

Untersuchungen zur Rolle des endogenen Cannabinoidsystems bei der Anpassung an aversive Situationen

Kornelia Kamprath



**Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Untersuchungen zur Rolle des
endogenen Cannabinoidsystems bei der
Anpassung an aversive Situationen**

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Kornelia Kamprath,
geb. am 04.10.1975
in Vacha

München, 2006

Promotionsbetreuer: Dr. Carsten T. Wotjak

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Landgraf

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Schuller

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2006

HAUT ZU STEIN

An manchen Tagen singen Vögel völlig aus dem Ton
Und die Melodie schmerzt im Ohr
Sie sangen falsch öfters schon
Doch diesmal ist es anders als die Male davor
Plötzlicher Hagel am Mittag drosch ihnen in ihre Teller
Er konnte sich nicht mehr rühren
Angst ist wie eine Leiche im Keller
Ohne Ort und Zeit
Und du vergisst, dass du sie vergessen hast

Die Geliebte versinkt im Treibsand
Dort drüben, kannst du sie sehen?
Das schwarze Haar umfasst der tobende Wind
Er bricht dein Wort, er trägt sie fort
Bruder sprich, kann es sein
Du versuchst zu gehen, doch deine Haut wird Stein
Haut wird Stein

An manchen Tagen singen Vögel völlig aus dem Ton
Irgendwie kennst du die Melodie
Du hörtest sie davor, doch sie schmerzt dein Ohr
Doch du vergisst Ort und Zeit
Und vergisst, dass du sie vergessen hast

Die Geliebte versinkt im Treibsand
Dort drüben, kannst du sie sehen?
Das schwarze Haar umfasst der tobende Wind
Er bricht dein Wort, er trägt sie fort
Bruder sprich, kann es sein
Du versuchst zu gehen, doch deine Haut wird Stein

Haut wird Stein

Haut zu Stein.

(Slime, 1992)

Vorwort

Obwohl Emotionen eine große Rolle in unserem Leben spielen, gewann die Erforschung neurobiologischer Grundlagen emotionalen Verhaltens erst in den letzten beiden Jahrzehnten zunehmend an Aufmerksamkeit. Die Ursache dafür liegt in der Problematik der Zugänglichkeit im Tiermodell: Wie kann man in Tieren zuverlässig Freude, Wut, Liebe, Hass, Ekel oder Trauer erzeugen und messen? So sind Angst und Furcht heute die neurobiologisch am besten charakterisierten Emotionen, was sich größtenteils auf gut etablierte Tiermodelle zurückführen lässt. Angst und Furcht sind essenziell, um das Überleben von Mensch und Tier zu sichern, denn sie ermöglichen ein frühzeitiges Erkennen und Vermeiden von potenziellen Gefahren. Bereits die Erwartung einer gefährvollen Situation kann Furchtreaktionen auslösen und somit dient die Erinnerung an solch aversive Situationen der Vermeidung von Gefahren in der Zukunft. Wenn sich jedoch eine erwartete Gefahr als harmlos herausstellt, müssen Furchtreaktionen schnell abklingen, um optimale Anpassung zu gewährleisten. Überschießende oder zu lang andauernde Furchtreaktionen können das Kennzeichen pathologischer Zustände sein. Wo Angst und Furcht einerseits das Überleben sichern, können folglich Defizite in der aktuellen Anpassung von Angst- und Furchtverhalten das Gegenteil bewirken.

Neurale Systeme, die das Abklingen von Furchtreaktionen vermitteln, stellen somit wichtige therapeutische Zielstrukturen zur Behandlung von Angsterkrankungen wie z.B. Phobien oder der posttraumatischen Belastungsstörung dar. Das endogene Cannabinoidsystem des Gehirns, das erst in den letzten Jahren zunehmend charakterisiert wurde, scheint eine exponierte Rolle beim Abklingen von Furchtreaktionen zu spielen. Obwohl sich die Hinweise auf eine Furcht reduzierende Funktion des Endocannabinoidsystems häufen, gibt es auch widersprüchliche Befunde. Darum besteht das Ziel dieser Arbeit darin, die Bedeutung des Endocannabinoidsystems beim Abklingen erlernter Furchtreaktionen genauer zu charakterisieren.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	5
INHALTSVERZEICHNIS	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	11
EINLEITUNG	14
1 DAS GEDÄCHTNIS FÜR ANGST UND FURCHT _____	14
1.1 Angst & Furcht – Begriffe im Wandel der Zeit.....	14
1.2 Angst- und Furchtverhalten bei Mäusen	16
1.3 Erlernte vs. Angeborene Furcht	17
1.4 Die Furchtkonditionierung	19
1.5 Sensitivierung.....	21
1.6 Extinktion und Habituation	22
1.6.1 Begriffsklärung: Was ist Extinktion?.....	22
1.6.2 Hypothesen der Extinktion	22
1.6.2.1 Lernpsychologische Ansätze	22
1.6.2.2 Extinktion oder Rekonsolidierung?	23
1.6.2.3 Nicht-assoziative Hypothesen der Extinktion: die Habituation .	23
2 DAS ENDOGENE CANNABINOIDSYSTEM _____	24
2.1 Das Endocannabinoidsystem – eine Einführung	25
2.2 Die Endocannabinoid-CB1-Synapse.....	26
2.2.1 Synthese und Freisetzung von Endocannabinoiden.....	26
2.2.1.1 Synthese von Anandamid	27
2.2.1.2 Synthese von 2-AG	28
2.2.2 CB1-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden	28
2.2.3 Wiederaufnahme und Abbau von Endocannabinoiden.....	29
2.2.3.1 Abbau von Anandamid.....	29
2.2.3.2 Abbau von 2-AG	30
2.2.3.3 Wiederaufnahme von Endocannabinoiden in die Zelle.....	30
2.3 Lokalisation des CB1 Cannabinoidrezeptors	31
2.4 Die Rolle von CB1 in Furcht- und Angstantworten.....	33
ZIELE DER ARBEIT	36

Inhaltsverzeichnis	7
DISKUSSION	38
CB1-VERMITTELTE MODULATION VON KINASEN UND PHOSPHATASEN IM ,FURCHKREISLAUF' – ASSOZIATIVE ODER NICHT-ASSOZIATIVE PROZESSE? _____	41
SCHUTZ VOR ÜBERERREGBARKEIT – EINE GENERELLE FUNKTION VON CB1? _____	45
DAS TIERMODELL: CB1 ^{-/-} - UND INZUCHTMÄUSE _____	46
ZUR INTERPRETATION VON SENSITIVIERUNGSEXPERIMENTEN _____	50
FURCHKONDITIONIERUNG UND STRESS _____	52
ENDOCANNABINOIDE UND STRESS _____	54
AUSBLICK _____	58
BEGRIFFSDEFINITIONEN - ZUR ERLÄUTERUNG PSYCHOLOGISCHER BEGRIFFE	60
LITERATURVERZEICHNIS	63
DANKSAGUNG	80
ERKLÄRUNG	81
ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL BEI KOAUTORENSCHAFT	82
CURRICULUM VITAE	83
ANHANG I: ÜBERSICHT ZUR PHARMAKOLOGIE DES ENDOCANNABINOIDSYSTEMS DES GEHIRNS	
MANUSKRIFT 1	
MANUSKRIFT 2	
MANUSKRIFT 3	
MANUSKRIFT 4	

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AEA	Anandamid (<i>N</i> -arachidonylethanolamin)
AKT	Proteinkinase B (PKB)
AMPA	α -Amino-3-hydro-5-methyl-4-isoazol-propionsäure, Agonist von non-NMDA-Glutamatrezeptoren
AT	Anandamidtransporter
BLA	basolateraler Nucleus des Corpus amygdaloideum
BLAC	basolateraler Komplex des Corpus amygdaloideum (LA und BLA)
BNST	Nucleus interstitialis striae terminalis (Bed nucleus der Stria terminalis)
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB1	Cannabinoidrezeptor Typ1
CB2	Cannabinoidrezeptor Typ2
CEA	zentraler Nucleus des Corpus amygdaloideum
CER	konditionierte Reaktion, conditioned emotional response
CG	Cortex cingularis
CORT	Corticosteron
COX-2	Cyclooxygenase Typ2
CR	konditionierte Reaktion (allgemein)
CREB	cAMP-Reaktionselement bindendes Protein
CRH	Corticotropin freisetzendes (Releasing) Hormon
CS	konditionierter Stimulus
CTA	konditionierte Geschmacksaversion (conditioned taste aversion)
DAG	1,2-Diacylglycerol
DGL	Diacylglycerollipase
dHC	dorsaler Hippocampus

DSI	depolarisationsinduzierte Suppression inhibitorischer Ströme
EPM	Elevated Plus Maze
ERK	,extracellular signal-regulated kinase'; Art der MAPK, auch p42/p44
FAAH	Fettsäureamidhydrolase
G-Protein	Guanosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
Glu	Glutamat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HAB	Zuchttyp (Ratte/ Maus), der viel angstähnliches Verhalten zeigt
HNS	hypothalamo-neurohypophysäres System
HPA-Achse	hypothalamo-adenohypophysäre-adrenale Achse
IC	Colliculus inferior
icv	intracerebroventrikulär
IL	infralimbischer Cortex
IP ₃	Inositoltriphosphat
ITC	Massa intercalata ('intercalated cell masses')
LA	lateraler Nucleus des Corpus amygdaloideum
LAB	Zuchttyp (Ratte/ Maus), der wenig angstähnliches Verhalten zeigt
ICEA	lateraler Sektor des zentralen Nucleus des Corpus amygdaloideum
LS	laterales Septum
LTD _i	Langzeitunterdrückung inhibitorischer postsynaptischer Ströme
LTP	Langzeitpotenzierung
LVGCC	L-Typ-spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanal
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
mCEA	medialer Sektor des zentralen Nucleus des Corpus amygdaloideum
MDTB	Mouse Defensive Test Battery
MEA	medialer Nucleus des Corpus amygdaloideum
MGL	Monoglyceridlipase
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
mPFC	medialer PFC
NAC	Nucleus accumbens

