

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Wirkung von Rhodiola-Derivaten auf die kognitiven
Fähigkeiten der Maus**

Eine tierexperimentelle Studie

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Sobia-Shakoor Bhutta

aus Immenstadt im Allgäu

Magdeburg 2022

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Bhutta, Sobia-Shakoor: Wirkung von Rhodiola-Derivaten auf die kognitiven Fähigkeiten der Maus. – 2022. – 21 Abb., 3 Anhänge.

Kurzreferat

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Rhodiola-Derivaten, insbesondere die Substanz 843, auf die kognitiven Fähigkeiten von Mäusen untersucht. Hierzu führten wir verschiedene Experimente auf verhaltensbiologischer Ebene durch, für die als experimenteller Ansatz das auf klassischer Konditionierung beruhende Furchtlernen gewählt wurde. Die Ergebnisse des kontextuellen Furchtlernens legen nahe, dass die Behandlung mit der Substanz 843 zu einem stabileren Furchtgedächtnis führt indem der Hippocampus positiv beeinflusst wird. Bei der Extinktion von signalvermittelter Furcht zeigen die Resultate, dass die hier untersuchte Substanz keinen verstärkenden Effekt auf das hierbei aktive Netzwerk hat. Um die Mechanismen der positiven Wirkungen von 843 auf das kontextuelle Furchtlernen besser zu verstehen, untersuchten wir unter anderem die Expressionsrate des Aktivitätsmarkers c-fos im Hippocampus. Es konnte festgestellt werden, dass durch die Substanzapplikation vor allem die Hippocampus-Areale CA1 und CA3, nicht jedoch der Gyrus Dentatus, nach 843-Applikation eine signifikant höhere c-fos-Expression aufwiesen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die positiven Wirkungen von 843 auf das kontextuelle Furchtlernen unter anderem auf einer gesteigerten neuronalen Aktivität im Hippocampus beruhen. Des Weiteren haben wir einen möglichen Einfluss von 843 auf die Expression des Wachstumsfaktors BDNF (brain-derived neurotrophic factor) untersucht. Allerdings konnten wir zu den untersuchten Zeitpunkten keinen Anstieg in der BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus beobachten. Jedoch konnten wir beobachten, dass der Lernprozess während der kontextuellen Furchtkonditionierung zu einem generellen Anstieg des BDNF-Gehalts führte. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die Substanz 843 einen Gedächtnissteigernden Effekt auf das kontextuelle Furchtlernen besitzt, der möglicherweise über eine gesteigerte neuronale Aktivität im Hippocampus vermittelt wird.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Einführung	7
2.1. Lernen und Gedächtnis	7
2.2. Steigerung der kognitiven Leistungsfähigkeit	8
2.2.1. <i>Rhodiola rosea</i> und abgeleitete Derivate	10
2.3. Furchtlernen	11
2.3.1. Furcht und Angst	11
2.3.2. Furchtlernen	12
2.3.3. Furchtextinktion	13
2.3.4. Neuroanatomie des Furchtlernens	15
2.4. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	19
2.5. c-fos Protein	22
2.6. Fragestellung der Arbeit	22
3. Material und Methoden	24
3.1. Versuchstiere	24
3.2. Konditionierungsapparatur	24
3.3. Signalvermitteltes Furchtextinktionslernen	26
3.4. Kontextuelle Furchtkonditionierung	27
3.5. Offenfeld-Test	28
3.6. Erhöhtes Pluslabyrinth	29
3.7. Gehirnpräparation und c-fos Färbung	30
3.8. BDNF-Nachweis mittels ELISA	31
3.9. Substanzen und Substanzapplikation	32
3.10. Datenanalyse und Statistik	32

4. Ergebnisse	34
4.1. Signalvermitteltes Furchtextinktionslernen	34
4.2. Kontextuelles Furchtlernen	37
4.3. Offenfeld-Test	40
4.4. Erhöhtes Pluslabyrinth	43
4.5. Analyse der neuronalen Aktivität im Hippocampus mittels c-fos Färbung	46
4.6. BDNF-Nachweis mittels ELISA	49
5. Diskussion	55
5.1. Furcht- und Furchtextinktionslernen	56
5.1.1. Kontextuelles Furchtlernen	56
5.1.2. Extinktion signalvermittelter Furcht	60
5.1.3. Zusammenfassung der Verhaltensexperimente	63
5.2. Analyse der neuronalen Aktivität	63
5.3. Einfluss von 843 auf die BDNF-Proteinexpression	65
6. Zusammenfassung	68
7. Literaturverzeichnis	70
8. Anhang	79
8.1. Danksagungen	79
8.2. Ehrenerklärung	80
8.3. Darstellung des Bildungsweges	81

1. Abkürzungsverzeichnis

ACSF:	Artificial cerebrospinal fluid (künstliche Zerebrospinalflüssigkeit)
ADHS:	Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätsstörung
Amy:	Amygdala
AP-1:	Aktivator-Protein-1
BA:	Basale Amygdala
BDNF:	Brain-derived neurotrophic factor (Wachstumsfaktor aus der Familie der Neurotrophine)
BLA:	Basolaterale Amygdala
BLS:	Bilaterale Stimulationen
BSA:	Bovines Serumalbumin
cAMP:	Zyklisches Adenosinmonophosphat (Second Messenger)
CeA:	Zentrale Amygdala
CR:	Konditionierte Reaktion (conditioned response)
CREB/CRE:	cAMP response element-binding protein / cAMP response element sequence
CS:	Konditionierter Stimulus (conditioned stimulus)
dB SPL:	Dezibel Schalldruckpegel
DG:	Gyrus Dentatus - Region des Hippocampus
DknS:	Donkey normal serum
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMDR:	Eye Movement Desensitization and Reprocessing Therapie
EPM:	Erhöhtes Pluslabyrinth
FAE:	Ferulasäure-Eicosylester
FNDC5:	Fibronectin domain-containing protein 5

Hip:	Hippocampus
IEG:	Immediate early gene
itc:	Interkalierte Zellen
KG:	Körpergewicht
LC:	Locus coeruleus
LTD:	Langzeitdepression
LTP:	Langzeitpotenzierung
mA:	Milliampere
MeA:	Mediale Amygdala
MMP:	Matrix-Metalloproteasen
mPFC:	Medialer Präfrontalkortex
MW:	Mittelwert
nAChR:	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
NOS:	Stickstoffmonoxidsynthase
PBS:	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA:	Paraformaldehyd
PI3K:	Phosphoinositid-3-Kinase
PTBS:	Posttraumatische Belastungsstörung
SEM:	Standardfehler des Mittelwertes
SOR:	Räumlicher Objektwiedererkennungstest
TrK:	Tropomyosine-related kinase
UR:	Unkonditionierte Reaktion
US:	Unkonditionierter Stimulus
VTA:	Ventrales tegmentales Areal

2. Einführung

2.1. Lernen und Gedächtnis

Lernen und das Gedächtnis sind täglich benötigte Leistungen unseres Gehirns, die beide auf neuronalen Mechanismen beruhen. Anhand von Tiermodellen können diese auf verschiedenen Ebenen ausgehend vom Verhalten bis hin zu den zellulären und molekularen Mechanismen untersucht werden. So kann in unterschiedlichen Lernparadigmen das Lernen und die Gedächtnisbildung auf Verhaltensebene untersucht und z.B. pharmakologisch beeinflusst werden. Besonders geeignet sind hierfür Modelle die auf den Prinzipien der Konditionierung beruhen (siehe Kapitel 3.3 und 3.4), da diese meist auf relativ einfachen, klar definierten Assoziationen beruhen. Zudem sind die zugrundeliegenden neuronalen Schaltkreise meist schon relativ gut verstanden. So verwendeten wir in dieser Arbeit das kontextuelle Furchtlernen, sowie das Extinktionslernen von signalvermittelter Furcht. Beide Lernparadigmen greifen dabei auf neuronale Aktivität bzw. Plastizität im Hippocampus, der Amygdala und des medialen Präfrontalkortexes zurück. Alle drei Regionen stellen wichtige Gehirngebiete für das Lernen und die Gedächtnisbildung dar (Feder et al., 2009; Maren et al., 2013; Marks et al., 2022; Quirk & Mueller, 2008).

Betrachtet man die zellulären Mechanismen des Lernens, so zeigt sich, dass die Informationsübertragung zwischen Neuronen über besondere Verbindungen erfolgt, die chemische Synapsen genannt werden. Hier wird die Aktivität der postsynaptischen Neurone durch die Wirkung von Neurotransmittern, die von den Endigungen der präsynaptischen Neuronen freigesetzt werden und an spezifische Rezeptoren binden, gesteigert oder gehemmt. Diese veränderbare synaptische Übertragung wird heute als einer der wichtigsten zellulären Mechanismen des Gedächtnisses und des Lernens angesehen. Die allgemeinen theoretischen Grundlagen dieser Plastizität beruhen in erster Linie auf der Annahme, dass die synchrone Aktivierung prä- und postsynaptischer Elemente, abhängig vom Stimulationsmuster, entweder zu einer langfristigen Verstärkung (Langzeitpotenzierung, LTP) oder Abschwächung (Langzeitdepression, LTD) der synaptischen Übertragung führen. Diese Phänomene wurden zunächst im Hippocampus und später in weiteren Gehirnarealen, die an kognitiven Funktionen beteiligt sind, nachgewiesen (Vigot, 2003). Dabei können unter anderem Neuropeptide

wie Brain-derived neurotrophic factor (BDNF, vgl. Kapitel 2.4), sowie neuromodulatorische Transmitter wie z.B. Acetylcholin, Dopamin oder Noradrenalin entweder die Bedingungen für eine LTP/LTD erleichtern oder aber selber die molekularen Schalter sein, die biochemische Veränderungen bei synaptischer Plastizität einleiten (Brigadski und Leßmann, 2014; Edelman et al., 2014).

2.2. Steigerung der kognitiven Leistungsfähigkeit

Die kognitive Leistungsfähigkeit kann durch den Gebrauch von psychoaktiven (nootropen) Substanzen gesteigert werden. Dies wird häufig als „*Cognitive enhancement*“ oder auch „*Neuroenhancement*“ bezeichnet. Hierbei kann durch *Cognitive enhancement* die Aufmerksamkeit, Konzentration und Lernleistung bei gesunden Personen verbessert werden um anspruchsvolle Aufgaben erfolgreich zu absolvieren (Fond et al., 2015; Sahakian & Morein-Zamir, 2007). Zum anderen sind diese Substanzen und die Aufklärung ihrer Wirkmechanismen klinisch relevant für die Behandlung von Erkrankungen die mit kognitiven Beeinträchtigungen einhergehen, wie z.B. Demenzerkrankungen. So werden z.B. Acetylcholinesterase-Inhibitoren, wie Donepezil, Galantamin und Rivastigmin, erfolgreich in der Behandlung der Alzheimer-Demenz (AD) eingesetzt (Haake et al., 2020). Diese Substanzen erhöhen die Konzentration des Neurotransmitters Acetylcholin im synaptischen Spalt, was durch eine erhöhte Aktivierung der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren, die wiederum über verschiedene Wege den für das Lernen wichtige NMDA-Rezeptor aktivieren können, die kognitiven Fähigkeiten der Patienten wahrscheinlich verbessert (Collingridge et al., 2013). Auch bei gesunden Testpersonen können diese Substanzen zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungen führen (Micoulaud, 2015; Grön et al., 2005). Aber auch Substanzen wie Modafinil oder Methylphenidat, die bei den Erkrankungen Narkolepsie und ADHS angewandt werden, verbessern die Wachsamkeit, welche ein Schlüsselfaktor für die kognitive Leistungsfähigkeit ist. Dies wird durch Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin und Noradrenalin in die Präsynapse erreicht (Mehlman, 2004; Fond et al., 2015).

Neben den synthetisch hergestellten „*Cognitive enhancern*“, gibt es auch eine Reihe von pflanzlichen Verbindungen, die bei Krankheiten mit kognitiven Beeinträchtigungen helfen können. So werden z.B. Extrakten von *Ginkgo biloba*, sowohl eine

gehirnfunktionssteigernde als auch eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben. Sie wirken als Vasodilatator, fördern also die Blutzirkulation im Gehirn, und erhöhen somit den Sauerstoff- und Energiegehalt im Gehirn. Die Neuroprotektion wird gewährleistet, indem das Gehirn vor Toxinen geschützt wird und altersbedingte zerebrale Neurotransmissionsdefekte gemindert werden (Suliman et al., 2016). Weiterhin wird eine anti-oxidative Wirkung als Radikalfänger, die Inhibierung der β -Amyloid-Aggregation und mögliche Effekte auf die Genexpression von Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparatur-Enzymen diskutiert, die den in hohen Konzentrationen in Ginkgo-Extrakten enthaltenen Flavonoiden und Terpenoiden zugeschrieben werden. Diese angenommenen Wirkungsmechanismen von Ginkgo-Extrakten sind jedoch nur teilweise evidenzbasiert (Franke et al., 2014).

Weitere Beispiele für natürliche „*Cognitive enhancer*“ sind das Alkaloid Nikotin und Koffein. So weist Nikotin, neben der großen Suchtgefahr und einigen unerwünschten Nebenwirkungen, eine Verbesserung der Aufmerksamkeits- und Gedächtniseigenschaften auf. Nikotin und seine synthetisierten Analoga stimulieren über verschiedenen Signalwege die Freisetzung von Acetylcholin und aktivieren den präsynaptischen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor. Dadurch wird eine parasymphomimetische Wirkung erzielt und zusätzlich die psychomotorische Leistungsfähigkeit gesteigert (Suliman et al., 2016).

Die psychoaktive Substanz Koffein wirkt in geringen Dosen als ein Stimulans mit zentralen Effekten, d.h. es werden sowohl die Wachheit, die Aufmerksamkeit und die Konzentrationsfähigkeit gesteigert, als auch das Langzeitgedächtnis verbessert. (Borota et al., 2014). Der Wirkmechanismus beruht auf der ähnlichen chemischen Struktur von Koffein und Adenosin, wodurch Koffein den Adenosin-Rezeptor im zentralen Nervensystem kompetitiv hemmen kann. In höheren Dosen wird der Abbau des *Second Messengers* cAMP durch Blockade der Phosphodiesterase verhindert, was zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in den Zellen führt (Schuster & Mitchell, 2019). Auch zwischen Koffein und der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen wurde ein Zusammenhang beschrieben: In geringen Dosen verhindert Koffein die β -Amyloid-Akkumulation in den zerebralen Blutgefäßen, schützt vor oxidativem Stress und kann dadurch vorbeugen an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken. Bei Parkinson-Patienten wurde durch Koffein eine herunterregulierte neuroinflammatorische Reaktion sowie ein geringerer Verlust von dopaminergen Neuronen beobachtet (Cappelletti et al., 2015).

2.2.1. *Rhodiola rosea* und abgeleitete Derivate

Rhodiola rosea, auch Rosenwurz genannt, gehört zur Familie der *Crassulaceae* (Dickblattgewächse) und kommt vor allem in arktischen Gebieten und den Gebirgsregionen Nordamerikas und Eurasiens vor. Es sind bereits unterschiedliche positive Wirkungen von *Rhodiola*-Extrakten, wie anti-inflammatorische, blutdruckreduzierende oder antidepressive Wirkungen, in verschiedenen Studien nachgewiesen worden (Limanaqi et al., 2020; Tao et al., 2019; Zhuang et al., 2019). Darüber hinaus wird außerdem berichtet, dass Extrakte der Pflanze einerseits zu einer Verbesserung der kognitiven Funktionen führen und andererseits neuroprotektive Wirkungen haben. Die Einnahme von *R. rosea* bewirkt laut Sellami und Kollegen (2018) eine nachweisliche Erhöhung des Serotonin- und Noradrenalinegehalts im präfrontalen Kortex, sowie der Dopamin- und Acetylcholin-Konzentration im limbischen System. Durch die Stimulation dieser Moleküle werden die Aufmerksamkeit, die Gedächtnisfunktion, die Konzentration und die körperliche Leistungsfähigkeit erhöht. So zeigte eine Studie, dass nach vierwöchiger Supplementierung mit *R. rosea*-Extrakten der Lactat Spiegel und Biomarker für Muskelschäden als Reaktion auf Aerobic-Übungen bei Athleten reduziert werden konnten (Sellami et al., 2018).

Durch die anti-oxidative Wirkung von *R. rosea*-Extrakten kann das Nervensystem vor Schäden geschützt werden, was wiederum das Risiko eines Ausbruchs der Alzheimer-Demenz verringern und die dabei auftretenden Gedächtnisstörungen verbessern kann (Suliman et al., 2016). Durch den Schutz des Gewebes gegen freie Sauerstoffradikale und schwache bis mittelstarke Mutagene kann oxidativer Stress in Endothelzellen verhindert werden. Außerdem wurde beobachtet, dass die Pflanzenextrakte die Angiogenese hemmen können, was insbesondere im Hinblick auf Prozesse bei einer Tumorprogression wesentlich ist. Dadurch wird das Wachstum des Primärtumors signifikant verlangsamt und die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung verringert. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf die Regulierung der Expression und Aktivität des Enzyms Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) beruht. Eine weitere positive Eigenschaft von *R. rosea* ist die antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien und Pilze (Radomska-Leśniewska et al., 2015).

All die zuvor genannten Beobachtungen wurden anhand von Extrakten aus *R. rosea* gemacht, die aus einer Mischung verschiedener Wirkstoffe bestehen. Abhängig von der Art der Extraktion und der Art und Menge der verwendeten Pflanzen ist die Konzentration

der enthaltenen Wirkstoffe unterschiedlich. Durch die Identifizierung der effektiven Substanzen könnten diese Wirkstoffe synthetisiert und exakt dosiert werden, was eine wichtige Voraussetzung für den standardisierten Einsatz als therapeutisches Medikament ist (Endres, 2020). In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe (Michels et al., 2018) wurden verschiedene Wirkstoffe aus der Wurzel von *Rhodiola rosea* isoliert und auf ihre Wirkung hinsichtlich Lern- und Gedächtnisleistungen in verschiedenen Spezies untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Bestandteil Ferulasäure-Eicosyl-Ester (FAE-20) eine stimulierende Wirkung auf die Gedächtnisleistung hat. Unter anderem wurde festgestellt, dass durch eine Gabe von FAE-20 dosisabhängig der altersbedingte Rückgang des Gedächtnisses bei erwachsenen Fruchtfliegen sowie der genetisch bedingte Verlust der Gedächtnisfunktion bei jungen Fliegen kompensiert werden konnte (Michels et al., 2018). Außerdem konnte man feststellen, dass sich die Erregbarkeit von CA1-Neuronen im Hippocampus von Mäusen erhöhte und dass eine Verbesserung des kontextabhängigen Furchtgedächtnisses zu beobachten war. Die Lernexperimente in dieser Studie basierten hierbei auf dem Prinzip der klassischen Konditionierung (Michels et al., 2018). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden von der Arbeitsgruppe, die an der Studie von Michels et al., 2018 beteiligt war, neue Substanzen entwickelt, die FAE-20 relativ ähnlich sind und möglicherweise eine höhere pharmakologische Potenz besitzen als FAE-20. Im Rahmen meiner Dissertation habe ich die Wirkungen von einem dieser neuen Derivate („843“), das von der Struktur des FAE-20 abgeleitet ist, auf die kognitiven Fähigkeiten der Maus untersucht (siehe 2.6).

2.3. Furchtlernen

2.3.1. Furcht und Angst

Emotionen spielen unter anderem eine wichtige Rolle um in verschiedenen Situationen mit einem angepassten Verhalten reagieren zu können. Dies trifft speziell auf aversive emotionale Zustände, wie z.B. Angst oder Furcht zu, die in gefährlichen Situationen durch angepasste Reaktionen die Überlebenswahrscheinlichkeit für das Individuum erhöhen können (Fendt & Fanselow, 1999). Emotionale Ereignisse führen auch zu einer besseren Gedächtnisbildung. So werden Ereignisse, die mit starken Emotionen verbunden sind, besser im Gedächtnis abgespeichert als unbedeutende Erlebnisse (Kindt, 2018). Störungen im emotionalen Gedächtnis werden als eine wichtige Ursache für verschiedene

psychisch bedingte Krankheiten, wie zum Beispiel Phobien, Angststörungen, posttraumatische Belastungsstörungen (PTBS), Suchterkrankungen oder Essstörungen angesehen (Fendt et al., 2020). Entsprechende Tiermodelle können dazu beitragen die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen und neue Behandlungsstrategien zu entwickeln (siehe 5.1.2).

In dieser Arbeit geht es speziell um das Furchtgedächtnis. Hierbei ist es zunächst wichtig zwischen den Begriffen „Angst“ und „Furcht“ zu differenzieren. „Furcht“ tritt bei einer akuten Gefahr auf, hat einen Fokus auf die Bedrohung und tritt normalerweise episodisch, das heißt nur in bestimmten Situationen, auf. Das bedeutet, dass nachdem die Bedrohung vorbei ist, auch die Furcht wieder nachlässt (Maren et al., 2013). „Angst“ hingegen wird als ein Zustand der Vigilanz verstanden, bei dem der Fokus sehr verschwommen ist, da die Quelle der Bedrohung unklar ist. Angst dauert viel länger an und geht mit weniger stark ausgeprägten physiologischen Reaktionen als die Furcht einher (Elman et al., 2018). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Furcht durch bestimmte Gefahrensituationen gelernt werden kann, wohingegen Angst eine eher angeborene Emotion ist (Tovote et al., 2015).

Bei Nagetieren lässt sich Furcht sehr gut über verschiedene Verhaltensveränderungen quantifizieren. Die markanteste Verhaltensveränderung ist dabei das sogenannte „Freezing“ (Schreckstarre), das als Index für Furchtverhalten genutzt wird. Das *Freezing* wird definiert als die Abwesenheit aller Bewegungen, außer denen, die zur Atmung notwendig sind und korreliert positiv mit der Stärke der Furchtreaktion (De Oca et al., 1998).

2.3.2. Furchtlernen

Der Teil des Langzeitgedächtnisses, bei dem die Wiedergabe von Gedächtnisinhalten automatisch und unbewusst erfolgt, wird als nicht-deklaratives oder implizites Gedächtnis bezeichnet. Diesem Teil des Gedächtnisses ordnet man unter anderem auch die klassische Konditionierung zu (Gruber, 2018). Bei der klassischen Furchtkonditionierung (vgl. **Abb. 1**) wird ein neutraler Stimulus mit einem aversiven, unkontingierten Reiz (US) gepaart. Als Folge tritt eine unkontingierte Antwort (UR) im Rahmen einer Furchtreaktion auf, die beispielsweise durch den Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks, durch Freisetzung von Stresshormonen wie Cortisol

oder durch *Freezing* gekennzeichnet ist (LeDoux, 2007; LeDoux 2014). Durch wiederholtes gemeinsames Auftreten von neutralem Stimulus und US, wird aus dem neutralen ein konditionierter Stimulus (CS), was bedeutet, dass dieser nun auch ohne den US eine der UR ähnlichen konditionierten Antwort (CR) auslösen kann (Bräscher et al., 2017; Wotjak et al. 2013).

In dieser Arbeit wird zwischen signalvermitteltem und kontextuellem Furchtlernen unterschieden. Bei der kontextuellen Konditionierung wird der aversive Reiz mit einer bestimmten Umgebung - bestehend aus mehreren Faktoren, die zur gleichen Zeit vorhanden sind (z.B. spezielle visuelle und akustische Eigenschaften) - in Verbindung gebracht. Dabei ist jeder kontextuelle Faktor in der Lage die konditionierte Reaktion mehr oder weniger stark hervorzurufen (Risbrough, 2010). Im Gegensatz dazu wird bei der signalvermittelten Konditionierung der Fokus lediglich auf den Signalreiz und nicht auf den Kontext gelegt (vgl. **Abb. 1**). Wird dieser mehrmals in Kombination mit dem aversiven Reiz präsentiert, reicht später seine alleinige Präsentation in einem neuen Kontext aus, um die CR auszulösen (Wotjak, 2019).

2.3.3. Furchtextinktion

Ein intensiv erforschter Mechanismus, um gelernte Furcht wieder zu reduzieren, ist die Furchtextinktion. Diese wird experimentell hervorgerufen, indem der CS wiederholt bzw. langanhaltend ohne gleichzeitige Paarung mit dem aversiven US präsentiert wird. Dies führt zu einer Abnahme der Furchtreaktion und damit auch des *Freezing*-Verhaltens (vgl. **Abb. 1**, Kindt, 2018). Man nimmt an, dass es dabei zu einem neuen Lernprozess kommt, bei dem das Abrufen des Furchtgedächtnisses supprimiert wird. Durch das Extinktionstraining bildet sich also eine neue Gedächtnisspur, bei der eine neue Assoziation zwischen „CS“ und „kein US“ gebildet wird (Herry et al., 2010; Quirk & Mueller, 2008). Jedoch kann der Begriff „Extinktion“ irreführend wirken, da es sich hierbei nicht um ein „Auslöschen“ des Gedächtnisses im engeren Sinn handelt. Bewiesen wird dies durch die Tatsache, dass die Furchtreaktion auf den CS nach erfolgreicher Extinktion durch einfache experimentelle Manipulationen erneut auftreten kann. So kann zum Beispiel bei Testung nach ein paar Tagen ein erneutes, verstärktes Auftreten der ursprünglichen Furchtreaktion beobachtet werden, die „Spontanremission“. Des Weiteren wird dieser Effekt auch beobachtet, wenn der US ohne erneute Verknüpfung

mit dem CS präsentiert wird (*Reinstatement*) oder der CS in einem neuen, bisher ungewohnten Kontext präsentiert wird (*Renewal*). Das Furchtgedächtnis wird also nicht dauerhaft gelöscht, sondern nur temporär unterdrückt (Wotjak et al., 2013).

Von der Furchtextinktion gilt es noch das „Vergessen“ der Furcht abzugrenzen, das ebenfalls zu einer Abnahme der Furchtreaktion über die Zeit führt. Dabei werden durch eine zunehmende Zeitspanne zwischen dem Lernen und dem Abrufen des Gespeicherten die Gedächtnisspuren des Furchtgedächtnisses abgeschwächt. Unter „Vergessen“ versteht man also das zeitbedingte Verschwinden von Gedächtnisinhalten (Wotjak et al., 2013). Allerdings ist das Furchtgedächtnis besonders stabil gegenüber Vergessen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass bei Ratten die konditionierte Furcht auch noch 16 Monate nach der Konditionierung abgerufen werden konnte (Gale et al., 2004).

