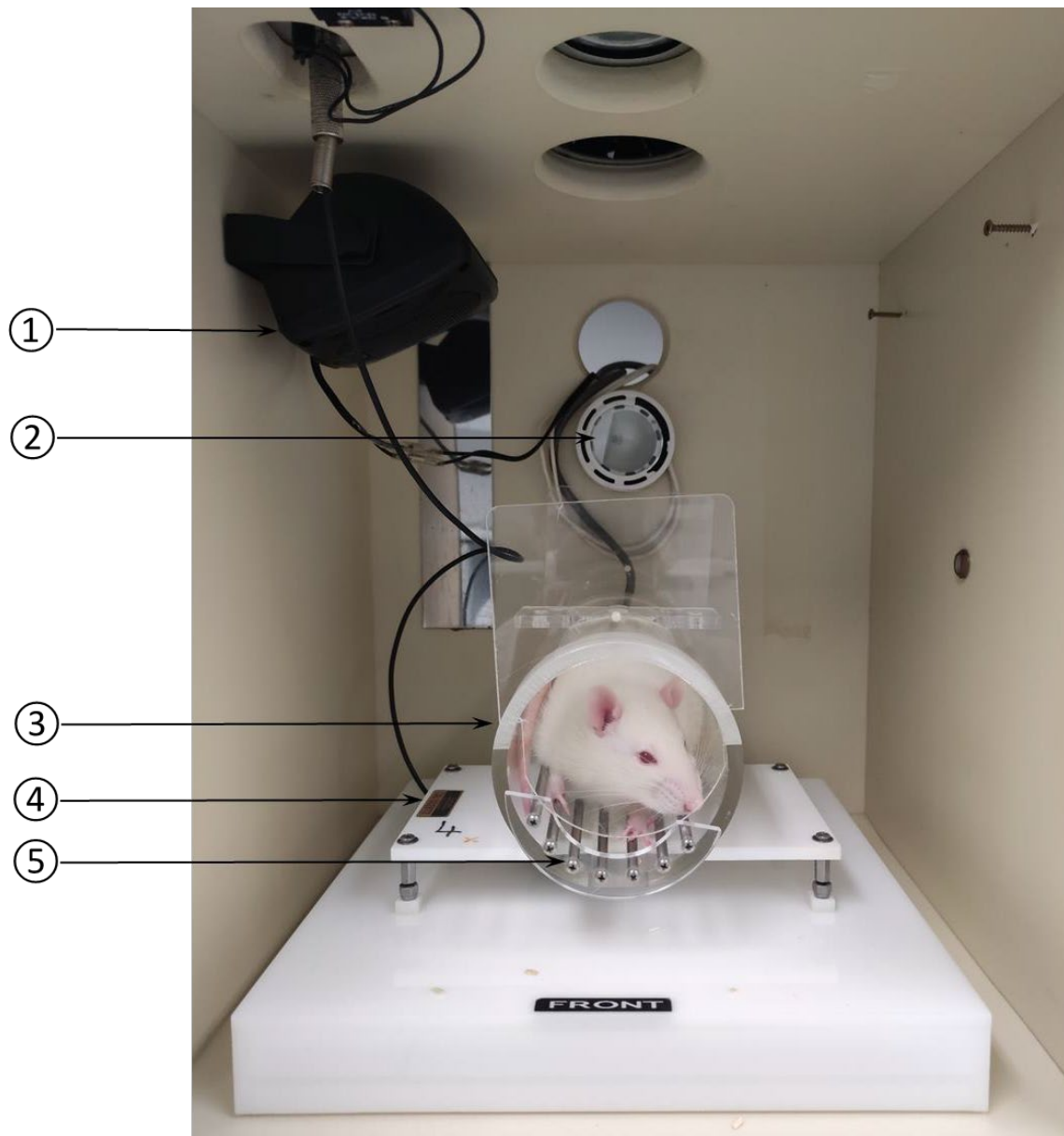
**(B)** GABAerge Synapse nach L-AG- und D-AG-Infusion. Infundiertes L-AG hemmt die Glutamatdecarboxylase (GAD) und somit die GABA-Synthese.

(Strukturformeln erstellt mit Chemograph Plus (Standard Version 2022), DigiLab Software GmbH, Altenholz, Deutschland ([www.chemograph.de](http://www.chemograph.de)))

## **2.5 Diskriminative Furchtkonditionierung**

### **2.5.1 Startleapparatur**

Sowohl für die Konditionierungen als auch für *Pre-* und *Posttest* wurde ein *Startle-System* benutzt (SR-LAB, San Diego Instruments, USA) (Abb. 6). Das *Startle-System* bestand aus acht identischen Kammern (35 cm × 35 cm × 38 cm). Jede der Kammern enthielt eine auf einem Podest befestigte Plexiglasröhre (9 cm x 16 cm). Über einen an der Unterseite des Podests befestigten, piezoelektrischen Bewegungssensor wurde die Schreckreaktion der Ratten gemessen. Hierzu wurde das Ausmaß (Amplitude) der aufgezeichneten Bewegungen 10-30 ms nach Abgabe des Schreckreizes gemittelt (Kahl & Fendt, 2016; Kreuzmann et al., 2020; Kreuzmann & Fendt, 2020). Die elektrischen Stimuli während der Konditionierungen wurden über ein Bodengitter (sechs Stäbe, 5 mm Durchmesser, 10 mm Abstand) in den Plexiglasröhren verabreicht. Die Kammern verfügten außerdem über einen an der Decke montierten Lautsprecher für die Applikation der akustischen Reize (Schreckreiz, Rauschen) sowie über eine 10-W-Glühlampe für die Applikation des Lichtreizes. Bedient, aufgezeichnet und analysiert wurden Test- und Konditionierungssitzungen mit der SR-LAB Software.



**Abbildung 6: Startleapparatur**

1. Lautsprecher; 2. Lichtquelle; 3. Plexiglasröhre; 4. Podest mit piezoelektrischem Bewegungssensor; 5. Bodengitter

### 2.5.2 Konditionierungsprotokoll

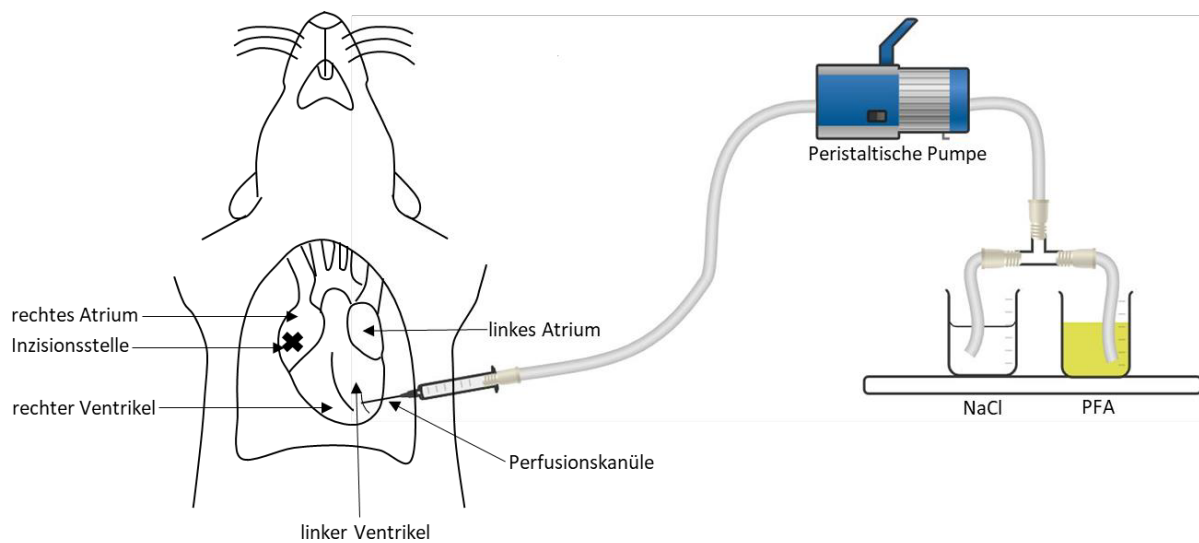
Für dieses Experiment wurde ein neues Verhaltensprotokoll etabliert. Hierzu wurde ein zuvor neutraler akustischer Reiz stets vorwärtsgepaart, mit einem aversiven elektrischen Stimulus, präsentiert (Abb. 1F). In einer separaten Sitzung wurde den Ratten ein zunächst ebenfalls neutraler Lichtreiz, explizit ungepaart, zu demselben elektrischen Stimulus präsentiert (Abb. 1E). Ziel war es, den akustischen Reiz als Furchtreiz zu konditionieren (CS+), der den unkonditionierten, aversiven Reiz (US) vorhersagt. Der Lichtreiz sollte hierbei neutral bleiben bzw. Sicherheit (*Safety*) signalisieren (CS-). Zu Beginn des Versuchs wurde ein erster *Pretest* (Pre1) (D4, Abb. 1) durchgeführt, um eventuell unkon-

ditionierte Effekte des CS+ (Rauschen: 66 dB SPL, 4,5 s), CS- (Licht: ca. 1000 lx, 4,5 s) und der gleichzeitigen Präsentation beider Reize (CS+/CS- *Compound*) auf die Schreckreaktion zu testen. In der *Startleapparatur* (Abb. 6) wurden den Ratten hierfür nach einer fünfminütigen Akklimatisierungsphase zehn Schreckreize (40 ms weißes Rauschen, 96 dB SPL; 30 s Interstimulusintervall (ISI)) zur Habituation der Schreckreaktion präsentiert. Außerdem wurden die hier ermittelten Werte zur Bestimmung der basalen Schreckreaktionsamplitude zur Beurteilung des Kontexteffekts verwendet. Anschließend wurden den Ratten die drei Reize (CS-, CS+/CS- *Compound*, CS+) in drei getrennten Blöcken dargeboten. Die Reihenfolge der Blöcke wurde gewählt, um eine blockweise Steigerung der Schreckreaktionsamplitude, nach vorheriger diskriminativer Fruchtkonditionierung, im *Posttest* zu erhalten. Deswegen wurde der als am wenigsten aversiv zu erwartende (CS-) zuerst und der als am aversivsten zu erwartende Block (CS+) zuletzt durchlaufen. Jeder Block enthielt acht Schreckreize. Drei Schreckreize wurden in jedem Block unabhängig von im Block dargebotenen Stimuli präsentiert (40 ms weißes Rauschen, 96 dB SPL; 30 s Interstimulusintervall (ISI)). Die übrigen fünf Schreckreize pro Block wurden stets 4,5 s nach Beginn entweder des CS-, CS+/CS- oder CS+ präsentiert und beendeten den Reiz. In allen *Trials* erfolgte die Datenaufzeichnung für die letzten 500 ms, also jeweils mit Ende des CS-, CS+/CS-, CS+ Reizes und vor Beginn des Schreckreizes. Die *Trials* in allen drei Blöcken waren pseudorandomisiert, das ITI betrug 30 s. Anschließend wurden die Ratten anhand ihrer Schreckreaktionen auf die Reize im *Pretest* (Pre1) (Licht, Rauschen, *Compound*), der gemittelten Schreckreaktion während der Habituation sowie nach ihrem Verhalten im LDB-Test gematched, um für Versuchs- und Kontrollgruppe ähnliche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Ein zweiter *Pretest* (Pre2) wurde an Tag zwölf durchgeführt (Abb. 1 D12), d. h. fünf Tage nach der Implantation der osmotischen Minipumpen. Dieser Test sollte sowohl mögliche Auswirkungen der L-AG- und D-AG-Injektion auf die Schreckreaktion als auch Auswirkungen der künftigen CS+, CS- und des CS+/CS- auf die Schreckreaktion bewerten. Im Anschluss an den zweiten *Pretest* (Pre2) erfolgten die Konditionierungen. An 2,5 Tagen (D12-D14, Abb. 1) wurden hierzu, beginnend mit dem CS-, alternierend fünf Konditionierungssitzungen durchgeführt. Dementsprechend waren zwei der Sitzungen CS+ (D13, D14, Abb. 1) und drei CS- Konditionierungen (D12, D13, D14, Abb. 1). Zwischen den Sitzungen gab es eine Pause von mindestens zwei Stunden. Beide Sitzungstypen begannen mit einer Akklimatisierungszeit von fünf Minuten. Dann wurde entweder der CS+ 13- (Rauschen: 66 dB SPL, 5 s) oder der CS- 15 Mal (Licht: ca. 1000 lx, 5 s) präsentiert. Zur Furchtkonditionierung wurde am Ende jedes CS+ ein US (0,5 s, 0,8 mA) dargeboten, während in den Sitzungen zur Pseudo-/Safety-Konditionierung acht US explizit ungepaart zum CS- präsentiert wurden. Zwischen CS+, CS- und US (in der CS- Konditionierung) wurde ein pseudorandomisiertes ITI von 45-65 s eingehalten. Am Tag nach der letzten

Konditionierungssitzung (D15, Abb. 1) wurde der *Posttest* durchgeführt. Dieser war identisch zu den beiden *Pretests*.