NAT	<i>N</i> -acyltransferase
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
PAG	zentrales Höhlengrau (periaqueductal gray)
PE	Phosphatidylethanolamin
PFC	präfrontaler Cortex
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B, AKT
PL	prälimbischer Cortex
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PV	Phospholipidvorstufen
PVN	Nucleus paraventricularis hypothalami
SON	Nucleus supraopticus
TMT	Trimethylthiazolin, synthetische Komponente des Fuchsgeruchs
US	unkonditionierter Stimulus
vHC	ventraler Hippocampus
vmPFC	ventromedialer PFC
VR1	Vanilloidrezeptor Typ1

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, auf welche Art und Weise das endogene Cannabinoidsystem die Extinktion konditionierter Furcht vermittelt. Dabei gliedert sich diese Arbeit in vier Teile. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Modulation intrazellulärer Signalkaskaden durch den CB1 Cannabinoidrezeptor während der Extinktion konditionierter Furcht. Dafür wurden CB1 Cannabinoidrezeptor-*knockout* Mäuse einer Furchtkonditionierung und deren Extinktion unterzogen und danach der Phosphorylierungsstatus der Kinasen p42, p44 sowie der Proteinkinase B und das Expressionslevel der Phosphatase Calcineurin im basolateralen und zentralen Nucleus der Amygdala, im ventromedialen präfrontalen Cortex sowie im dorsalen und ventralen Hippocampus dieser Tiere gemessen. Die untersuchten Enzyme zeigten sich in diesen Hirnregionen, die in die Extinktion konditionierter Furcht involviert sind, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unterschiedlich reguliert. Diese Studie legt den Schluss nahe, dass Endocannabinoide die Extinktion konditionierter Furcht über die Modulation intrazellulärer Signalkaskaden vermitteln, die in Abhängigkeit von der jeweiligen Hirnstruktur unterschiedlich einbezogen sind.

Da bisherige Arbeiten zur allgemeinen Rolle von CB1 in verschiedenen Lernaufgaben kontroverse Ergebnisse lieferten und allein die Einbeziehung des Endocannabinoidsystems in die Extinktion konditionierter Furcht übereinstimmend gezeigt wurde, wird im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, inwieweit sich die Furchtkonditionierung von anderen Lernparadigmen unterscheidet. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen, dass die bei der Furchtkonditionierung auftretende unabdingbare, stark aversive Situation neben der klassischen Konditionierung auch eine Stress-Sensitivierung hervorrufen kann. Hierfür wurde gezeigt, dass bereits die Applikation eines milden elektrischen Fußschocks *per se* ausreicht, um eine unspezifische Erhöhung der Reaktivität des Tieres zu erzielen. Auf der Verhaltensebene zeigten schocksensitiviertere Tiere beispielsweise eine Furchtreaktion auf Töne, wie sie ebenfalls für die Furchtkonditionierung verwendet wurden, aber auch ein verstärktes angähnliches Verhalten im Hell-Dunkel-Meidetest. In einer Reihe von Experimenten wurde demonstriert, dass sich diese Erhöhung der Furchtantworten nach Applikation eines Fußschocks nicht auf eine Kontextgeneralisierung, d.h. auf kontextuelles assoziatives Lernen, zurückführen lässt. So zeigten auch Mäuse, die eine Furchtkonditionierung erfahren hatten, neben der Furchtreaktion auf den konditionierten Tonreiz ein verstärktes angähnliches Verhalten im Hell-Dunkel-Meidetest, was unterstreicht, dass während einer Furchtkonditionierung nicht nur assoziative, sondern auch nicht-assoziative Lernvorgänge, wie die Sensitivierung, induziert werden. Ähnliches gilt für die Extinktion der Furchtkonditionierung, die in derzeitigen Modellen als neue inhibitorische Assoziation zwischen konditioniertem Stimulus und dem Ausbleiben des vorhergesagten ‚Bestrafungsreizes‘ beschrieben wird. In der vorliegenden Arbeit wurde dargelegt, dass nicht-assoziative Habituationsprozesse, die bei wiederholter Präsentation

des konditionierten Stimulus auftreten, ebenfalls zur Extinktion konditionierter Furcht beitragen. Dieses erstmalig gezeigte Zusammenspiel assoziativer und nicht-assoziativer Prozesse bei der Akquisition und Extinktion konditionierter Furcht wurde in der ‚Zwei-Komponenten-Theorie‘ zum Gedächtnis konditionierter Furcht zusammengefasst.

Da vorhergehende Studien die Involvierung des Endocannabinoidsystems in die Extinktion konditionierter Furcht belegten, wurde im dritten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Endocannabinoide assoziatives Extinktionslernen oder Habituationsprozesse modulieren. In einer Reihe von Experimenten wurde gezeigt, dass der CB1 Cannabinoidrezeptor assoziatives Sicherheitslernen nicht beeinflusst – für Habituationsprozesse jedoch erforderlich ist. In einigen Experimenten konnte kein Einfluss des CB1 Cannabinoidrezeptors auf die Kurzzeitanpassung festgestellt werden, dennoch vermittelte der CB1 Cannabinoidrezeptor generell, d.h. auch in diesen Fällen, Langzeithabituation an aversive Situationen. Dies deutete darauf hin, dass das Endocannabinoidsystem Kurzzeitanpassung und Langzeithabituation über verschiedene Mechanismen vermittelt. Zusammenfassend wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das endogene Cannabinoidsystem als erstes molekulares Korrelat der Habituationskomponente der Furchtextinktion identifiziert.

Um die unterschiedliche Einbeziehung des Endocannabinoidsystems in die Kurzzeitanpassung an aversive Situationen besser zu verstehen, wurde im letzten Teil der Arbeit die Aversivität der Testsituation, d.h. die Intensität der Fußschocks während der Sensitivierung, systematisch verändert und danach die akute Furchtreaktion auf einen Ton gemessen. Nach geringen und starken Fußschocks waren Endocannabinoide nicht an der Kurzzeitanpassung beteiligt, lediglich die Applikation eines Fußschocks mittlerer Intensität führte dazu, dass Endocannabinoide ihre Furcht reduzierende Wirkung während der darauf folgenden Tonpräsentation entfalten konnten. Um zu erforschen, ob in stark aversiven Situationen der CB1 Cannabinoidrezeptor durch effiziente Endocannabinoid-Wiederaufnahme- und Abbauprozesse nicht genügend stimuliert wird, um Furchtreaktionen zu reduzieren, wurden Endocannabinoid-Wiederaufnahme- und Abbauprozesse limitiert. Dies führte zu einer verbesserten Anpassung an stark aversive Situationen, die sich in einer verringerten Furchtreaktion zeigte und somit eine therapeutische Ansatzmöglichkeit für Angsterkrankungen bilden könnte. Die hier neu gewonnen Erkenntnisse, namentlich dass eine bestimmte Aversivität erreicht werden muss, um das Endocannabinoidsystem zu aktivieren und dass bei sehr starker Aversivität die Furcht reduzierende Wirkung der Endocannabinoide durch effiziente Wiederaufnahme- und Abbauprozesse limitiert wird, wurde in der ‚Hypothese vom kritischen Bereich der Endocannabinoidwirkung‘ zusammengefasst. Auf diese Weise gewährleistet das Endocannabinoidsystem eine adäquate Anpassung an aversive Situationen, indem Furchtreaktionen in Situationen mittlerer Aversivität gedämpft werden, starke Aversivität jedoch eine starke Reaktion auslöst, um bei relevanten Stimuli und Ereignissen die Bildung eines Furchtgedächtnisses zu ermöglichen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen, dass sowohl bei der Akquisition als auch bei der Extinktion konditionierter Furcht Sensitivierung bzw. Habituation als nicht-assoziative Prozesse mitwirken. Dabei zeigte sich, dass das Endocannabinoidsystem die Extinktion konditionierter Furcht vermittelt, indem es Langzeithabituation ermöglicht und in einigen Fällen auch in die Kurzzeitanpassung involviert ist. Eine solche Einbeziehung des Endocannabinoidsystems in die akute Anpassung an aversive Situationen erwies sich als von der Aversivität der Situation abhängiger Prozess. Der CB1 Cannabinoidrezeptor wurde somit als erstes molekulares Korrelat der Habituationskomponente der Extinktion konditionierter Furcht identifiziert.

Einleitung

1 Das Gedächtnis für Angst und Furcht

Angst und Furcht sind Emotionen, die bei der Konfrontation mit einer Gefahr oder auch deren bloßer Erwartung entstehen. Sie haben sich während der Evolution als grundlegende Warn- und Schutzfunktionen bei vielen Tieren einschließlich des Menschen herausgebildet.

1.1 Angst & Furcht – Begriffe im Wandel der Zeit

Die Begriffe Angst und Furcht werden im alltäglichen Sprachgebrauch häufig synonym verwendet und es fällt schwer, zwischen beiden zu unterscheiden. Die heute gebräuchlichste Unterscheidung, Angst als ungerichtet und Furcht als gerichtet zu betrachten, leitet sich aus der modernen abendländischen Philosophie her: Während in der Antike bei Aristoteles und Platon Angst als physische Reaktion betrachtet wird, sieht Kierkegaard (1813 – 1855) die existentielle Angst als Wesensmerkmal menschlichen Denkens und der Willensfreiheit an. Kierkegaard beschreibt 1844 in seinem Aufsatz ‚Der Begriff Angst‘ den Unterschied zwischen Angst und Furcht (Kierkegaard, 1844):

Man findet den Begriff Angst kaum jemals in der Psychologie behandelt, ich muss deshalb darauf aufmerksam machen, dass er gänzlich verschieden ist von Furcht und ähnlichen Begriffen, die sich auf etwas Bestimmtes beziehen, während Angst die Wirklichkeit der Freiheit der Möglichkeit für die Möglichkeit ist.

Als sich im 19. Jahrhundert die Psychologie als eigenständige Wissenschaft entwickelte (1879 eröffnete Wilhelm Wundt das erste psychologische Laboratorium in Leipzig), wurde die zeitgenössische Philosophie als wichtige geistesgeschichtliche Quelle genutzt. Somit leiten sich viele Begriffe und Ideen der Psychologie ursprünglich aus der Philosophie her. Diese Ideen wurden weiterentwickelt und vertieft, verschiedene Strömungen in der Psychologie entstanden und auch die Begriffe Angst und Furcht sind diesem Wandel unterworfen, indem sie im jeweiligen psychologischen Gesamtkonzept interpretiert werden (z.B. psychoanalytische, lernpsychologische, kognitive Angsttheorien).