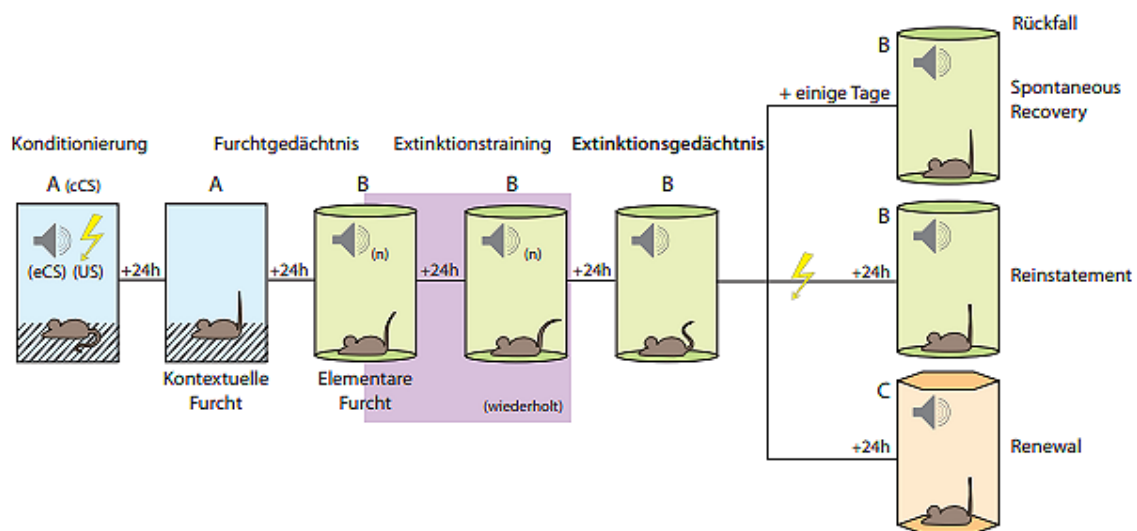


Abbildung 1: Furchtkonditionierung und -extinktion (aus Wotjak et al., 2013): Während der Furchtkonditionierung wird in einem bestimmten Kontext A ein Tonsignal (CS) gemeinsam mit einem elektrischen Fußreiz (US) präsentiert. Bei erneuter Präsentation des konditionierten Tons oder Kontextes wird eine typische Furchtreaktion (*Freezing*) ausgelöst. Im Extinktionstraining wird der Ton ohne aversiven Reiz präsentiert, wodurch es in einem Umlernprozess zur Unterdrückung des Furchtgedächtnisses kommt. Dass es sich hierbei jedoch nicht um ein Auslöschen handelt ist daran zu sehen, dass das erneute Auftreten der Furchtreaktion auf das Tonsignal entweder spontan (*Spontaneous Recovery*) oder durch erneute Präsentation eines US (*Reinstatement*) bzw. die Testung in einem neuen Kontext (*Renewal*) möglich ist.

2.3.4. Neuroanatomie des Furchtlernens

Das limbische System ist am Einspeichern und Abrufen von Gedächtnisinhalten, sowie der emotionalen Bewertung von Gedächtnisinhalten beteiligt. Es setzt sich aus verschiedenen Strukturen zusammen, wie dem Corpus mamillare, dem Fornix, dem Hippocampus, der Amygdala, dem Gyrus cinguli und dem Gyrus parahippocampalis. Vor allem der Hippocampus (Hip) und die Amygdala (Amy), aber auch der mediale präfrontale Kortex (mPFC), spielen im Furchtnetzwerk, auch aversives Motivationssystem genannt, eine große Rolle. Die Aktivität dieser Strukturen wird hauptsächlich durch die neuromodulatorischen Transmitter Noradrenalin aus dem Locus coeruleus (LC), Dopamin aus dem ventralen tegmental Areal (VTA) und Serotonin aus den Raphekernen reguliert (vgl. **Abb. 2**; Feder et al., 2009). Die sensorischen Informationen erreichen die Amygdala über zwei Wege: entweder werden sie über den Thalamus direkt zur Amygdala weitergeleitet, um eine schnelle Schutzreaktion auszulösen, oder die Reize werden erst zum Kortex gesendet, um dort genauer verarbeitet zu werden, bevor sie die Amygdala erreichen. Der Kortex wird zudem benötigt, wenn komplexere CS verwendet werden, so kann z.B. eine Tonfolge nur über den auditorischen Kortex verarbeitet und als CS gelernt werden. (Ehlert, 2013).

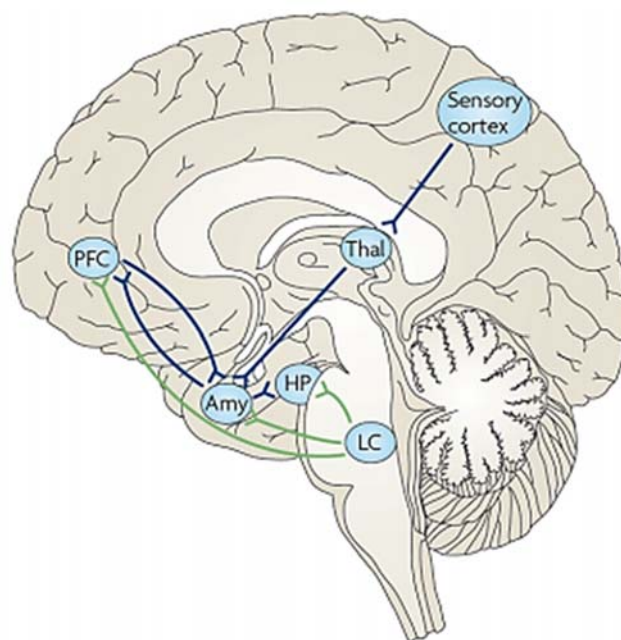


Abbildung 2: Furchtnetzwerk / aversives Motivationssystem (aus Feder et al., 2009): Vereinfachtes Schema der wichtigsten limbischen Regionen im Furchtnetzwerk. Diese sind stark miteinander verbunden und regulieren emotionale Zustände. Die Aktivität dieser Bereiche wird durch Noradrenalin (aus dem Locus coeruleus (LC)), Dopamin (aus dem ventralen tegmental Areal (VTA)) und Serotonin (aus den Raphe-Kernen) reguliert. Abkürzungen: Sensory cortex: Sensorischer Kortex; Thal: Thalamus; PFC: Präfrontaler Kortex; Amy: Amygdala; HP: Hippocampus; LC: Locus coeruleus.

Die funktionelle Anatomie der Amygdala ist in der Evolution sehr gut konserviert worden. Daher weist die Amygdala der Nagetiere eine sehr starke Ähnlichkeit mit der menschlichen Amygdala hinsichtlich Anatomie, Funktionalität und Konnektivität auf (Maren, 2004, LeDoux, 2007). Die Amygdala besteht aus mehreren Kerngebieten (vgl. **Abb. 3**), wobei der basolaterale Kernkomplex und der zentrale Nucleus für die Furchtkonditionierung von großer Bedeutung sind (Stein et al., 2010; Pape & Pare, 2010; Ehrlich et al., 2009). Der laterale Bereich (LA) stellt die Haupteingangsregion für sensorische Informationen aus dem Kortex und aus dem Thalamus dar, aber auch die anderen Kernbereiche erhalten von verschiedenen Strukturen wichtige Eingänge. So projiziert der mediale präfrontale Kortex in die basale Amygdala (BA), in den zentralen Kern der Amygdala (CeA) und in die sogenannten interkalierten Zellen (itc). Die mediale Amygdala (MeA) erreichen eingehende Informationen vor allem aus dem olfaktorischen System (vgl. **Abb. 3**). Da auch viele intraamygdaloide Verbindungen auf Ebene der Subnuclei existieren, wodurch die verschiedenen in die gesamte Amygdala eintreffenden Informationen miteinander verglichen werden können, ist eine angemessene Verhaltensreaktion auf einen Furchtstimulus möglich (LeDoux, 2007).

Im Gegensatz zur basolateralen Amygdala (BLA) stellt der zentrale Nucleus die Hauptregion der aus der Amygdala ausgehenden Informationen dar. Er kann in einen medialen und in einen lateralen Anteil unterteilt werden, die jeweils Projektionen in das periaquäduktale Grau, in den Hypothalamus, in den motorischen Vaguskerne und in das oben genannte monoaminerge System haben. Jedoch hat auch der basale Amygdalabereich einige Ausgangsstrukturen, die unter anderem instinktive Reaktionen wie das Fluchtverhalten zum Schutz vor einer Gefahr kontrollieren (vgl. **Abb. 4**). Es werden also subkortikale Zentren angesteuert, die an der autonomen und endokrinen Komponente der Antworten auf einen aversiven Reiz beteiligt sind. Somit ist die BLA für die Einschätzung der Gefährlichkeit eines aversiven Reizes verantwortlich, wohingegen die CeA zuständig für die Kontrolle der Furchtreaktion, z.B. des *Freezings*, ist (Stein et al., 2010).

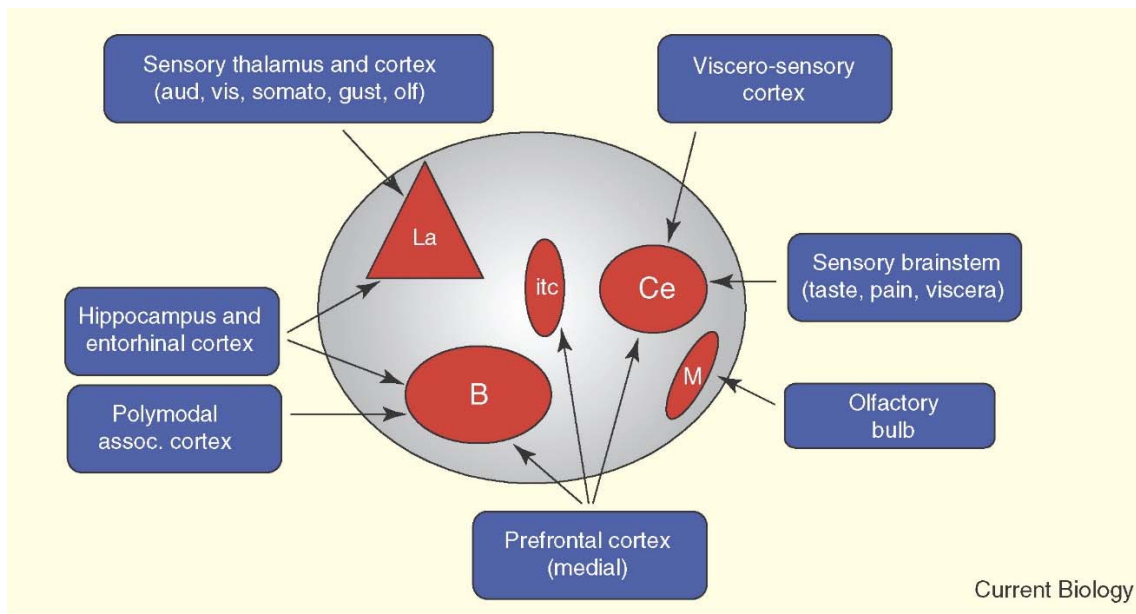


Abbildung 3: Eingänge in die Amygdala (aus LeDoux, 2007): Abkürzungen der Amygdala-Areale: B, Basalkern; Ce, zentraler Kern; itc, interkalierte Zellen; La, lateraler Kern; M, medialer Kern. Sensorische Abkürzungen: aud, auditiv; vis, visuell; somato, somatosensorisch; gust, gustatorisch (Geschmack).

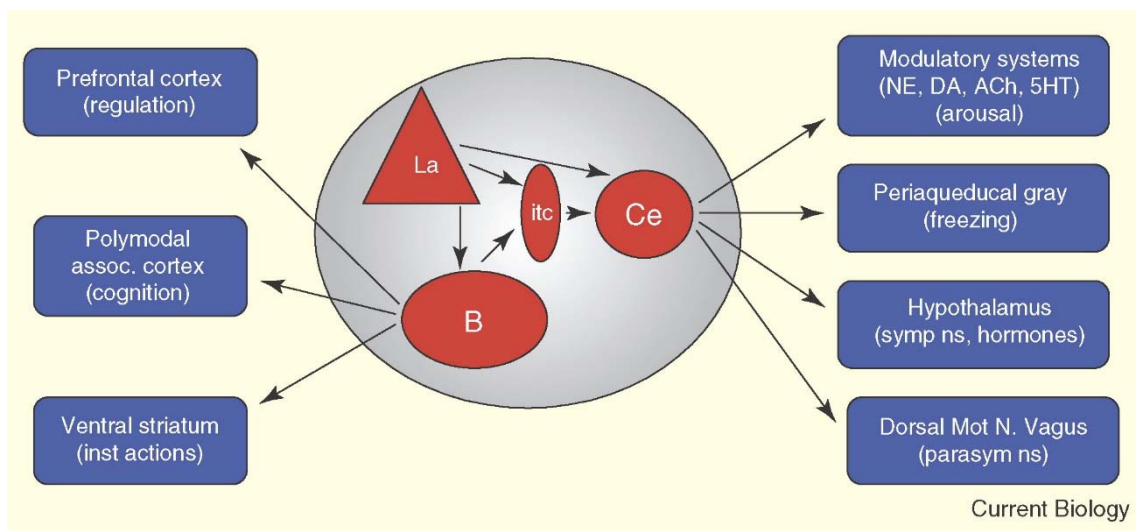


Abbildung 4: Zielstrukturen der Amygdala (aus LeDoux, 2007): Abkürzungen der Amygdala-Areale: B, Basalkern; Ce, zentraler Kern; itc, interkalierte Zellen; La, lateraler Kern. Abkürzungen des modulatorischen Erregungssystems: NE, Norepinephrin; DA, Dopamin; ACh, Acetylcholin; 5HT, Serotonin). Andere Abkürzungen: parasymp ns, parasympathisches Nervensystem; symp ns, sympathisches Nervensystem.

Bei der Verarbeitung auditiver Stimuli während einer Furchtkonditionierung stammen die Informationen über den akustischen Reiz einerseits aus dem sensorischen Kortex und andererseits aus den auditorischen, posterioren Thalamuskernen (Wotjak et al., 2013). Durch die Kombination des thalamischen und des kortikalen Weges erfolgt die

Signalvermittlung sowohl präzise als auch schnell (LeDoux, 2007). Die Informationen über das akustische Signal und über den aversiven Stimulus laufen in der lateralen Amygdala zusammen und tragen somit zur Bildung des Furchtgedächtnisses bei (Wotjak et al., 2013). Dass die Amygdala eine wichtige Rolle bei der Furchtkonditionierung spielt, zeigen verschiedene Studien an Tieren. Durch Läsionen des lateralen und zentralen Kerns wird die auditorische Furchtkonditionierung eliminiert und führt zu Defiziten in der Ausprägung von Furcht (LeDoux, 2000). Ähnliche Erkenntnisse lassen sich auch in Studien mit Bezug auf den Menschen finden (Bechara et al. 1995).

Eine weitere Gehirnstruktur, die am Fruchtlernen beteiligt ist, stellt der Hippocampus (Hip) dar. Anhand von Tierstudien wird deutlich, dass durch Läsionen im Hip Defizite im Furchtverhalten bei kontextueller Furchtkonditionierung auftreten. Dabei sind die Verhaltensänderungen vom Zeitpunkt der Läsion abhängig, d.h. je früher der Schaden nach der Konditionierung zugefügt wird, desto deutlicher ist das Abschwächen des *Freezings* zu sehen (Maren et al., 2013). Dem Hip kommt die Aufgabe zu, Informationen über die Umgebung zu speichern, in der das Lernen bzw. die Konditionierung stattgefunden hat. So werden die verschiedenen Eigenschaften eines bestimmten Kontextes - wie z.B. Geruch, Farbe, Materialbeschaffenheit - vom Hip in die BLA weitergeleitet. Hier werden diese Informationen mit dem aversiven Stimulus verknüpft (Endres, 2020; Izquierdo et al., 2016; Wotjak et al., 2013). Hierfür spielt vor allem der ventrale Hip eine wichtige Rolle, da dieser Efferenzen zur Amygdala und zum Hypothalamus besitzt. Daher führen gerade Läsionen in diesem Bereich zu einer Abnahme des Furchtverhaltens bei kontextueller Furchtkonditionierung. Im Gegensatz dazu ist der dorsale Hippocampus eher an kognitiven Aufgaben, räumlicher Orientierung und Gedächtnisbildung beteiligt (Stein et al., 2010; Fanselow & Dong, 2010; Moser et al., 1995).

An den neuronalen Schaltkreisen der Furchtextinktion sind neben den bereits erwähnten Strukturen Amygdala und Hippocampus noch weitere Hirnbereiche beteiligt. Die infralimbische (IL) Region des mPFC unterdrückt die Furchtantwort, indem inhibitorische Signale an spezielle Zellen der BLA gesendet werden (Quirk et al., 2008). Diese sogenannten Extinktionsneurone („No Fear“ - Neurone) übertragen das Signal auf die interkalierten Zellen (itc) der Amygdala. Die GABAergen Interneurone hemmen ihrerseits dann die CeA und reduzieren dadurch deren Aktivierung durch Afferenzen aus der BLA und somit auch die Furchtreaktion (Springer et al., 2010). Außerdem vermittelt

der ventrale Hip Informationen über den Extinktionskontext an die prälimbische Region des mPFC. Dort werden inhibitorische Zellen aktiviert, die daraufhin die erregenden Projektionen auf die Furchtneurone („Fear“- Neurone) in der BLA abschwächen und auf diesem Weg eine Furchtextinktion verstärken (Wotjak et al., 2013; Quirk & Mueller, 2008; Herry et al., 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl das Furchtlernen als auch die Furchtextinktion auf neuronaler Ebene komplexe Vorgänge sind und dass an diesem Furchtnetzwerk mehrere wichtige Strukturen beteiligt sind. Diese erfüllen jedoch nicht nur einzelne, solitäre Aufgaben, sondern interagieren viel mehr zusammen in Schaltkreisen und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Aktivität. Die zentrale Rolle kommt dabei der Amygdala zu, die aber ohne ihre Verbindungen zum Hip und zum mPFC allein nicht in der Lage wäre, eine angemessene, adaptive Reaktion auf einen aversiven Stimulus auszulösen bzw. wieder zu reduzieren. Moduliert wird das Furchtnetzwerk durch verschiedene Neurotransmitter wie Dopamin, Noradrenalin oder Serotonin.

2.4. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Der aus dem Gehirn stammende Wachstumsfaktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor) gehört zur Gruppe der Neurotrophine und übernimmt in vielen neurophysiologischen Prozessen eine zentrale Rolle, wie zum Beispiel bei der Steuerung von Schaltkreisen, die an den emotionalen und kognitiven Funktionen des Gehirns beteiligt sind (Cowansage et al., 2010). Zudem hat das Protein die Aufgabe das Überleben von Neuronen zu gewährleisten (Neuroprotektion) und deren Wachstum zu stimulieren, sowie synaptische Plastizität zu gewährleisten (Edelmann et al., 2014; Lessmann et al., 2003; Park & Poo, 2010). Die BDNF-Synthese findet daher vor allem in Hirnregionen statt, die für Lern- und Gedächtnisprozesse verantwortlich sind, wie zum Beispiel im Hippocampus, in der Amygdala, im Kortex oder im Vorderhirn (Phillips, 2017).

BDNF wird als Vorläuferprotein (Prä-Pro-BDNF) synthetisiert, welches im weiteren Verlauf des Transports in das endoplasmatische Retikulum durch eine Spaltung in das pro-BDNF-Protein umgewandelt wird (vgl. Leßmann und Brigadski, 2009; Brigadski und Leßmann, 2020). Dieses kann entweder im trans-Golgi-Netzwerk durch Enzyme intrazellulär proteolytisch gespalten und als reife, mature Form sezerniert werden. Oder es wird als pro-BDNF sezerniert und extrazellulär durch Proteasen wie Plasmin oder

Matrix-Metalloproteasen (MMP) prozessiert (Kowiański et al., 2018). Jedoch aktivieren pro-BDNF und das mature BDNF-Molekül nicht dieselben Signalkaskaden, sondern arbeiten vielmehr antagonistisch. Das mature BDNF gewährleistet Neuroprotektion und spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Modulation synaptischer Verbindungen durch LTP (Brigadski & Lessmann 2020). Dahingegen werden durch das pro-BDNF-Protein Prozesse wie LTD oder der apoptotische Tod von Neuronen stimuliert. Durch diese entgegengesetzten Wirkungen, die durch die verschiedenen Isoformen des Wachstumsfaktors ausgelöst werden können, ist die Aufrechterhaltung eines dynamischen Gleichgewichts zwischen stimulierenden und hemmenden Effekten auf neurophysiologische Vorgänge wie die synaptische Plastizität möglich (Brigadski und Lessmann, 2014).

Es sind einige Erkrankungen bekannt, die durch eine Dysregulation der BDNF-Konzentration herbeigeführt werden. So ist ein Zusammenhang zwischen reduzierten BDNF-Gehalten und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer bekannt, was sich unter anderem durch eine Hippocampus-Atrophie und eine Abnahme der Gedächtnisleistung bei verringerter BDNF-Expression zeigt (Shen et al., 2018; Psotta et al., 2015; Laske et al., 2006; Franzmeier, 2021). Bei Parkinson-Patienten liegt im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant verringerte BDNF-mRNA-Expression in der Substantia nigra pars compacta vor. Dies könnte möglicherweise auf den Verlust von Neuronen in diesem Kernkomplex zurückzuführen sein, da diese BDNF spezifisch exprimieren können (vgl. **Abb. 5**). Hier lässt sich eine Erhöhung der BDNF-Expression nach medikamentöser Behandlung - beispielsweise mit Levodopa – erreichen, da hierdurch degenerierende Dopamin-Neuronen gerettet werden (Jiang et al., 2019).

Aber auch bei verschiedenen psychischen Erkrankungen wie Depression oder Schizophrenie wurde eine erniedrigte BDNF-Konzentration im Blutserum festgestellt, die nach einer Behandlung mit Antidepressiva wieder ansteigen kann (Björkholm, 2016). Die verminderte BDNF-Synthese und das damit einhergehende erhöhte Risiko an einer dieser Krankheiten zu erkranken könnte auf einen Polymorphismus im BDNF-Gen, bei dem die Aminosäure Valin gegen Methionin ausgetauscht wird (Val66Met-Polymorphismus), zurückzuführen sein (Egan et al., 2003). Dadurch kommt es zu einer Modulation der Neurotransmission und gehirnstrukturellen Veränderungen, die für die Entwicklung von neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen verantwortlich sind (Brigadski und Lessmann, 2014; Franzmeier, 2021).

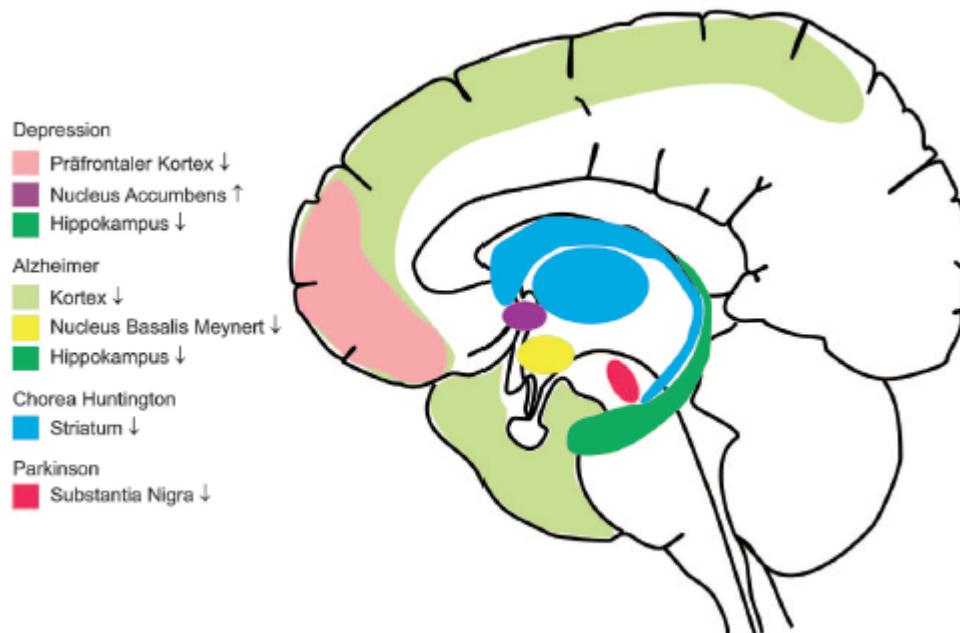


Abbildung 5: Veränderte BDNF-Expression bei neurodegenerativen und psychischen Erkrankungen (aus Brigadski und Lessmann, 2014): Die Pfeile markieren einen Mangel bzw. einen Überschuss an BDNF in den entsprechenden Gehirnarealen.

Die Beteiligung dieses Wachstumsfaktors bei verschiedenen Erkrankungen des ZNS macht dieses Neurotrophin zu einem vielversprechenden therapeutischen Ziel (Edelmann et al., 2014; Lessmann et al., 2003; Mohammadi et al., 2018). Daher ist die Suche nach neuen Substanzen, die die BDNF/TrkB-Signalgebung positiv modulieren können, von hohem Interesse in der translationalen Forschung (Andero & Ressler 2012; Colucci-D'Amato 2020). In der Literatur finden sich Studien, die über die Wirkung von *Cognitive enhancern* wie Koffein auf die BDNF-Expression berichten. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der BDNF-Proteinkonzentration durch vermehrte Expression und Freisetzung von BDNF im Hippocampus von Mäusen nach Behandlung mit Koffein. Die Tiere schnitten im Vergleich zur Kontrollgruppe im Objektwiedererkennungstest besser ab und zeigten im Schwimmlabyrinth nach Morris eine bessere Gedächtnisleistung. Es werden aber auch Pflanzenextrakte wie *Ginkgo biloba* oder *Rhodiola rosea* in Bezug auf eine positive Modulation von BDNF diskutiert. Der Wirkstoff *Salidroside* der *Rhodiola*-Wurzel sowie *Ginkgo biloba*-Blattextrakte führten in verschiedenen Untersuchungen zu einem signifikanten Anstieg an BDNF, vor allem im Hippocampus (Belviranli et al., 2015; Chen et al., 2008; Chen et al., 2020; Yang et al., 2014; Zhu et al., 2015).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Modulation der BDNF/TrkB-Signalgebung durch verschiedenste Substanzen pflanzlichen Ursprungs, bzw. deren Derivate, ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von ZNS-Erkrankungen zu sein scheint (Sangiovanni et al. 2017).

2.5. c-fos Protein

Als „*Immediate early genes*“ (IEG) werden Gene bezeichnet, die nach Stimulation einer Zelle durch Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren oder elektrischer Erregung innerhalb von wenigen Minuten transkribiert werden. Bereits kurze Zeit nach der Stimulation endet die Transkription dieser Gene, sie ist also nur vorübergehend. IEGs dienen als indirekte Marker zur Messung von neuronaler Aktivität und plastischen Veränderungen bei der Langzeitgedächtnisbildung. Am häufigsten verwendet werden dabei Proteine wie Egr-1, Arc oder c-fos (Gallo et al., 2018; Solomonia und McCabe, 2015). In dieser Arbeit sollen mögliche Veränderungen der c-fos-Expression nach Applikation der Substanz 843 und nachfolgender Furchtkonditionierung untersucht werden.