## 2.6 Histologie

45-60 Minuten nach Ende des *Posttests* wurde den Ratten 350 mg/kg Chloralhydrat intraperitoneal zur Anästhesie verabreicht. Anschließend wurden die Tiere auf dem Rücken liegend auf einer Styroporplatte fixiert und die Thoraxhöhle freigelegt. Bei schlagendem Herz und intaktem Kreislauf wurde eine Perfusionsnadel im linken Ventrikel platziert und die Ratten anschließend nach Eröffnung des rechten Atriums zunächst mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, gefolgt von 4,0 % Paraformaldehyd mit 0,2 % 0,1 M Pikrinsäurelösung transkardial perfundiert (Abb. 7).



### **Abbildung 7: Schematische Darstellung der transkardialen Perfusion**

Links Ratte mit eröffneter Thoraxhöhle und platzierter Perfusionskanüle; rechts Perfusionslösungen (PFA (Paraformaldehyd (mit Pikrinsäurelösung)), NaCl (Kochsalzlösung (phosphatgepuffert)))  
(Teile der Abbildung erstellt mit Chemix (2022) (<https://chemix.org>))

Die Ratten wurden dekapitiert, die Gehirne entnommen und in einer 30%igen Saccharose- und 4%igen Paraformaldehydlösung für mindestens 48 Stunden weiter fixiert. Mit einem Kryostat (CM 3050, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden 40 µm dicke Hirnschnitte der zu untersuchenden Region angefertigt. Hierfür wurden die Gehirne mit Trockeneis und einem Klebmedium (Leica Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) fixiert und gefroren. Eine von vier Schnittserien wurde direkt auf Objektträgern aufgefangen, getrocknet, mit 5%igem Kresylviolett nach Nissl gefärbt (siehe Anlage 1) und mithilfe von DPX mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend wurde die Lage der Injektionsstellen mit einem Lichtmikroskop (DMS 1000, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) unter Zuhilfenahme eines Hirnatlas für Ratten (Paxinos & Watson, 2014) bestimmt.

## 2.7 Statistische Auswertung

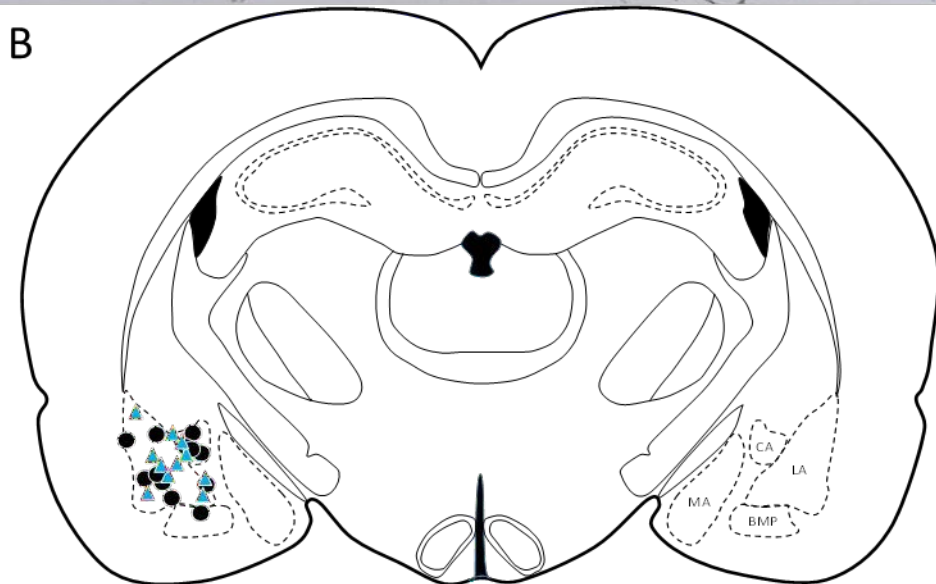
Zur statistischen Auswertung der Daten wurde Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test sichergestellt. Anschließend wurden Varianzanalysen mit entsprechenden Post-hoc-Vergleichen durchgeführt. Für alle Analysen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  gewählt. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Da die Werte der Schreckreaktionsamplituden zwischen und innerhalb der Gruppen eine große Variabilität zeigten und die gemittelte Schreckreaktionsamplitude aus der Habituationsphase durch den experimentellen Kontext beeinflusst wurde (siehe unten), wurden zur Bewertung der Effekte von CS+, CS- und des CS+/CS- auf die Schreckreaktionsamplitude Z-Scores verwendet. Die Z-Scores wurden mit der Formel  $z = (x - \mu)/\sigma$  berechnet. Hierbei ist  $x$  jeweils die Schreckreaktionsamplitude in Anwesenheit des CS+, CS- oder CS+/CS-,  $\mu$  die gemittelte Schreckreaktionsamplitude auf die alleinige Präsentation des Schreckreizes und  $\sigma$  die Standardabweichung der Reaktion auf die alleinige Präsentation des Schreckreizes (individuell für jedes Tier und jeden Test berechnet). Ein einzelner Z-Score wurde als Ausreißer identifiziert (ROUT-Methode) und von der Berechnung der gemittelten Z-Scores der betroffenen Ratte ausgeschlossen.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Injektionsstellen**

Die histologische Auswertung der Hirnschnitte ergab, dass die Kanülen bei 23 Ratten (D-AG: n = 11; L-AG: n = 12) korrekt platziert wurden. Die Injektionsstellen in der lateralen, basolateralen oder zentralen Amygdala sind in Abb. 8 dargestellt. Insgesamt wurden sechs Ratten von der weiteren Analyse ausgeschlossen: Vier wegen falscher Kanülenplatzierung (Putamen caudatum), zwei weitere, da hier kein Korrelat der Injektionskanüle im histologischen Präparat identifiziert und somit keine Aussage über den Injektionsort getroffen werden konnte. Eine Ratte starb während des Eingriffs.





Bregma -3,12 mm

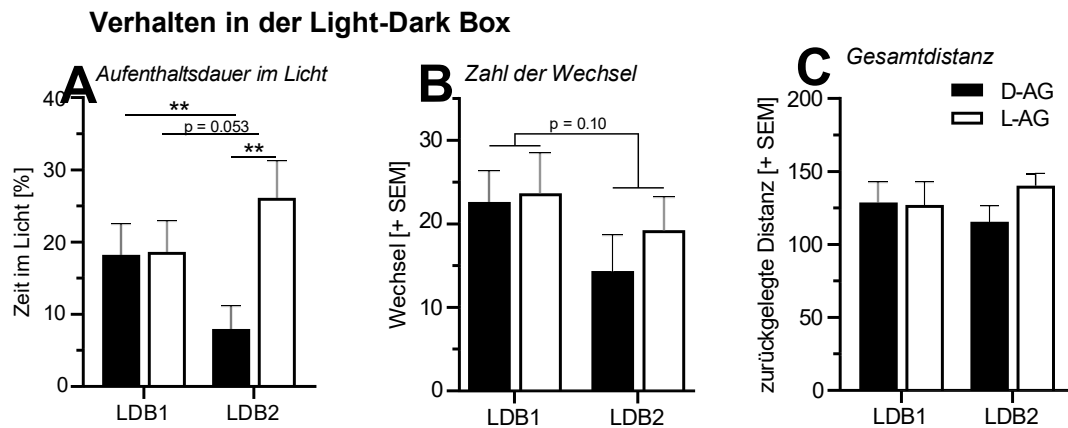
**Abbildung 8: Hirnschnitt mikroskopisch und schematisch**

**(A)** Exemplarischer, mikroskopischer Hirnschnitt mit Darstellung von Stichkanal und Injektionsstelle in der Amygdala: Kanülenverlauf (weiß gestrichelt), Injektionsstelle (weiße Ellipse).

**(B)** Schematischer koronaler Hirnschnitt mit Darstellung der Injektionsstellen: Schwarze Punkte stehen für korrekt in der Amygdala platzierte Kanülenspitzen bei L-AG- und blaue Dreiecke für die korrekte Platzierung der Kanülen bei D-AG-behandelten Ratten. Abkürzungen: MA, mediale Amygdala; BMP, basomediale Amygdala, hinterer Teil; CA, zentrale Amygdala; LA, laterale und basolaterale Amygdala.

### 3.2 Verhalten im *Light-Dark Box Test*

Insgesamt wurden zwei *Light-Dark Box Tests* durchgeführt: Der erste (LDB1) vor und der zweite (LDB2) fünf bis sechs Tage nach Implantation der intrakraniellen Kanülen und osmotischen Minipumpen. Im LDB1 verbrachten sowohl die Versuchs- als auch die Kontrollgruppe ähnlich viel Zeit im Lichtkompartiment, was darauf hindeutet, dass sich die Gruppen in Bezug auf ihr Furchtverhalten nicht unterschieden (Abb. 9A). Im LDB2 verbrachten die D-AG-behandelten Ratten weniger Zeit im Lichtkompartiment, während die L-AG-behandelten Ratten sich dort länger aufhielten. Die Abnahme der Aufenthaltsdauer im Lichtkompartiment in der D-AG-Gruppe deutet auf eine Zunahme angstähnlichen Verhaltens hin, die leichte Zunahme in der L-AG-Gruppe hingegen auf eine Abnahme. Dies geht aus einer ANOVA hervor, die eine signifikante Interaktion zwischen Zeit und Behandlung ( $F(1,21) = 15,28$ ,  $p = 0,0008$ ), aber keine Haupteffekte von Zeit ( $F(1,21) = 0,37$ ,  $p = 0,55$ ) und Behandlung ( $F(1,21) = 2,78$ ,  $p = 0,11$ ) zeigt. Im Anschluss durchgeführte Post-hoc-Mehrfachvergleiche nach Sidak ergeben keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen im LDB1 ( $t = 0,07$ ,  $p = 0,99$ ), aber im LDB2 ( $t = 3,02$ ,  $p = 0,009$ ). Darüber hinaus konnte, wie oben beschrieben, gezeigt werden, dass die Ratten aus der D-AG-Gruppe signifikant weniger Zeit im Lichtkompartiment verbrachten als noch im LDB1 ( $t = 3,13$ ,  $p = 0,01$ ), während die mit L-AG behandelten Ratten tendenziell mehr Zeit im Lichtkompartiment verbrachten als im LDB1 ( $t = 2,39$ ,  $p = 0,052$ ). Hinsichtlich der Frequenz der Wechsel zwischen hellem und dunklem Kompartiment (Abb. 9B) gab es im LDB2 tendenziell weniger Wechsel zwischen den Kompartimenten ( $F(1,21) = 2,94$ ,  $p = 0,10$ ). Die Behandlung (D-AG, L-AG) hatte hierauf jedoch keinen Einfluss ( $F(1,21) = 0,40$ ,  $p = 0,53$ ). Auch gab es keine Wechselwirkung zwischen Behandlung und Zeit ( $F(1,21) = 0,27$ ,  $p = 0,61$ ). Die gesamte lokomotorische Aktivität während der LDB-Tests, der die zurückgelegte Gesamtdistanz zugrunde liegt (Abb. 9C), wurde weder durch Zeit, noch Behandlung beeinflusst. Weiter gab es keine Wechselwirkung zwischen Zeit und Behandlung ( $F's < 1,32$ ,  $ps > 0,26$ ).