Im Gegensatz zu der auf einem geisteswissenschaftlichen Hintergrund basierenden Entwicklung der Psychologie folgt die Entwicklung der (Neuro-)Biologie naturwissenschaftlichen Ideen, d.h. die gleichen Denkansätze, die Physik und Chemie nutzen, um die unbelebte Natur zu studieren, werden auf die belebte Natur angewandt. Mit diesen ‚Werkzeugen‘ gelangen große Fortschritte in der Neurobiologie in Bezug auf die Erfor-

schung sensorischer Systeme, insbesondere des visuellen Systems (Nobelpreis Hubel & Wiesel). Die Erforschung von Emotionen wie Angst und Furcht in der Neurobiologie war hingegen lange Zeit nicht sehr populär. In den letzten Jahrzehnten entstanden jedoch immer mehr interdisziplinäre Forschungsansätze, so auch im ‚Grenzgebiet‘ zwischen Psychologie und Neurobiologie. Eine Konsequenz daraus ist der Versuch, Begrifflichkeiten aus der Psychologie wie Angst, Furcht - oder auch Bewusstsein, Kognition etc. - mit biologischen Konzepten zu hinterlegen. Oft leiten sich in der Psychologie Begriffsdefinitionen auch aus der Beschreibung der experimentellen Prozedur her, wohingegen die Biologie meist mit dem gleichen Begriff die zugrunde liegenden (beispielsweise neuronalen) Prozesse beschreibt. Um zu zeigen, in welchem Zusammenhang bestimmte psychologische Begriffe in dieser Arbeit verwendet wurden, sind am Ende der vorliegenden Arbeit entsprechende Begriffsdefinitionen zu finden.

Verschiedene Forscher haben Tiermodelle defensiven Verhaltens zur Unterscheidung von Angst und Furcht entwickelt (Blanchard & Blanchard, 1990; Lang et al., 2000). Dabei wird Furcht als Antwort auf eine aktuelle Gefahr, die ein aktives Handeln erfordert, und Angst als Antwort auf eine potenzielle Gefahr betrachtet. Eine zentrale Komponente der Angst ist die Risikobewertung (‚risk assessment‘), die experimentell als Annäherung und ‚Scannen‘ (Abtasten) der möglichen Gefahr gemessen werden kann. Die mentalen Aktivitäten, die sich mit der Bewertung potenzieller Gefahren befassen, werden als humanes Analogon zur Risikobewertung bei Tieren interpretiert und als Angst definiert. Gray und McNaughton (2000) kritisierten diesen Ansatz, da er sich auf den Ursprung der Angst bzw. Furcht auslösenden Reize bezieht und nicht auf die beobachtbaren Verhaltensmuster und die dem zugrunde liegenden neuronalen Systeme. Sie schlagen vor, die Begriffe ‚Angst‘ und ‚Furcht‘ generell zu vermeiden und stattdessen die vermittelnden Systeme – das ‚Fight-Flight-Freezing‘-System für Furcht und das ‚Behavioral Inhibition/ Risk Assessment‘-System für Angst - zu verwenden. Jedoch sind die beobachtbaren Verhaltensweisen nicht immer eindeutig einem System zuzuordnen, so kann Bewegungslosigkeit sowohl als Verhaltensstarre (‚Freezing‘) als auch als Verhaltenshemmung (‚Behavioral Inhibition‘) interpretiert werden.

Catherall (2003) betrachtet Furcht als Alarmzustand, der durch sensorischen Input ausgelöst wird und Angst als Alarmzustand, der durch kognitiven Input ausgelöst wird. Die zugrunde liegenden neuronalen Netze überlappen sich zwar teilweise, jedoch wird Furcht von bottom-up- und Angst von top-down-Prozessen bestimmt. Die Überlappung der neuronalen Netze kann zu ähnlichen Verhaltens-Outputs führen, was wiederum zur häufigen Verwechslung von Angst und Furcht führt. Außerdem kann sich Angst aus spezifischer Furcht entwickeln, was auch zur Ätiologie der Posttraumatischen Belastungsstörung beitragen kann.

Für die Anpassung an aversive Situationen spielen demzufolge beide Prozesse eine Rolle. Im Labor werden verschiedene Experimente eingesetzt, um Angst oder Furcht zu untersuchen. Dabei wird danach unterschieden, ob angst- oder furchtbezogene Parameter gemessen werden, denn wegen der teilweisen Überlappung und Komplexität von Angst- und Furchtsystem kann auch bei Experimenten zur Messung von Furchtpa-

parametern Angst erzeugt werden und umgekehrt. Experimente, bei denen angstbezogene Parameter gemessen werden, bieten meist die Möglichkeit, die Risikobewertung („risk assessment“ – die „Annäherung“ an eine potenzielle Gefahr) zu untersuchen. Dazu zählen z.B. Hell-Dunkel-Meidetests, das „Elevated Plus Maze“ (EPM) oder die „Mouse Defensive Test Battery“ (MDTB; Blanchard et al., 2001a). Im Gegensatz dazu wird in furchtbezogenen Experimenten meist nur das Furchtverhalten selbst gemessen, z.B. die Verhaltensstarre oder eine Potenzierung des Schreckreflexes während der Präsentation eines Prädatorengeruchs oder eines bestimmten Furchtreizes nach der Furchtkonditionierung.

1.2 Angst- und Furchtverhalten bei Mäusen

Angst- und Furchtreaktionen dienen dazu, Situationen, die Schmerz, Verletzung oder Tod zur Folge haben könnten, zu vermeiden und zählen damit zum defensiven Verhaltensrepertoire. Da die Verteidigung gegen unbelebte Reize zumeist entweder sehr einfach (z.B. scharfe Gegenstände, hohe und enge Plätze etc.) oder unmöglich (z.B. Naturkatastrophen) ist, hat sich das defensive Verhaltensrepertoire vor allem im Zusammenhang mit belebten Bedrohungsreizen, wie Räubern, Artgenossen, und gelegentlich artfremden Konkurrenten evolutiv entwickelt (Blanchard et al., 2001a; Blanchard et al., 2001b).

Im Allgemeinen wird die Intensität des Verteidigungsverhaltens von der Verteidigungsdistanz („defensive distance“), also der Distanz zum Bedrohungsreiz, bestimmt. Die Intensität des defensiven Verhaltens steigt, wenn die Verteidigungsdistanz abnimmt. Eine weit entfernte Bedrohung führt zur Unterbrechung der Aktivität, Orientierung zur Reizquelle hin und sensorischem Abtasten („vigilance“). Bei näheren Bedrohungsreizen wird in Abhängigkeit von der Gesamtsituation Flucht oder Verhaltensstarre („Freezing“) ausgelöst. Dabei spielt die Existenz von Fluchtwegen und ggf. die Spezies des Räubers eine Rolle. Ist beispielsweise ein Fluchtweg blockiert und der Bedrohungsreiz relativ nah, führt dies zu Verhaltensstarre, die gelegentlich von „Fluchtversuchen“ (z.B. Sprüngen) unterbrochen sein kann. Bei sehr großer Nähe des Bedrohungsreizes ist defensives Drohverhalten und, wenn der Kontakt unvermeidbar ist, defensives Attakieren zu beobachten (Blanchard et al., 2001a).

Wenn Art und Ort der Bedrohungsquelle unsicher sind, kann neben der Unterbrechung der Aktivität und Orientierung zur potenziellen Gefahr auch eine Annäherung und Untersuchung der möglichen Gefahr erfolgen (Risikobewertung; „risk assessment“). Je nach Situation kann eine solche Risikobewertung entweder, wenn die Bedrohung bestätigt wird, zu spezifischem Verteidigungsverhalten oder, bei Einstufung der Situation als gefahrlos, zur Rückkehr zu normalem, nicht-defensivem Verhalten führen.

Die beschriebenen Verhaltensweisen sind jedoch nicht artspezifisch für Mäuse, sondern bei vielen Säugerarten zu beobachten (Eisenberg, 1981). Zu den Gemeinsamkeiten defensiver Verhaltensmuster bei Säugern zählen (1) die Arten der Bedrohungsreize, die defensives Verhalten auslösen, (2) der Zusammenhang zwischen Art der Be-

drohungssituation und der Art des ausgelösten Verteidigungsverhaltens, (3) die defensiven Verhaltensweisen selbst und die Reihenfolge, in der sie ausgelöst werden und (4) die Auswirkungen solcher Verhaltensweisen auf die Umwelt (Blanchard et al., 2001a). Die Ähnlichkeit defensiver Verhaltensmuster bei Säugern ist eine wichtige Voraussetzung für die Übertragbarkeit tierexperimenteller Ansätze auf menschliche defensive Verhaltensweisen und deren Psychopathologien (Blanchard et al., 2001b).

Nach dem Konzept der Homologie von Verhaltensweisen ist zu erwarten, dass diese umso ähnlicher sind, je verwandter die zu vergleichenden Arten sind (vorausgesetzt der Lebensraum ist entsprechend ähnlich). In der Tat sind die defensiven Verhaltensmuster von Mäusen sehr ähnlich im Vergleich zu Ratten, insbesondere bei Wildtieren. Laborratten und Labormäuse unterscheiden sich stärker voneinander, wobei die Gründe in der Domestizierung liegen. Die Unterschiede beruhen vor allem auf einer höheren Risikobewertung ('risk assessment') bei Labormäusen im Vergleich zu Ratten und zu Wildmäusen (d.h. nach anfänglicher Flucht nähern sich Labormäuse häufiger der Gefahr an und untersuchen diese) und der hauptsächlich bei Ratten beobachteten Alarmvokalisation (Blanchard et al., 2001a). Die Unterschiede zwischen Wild- und Labormäusen lassen sich damit erklären, dass bei der Zucht von Labortieren nicht die natürlichen Selektionskriterien angewendet wurden. Außerdem wurden unterschiedliche Kriterien für die Zucht der verschiedenen Stämme von Labormäusen verwendet, was zu großen Unterschieden zwischen den Stämmen geführt hat (vgl. auch Wotjak, 2003). Das Furchtverhalten betreffend, wurden sowohl Unterschiede zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen im Langzeitgedächtnis für Furcht (Balogh & Wehner, 2003) als auch in der 'Löschung' und Erneuerung des Furchtgedächtnisses (Waddell et al., 2004) gefunden.