Das c-fos-Protein wird durch Aktivierung des CREB / CRE-Komplexes durch cAMP und Kalzium exprimiert und bildet mit anderen Proteinen, darunter die c-Jun-Gruppe, den Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1). Dieser bindet als Dimer an die DNA und leitet so die Transkription bestimmter Gene ein, die vor allem die Zellteilung und -differenzierung sowie die Apoptose regulieren (Yeh und Parekh, 2018). Die Aktivität des c-fos-Gens ist besonders gut für Studien geeignet, die sich mit Veränderungen der neuronalen Aktivität in Verbindung mit Lernen und Gedächtnis beschäftigen, da das c-fos-Protein ein niedriges Aktivitätsniveau aufweist, nach einer Intervention rasch ansteigt und dann wieder auf den Ausgangswert absinkt. Durch dieses zeitliche Expressionsprofil wird auch die Autoregulation dieses IEGs deutlich (Kinnavaneet al., 2015).

2.6. Fragestellung der Arbeit

Aufbauend auf den unter 2.2.1 beschriebenen positiven Wirkungen von Extrakten der Pflanze *Rhodiola rosea*, wurden diese genauer untersucht und mehrere effektive Wirkstoffe darin identifiziert. Eines dieser Moleküle ist der Ferulasäureester, der eine

gedächtnissteigernde Wirkung in der Fruchtfliege, der Honigbiene, sowie im Mausmodell aufwies (Michels et al. 2018). Ausgehend von diesem Ferulasäureester wurden am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle neue synthetische Derivate entwickelt, die möglicherweise eine höhere Effizienz besitzen, als der Ferulasäureester. In der Arbeitsgruppe von Prof. Gerber am Leibniz-Institut für Neurobiologie (Magdeburg) wurden die verschiedenen Derivate bereits bei Fruchtfliegenlarven auf ihre gedächtnissteigernde Wirkung hin getestet, wobei sich die Substanz 843 als am vielversprechendsten erwies. Da allerdings unklar ist, ob diese Substanz bei Säugetieren eine ähnliche Wirkung erzielen kann, sollte nun deren Auswirkung auf das Lernen und die Gedächtnisbildung im Mausmodell von uns untersucht werden. Zu diesem Zweck haben wir das Furchtlernen bei Mäusen des Stammes C57BL/6J anhand kontextueller Furchtkonditionierung, sowie die Extinktion von signalvermittelter Furcht untersucht. Außerdem wurden auf zellulärer Ebene mögliche Effekte der Substanz 843 auf die neuronale Aktivität sowie die Expressionsrate von BDNF auf Proteinebene untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden männliche Mäuse des Wildtypstammes C57BL/6J eingesetzt. Dieser Stamm ist der genetisch am besten beschriebene und der am weitesten verbreitete Labormausstamm (Mekade et al., 2009). Vor allem der J-Sub-Stamm zeigt gegenüber anderen Sub-Stämmen eine bessere Lernfähigkeit (Bryant et al., 2008). Alle Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Testung zwischen 12 und 16 Wochen alt und 24 bis 32 Gramm schwer. Die Mäuse wurden im Tierlabor des Instituts für Physiologie der Medizinischen Fakultät Magdeburg gezüchtet (Ursprung der Elterntiere: Charles River, Sulzfeld).

Die Versuchstiere wurden in Standardkäfigen Typ II (25,7 cm x 16,2 cm x 14 cm) à zwei bis vier Tiere mit einem Häuschen und Nestbaumaterial gehalten. Wasser und artgerechtes Futter standen ad libitum zur Verfügung. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 h hell / 12 h dunkel, wobei die helle Phase von 7 Uhr bis 19 Uhr andauerte. Alle Versuche wurden in der Lichtphase zwischen 8 und 18 Uhr durchgeführt. Die Lichtintensität, die Raumtemperatur und die relative Luftfeuchtigkeit wurden konstant gehalten. Die Injektionen wurden in einem separaten, dafür vorgesehenen Raum verabreicht. Vor jedem Experiment wurden die Versuchstiere in den Experimentalraum transportiert.

Die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Tierexperimente wurde nach den Richtlinien der EU-Direktive 2010/63/EU durchgeführt und vom Landesverwaltungsamts Sachsen-Anhalt unter dem Aktenzeichen 42502-2-1191 UniMD genehmigt.

3.2. Konditionierungsapparatur

Die Apparatur, die für die Furchtkonditionierungs- und Extinktionsversuche benutzt wurde, befand sich in einer großen schallgedämpften Kammer (vgl. **Abb. 6**). Diese beinhaltete zwei weitere kleinere Kammern, die identisch aufgebaut waren und die Messung zweier Tiere parallel ermöglichte. Am Boden befanden sich jeweils Bodengitter, durch die elektrische Reize verabreicht werden konnten.

Infrarotlichtschranken, die über den Gitterstäben angebracht waren, detektierten die Bewegungen der Mäuse. Um den Kontext zu variieren, war es möglich das Gitter durch eine schwarze Bodenplatte zu ersetzen. Ebenso konnte zwischen hellen und dunklen Boxen aus Plexiglas variiert werden, die auf das Bodengitter gestellt wurden. Des Weiteren konnte die Lichtintensität in den Kammern modifiziert werden oder durch einen Ventilator ein Hintergrundrauschen erzeugt werden. Außerdem wurden die Boxen und der Kammerboden durch verschiedene Reinigungsmittel (Descosept¹ und 70%-iges Ethanol²) gesäubert, um unterschiedliche olfaktorische Stimuli als eine Kontexteigenschaft zu liefern. Die verwendete Software zur Datenanalyse („*fear conditioning system*“) des Verhaltens stammt - wie die Apparatur - von TSE-Systems³.



Abbildung 6: Konditionierungsapparatur zur Untersuchung des kontextuellen Furchtlernens, sowie des Extinktionslernens von signalvermittelter Furcht.

¹ Descosept AF; Dr. Schumacher GmbH Malsfeld, Deutschland

² Ethanol 70% verdünnt aus Ethanol 97%; Otto Fischar GmbH & Co. KG Deutschland

³ TSE fear conditioning system; Version 09.02; TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland

3.3. Signalvermitteltes Furchtextinktionslernen

Für das signalvermittelte Furchtextinktionslernen wurde ein drei Tage andauerndes Versuchsprotokoll angewendet. Am ersten Tag fand die Konditionierung in einem bestimmten Kontext A statt. Dieser beinhaltete eine helle Box aus Plexiglas, Bodengitter, Licht der Intensität 10 Lux, ein Hintergrundrauschen (erzeugt durch einen Ventilator) und 70%iges Ethanol als Reinigungsmittel und Duftstoff. Der Versuchsablauf gliederte sich in eine zweiminütige Habituationsphase, in der keine Stimuli präsentiert wurden. Darauf folgte fünfmal das gepaarte Auftreten eines Sinustones mit einem Fußschock. Der 8 kHz-Sinuston diente als konditionierter Stimulus (CS) und hatte eine Intensität von 80 dB SPL. Am Ende des 30 Sekunden langen Tons wurde ein elektrischer Fußschock verabreicht. Dieser eine Sekunde andauernde pulsierende Fußschock hatte eine Stärke von 0,4 mA und diente als unkonditionierter Stimulus (US). Zwischen den Tönen lag jeweils ein 60 - 120 Sekunden langes tonfreies Intervall. Die Tiere wurden eineinhalb Minuten nachdem das letzte Mal der CS präsentiert wurde aus dem Konditionierungsapparat genommen.

Am zweiten Tag wurden zuerst die Injektionen i.p. verabreicht (vgl. Kapitel 3.9) und anschließend nach 30-minütiger Wartezeit das Extinktionstraining mit den Versuchstieren durchgeführt. Um lediglich die Furcht auf den Tonreiz ohne kontextuelle Furchtkomponenten zu untersuchen, wurde hierfür der Kontext B angewendet, der folgende Bestandteile enthielt: eine dunkle Plexiglasbox, eine Bodenplatte auf den Gitterstäben und schwächeres Licht. Außerdem wurde der Ventilator und somit das Hintergrundgeräusch ausgeschaltet und Descosept zur Reinigung benutzt. Um eine Extinktion des Furchtgedächtnisses zu erreichen wurde 30-mal nach der zweiminütigen Habituationsphase ein 30 Sekunden dauernder Ton präsentiert (CS), dieses Mal ohne gleichzeitiges Auftreten eines Fußschocks. Zwischen den einzelnen Tonpräsentationen lagen jeweils fünf Sekunden lange geräuschfreie Intervalle.

An Tag 3 wurde 24 h nach dem Extinktionstraining das Extinktionsgedächtnis in demselben Kontext wie am vorigen Tag getestet (Kontext B). Hierfür wurde fünfmal der CS (30 s) abgespielt und zwischen jedem Ton befand sich ein zweiminütiges Stimulus-freies Intervall.

3.4. Kontextuelles Furchtlernen

Um das kontextuelle Furchtlernen zu untersuchen, wurde bei dieser Konditionierung der Fokus auf den Kontext als zu lernender Stimulus gelegt, d.h. es wurden keine diskreten Reize als zu lernende Stimuli dargeboten. Wie bereits bei der signalvermittelten Furchtkonditionierung (vgl. Kapitel 3.3) erwähnt, konnte die Versuchsumgebung für die Tiere optisch modifiziert werden, indem helle oder dunkle Boxen aus Plexiglas eingesetzt wurden oder die Lichtintensität in den Kammern verändert wurde. Akustische Unterschiede wurden durch das Ein- oder Ausschalten des Ventilators erzielt. Zudem war es auch möglich in dem Versuchsprotokoll des *TSE fear conditioning system* ein Hintergrundrauschen (50 dB weißes Rauschen) zu integrieren. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Reinigungsmitteln und dem Einlegen einer Bodenplatte statt dem Bodengitter konnte der Kontext weiter variiert werden (vgl. Kapitel 3.3). An Tag 1 wurden die Mäuse in einem festgelegten Kontext A konditioniert. Die Injektion der jeweiligen Substanzen (vgl. Kapitel 3.9) erfolgte 30 Minuten vor Beginn des Experiments. Nach einer Habituationsphase von zwei Minuten wurde der erste elektrische Fußreiz (pulsierend) verabreicht, dessen Stromstärke 0,4 mA betrug. Nach eineinhalb Minuten erfolgte der zweite Fußschock, nach weiteren vier Minuten der letzte Fußschock. Anschließend verblieben die Tiere noch für zweieinhalb Minuten in der Apparatur, bevor sie wieder in ihre Käfige gebracht wurden.

Der zweite Tag gliederte sich in zwei Abschnitte. Anfangs wurden die Mäuse in einen bestimmten neutralen Kontext B gesetzt, dem sie zuvor noch nicht ausgesetzt waren. Nach fünf Minuten in diesem neuen neutralen Kontext wurden die Tiere wieder für eine Stunde in ihre Heimatkäfige gesetzt. Dieser Test diente dazu die Spezifität des Furchtgedächtnisses zu überprüfen. Im zweiten Teil wurden die Versuchstiere für 15 Minuten in die gleiche Umgebung wie bei der Konditionierung (Kontext A) gesetzt, mit dem Unterschied, dass dieses Mal die elektrischen Fußreize ausblieben. Es wurde das Verhalten der Mäuse, vor allem das *Freezing*, automatisch erfasst und anschließend ausgewertet.

Am dritten und letzten Tag befanden sich die Tiere für 10 Minuten wieder im Kontext A, um die Extinktion des Furchtgedächtnisses 48 h nach der Injektion beurteilen zu können.

3.5. Offenfeld-Test

Für die Offenfeld-Experimente wurde eine quadratische Arena mit den Maßen 50 cm x 50 cm x 30 cm verwendet (vgl. **Abb. 7**). Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden die Versuchstiere in eine 843-Versuchs- und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Anschließend wurde jedem Tier jeweils 30 Minuten vor Versuchsbeginn eine intraperitoneale Injektion mit der Substanz 843 bzw. Kontrolllösung verabreicht. Während den Experimenten wurde die Arena mit geringer Lichtintensität (ca. 80 Lux) beleuchtet. Eine Kamera zur Videoüberwachung während der Versuche wurde über der Arena installiert und mittels der Software AnyMaze (Stoelting Co.) wurde das Explorationsverhalten der Tiere aufgezeichnet und ausgewertet. Um für die Tiere möglicherweise irritierende Gerüche zu beseitigen, wurde die Arena vor jedem neuen Testdurchlauf mit 70%igem Ethanol gründlich gereinigt. Danach wurde jeweils eine Maus in die Mitte der Arena gesetzt und konnte für 10 Minuten die Arena erkunden. Ausgewertet wurden die zurückgelegte Strecke der Tiere als Maß für das Explorationsverhalten. Zudem wurde die Aufenthaltszeit in einer virtuellen Zentrumszone in der Mitte der Arena (50% der Fläche) analysiert, um zusätzlich Rückschlüsse auf das Angstverhalten der Tiere ziehen zu können. Je mehr Zeit die Tiere sich in dieser Zentrumszone aufhalten, desto weniger ängstlich sind sie (Himanshu et al., 2020).

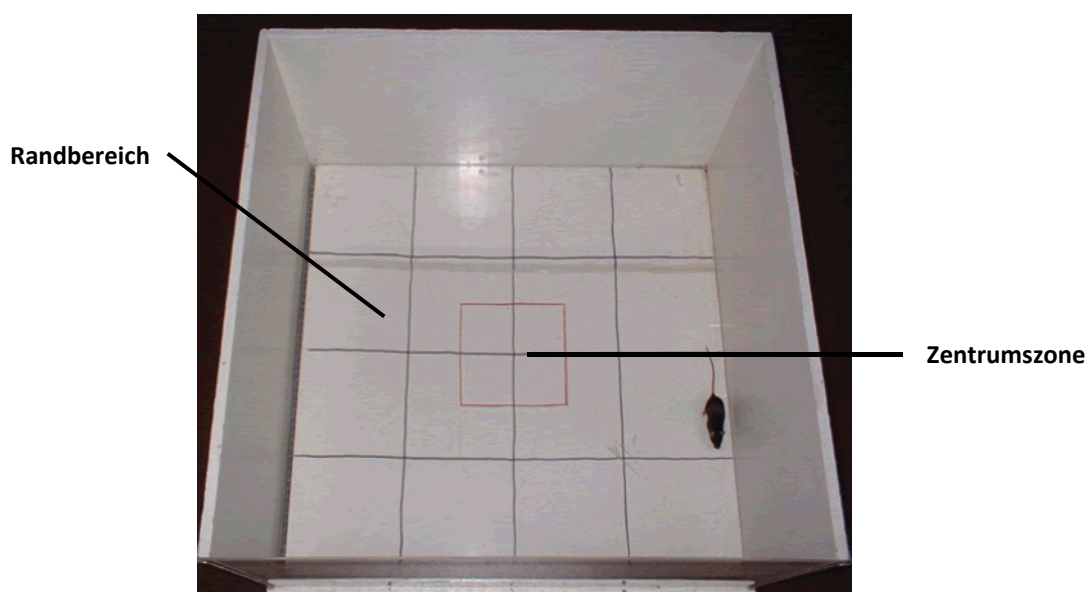


Abbildung 7: Offenfeld-Arena zur Untersuchung des spontanen Explorationsverhaltens (aus Adenowo et al., 2018).

3.6. Erhöhtes Pluslabyrinth

Das Erhöhte Pluslabyrinth (EPM) ist ein weit verbreiteter Test, um den Angstzustand bei Nagetieren zu untersuchen (Campos et al., 2013). Es besteht aus zwei geschlossenen Armen, zwei offenen Armen und einem Zentrum (vgl. **Abb. 8**) und befindet sich ca. 90 cm über dem Boden. Zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen wurde auch hier eine Reinigung mit 70%igem Ethanol vorgenommen. Jedem Tier wurde eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn entweder die Substanz oder die Kontrolllösung injiziert. Dann wurde es zunächst in die Mitte der Apparatur gesetzt und konnte sich frei bewegen und das gesamte Labyrinth für fünf Minuten erkunden. Das Verhalten wurde für die spätere Analyse mit *AnyMaze* über eine Videokamera aufgenommen, die über dem EPM angebracht war. Anschließend wurden die durchschnittlich zurückgelegte Strecke, die Aufenthaltszeit in den verschiedenen Zonen und die Anzahl der Eintritte in die unterschiedlichen Bereiche als Messparameter ausgewertet.

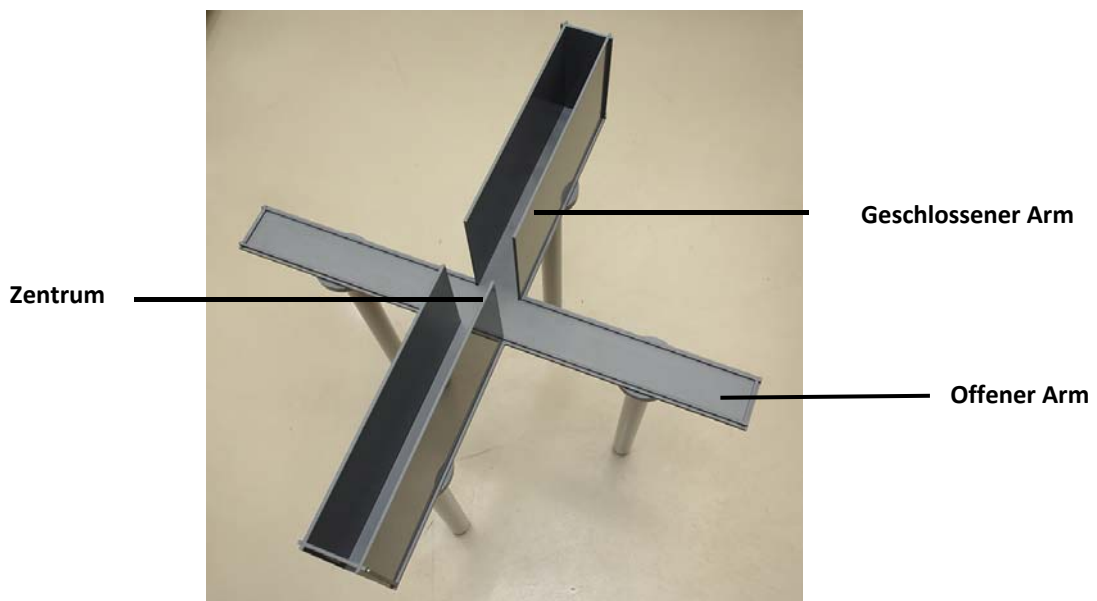


Abbildung 8: Erhöhtes Pluslabyrinth zur Untersuchung des Angstverhaltens der Tiere (aus: Elevated Plus Maze - Fraunhofer IZI).

3.7. Gehirnpräparation und c-fos Färbung

c-fos ist ein immediate early gene-Protein, das bei wiederholter elektrischer Aktivität von Nervenzellen stark in seiner Expression erhöht wird. Zur Analyse, ob die neuronale Aktivität durch 843-Applikation eine deutliche Veränderung aufweist, wurde in diesem Versuchsteil die neuronale Aktivität im Hippocampus über die immunhistochemische Anfärbung des c-fos Proteins untersucht (vgl. Kapitel 2.5). Die Versuchstiere wurden auch hier in eine 843-Versuchs- und eine Kontrollgruppe unterteilt. Entsprechend dem Gewicht wurde entweder die Substanz 843 oder Kontrolllösung verabreicht. Eine halbe Stunde später fand die kontextuelle Furchtkonditionierung wie in Kapitel 3.4 beschrieben statt. Anschließend wurden die Tiere 90 Minuten nach der Konditionierung durch die intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid⁴ und 7 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid⁵ narkotisiert. Um die transkardiale Perfusion durchzuführen, wurde das Herz freigelegt und dann durch Spülung mit eisgekühlter 0,9% NaCl-Lösung das Blut aus dem gesamten Kreislauf entfernt. Nach vier bis fünf Minuten wurde die Perfusion beendet und eine Dekapitation durchgeführt, um das Gehirn aus dem Schädel frei zu präparieren. Dieses wurde in einem Gläschen mit 4% PFA für 24 h aufbewahrt, um das Gewebe vollständig für die weiteren Färbeschritte zu fixieren.

Mit einem Gefriermikrotom wurden 40 µm dicke, frei flotierende Schnitte der dorsalen Hippocampusregion angefertigt. Insgesamt erstellten wir jeweils 12 Schnitte mit beiden Hirnhemisphären pro Tier. Anschließend wurden diese auf Objektträger aufgezogen und nach folgendem Protokoll gefärbt:

- Einbettung für 3 x 10 Minuten in PBS (pH 7,4; 0,12M: 14,03 g NaCl; 2,76 g NaH₂PO₄xH₂O; 10,88 g K₂HPO₄; 2 l Aqua dest.)⁶ + 0,3% Triton
- 1 Stunde Vorinkubation bei Raumtemperatur in 10% Donkey normal Serum (DknS) in PBS + 2% BSA + 0,3% Triton
- Primärantikörper (polyclonaler rabbit Antikörper, Synaptic Systems, Katalog-Nr.: 226003) über 2 Nächte bei 4°C im Kühlschrank (Verdünnung 1:1000) + 10% DknS in PBS + 2% BSA + 0,3% Triton (Negativ-Kontrollen)
- Einbettung für 3 x 10 Minuten in PBS
- 2 Stunden Sekundärantikörper (Alexa 555 DkARb) bei Raumtemperatur in PBS + 0,2% Triton (Verdünnung 1:500)
- Einbettung für 3 x 10 Minuten in PBS, danach kurz Aqua dest.
- 40 µm dicke Kryoschnitte auf Objektträger ziehen und kurz trocknen lassen
- Mit Immumount eindeckeln

⁴ Ketaminhydrochlorid: Ketaset, Zoetis, Deutschland

⁵ Xylazinhydrochlorid: Rompun, Bayer, Deutschland

⁶ Alle Substanzen von Merck, Deutschland

3.8. BDNF- ELISA

Um mögliche Effekte der Substanz 843 auf die BDNF-Synthese festzustellen, wurde das antikörperbasierte Nachweisverfahren ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) angewandt. Hierfür wurden die Versuchstiere zunächst in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei die Gehirnpräparation bei der ersten Gruppe (n = 8) 45 Minuten nach der Injektion durchgeführt wurde. Bei der zweiten Gruppe (n = 8) hatte die Substanz eine Wirkzeit von 90 Minuten, bevor die Gehirne entnommen wurden. Nach Applikation der Substanz bzw. der Kontrolle wurden die Tiere nach entsprechender Zeit mit ca. 1 ml Isofluran⁷ anästhetisiert. Dazu wurde das Narkosemittel auf ein Papiertuch auf dem Boden eines Vakuum-Exsikkators pipettiert. Nach Einsetzen der Narkose wurde eine Dekapitation durchgeführt und das Gehirn aus dem Schädel frei präpariert. In einer Petrischale mit ACSF wurde das Gehirn so präpariert, dass am Ende folgende Proben zur Verfügung standen: frontaler Kortex, Hippocampus und parietaler Kortex. Alle Proben wurden jeweils in eigenen Mikroreaktionsgefäßen aufgefangen, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C für die weiteren Untersuchungen gelagert.

Da die alleinige Applikation von 843 zu keiner Erhöhung der BDNF-Proteinkonzentration führte, sollte in einer weiteren Testgruppe untersucht werden, ob durch 843 die durch einen Lernprozess induzierte BDNF-Synthese zusätzlich gesteigert werden kann. Hierzu wurde ein weiterer Versuchsdurchgang mit insgesamt 8 Tieren durchgeführt. Dazu fand 30 Minuten nach der Injektion der Substanz bzw. der Kontrolle ein Lerntest in der Konditionierungsapparatur statt (kontextuelles Furchtlernen, wie unter 3.4 beschrieben). 45 Minuten nach der Konditionierung wurden die Gehirne wie oben beschrieben nach transkardialer Perfusion präpariert.

Die Bestimmung der BDNF-Proteinspiegel wurde mit einem sensitiven ELISA-Set (Quantikine free BDNF, R&D Systems) durchgeführt. Die Aufarbeitung der Proben und die nachfolgende Messung erfolgten genau nach den Angaben des Herstellers.

⁷ Isofluran: Isofluran CP, CP-Pharma, Deutschland

3.9. Substanzen und Substanzapplikation

Die Injektionen wurden jeweils eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn verabreicht, damit die Substanz ausreichend Zeit hatte sich gleichmäßig im Körper zu verteilen. Die Injektionen wurden alle in einen separaten Raum durchgeführt. Für die Injektion wurden 16,35 mg der Substanz 843 in 1 ml 99%igen Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde vor Gebrauch mit 0,9%iger NaCl-Lösung in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Als Kontrolle diente eine 1:10 Mischung bestehend aus 99%igem Ethanol und 0,9%iger NaCl-Lösung. Die Tiere wurden jeweils in eine 843-Versuchsgruppe und eine Kontrollgruppe unterteilt und dann gewogen, um die Menge der benötigten Substanz zu berechnen. Da 3 ml pro kg Körpergewicht verabreicht wurden und die Tiere zwischen 24 und 32 Gramm schwer waren, lag das Injektionsvolumen für die Tiere zwischen 0,07 und 0,1 ml. Die Substanz bzw. die Kontrolllösung wurden intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Substanz 843 wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Gerber, Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg (LIN), zur Verfügung gestellt.

3.10. Datenanalyse und Statistik

Für die Datenerhebung der Furchtkonditionierungs-/ Furchtextinktionsexperimente wurde das *TSE fear conditioning system* benutzt, welches es ermöglichte das Verhalten der Versuchstiere aufzunehmen und verhaltensspezifische Daten wie zurückgelegte Strecke, Sprünge oder aufgerichtete Körperhaltung und die Dauer des *Freezing*-Verhaltens (Anteil an der gesamten Messzeit) zu analysieren. Dabei hatte Letzteres in diesen Experimenten die größte Relevanz als primärer Parameter für das Furchtverhalten. Für die Detektion von *Freezing*-Verhalten wurde eine Schwelle von mindestens 4 Sekunden Immobilität eingestellt. Das Programm *ANY-maze*⁸ wurde verwendet, um bei den Offenfeld und EPM Experimenten die für die Verhaltensanalyse notwendigen Daten aufzuzeichnen und zu analysieren. Für die weitere Datenanalyse diente Microsoft Excel⁹. Die Software JMP¹⁰ wurde für die statistische Datenanalyse genutzt. Die Varianzanalyse ANOVA (*Analysis of variance*) gefolgt von einem Fisher LSD post-hoc-Test wurden als statistisches Verfahren angewandt. Immer wenn Messwiederholungen vorlagen, wurde

⁸ ANY-maze 6.3: Stoelting Co., Dublin, Irland

⁹ Microsoft Excel: Microsoft Office 365; Version: 16.0.11126.20234 (32-Bit)

¹⁰ JMP: 8.0.2; SAS Institute Inc. 2009

eine „repeated measures“ ANOVA angewendet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikanter Unterschied angesehen.