**Abbildung 9: Verhalten im Light-Dark Box Test**

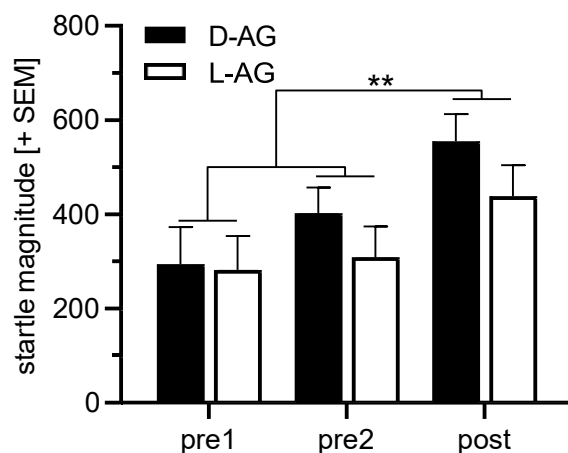
Balkendiagramm mit Darstellung der **(A)** prozentualen Zeit, die im Lichtkompartiment verbracht wurde, **(B)** Zahl der Wechsel zwischen den Kompartimenten, **(C)** Gesamtdistanz der zurückgelegten Strecke. Im zweiten Test (LDB2) verbrachten die D-AG-behandelten Ratten signifikant weniger Zeit im Lichtkompartiment, während L-AG-behandelte Ratten tendenziell mehr Zeit im Lichtkompartiment verbrachten. \*\*  $p < 0,01$ , Post-hoc-Vergleiche nach signifikanten Effekten in der ANOVA.

### 3.3 Modulation der Schreckreaktion durch den Kontext

Zu Beginn eines jeden Tests wurde die Schreckreaktionsamplitude der Ratten ohne Präsentation eines der später getesteten Stimuli (CS+, CS-, CS+/CS- Compound) gemessen (Habituationsphase). Veränderungen der Schreckreaktionsamplitude während dieser Testphase erlauben Rückschlüsse über die Ausbildung einer kontextuellen Furchtkonditionierung (McNish et al., 1997; Uzuneser & Fendt, 2020), da hier nur der experimentelle Kontext präsent ist. Um Veränderungen ins Verhältnis setzen zu können, wurden die Schreckreaktionsamplituden aus dieser Testphase zu verschiedenen Zeitpunkten im Experiment analysiert (Pre1, Pre2, Post). Wie in Abb. 10 zu sehen ist, nimmt die Schreckreaktionsamplitude im Laufe der Zeit zu ( $F(2,32) = 9,13$ ,  $p = 0,007$ ). Es zeigen sich allerdings weder Gruppeneffekte ( $F(1,21) = 1,14$ ,  $p = 0,29$ ) noch eine Interaktion zwischen Zeit und Gruppe ( $F(2,32) = 0,42$ ,  $p = 0,66$ ). Auffällig ist ein signifikanter Anstieg der Schreckreaktionsamplitude im *Posttest* (post-hoc Tukey's Vergleiche mit Pre1 und Pre2:  $t_s > 4,38$ ,  $p_s < 0,01$ ), der auf eine erfolgreiche Kontext-Furchtkonditionierung hindeutet. In der D-AG-behandelten Gruppe ist der Anstieg der Schreckreaktionsamplitude sehr robust ( $t_s > 3,28$ ,  $p_s < 0,07$ ), bei den Ratten, die L-AG-Infusionen erhielten, jedoch weniger ausgeprägt ( $t_s > 2,90$ ,  $p_s < 0,12$ ).

## Startle magnitude

Kontexteffekt



**Abbildung 10: Auswirkungen des Kontexts auf die Schreckreaktionsamplitude (Startle magnitude) vor und nach diskriminativer Furchtkonditionierung**

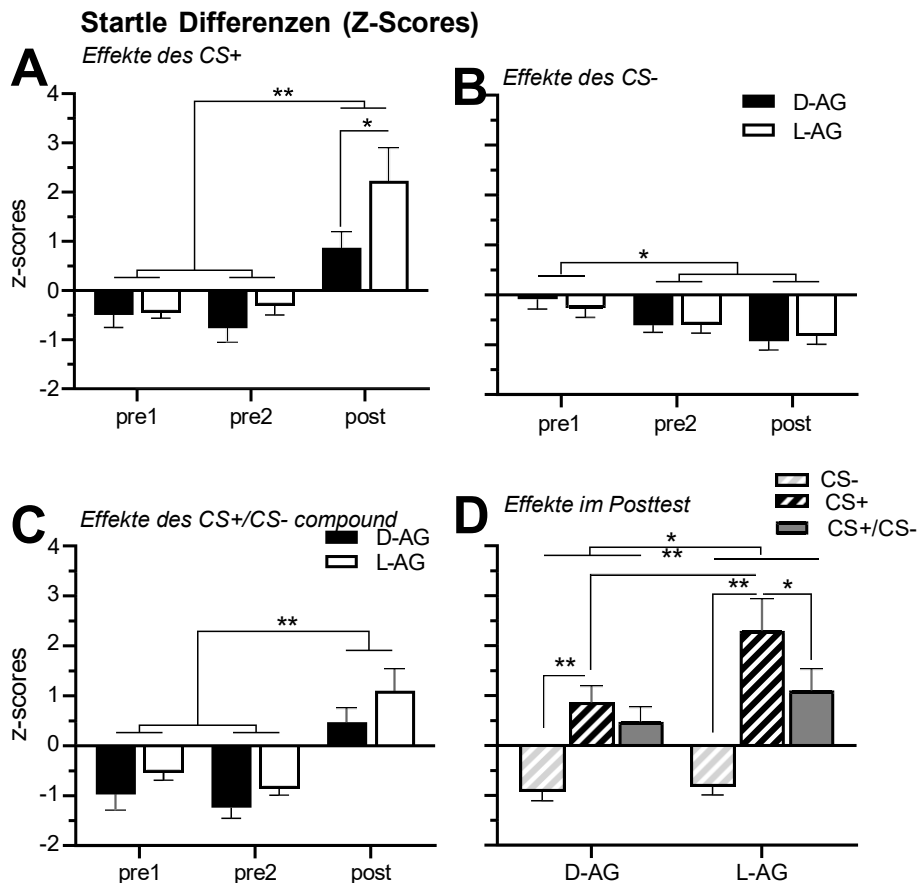
Balkendiagramm mit Darstellung der gemittelten Schreckreaktionsamplitude aus der Habituationsphase. Die diskriminative Furchtkonditionierung, die zwischen Pre2- und Posttest durchgeführt wurde, führte zu einer signifikanten Erhöhung der Schreckreaktionsamplitude, was auf eine erfolgreiche Kontext-Furchtkonditionierung hindeutet. Dieser Effekt war bei D-AG-behandelten Ratten stärker ausgeprägt. \*\*  $p < 0,01$ , Post-hoc-Vergleich nach signifikanten Effekten in der ANOVA.

### 3.4 Modulation der Schreckreaktionsamplitude durch CS+, CS- und deren gleichzeitiger Präsentation (CS+/CS- Compound)

Im zweiten Teil jedes Tests wurden die Auswirkungen von CS+, CS- und des CS+/CS- Compound auf die Schreckreaktionsamplitude untersucht. Aufgrund der Variabilität der Schreckreaktion und der Veränderungen der basalen Schreckreaktion durch den Kontext (siehe Abb. 10) wurden für diese Analysen Z-Scores verwendet. Zunächst wurden die Z-Scores in Hinblick auf den Effekt des CS+ analysiert. Hier war ein Anstieg von Pre1 und Pre2 im Vergleich zum Posttest zu sehen, was bedeutet, dass es zu einer Verstärkung der Schreckreaktion während der Präsentation des CS+ kam (Abb. 11A). Der als signifikant nachgewiesene Haupteffekt Zeit ( $F(2,42) = 31,26$ ,  $p > 0,0001$ ) unterstützt dies, während es für einen Gruppeneffekt ( $F(1,21) = 3,01$ ,  $p = 0,098$ ) und eine Interaktion zwischen Zeit und Gruppe ( $F(2,42) = 2,50$ ,  $p = 0,094$ ) Tendenzen gibt. Die im Anschluss durchgeführten Post-hoc-Vergleiche zeigen, signifikant höhere Z-Scores im Posttest als im Pre1 und Pre2 ( $t_s > 6,74$ ,  $p_s < 0,0001$ ). Darüber hinaus sind bei L-AG-behandelten Ratten signifikant höhere Z-Scores im Posttest als bei D-AG-behandelten Ratten zu sehen ( $t = 2,73$ ,  $p = 0,02$ ). Dies deutet darauf hin, dass eine chronische unilaterale Infusion von L-AG in die Amygdala zu einer Erhöhung der furchtpotenzierten Schreckreaktion (FPS) führt. Auch der Effekt des CS- auf die Schreckreaktionsamplitude veränderte sich mit der Zeit ( $F(2,42) = 10,16$ ,  $p = 0,003$ ; Abb. 11B), während jedoch kein Gruppeneffekt und kei-

ne Zeit x Gruppen-Interaktion vorliegen ( $F_s < 0,42$ ,  $p_s > 0,66$ ). Post-hoc-Vergleiche im Anschluss ergeben signifikant niedrigere Z-Scores im Pre2 und *Posttest* im Vergleich zum Pre1 ( $t_s > 2,69$ ,  $p_s < 0,03$ ). Anders verhält es sich mit den Effekten des CS+/CS- *Compound* auf die Schreckreaktionsamplitude. Auch hier ist zwar Zeit als Haupteffekt signifikant ( $F(2,42) = 26,08$ ,  $p < 0,0001$ ; Abb. 11C), der ANOVA folgende Post-hoc-Vergleiche zeigen jedoch einen signifikanten Anstieg vom Pre1- und Pre2 zum *Posttest* ( $t_s > 5,65$ ,  $p_s < 0,0001$ ). Außerdem gibt es einen signifikanten Haupteffekt Gruppe ( $F(1,21) = 4,38$ ,  $p = 0,48$ ), aber keine Interaktion zwischen Zeit und Gruppe ( $F(2,42) = 0,11$ ,  $p = 0,89$ ).

In Abb. 11D sind schließlich alle Z-Scores des *Posttests* zusammengefasst. Anhand dieser lässt sich ableiten, dass Ratten, die chronische unilaterale L-AG-Infusionen in die Amygdala erhielten, allgemein höhere Z-Scores aufweisen ( $F(1,21) = 4,42$ ,  $p = 0,048$ ). Außerdem gibt es einen signifikanten Stimulus Haupteffekt ( $F(2,42) = 23,71$ ,  $p < 0,0001$ ), während eine Behandlung x Stimulus-Interaktion nicht nachgewiesen werden kann ( $F(2,42) = 1,32$ ,  $p = 0,22$ ). Post-hoc-Vergleiche zeigen schließlich signifikante Unterschiede zwischen den Effekten des CS+ und CS- in beiden Behandlungsgruppen ( $t_s > 3,41$ ,  $p_s < 0,003$ ). Bemerkenswert ist, dass der Unterschied zwischen CS+ Effekt und dem des CS+/CS- *Compound* nur bei Ratten, die chronische unilaterale L-AG-Infusionen in die Amygdala erhielten, signifikant ist ( $t = 2,37$ ,  $p = 0,02$ ; D-AG-behandelte Ratten:  $t = 0,75$ ,  $p = 0,46$ ).