Aber auch innerhalb eines Stammes von Labormäusen (bei Männchen gleichen Alters) kann das Furchtverhalten in Abhängigkeit von Umgebung und Vorerfahrung der Tiere differieren. Die Labormäuse des C57Bl6/N-Stammes zeigten auf ein 17-20kHz Ultraschall-Ton-Muster von 85dB (ein solches Ton-Muster löst eine angeborene Furchtreaktion aus) im Heimkäfig meist Fluchtverhalten, eine Beschleunigung der Atmung und gelegentlich Sprünge oder 'tail rattling' – Verhaltensstarre hingegen war kaum zu sehen. Wenn das gleiche Ton-Muster in einem neuen, unbekanntem Käfig vorgespielt wurde, konnte man öfter Verhaltensstarre und weniger Fluchtverhalten beobachten. Eine ähnliche Verschiebung der defensiven Verhaltensweisen von Fluchtverhalten zur Verhaltensstarre wurde ausgelöst, wenn die Tiere eine negative Vorerfahrung, wie einen Fußschock, gemacht hatten (Mongeau et al., 2003).

1.3 Erlernte vs. Angeborene Furcht

Das gesamte Spektrum defensiver Verhaltensweisen dient dazu, das Überleben in bedrohlichen Situationen zu sichern. Um Gefahren möglichst frühzeitig zu erkennen und zu vermeiden, werden Erinnerungen an bedrohliche Situationen lange im Furchtgedächtnis gespeichert. So kann bereits die Erwartung einer Gefahr Furcht und Furcht-

reaktionen auslösen. Umgekehrt wirft dies die Frage auf, ob Angst und Furcht ausschließlich Lernergebnisse sind, oder ob es angeborene Angst und Furcht gibt.

Die Psychologie unterscheidet verschiedene Angsttheorien, die auch die neurobiologische Erforschung dieser Systeme stark prägen. Dazu zählen psychoanalytische, lernpsychologische, kognitive und psychophysiologische Angsttheorien. Da psychoanalytische und kognitive Angsttheorien hauptsächlich den humanen Bereich betreffen und im Tierexperiment schwer zugänglich sind, wird im Folgenden darauf nicht näher eingegangen. Lernpsychologische und psychophysiologische Angsttheorien sind hingegen im Tierexperiment gut zu untersuchen. Zu den psychophysiologischen Angsttheorien zählen beispielsweise Grays ‚Behavioral Inhibition System‘ (septo-hippocampales System, siehe Abschnitt 1.1; Gray & McNaughton, 2000), die bereits von Wilhelm Wundt entworfene und von Daniel E. Berlyne erweiterte Theorie von Aktivierung („Arousal“) und Habituation (Berlyne, 1960)¹ sowie die ‚Duale Prozesstheorie der Habituation‘ von Thompson und Groves (Groves & Thompson, 1970; Thompson & Spencer, 1966).

Wesentlich populärer in der Angstforschung sind jedoch die lernpsychologischen Angsttheorien, deren Ursprung im Behaviorismus liegt und dessen Verbreitung im angloamerikanischen Raum sicherlich zur Popularität dieser Ansätze beigetragen hat. So findet man Mowrers Zwei-Faktoren Theorie der Angstenstehung, die auf klassischer und instrumenteller Konditionierung basiert, beispielsweise als Lehrmeinung zur Angstenstehung (vgl. Birbaumer & Schmidt, 1999a; Mowrer, 1939). Die Popularität dieser Theorie erklärt neben der weiten Verbreitung der Furchtkonditionierung als experimentellem Ansatz zur Angstforschung auch, warum die Existenz angeborener Furchtreaktionen lange Zeit als umstritten galt. Seligman erweiterte die lernpsychologischen Angsttheorien um den Begriff der ‚Preparedness‘ (siehe *Begriffsdefinitionen*; Seligman, 1971). Öhman und Mineka entwickelten dieses Konzept weiter zu einem evolutionär entstandenen ‚Furchtmodul‘ und konnten in diesem Zusammenhang beispielsweise zeigen, dass bei einer Furchtkonditionierung mit Spinnen bessere Lernerfolge erzielt werden als mit Pistolen, obwohl beides furchtrelevante Reize sind (Mineka & Öhman, 2002; Öhman & Mineka, 2001). Diese Entwicklung lernpsychologischer Angsttheorien spiegelt den Trend vom Behaviorismus hin zu evolutionär-biologischen Konzepten wider. Angeborene Furchtreaktionen sind jedoch nicht Bestandteil dieser lernpsychologischen Ansätze und noch immer besteht die Debatte, ob Furcht auf un-konditioniertem (nicht-assoziativem) Wege entstehen kann (vgl. Sonderausgabe von ‚*Behaviour Research and Therapy*‘, Vol. 40, 2002: Fears born and bred: non-associative fear acquisition?). Abseits dieser strikt lernpsychologischen Konzepte findet man eine Fülle von Literatur zu ‚unkonditionierter‘ oder angeborener Furcht (Antoniadis & McDonald, 2001; Blair et al., 2005; Chen et al., 2006; Holahan & White, 2004; Lanuza et al., 2004; Vazdarjanova et al., 2001; Walker & Davis, 1997; Young, 2004). Bei

¹ Dabei werden Aktivierung und Habituation als wechselwirkende Prozesse beschrieben, wobei ein Zustand mittlerer Aktivierung als optimal angesehen wird. Angst wird dabei als Zustand zu starker Aktivierung betrachtet.

Labormäusen und –ratten wird angeborene Furcht meist mit Prädatorengeruch untersucht: So reagieren Tiere, die nie einen lebendigen Fuchs gesehen haben, mit einem ganzen Spektrum von Furcht- und Stressantworten auf Trimethylthiazolin (TMT, synthetischer Bestandteil des Fuchsgeruchs; Überblick siehe Fendt et al., 2005). Andere angeborene aversive Stimuli bei Mäusen sind z.B. laute (Ultraschall-)Töne (Mongeau et al., 2003) oder helles Licht. In den letzten Jahren konnten zunehmend Hirnstrukturen identifiziert werden, die vorrangig entweder an konditionierten oder an unkonditionierten Furchtreaktionen beteiligt sind (Walker & Davis, 1997; Rosen, 2004; Blair et al., 2005; Martinez et al., 2006).

Solche angeborenen Furchtreaktionen (,innate fear') sind jedoch grundsätzlich von dem psychologischen Konzept der ebenfalls angeborenen ,Angst als Eigenschaft' (trait anxiety) zu unterscheiden. Angeborene Furchtreaktionen haben sich evolutiv entwickelt (z.B. durch Koevolution von Räuber und Beute) und sind somit art- und stimulusspezifisch, wohingegen ,trait anxiety' eine unspezifische Ängstlichkeit auf verschiedene Stimuli beschreibt und als interindividuell zu betrachten ist, also nur einige Individuen einer Art betrifft (Überblick siehe Millan, 2003). Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Tiermodell für angeborene Furchtreaktionen (z.B. TMT), ist von einem Tiermodell für ,trait anxiety' zu erwarten, dass verschiedene Individuen einer Art mehr oder weniger ,angeboren ängstlich' in verschiedenen angstrelevanten Verhaltenstests reagieren. Ein solches Tiermodell ist mit Zuchttypen von Ratten (bzw. Mäusen) realisiert worden, die speziell darauf gezüchtet wurden, hohes angsthähnliches Verhalten (HAB-Zuchttyp) bzw. niedriges angsthähnliches Verhalten (LAB-Zuchttyp) zu zeigen, wobei HAB- und LAB-Tiere zur gleichen Art gehören (Übersicht siehe Landgraf & Wigger, 2002). Auf diese Art und Weise wird noch einmal der Unterschied von Angst und Furcht deutlich, denn obwohl es sich sowohl bei ,innate fear' als auch bei ,trait anxiety' um angeborene Merkmale handelt, sind sie doch grundsätzlich verschieden.

Im Gegensatz zu angeborenen Furchtreaktionen, die je nach Art durch bestimmte Reize ausgelöst werden und folglich wenig variabel sind, eignen sich erlernte Furchtreaktionen gut, um aktuelle Anpassungen an aversive Umweltsituationen zu untersuchen. Das klassische Paradigma zum Erlernen von Furchtreaktionen ist die Furchtkonditionierung.

1.4 Die Furchtkonditionierung

Die Furchtkonditionierung wird zur klassischen Pavlovschen Konditionierung gezählt. Die klassische Konditionierung zeichnet sich durch eine Assoziation eines konditionierten (CS) und eines unkonditionierten Reizes (US) aus. Dabei spielt die Kontiguität, d.h. die zeitliche Paarung der Reize, eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Assoziation. Bei einem Test des bei klassischer Konditionierung erworbenen Gedächtnisses ist außerdem die Kontingenz, d.h. die ,Vorhersagekraft' des konditionierten Stimulus, von entscheidender Bedeutung (zu Kontiguität und Kontingenz siehe auch *Begriffsdefinitionen*).