Um die Daten des Experiments zur Untersuchung des c-fos Proteins auszuwerten, wurden die Schnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB, 301-371.01¹¹) betrachtet und zunächst mit der Kamera Spot Insight 2 (Modell 18.0)¹² und dem Programm Spot¹³ Fotos der zu analysierenden Hippocampus-Regionen auf den Schnittpräparaten gemacht. Anschließend wurden mit Hilfe der Software Image J¹⁴ die c-fos exprimierenden Zellen über ein selbsterstelltes Makro automatisch gezählt und ausgegeben. Hierzu wurden mit Hilfe eines Gehirnatlanten¹⁵ jeweils die kompletten Zellkörperschichten der jeweiligen Sub-Regionen (CA1, CA3, DG) als Analysebereich markiert. Die automatische Zählung wurde so kalibriert, dass sie sehr gut mit stichprobenartigen manuellen Zählungen korrelierte ($r = 0,93$; $p > 0,001$; $n = 100$). Pro Tier wurden 12 Schnitte des dorsalen Hippocampus (jeweils beide Hemisphären) ausgezählt und pro Tier für jede Sub-Region ein Mittelwert gebildet. Alle Diagramme in dieser Arbeit wurden mit dem Programm GraphPad Prism¹⁶ erstellt und bearbeitet.

¹¹ Leica Mikroskope & Systeme GmbH, Wetzlar

¹² Visitron Systems GmbH, Puchheim

¹³ Spot: Version 5.2, Visitron Systems GmbH, Puchheim

¹⁴ Image J: Version 1.52v (April 2020)

¹⁵ The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Franklin and Paxinos, 3. Auflage (2008)

¹⁶ GraphPad Prism: Version 9.0

4. Ergebnisse

4.1. Signalvermitteltes Furchtextinktionslernen

Um das signalvermittelte Furchtextinktionslernen zu untersuchen, wurde ein drei Tage andauerndes Versuchsparadigma durchgeführt. Am ersten Tag fand die Furchtkonditionierung in einem bestimmten festgelegten Kontext A statt. In **Abbildung 9** ist zu sehen, dass das *Freezing*-Verhalten sowohl in der 843-Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe erst nach der zweiten Präsentation des Tons (CS) und des elektrischen Fußschocks (US) anzusteigen begann, sodass der *Freezing*-Wert für die 843-Versuchsgruppe bei $9,7 \pm 3,8\%$ und für die Kontrollgruppe bei $9,7 \pm 4,0\%$ lag, als der Ton das zweite Mal präsentiert wurde. Bei der dritten Paarung von CS und US stieg der Wert auf $28,4 \pm 6,2\%$ für die 843-Versuchsgruppe und für die Kontrollgruppe auf $28,1 \pm 7,2\%$ an. Beim letzten Ertönen lag der Wert für die Kontrolltiere bei $40,1 \pm 7,4\%$ und für die 843-Gruppe bei $37,2 \pm 6,1\%$ der Zeit. Zwischen den Stimulus-Präsentationen sank das *Freezing*-Verhalten bei beiden Gruppen ab dem zweiten Mal immer wieder ab. Eine ANOVA ergab erwartungsgemäß keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der 843-Versuchsgruppe hinsichtlich des *Freezing* ($F_{1,644} = 0,0$; $p = 1,00$). Dies war eine wichtige Voraussetzung für die an Tag 2 durchgeführte Untersuchung zu den Auswirkungen einer akuten Applikation von 843 auf das Extinktionslernen.

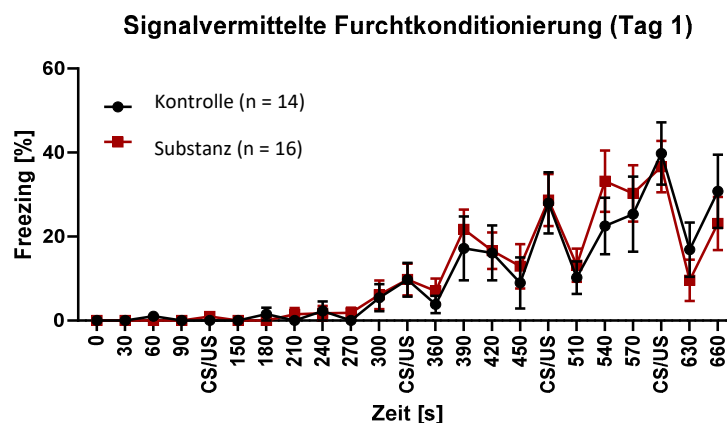


Abbildung 9: Signalvermittelte Furchtkonditionierung an Tag 1: Zwischen den beiden Gruppen ergab sich erwartungsgemäß kein Unterschied im *Freezing*-Verhalten, was eine wichtige Voraussetzung für die am nächsten Tag durchgeführte Untersuchung zu dem Einfluss von 843 auf das Extinktionslernen war. Das *Freezing* ist auf der Abszisse für den jeweils vorangegangenen 30 Sekunden - Zeitraum als Prozentanteil der Zeit dargestellt. Dargestellt sind MW \pm SEM.

Am zweiten Tag wurden die Tiere dann mit der Substanz 843 bzw. nur dem Lösungsmittel behandelt. 30 Minuten danach fand das Extinktionstraining auf den CS statt, für welches ein neuer Kontext verwendet wurde (Kontext B), um eine kontextuell bedingte Furchtreaktion auszuschließen. Dazu wurde nach einer Habituationsphase von zwei Minuten 30-mal der CS 30 Sekunden lang präsentiert. Ein fünf Sekunden langes geräuschfreies Intervall lag jeweils zwischen den einzelnen Tonpräsentationen. Um die Darstellung im Diagramm A in **Abbildung 10** übersichtlicher zu gestalten, wurde jeweils aus drei CS-Präsentationen die *Freezing*-Werte gemittelt. Dieses Paradigma erwies sich in früheren Studien als sehr effektiv, um Extinktionslernen bei Mäusen zu induzieren (Psotta et al., 2013; Whittle et al., 2010). Zu Beginn lag der *Freezing*-Wert für CS 1-3 in der 843-Versuchsgruppe bei $58 \pm 3,7\%$ und in der Kontrollgruppe bei $65,9 \pm 5,0\%$. Gegen Ende der Testphase sanken diese anfänglich hohen Werte auf $32,7 \pm 6,7\%$ für die mit Substanz behandelten Tiere und $38,9 \pm 6,6\%$ für die Kontrolltiere, die 10% Ethanol in Wasser injiziert bekamen. Im Allgemeinen ist in beiden Gruppen eine Extinktion zu beobachten, jedoch fällt ein leichter Anstieg der gemessenen Werte ab CS 16-18 auf, welcher möglicherweise auf einer spontanen Inaktivität der Tiere beruht. Da das Messsystem nicht zwischen *Freezing*-Verhalten und Immobilität der Tiere unterscheiden kann, können so folglich falsch-positive *Freezing*-Werte entstehen, welche vermutlich den beobachteten Anstieg in beiden Gruppen erklären könnte. Dennoch zeigten beide Gruppen ein generell erfolgreiches Extinktionslernen (Faktor CS-Präsentation: $F_{9,280} = 9,6$; $p < 0,0001$). Fisher-LSD post-hoc Vergleiche zeigten in beiden Gruppen signifikante Unterschiede zwischen den CS-Präsentationen 1-3 und 28-30. Jedoch ergab sich weder ein signifikanter Haupteffekt für den Faktor Behandlung noch eine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung x CS-Präsentation (F 's $\leq 1,2$; p 's $\geq 0,3$), was darauf hindeutet, dass die 843-Applikation vor dem Extinktionstraining nicht in der Lage war, die Akquisition des Furchtextinktionsgedächtnisses zu verbessern.

An Tag drei des Experiments wurde das Extinktionsgedächtnis der Tiere im selben Kontext, in dem das Extinktionstraining stattfand (Kontext B), getestet. Dazu wurde fünfmal jeweils 30 Sekunden lang der CS präsentiert. Nach jedem Ton folgte jeweils ein zweiminütiges Stimulus-freies Intervall. In **Abbildung 10** sind in Diagramm B die *Freezing*-Werte der beiden Gruppen (Kontrollgruppe: $21,4 \pm 4,4\%$, Versuchsgruppe $19,9 \pm 4,4\%$) über alle fünf Tonpräsentationen gemittelt dargestellt. Die *Freezing*-Werte sind im Vergleich zum Beginn des Extinktionstrainings am Vortag signifikant gesunken.

Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($F_{1,812} = 0,02$; $p = 0,8918$).

Zusammenfassend beobachteten wir in diesem Experiment, dass sich die *Freezing*-Werte beider Gruppen bei der signalvermittelten Furchtkonditionierung nach der Substanzapplikation nicht signifikant voneinander unterschieden. Während des Extinktionstrainings war zwar sowohl in der 843-Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe eine Extinktion zu beobachten, jedoch weisen die Werte zwischen beiden Gruppen keine signifikante Differenz auf. Auch am dritten Tag, an dem das Extinktionsgedächtnis untersucht wurde, ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Somit zeigten beide Gruppen eine erfolgreiche Extinktion von konditionierter Furcht, jedoch konnte dieser Lernprozess durch 843-Gabe nicht verbessert werden.

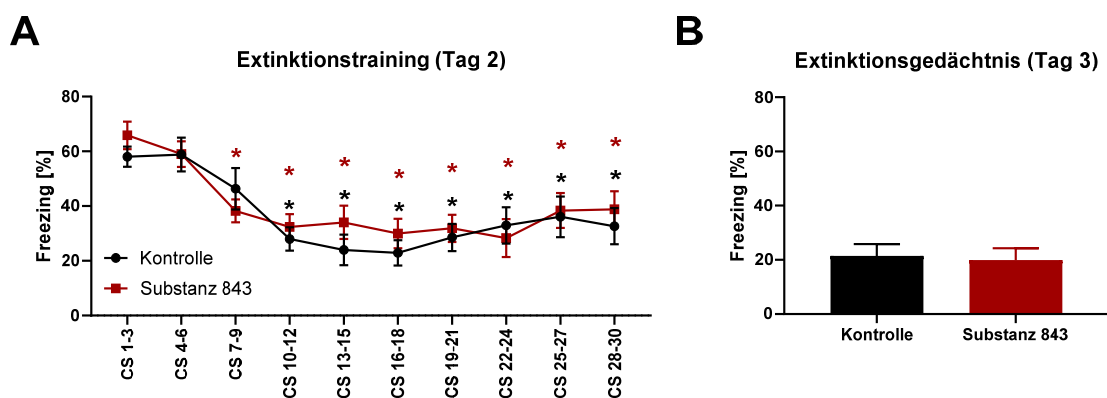


Abbildung 10:

A) *Freezing*-Verhalten in Kontroll- und 843-Versuchsgruppe während des Extinktions-trainings: 30 Minuten nach Substanzapplikation konnte kein Unterschied im Extinktionslernen zwischen den beiden Behandlungsgruppen beobachtet werden. Die Substanz 843 scheint somit die Akquisition des Extinktionsgedächtnisses nicht zu verbessern. Dargestellt sind MW \pm SEM, * = signifikanter Unterschied zu CS 1-3 (Fisher post-hoc Vergleiche). Das *Freezing* ist auf der Ordinate in % der Zeit dargestellt.

B) Extinktionsgedächtnis 24 Stunden nach dem Extinktionstraining: Beide Gruppen zeigen ein erfolgreiches Extinktionsgedächtnis, das allerdings durch die Substanzgabe nicht verändert wurde. Dargestellt sind MW \pm SEM. Das *Freezing* ist auf der Ordinate in % der Zeit dargestellt.

4.2. Kontextuelles Furchtlernen

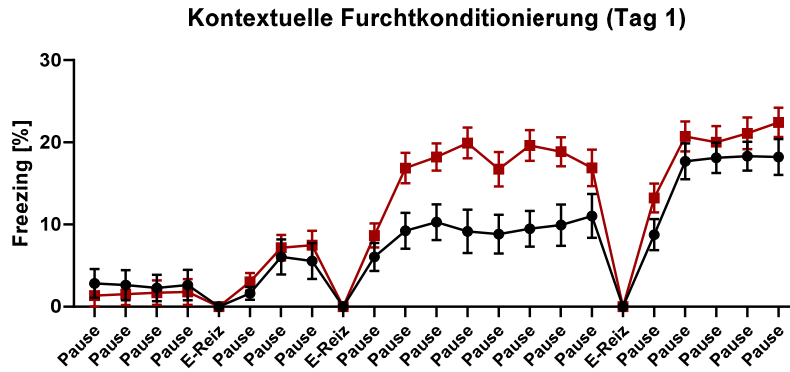
Die kontextuelle Furchtkonditionierung wurde ebenfalls mittels eines dreitägigen Paradigmas untersucht. Im Gegensatz zum vorherigen Experiment erfolgte hier die Substanzapplikation 30 Minuten vor der Konditionierung. In **Abbildung 11** ist in Diagramm A das *Freezing*-Verhalten der Kontroll- und der 843-Versuchsgruppe während der Konditionierung in Kontext A zu sehen. Während der Konditionierung stieg das *Freezing* nach jedem Fußschock weiter an (Kontrollgruppe: von $2,7 \pm 1,8\%$ auf $18,3 \pm 2,0\%$; 843-Gruppe: von $1,6 \pm 1,4\%$ auf $22,4 \pm 1,8\%$). Nach dem zweiten Fußschock zeigte die mit 843 behandelte Gruppe ein vergleichsweise hohes *Freezing*, welches nach dem dritten Fußschock aber wieder im gleichen Bereich wie das *Freezing*-Verhalten der Kontrollgruppe lag. Insgesamt ergab sich während der Konditionierung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($F_{1,828} = 0,35$; $p = 0,5537$).

Am zweiten Tag wurden die Versuchstiere zunächst in einem neutralen Kontext (Kontext B) getestet. Eine ANOVA zeigte hierbei signifikant erhöhte *Freezing*-Werte in der 843-Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($F_{1,30} = 19,1$; $p = 0,0001$) an. Die Werte lagen während der fünfminütigen Testphase in der Kontrollgruppe bei $11,3 \pm 2,9\%$ und in der 843-Versuchsgruppe bei $30,2 \pm 3,9\%$ (vgl. **Abb. 11**, Diagramm B).

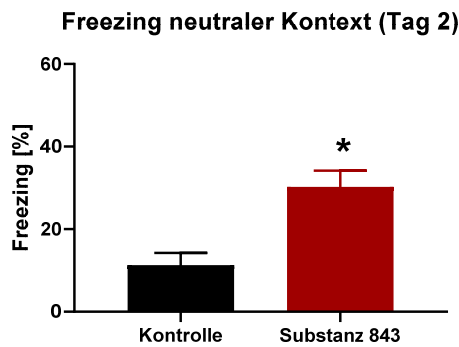
Eine Stunde später wurden die Versuchstiere im selben Kontext, der für die Konditionierung verwendet wurde (Kontext A) getestet, um das kontextuelle Furchtgedächtnis zu untersuchen (vgl. **Abb. 11**, Diagramm C). Die Testphase dauerte 15 Minuten und wurde für die Datenanalyse in drei jeweils fünfminütige Zeitfenster gegliedert. Eine Varianzanalyse ergab generell signifikant höhere *Freezing*-Werte in der 843-Versuchsgruppe als in der Kontrollgruppe (Faktor Behandlung: $F_{1,108} = 15,0$; $p = 0,0002$), sowie eine generelle Abnahme des *Freezing*-Verhaltens über die Zeit (Faktor Zeitpunkt: $F_{2,108} = 8,4$; $p = 0,0004$). Aufgrund der gleichsinnigen Abnahme in beiden Gruppen ergab sich allerdings keine signifikante Interaktion der beiden Faktoren (Behandlung x Zeitpunkt: $F_{2,108} = 0,03$; $p = 0,9$). Der prozentuale *Freezing*-Anteil sank in der 843-Versuchsgruppe im Mittel von $49,4 \pm 5,0\%$ in den ersten fünf Minuten auf $37,5 \pm 5,0\%$ im zweiten Zeitfenster und schließlich auf $31,9 \pm 4,0\%$ in den letzten fünf Minuten. In der Kontrollgruppe lag der Anfangswert bei $35,4 \pm 4,6\%$, welcher auf $24,3 \pm 4,9\%$ sank und schließlich in der letzten Zeitspanne bei $16,3 \pm 3,2\%$ lag. Post-hoc Fisher-LSD-Vergleiche zeigten zu allen drei Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied

zwischen den beiden Gruppen, sowie für beide Gruppen einen signifikanten Unterschied zwischen Zeitpunkt eins und drei.

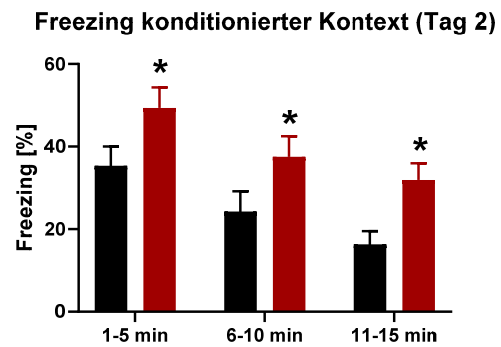
A



B



C



■ Kontrolle (n = 19)
■ Substanz 843 (n = 19)

Abbildung 11:

A) Kontextuelle Furchtkonditionierung an Tag 1: Es ergaben sich keine generellen Unterschiede im *Freezing*-Verhalten während der Konditionierung. Lediglich nach dem zweiten elektrischen Reiz reagierten die mit 843 behandelten Tiere mit einem verstärkten *Freezing*-Verhalten, das allerdings weder nach dem ersten noch nach dem dritten elektrischen Reiz beobachtbar war. Während der Präsentation der Extinktionsreize (E-Reize) konnte kein *Freezing*-Wert dargestellt werden, da die Dauer des E-Reizes (1s) kleiner als die *Freezing*-Schwelle (4s) war. Dargestellt ist das *Freezing*-Verhalten jeweils in 30 s Abschnitten als MW \pm SEM. Das *Freezing* ist auf der Ordinate in % der Zeit dargestellt.

B) *Freezing*-Verhalten in Kontroll- und 843-Versuchsgruppe im neutralen Kontext an Tag 2: Wir erwarteten in neutralem Kontext das *Freezing* in beiden Gruppen auf einem gleich geringen Niveau. Jedoch zeigten die mit 843 behandelten Tiere überraschenderweise ein signifikant erhöhtes *Freezing*-Verhalten, was auf eine unspezifische generalisierte Furchtreaktion hindeuten könnte (vgl. Kapitel 5.1.1). Dargestellt sind MW \pm SEM, * = p < 0,05. Das *Freezing* ist auf der Ordinate in % der Zeit dargestellt.

C) *Freezing*-Verhalten an Tag 2 im konditionierten Kontext (24h nach Substanzapplikation): Zur genaueren Analyse des Furchtverhaltens über die Zeit wurde der 15-minütige Versuch in 3 Blöcken á 5 min analysiert. Hierbei zeigte die mit 843 behandelten Tiere in allen 3 Phasen signifikant mehr *Freezing* als die Kontrollgruppe. Dargestellt sind MW \pm SEM, * = p < 0,05. Das *Freezing* ist auf der Ordinate in % der Zeit dargestellt.

Am dritten Versuchstag wurden die Tiere erneut im konditionierten Kontext (Kontext A) getestet, um die weitere Extinktion des Furchtgedächtnisses zu untersuchen. Auch hier wurden die zehn Minuten Testdauer in zwei gleich lange Zeitfenster von jeweils fünf Minuten unterteilt (vgl. **Abb. 12**). Eine ANOVA ergab einen signifikanten Effekt für den Faktor Behandlung ($F_{1,72} = 8,9$, $p = 0,004$). Allerdings zeigte sich weder eine signifikante Veränderung des *Freezing*-Verhaltens über die Zeit, noch eine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung x Zeitpunkt (F 's $\leq 0,13$, p 's $\geq 0,72$). In den ersten fünf Minuten lag der Anfangswert der Kontrollgruppe bei $18,4 \pm 4,4\%$, der Wert der 843-Versuchsgruppe lag bei $30,8 \pm 4,4\%$. In der zweiten Hälfte wiesen die Kontrolltiere einen Wert von $16 \pm 4,3\%$ auf und die 843-Gruppe lag bei $30,0 \pm 4,3\%$. Post-hoc Fisher-LSD-Vergleiche zeigten zu beiden Zeitpunkten signifikant mehr *Freezing*-Verhalten bei 843 behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

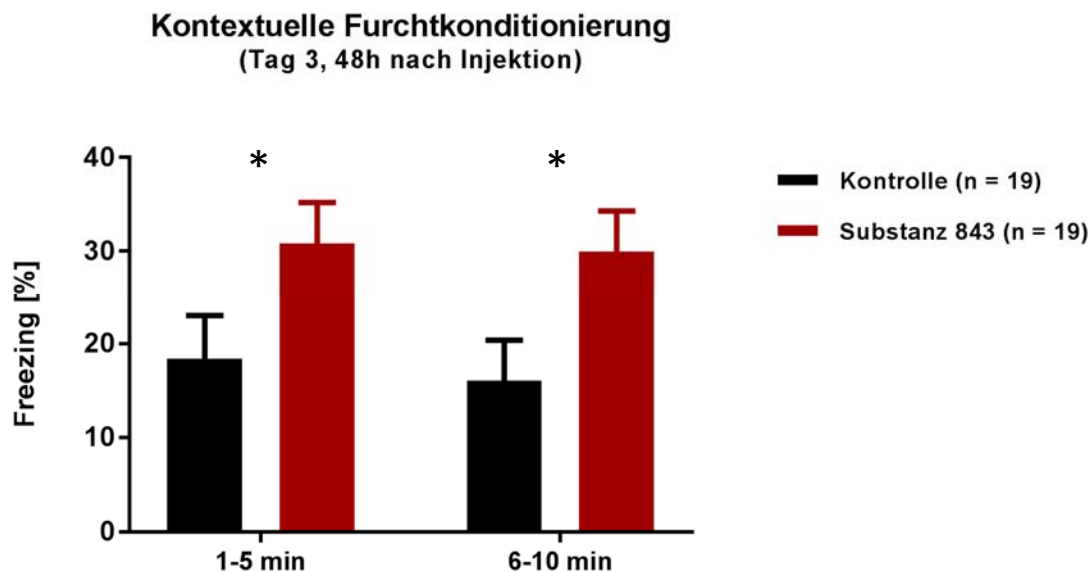


Abbildung 12: *Freezing*-Verhalten an Tag 3 im konditionierten Kontext (48h nach Injektion): In beiden Versuchshälften zeigten die mit 843 behandelten Tiere mehr *Freezing* als die Kontrolltiere. Dargestellt sind MW \pm SEM., * = $p < 0,05$. Das *Freezing* ist auf der Ordinate in % der Zeit dargestellt.

In **Abbildung 13** ist das *Freezing*-Verhalten der 843-Versuchs- und der Kontrollgruppe am zweiten und dritten Tag des Experiments zur besseren Übersicht nochmals zusammenfassend in einem Diagramm dargestellt. Zusammenfassend zeigt sich, dass die systemische Gabe der Substanz 843 vor der Konditionierung dazu führte, dass die Tiere mehr Furchtverhalten im konditionierten Kontext zeigten, welches resistenter gegenüber

einer Extinktion ist. Allerdings führte die Behandlung auch dazu, dass die Tiere mehr *Freezing* in einem ähnlichen, neutralen Kontext zeigten, was auf ein weniger präzises Furchtgedächtnis schließen lässt.

Zusammenfassung kontextuelle Furchtkonditionierung

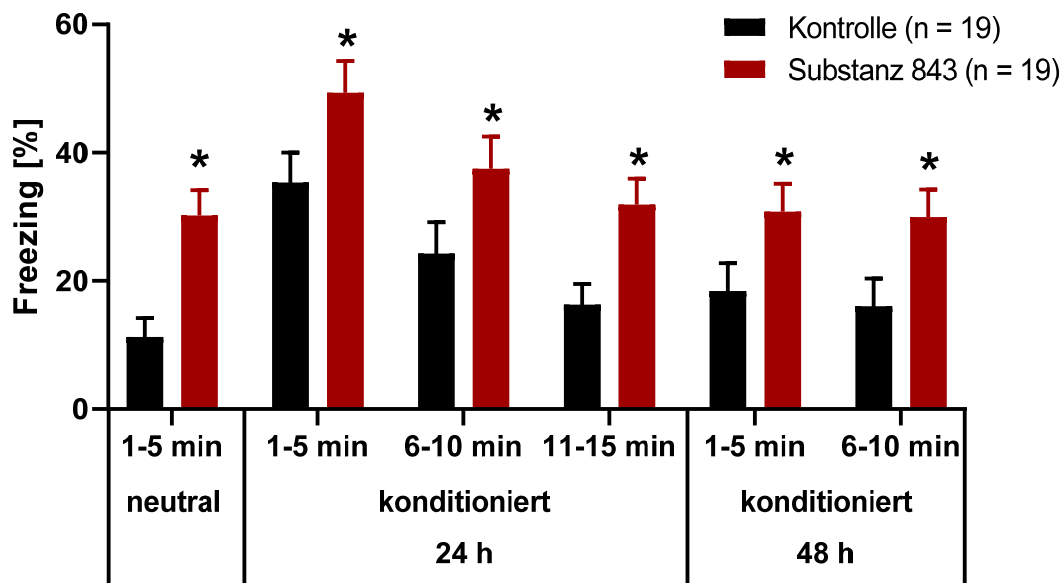


Abbildung 13: Übersicht des Freezing-Verhaltens im neutralen und konditionierten Kontext an Tag 2 und Tag 3 des kontextuellen Furchtlernexperiments. Dargestellt sind MW \pm SEM, * = $p < 0,05$. Das Freezing ist auf der Ordinate in % der Zeit dargestellt.

4.3. Offenfeld-Test

Aufgrund des erhöhten *Freezing*-Verhaltens von 843 behandelten Tieren im neutralen Kontext, sollten in den beiden nachfolgenden Versuchsteilen (vgl. Kapitel 4.3 und 4.4) mögliche Effekte der Substanz 843 auf die Spontanmotorik und das Angstverhalten der Tiere untersucht werden. Hierzu wurden diese 30 Minuten nach Substanzapplikation für jeweils zehn Minuten in eine Offenfeld-Arena gesetzt. Im Rahmen dieses Tests wurden verschiedene Parameter wie zurückgelegte Strecke, Geschwindigkeit, Aufenthaltszeit im Zentrum und im Randbereich sowie die Anzahl der Eintritte in die innere und äußere Zone gemessen und ausgewertet. Insgesamt wurden für diese eigenständige Versuchsreihe 15 naive, d.h. zuvor nicht getestete Tiere verwendet, davon 7 in der 843-Versuchsgruppe und 8 in der Kontrollgruppe.

Als Hauptanalyseparameter wurde die zurückgelegte Strecke der Tiere analysiert. Wie in **Abbildung 14** (Diagramm A) ersichtlich ist, liegt diese in der 843-Versuchsgruppe bei

ca. $40 \pm 3,7$ m und in der Kontrollgruppe etwa bei $44 \pm 2,9$ m. Eine Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich des zurückgelegten Weges ($F_{1,13} = 0,7878$; $p = 0,3909$) womit ein reduzierender Effekt der Substanz 843 auf die Spontanmotorik der Versuchstiere ausgeschlossen werden kann.