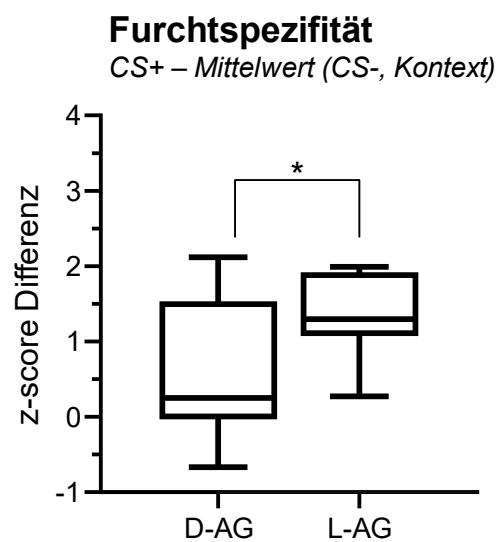


**Abbildung 11: Auswirkung von CS+, CS- und des CS+/CS- Compound auf die Schreckreaktionsamplitude vor und nach diskriminativer Furchtkonditionierung**

Balkendiagramme mit Darstellung der Z-Scores der Schreckreaktionsamplituden in Reaktion auf die getesteten Stimuli (Startle Differenzen). **(A)** Die diskriminative Furchtkonditionierung, die zwischen Pre2 und Posttest durchgeführt wurde, verstärkte die Schreckreaktion in Reaktion auf den CS+ signifikant. Dies deutet auf eine erfolgreiche Furchtkonditionierung auf den CS+ hin. Die Z-Scores waren bei L-AG-behandelten Ratten signifikant höher als bei Ratten, die D-AG-Infusionen erhielten. **(B)** Die Z-Scores der Reaktion auf den CS- nahmen vom Pre1- zum Pre2 ab. Die diskriminative Furchtkonditionierung zwischen Pre2 und Post hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Abnahme des CS-. **(C)** Die Z-Scores des CS+/CS- Compound waren nach diskriminativer Furchtkonditionierung signifikant erhöht. **(D)** Vergleiche der Z-Scores im Posttest ergaben signifikant höhere Werte bei L-AG-behandelten Ratten als bei D-AG-behandelten. In beiden Behandlungsgruppen gab es signifikante Unterschiede zwischen CS+ und CS- Effekten, was auf eine erfolgreiche diskriminative Furchtkonditionierung hindeutet. Der signifikante Unterschied zwischen den Z-Scores des CS+ und CS+/CS- Compound in der L-AG-behandelten Gruppe deutet darauf hin, dass der CS- nur in dieser Gruppe als konditionierter Inhibitor fungiert. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Post-hoc-Vergleich nach signifikanten Effekten in der ANOVA.

### 3.5 Spezifität der Furchtreaktion

Abschließend wurde die Spezifität der Furchtreaktion bewertet. Hierzu wurden die individuellen Mittelwerte der Z-Scores des Kontexteffekts sowie die des CS- Effekts auf die Schreckreaktionsamplitude von den individuellen Z-Scores des CS+ Effekts auf die Schreckreaktionsamplitude subtrahiert. Je größer diese Differenz ist, desto spezifischer ist die Furchtreaktion auf den CS+ und desto weniger spezifisch auf den Kontext und/oder den CS-. In Abb. 12 sind diese Z-Score-Unterschiede dargestellt. Ratten, die chronisch unilaterale L-AG-Infusionen in die Amygdala erhielten, zeigten signifikant höhere Z-Score-Unterschiede als Ratten, die D-AG erhielten (Mann-Whitney-Test:  $U = 32$ ,  $p = 0,04$ ).



**Abbildung 12: Unterschiede der Z-Scores zeigen die Spezifität der konditionierten Furchtreaktion**

*Whisker-Blot (Median, Quartile, Tukey-Whisker) mit Darstellung der Furchtspezifität (Furchtspezifitäts-Score). Die Furchtspezifität wurde ermittelt, indem die Mittelwerte der Z-Scores des Kontexteffekts und des CS- Effekts auf die Schreckreaktionsamplitude von den Z-Scores des CS+-Effekts subtrahiert wurden. L-AG-behandelte Ratten zeigten signifikant höhere Z-Score-Unterschiede als D-AG-behandelte Ratten. \*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test.*

## 4 Diskussion

Ziel dieses Experiments war es, zu untersuchen, wie sich die chronische unilaterale Infusion von L-AG in die Amygdala auf die Entwicklung von Angst und diskriminative Furchtkonditionierung bei Ratten auswirkt. L-AG hemmt die Glutamat Decarboxylase (GAD) und führt so nachweislich zu einer Reduktion der GABA-Synthese (Horton et al., 1978; Sajdyk et al., 2008; Shekhar et al., 1996). Eine entsprechende Hemmung dieses Enzyms führt in der Folge sowohl zu einer geringeren lokalen Verfügbarkeit als auch zu einer geringeren Freisetzung von GABA. Ein Defizit des hemmenden Neurotransmitters löst eine Enthemmung der neuronalen Aktivität, d.h. eine höhere Erregbarkeit im Zielgebiet, aus (Johnson et al., 2013; Johnson & Shekhar, 2006). Neben der Versuchsgruppe, die L-AG erhielt, wurden einer Kontrollgruppe Infusionen mit D-AG, dem inaktiven Enantiomer von L-AG, verabreicht (Orlowski et al., 1977). Die hierzu erhobenen Daten zeigen, dass die chronische unilaterale Infusion von L-AG in die Amygdala eine Zunahme angstähnlichen Verhaltens im *Light-Dark Box* Test verhindert und zu einer weniger ausgeprägten kontextuellen Furchtkonditionierung führt (Abb. 9, 10). Zudem verstärkte L-AG die furchtpotenzierte Schreckreaktion (FPS) in Bezug auf den CS+, während die Behandlung mit L-AG aber weder die Schreckreaktion auf den CS- noch die auf den experimentellen Kontext beeinflusste (Abb. 10, 11). Dies bedeutet, dass Furchtkonditionierung in dieser Gruppe spezifischer wurde (Abb. 12). Auffällig ist, dass nur bei L-AG-, nicht aber bei D-AG-behandelten Ratten der hohe CS+-Effekt durch die gleichzeitige Darbietung mit dem CS- signifikant reduziert werden konnte, was darauf hindeutet, dass der CS- als *Safety*-Stimulus gelernt wurde (Abb. 11D). Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass chronische unilaterale L-AG-Infusionen in die Amygdala und somit eine erhöhte Erregbarkeit der Amygdala, die Spezifität konditionierter Furcht verbessern, *Safety*-Lernen begünstigen und dadurch einer Generalisierung von Furcht und der Entwicklung von unspezifischer Angst entgegenwirken.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Ansatz gewählt, der schon seit einigen Jahren auf dem Gebiet der Panikforschung verwendet wird. Bereits die Shekhar-Gruppe verwendete chronische, unilaterale L-AG-Infusionen, allerdings in den dorsomedialen Hypothalamus, zur chronischen Inhibition der GABA-Synthese. Auf diese Weise wollte sie die Schwelle für panikartige Zustände bei Ratten senken. Die Gruppe konnte nachweisen, dass L-AG-Infusionen zum einen die Verfügbarkeit von GABA an der Infusionsstelle verringert und zum anderen dadurch die Erregbarkeit umliegender Neurone erhöht wird (Johnson et al., 2013; Johnson & Shekhar, 2006). Weitere Studien dieser, aber auch unserer und anderer Gruppen zeigten außerdem, dass eine so durchgeführte Steigerung neuronaler Erregbarkeit auch zur Beeinflussung emotionaler Reaktionen verwendet werden kann. Chronische unilaterale L-AG-Infusionen in den BNST (*bed nucleus of the stria terminalis*) verstärkten beispielsweise angstähnliches Verhalten (Sajdyk et al., 2008), während L-AG-Infusionen in den infralimbischen Kortex *Safety*-



Lernen erleichterten (Kreutzmann & Fendt, 2020). Darüber hinaus führten chronische L-AG-Infusionen in den präfrontalen Kortex zu Aufmerksamkeitsdefiziten, zu einem Impulskontrollverlust und zu einer erhöhten lokomotorischen Aktivität (Paine et al., 2015). Molekulare Analysen hierzu zeigten, dass solch chronische L-AG-Infusionen die Expression von GAD67 erhöhen, des Enzyms, das GABA synthetisiert. Daneben werden allerdings die Expression des GABA-Transporters GAT1 und die der obligaten NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1 nicht beeinflusst (Paine et al., 2015). Die erwähnte Erhöhung von GAD67 ist vermutlich aber kein direkter Effekt, sondern auf eine kompensatorische Hochregulation des Enzyms aufgrund des niedrigen GABA-Spiegels zurückzuführen.

Basierend auf den bereits in anderen Forschungsgruppen gesammelten Erkenntnissen lautet die dieser Arbeit zugrundeliegende wissenschaftliche Fragestellung also, inwiefern eine Erhöhung der Erregbarkeit von Neuronen der Amygdala die Spezifität von Furchtkonditionierung beeinflusst. Um dies zu untersuchen wurde der oben beschriebene Ansatz verwendet und Ratten entweder L-AG oder das inaktive Enantiomer D-AG chronisch in die Amygdala infundiert. Unilaterale Infusionen wurden gewählt, um einen moderaten Anstieg der Erregbarkeit zu erreichen, der nach Möglichkeit noch im physiologischen Bereich liegt. Bei bilateraler Injektion hingegen war eine zu starke, höchstwahrscheinlich unphysiologische Erhöhung der Erregbarkeit, ähnlich dem *Amygdala-Kindling*, welches nachweislich pathologische Folgen wie z.B. Krampfanfälle hat, zu befürchten (Chen et al., 2016).

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen eine chronische unilaterale Infusion von L-AG in die Amygdala hat, wurden die Ratten einem Protokoll zur diskriminativen Furchtkonditionierung unterzogen. Dazu durchliefen sie eine klassische Furchtkonditionierung, bei der der CS+ vorwärtsgepaart mit dem US präsentiert wurde, sowie eine Pseudo-/Safety-Konditionierung, bei der der CS- explizit ungepaart mit dem US präsentiert wurde. Die jeweilige emotionale Reaktion auf die beiden Reize sowie auf deren gleichzeitige Präsentation (CS+/CS- *Compound*) wurde durch die Messung der akustischen Schreckreaktion (ASR) zweimal vor (Pre1/Pre2) und einmal nach (Post) der Konditionierung bestimmt (Jovanovic et al., 2020; Robison-Andrew et al., 2014; Uzuneser & Fendt, 2020). Zusätzlich wurde die ASR zu Beginn jeder Testsitzung (Habituationsphase) alleine, ohne Zusammenhang zu den anschließend präsentierten Stimuli, bestimmt um den Effekt des Kontexts auf die Schreckreaktionsamplitude zu messen (Cushman & Fanselow, 2012; Gewirtz et al., 2000; McNish et al., 2000).