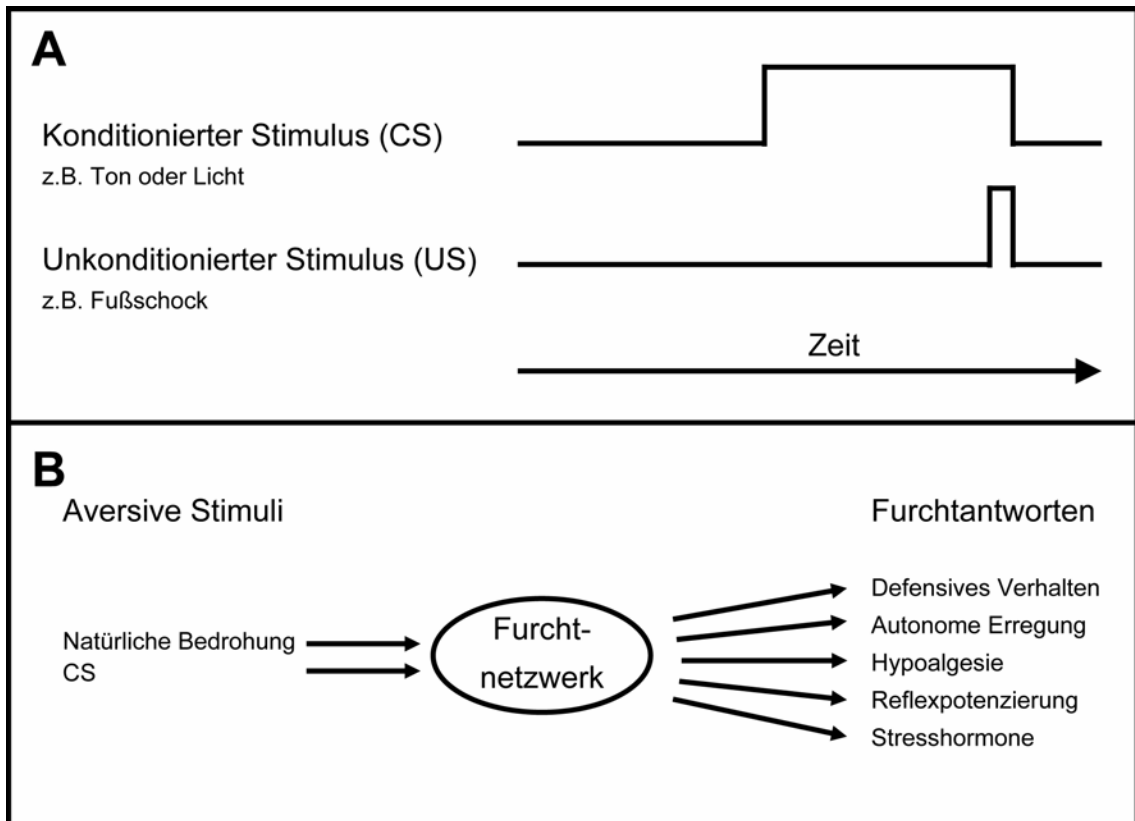


Abbildung 1: (A) Die Furchtkonditionierung beinhaltet die zeitliche Paarung eines neutralen konditionierten Stimulus (CS; z.B. Ton oder Licht) mit einem stark aversiven unkonditionierten Stimulus (US; z.B. Fußschock), wobei der neutrale konditionierte Stimulus bereits vor dem aversiven unkonditionierten Stimulus beginnt. (B) Nach der Furchtkonditionierung ist der CS in der Lage, verschiedene Furchtantworten auf physiologischer und Verhaltensebene auszulösen, die normalerweise von natürlichen Bedrohungen hervorgerufen werden (Nach LeDoux, 2000).

Während der Furchtkonditionierung (Erläuterung siehe Abb.1A; *Begriffsdefinitionen*) wird ein neutraler konditionierter Stimulus (CS, z.B. Ton) mit einem aversiven unkonditionierten Stimulus (US, z.B. Fußschock) gepaart, wobei der CS die Fähigkeit erlangt, in einem späteren Test eine Furchtreaktion (konditionierte Reaktion, CR) auszulösen. Der Konditionierungskontext kann ebenfalls als CS dienen, in diesem Fall spricht man von kontextueller Furchtkonditionierung (im Gegensatz zur unimodalen Furchtkonditionierung zu der auch die auditorische Furchtkonditionierung mit einem Ton als CS zählt; siehe auch *Begriffsdefinitionen*). Der CS hat während der Konditionierung die Fähigkeit erlangt, artspezifische Furchtantworten zu kontrollieren – dazu zählen Verteidigungsverhalten (z.B. Verhaltensstarre), die Potenzierung von Reflexen (z.B. des Schreckreflexes), autonome und endokrine Veränderungen (z.B. Blutdruck, Ausschüttung von Stresshormonen) sowie Veränderungen in der Schmerzsensitivität (Abb.1B). Besonders häufig wird die Messung der Verhaltensstarre oder der Potenzierung des Schreckreflexes während der Präsentation des konditionierten Stimulus angewendet, um das während der Furchtkonditionierung gebildete Furchtgedächtnis zu untersuchen.

1.5 Sensitivierung

Angeborene, ungelernte Furchtreaktionen und durch Furchtkonditionierung, also Assoziation, gelernte Furcht bilden die beiden Extreme eines Kontinuums (Marks, 2002). Furchtreaktionen können jedoch auch durch nicht-assoziative Sensitivierung (siehe *Begriffsdefinitionen*) hervorgerufen werden, wobei die Erfahrung aversiver Stimuli oder Situationen (z.B. eines milden elektrischen Fußschocks) eine erhöhte Reaktivität auf andere Stimuli („Teststimuli“) verursacht. Solche „Teststimuli“ für die Sensitivierung sollten stressbezogen bzw. mild aversiv sein. Völlig neutrale oder gar attraktive Reize erlangen nach der aversiven Sensitivierung kaum die Fähigkeit, Furchtreaktionen auszulösen, da Sensitivierung nur eine Erhöhung der Reaktivität verursacht, also eine prinzipielle Reaktivität Voraussetzung ist. Während der Sensitivierung wird also formal betrachtet die Schwelle abgesenkt, bei der ein Stimulus eine Reaktion auslöst. In diesem Zusammenhang erscheinen Stimuli interessant, deren Stressbezogenheit erst durch die Sensitivierung offensichtlich wird (d.h. die zuvor als unerschwellig zu betrachten sind) und die sonst leicht für neutrale Stimuli gehalten werden könnten. Dazu könnten z.B. Töne, wie sie in der auditorischen Furchtkonditionierung als ‚neutraler‘ CS eingesetzt werden, zählen. Laute Töne sind in der Lage, eine unkonditionierte Furchtreaktion auszulösen und eine elektrische Stimulation des Inferioren Colliculus (IC) – einer Hirnregion des auditorischen Systems – mittels Reizelektroden löst in Abhängigkeit ihrer Intensität das gesamte Spektrum defensiven Verhaltens aus, von einer Orientierungsreaktion über Verhaltensstarre bis hin zu Fluchtversuchen (Troncoso et al., 1998; Brandao et al., 1999; Lamprea et al., 2002). Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen auditorischem System und ‚Furchtsystem‘ hin, der auch ohne Furchtkonditionierung, d.h. ohne assoziatives Lernen, besteht (zur Rolle des IC als Filter biologisch relevanter Informationen und Relais zu motorischen Output-Regionen siehe auch Cassey & Covey, 1996). In der vorliegenden Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob ein Fußschock in der Lage ist, Mäuse derart zu sensitivieren, dass sie auf einen Ton, der bei naiven Tieren keine Furchtreaktion auslöst, nunmehr eine Verhaltensstarre zeigen. Wenn dies der Fall ist, ist in Betracht zu ziehen, dass auch Sensitivierungseffekte an der Furchtreaktion nach auditorischer Furchtkonditionierung beteiligt sein könnten, da hierfür die gleichen Töne verwendet werden und diese somit nicht mehr als ‚neutral‘ angesehen werden könnten. Wenn man z.B. eine ‚Furchtkonditionierung‘ mit dem Fuchsgesicht TMT (der angeborene Furchtreaktionen auslöst) und einem Fußschock durchführen würde, wäre die nachfolgende Furchtreaktion auf TMT nicht ausschließlich auf die Assoziation mit dem Fußschock zurückzuführen, sondern auch auf nicht-assoziative (unkonditionierte) Furcht. Gleiches erscheint plausibel für die Furchtkonditionierung mit einem lauten Ton, der ebenfalls eine angeborene Furchtreaktion auslöst. Genügt die Verringerung der Lautstärke, um den Ton zu einem echten ‚furchtneutralen‘ Stimulus zu machen? Somit stellt sich die Frage, ob die auditorische Furchtkonditionierung tatsächlich als rein assoziatives Lernen im Sinne einer klassischen Pavlovschen Konditionierung betrachtet werden kann.

1.6 Extinktion und Habituation

1.6.1 Begriffsklärung: Was ist Extinktion?

Um eine optimale Anpassung an aktuelle Umweltsituationen zu gewährleisten, müssen Furchtreaktionen abklingen, wenn die Gefahr vorüber ist oder eine erwartete Gefahr nicht eintritt. Eine Abnahme der Furchtreaktion kann durch verschiedene Konzepte erklärt werden, wobei ein einfaches ‚Vergessen‘ (also ein zeitlicher ‚Verfall‘ der Information ohne zwischenzeitliches Abrufen) weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Das populärste Konzept zur Abnahme der Furchtreaktion ist die ‚Extinktion‘ - ein Konzept, das für die Abnahme konditionierter Furchtreaktionen von Pavlov entwickelt wurde (siehe *Begriffsdefinitionen*; Pavlov, 1927).

Heute wird der Begriff ‚Extinktion‘ auf verschiedene Weisen benutzt (Übersicht siehe Myers & Davis, 2002). Einerseits wird mit ‚Extinktion‘ die experimentelle Prozedur beschrieben, die zur Abnahme der Furchtreaktion führt. Oft wird der Begriff auch verwendet, um den Abnahmeeffekt der experimentellen Prozedur auf die Furchtantwort darzustellen. Weiterhin verwendet man den Begriff der Extinktion auch für die neuronalen und molekularen Prozesse, die zur Abnahme der konditionierten Furchtreaktion führen. Myers und Davis (2002) schlagen vor, die experimentelle Prozedur als ‚Extinktionstraining‘, die Abnahme der Furchtreaktion, die während eines Extinktionstrainings beobachtet wird, als ‚within-session‘-Extinktion (auch ‚Kurzzeitextinktion‘²) und die Abnahme der Furchtreaktion, die nach einem bestimmten Zeitintervall nach dem Training gemessen wird, als Extinktionsgedächtnis (‚extinction retention‘) zu bezeichnen. Der Begriff ‚Extinktion‘ sollte ausschließlich für den Prozess, der zur Abnahme der konditionierten Furchtreaktion führt, reserviert bleiben. Obwohl dieser Vorschlag wesentlich zur Begriffsklärung beitragen würde, findet man in der Literatur noch keine eindeutige Zuordnung des Begriffs Extinktion.