In **Abbildung 14** ist in Diagramm B die Aufenthaltszeit jeweils im Zentrum und im Randbereich dargestellt. Tiere der 843-Versuchsgruppe verbrachten durchschnittlich $66,4 \pm 7,0$ Sekunden in der inneren Zone und $524,5 \pm 5,9$ Sekunden (8,7 Minuten) in der äußeren Zone. In der Kontrollgruppe verhielt es sich ähnlich: $70,8 \pm 9,7$ Sekunden verblieben die Tiere im Zentrum und ca. $523,1 \pm 9,5$ Sekunden (8,7 Minuten) in der peripheren Zone. Eine Varianzanalyse zeigte eine signifikante Differenz zwischen den generellen Aufenthaltszeiten in den beiden Bereichen (Faktor „Zone“: $F_{1,26} = 2898,3$; $p = 0,0001$), d.h. Tiere beider Gruppen hielten sich deutlich länger im Randbereich als im Zentrum der Arena auf. Jedoch gibt es weder einen generellen Effekt der Behandlung der Tiere ($F_{1,26} = 0,03$; $p = 0,860$), noch eine Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Zone ($F_{1,26} = 0,12$; $p = 0,730$), was bedeutet, dass die Tiere sich unabhängig davon ob sie zuvor die Substanz bzw. Kontrolllösung appliziert bekamen, vergleichbar lange im Zentrum bzw. im Randbereich aufgehalten haben.

Als weiterer Messparameter wurde die Anzahl der Eintritte in die beiden Zonen ausgewertet. Hierbei betraten Individuen der 843-Versuchsgruppe im Durchschnitt $46 \pm 4,0$ -mal und die der Kontrollgruppe ca. $41 \pm 3,4$ -mal das Zentrum. Der periphere Bereich wurde in den 10 Minuten Testdauer von Tieren mit Substanzapplikation durchschnittlich $47 \pm 4,0$ -mal und von der Kontrollgruppe $41 \pm 3,4$ -mal aufgesucht (vgl. **Abb. 14**, Diagramm C). Eine ANOVA zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Eintritten in das Zentrum der Arena und einer Behandlung mit der Substanz 843 ($F_{1,13} = 0,9721$; $p = 0,3422$).

In **Abbildung 14** ist die mittlere Geschwindigkeit der Tiere aus der Versuchs- und Kontrollgruppe in Diagramm D veranschaulicht. Diese lag bei den Tieren mit Substanzapplikation im Durchschnitt bei $0,067 \pm 0,006$ m/s und somit geringfügig niedriger als bei den Tieren mit Kontrolllösung-Injektion, die einen Wert von $0,074 \pm 0,005$ m/s lieferten. Diese leichte Differenz war statistisch nicht signifikant, wie eine ANOVA zeigte ($F_{1,13} = 0,1032$; $p = 0,7531$).

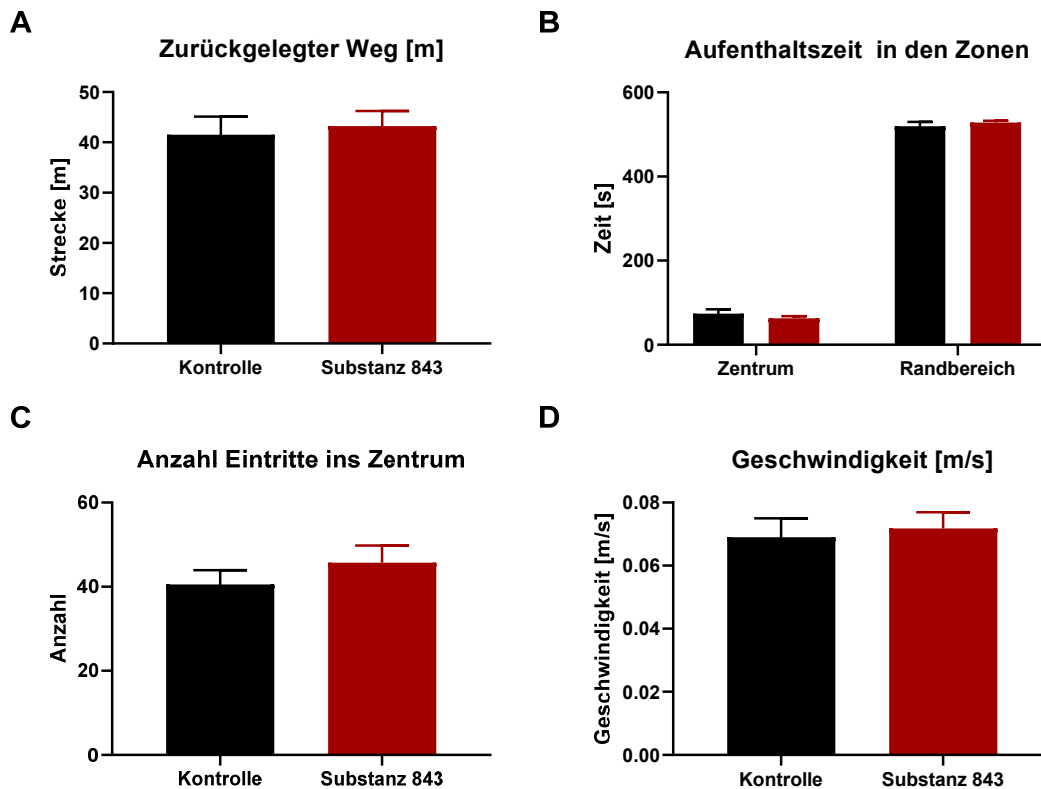


Abbildung 14:

A) Durchschnittliche zurückgelegte Strecke in der Offenfeld-Arena: Die zurückgelegte Strecke wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten ermittelt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen mit 843 behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Dargestellt sind MW \pm SEM.

B) Durchschnittliche Aufenthaltszeit im Zentrum bzw. im Randbereich der Offenfeld-Arena (angegeben in Sekunden): Es zeigte sich ein Unterschied zwischen den generellen Aufenthaltszeiten in den beiden Bereichen, das heißt Tiere beider Gruppen hielten sich länger im Randbereich als im Zentrum auf. Jedoch verweilten die Tiere unabhängig von der 843- bzw. Kontrollinjektion ähnlich lange in den beiden Arealen. Dargestellt sind MW \pm SEM.

C) Durchschnittliche Anzahl der Eintritte ins Zentrum der Offenfeld-Arena: Die Anzahl der Eintritte wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten ermittelt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen mit 843 behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Dargestellt sind MW \pm SEM.

D) Durchschnittliche Geschwindigkeit der Aktivität in der Versuchs- und Kontrollgruppe: Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen mit der Substanz 843 behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Dargestellt sind MW \pm SEM.

Zusammenfassend lässt sich in Hinblick auf die Ergebnisse des Offenfeld-Tests sagen, dass bei allen betrachteten Messparametern (zurückgelegte Strecke, Geschwindigkeit, sowie Aufenthaltszeiten und die Anzahl der Eintritte in die innere Zone) keine signifikanten Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nachweisbar waren. Somit kann man einen Effekt der Substanz 843 auf die Spontanmotorik sowie das Angstverhalten der Tiere ausschließen. Da die Arena aber verhältnismäßig klein war und

die Versuche im Dämmerlicht durchgeführt worden waren, könnte die zentrale Zone auch nicht so stark aversiv für die Tiere gewesen sein. Daher wurde das Angstverhalten mittels des erhöhten Pluslabyrinthes weiter untersucht (vgl. Kapitel 4.4).

4.4. Erhöhtes Pluslabyrinth (EPM)

Der Grad der Angst wird im EPM anhand von Variablen wie die Aufenthaltszeiten und die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen und offenen Arme gemessen. Ein hoher Prozentsatz der Zeit und häufiger Besuch der geschlossenen Arme des Labyrinths zeigen Angst an (Costa et al., 2014). Für diesen Versuch wurden 15 Tiere verwendet. Jeweils 8 Tiere wurden mit der Substanz behandelt, die restlichen 7 Versuchstiere bekamen eine Injektion mit der Kontrolllösung. Um einen möglichen angstausslösenden Effekt der Substanz zu untersuchen wurden als Messparameter die Aufenthaltszeit in den verschiedenen Zonen des Labyrinths, die Anzahl der Eintritte in die unterschiedlichen Bereiche und die durchschnittlich zurückgelegte Strecke in der fünfminütigen Testphase ausgewertet.

In **Abbildung 15** ist die durchschnittliche Dauer des Aufenthalts in den verschiedenen Bereichen des EPM während den fünf Minuten des Versuchsdurchlaufs dargestellt. Tiere der 843-Versuchsgruppe hielten sich im Mittel ca. 184 ± 13 Sekunden (3,1 Minuten) im geschlossenen Arm, 52 ± 8 Sekunden im offenen Arm und etwa 65 ± 6 Sekunden im Zentrum auf. Individuen der Kontrollgruppe verbrachten im Mittel ca. 201 ± 15 Sekunden (3,4 Minuten) im geschlossenen Arm, 49 ± 9 Sekunden im offenen Arm und etwa 51 ± 7 Sekunden im Zentrum. Eine ANOVA ergab keinen signifikanten generellen Effekt des Faktors „Behandlung“ auf die Aufenthaltszeit, das heißt Individuen beider Gruppen verblieben ungefähr gleich lange in den verschiedenen Bereichen des Labyrinths ($F_{1,39} = 0,0$; $p = 0,9999$). Es zeigte sich jedoch ein genereller Zusammenhang zwischen den Zonen und der darin verbrachten Zeit ($F_{2,39} = 121$; $p = 0,0001$): in beiden Gruppen wurde am meisten Zeit im geschlossenen Arm verbracht, gefolgt vom Zentrum. Am seltensten wurde der offene Arm besucht. Insgesamt konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit zur Versuchs- oder Kontrollgruppe und einem längeren Aufenthalt in einem bestimmten Bereich des Labyrinths nachgewiesen werden (Interaktion der Faktoren Behandlung x Zone: $F_{2,39} = 1,17$; $p = 0,3215$).

Aufenthaltszeit in den verschiedenen Zonen [sec.]

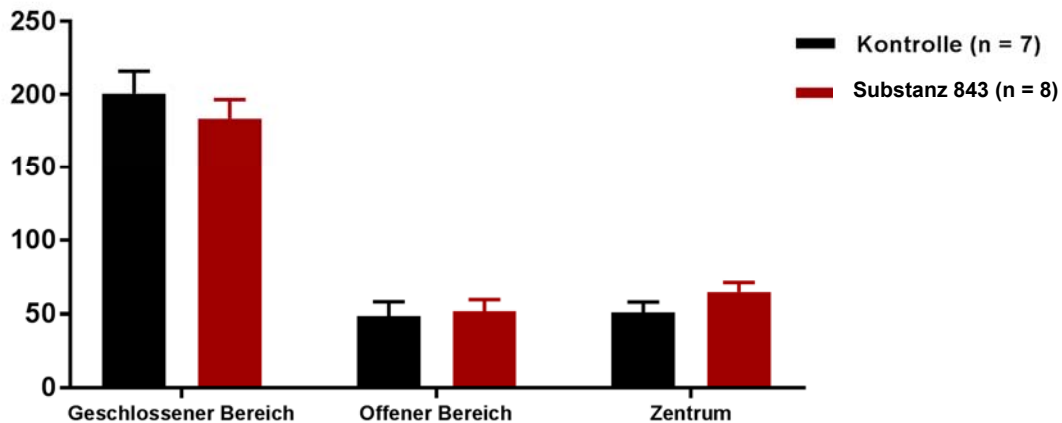


Abbildung 15: Darstellung der durchschnittlichen Aufenthaltszeiten in den unterschiedlichen Bereichen des EPM jeweils für die mit 843 behandelte Versuchs- und die Kontrollgruppe: Die durchschnittliche Aufenthaltszeit wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten ermittelt. Tiere beider Gruppen verblieben ungefähr gleich lange in den jeweiligen Bereichen. Beide Gruppen verbrachten am meisten Zeit im geschlossenen Arm, gefolgt vom Zentrum und dem offenen Arm. Es konnte keine Wechselwirkung zwischen der Zugehörigkeit zur Versuchs- oder Kontrollgruppe und einem längeren Aufenthalt in einem bestimmten Bereich nachgewiesen werden. Dargestellt sind MW \pm SEM.

Als weiterer Parameter zur Erfassung des Angstverhaltens wurde die durchschnittliche Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Zonen des Labyrinths untersucht. Am häufigsten wurde in beiden Gruppen das Zentrum besucht: 34 ± 3 -mal in der 843-Versuchsgruppe und mit ca. 28 ± 3 -mal etwas weniger in der Kontrollgruppe. An zweiter Stelle folgte der geschlossene Bereich des EPM mit ca. 20 ± 2 Eintritte in der 843-Versuchsgruppe und 17 ± 2 Eintritte der Kontrollgruppe. Am wenigsten wurde der offene Arm in beiden Gruppen aufgesucht: Tiere, die mit der Substanz behandelt wurden überquerten etwa 16 ± 3 -mal die Grenze zum offenen Arm; die mit Kontrolllösung behandelten Tiere ca. 13 ± 2 -mal (vgl. **Abb. 16**). Insgesamt liegen in allen drei Zonen die Werte der 843-Versuchsgruppe leicht höher als die der Kontrollgruppe. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Einfluss des Faktors „Behandlung“ auf die generelle Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Zonen ($F_{1,39} = 3,7854$; $p = 0,0590$). Einen signifikanten generellen Zusammenhang findet man allerdings zwischen den Zonen und der Anzahl der dortigen Besuche: Individuen beider Gruppen suchten am häufigsten das Zentrum auf, gefolgt vom geschlossenen Arm und am wenigsten den offenen Arm ($F_{2,39} = 25,3$; $p = 0,0001$). Jedoch zeigte die ANOVA keine signifikante Wechselwirkung zwischen der Substanz- bzw. Kontrolllösung-Injektion und einem vermehrten Besuch einer bestimmten Region des EPM ($F_{2,39} = 0,2374$; $p = 0,07898$).

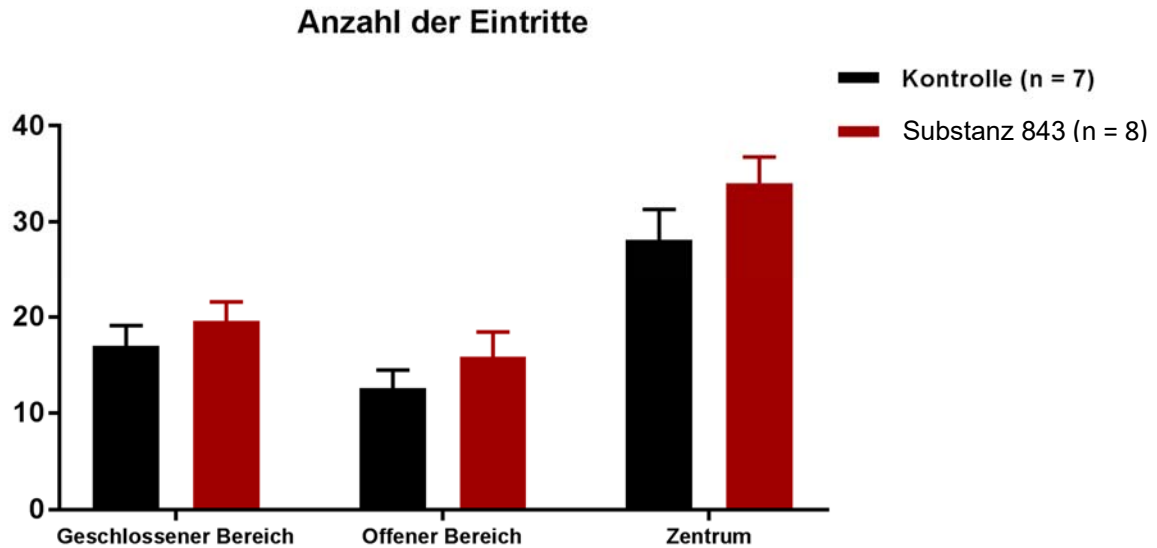


Abbildung 16: Durchschnittliche Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Bereiche des Labyrinths jeweils für die 843-Versuchs- und die Kontrollgruppe: Die durchschnittliche Aufenthaltszeit wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten ermittelt. Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen der Substanz- bzw. Kontrolllösung-Injektion und einem vermehrten Besuch einer bestimmten Region. Jedoch suchten Tiere beider Gruppen am häufigsten das Zentrum auf, gefolgt vom geschlossenen Arm. Am wenigsten wurde der offene Arm des EPM besucht. Dargestellt sind MW \pm SEM.

Zur Kontrolle der motorischen Aktivität wurde zusätzlich die durchschnittlich zurückgelegte Distanz beider Gruppen verglichen. **Abbildung 17** zeigt, dass Tiere der 843-Versuchsgruppe mit ca. $8,3 \pm 0,62$ m etwas mehr Strecke zurückgelegt haben als die der Kontrollgruppe. Diese wiesen einen Wert von etwa $6,9 \pm 0,82$ m auf. Eine ANOVA ergab jedoch keinen statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Substanzapplikation und zurückgelegter Strecke ($F_{1,13} = 1,9684$; $p = 0,1840$).

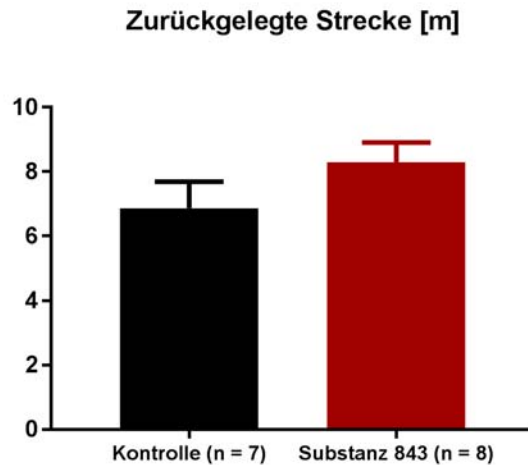


Abbildung 17: Zurückgelegter Weg jeweils für die Versuchs- und die Kontrollgruppe: Die durchschnittliche zurückgelegte Strecke wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten ermittelt. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Substanzapplikation und zurückgelegter Strecke. Dargestellt sind MW ± SEM.

Anhand der oben beschriebenen Ergebnisse des EPM-Versuchs kann man davon ausgehen, dass die hier verwendete Substanz 843 bei den Versuchstieren keinen Angstzustand provoziert oder verstärkt hat. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der 843-Gruppe und der Ethanol-Gruppe bezüglich der beobachteten Messparameter Aufenthaltszeit in den verschiedenen Zonen des Labyrinths, Anzahl der Eintritte in die unterschiedlichen Bereiche und durchschnittlich zurückgelegte Strecke zu verzeichnen.

4.5. Analyse der neuronalen Aktivität im Hippocampus mittels c-fos Färbung

Das c-fos Protein ist ein indirekter Marker zur Messung von erhöhter neuronaler Aktivität von Nervenzellen, die von länger andauernden intrazellulären Ca^{2+} - Erhöhungen gefolgt wird. Solche Aktivitätsmuster werden typischerweise auch bei der Gedächtnisbildung beobachtet. Daher sollte untersucht werden, ob nach Applikation der Substanz 843 und anschließender Furchtkonditionierung (30 Minuten später) die neuronale Aktivität im Hippocampus erhöht ist, welche über eine verstärkte c-fos-Expression ausgelesen werden kann. Hierfür wurden jeweils 8 Tiere (2 Gruppen à 4 Tiere) pro Versuchs- und Kontrollgruppe mit der Substanz 843 oder 10% Ethanol behandelt und dann trainiert.

Anschließend wurden sie 90 Minuten nach dem Training transkardial perfundiert, die Gehirne präpariert und als histologische Gewebepräparate aufbereitet. In **Abbildung 18** sind repräsentative Bilder der Gyrus Dentatus-, CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus jeweils eines 843-Versuchs- und Kontrolltieres zu sehen. Die hell aufleuchtenden Zellen stellen c-fos exprimierende Neurone dar.

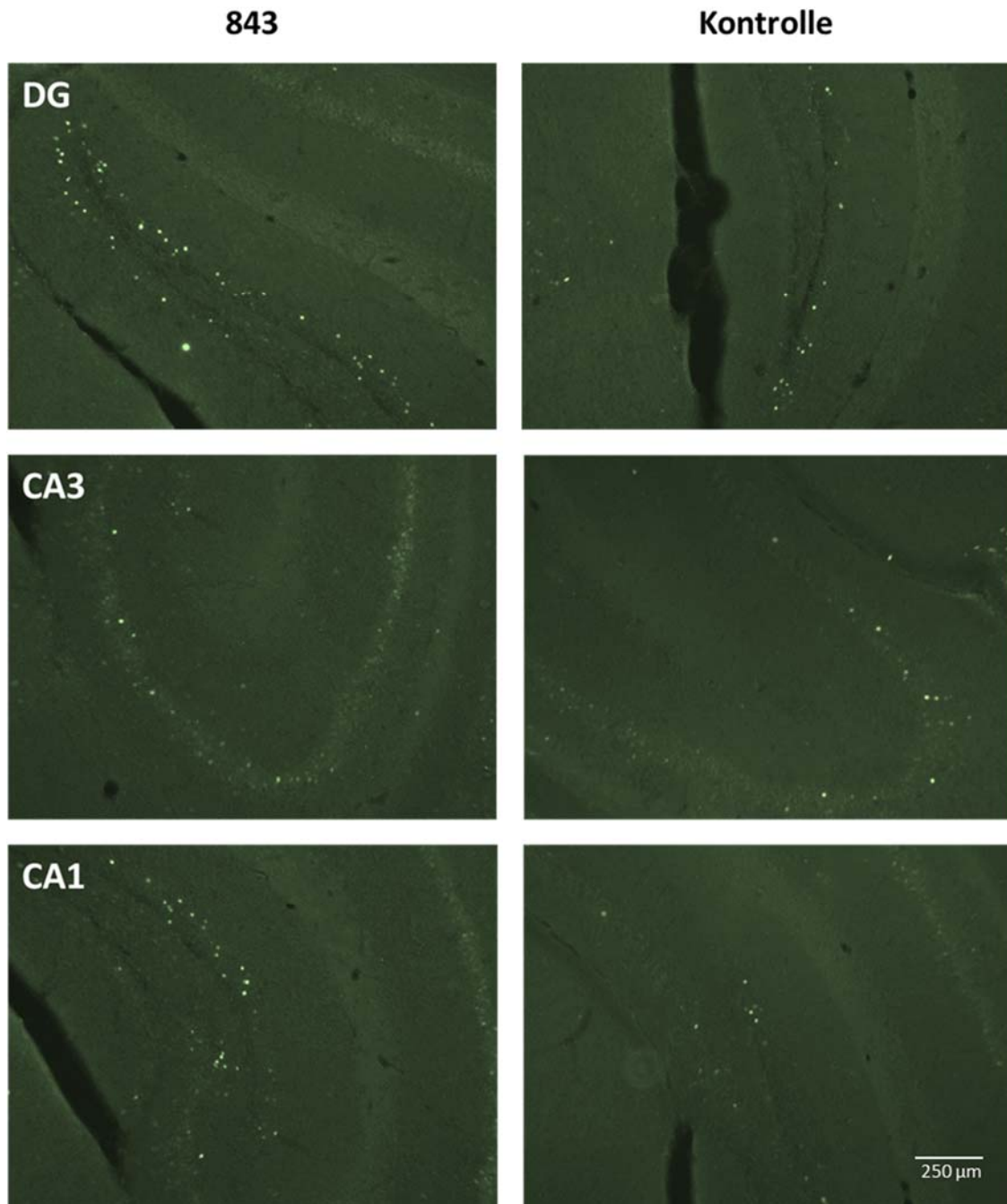


Abbildung 18: Repräsentative mikroskopische Bilder der hippocampalen Gyrus Dentatus- (DG), CA3- und CA1-Region: Gegenübergestellt sind jeweils dieselben Gehirnareale von mit Substanz 843 bzw. 10% Ethanol in Wasser (Lösungsmittelkontrolle) behandelten Tieren. Die hell aufleuchtenden Punkte stellen c-fos exprimierende Neurone dar.

In **Abbildung 19** ist die durchschnittliche Anzahl der c-fos exprimierenden Neuronen in den betrachteten Regionen des Hippocampus für Versuchs- und Kontrollgruppe im Vergleich dargestellt. Es handelt sich hierbei um Relativwerte, die aus den Absolutzahlen berechnet wurden, indem zunächst jeweils der Mittelwert beider Kontrollgruppen aus dem ersten und zweiten Set berechnet wurde. Diese Werte wurden dann gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte der Versuchs- und Kontrollgruppe des jeweiligen Sets relativ dazu berechnet. Die größte Differenz zwischen der Zellanzahl beider Gruppen ist in der CA1-Region zu finden: hier zeigte die 843-Versuchsgruppe $77,3 \pm 12,9\%$ mehr c-fos-positive Neurone als die Kontrollgruppe. Eine ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt der 843-Applikation auf diese Hippocampus-Struktur auf ($F_{1,6} = 34,6$; $p = 0,0011$). Eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Werten der Versuch- und Kontrollgruppe ergab sich auch für die CA3-Region. In der 843-Gruppe zeigten $39,4 \pm 10,0\%$ mehr Zellen eine c-fos-Expression als in der Ethanol-Gruppe ($F_{1,6} = 12,6$; $p = 0,0121$). Auch im Gyrus Dentatus-Bereich wies die Substanzgruppe mehr c-fos-Aktivität auf, jedoch ist der Unterschied zur Kontrollgruppe mit $24,1 \pm 7,4\%$ statistisch nicht signifikant ($F_{1,6} = 2,8390$; $p = 0,1430$).

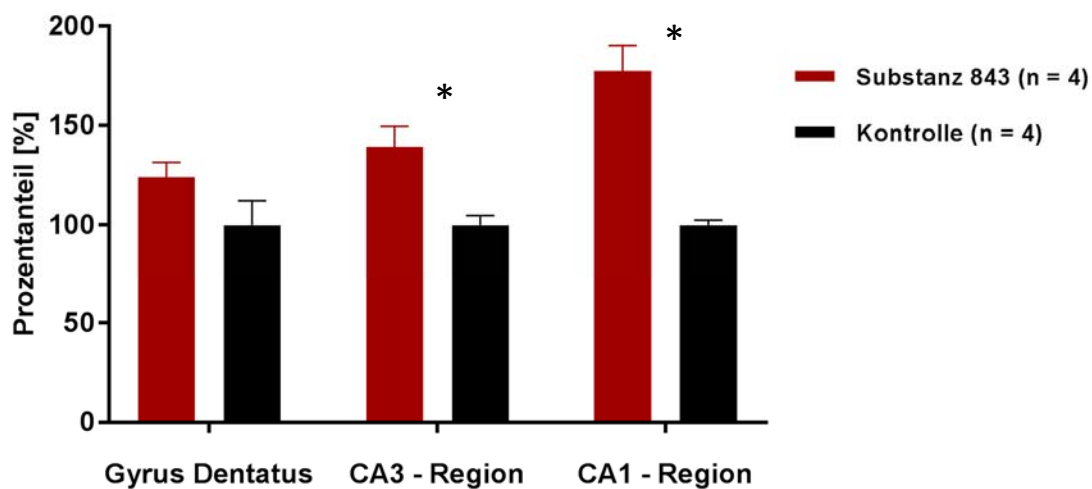


Abbildung 19: Durchschnittliche relative Anzahl der c-fos exprimierenden Zellen in den Hippocampus-Bereichen Gyrus Dentatus, CA3- und CA1-Region im Vergleich zwischen der 843-Versuchs- und der Kontrollgruppe: Signifikante Unterschiede in der c-fos-Expression in der CA3- und CA1-Region sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Dargestellt sind MW \pm SEM, * = $p < 0,05$.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der CA3- und CA1-Region des Hippocampus die 843-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im Durchschnitt eine statistisch signifikant höhere Anzahl an c-fos-positiven Neuronen aufweist. Dies trifft aber nicht für den Gyrus Dentatus - Bereich zu. In Anbetracht dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die Substanz 843 die neuronale Aktivität in diesen Regionen positiv beeinflusst und somit über diesen Weg die synaptische Plastizität im Rahmen eines Lernprozesses verstärken kann.