Der erste *Pretest* (Pre1) bestätigte, dass weder der akustische- (CS+) noch der Lichtreiz (CS-) noch der experimentelle Kontext einen unkonditionierten Effekt auf die Schreckreaktionsamplitude hatten (Abb. 10, 11). Anhand dieser Daten und derer des ersten LDB-Tests (LDB1) (Abb. 9) wurden die Ratten in zwei Gruppen aufgeteilt. Beide Gruppen sollten möglichst ähnliche Mittelwerte für die

Schreckreaktion während der Habituationsphase zeigen, auf die präsentierten Reize (CS+, CS-, CS+/CS- *Compound*) mit einer ähnlich hohen Schreckreaktion reagieren sowie vergleichbar angstähnliches Verhalten im LDB zeigen. Der zweite LDB-Test (LDB2) wurde vier bis fünf Tage nach Implantation der osmotischen Minipumpen durchgeführt. Hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden (Abb. 9): Mit D-AG behandelte Ratten verbrachten weniger und mit L-AG behandelte Ratten mehr Zeit im Lichtkompartiment als im LDB1, was auf eine Zunahme angstähnlichen Verhaltens in der D-AG-Gruppe und auf eine Abnahme in der L-AG-Gruppe hindeutet. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Konditionierungssitzungen durchgeführt wurden, kann dieser Effekt der Behandlung zugeschrieben werden. Das heißt, dass die unilaterale Infusion von L-AG in die Amygdala die in der Kontrollgruppe (D-AG) beobachtete Zunahme angstähnlichen Verhaltens verhindert hat und sogar zu einer fast signifikanten Abnahme angstähnlichen Verhaltens führte. Grund für die Zunahme von angstähnlichem Verhalten in der D-AG-Gruppe könnte Stress sein, dem die Ratten ausgesetzt waren als die osmotischen Pumpen implantiert wurden. Dieser Stress könnte auch den Anstieg der Schreckreaktion während der Kontextexposition im zweiten *Pre-test* verursacht haben (Abb. 10, Pre2). Anzumerken ist, dass die Schreckreaktion bei der Kontextexposition im *Posttest* in beiden Gruppen erhöht war (Abb. 10). Wie oben beschrieben, sind Veränderung der Schreckreaktion dieser Art bei kontextueller Furchtkonditionierung üblich (McNish et al., 1997; Uzuneser & Fendt, 2020), was bedeutet, dass beide Gruppen dieses Experiments erfolgreich kontextuell furchtkonditioniert wurden. Dieser Kontexteffekt war allerdings bei den mit L-AG behandelten Ratten weniger stark ausgeprägt als in der Kontrollgruppe (D-AG) (Abb. 10). Die Auswertung der Effekte von CS+ und CS- auf die Schreckreaktionsamplitude zeigt, dass beide Gruppen erfolgreich auf den CS+, aber nicht auf den CS- furchtkonditioniert wurden (Abb. 11), was auf eine erfolgreiche diskriminative Furchtkonditionierung schließen lässt. Auffällig ist, dass die L-AG-behandelten Ratten, obwohl sie sowohl im LDB2 als auch auf den Kontext weniger ängstlich reagierten als die Kontrollgruppe, eine signifikant höhere Schreckreaktion auf den CS+ zeigten als die mit D-AG behandelten Ratten. Dies lässt vermuten, dass die durch die chronische unilaterale L-AG-Infusion erreichte erhöhte Erregbarkeit der Amygdala-Neurone die Furchtkonditionierung auf den CS+ erleichtert. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Veröffentlichungen, in denen nach teilweisem *Amygdala Kindling* ebenfalls eine erleichterte Furchtkonditionierung beobachtet wurde (Rosen et al., 1996). Wie bereits erwähnt, wirkten sich die chronischen unilateralen L-AG-Infusionen in die Amygdala weder auf die Reaktion auf den CS- noch auf die Reaktion auf den Konditionierungskontext aus, was darauf hindeutet, dass dieser Effekt spezifisch für den CS+ ist. Mit anderen Worten: Die ermittelten Daten legen nahe, dass die Spezifität der konditionierten Furchtreaktion durch die L-AG-Infusionen erhöht wurde. Diese Interpretation wird auch durch die Ergebnisse des erhobenen

Furchtspezifitäts-Scores (Z-Score-Differenz) unterstützt, der bei L-AG-behandelten Ratten signifikant höher als bei D-AG-behandelten Ratten ist (Abb. 12).

Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass bei den mit L-AG behandelten Ratten die Höhe der Schreckreaktion auf den CS+/CS- *Compound* im Vergleich zu der auf den CS+ deutlich reduziert war. Dies deutet darauf hin, dass der CS- in der L-AG-Gruppe die Rolle eines konditionierten Inhibitors einnimmt. Konditionierte Inhibition wiederum wird als essentieller Mechanismus beim *Safety*-Lernen diskutiert (Gerber et al., 2014; Kong et al., 2014; Odriozola & Gee, 2021), an dem nachgewiesenermaßen auch die Amygdala beteiligt ist (Sangha et al., 2013). Letzteres wird durch die in dieser Studie ermittelten Daten unterstützt.

Offenbar verringert also die chronische unilaterale Infusion von L-AG in die Amygdala Angst und kontextbezogene Furcht, während die Spezifität konditionierter Furcht und von *Safety*-Lernen zunimmt. Auf den ersten Blick mag dieses Ergebnis überraschen, da eine erhöhte Amygdala-Aktivität häufig mit Angst- und Affektstörungen einhergeht (Etkin & Wager, 2007; Godlewska et al., 2012; Rauch et al., 2003) und da Symptome dieser Störungen eben gerade eine erleichterte und generalisierte Furchtkonditionierung (Cooper et al., 2018; Dunsmoor & Paz, 2015; Lissek & Grillon, 2010), eine Erhöhung von allgemeinem Angstgefühl, kontextbezogener Furcht und eines Defizits beim *Safety*-Lernen sind (Grillon, 2002; Kennedy et al., 2001; Lissek et al., 2009). Während also eine erleichterte Furchtkonditionierung sowohl bei den Ratten (L-AG) der vorliegenden Studie als auch bei Patienten mit Angststörungen beobachtet werden kann, sind die übrigen genannten Symptome dieser Störungen den in dieser Studie beobachteten Veränderungen gegenüber mehr oder weniger diametral. Was die Frage aufwirft, wie sich diese Unterschiede erklären lassen?

Es ist zu vermuten, dass hierfür entscheidend ist, ob die Aktivität der Amygdala bi- oder unilateral verändert wird. Patienten mit Angststörungen zeigen in der Regel eine chronisch bilaterale Hyperaktivität und/oder Hyperreaktivität der Amygdala (Etkin & Wager, 2007), während Patienten mit chronisch bilateralen Läsionen der Amygdala wiederum nicht in der Lage sind Furcht zu lernen, bzw. nicht furchtkonditioniert werden können (Amaral, 2002; Feinstein et al., 2011). Liegt hingegen eine chronisch unilaterale Läsion der Amygdala vor, ist die Fähigkeit zur Furchtkonditionierung nur zum Teil eingeschränkt oder bleibt sogar komplett erhalten (Izquierdo & Murray, 2004; LaBar & LeDoux, 1996; Peper et al., 2001). Soweit bekannt, wurden zu chronisch unilateraler Stimulation der Amygdala bisher keine Studien veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass eine solche chronisch unilaterale Stimulation Furchtkonditionierung fördert und dessen Spezifität verbessert. Da eine bilaterale Aktivierung der Amygdala zu pathologisch verstärkten Furchtreaktionen führt, liegt es nahe, dass bei unilateraler Stimulation, wie sie in diesem Experiment durchgeführt wurde, die Amygdala

der kontralateralen Hemisphäre höchstwahrscheinlich normal funktioniert, was dann für eine unphysiologische, d. h. pathologische Erhöhung der Gesamterregbarkeit nicht ausreicht. Zudem scheint eine unilaterale Stimulation möglicherweise ebenfalls nicht auszureichen, um die neuronale Aktivität der mit der Amygdala eng verbundenen Hirnareale zu erhöhen. Eines dieser Areale, das in diesem Zusammenhang wahrscheinlich eine entscheidende Rolle spielt, ist der Interstitialkern der Stria terminalis (*bed nucleus of the stria terminalis* (BNST)), ein Teil der erweiterten Amygdala. Während die Amygdala vorwiegend mit spezifischer Furcht in Verbindung gebracht wird, ist der BNST eher mit Furchtgeneralisierung, Kontextfurcht und Angst assoziiert (Davis et al., 1997a, 1997b; Davis, 1998; Sullivan et al., 2004). Die Erhöhung der Erregbarkeit der Amygdala einer Gehirnhälfte hatte also vermutlich in erster Linie Einfluss auf die durch den spezifischen konditionierten Stimulus (CS+) ausgelöste Furcht. Da durch diese Art der Stimulation die BNST-Aktivität höchstwahrscheinlich nicht beeinflusst wurde, hatte eine solche Manipulation dementsprechend weniger Einfluss auf die Generalisierung von Furcht, kontextbezogene Furcht sowie die Ängstlichkeit der Ratten.

Wie bereits erwähnt, beobachteten wir, dass der CS- in der L-AG-Gruppe als konditionierter Inhibitor fungierte. Dies deutet auf ein verbessertes *Safety*-Lernen hin und ist eine direkte Folge der spezifischeren Furchtkonditionierung sowie der geringer ausgeprägten Kontextfurcht in der L-AG-Gruppe, was schließlich dazu führt, dass gefährliche von sicheren Reizen besser unterschieden werden können (Takemoto & Song, 2019). Darüber hinaus fördert die Verringerung von Angst, wie sie in diesem Experiment bei der L-AG-Gruppe zu sehen ist, ebenfalls *Safety*-Lernen (Ilse et al., 2019).

Zu beachten ist, dass anscheinend eine Lateralisation des Gehirns bezüglich der Funktionen der Amygdala existiert. So ist die linke Amygdala beim Menschen stärker an der emotionalen Verarbeitung, einschließlich Furchtkonditionierung, beteiligt als die rechte (Baas et al., 2004; Killgore & Yurgelun-Todd, 2001; Phelps et al., 2001). Bei Ratten scheint hierbei jedoch die rechte Amygdala eine größere Rolle zu spielen (Baker & Kim, 2004; Kiyokawa et al., 2016), während eine solche Lateralisierung bezüglich Furchtkonditionierung bei Mäusen bisher nicht beschrieben wurde (Orman & Stewart, 2007). Daraus ergibt sich eine erwähnenswerte Limitation der durchgeführten Studie. Da alle Infusionen in die linke Hemisphäre erfolgten, kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die beobachteten Effekte exklusiv für die linke Seite sind und ob linksseitige Infusionen mehr, weniger oder ähnlich wirksam wie rechtsseitige sind. Darüber hinaus bleibt offen, welche Wirkung höhere L-AG-Dosen hätten und was die bilaterale Infusion von L-AG auslösen würde. Wie oben begründet, ist hierbei anzunehmen, dass dies zu einer übermäßigen und unphysiologisch erhöhten Erregbarkeit von Amygdala-Neuronen führt, welche sich u.a. in einem maladaptiven Furchtgedächtnis äußern und zu übergeneralisierter Furcht führen könnte.

Schließlich ist zu beachten, dass die Infusionsstellen der durchgeführten Studie in verschiedenen Unterregionen der Amygdala lagen (laterale, basolaterale und zentrale Amygdala). Es gab keinen Hinweis dafür, dass die verschiedenen Infusionsstellen das gemessene Verhalten in diesem Experiment unterschiedlich beeinflussten. Allerdings war die Stichprobengröße pro Subregion relativ klein. Weiter zu beachten ist, dass L-AG-Infusionen den GABA-Spiegel sogar 1 mm von der Infusionsstelle entfernt beeinflussen (Shekhar et al., 1996), d.h. der verwendete methodische Ansatz ist höchstwahrscheinlich nicht sensitiv genug, um den Beitrag der verschiedenen Amygdala-Subregionen zu den beobachteten Effekten zu bewerten.