1.6.2 Hypothesen der Extinktion

1.6.2.1 Lernpsychologische Ansätze

Eine Abnahme der konditionierten Furchtreaktion durch wiederholte CS-Präsentation kann durch verschiedene Hypothesen erklärt werden. Traditionell spielen wiederum die lernpsychologischen Hypothesen eine große Rolle. Danach beruht die Abnahme der konditionierten Furchtreaktion entweder auf einer Abschwächung der Ton-Schock-Assoziation selbst (Rescorla & Wagner, 1972; Wagner & Rescorla, 1972) oder wird durch einen neuen Lernvorgang, der zur Inhibition der Ton-Schock-Assoziation führt, realisiert (Übersicht siehe Myers & Davis, 2002). Diese Hypothese des ‚Neulernens‘ ist

² Aus der experimentellen Prozedur leiten sich die Begriffe Kurz- und Langzeitextinktion her. Im Folgenden beschreibt die Kurzzeitextinktion die Extinktion während einer Extinktionssession (experimentell: während einer Session mit ‚Ton-allein‘-Präsentationen) und Langzeitextinktion die Abnahme des Furchtverhaltens über mehrere solcher Sessionen hinweg.

heute am weitesten verbreitet. Vereinfacht betrachtet besagt die Hypothese, dass das Tier während der Extinktion eine neue ‚CS – kein US‘-Assoziation lernt, die die ursprüngliche CS-US-Assoziation unterdrückt.

Bestimmte Merkmale der Extinktion unterstützen die Hypothese, dass hier ein neuer Lernvorgang vorliegt, wobei eine neu gebildete ‚CS - kein US‘-Assoziation, die die ursprüngliche CS-US-Assoziation unterdrückt. Die Phänomene von Spontanerholung (‚spontaneous recovery‘), Wiederherstellung (‚reinstatement‘) und Erneuerung (‚renewal‘, Erklärung dieser Phänomene siehe *Begriffsdefinitionen*) der Furchtreaktion nach dem Extinktionsvorgang deuten darauf hin, dass die CS-US-Assoziation noch immer vorhanden ist und lediglich deren Abruf gehemmt wird (Übersicht siehe Myers & Davis, 2002).

1.6.2.2 Extinktion oder Rekonsolidierung?

Ein anderes interessantes Phänomen im Zusammenhang mit der Extinktion ist die Rekonsolidierung (siehe *Begriffsdefinitionen*; Nader et al., 2000; Nader, 2003; Dudai, 2004; Eisenberg et al., 2003). Ein labiles Stadium während des Abrufes des Gedächtnisses, das Rekonsolidierung zur Stabilisation erfordert, macht dieses angreifbar für eine ‚Inhibition‘. Andererseits würde ein solcher labiler Gedächtniszustand bei jedem Abruf bedeuten, dass jedes Extinktionstraining abhängig von den Gegebenheiten auch zu Rekonsolidierung, also zur Verstärkung des ursprünglich Gelernten, führen kann. Aufgrund der Bedeutung von dem Extinktionstraining ähnlichen Therapieansätzen zur Behandlung von Angsterkrankungen ist das Konzept der Rekonsolidierung nicht unumstritten (vgl. Izquierdo et al., 2004).

1.6.2.3 Nicht-assoziative Hypothesen der Extinktion: die Habituation

Kann die Abnahme der konditionierten Furchtreaktion auf wiederholte CS-Präsentation hin auch durch nicht-assoziative Lernprozesse erklärt werden (vgl. Frey & Butler, 1977)? Obwohl die Extinktion in manchen Artikeln als rein assoziatives Lernen dargestellt wird (Rescorla, 2001), gibt es auch Hinweise auf nicht-assoziative Komponenten der Extinktion (Myers & Davis, 2002). Solche nicht-assoziativen Hypothesen hätten gemeinsam, dass die CS-US-Assoziation davon nicht betroffen wäre. Demzufolge wären oben genannte Merkmale (Erneuerung, Wiederherstellung etc.), die aufzeigen, dass die CS-US-Assoziation auch nach Extinktion noch vorhanden ist, auch in Übereinstimmung mit einer solchen nicht-assoziativen Hypothese. Nicht-assoziative Lernvorgänge, die Extinktion erklären könnten, sind Desensitivierung und Habituation (siehe *Begriffsdefinitionen*). Obwohl eine Desensitivierung erstrebenswert erscheint, ist eine solche allgemeine Entspannung nach einer Furchtkonditionierung im Verhaltensexperiment ohne Verabreichung von Pharmaka äußerst schwer zu erzielen. Außerdem erfordert die Definition der Extinktion lediglich eine Abnahme der konditionierten Furchtreaktion auf den konditionierten Stimulus hin (Pavlov, 1927). Eine solche Abnahme einer Reaktion bei wiederholter Stimulation erinnert hingegen an Habituationsprozesse. Habituation wird auch in vielen anderen Zusammenhängen neben der

Extinktion beobachtet. So könnte auch die Abnahme sensitivierter Furchtreaktionen auf Habituationsprozessen beruhen, *per definitionem* nicht aber auf Extinktion, da diese die Abnahme konditionierter Furchtreaktionen beschreibt. Dabei sind die prozeduralen Ähnlichkeiten zwischen Extinktion und Habituation offensichtlich: beide Lernarten sind durch eine Abnahme der Reaktion bei wiederholter Stimuluspräsentation gekennzeichnet. Ist also die Extinktion als Unterart der Habituation zu betrachten oder umgekehrt? Bei der gebräuchlichen Unterteilung der verschiedenen Lernformen (vgl. Birbaumer & Schmidt, 1999b) sind Extinktion als assoziative Lernform und Habituation als nicht-assoziative Lernform jedoch relativ weit voneinander entfernt. Auch die zugrunde liegenden Prozesse sind unterschiedlich beschrieben: eine (hypothetische) inhibitorische Assoziation bei der Extinktion (vgl. Myers & Davis, 2002) steht einer Abnahme der Erregbarkeit im Stimulus-Reaktions-Weg gegenüber (vgl. Thompson & Spencer, 1966; Castellucci et al., 1978). Trotzdem teilen Extinktion und Habituation viele Gemeinsamkeiten, die in der Habituationshypothese der Extinktion beschrieben wurden (McSweeney & Swindell, 2002). So werfen die Autoren beispielsweise die Frage auf, wieso während der Extinktion (wenn diese als rein assoziativer Prozess betrachtet wird) keine Habituation an den wiederholt präsentierten konditionierten Stimulus auftreten sollte. Hauptsächlich beruht die Argumentationslinie der Autoren jedoch auf den Gemeinsamkeiten habituierten und extinguierten Verhaltens. Zu diesen Gemeinsamkeiten zählen unter anderem die Spontanerholung, Erneuerung und Wiederherstellung (siehe *Begriffsdefinitionen*), die Stimulusspezifität (auf den wiederholt präsentierten Stimulus), eine verstärkte Extinktion/ Habituation je öfter der Reiz präsentiert wird und die ‚Habituation ohne Antwort‘, was die Möglichkeit der Habituation an einen Stimulus beschreibt, auch wenn keine Verhaltensantwort gemessen werden kann. Außerdem weisen die Autoren darauf hin, dass sich die Kritik an der Beteiligung von Habituationsprozessen an der Extinktion oft auf die Langzeiteffekte der Extinktion im Gegensatz zu den Kurzzeiteffekten der Habituation bezieht (Peeke & Petrinovich, 1984) und zeigen, dass auch die Habituation Langzeiteffekte hat (siehe auch Castellucci et al., 1978). In der vorliegenden Arbeit soll unter anderem geklärt werden, inwieweit Sensitivierung und Habituation für die Furchtkonditionierung und deren Extinktion eine Rolle spielen.

2 Das endogene Cannabinoidsystem

Anders als für die Habituation, deren molekulare Grundlagen hauptsächlich bei *Aplysia californica* erforscht wurden (siehe z.B. Castellucci et al., 1978), wurden für die Extinktion konditionierter Furcht in den letzten Jahren verschiedene molekulare Substrate bei Wirbeltieren identifiziert, wozu unter anderem spannungsgesteuerte Kalziumkanäle des L-Typs (LVGCCs; Cain et al., 2002; Cain et al., 2005), die Phosphatase Calcineurin (Lin et al., 2003c; Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003a), und auch der CB1 Cannabinoidrezeptor (Marsicano et al., 2002; Suzuki et al., 2004; Chhatwal et al., 2005) zählen.

Auf das endogene Cannabinoidsystem mit dem CB1 Cannabinoidrezeptor soll im Folgenden näher eingegangen werden.

2.1 Das Endocannabinoidsystem – eine Einführung

Obwohl Derivate der Hanfpflanze *Cannabis sativa* seit tausenden von Jahren zu medizinischen oder Erholungszwecken genutzt wurden, entstammt das heutige Wissen um die Chemie und Physiologie der Cannabinoide hauptsächlich Forschungsergebnissen aus den letzten Jahren. Die Suche nach den psychoaktiven Inhaltsstoffen der Hanfpflanze geht zurück bis ins 19. Jahrhundert (ausführlicher historischer Überblick siehe Iversen, 2000). Heute sind über 60 Bestandteile von *Cannabis sativa* identifiziert, von denen die meisten keine psychoaktive Wirkung aufweisen. Die Komponente der Hanfpflanze mit den stärksten psychoaktiven Effekten ist Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), das 1964 von Gaoni und Mechoulam isoliert wurde (Gaoni & Mechoulam, 1964). Dies war der Beginn der modernen Cannabisforschung, denn nun konnten die Chemie, Physiologie und die Effekte von Cannabinoiden auf Labortiere untersucht werden. Wie auch bei anderen psychoaktiven Substanzen war damit die Suche nach einem Rezeptor für Cannabinoide eröffnet. Diese gestaltete sich jedoch unter Benutzung traditioneller Radioligandenbindungsassays, die z.B. bei der Erforschung des Opioidsystems sehr hilfreich waren (vgl. Snyder, 1994), als außerordentlich schwierig, was auf die lipophile Natur von Δ^9 -THC zurückzuführen war. Der Durchbruch gelang durch die Entwicklung eines hoch potenten hydrophileren Analogs von Δ^9 -THC, namentlich CP55940 (zur Pharmakologie des Endocannabinoidsystems inklusive Strukturformeln entsprechender Pharmaka siehe Anhang 1). Dieses konnte radioaktiv markiert werden und damit wurde ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) als Cannabinoidrezeptor im Rattenhirn entdeckt (Devane et al., 1988), dessen Sequenz 1990 identifiziert wurde (Matsuda et al., 1990). 1993 wurde die Sequenz eines zweiten Cannabinoidrezeptors, der nicht im Gehirn, sondern in Makrophagen exprimiert wurde, aufgeklärt (Munro et al., 1993). Die Autoren schlugen vor, den zuerst entdeckten, hauptsächlich im Gehirn exprimierten Cannabinoidrezeptor als CB1 Cannabinoidrezeptor (CB1) und den anderen als CB2 Cannabinoidrezeptor (CB2) zu bezeichnen. Die Entdeckung der Cannabinoidrezeptoren deutete darauf hin, dass es endogene Liganden geben müsse, die Endocannabinoide. Zwei endogene Lipide, Anandamid (AEA; benannt nach *ananda* – Sanskrit für Glück, Wonne, Freude) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG), konnten als CB1-Agonisten identifiziert werden (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Heute wird sowohl die Existenz eines oder mehrerer weiterer Cannabinoidrezeptoren (Übersicht siehe Pertwee & Ross, 2002; Wilson & Nicoll, 2002) wie auch weiterer Endocannabinoide (Noladin, Virodhamin und N-Arachidonoyl-Dopamin - NADA; Übersicht siehe De Petrocellis et al., 2004) diskutiert.