4.6. BDNF-Nachweis mittels ELISA

Der Wachstumsfaktor BDNF spielt vor allem bei Lern- und Gedächtnisprozessen eine wichtige Rolle. Daher findet die Synthese dieses Neurotrophins besonders in Regionen des Hippocampus, der Amygdala, des Kortex und des Vorderhirns statt (Phillips, 2017). Um herauszufinden, ob die Substanz 843 die BDNF-Synthese beeinflusst wurden Gehirnpräparate der Versuchs- und der Kontrollgruppe mittels ELISA untersucht. Dabei stammten die Präparate einmal von Tieren, die konditioniert wurden (4 Versuchstiere, 4 Kontrolltiere, $n = 8$), und einmal von solchen, bei denen auf eine Konditionierung verzichtet wurde (8 Versuchstiere, 8 Kontrolltiere, $n = 16$).

Bei Tieren des Versuchsansatzes ohne Konditionierung wurde der BDNF-Gehalt [pg BDNF/mg Gehirngewebe] zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die für den Hippocampus gemessenen Werte lagen sowohl für die Versuchs- als auch für die Kontrollgruppe zu beiden Messpunkten auf dem gleichen Niveau. So ergab sich 45 Minuten nach Injektion der 843- bzw. Kontrolllösung für die 843-Versuchsgruppe ein Wert von $25 \pm 0,83$ pg/mg Gewebe und für die Kontrollgruppe ein Wert von $24 \pm 0,32$ pg/mg. Diese Werte änderten sich für beide Gruppen kaum wenn 90 Minuten nach Substanzapplikation gemessen wurde: die 843-Gruppe wies einen BDNF-Gehalt von $25,2 \pm 1,1$ pg/mg auf und die Ethanol-Gruppe lag bei einem Wert von $24,6 \pm 1,68$ pg/mg. Insgesamt war im Vergleich beider Gruppen weder nach 45 Minuten ($F_{1,6} = 1,1055$; $p = 0,3335$), noch nach 90 Minuten ($F_{1,6} = 0,0872$; $p = 0,7777$) eine signifikante Veränderung des BDNF-Gehalts zu beobachten (vgl. **Abb. 20**, Diagramm A).

In **Abbildung 20** ist in Diagramm B die Konzentration des BDNF-Proteins im Kortex dargestellt. Sie lag zum Zeitpunkt 45 Minuten für die 843-Versuchsgruppe bei

18,2 ± 1,29 pg/mg und in der Kontrollgruppe bei 15,8 ± 0,67 pg/mg. Eineinhalb Stunden nach der Injektion lagen die Werte für die mit der Substanz 843 behandelten Tiere bei 15,4 ± 1,3 pg/mg und für die Tiere, die 10% Ethanol in Wasser injiziert bekamen, bei 38,7 ± 1,57 pg/mg. Es ergab sich keine signifikante Differenz zwischen dem BDNF-Gehalt der Versuchs- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 45 Minuten ($F_{1,6} = 2,7505$; $p = 0,1483$), welche jedoch zum zweiten Messzeitpunkt 90 Minuten deutlich vorhanden war ($F_{1,6} = 130$; $p = 0,0001$). Insgesamt war zwischen den beiden Zeitpunkten in der 843-Substanzgruppe ein minimaler Abfall der Konzentration zu verzeichnen und für die Kontrollgruppe ein deutlicher Anstieg des BDNF-Gehalts.

Für den frontalen Kortex lässt sich aus Diagramm C in **Abbildung 20** ableiten, dass zum ersten Messpunkt der Protein-Gehalt für die 843-Gruppe bei 94,3 ± 6,91 pg/mg und in der Ethanol-Gruppe bei 101 ± 2,7 pg/mg lag. Beim zweiten Messzeitpunkt war für beide Gruppen ein minimaler Anstieg zu verzeichnen, da der Wert für die Substanzgruppe bei 97,3 ± 2,5 pg/mg lag und für die Kontrollgruppe bei 103,3 ± 2,03 pg/mg. Wie eine ANOVA ergab, war die Differenz zwischen beiden Gruppen zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant (45 Minuten: $F_{1,6} = 0,8096$; $p = 0,4029$ und 90 Minuten: $F_{1,6} = 3,4760$; $p = 0,1115$).

BDNF-Proteinexpression ohne vorherige Konditionierung

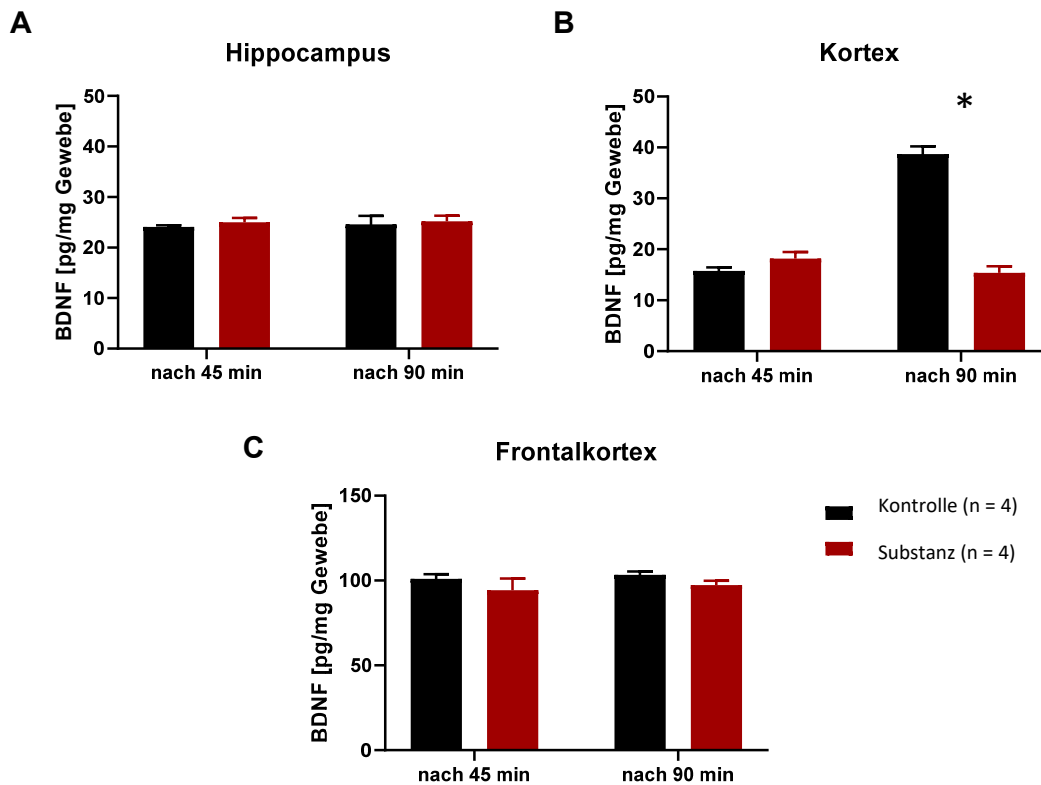


Abbildung 20:

A) Durchschnittlicher BDNF-Gehalt in pg/mg Gehirngewebe im Hippocampus jeweils 45 und 90 Minuten nach der Injektion für die 843-Versuchs- und Kontrollgruppe (ohne vorige Konditionierung): Zu beiden Zeitpunkten ergab die Messung des BDNF-Gehalts in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Dargestellt sind MW \pm SEM.

B) Durchschnittlicher BDNF-Gehalt in pg/mg Gehirngewebe im Kortex nach jeweils 45 und 90 Minuten für die Versuchs- und Kontrollgruppe (ohne vorige Konditionierung): Es ist ein signifikanter Unterschied in der BDNF-Konzentration zwischen Individuen beider Gruppen nach 90 Minuten zu sehen, nicht jedoch nach 45 Minuten. Dargestellt sind MW \pm SEM, * = $p < 0,05$.

C) Durchschnittlicher BDNF-Gehalt in pg/mg Gehirngewebe im frontalen Kortex nach jeweils 45 und 90 Minuten für die Versuchs- und Kontrollgruppe (ohne vorige Konditionierung): Für beide Gruppen steigt die BDNF-Konzentration zum zweiten Messpunkt minimal an, jedoch liegt zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz vor. Dargestellt sind MW \pm SEM.

Möglicherweise kann die BDNF-Proteinexpression nur gesteigert werden, wenn die BDNF-Synthese durch einen vorangegangenen Lernprozess induziert worden ist. Daher fand in einem zweiten Versuchsansatz die Messung einmalig 45 Minuten nach der Furchtkonditionierung statt. Für den Hippocampus kann man festhalten (vgl. **Abb. 21**, Diagramm A), dass der BDNF-Gehalt in der 843-Versuchsgruppe bei $31,4 \pm 3,74$ pg/mg lag und in der Kontrollgruppe bei $33 \pm 1,44$ pg/mg. Eine statistisch signifikante Differenz

zwischen beiden Gruppen bezüglich der Konzentration konnte mittels einer ANOVA ausgeschlossen werden ($F_{1,6} = 0,1596$; $p = 0,7033$). Interessanterweise kann festgestellt werden, dass der BDNF-Gehalt im Hippocampus im Vergleich zu den nicht-trainierten Tieren hier leicht erhöht war, was möglicherweise durch die oben bereits erwähnte Steigerung der BDNF-Expression nach vorangegangenem Lernen erklärt werden kann (vgl. **Abb. 20**, Diagramm A).

Das Diagramm B in **Abbildung 21** zeigt die BDNF-Konzentration zum Messzeitpunkt im Kortex. Die 843-Versuchsgruppe wies einen Gehalt von $87,5 \pm 6,29$ pg/mg auf und die Kontrollgruppe lag mit $81,9 \pm 7,06$ pg/mg leicht niedriger, eine ANOVA zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten der beiden Gruppen ($F_{1,5} = 0,3496$; $p = 0,58$).

Diagramm C in **Abbildung 21** stellt den hier untersuchten Effekt im frontalen Kortex der Tiere dar. Die mit Substanz 843 behandelten Mäuse zeigten einen BDNF-Gehalt von $102,9 \pm 7,37$ pg/mg. Die Mäuse mit einer Kontrolllösung-Injektion wiesen im Durchschnitt eine Konzentration von $109,2 \pm 4,18$ pg/mg auf. Auch hier lieferte eine ANOVA keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($F_{1,5} = 0,4492$; $p = 0,5324$).

BDNF-Proteinexpression 45 min nach Konditionierung

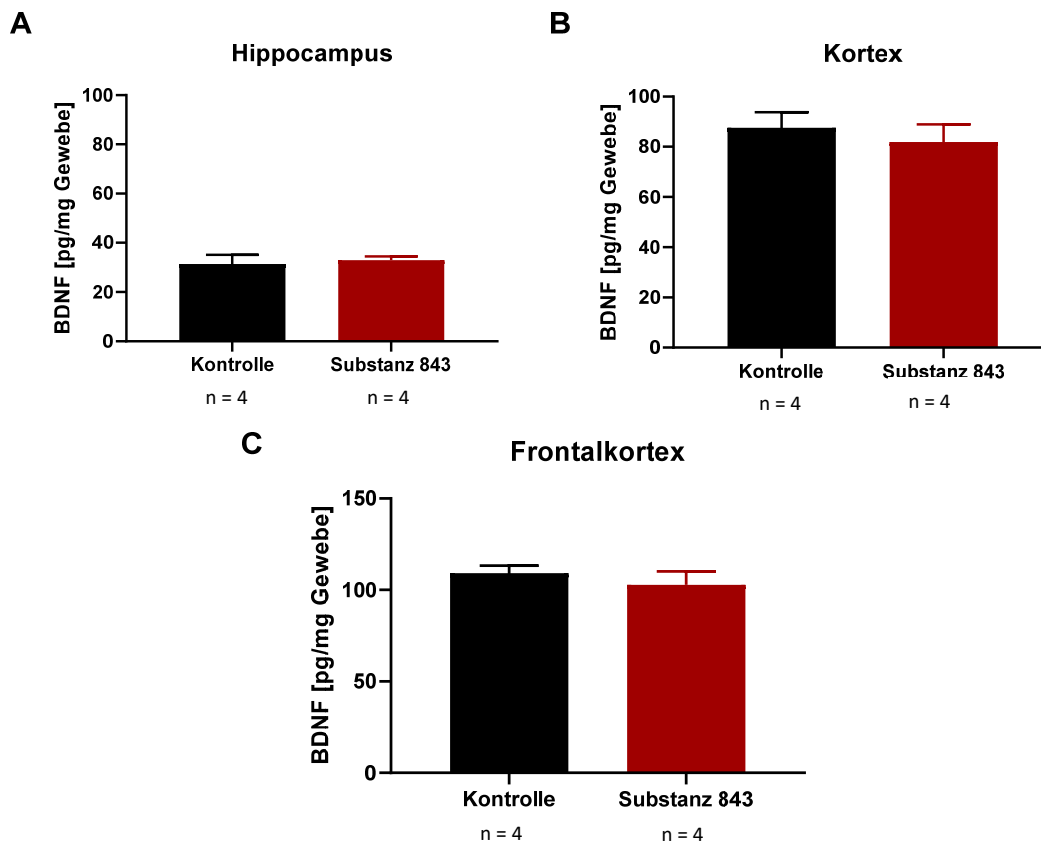


Abbildung 21:

A) Durchschnittlicher BDNF-Gehalt in pg/mg Gehirngewebe im Hippocampus für die Versuchs- und Kontrollgruppe 45 Minuten nach vorher stattgefundener Konditionierung: Es konnte zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Dargestellt sind MW \pm SEM.

B) Durchschnittlicher BDNF-Gehalt in pg/mg Gehirngewebe im Kortex für die Versuchs- und Kontrollgruppe 45 Minuten nach vorher stattgefundener Konditionierung: Es konnte zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Dargestellt sind MW \pm SEM.

C) Durchschnittlicher BDNF-Gehalt in pg/mg Gehirngewebe im frontalen Kortex für die Versuchs- und Kontrollgruppe 45 Minuten nach vorher stattgefundener Konditionierung: Es konnte zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Dargestellt sind MW \pm SEM.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das *Rhodiola*-Derivat 843 in dem von uns betrachteten Zeitfenster von 45 bzw. 90 Minuten keinen signifikanten Effekt im Sinne eines Anstiegs der BDNF-Konzentration im Vergleich von Versuchs- und Kontrollgruppe induzierte. Im Versuchsansatz ohne Furchtkonditionierung lagen die Werte für beide Gruppen in einem ähnlichen Bereich, dabei war der durchschnittliche BDNF-Gehalt im frontalen Kortex mit Abstand am höchsten, gefolgt vom Hippocampus. Die niedrigsten Werte waren im Kortex (im parietalen Bereich) zu finden, wobei hier zu erwähnen ist, dass die Kontrollgruppe zum zweiten Messpunkt 90 Minuten nach der

Injektion einen überraschenden Anstieg des BDNF-Gehalts aufwies. Im Versuchsansatz mit Konditionierung war die BDNF-Konzentration im Durchschnitt auch hier im frontalen Kortex am höchsten, an zweiter Stelle folgt der Kortex und die Werte des Hippocampus waren hier am niedrigsten. Jedoch lässt sich feststellen, dass der Lernprozess, der bei der Furchtkonditionierung stattfand, in allen drei betrachteten Gehirnstrukturen zu einem Anstieg des BDNF-Gehalts (im Vergleich zum Versuchsdurchlauf ohne Konditionierung) geführt hat, welcher im Kortex am stärksten zu sehen war (vgl. **Abb. 20 und 21**).

5. Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren die bereits publizierten Befunde zur positiven Auswirkung des Bestandteils FAE-20 der Pflanze *Rhodiola rosea* auf die Gedächtnisfunktion bei verschiedenen Insektenarten und Nagetieren (Michels et al., 2018). So konnte bei Mäusen nach akuter Gabe von FAE-20 zum Beispiel eine erhöhte Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen im Hippocampus und ein verbessertes Hippocampus-abhängiges Gedächtnis beobachtet werden (Michels et al., 2018). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden neue, dem FAE-20 ähnliche, Derivate synthetisiert, von denen in dieser Studie die Auswirkung der Substanz 843, auf die kognitiven Fähigkeiten der Maus in verhaltensbiologischen Experimenten untersucht worden sind. Da für FAE-20 positive Wirkungen auf Hippocampus-Neurone, sowie auf Hippocampus-abhängiges Lernen gezeigt werden konnten, haben wir ebenfalls das Hippocampus-abhängige kontextuelle Furchtlernen als Verhaltensparadigma gewählt. Hier konnten wir beobachten, dass FAE-20 zu einem verstärkten und extinktionsresistenteren Furchtverhalten führte. Allerdings zeigten die Tiere in einem ähnlichen, neutralen Kontext auch ein erhöhtes Furchtverhalten, was auf eine generalisierte Furcht oder ein erhöhtes Angstverhalten hindeuten könnte. Mittels Offenfeld und EPM-Versuchen konnten wir allerdings ausschließen, dass 843 die Spontanmotorik reduziert oder eine anxiogene Wirkung besitzt. Anhand von c-fos-Färbungen konnten wir zudem zeigen, dass die Behandlung mit 843 zu einer Erhöhung der neuronalen Aktivität speziell in der CA1- und der CA3-Region des Hippocampus führte. Allerdings konnten unsere Daten keinen Anhaltspunkt dafür liefern, dass die Wirkung von 843 über eine veränderte BDNF-Synthese erfolgt. Überraschenderweise konnten wir in einem weiteren Lernexperiment, das auch auf synaptischer Plastizität im Hippocampus beruht (Extinktion signalvermittelter Furcht, vgl. Kapitel 5.1.2.), keine Wirkung von 843 beobachten.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der einzelnen Experimente unter Berücksichtigung von Erkenntnissen aus aktueller Forschung auf diesem Gebiet vergleichend diskutiert werden.

5.1. Furcht- und Furchtextinktionslernen

5.1.1. Kontextuelles Furchtlernen

Da für FAE-20 positive Wirkungen auf kontextuelles Furchtlernen, sowie neuronale Aktivität von Hippocampusneuronen beobachtet wurden (Michels et al., 2018), haben wir die Substanz 843 ebenfalls in diesem überwiegend Hippocampus-abhängigen Lernparadigma untersucht. Hierzu wurde am ersten Tag des Versuchs die Substanz 30 Minuten vor der kontextabhängigen Furchtkonditionierung injiziert. Hierbei beobachteten wir kein generell verändertes Verhalten bei den mit der Substanz 843 behandelten Tieren (vgl. **Abb. 11**, Diagramm A). Allerdings zeigten Tiere der 843-Versuchsgruppe nach dem zweiten elektrischen Stimulus ein deutlich erhöhtes *Freezing* als die Kontrollgruppe. Jedoch war nach dem ersten und dritten elektrischen Stimulus keine solche Erhöhung sichtbar, weshalb wir nicht davon ausgehen, dass die später beobachteten Wirkungen von 843 auf das Furchtgedächtnis auf eine unspezifische Wirkungsweise wie zum Beispiel eine veränderte Schmerzschwelle oder ein generell erhöhtes Angstverhalten beruhen. Letzteres kann aufgrund zusätzlicher Experimente, in denen das Angstverhalten mit Offenfeld und EPM untersucht worden ist (s.u.), ausgeschlossen werden. Möglicherweise könnte dieses frühzeitig erhöhte *Freezing* auf eine leicht beschleunigte Akquisition des kontextuellen Furchtgedächtnisses hindeuten. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass die Stärke der unkonditionierten Reaktion mit dem späteren Furchtgedächtnis positiv korreliert (Kreutzmann et al., 2021; Ponder et al., 2007), kann man hier dennoch nicht eindeutig zwischen konditionierter und ungelernter Reaktion unterscheiden, da das *Freezing* auch die adäquate Reaktion auf den unkonditionierten Reiz ist. Um auszuschließen, dass durch die 843-Gabe die Aktivität der Tiere generell reduziert wird, haben wir einen Offenfeld-Test durchgeführt, um das Explorationsverhalten der Tiere genauer analysieren zu können. Hier zeigte sich in den verschiedenen analysierten Messparametern, wie zurückgelegter Strecke oder Geschwindigkeit (vgl. **Abb. 14**), keine Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe, sodass wir einen hemmenden Effekt von 843 auf die Spontanmotorik der Tiere ausschließen können.

Am nächsten Tag zeigten die mit 843 behandelten Tiere interessanterweise ein signifikant höheres *Freezing* im konditionierten Kontext, als die Kontrolltiere. Dieses erhöhte *Freezing* war über die gesamte Versuchszeit zu beobachten und war noch am darauffolgenden Tag beobachtbar (vgl. **Abb. 11 und 12**). Diese Befunde deuten auf ein

stabileres Furchtgedächtnis hin, welches durch das Extinktionstraining nicht so einfach zu beeinflussen ist. Zusätzlich wurden die Versuchstiere zunächst in einem neutralen Kontext getestet, um die Spezifität des Furchtgedächtnisses zu überprüfen. Überraschenderweise zeigten die mit 843 behandelten Tiere hier ebenfalls ein signifikant erhöhtes *Freezing*-Verhalten (vgl. **Abb. 11**, Diagramm B), was auf ein generalisiertes Furchtverhalten hindeuteten könnte.

Eine mögliche Erklärung für die hohen *Freezing*-Werte der 843-Versuchsgruppe im neutralen Kontext könnte sein, dass 843 eine anxiogene Wirkung besitzt. So konnte bei Menschen mit Angststörungen beobachtet werden, dass diese mit erhöhten konditionierten Reaktionen (CR) sowohl auf furchtkonditionierte Reize (CS+), als auch auf ungepaarte „Sicherheitsreize“ (*safety stimuli*, CS-) reagieren (Mineka & Oehlberg 2008). Des Weiteren konnte bei Mäusen beobachtet werden, dass das Angstverhalten im Offenfeld, d.h. die Aufenthaltszeit in der Randzone, positiv mit dem *Freezing* im konditionierten Kontext korrelierte (Ahn et al., 2013). Deshalb haben wir die Aufenthaltsdauer sowie die Anzahl der Eintritte in die Zentrumszone der Offenfeld-Arena nach 843-Gabe ausgewertet (vgl. **Abb. 14**). Diese Parameter gelten als ein Maß für die Ängstlichkeit der Tiere (Himanshu et al., 2020). Hier konnten wir allerdings keine anxiogene Wirkung durch die akute 843-Gabe beobachten. Um das Angstverhalten der Tiere noch weitergehend zu untersuchen, haben wir mit separaten Tieren einen weiteren Test im erhöhten Pluslabyrinth durchgeführt. Dieser Test beruht - wie der Offenfeld-Test - auf dem natürlichen spontanen Erkundungsverhalten der Tiere in einer neuen Umgebung. Zusätzlich aber auch auf der natürlichen Angst der Tiere vor erhöhten und ungeschützten Flächen. Als Maß für den Grad der Angst dient die Anzahl der Besuche der offenen Arme und die dort verbrachte Zeit (Vuralli et al. 2019, Seibenhener et al. 2015). Auch hier zeigten sich in allen analysierten Parametern (Aufenthaltszeit in den Zonen, Anzahl der Eintritte in die Zonen, zurückgelegte Strecke) keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (vgl. **Abb. 15, 16 und 17**), sodass auch anhand dieses Tests eine anxiogene Wirkung der Substanz 843 ausgeschlossen werden kann. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser beiden Tests zur Messung des unkonditionierten angstassoziierten Verhaltens der Mäuse, dass diese basalen Eigenschaften durch 843 akut nicht verändert werden und somit keine Erklärung für die erhöhten *Freezing*-Werte im neutralen Kontext liefern. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass die Tiere keine exakte Erinnerung an den Kontext abgespeichert haben und deshalb in dem den

Konditionierungs-Kontext relativ ähnlichen neutralen Kontext ebenfalls mit Furchtverhalten reagieren, das heißt ein generalisiertes Furchtverhalten aufweisen.

Interessanterweise konnte aber auch im konditionierten Kontext ein erhöhtes *Freezing* beobachtet werden, das signifikant höher war als das *Freezing*-Verhalten im neutralen Kontext. Initial war dieses *Freezing* am höchsten und nahm dann im weiteren Verlauf etwas ab, blieb aber stets signifikant höher als das *Freezing*-Verhalten der Kontrollgruppe (vgl. **Abb. 11 und 12**). Dieser Effekt, dass das Furchtverhalten länger anhält, deckt sich mit den Beobachtungen die im selben experimentellen Paradigma mit FAE-20 gemacht worden sind (Michels et al., 2018). Im Gegensatz zu FAE-20 erhöhte 843 zudem auch das absolute initiale *Freezing* und scheint somit hinsichtlich der absoluten Stärke des Furchtgedächtnisses effektiver zu Wirken als FAE-20.

Auch wenn das erhöhte *Freezing* im konditionierten Kontext auf eine gedächtnissteigernde Wirkung von 843 schließen lässt, so scheint dieser Effekt aber mit dem erhöhten *Freezing* im neutralen Kontext, das auf ein generalisiertes Furchtgedächtnis hindeutet, im Widerspruch zu stehen. Denn für einen funktionalen kognitiven Enhancer würde man fordern, dass er nicht nur zu einem länger anhaltenden, sondern auch zu einem präziseren Gedächtnis führen sollte. Für FAE-20 konnte gezeigt werden, dass es an isolierten hippocampalen Schnittpräparaten die Erregbarkeit von Neuronen erhöhte (Michels et al., 2018). Die Erhöhung der neuronalen Aktivität könnte ein möglicher Mechanismus für die gedächtnissteigernde Wirkung von FAE-20 (und *Rhodiola rosea*) sein, da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass die Erhöhung neuronaler Aktivität im Hippocampus das kontextuelle Furchtgedächtnis verbessern kann (Restivo et al., 2009). Interessanterweise scheint eine erhöhte neuronale Aktivität die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass Neurone in ein Engramm, das den spezifischen Gedächtnisinhalt repräsentiert, eingebunden werden (z.B. Yiu et al., 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Kontexte die zeitlich dicht hintereinander präsentiert wurden (5 Stunden) auf neuronaler Ebene eine höhere Überlappung an Neuronen innerhalb des Gedächtnis-Engramms aufwiesen als Kontexte die zeitlich weit entfernt (7 Tage) voneinander präsentiert wurden. Interessanterweise führte eine kontextuelle Furchtkonditionierung in einem Kontext dazu, dass diese Furcht auf einen zuvor zeitlich dicht präsentierten Kontext übertragen wurde (Cai et al. 2016). Es wäre somit denkbar, dass 843 zu einer langanhaltenden Erhöhung der neuronalen Aktivität führt, die dann wiederum dazu beiträgt, dass die neuronale Repräsentation des dem konditionierten

Kontext ähnlichen, neutralen Kontextes eine starke Überlappung mit dem Engramm des konditionierten Kontextes aufweist und somit auch das gelernte Furchtverhalten auf den neutralen Kontext überspringt. Um diese Hypothese zu überprüfen sollte in weiterführenden Experimenten eine größere Pause von mehreren Tagen zwischen Konditionierung und der Exposition zum neutralen Kontext eingefügt werden.