Offen bleibt auch, ob ein diesem Experiment ähnlicher Ansatz (milde Aktivierung der Amygdala) eine Behandlungsoption für Patienten mit Angststörungen darstellt, die zu Angstgeneralisierung neigen und ob mit diesem Ansatz ein Übergang von Generalisierung zu spezifischer Furcht erreicht werden kann. Um dieser Frage weiter nachzugehen, müssten Änderungen im Versuchsaufbau vorgenommen werden. Die Infusion von L-AG und somit auch die Aktivierung der Amygdala fand im vorliegend beschriebenen Versuch schon vor den Konditionierungssitzungen statt. Die erhobenen Ergebnisse lassen daher keine direkten Rückschlüsse auf die Behandlung von Patienten mit bestehenden Angststörungen zu. Ein Experiment, bei dem die L-AG-Infusionen nach der Konditionierung durchgeführt werden, wäre für diesen Zweck aussagekräftiger. Dennoch lassen die Ergebnisse dieser Studie die Vermutung zu, dass eine unilaterale chronische Aktivierung der Amygdala einer Generalisierung vorbeugen könnte, indem sie die Fähigkeit zur genaueren Diskrimination eingehender Reize erhöht. Die festgestellte, verbesserte Diskriminationsfähigkeit könnte auf eine Veränderung des Furchtgedächtnisses zurückzuführen sein, das durch die, in diesem Fall, nur mäßig erhöhte Aktivität einen zuverlässigeren Abruf von Informationen ermöglicht. Eine in diesem Maße aktivierte Amygdala könnte also in der Lage sein, Informationen über eintreffende Furchtreize kanalisiert abzuspeichern und adaptiver zu arbeiten. Dass die Aktivität der Amygdala nicht nur für das Erlernen (Furchtkonditionierung), sondern auch für das Verlernen von Furcht von wesentlicher Bedeutung ist, wurde in Studien zur Amygdala-Inhibition beschrieben. Es konnte sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen gezeigt werden, dass mit Benzodiazepinen behandelte Patienten mit Angststörungen weniger erfolgreich ihre Symptome durch eine Konfrontationstherapie verbesserten und auch häufiger zu Rückfällen nach Ende der Therapie neigten als die Placebogruppe (Bouton et al., 1990; Marks et al., 1993). Eine naheliegende Erklärung hierfür ist, dass die durch die Benzodiazepine hervorgerufene Reduktion der Amygdalaaktivität sowie deren amnestische Wirkung der Zugriff auf das Furchtgedächtnis und somit der Zugang zu den verlernenden Erinnerungen erschwert wird. Basierend hierauf wäre ein möglicher Behandlungsansatz, die Amygdala im Rahmen von Verhaltenstherapiesitzungen zu stimulieren und zu überprüfen, ob positive Effekte, wie ein Übergang von generalisierter Angst zu

spezifischer Furcht oder sogar ein Verlernen von angst- und furchtassoziierten Symptomen, erzielt werden können. Im Vorfeld sollten solche Behandlungsansätze durch weitere Versuche in Tiermodellen theoretisch fundiert werden. Zur Verifikation der Ergebnisse dieser Arbeit und um mehr Einblick in die beteiligten Hirnregionen und Unterkerne zu erhalten, erscheinen weitere Untersuchungen wie beispielsweise immunhistochemische Färbungen sinnvoll. Hierbei könnten u.a. durch den Nachweis von *Immediate Early Genes* Rückschlüsse auf die neuronale Aktivität der verschiedenen Regionen gezogen werden. Letztlich ist für die Anwendung beim Menschen ein deutlich weniger invasiver Ansatz erforderlich. Möglichkeiten der weniger invasiven Stimulation von Hirnarealen, die bereits beim Menschen eingesetzt werden, sind z.B. die transkranielle Magnetstimulation (TMS) oder die transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS) (Nitsche et al., 2008; Raj et al., 2018; Rossini et al., 2015). Andere Verfahren wie die Optogenetik oder die temporale Interferenz (TI) werden derzeit untersucht (Grossman et al., 2017; Grossman et al., 2018; Polanía et al., 2018).

## 5 Schlussfolgerung

Insgesamt zeigt die vorliegende Studie, dass die chronische unilaterale Infusion von L-AG in die Amygdala die Spezifität konditionierter Furcht verbessert und *Safety*-Lernen bei Ratten unterstützt, während sie kontextbezogene Furcht und Angst reduziert. Es ist anzunehmen, dass diese Effekte durch eine moderate und spezifisch die Amygdala betreffende Erhöhung neuronaler Erregbarkeit hervorgerufen werden und dass diese erhöhte neuronale Erregbarkeit der Amygdala wiederum dazu beiträgt, dass diese Neurone zu einer Gedächtnisspur rekrutiert werden (Han et al., 2007; Lau et al., 2020; Yiu et al., 2014). Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnisse könnten von potentiell großer klinischer Relevanz sein, da eine Modulation der Erregbarkeit der Amygdala, z.B. durch pharmakologische Interventionen oder nicht-invasive Hirnstimulation während der Reaktivierung des Furchtgedächtnisses bspw. in der Konfrontationstherapie, dazu beitragen könnte, ein übergeneralisiertes und maladaptives Furchtgedächtnis in ein spezifischeres und adaptives Furchtgedächtnis umzuwandeln. Künftige Forschungsarbeiten sollten an diese neuen Erkenntnisse anknüpfen, um ihr Potential im Hinblick auf die Erforschung und Therapie von Angsterkrankungen auszuschöpfen.

## 6 Zusammenfassung

Die neuronale Aktivität der Amygdala ist für Furchtlernen, auch Furchtkonditionierung genannt, von entscheidender Bedeutung. Bei Patienten mit Angststörungen wird häufig eine bilaterale Hyperaktivität der Amygdala beobachtet. Diese Hyperaktivität begünstigt Furchtkonditionierung und/oder eine Übergeneralisierung konditionierter Furcht. Im Gegensatz dazu schwächt eine Hypoaktivität der Amygdala, beispielsweise durch pharmakologisches Eingreifen, die Konditionierung von Furcht ab oder blockiert sie völlig. Bislang ist wenig darüber bekannt, wie verschiedene Aktivitätszustände der neuronalen Erregbarkeit der Amygdala die Spezifität oder Generalisierung von Furcht beeinflussen. Daher wurde in der vorliegenden Studie durch chronische Hemmung der GABA-Synthese in der Amygdala die Erregbarkeit dieser gesteigert und die Auswirkungen auf die Spezifität von Furchtkonditionierung untersucht. Hierzu wurden Ratten unilateral intrakranielle Kanülen in die Amygdala implantiert. Die Kanülen waren mit subkutan implantierten osmotischen Minipumpen verbunden, die entweder den GABA-Synthesehemmer L-Allylglycin oder sein inaktives Enantiomer D-Allylglycin abgaben. Nach einer Woche chronischer GABA-Synthesemanipulation wurden die Ratten einem diskriminativen Furchtkonditionierungsprotokoll unterzogen. Darüber hinaus wurde in *Light-Dark Box* (LDB) Tests angstähnliches Verhalten der Ratten gemessen. Die Ergebnisse hieraus (LDB) zeigen, dass die unilaterale Infusion von L-AG die in der Kontrollgruppe (D-AG) beobachtete Zunahme angstähnlichen Verhaltens verhinderte. D-AG-behandelte Ratten verbrachten demnach nach der Behandlung signifikant weniger Zeit im Lichtkompartiment als davor ( $t = 3,13$ ,  $p = 0,01$ ), während die L-AG-Gruppe dort tendenziell mehr Zeit verbrachte ( $t = 2,39$ ,  $p = 0,052$ ). Erhobene Daten zur Kontextfurcht bestätigen dies. Weiter zeigten L-AG-behandelte Ratten nach erfolgreicher diskriminativer Furchtkonditionierung signifikant höhere Schreckreaktionen auf den CS+ als die mit D-AG behandelten ( $t = 2,73$ ,  $p = 0,02$ ). L-AG-Infusionen verstärkten also den FPS auf den CS+. Auch wurde durch L-AG-Infusionen die Spezifität der konditionierten Furchtreaktion erhöht (Mann-Whitney-Test:  $U = 32$ ,  $p = 0,04$ ). Zudem begünstigte die Gabe von L-AG *Safety-Lernen*, da nur in dieser Gruppe durch die spezifischere Furchtkonditionierung der CS- als konditionierter Inhibitor gelernt wurde und in der Lage war die Schreckreaktionsamplitude des CS+ signifikant zu reduzieren ( $t = 2,37$ ,  $p = 0,02$ ; D-AG-behandelte Ratten:  $t = 0,75$ ,  $p = 0,46$ ). Die hier ermittelten Daten zeigen, dass chronische unilaterale L-AG-Infusionen in die Amygdala die Spezifität konditionierter Furcht verbessern, *Safety-Lernen* unterstützen und Angst sowie die Generalisierung von Furcht mindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen also nahe, dass eine mäßige Erhöhung der Erregbarkeit der Amygdala sich positiv auf die Spezifität konditionierter Furcht auswirken kann und verdeutlichen die potenzielle Anwendung für therapeutische Interventionen.



## Literaturverzeichnis

1. Amaral, D. G. (2002). The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: implications for understanding social anxiety. *Biological Psychiatry*, *51*(1), 11–17. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01307-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01307-5)
2. Baas, D., Aleman, A., & Kahn, R. S. (2004). Lateralization of amygdala activation: A systematic review of functional neuroimaging studies. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *45*(2), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.02.004>
3. Baker, K. B., & Kim, J. J. (2004). Amygdalar lateralization in fear conditioning: Evidence for greater involvement of the right amygdala. *Behavioral Neuroscience*, *118*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.15>
4. Boland, R. (2021). *Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry* (12th ed.). Wolters Kluwer Health. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=7026344>
5. Bouton, M. E., Kenney, F. A., & Rosengard, C. (1990). State-dependent fear extinction with two benzodiazepine tranquilizers. *Behavioral Neuroscience*, *104*(1), 44–55. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.104.1.44>
6. Bouton, M. E., Nelson, J. B., & Rosas, J. M. (1999). Stimulus generalization, context change, and forgetting. *Psychological Bulletin*, *125*(2), 171–186. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.125.2.171>.
7. Canu, E., Kostić, M., Agosta, F., Munjiza, A., Ferraro, P. M., Pesic, D., Copetti, M., Peljto, A., Lecic Tosevski, D., & Filippi, M. (2015). Brain structural abnormalities in patients with major depression with or without generalized anxiety disorder comorbidity. *Journal of Neurology*, *262*(5), 1255–1265. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7701-z>
8. Chen, S.-D., Wang, Y.-L., Liang, S.-F., & Shaw, F.-Z. (2016). Rapid Amygdala Kindling Causes Motor Seizure and Comorbidity of Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*, 129. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00129>
9. Collins, D. R., & Paré, D. (2000). Differential fear conditioning induces reciprocal changes in the sensory responses of lateral amygdala neurons to the CS(+) and CS(-). *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *7*(2), 97–103. <https://doi.org/10.1101/lm.7.2.97>
10. Cooper, S. E., Grillon, C., & Lissek, S. (2018). Impaired discriminative fear conditioning during later training trials differentiates generalized anxiety disorder, but not panic disorder, from healthy control participants. *Comprehensive Psychiatry*, *85*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2018.07.001>