2.2 Die Endocannabinoid-CB1-Synapse

2.2.1 Synthese und Freisetzung von Endocannabinoiden

Endocannabinoide sind retrograde Botenstoffe, die an der Postsynapse freigesetzt werden und über den synaptischen Spalt zum präsynaptisch lokalisierten CB1-Rezeptor gelangen (Überblick siehe Alger, 2002). Dies konnte gezeigt werden, weil ein ‚retrogrades‘ Phänomen, die depolarisationsinduzierte Suppression inhibitorischer Ströme³ (DSI) durch CB1-Antagonisten geblockt sowie durch CB1-Agonisten nachgeahmt werden konnte (Überblick siehe Alger, 2002; Wilson & Nicoll, 2002). Postsynaptische Depolarisation führt also zu postsynaptischer Endocannabinoidfreisetzung, die präsynaptisch CB1-Rezeptoren aktivieren, was wiederum über die G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheiten zur präsynaptischen Schließung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und damit zur Unterdrückung der Transmitterfreisetzung führt (Übersicht siehe Abb.2, Piomelli, 2003).

Die Lipidstruktur und die *On demand*-Synthese der Endocannabinoide sind die Ursache, dass ihre Identifikation länger als in anderen Transmittersystemen mit klassischen präsynaptischen Vesikeln gedauert hat. Gleichzeitig liegt dort der Vorteil, denn durch leicht membrangängige Lipide werden schnelle Aktionen ermöglicht. Bereits in den letzten Jahrzehnten zeichnete sich ab, dass Phospholipide nicht einfach nur als strukturelle Komponenten der Zellmembran zu betrachten sind, sondern auch als Vorstufen für Signalmoleküle, wie z.B. 1,2-Diacylglycerol (DAG). Auch für die beiden am besten charakterisierten Endocannabinoide, AEA und 2-AG, stellte sich heraus, dass sie aus Phospholipidvorstufen (PV) synthetisiert werden (siehe Abb.2; Übersicht siehe Di Marzo et al., 1998; Freund et al., 2003). Die Synthese von Endocannabinoiden kann aber auch Ca^{2+} -unabhängig über metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe 1 (mGluR1 und mGluR5) stimuliert werden (siehe Abb.2; Maejima et al., 2001; Varma et al., 2001; Ohno-Shosaku et al., 2002). Demzufolge stellen mGluRs und Depolarisation zwei unabhängige Wege dar, auf denen die Endocannabinoidsynthese getriggert werden kann, die aber auch gemeinsam das Ausmaß der DSI steigern können (Überblick siehe Abb.2, Wilson & Nicoll, 2002; Piomelli, 2003; Doherty & Dingledine, 2003). Wenn Ca^{2+} -Influx und mGluRs DSI bzw. die Freisetzung von Endocannabinoiden synergistisch bewirken, geschieht dies wahrscheinlich über einen intrazellulären Weg, der Calcineurin involviert (siehe Abb.2; Doherty & Dingledine, 2003).

³ DSI bedeutet, dass eine kurze Depolarisation des Neurons transient GABA-getriggerte Inhibition dieses Neurons unterdrücken kann. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass DSI trotz postsynaptischen Ursprungs präsynaptisch lokalisiert ist (Llano et al., 1991; Pitler & Alger, 1992). Durch postsynaptische Depolarisation muss also ein retrograder Botenstoff freigesetzt werden, um präsynaptisch die GABA-Ausschüttung zu verhindern.

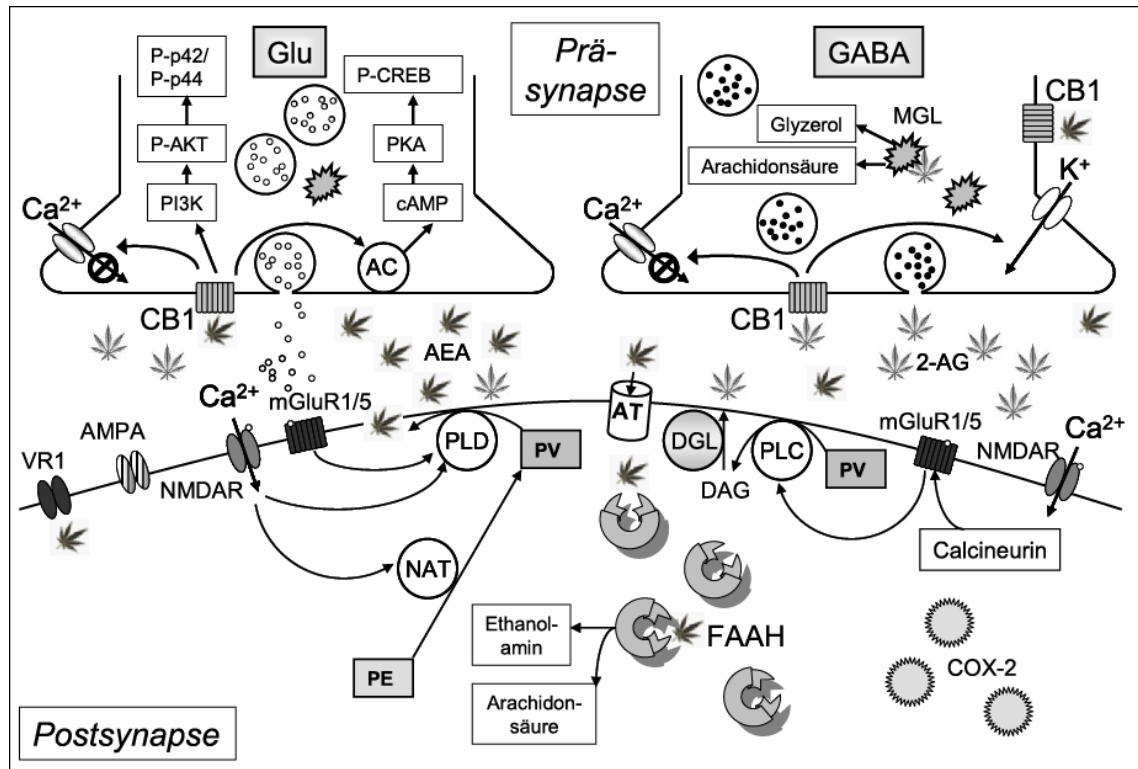


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Endocannabinoid-CB1-Synapse. CB1-Rezeptoren sind auf den Axonterminalen sowohl glutamaterger als auch GABAerger Neuronen zu finden, bei GABAergen Neuronen ist CB1 auch präterminal lokalisiert (Nyiri et al., 2005). Die durch CB1-Aktivierung getriggerten intrazellulären Ereignisse gelten jeweils für beide, glutamaterge und GABAerge, Neuronen und können sowohl durch AEA- wie auch durch 2-AG-Bindung an CB1 ausgelöst werden. Der Einfachheit halber wurden Abbau- und Synthesewege für AEA und 2-AG sowie intrazelluläre Signalkaskaden nur einmal dargestellt. Trotz GABAerger Präsynapse fehlt ein GABA-Rezeptor in der Postsynapse, da bisher kein Zusammenhang von GABA-Rezeptor-Stimulation und Endocannabinoidfreisetzung gezeigt werden konnte. Möglicherweise endet die GABAerge Präsynapse auf einer anderen Postsynapse, wobei CB1-Rezeptoren auf GABAergen Neuronen durch Endocannabinoidfreisetzung benachbarter Postsynapsen stimuliert werden könnten. Abkürzungen und genaue Erläuterungen siehe Text/ Abkürzungsverzeichnis.

2.2.1.1 Synthese von Anandamid

Es konnte gezeigt werden, dass Anandamid durch Hydrolyse aus dem Phospholipid *N*-arachidonyl-phosphatidylethanolamin entsteht – eine Reaktion, die durch die Phospholipase D (PLD) katalysiert wird (Überblick siehe Sugiura et al., 2002; Freund et al., 2003). Die Phospholipidvorstufe *N*-arachidonyl-phosphatidylethanolamin, die bei dieser Reaktion verbraucht wird, wird durch das Enzym *N*-acyltransferase (NAT), das eine Arachidonatgruppe von der sn-1-Glycerolesterposition von Phospholipiden auf die primäre Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) überträgt, nachgeliefert. Beide Reaktionen verlaufen wahrscheinlich parallel und werden durch Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels oder durch Aktivierung von Neurotransmitterrezeptoren (wie z.B. dem Dopamin-D2-Rezeptor im Striatum) induziert (Abb.2; Freund et al., 2003).