Auf der anderen Seite muss für eine sichere Verarbeitung der Kontextinformationen (CS) - und somit für ein erfolgreiches kontextuelles Furchtlernen - die Überlagerung dieser Kontextinformationen mit der aversiven Fußschock-Information (US) verhindert werden. Dies geschieht durch eine gezielte Hemmung der Eingänge, die diese US-Information in den Hippocampus senden (Lovett-Baron et al., 2014). In diesem Sinne könnte eine generelle Erhöhung der neuronalen Aktivität im Hippocampus sich auch negativ auf die Verarbeitung des Kontextes als konditioniertem Stimulus (CS) auswirken. Dies hätte zur Folge, dass die Tiere dann auch in ähnlichen Kontexten, wie unserem neutralen Kontext, mit Furchtverhalten reagieren, da die CS-Informationen nicht präzise gespeichert wurden. Somit könnten unsere Daten dahingehend interpretiert werden, dass 843 tatsächlich einen gedächtnissteigernden Effekt hat, der sich durch das erhöhte und langanhaltende *Freezing*-Verhalten im konditionierten Kontext zeigte, gleichzeitig aber auch die Integration der kontextuellen Informationen beeinträchtigte, sodass wir ebenfalls ein generalisiertes Furchtverhalten in einem ähnlichen, neutralen Kontext beobachteten. In weiterführenden Experimenten wäre es interessant zu prüfen, ob 843 in anderen Hippocampus-abhängigen Lernaufgaben, die ohne aversive Reize auskommen, wie zum Beispiel dem räumlichen Objektwiedererkennungstest (SOR), eine gedächtnissteigernde Wirkung besitzt.

Für *Rhodiola rosea* konnte ein positiv modulierender Effekt auch auf das cholinerge System gezeigt werden, wodurch eine positive Wirkung auf Lern- und Gedächtnisprozesse erzielt werden kann. Der beobachtete Effekt ist wahrscheinlich auf mehrere zugrundeliegende Mechanismen zurückzuführen, einschließlich der Steigerung des Acetylcholinpiegels im Gehirn (Vasileve et al., 2016). Der Acetylcholinesterase-Inhibitor Galantamin zählt zu den sogenannten *cognitive enhancern* und findet als kognitiv förderndes Medikament vor allem in der Therapie der Alzheimer-Erkrankung Anwendung. Außerdem führt das Medikament als positiver allosterischer Modulator von nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) dazu, dass diese bei gleichbleibender Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt stärker und länger anhaltend aktiviert

werden. In einer anderen Studie wurde untersucht, ob Galantamin durch seine beschriebenen Wirkweisen die durch chronischen Nikotinentzug induzierten kognitiven Defizite, die zu einem Sucht-Rückfall führen können, lindern kann und somit eventuell als Hilfsmittel zur Raucherentwöhnung eingesetzt werden kann. Hierfür wurden Mäuse der Versuchsgruppe zunächst mit Galantamin behandelt und anschließend ihr Verhalten anhand von kontextueller Furchtkonditionierung, wie auch von uns angewandt, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die einer Galantamin-Behandlung unterzogen wurden, signifikant mehr *Freezing* zeigten als die Kontrollgruppe und somit nikotinentzugsbedingte Defizite in der kontextuellen Konditionierung durch das Medikament gelindert werden konnten (Wilkinson et al. 2011). Es ist bekannt, dass auch *R. rosea* positiven Einfluss auf das cholinerge System hat, daher wäre es interessant zu prüfen ob auch für *R. rosea* ein Einsatz als Pharmakotherapeutikum bzw. Hilfsmittel zur Aufrechterhaltung der Rauchabstinenz und zur Verhinderung eines Rückfalls in Betracht käme und inwiefern das cholinerge System durch die 843-/FAE-20-Gabe beeinflusst wird.

5.1.2. Extinktion signalvermittelter Furcht

Die Extinktion signalvermittelter Furcht ist ein weiteres Lernparadigma, das ebenfalls wie die kontextuelle Furchtkonditionierung unter anderem auf hippocampaler Plastizität beruht und daher von uns im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Bei der signalvermittelten Furchtkonditionierung wird ein emotional neutraler Reiz (z. B. ein Ton) während einer Konditionierung mit einem aversiven unconditionierten Reiz (z. B. einem aversiven elektrischen Fußreiz) gepaart. Der auditive konditionierte Reiz und der nozizeptive unconditionierte Reiz werden hauptsächlich über thalamische und kortikale Wege im lateralen Kerngebiet der Amygdala verarbeitet und tragen so zur Bildung des Furchtgedächtnisses bei (Johansen et al., 2011).

Das Verständnis der signalvermittelten Furchtkonditionierung hat zudem eine hohe klinische Relevanz, da sich dieses Modellsystem neben der Charakterisierung der Mechanismen des Lernens und des Gedächtnisses möglicherweise auch für das Verständnis von furchtbezogenen Erkrankungen wie posttraumatischen Belastungsstörungen (PTBS) und Phobien eignet (Fenster et al., 2018; Haaker et al., 2019). Störungen der Furchtkonditionierung, ihrer Extinktion und ihres Abrufs sind eine

der möglichen Ursachen von PTBS (Lang et al., 2000; Öhman & Mineka, 2001). Es wird die Möglichkeit diskutiert, Furchterinnerungen mit Verhaltensmaßnahmen anstelle von pharmakologischen Interventionen zu modulieren und so die Furchtextinktion zu erleichtern, die bei der PTBS verzögert stattfindet. Bei der *Eye Movement Desensitization and Reprocessing* (EMDR) Therapie werden kognitive, emotionale und körperliche Assoziationen zu einer traumatischen Szene hergestellt. Dazu gehört auch die imaginäre Exposition während der bilateralen Stimulation (BLS), bei der entweder auditive, visuelle oder somaästhetische Stimuli abwechselnd auf beiden Seiten des Körpers der Probanden eingesetzt werden. Die therapeutische Wirkung von EMDR wird durch die Assoziation der traumatischen Erinnerung des Patienten mit der Präsentation der BLS erreicht, was zu einer Löschung der emotionalen Reaktionen führt, die durch die traumatische Erinnerung hervorgerufen werden (Boukezzi et al., 2017). Diese verhaltensbasierten Therapien könnten wiederum durch die parallele, unterstützende Gabe von *cognitive enhancern* in ihrer Effizienz verstärkt werden (Singewald et al., 2015; Choi et al., 2010; Davis et al., 2006; Zwanzger et al., 2021)

Erwartungsgemäß zeigten die 843-behandelte und die Kontrollgruppe keine Unterschiede während der Furchtkonditionierung, was eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende Untersuchung zu möglichen Wirkungen von 843 auf das Extinktionslernen war. Am zweiten Tag fand dann das eigentliche Extinktionstraining in einem neuen Kontext statt. 30 Minuten vor Beginn des Trainings wurde den Tiere entweder 843 oder Kontroll-Lösung injiziert. In diesem Experiment beobachteten wir eine erfolgreiche Extinktion des Furchtgedächtnisses in beiden Gruppen. Jedoch war keine signifikante Differenz zwischen den 843 behandelten und den Kontrolltieren zu sehen, was gegen einen lernsteigernden Effekt des Rhodiola-Derivats auf die Akquisition des Extinktionsgedächtnisses spricht. Der leichte erneute Anstieg der *Freezing*-Werte zum Ende des Experiments hin, lässt auf eine zunehmende Inaktivität der Tiere beider Gruppen vermuten, möglicherweise bedingt durch die lange Aufenthaltsdauer in der Versuchsarena und die Tatsache, dass das Tier nach einer bestimmten Zeit seine Umgebung ausgiebig erkundet hat. Da das Messsystem nicht zwischen Immobilität der Tiere und *Freezing*-Verhalten unterscheiden kann, könnten so falsch-positive *Freezing*-Werte entstanden sein (vgl. Diskussion in Psotta et al., 2013). Am letzten Tag des Experiments wurde das Extinktionsgedächtnis getestet. Hierbei zeigten die Ergebnisse im Vergleich zum Beginn des Extinktionstrainings am Vortag sehr geringe *Freezing*-Zeiten, was auf ein erfolgreiches Extinktionsgedächtnis hindeutet. Es ergab sich jedoch kein

signifikanter Unterschied zwischen den *Freezing*-Werten in beiden Gruppen und folglich auch keine gedächtnissteigernde Wirkung der Substanz 843 auf das Extinktionsgedächtnis.

Die wichtigsten Hirnregionen, für die Verarbeitung der signalvermittelten Furchtkonditionierung sind die basolaterale und zentrale Amygdala (Curzon et al. 2009). Das Netzwerk, das an der Akquisition und Konsolidierung der Furchtextinktion beteiligt ist, beinhaltet neben der Amygdala aber noch zusätzlich den medialen präfrontalen Kortex (speziell der infralimbische Teil) sowie den Hippocampus (Quirk & Müller 2008; Herry et al., 2010; Levy & Schiller, 2021). Letzterer spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des Kontextes, in dem die Extinktion stattfindet (Hamm et al., 2017; Levy & Schiller, 2021). Möglicherweise sind die am Extinktionslernen beteiligten Areale unterschiedlich sensitiv für die Wirkung von *Rhodiola* und entsprechend für davon abgeleitete Derivate. Dies könnte erklären, warum das stark von synaptischer Plastizität im Hippocampus anhängige kontextuelle Furchtlernen durch 843 (diese Studie) sowie FAE-20 (Michels et al., 2018) positiv beeinflusst werden kann, wohingegen das Extinktionslernen der signalvermittelten Furcht, welches vornehmlich auf Plastizität im PFC und der Amygdala beruht (Herry et al., 2008; Herry et al., 2010; Burgos-Robles et al., 2007), durch 843 nicht beeinflusst wird. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass die meisten Beobachtungen zur gedächtnissteigernden Wirkung von *Rhodiola rosea* bislang bei Hippocampus-abhängigen Lernaufgaben gemacht wurden (Ma et al., 2018).

Das hier verwendete Extinktionsparadigma ist zudem relativ effektiv um ein erfolgreiches Extinktionslernen bei den Mäusen auszulösen. Dadurch zeigen die Tiere am dritten Tag auch nur vergleichsweise wenig *Freezing*-Verhalten auf den Tonreiz. Möglicherweise sind nach längerer Wartezeit (z.B. nach 2 Wochen) Unterschiede beobachtbar, da bei 843 behandelten Tieren die Spontanerholung („spontaneous recovery“) des Furchtgedächtnisses schwächer ausgeprägt sein könnte. Dies sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Auch ein schwächeres Extinktionsprotokoll, dass nur zu einer partiellen Extinktion von Furcht führt, könnte ein vielversprechender Ansatz sein um mögliche gedächtnissteigernde Wirkungen von 843 zu untersuchen.

5.1.3. Zusammenfassung der Verhaltensexperimente

Zusammenfassend lässt sich durch die Resultate der durchgeführten Verhaltensexperimente sagen, dass das untersuchte *Rhodiola*-Derivat 843 einen nachweisbaren Effekt auf hippocampales Lernen hat. Weiter deuten unsere Daten an, dass 843 eine stärkere Wirkung auf den Hippocampus haben könnte, dem zentralen Bestandteil des Netzwerkes, das an der kontextuellen Furchtkonditionierung beteiligt ist, als auf die Amygdala, die eine große Rolle bei der signalvermittelten Furchtkonditionierung spielt. Diese Aussage lässt sich auch mit dem Ergebnis einer Metastudie von Ma und Kollegen vereinen, die 36 Studien mit insgesamt 836 Tieren untersuchte. Diese Studien befassten sich mit möglichen Wirkungen von *R. rosea* und/oder Derivaten dieser Pflanze auf kognitive Fähigkeiten bei Mäusen und Ratten. Die Metaanalyse kam zu dem Ergebnis, dass eine eindeutige Mehrheit der Studien einen positiven Effekt dieser Substanzen auf das Lernen und die Gedächtnisfunktion von Nagern in Hippocampus-abhängigen Lernaufgaben (z.B. Schwimmlabyrinth) hatten. Die möglichen Wirkmechanismen von *Rhodiola rosea* und abgeleiteten Derivaten beruhen dabei vermutlich größtenteils auf deren anti-oxidativen Wirkungen, der Regulation cholinergischer Modulation, Anti-Apoptose-Aktivitäten, Entzündungshemmung sowie der Verbesserung des zerebralen Metabolismus (Ma et al. 2018). Diese Wirkmechanismen waren hauptsächlich im Hippocampus nachweisbar, sodass sich die Frage stellt, ob die Substanz 843 möglicherweise leichter in den Hippocampus als in andere Hirnareale, wie beispielsweise die Amygdala, gelangt. Dies könnte unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse zur Extinktion des signalvermittelten Furchtgedächtnisses eine Erklärung dafür liefern wieso die Furchtextinktion durch das *R. rosea* - Derivat 843 nicht beeinflusst wurde.

5.2. Analyse der neuronalen Aktivität

In einigen Studien wird dem c-fos-Protoonkogen eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität im Rahmen von Lernprozessen zugeschrieben. Die Expression des IEG c-fos wird in bestimmten Gehirnregionen, die an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt sind, schnell und selektiv hochreguliert (Jaworski et al. 2018). In den letzten Jahren haben Studien an Neuronen, die c-fos exprimieren, gezeigt, dass IEG-positive Neurone während des Lernens Informationen codieren und speichern, die für den Speicherabruf erforderlich

sind, was darauf hindeutet, dass sie an der Bildung des Langzeitgedächtnisses beteiligt sind (Minatohara et al. 2015). Um festzustellen, ob das *Rhodiola*-Derivat einen Einfluss auf die neuronale Aktivität und damit auch auf die Expression dieses Protoonkogens hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob es quantitative Unterschiede bezüglich *c-fos* exprimierender Neurone in bestimmten Hippocampus-Regionen zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren gibt.

Die Auswertung der histologischen Gehirnschnitte nach immunhistochemischer *c-fos*-Färbung ergab eine durchschnittlich höhere *c-fos*-Aktivität in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus bei der mit 843 behandelten Gruppe als in der Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen passen zu einer früheren Studie von Besnard und Kollegen (2020), die zeigte, dass das kontextuelle Furchtlernen zu einer erhöhten Anzahl an *c-fos* positiven Zellen in der CA3- und CA1-Region, jedoch nicht im Gyrus Dentatus führte. Dabei war die *c-fos*-Induktion im CA3-Bereich höher als im CA1-Bereich, was darauf hindeuten könnte, dass die CA3-Region für das kontextuelle Gedächtnis wichtiger sein könnte, da sie für die Reorganisation von Informationen und als assoziatives Speichernetzwerk dient (Besnard et al., 2020). Dies könnte an den jeweils unterschiedlichen efferenten Signalwegen von CA3 und CA1 liegen (Cai et al. 2018). Somit könnte es sein, dass die Substanz 843 über eine erhöhte neuronale Aktivität in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus zu einem verstärkten kontextuellen Furchtgedächtnis führt. In der Literatur lassen sich für diese beiden hippocampalen Bereiche ähnlich positive Wirkungen von verschiedenen *Rhodiola*-Derivaten finden. So wird unter anderem über einen verminderten Hypoxie-induzierten Zelltod (durch chronische zerebrale Hypoperfusion) im CA1-Bereich des Hippocampus von Ratten im Sinne einer Neuroprotektion nach Applikation von *R. rosea* berichtet (Zhuang et al. 2019). In einer weiteren Studie konnte bei Mäusen, die mit FAE-20 behandelt wurden, eine erhöhte elektrische Erregbarkeit in patch-clamp Einzelzell-Ableitungen von CA1-Neuronen nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten diese Tiere im Rahmen einer kontextuellen Konditionierung ein stabileres Furchtgedächtnis als die Kontrolltiere (Michels et al. 2018). Diese Ergebnisse lassen sich auch mit unseren Beobachtungen zu der Kontext-abhängigen Furchtkonditionierung vereinbaren, denn die Wirkung der Substanz 843 auf hippocampale Strukturen ist nicht nur auf neuronaler Ebene an der erhöhten *c-fos* Expression zu sehen, sondern auch im verhaltensbiologischen Ansatz an erhöhten konditionierten *Freezing*-Werten als Zeichen eines verbesserten Furchtgedächtnisses (vgl. Kapitel 5.1.1). Dies legt nahe, dass die Substanz 843 neuronale Prozesse der

Langzeitgedächtnisbildung und des Hippocampus-abhängigen Furchtgedächtnisses positiv beeinflussen kann.

5.3. Einfluss von 843 auf die BDNF-Proteinexpression

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass Extrakte von *Rhodiola rosea* eine neuroprotektive Wirkung bei Fruchtfliegen aufweisen. Die Neuroprotektion läuft hier direkt über den PI3K-Signalweg ab, da der BDNF/TrkB-Signalweg bei Fliegen nicht existiert (Zhang et al., 2016). Die PI3K-Signalkaskade ist ein intrazellulärer Signalweg, der bei vielen Zellvorgängen, die das Zellwachstum, die Zellproliferation und den Zellstoffwechsel, sowie synaptische Plastizität regulieren, eine wichtige Rolle spielt (Sanchez-Algeria et al., 2018). Diese Kaskade kann bei Säugetieren auch über den bereits erwähnten BDNF/TrkB-Signalweg aktiviert werden (Rai et al., 2019). Im BDNF/TrkB-Signalweg führt eine Punktmutation an der Phosphorylierungsstelle Y515 (PI3K-Signalkaskade) des TrkB-Rezeptors zu einer Beeinträchtigung der Konsolidierung des Furchtgedächtnisses (Musumeci et al., 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch das Abrufen und die Extinktion von konditionierter Furcht bei lokaler Hemmung dieses Signalweges in der Amygdala beeinträchtigt werden (Kritman und Maroun, 2013; Slouzkey und Maroun, 2016), was die große Bedeutung dieses Signalweges in der Amygdala im Hinblick auf das Furchtlernen und die synaptische Plastizität unterstreicht (Endres, 2020). Es wäre also denkbar, dass auch der BDNF/TrkB-Signalweg über den PI3K-Signalweg als Ansatzpunkt für Modulatoren wie zum Beispiel FAE-20 dienen könnte.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit die Beeinflussung der BDNF-Proteinexpression im Hippocampus durch die Substanz 843 mittels ELISA untersucht. Wir fanden durch unsere Experimente hierzu heraus, dass die alleinige Substanzapplikation zu keinem signifikanten Anstieg des BDNF-Spiegels in der 843-Versuchsgruppe der unkontingierten Tiere führte (vgl. **Abb. 26**). Der BDNF-Gehalt blieb sowohl bei den 843- als auch bei den Kontrolltieren zu beiden Messpunkten (45 bzw. 90 Minuten nach Substanzapplikation) auf einem ähnlichen Niveau. Es konnte somit kein Effekt der Substanz 843 auf die basale BDNF-Konzentration nachgewiesen werden. Wir untersuchten daraufhin, ob ein Einfluss nach vorangegangener Furchtkonditionierung besteht, da BDNF bevorzugt auf neuronal aktive Neuronen wirkt, was

möglicherweise durch die Gabe der Substanz 843 verbessert werden kann. Dies scheint naheliegend, da z.B. bereits gezeigt werden konnte, dass BDNF alleine nicht das Neuritenwachstum von kortikalen Pyramidenneuronen anregt. Jedoch wird dies durch die Gabe von BDNF und die gleichzeitige Induktion neuronaler Aktivität durch NDMA-Rezeptoren erreicht (McAllister et al., 1996). Allerdings konnten wir in unserem Experiment lediglich im Vergleich zu den untrainierten Tieren einen generellen Anstieg des BDNF-Gehalts sowohl in der Substanz 843-Gruppe als auch in der 10%-Ethanol-Kontrollgruppe feststellen. Dieser ist vermutlich auf den Lernprozess durch die Konditionierung zurückzuführen. Das Rhodiola-Derivat 843 führte jedoch auch hier zu keinem signifikanten Effekt im Sinne eines Anstiegs der BDNF-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Kapitel 4.6).

Eine mögliche Erklärung für den nicht beobachteten Anstieg der BDNF-Konzentration nach den 843-Injektionen könnte die Wahl der Messzeitpunkte sein. Wir wählten hierfür jeweils 45 und 90 Minuten nach Substanzapplikation für den Durchlauf ohne Konditionierung und 45 Minuten nach vorangegangener Konditionierung. Da es bislang noch keine Daten zur BDNF-Proteinexpression im Hippocampus nach kontextueller Furchtkonditionierung gibt, wurden diese Zeitpunkte aufgrund früherer Studien gewählt, die zeigten, dass es in einem Zeitraum von 60 bis 120 Minuten nach signalvermittelter Furchtkonditionierung zu einem Anstieg der BDNF-Proteinexpression in der Amygdala und dem perirhinalen Kortex kommt (Schulz-Klaus et al. 2013; Ou et Gean, 2007). Allerdings scheint die Lern-induzierte BDNF-Expression kein paralleler, stereotyper Prozess zu sein, da die Peaks der Expression zwischen Amygdala (90 min) und perirhinalen Kortex (120 min) zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet werden. Für ein anderes Hippocampus-abhängiges Lernparadigma (passives Meideverhalten) konnte im Hippocampus eine gedächtnisrelevante BDNF-Proteinexpression 3 und 12 h nach der initialen Konditionierung nachgewiesen werden (Bekinschtein et al. 2007). Somit wäre es durchaus denkbar, dass unsere Analysezeitpunkte nicht gut gewählt waren, um den Einfluss von 843 auf eine Lern-induzierte BDNF-Proteinexpression zu untersuchen. Da wir allerdings im Vergleich zu den unkonditionierten Tieren eine generelle Erhöhung an BDNF-Protein beobachten konnten, scheint zum gewählten Zeitpunkt (45 min) die BDNF-Proteinexpression durch die Konditionierung beeinflusst zu sein.

Zusammenfassend zeigen unsere Experimente keinen Einfluss von 843 auf die BDNF-Proteinexpression in Hippocampus, Kortex und Präfrontalkortex. Diese Beobachtung

machten wir sowohl in naiven, als auch in unmittelbar zuvor furchtkonditionierten Tieren. Allerdings konnten wir eine - vermutlich durch den Lernprozess induzierte - generelle Erhöhung der BDNF-Proteinexpression in allen drei Gehirnarealen beobachten, die durch 843 aber nicht weiter gesteigert werden konnte. In Anbetracht der Erkenntnisse aus vorangegangenen Studien anderer Arbeitsgruppen, die zeigen dass verschiedene Lernprozesse in verschiedenen Gehirnarealen zu zeitlich unterschiedlichen eng begrenzten Peaks in der BDNF-Proteinexpression führen (Schulz-Klaus et al., 2013; Ou et Gean, 2007 & 2010; Bekinschtein et al., 2007), wäre es denkbar, dass wir in unseren Messung die für die Gedächtnisbildung relevanten Zeitpunkte verpasst haben und daher in unserem Experiment keinen Effekt der Substanz auf die Proteinexpression von BDNF nachweisen konnten. Um diese Möglichkeit weiter zu untersuchen, sollte in weiterführenden Experimenten zunächst an unbehandelten Tieren der Zeitverlauf der BDNF-Proteinexpression im Hippocampus nach kontextuellem Furchtlernen analysiert werden, um nachfolgend dann eine mögliche Wirkung von 843 auf die maximale BDNF-Proteinexpression zu untersuchen. Möglicherweise könnte der PI3K-Signalweg durch 843 auch unter Umgehung des BDNF/TrkB-Signalweges aktiviert werden. Es wäre daher interessant in weiterführenden Experimenten zu untersuchen ob der PI3K-Signalweg durch 843-Gabe beeinflusst werden kann.

6. Zusammenfassung

Viele aus *Rhodiola rosea* isolierte Extrakte und Einzelverbindungen haben pharmakologische Wirkungen auf verschiedene Organe und Regulationssysteme des Körpers. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass *R. rosea* einen therapeutischen Nutzen für die Behandlung verschiedener Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Depression, zerebrovaskuläre Erkrankungen, Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen hat. Außerdem weisen einige Ergebnisse auf die Verwendung als Immuntherapeutikum zur Behandlung von Krebs hin, da eine allgemeine antioxidative Wirkung im Körper und eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen beobachtet wurde (Zhuang et al. 2019). Darüber hinaus sind gedächtnissteigernde und neuroprotektive Wirkungen bekannt, die durch die Erhöhung des Noradrenalin- und Serotoningehalts im PFC sowie der Acetylcholin- und Dopaminkonzentration im limbischen System zustande kommen (Sellami et al., 2018). Besonders die beiden zuletzt genannten Wirkungen von *R. rosea* stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit, da sie sich mit möglichen Wirkweisen und Einflüssen eines *R. rosea*-Derivates auf die kognitiven Fähigkeiten der Maus beschäftigt. Vor allem stand hierbei die Substanz 843 im Mittelpunkt der Beobachtungen. Wir untersuchten mögliche Effekte einerseits auf verhaltensbiologischer Ebene, wobei das Lernen bei kontextuellem Furchtlernen und die Extinktion signalvermittelter Furcht als Versuchsansatz diente. Unsere Ergebnisse zum kontextabhängigen Lernen legen nahe, dass Mäuse, denen die Substanz 843 injiziert wurde, ein stabileres Furchtgedächtnis zeigten als die Kontrollgruppe und somit ein positiver Effekt auf die neuronale Plastizität im Hippocampus vorliegt. Die Versuchsergebnisse zur Extinktion der signalvermittelten Furcht zeigten allerdings keine gedächtnissteigernde Wirkung der Substanz 843. Auf neuronaler Ebene haben wir mögliche Auswirkungen der Substanz 843 auf die Expressionsrate des c-fos- und des BDNF-Proteins untersucht. Wir konnten feststellen, dass im Hinblick auf die c-fos-Synthese vor allem die hippocampalen Regionen CA3 und CA1 durch kontextuelles Furchtlernen stimuliert werden und die Expressionsrate dieses IEG signifikant gesteigert wird, was auf eine gesteigerte neuronale Aktivität in diesen Regionen hindeutet. Somit könnte das verbesserte kontextuelle Furchtlernen über eine gesteigerte neuronale Aktivität im Hippocampus erklärt werden. Die Tatsache, dass wir keine erhöhte BDNF-Konzentration in Kortex, frontalen Kortex oder Hippocampus nach Substanzapplikation nachweisen konnten deutet daraufhin, dass die Wirkung der Substanz 843 nicht über

BDNF-Signalwege vermittelt wird. Jedoch führte der bei einer Konditionierung ablaufende Lernprozess zu einem generellen Anstieg des BDNF-Gehalts in den untersuchten Gehirnregionen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die von *R. rosea* abgeleitete Substanz 843 in der Lage ist das Gedächtnis von Mäusen zu steigern. Zudem unterstützen diese Daten indirekt die Hypothese, dass *R. rosea* positive Wirkungen auf die kognitiven Fähigkeiten der Maus besitzt, und daher weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet rechtfertigt.