11. Cushman, J. D., & Fanselow, M. S. (2010). Fear Conditioning. In *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (pp. 524–531). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00136-6>
12. Cushman, J. D., & Fanselow, M. S. (2012). Context Fear Learning. In N. M. Seel (Ed.), *Encyclopedia of the Sciences of Learning* (pp. 797–799). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1428-6\\_832](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1428-6_832)
13. Damasio, A., & Carvalho, G. B. (2013). The nature of feelings: Evolutionary and neurobiological origins. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(2), 143–152. <https://doi.org/10.1038/nrn3403>.
14. Dattani, S., Ritchie, H., & Roser, M. (2021). "Mental Health". <https://ourworldindata.org/mental-health>
15. Davis, M. (1989). Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. *Behavioral Neuroscience*, *103*(3), 495–503. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.103.3.495>
16. Davis, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, *15*, 353–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.002033>
17. Davis, M. (1998). Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biological Psychiatry*, *44*(12), 1239–1247. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00288-1](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00288-1)
18. Davis, M., Falls, W. A., Campeau, S., & Kim, M. (1993). Fear-potentiated startle: A neural and pharmacological analysis. *Behavioural Brain Research*, *58*(1-2), 175–198. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90102-v](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90102-v)
19. Davis, M., Walker, D. L., & Lee, Y. (1997a). Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: Differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *352*(1362), 1675–1687. <https://doi.org/10.1098/rstb.1997.0149>.
20. Davis, M., Walker, D. L., & Lee, Y. (1997b). Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *821*, 305–331. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48289.x>
21. Dunsmoor, J. E., & Paz, R. (2015). Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. *Biological Psychiatry*, *78*(5), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.010>
22. Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Cioocchi, S., Herry, C., & Lüthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, *62*(6), 757–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.026>

23. Ekman, P., & Friesen, W. V. (1971). Constants across cultures in the face and emotion. *Journal of Personality and Social Psychology*, *17*(2), 124–129. <https://doi.org/10.1037/h0030377>
24. Ekman, P., Sorenson, E. R., & Friesen, W. V. (1969). Pan-cultural elements in facial displays of emotion. *Science (New York, N.Y.)*, *164*(3875), 86–88. <https://doi.org/10.1126/science.164.3875.86>
25. Eleftheriou, B. E. (1972). *The Neurobiology of the Amygdala* (Vol. 2). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8987-7>
26. Etkin, A., & Wager, T. D. (2007). Functional neuroimaging of anxiety: A meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *The American Journal of Psychiatry*, *164*(10), 1476–1488. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.07030504>
27. Falls, W. A. (2010). Fear: Potentiation and Startle. In *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (pp. 538–542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00137-8>
28. Feinstein, J. S., Adolphs, R., Damasio, A., & Tranel, D. (2011). The human amygdala and the induction and experience of fear. *Current Biology : CB*, *21*(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.042>
29. Fendt, M., & Fanselow, M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*(5), 743–760. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(99\)00016-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00016-0)
30. Fendt, M., & Koch, M. (2013). Translational value of startle modulations. *Cell and Tissue Research*, *354*(1), 287–295. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1599-5>.
31. Gerber, B., Yarali, A., Diegelmann, S., Wotjak, C. T., Pauli, P., & Fendt, M. (2014). Pain-relief learning in flies, rats, and man: basic research and applied perspectives. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *21*(4), 232–252. <https://doi.org/10.1101/lm.032995.113>
32. Gewirtz, J. C., McNish, K. A., & Davis, M. (2000). Is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? *Behavioural Brain Research*, *110*(1-2), 83–95. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(99\)00187-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00187-4)
33. Godlewska, B. R., Norbury, R., Selvaraj, S., Cowen, P. J., & Harmer, C. J. (2012). Short-term SSRI treatment normalises amygdala hyperactivity in depressed patients. *Psychological Medicine*, *42*(12), 2609–2617. <https://doi.org/10.1017/S0033291712000591>
34. Grillon, C. (2002). Startle reactivity and anxiety disorders: aversive conditioning, context, and neurobiology. *Biological Psychiatry*, *52*(10), 958–975. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01665-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01665-7)

35. Grossman, N., Bono, D., Dedic, N., Kodandaramaiah, S. B., Rudenko, A., Suk, H.-J., Cassara, A. M., Neufeld, E., Kuster, N., Tsai, L.-H., Pascual-Leone, A., & Boyden, E. S. (2017). Noninvasive Deep Brain Stimulation via Temporally Interfering Electric Fields. *Cell*, *169*(6), 1029–1041.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.024>
36. Grossman, N., Okun, M. S., & Boyden, E. S. (2018). Translating Temporal Interference Brain Stimulation to Treat Neurological and Psychiatric Conditions. *JAMA Neurology*, *75*(11), 1307–1308. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2760>
37. Han, J.-H., Kushner, S. A., Yiu, A. P., Cole, C. J., Matynia, A., Brown, R. A., Neve, R. L., Guzowski, J. F., Silva, A. J., & Josselyn, S. A. (2007). Neuronal competition and selection during memory formation. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5823), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1139438>
38. Hofmeijer-Sevink, M. K., Batelaan, N. M., van Meegen, H. J. G. M., Penninx, B. W., Cath, D. C., van den Hout, M. A., & van Balkom, A. J. L. M. (2012). Clinical relevance of comorbidity in anxiety disorders: A report from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *Journal of Affective Disorders*, *137*(1-3), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.12.008>
39. Horton, R. W., Chapman, A. G., & Meldrum, B. S. (1978). Regional changes in cerebral GABA concentration and convulsions produced by D and by L-allylglycine. *Journal of Neurochemistry*, *30*(6), 1501–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb10484.x>
40. Ilse, A., Prameswari, V., Kahl, E., & Fendt, M. (2019). The role of trait anxiety in associative learning during and after an aversive event. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *26*(2), 56–59. <https://doi.org/10.1101/lm.048595.118>
41. Iwata, J., Chida, K., & LeDoux, J. E. (1987). Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Research*, *418*(1), 183–188. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90978-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90978-4)
42. Izquierdo, A., & Murray, E. A. (2004). Combined unilateral lesions of the amygdala and orbital prefrontal cortex impair affective processing in rhesus monkeys. *Journal of Neurophysiology*, *91*(5), 2023–2039. <https://doi.org/10.1152/jn.00968.2003>
43. Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, *517*(7534), 284–292. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
44. Jasnow, A. M., Lynch, J. F., Gilman, T. L., & Riccio, D. C. (2017). Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(3), 821–835. <https://doi.org/10.1002/jnr.23837>

45. Johnson, P. L., Fitz, S. D., Engleman, E. A., Svensson, K. A., Schkeryantz, J. M., & Shekhar, A. (2013). Group II metabotropic glutamate receptor type 2 allosteric potentiators prevent sodium lactate-induced panic-like response in panic-vulnerable rats. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, *27*(2), 152–161. <https://doi.org/10.1177/0269881112454230>
46. Johnson, P. L., & Shekhar, A. (2006). Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, *26*(26), 7093–7104. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0408-06.2006>
47. Jovanovic, T., Duncan, E. J., Kaye, J., Garza, K., Norrholm, S. D., Inslicht, S. S., Neylan, T. C., Mathew, S. J., Iosifescu, D., Rothbaum, B. O., Mayberg, H. S., & Dunlop, B. W. (2020). Psychophysiological treatment outcomes: Corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist increases inhibition of fear-potentiated startle in PTSD patients. *Psychophysiology*, *57*(1), e13356. <https://doi.org/10.1111/psyp.13356>
48. Kahl, E., & Fendt, M. (2016). Metabotropic Glutamate Receptors 7 within the Nucleus Accumbens are Involved in Relief Learning in Rats. *Current Neuropharmacology*, *14*(5), 405–412. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150425002017>
49. Kennedy, B. L., Schwab, J. J., Morris, R. L., & Beldia, G. (2001). Assessment of state and trait anxiety in subjects with anxiety and depressive disorders. *The Psychiatric Quarterly*, *72*(3), 263–276. <https://doi.org/10.1023/A:1010305200087>
50. Killgore, W. D., & Yurgelun-Todd, D. A. (2001). Sex differences in amygdala activation during the perception of facial affect. *Neuroreport*, *12*(11), 2543–2547. <https://doi.org/10.1097/00001756-200108080-00050>.
51. Kiyokawa, Y., Takahashi, D., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2016). The right central amygdala shows greater activation in response to an auditory conditioned stimulus in male rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *78*(10), 1563–1568. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0255>
52. Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology*, *59*(2), 107–128. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00098-7](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00098-7)
53. Kong, E., Monje, F. J., Hirsch, J., & Pollak, D. D. (2014). Learning not to fear: Neural correlates of learned safety. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *39*(3), 515–527. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.191>
54. Kreuzmann, J. C., & Fendt, M. (2020). Chronic inhibition of GABA synthesis in the infralimbic cortex facilitates conditioned safety memory and reduces contextual fear. *Translational Psychiatry*, *10*(1), 120. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0788-8>

55. Kreutzmann, J. C., Jovanovic, T., & Fendt, M. (2020). Infralimbic cortex activity is required for the expression but not the acquisition of conditioned safety. *Psychopharmacology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05527-7>
56. LaBar, K. S., & LeDoux, J. E. (1996). Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral amygdala damage: Correspondence with unilateral temporal lobectomy in humans. *Behavioral Neuroscience*, *110*(5), 991–997. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.5.991>
57. Lau, J. M. H., Rashid, A. J., Jacob, A. D., Frankland, P. W., Schacter, D. L., & Josselyn, S. A. (2020). The role of neuronal excitability, allocation to an engram and memory linking in the behavioral generation of a false memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *174*, 107284. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107284>
58. LeDoux, J. E. (1998). *The emotional brain: The mysterious underpinnings of emotional life* (1st. Touchstone ed.). *A Touchstone book*. Simon & Schuster.
59. LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, *23*, 155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
60. 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. *The Journal of Neuroscience*, *8*(7), 2517–2529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-07-02517.1988>
61. Lissek, S. (2012). Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: The case for conditioned overgeneralization. *Depression and Anxiety*, *29*(4), 257–263. <https://doi.org/10.1002/da.21922>
62. Lissek, S., & Grillon, C. (2010). Overgeneralization of Conditioned Fear in the Anxiety Disorders. *Zeitschrift Für Psychologie / Journal of Psychology*, *218*(2), 146–148. <https://doi.org/10.1027/0044-3409/a000022>
63. Lissek, S., Rabin, S., Heller, R. E., Lukenbaugh, D., Geraci, M., Pine, D. S., & Grillon, C. (2010). Overgeneralization of conditioned fear as a pathogenic marker of panic disorder. *The American Journal of Psychiatry*, *167*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09030410>
64. Lissek, S., Rabin, S. J., McDowell, D. J., Dvir, S., Bradford, D. E., Geraci, M., Pine, D. S., & Grillon, C. (2009). Impaired discriminative fear-conditioning resulting from elevated fear responding to learned safety cues among individuals with panic disorder. *Behaviour Research and Therapy*, *47*(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2008.10.017>