7. Literaturverzeichnis

1. Ahn, SH.; Jang, EH.; Choi, JH.; Lee, HR.; Bakes, J.; Kong, YY.; Kaang, BK. (2013): Basal anxiety during an open field test is correlated with individual differences in contextually conditioned fear in mice. In: *Animal Cells and Systems* 17 (3), S. 154 – 159.
2. Ademola YU.; Kehinde AT.; Atilade AO.; Aderinola AA.; Samuel MB. et al. (2018): Neurobehavioural Study on the Effect of Aqueous Extract of Citrus Medica Leaf on Prefrontal Cortex of Hyperglycemia Wistar Rats. In: *Journal of Molecular Histology and Medical Physiology* 3, S. 123.
3. Andero, R.; Ressler, KJ. (2012): Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. In: *Genes, brain, and behavior* 11 (5), S. 503–512.
4. Bechara, A.; Tranel, D.; Damasio, H.; Adolphs, R.; Rockland, C.; Damasio, AR. (1995): Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. In: *Science (New York, N.Y.)* 269 (5227), S. 1115–1118.
5. Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Igaz, LM.; Bevilacqua, LRM.; Izquierdo, I.; Medina, JH. (2007): Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. In: *Neuron* 53 (2), S. 261–277.
6. Belviranlı, M.; Okudan, N. (2015): The effects of Ginkgo biloba extract on cognitive functions in aged female rats: the role of oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor. In: *Behavioural Brain Research* 278, S. 453–461.
7. Besnard, A.; Miller, SM.; Sahay, A. (2020): Distinct Dorsal and Ventral Hippocampal CA3 Outputs Govern Contextual Fear Discrimination. In: *Cell reports* 30 (7), 2360-2373.e5
8. Björkholm, C.; Monteggia, LM. (2016): BDNF - a key transducer of antidepressant effects. In: *Neuropharmacology* 102, S. 72–79.
9. Borota, D.; Murray, E.; Keceli, G.; Chang, A.; Watabe, JM.; Ly, M. et al. (2014): Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. In: *Nature neuroscience* 17 (2), S. 201–203.
10. Boukezzzi, S.; Silva, C.; Nazarian, B.; Rousseau, PF.; Guedj, E.; Valenzuela-Moguillansky, C.; Khalfa, S. (2017): Bilateral Alternating Auditory Stimulations Facilitate Fear Extinction and Retrieval. In: *Frontiers in Psychology* 8, S. 990
11. Bräscher, A.; Kleinböhl, D.; Hölzl, R.; Becker, S. (2017): Differential Classical Conditioning of the Nocebo Effect. Increasing Heat-Pain Perception without Verbal Suggestions. In: *Frontiers in Psychology* 8.
12. Brigadski, T.; Lessmann, V. (2014): BDNF. Ein Regulator von Lern- und Gedächtnisprozessen mit klinischem Potenzial. In: *e-Neuroforum* 20 (1), S. 166–177.
13. Brigadski, T.; Leßmann, V. (2020): The physiology of regulated BDNF release. In: *Cell and tissue research* 382 (1), S. 15–45.

14. Bryant, CD.; Zhang, NN.; Sokoloff, G.; Fanselow, MS.; Ennes, HS.; Palmer, AA.; McRoberts, JA. (2008): Behavioral differences among C57BL/6 substrains. Implications for transgenic and knockout studies. In: *Journal of neurogenetics* 22 (4), S. 315 – 331.
15. Burgos-Robles, A.; Vidal-Gonzalez, I.; Santini, E.; Quirk, GJ. (2007): Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. In: *Neuron* 53 (6), S. 871–880.
16. Cai, CY.; Chen, C.; Zhou, Y.; Han, Z.; Qin, C.; Cao, B. et al. (2018): PSD-95-nNOS Coupling Regulates Contextual Fear Extinction in the Dorsal CA3. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 12775.
17. Cai, DJ.; Aharoni, D.; Shuman, T.; Shobe, J.; Biane, J.; Song, W. et al. (2016): A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. In: *Nature* 534 (7605), S. 115–118.
18. Campos, AC.; Fogaça, MV.; Aguiar, DC.; Guimarães, FS. (2013): Animal models of anxiety disorders and stress. In: *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)* 35 Suppl 2, S101-11.
19. Cappelletti, S.; Daria, P.; Sani, G.; Aromatario, M. (2015): Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? In: *Current Neuropharmacology* 13 (1), S. 71–88.
20. Chen, X.; Liu, J.; Gu, X.; Ding, F. (2008): Salidroside attenuates glutamate-induced apoptotic cell death in primary cultured hippocampal neurons of rats. In: *Brain research* 1238, S. 189–198.
21. Chen, Y.; Feng, Z.; Shen, M.; Lin, W.; Wang, Y.; Wang, S. et al. (2020): Insight into Ginkgo biloba L. Extract on the Improved Spatial Learning and Memory by Chemogenomics Knowledgebase, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulation, and Bioassay Validations. In: *ACS omega* 5 (5), S. 2428–2439.
22. Choi, DC.; Rothbaum, BO.; Gerardi, M.; Ressler, KJ. (2010): Pharmacological enhancement of behavioral therapy: focus on posttraumatic stress disorder. In: *Current topics in behavioral neurosciences* 2, S. 279–299.
23. Collingridge, GL.; Volianskis, A.; Bannister, N.; France, G.; Hanna, L.; Mercier, M. et al. (2013): The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. In: *Neuropharmacology* 64, S. 13–26.
24. Colucci-D'Amato, L.; Speranza, L.; Volpicelli, F. (2020): Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 21 (20).
25. Costa, AA.; Morato, S.; Roque, AC.; Tinós, R. (2014): A computational model for exploratory activity of rats with different anxiety levels in elevated plus-maze. In: *Journal of Neuroscience Methods* 236, S. 44–50.
26. Cowansage, KK.; LeDoux, JE.; Monfils, MH. (2010): Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. In: *Current molecular pharmacology* 3 (1), S. 12–29.

27. Curzon, P.; Rustay, NR.; Browman, KE. (2009): Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents: CRC Press/Taylor & Francis.
28. Davis, M.; Ressler, K.; Rothbaum, BO.; Richardson, R. (2006): Effects of D-cycloserine on extinction: translation from preclinical to clinical work. In: *Biological psychiatry* 60 (4), S. 369–375.
29. DeOca, BM.; DeCola, JP.; Maren, S.; Fanselow, MS. (1998): Distinct Regions of the Periaqueductal Gray Are Involved in the Acquisition and Expression of Defensive Responses. In: *The Journal of Neuroscience*. 18 (9), S. 3426–3432.
30. Edelmann, E.; Lessmann, V.; Brigadski, T. (2014): Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. In: *Neuropharmacology* 76 Pt C, S. 610–627.
31. Egan, MF.; Kojima, M.; Callicott, JH.; Goldberg, TE.; Kolachana, BS.; Bertolino, A. et al. (2003): The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. In: *Cell* 112 (2), S. 257–269.
32. Ehlert, U. (2013): *Verhaltensmedizin*; Springer Berlin Heidelberg; S. 34 – 38.
33. Ehrlich, I.; Humeau, Y.; Grenier, F.; Ciochi, S.; Herry, C.; Lüthi, A. (2009): Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. In: *Neuron* 62 (6), S. 757–771.
34. Elman, I.; Borsook, D. (2018): Threat Response System. Parallel Brain Processes in Pain vis-à-vis Fear and Anxiety. In: *Frontiers in Psychiatry* 9.
35. Endres, T. (2020): Die Rolle des BDNF/TrkB-Signalweges bei Lernprozessen in Wildtyp-Mäusen und einem Mausmodell des Morbus Alzheimer; *Habilitationsschrift Medizinische Fakultät OvGU Magdeburg*, S.57 – 58.
36. Fanselow, MS.; Dong, HW. (2010): Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? In: *Neuron* 65 (1), S. 7–19.
37. Feder, A.; Nestler, EJ.; Charney, DS. (2009): Psychobiology and molecular genetics of resilience. In: *Nature reviews. Neuroscience* 10 (6), S. 446–457.
38. Fendt, M.; Fanselow, MS. (1999): The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23 (5), S. 743–760.
39. Fendt, M.; Parsons, MH.; Apfelbach, R.; Carthey, AJR.; Dickman, CR.; Endres, T. et al. (2020): Context and trade-offs characterize real-world threat detection systems: A review and comprehensive framework to improve research practice and resolve the translational crisis. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 115, S. 25–33.
40. Fenster, RJ.; Lebois, LAM.; Ressler, KJ.; Suh, J. (2018): Brain circuit dysfunction in post-traumatic stress disorder: from mouse to man. In: *Nature reviews. Neuroscience* 19 (9), S. 535–551.
41. Fond, G.; Micoulaud-Franchi, JA.; Brunel, L.; Macgregor, A.; Miot, S.; Lopez, R. et al. (2015): Innovative mechanisms of action for pharmaceutical cognitive enhancement: A systematic review. In: *Psychiatry research* 229 (1-2), S. 12–20.
42. Franke, AG.; Heinrich, I.; Lieb, K.; Fellgiebel, A. (2014): The use of Ginkgo biloba in healthy elderly. In: *Age* 36 (1), S. 435–444.

43. Franzmeier, N.; Ren, J.; Damm, A.; Monté-Rubio, G.; Boada, M.; Ruiz, A. et al. (2021): The BDNFVal66Met SNP modulates the association between beta-amyloid and hippocampal disconnection in Alzheimer's disease. In: *Molecular Psychiatry* 26 (2), S. 614–628.
44. Fraunhofer IZI, Elevates Plus Maze (Abgerufen am 07.03.2021, 17:57 Uhr): <https://www.izi.fraunhofer.de/en/central-facilities/center-for-experimental-medicine/preclinical-models/models/elevated-plus-maze.html>
45. Gale, GD.; Anagnostaras, SG.; Godsil, BP.; Mitchell, S.; Nozawa, T.; Sage, JR. et al. (2004): Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. In: *The Journal of Neuroscience*. 24 (15), S. 3810–3815
46. Gallo, FT.; Katche, C.; Morici, JF.; Medina, JH.; Weisstaub, NV. (2018): Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 12.
47. Grön, G.; Kirstein, M.; Thielscher, A.; Riepe, MW.; Spitzer, M. (2005): Cholinergic enhancement of episodic memory in healthy young adults. In: *Psychopharmacology* 182 (1), S. 170–179.
48. Gruber, T. (2018): *Gedächtnis*; Springer Berlin Heidelberg; S.50.
49. Haake, A.; Nguyen, K.; Friedman, L.; Chakkampambil, B.; Grossberg, GT. (2020): An update on the utility and safety of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. In: *Expert opinion on drug safety* 19 (2), S. 147–157.
50. Haaker, J.; Maren, S.; Andreatta, M.; Merz, CJ.; Richter, J.; Richter, SH. et al. (2019): Making translation work: Harmonizing cross-species methodology in the behavioural neuroscience of Pavlovian fear conditioning. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 107, S. 329–345.
51. Hamm, A.; Wendt, J.; Volkmann, M. (2017): Extinktion: Neurowissenschaftliche Erkenntnisse zur Frage, wie Menschen sich ändern. In: *Verhaltenstherapie* 27 (1), S. 16–26.
52. Herry, C.; Ciocchi, S.; Senn, V.; Demmou, L.; Müller, C.; Lüthi, A. (2008): Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. In: *Nature* 454 (7204), S. 600–606.
53. Herry, C.; Ferraguti, F.; Singewald, N.; Letzkus, JJ.; Ehrlich, I.; Lüthi, A. (2010): Neuronal circuits of fear extinction. In: *The European journal of neuroscience* 31 (4), S. 599–612.
54. Himanshu, S. (2020): A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. In: *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* 18 (3), S. 341–351.
55. Izquierdo, I.; Furini, CRG.; Myskiw, JC. (2016): Fear Memory. In: *Physiological reviews* 96 (2), S. 695–750.
56. Jaworski, J.; Kalita, K.; Knapska, E. (2018): c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. In: *Acta neurobiologiae experimentalis* 78 (4), S. 287–296.
57. Jiang, L.; Zhang, H.; Wang, C.; Ming, F.; Shi, X.; Yang, M. (2019): Serum level of brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease: a meta-analysis. In: *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 88, S. 168–174.

58. Johansen, JP.; Cain, CK.; Ostroff, LE.; LeDoux, JE. (2011): Molecular mechanisms of fear learning and memory. In: *Cell* 147 (3), S. 509–524.
59. Kindt, M. (2018): The surprising subtleties of changing fear memory. A challenge for translational science. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373 (1742).
60. Kinnavane, L.; Albasser, MM.; Aggleton, JP. (2015): Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. In: *Behavioural Brain Research* 285, S. 67–78.
61. Kowiański, P.; Lietzau, G.; Czuba, E.; Waśkow, M.; Steliga, A.; Moryś, J. (2018): BDNF. A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. In: *Cellular and Molecular Neurobiology* 38 (3), S. 579–593.
62. Kreutzmann, JC.; Marin, MF.; Fendt, M.; Milad, MR.; Ressler, K.; Jovanovic, T. (2021): Unconditioned response to an aversive stimulus as predictor of response to conditioned fear and safety: A cross-species study. In: *Behavioural Brain Research* 402, S. 113105.
63. Kritman, M.; Maroun, M. (2013): Inhibition of the PI3 kinase cascade in corticolimbic circuit: temporal and differential effects on contextual fear and extinction. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 16 (4), S. 825–833.
64. Lang, PJ.; Davis, M.; Öhman, A. (2000): Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. In: *Journal of affective disorders* 61 (3), S. 137–159.
65. Laske, C.; Stransky, E.; Leyhe, T.; Eschweiler, GW.; Wittorf, A.; Richartz, E. et al. (2006): Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. In: *Journal of neural transmission* 113 (9), S. 1217–1224.
66. LeDoux, JE. (2000): Emotion circuits in the brain. In: *Annual review of neuroscience* 23, S. 155–184.
67. LeDoux, JE. (2007): The amygdala. In: *Current Biology* 17 (20), S. 868 – 874.
68. LeDoux, JE. (2014): Coming to terms with fear. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (8), S. 2871–2878.
69. Lessmann, V.; Gottmann, K.; Malcangio, M. (2003): Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. In: *Progress in Neurobiology* 69 (5), S. 341–374.
70. Levy, I.; Schiller, D. (2021): Neural Computations of Threat. In: *Trends in cognitive sciences* 25 (2), S. 151–171.
71. Limanaqi, F.; Biagioni, F.; Busceti, CL.; Polzella, M.; Fabrizi, C.; Fornai, F. (2020): Potential Antidepressant Effects of *Scutellaria baicalensis*, *Hericium erinaceus* and *Rhodiola rosea*. In: *Antioxidants* 9 (3).
72. Lovett-Barron, M.; Kaifosh, P.; Kheirbek, MA.; Danielson, N.; Zaremba, JD.; Reardon, TR. et al. (2014): Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6173), S. 857–863.
73. Ma, GP.; Zheng, Q.; Xu, MB.; Zhou, XL.; Lu, L.; Li, ZX.; Zheng, GQ. (2018): *Rhodiola rosea* L. Improves Learning and Memory Function: Preclinical Evidence and Possible Mechanisms. In: *Frontiers in Pharmacology* 9.

74. Maren, S.; Quirk, GJ. (2004): Neuronal signalling of fear memory. In: *Nature reviews. Neuroscience* 5 (11), S. 844–852.
75. Maren, S.; Phan, KL.; Liberzon, I. (2013): The contextual brain. Implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. In: *Nature reviews. Neuroscience* 14 (6), S. 417–428.
76. Marks, WD.; Yokose, J.; Kitamura, T.; Ogawa, SK. (2022): Neuronal Ensembles Organize Activity to Generate Contextual Memory. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 16, S. 805132.
77. McAllister, AK.; Katz, LC.; Lo, DC. (1996): Neurotrophin Regulation of Cortical Dendritic Growth Requires Activity. In: *Neuron* 17 (6), S. 1057–1064.
78. Mehlman, MJ. (2004): Cognition-Enhancing Drugs. In: *The Milbank Quarterly* 82 (3), S. 483–506.
79. Mekada, K.; Abe, K.; Murakami, A.; Nakamura, S.; Nakata, H.; Moriwaki, K.; Obata Y., Yoshiki A. (2009): Genetic Differences among C57BL/6 Substrains. In: *Experimental Animals* 58 (2), S. 141 – 149.
80. Michels, B.; Zwaka, H.; Bartels, R.; Lushchak, O.; Franke, K.; Endres, T. et al. (2018): Memory enhancement by ferulic acid ester across species. In: *Science Advances* 4 (10), eaat6994.
81. Micoulaud, FG. (2015): Neuroenhancement in Healthy Adults, Part I: Pharmaceutical Cognitive Enhancement: A Systematic Review. In: *Journal of Clinical Research and Bioethics* 06 (02).
82. Minatohara, K.; Akiyoshi, M.; Okuno, H. (2015): Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8.
83. Mineka, S.; Oehlberg, K. (2008): The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. In: *Acta psychologica* 127 (3), S. 567–580.
84. Mohammadi, A.; Amooeian, VG.; Rashidi, E. (2018): Dysfunction in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway and Susceptibility to Schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's Diseases. In: *Current gene therapy* 18 (1), S. 45–63.
85. Moser, MB.; Moser, EI.; Forrest, E.; Andersen, P.; Morris, RG. (1995): Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (21), S. 9697–9701.
86. Musumeci, G.; Sciarretta, C.; Rodríguez-Moreno, A.; Al Banhaabouchi, M.; Negrete-Díaz, V.e; Costanzi, M. et al. (2009): TrkB modulates fear learning and amygdalar synaptic plasticity by specific docking sites. In: *The Journal of Neuroscience*. 29 (32), S. 10131–10143.
87. Ohman, A.; Mineka, S. (2001): Fears, phobias, and preparedness: toward an evolved module of fear and fear learning. In: *Psychological review* 108 (3), S. 483–522.
88. Ou, LC.; Gean, PW. (2007): Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. In: *Molecular Pharmacology* 72 (2), S. 350–358.

89. Ou, LC.; Yeh, SH.; Gean, PW. (2010): Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. In: *Neurobiology of learning and memory* 93 (3), S. 372–382.
90. Pape, HC.; Pare, D. (2010): Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. In: *Physiological reviews* 90 (2), S. 419–463.
91. Park, H.; Poo, M. (2013): Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. In: *Nature reviews. Neuroscience* 14 (1), S. 7–23.
92. Phillips, C. (2017): Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity. Making the Neuroplastic Connection. In: *Neural Plasticity 2017*, S. 1 – 3.
93. Ponder, CA.; Kliethermes, CL.; Drew, MR.; Muller, J.; Das, K.; Risbrough, VB. et al. (2007): Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. In: *Genes, brain, and behavior* 6 (8), S. 736–749.
94. Psotta, L.; Lessmann, V.; Endres, T.(2013): Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice. In: *Neurobiology of learning and memory* 103, S. 34–38.
95. Psotta, L.; Rockahr, C.; Gruss, M.; Kirches, E.; Braun, K.; Lessmann, V. et al. (2015): Impact of an additional chronic BDNF reduction on learning performance in an Alzheimer mouse model. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 9, S. 58.
96. Quirk, GJ.; Mueller, D. (2008): Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. In: *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33 (1), S. 56 – 72.
97. Radomska-Leśniewska, DM.; Skopiński, P.; Bałan, BJ.; Białoszewska, A.; Józwiak, J.; Rokicki, D. et al. (2015): Angiomodulatory properties of *Rhodiola* spp. and other natural antioxidants. In: *Central-European Journal of Immunology* 40 (2), S. 249–262.
98. Rai SN.; Dilnashin H.; Birla H.; Singh SS.; Zahra W.; Rathore AS.; Singh BK.; Singh SP. (2019) The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. In: *Neurotoxicity Research* 35: S. 775-795.
99. Restivo, L.; Tafi, E.; Ammassari-Teule, M.; Marie, H. (2009): Viral-mediated expression of a constitutively active form of CREB in hippocampal neurons increases memory. In: *Hippocampus* 19 (3), S. 228–234.
100. Risbrough, V. (2010): Behavioral correlates of anxiety. In: *Current topics in behavioral neurosciences* 2, S. 205 – 228.
101. Sahakian, B.; Morein-Zamir, S. (2007): Professor's little helper. In: *Nature* 450 (7173), S. 1157–1159.
102. Sánchez-Alegría, K.; Flores-León, M.; Avila-Muñoz, E.; Rodríguez-Corona, N.; Arias, C. (2018): PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions. In: *International journal of molecular sciences* 19 (12).
103. Sangiovanni, E.; Brivio, P.; Dell'Agli, M.; Calabrese, F. (2017): Botanicals as Modulators of Neuroplasticity: Focus on BDNF. In: *Neural Plasticity 2017*, S. 5965371.

104. Schulz-Klaus, B.; Lessmann, V.; Endres, T. (2013): BDNF-dependent consolidation of fear memories in the perirhinal cortex. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 7, S. 205.
105. Schuster, J.; Mitchell, ES. (2019): More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. In: *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 89, S. 263–274.
106. Seibenhener, ML.; Wooten, MC. (2015): Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. In: *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (96).
107. Sellami, M.; Slimeni, O.; Pokrywka, A.; Kuvačić, G.; D Hayes, L.; Milic, M.; Padulo, J. (2018): Herbal medicine for sports: a review. In: *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 15.
108. Shen, T.; You, Y.; Joseph, C.; Mirzaei, M.; Klistorner, A.; Graham, SL.; Gupta, V. (2018): BDNF Polymorphism: A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders. In: *Aging and Disease* 9 (3), S. 523–536.
109. Singewald, N.; Schmuckermair, C.; Whittle, N.; Holmes, A.; Ressler, KJ. (2015): Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. In: *Pharmacology & therapeutics* 149, S. 150–190.
110. Slouzkey, I.; Maroun, M. (2016): PI3-kinase cascade has a differential role in acquisition and extinction of conditioned fear memory in juvenile and adult rats. In: *Learning & memory* 23 (12), S. 723–731.
111. Solomon, RO.; McCabe, BJ. (2015): Molecular mechanisms of memory in imprinting. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 50, S. 56–69.
112. Stein, MB.; Steckler, T. (2010): *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment*; Springer Berlin Heidelberg; S.251 – 261.
113. Suliman, NA.; Mat T.; Che N.; Mohd M., Mohamad A.; Adenan, MI.; Hidayat B.; Mohamad T.; Basir, R. (2016): Establishing Natural Nootropics: Recent Molecular Enhancement Influenced by Natural Nootropic. In: *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2016.
114. Tao, H.; Wu, X.; Cao, J.; Peng, Y.; Wang, A.; Pei, J. et al. (2019): *Rhodiola species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study*. In: *Medicinal research reviews* 39 (5), S. 1779–1850.
115. Tovote, P.; Fadok, JP.; Luthi, A. (2015): Neuronal circuits for fear and anxiety. In: *Nature reviews. Neuroscience* 16 (6), S. 317–331.
116. Vasileva, LV.; Getova, DP.; Doncheva, ND.; Marchev, AS.; Georgiev, MI. (2016): Beneficial effect of commercial *Rhodiola* extract in rats with scopolamine-induced memory impairment on active avoidance. In: *Journal of Ethnopharmacology* 193, S. 586–591.
117. Vigot, R. (2003): La dépression synaptique à long-terme: un mécanisme pour la mémoire et l'apprentissage au niveau du cervelet. In: *Medecine sciences : M/S* 19 (4), S. 437–441.
118. Vuralli, D.; Wattiez, AS.; Russo, AF.; Bolay, H. (2019): Behavioral and cognitive animal models in headache research. In: *The Journal of Headache and Pain* 20 (1).

119. Whittle, N.; Hauschild, M.; Lubec, G.; Holmes, A.; Singewald, N. (2010): Rescue of impaired fear extinction and normalization of cortico-amygdala circuit dysfunction in a genetic mouse model by dietary zinc restriction. In: *The Journal of Neuroscience*. 30 (41), S. 13586–13596.
120. Wilkinson, DS.; Gould, TJ. (2011): The effects of galantamine on nicotine withdrawal-induced deficits in contextual fear conditioning in C57BL/6 mice. In: *Behavioural Brain Research* 223 (1), S. 53–57.
121. Wotjak, CT.; Pape, HC. (2013): Neuronale Schaltkreise von Furchtgedächtnis und Furchtextinktion. In: *e-Neuroforum* 19 (3), S. 92 – 103.
122. Wotjak, CT. (2019): Sound check, stage design and screen plot - how to increase the comparability of fear conditioning and fear extinction experiments. In: *Psychopharmacology* 236 (1), S. 33–48.
123. Yang, SJ.; Yu, HY.; Kang, DY.; Ma, ZQ.; Qu, R.; Fu, Q.; Ma, SP. (2014): Antidepressant-like effects of salidroside on olfactory bulbectomy-induced pro-inflammatory cytokine production and hyperactivity of HPA axis in rats. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 124, S. 451–457.
124. Yeh, YC.; Parekh, AB. (2018): *CRAC Channels and Ca²⁺-Dependent Gene Expression*: CRC Press/Taylor & Francis.
125. Yiu, AP.; Mercaldo, V.; Yan, C.; Richards, B.; Rashid, AJ.; Hsiang, HL. et al. (2014): Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. In: *Neuron* 83 (3), S. 722–735.
126. Zhang B.; Wang Y.; Li H.; Xiong R.; Zhao Z.; Chu X.; Li Q.; Sun S.; Chen S. (2016) Neuroprotective effects of salidroside through PI3K/Akt pathway activation in Alzheimer's disease models. In: *Drug Design, Development and Therapy* 10: S. 1335-1343.
127. Zhu, L.; Wei, T.; Gao, J.; Chang, X.; He, H.; Miao, M.; Yan, T. (2015): Salidroside attenuates lipopolysaccharide (LPS) induced serum cytokines and depressive-like behavior in mice. In: *Neuroscience letters* 606, S. 1–6.
128. Zhuang, W.; Yue, L.; Dang, X.; Chen, F.; Gong, Y.; Lin, X.; Luo, Y. (2019): Rosenroot (Rhodiola): Potential Applications in Aging-related Diseases. In: *Aging and Disease* 10 (1), S. 134–146.
129. Zwanzger, P.; Singewald, N.; Bandelow, B. (2021): Pharmakotherapie von Angsterkrankungen – leitliniengerechte Therapie und Neuentwicklungen. In: *Der Nervenarzt*.

8. Anhang

8.1. Danksagungen

Die Danksagung ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

8.2. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Wirkung von Rhodiola-Derivaten auf die kognitiven Fähigkeiten der Maus“ im Institut der Physiologie mit Unterstützung durch meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Volkmar Leßmann und meinen Betreuer Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Endres 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 04.08.2022

Sobia-Shakoor Bhutta

8.3. Darstellung des Bildungsweges

Die Darstellung des Bildungsweges ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.