65. Lonsdorf, T. B., Menz, M. M., Andreatta, M., Fullana, M. A., Golkar, A., Haaker, J., Heitland, I., Hermann, A., Kuhn, M., Kruse, O., Meir Drexler, S., Meulders, A., Nees, F., Pittig, A., Richter, J., Römer, S., Shibani, Y., Schmitz, A., Straube, B., . . . Merz, C. J. (2017). Don't fear 'fear conditioning': Methodological considerations for the design and analysis of studies on human fear acquisition, extinction, and return of fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *77*, 247–285. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.02.026>
66. Lopresto, D., Schipper, P., & Homberg, J. R. (2016). Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *60*, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.009>
67. Marks, I. M., Swinson, R. P., Başoğlu, M., Kuch, K., Noshirvani, H., O'Sullivan, G., Lelliott, P. T., Kirby, M., McNamee, G., & Sengun, S. (1993). Alprazolam and exposure alone and combined in panic disorder with agoraphobia. A controlled study in London and Toronto. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, *162*, 776–787. <https://doi.org/10.1192/bjp.162.6.776>
68. McAllister, W. R., & McAllister, D. E. (1963). Increase over time in the stimulus generalization of acquired fear. *Journal of Experimental Psychology*, *65*(6), 576–582. <https://doi.org/10.1037/h0046583>
69. McDonald, A. J., & Mott, D. D. (2017). Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(3), 797–820. <https://doi.org/10.1002/jnr.23709>
70. McNish, K. A., Gewirtz, J. C., & Davis, M. (1997). Evidence of Contextual Fear after Lesions of the Hippocampus: A Disruption of Freezing But Not Fear-Potentiated Startle. *The Journal of Neuroscience*, *17*(23), 9353–9360. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-23-09353.1997>
71. McNish, K. A., Gewirtz, J. C., & Davis, M. (2000). Disruption of contextual freezing, but not contextual blocking of fear-potentiated startle, after lesions of the dorsal hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, *114*(1), 64–76. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.114.1.64>
72. Morey, R. A., Dunsmoor, J. E., Haswell, C. C., Brown, V. M., Vora, A., Weiner, J., Stjepanovic, D., Wagner, H. R., & LaBar, K. S. (2015). Fear learning circuitry is biased toward generalization of fear associations in posttraumatic stress disorder. *Translational Psychiatry*, *5*, e700. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.196>
73. Nitsche, M. A., Cohen, L. G., Wassermann, E. M., Priori, A., Lang, N., Antal, A., Paulus, W., Hummel, F., Boggio, P. S., Fregni, F., & Pascual-Leone, A. (2008). Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimulation*, *1*(3), 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.004>

74. Odriozola, P., & Gee, D. G. (2021). Learning About Safety: Conditioned Inhibition as a Novel Approach to Fear Reduction Targeting the Developing Brain. *The American Journal of Psychiatry*, *178*(2), 136–155. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20020232>
75. Öhman, A. (2007). Fear. In *Encyclopedia of Stress* (pp. 15–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00156-2>
76. Orłowski, M., Reingold, D. F., & Stanley, M. E. (1977). D- and L-stereoisomers of allylglycine: Convulsive action and inhibition of brain L-glutamate decarboxylase. *Journal of Neurochemistry*, *28*(2), 349–353. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb07754.x>
77. Orman, R., & Stewart, M. (2007). Hemispheric differences in protein kinase C beta1 levels in the rat amygdala: Baseline asymmetry and lateralized changes associated with cue and context in a classical fear conditioning paradigm. *Neuroscience*, *144*(3), 797–807. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.017>
78. Paine, T. A., Cooke, E. K., & Lowes, D. C. (2015). Effects of chronic inhibition of GABA synthesis on attention and impulse control. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *135*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.019>
79. Pavlov, P. I. (2010). Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Annals of Neurosciences*, *17*(3), 136–141. <https://doi.org/10.5214/ans.0972-7531.1017309>
80. Paxinos, G., & Watson, C. (2014). *Paxinos and Watson's the rat brain in stereotaxic coordinates* (7th ed.). Elsevier Acad. Press.
81. Peper, M., Karcher, S., Wohlfarth, R., Reinshagen, G., & LeDoux, J. E. (2001). Aversive learning in patients with unilateral lesions of the amygdala and hippocampus. *Biological Psychology*, *58*(1), 1–23. [https://doi.org/10.1016/S0301-0511\(01\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0511(01)00098-9)
82. Perkins, C. C., & Weyant, R. G. (1958). The interval between training and test trials as a determiner of the slope of generalization gradients. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *51*(5), 596–600. <https://doi.org/10.1037/h0042550>
83. Phelps, E. A., O'Connor, K. J., Gatenby, J. C., Gore, J. C., Grillon, C., & Davis, M. (2001). Activation of the left amygdala to a cognitive representation of fear. *Nature Neuroscience*, *4*(4), 437–441. <https://doi.org/10.1038/86110>
84. Polanía, R., Nitsche, M. A., & Ruff, C. C. (2018). Studying and modifying brain function with non-invasive brain stimulation. *Nature Neuroscience*, *21*(2), 174–187. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0054-4>



85. Rajj, T., Nummenmaa, A., Marin, M.-F., Porter, D., Furtak, S., Setsompop, K., & Milad, M. R. (2018). Prefrontal Cortex Stimulation Enhances Fear Extinction Memory in Humans. *Biological Psychiatry*, *84*(2), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.022>
86. Rauch, S. L., Shin, L. M., & Wright, C. I. (2003). Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *985*, 389–410. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07096.x>
87. Ren, C., & Tao, Q. (2020). Neural Circuits Underlying Innate Fear. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1284*, 1–7. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7086-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7086-5_1)
88. Robison-Andrew, E. J., Duval, E. R., Nelson, C. B., Echiverri-Cohen, A., Giardino, N., Defever, A., Norrholm, S. D., Jovanovic, T., Rothbaum, B. O., Liberzon, I., & Rauch, S. A. M. (2014). Changes in trauma-potentiated startle with treatment of posttraumatic stress disorder in combat Veterans. *Journal of Anxiety Disorders*, *28*(4), 358–362. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2014.04.002>.
89. Rosen, J. B., Hamerman, E., Sitcoske, M., Glowa, J. R., & Schulkin, J. (1996). Hyperexcitability: Exaggerated fear-potentiated startle produced by partial amygdala kindling. *Behavioral Neuroscience*, *110*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.1.43>
90. Rossini, P. M., Burke, D., Chen, R., Cohen, L. G., Daskalakis, Z., Di Iorio, R., Di Lazzaro, V., Ferreri, F., Fitzgerald, P. B., George, M. S., Hallett, M., Lefaucheur, J. P., Langguth, B., Matsumoto, H., Miniussi, C., Nitsche, M. A., Pascual-Leone, A., Paulus, W., Rossi, S., . . . Ziemann, U. (2015). Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an I.F.C.N. Committee. *Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, *126*(6), 1071–1107. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.02.001>
91. Sajdyk, T., Johnson, P., Fitz, S., & Shekhar, A. (2008). Chronic inhibition of GABA synthesis in the bed nucleus of the stria terminalis elicits anxiety-like behavior. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, *22*(6), 633–641. <https://doi.org/10.1177/0269881107082902>
92. Sangha, S., Chadick, J. Z., & Janak, P. H. (2013). Safety encoding in the basal amygdala. *The Journal of Neuroscience*, *33*(9), 3744–3751. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3302-12.2013>
93. Shekhar, A., Keim, S. R., Simon, J. R., & McBride, W. J. (1996). Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *55*(2), 249–256. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(96\)00077-9](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(96)00077-9)
94. Shepard, R. N. (1987). Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science (New York, N.Y.)*, *237*(4820), 1317–1323. <https://doi.org/10.1126/science.3629243>

95. Silva, B. A., Gross, C. T., & Gräff, J. (2016). The neural circuits of innate fear: Detection, integration, action, and memorization. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 23(10), 544–555. <https://doi.org/10.1101/lm.042812.116>
96. Spampanato, J., Polepalli, J., & Sah, P. (2011). Interneurons in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, 60(5), 765–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.11.006>
97. Sullivan, G. M., Apergis, J., Bush, D. E. A., Johnson, L. R., Hou, M., & LeDoux, J. E. (2004). Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience*, 128(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.015>
98. Sun, Y., Gooch, H., & Sah, P. (2020). Fear conditioning and the basolateral amygdala. *F1000Research*, 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21201.1>
99. Takemoto, M., & Song, W.-J. (2019). Cue-dependent safety and fear learning in a discriminative auditory fear conditioning paradigm in the mouse. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 26(8), 284–290. <https://doi.org/10.1101/lm.049577.119>
100. Theeuwes, F., & Yum, S. I. (1976). Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Annals of Biomedical Engineering*, 4(4), 343–353. <https://doi.org/10.1007/BF02584524>
101. Uzuneser, T. C., & Fendt, M. (2020). Individual expression of conditioned safety but not of conditioned relief is correlated with contextual fear. *Behavioural Brain Research*, 393, 112799. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112799>
102. Yeomans, J. S., Li, L., Scott, B. W., & Frankland, P. W. (2002). Tactile, acoustic and vestibular systems sum to elicit the startle reflex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00057-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00057-4)
103. Yiu, A. P., Mercaldo, V., Yan, C., Richards, B., Rashid, A. J., Hsiang, H.-L. L., Pressey, J., Mahadevan, V., Tran, M. M., Kushner, S. A., Woodin, M. A., Frankland, P. W., & Josselyn, S. A. (2014). Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. *Neuron*, 83(3), 722–735. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.017>
104. Zhao, B., Sun, J., Li, Q., & Zhong, Y. (2021). Differential conditioning produces merged long-term memory in *Drosophila*. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.66499>

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. habil. Markus Fendt, der mich lange begleitete und mich hervorragend betreute. Markus, während der langen Zeit der Betreuung hast du mich nicht nur stets bestens fachlich unterstützt, sondern erfuhst auch von persönlichen Krisen, batest mir auch hier stets Unterstützung an und halfst mir mit herzlichen Worten und einem offenen Ohr.

Weiter bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Judith Kreuzmann, die mich schnell in die Labormethoden einarbeitete und mir mit konstruktivem Rat weiterhalf.

Großer Dank gilt auch Dana Mayer und Evelyn Kahl, die mich bedacht und unermüdlich bei der Arbeit im Labor unterstützten.

Meinen Freunden, Max Dienberg und Philipp Scharfenberger danke ich für die vielen hilfreichen Gespräche und Anregungen.

Rakiya, meiner Schwester, danke ich dafür, dass sie mich immer daran erinnert, dass es auch Auszeiten braucht.

Besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern, Stefanie und Azzeddine El Matine. Danke, dass ihr mich immer begleitet, mich motiviert, stützt und mir bei schweren Entscheidungen immer die besten Ratgeber seid.

Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Freundin Joey. Danke, für deine wahnsinnige Geduld, dafür dass du mich nie unter Druck gesetzt und mich trotzdem immer motiviert hast.

Schließlich danke ich meinem Sohn Nuri dafür, dass er mich egal wie grau ein Tag ist glücklich macht, sobald ich ihn sehe.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Chronische unilaterale Hemmung der GABA-Synthese in der Amygdala erhöht die Spezifität konditionierter Furcht bei Ratten**

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Betreuung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Markus Fendt und Frau Dr. rer. nat. Judith Kreutzmann

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

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

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

Magdeburg, den 15.02.2023

Rami Sebastian El Matine

## **Bildungsweg**

Nicht einsehbar

Nicht einsehbar

Nicht einsehbar

## Anlagen

### Anlage 1

#### Nissl-/Kresylviolett-Färbung

##### Materialien

##### Reagenzien:

- Aqua dest.
- 70% Ethanol
- 96% Ethanol
- 100% Ethanol
- Essigsäure
- Kresylviolett acetat

##### Geräte:

- Färbeschalen
- Objektträgerschalen
- Stopp-Uhr
- Deckgläser
- Pinzette

##### Kresylviolett Färbelösung:

1. 5 g Kresylviolett in 100 ml Ethanol (100%) geben
2. 30 min mischen mit Magnetrührer bei 50 °C
3. 500 ml Aqua dest. hinzugeben
4. Lösung filtern (bis zu 4 h)
5. In einer dichten Flasche aufbewahren

##### Durchführung

1. Gefrierschnitte ca. 1h trocknen
2. 2 min 70% Ethanol
3. 1- 2 min 30'' Kresylviolett Färbelösung
4. 2x kurz Aqua dest.
5. 2 min 70% Ethanol
6. 2 min 96% Ethanol + 15 Tropfen Essigsäure
7. 2 min 100% Ethanol
8. 5 min Rothihistol
9. 2 min Rothihistol
10. Einbetten mit DPX