2.2.1.2 Synthese von 2-AG

Die Synthese von 2-AG ist auf zwei Wegen möglich. Einerseits kann durch Phospholipase C (PLC)-vermittelte Hydrolyse von Membranphospholipiden Diacylglycerol (DAG) entstehen, das dann durch die Diacylglycerollipase (DGL) in 2-AG umgewandelt wird (Abb.2). Andererseits kann durch die Phospholipase A₁ (PLA₁) Lysophosphatidylinositol hergestellt werden, das anschließend durch PLC-Aktivität zu 2-AG hydrolysiert wird. Da in Kulturen corticaler Neuronen Inhibitoren der PLC- und DGL-Aktivität die 2-AG-Synthese blockieren können, scheint dies der Hauptweg der 2-AG-Synthese zu sein (Übersicht siehe Sugiura et al., 2002; Freund et al., 2003). Die 2-AG-Synthese kann wie die Anandamidsynthese durch Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels oder durch die Stimulation bestimmter Neurorezeptoren induziert werden (Übersicht siehe Freund et al., 2003).

2.2.2 CB1-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden

CB1 ist ein klassischer G_{i/o}-gekoppelter Rezeptor und kann bei Aktivierung die für diese Klasse von Rezeptoren typischen intrazellulären Signalkaskaden triggern. Dazu gehören die Schließung von Ca²⁺-Kanälen, das Öffnen von K⁺-Kanälen, die Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität und die Stimulation von Kinasen, die Tyrosin-, Serin- und Threoninreste in Proteinen phosphorylieren können (Übersicht siehe Wilson & Nicoll, 2002; Piomelli, 2003; Demuth & Molleman, 2006). Die Modulation von Ionenkanälen, insbesondere von Ca²⁺-Kanälen, führt zur CB1-vermittelten Hemmung der präsynaptischen Transmitterausschüttung. Durch Modulation der Adenylatzyklase (AC) kann CB1-Aktivierung über cAMP, PKA und das cAMP-responsive Element die Genexpression beeinflussen und damit zu langfristigen Änderungen in Neuronen führen, die unter anderem auch in Lernvorgängen eine Rolle spielen können. Die Modulation der Genexpression hängt von einem komplexen Netzwerk intrazellulärer Proteinkinasen ab. Dazu zählen beispielsweise ERKs (extrazelluläres Signal-regulierte MAP-Kinasen) und die fokale Adhäsionskinase (FAK), die aktiviert werden, wenn hippocampale Hirnschnitte mit CB1-Agonisten behandelt werden (Übersicht siehe Piomelli, 2003). Eine Aktivierung der MAP-Kinasen vom Typ p42/p44 (ERKs) durch CB1-Agonisten konnte *in vitro* (Bouaboula et al., 1995; Galve-Roperh et al., 2002) und *in vivo* in verschiedenen Hirnregionen von Ratten und Mäusen nachgewiesen werden (Valjent et al., 2001; Derkinderen et al., 2003; Rubino et al., 2004). Auf welche Art und Weise CB1 die MAPK-Kaskade⁴ aktiviert, ist jedoch noch nicht völlig erforscht. Dass CB1 selbst als Tyrosinkinase-gekoppelter Rezeptor agiert, wird aufgrund seiner Struktur weitgehend ausgeschlossen. Ein möglicher Weg führt über die Aktivierung der Phosphatidylinosi-

⁴ Die Aktivierung der MAPK-Kaskade wird normalerweise durch Aktivierung eines Tyrosinkinase-rezeptors induziert. Dadurch wird das G-Protein Ras stimuliert und eine Signalkaskade initiiert, die mit der Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf (MAP Kinase Kinase Kinase) beginnt. Raf aktiviert die MAP Kinase Kinase (MEK), was in Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAPK resultiert, die verschiedene zytoplasmatische und Zellkern-Proteine phosphorylieren kann. Bisher wurden 3 Untergruppen von MAPK identifiziert: ERKs (p42/p44), p38 sowie JNK.

tol-3-Kinase (PI3K), die nicht nur die Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Raf vermitteln kann, sondern auch die Proteinkinase B (PKB, auch AKT) phosphoryliert und damit aktiviert. Tatsächlich konnten CB1-Agonisten wie Δ^9 -THC und CP55940 die PKB (AKT) in SR141716A-sensitiver Manier (SR141716A ist ein CB1-Antagonist, siehe Anhang 1) stimulieren (Gomez del Pulgar et al., 2000; Galve-Roperh et al., 2002). *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation von CB1 die PI3K/PKB-Kaskade induziert, was wiederum zur Phosphorylierung der p42/p44-MAPK führt (Sanchez et al., 2003). Dies wirft auch die Frage auf, inwieweit solche CB1-induzierten intrazellulären Signalkaskaden, wie z.B. die PI3K/PKB-p42/p44-Kaskade, an endocannabinoidvermittelten Lernvorgängen beteiligt sind, insbesondere da solche Kaskaden die für Lernprozesse typische synaptische Plastizität vermitteln könnten.

2.2.3 Wiederaufnahme und Abbau von Endocannabinoiden

Wie andere Neurotransmitter müssen auch Endocannabinoide nach Beendigung ihrer Signalübertragung aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Gerade die Abbau-mechanismen der ‚Haupt‘-Endocannabinoide Anandamid und 2-AG bilden einen potenziellen pharmakologischen Angriffspunkt, um die Signalübertragung durch Endocannabinoide zu erhöhen. Demzufolge wurden diese Mechanismen in den letzten Jahren verstärkt erforscht und viele neue Pharmaka entwickelt, deren Wirkung spezifischer als die von CB1-Agonisten ist, weil nur die Effekte endogen aktivierter Cannabinoide potenziert werden. Eine Übersicht zur Pharmakologie des Endocannabinoidsystems des Gehirns mit den Strukturformeln ausgewählter Pharmaka befindet sich im Anhang 1. Obwohl man sich über die Abbaumechanismen von Anandamid und 2-AG derzeit weitgehend einig ist, ist der Mechanismus des Rücktransports aus dem synaptischen Spalt in die Zelle seit einigen Jahren umstritten (vgl. Glaser et al., 2005).

2.2.3.1 Abbau von Anandamid

In verschiedenen Geweben und Zellen konnte gezeigt werden, dass Anandamid (AEA) zu Arachidonsäure und Ethanolamin hydrolysiert wird (Übersicht siehe Sugiura et al., 2002). Bereits in den achtziger Jahren wurde ein Enzym, das die Hydrolyse von *N*-acylethanolamin zu freien Fettsäuren und Ethanolamin katalysiert, intensiv erforscht und beschrieben (Schmid et al., 1985). Die Autoren nannten dieses Enzym *N*-acylethanolamin-Amidohydrolase. Die Hydrolyse speziell von AEA wurde 1993 erstmals untersucht und die dabei auftretende enzymatische Aktivität wurde dem Enzym Anandamidamidase zugeschrieben (Deutsch & Chin, 1993). Als später von Cravatt und Mitarbeitern ein Enzym kloniert wurde, das die Hydrolyse von Oleamid katalysiert, zeigte sich, dass dieses Enzym auch andere *N*-acylethanolamine sowie AEA hydrolysieren konnte und die Autoren nannten dieses Enzym Fettsäureamidhydrolase (Fatty acid amide hydrolase; FAAH; Cravatt et al., 1996; Giang & Cravatt, 1997). Heute geht man davon aus, dass es sich bei *N*-acylethanolamin-Amidohydrolase, Anandamidamidase und FAAH um ein und dasselbe Enzym handelt (Sugiura et al., 2002). FAAH ist in vielen Geweben und Zellen weit verbreitet (Überblick zu FAAH siehe McKinney & Cravatt,

2005). In Neuronen zeigte sich eine hauptsächlich postsynaptische Lokalisation von FAAH, mit einer Assoziation an Membranen zytoplasmatischer Organellen (Gulyas et al., 2004). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Inhibitoren der Anandamidhydrolyse beschrieben, wobei diese anfänglich relativ unspezifisch waren, in den letzten Jahren aber mit AM374 und URB597 (Kathuria et al., 2003) spezifische FAAH-Inhibitoren gefunden wurden (Freund et al., 2003).

Neben der Hydrolyse kann Anandamid auch durch enzymatische Oxygenierung durch Cytochrom P450-Hydroxylase und Lipoxygenasen abgebaut werden und ist ein Substrat der Cyclooxygenase-2 (COX-2). Da in FAAH^{-/-}-Mäusen jedoch weder der Abbau endogenen noch exogenen Anandamids stattfindet (Lichtman et al., 2002), scheinen diese Abbaumechanismen eher untergeordnete Rollen zu spielen (Übersicht siehe Freund et al., 2003).

2.2.3.2 Abbau von 2-AG

Obwohl Fettsäureester wie 2-AG *in vitro* auch ausgezeichnete Substrate für FAAH darstellen (Übersicht siehe Freund et al., 2003), scheint dies nicht der einzige Mechanismus für den 2-AG-Abbau zu sein. So findet auch in FAAH^{-/-}-Mäusen 2-AG-Abbau statt (Lichtman et al., 2002), und FAAH-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die 2-AG-Hydrolyse (Beltramo & Piomelli, 2000). Die Hydrolyse von 2-AG zu Arachidonsäure und Glycerol ist demzufolge hauptsächlich einem anderen Enzym zuzuschreiben, der Monoglyceridlipase (auch Monoacylglycerollipase, MGL, Übersicht siehe Sugiura et al., 2002; Freund et al., 2003). MGL ist eine zytosolische Serinhydrolase, die 2- und 1-Monoglyceride zu Fettsäuren und Glycerol abbaut (Karlsson et al., 1997). Die höchsten Expressionslevel von MGL sind im Rattenhirn in Regionen zu finden, wo auch CB1-Rezeptoren vorhanden sind (Dinh et al., 2002). Somit ist die MGL wie CB1 hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert, was auf funktionelle Unterschiede zwischen 2-AG und AEA (mit postsynaptisch lokalisierter FAAH) hinweisen könnte (Gulyas et al., 2004).

Wie Anandamid kann auch 2-AG durch die COX-2 abgebaut werden (Kozak et al., 2000; Moody et al., 2001). Die Rolle dieses Abbaumechanismus *in vivo* im Gehirn ist jedoch nicht vollständig geklärt, insbesondere da spezifische MGL-Inhibitoren Endocannabinoidsignale im Hippocampus stark erhöhen (Makara et al., 2005). Dabei wurde gezeigt, dass MGL in die 2-AG-vermittelte synaptische Plastizität involviert zu sein scheint und URB602 sowie insbesondere URB754 wurden als spezifische MGL-Inhibitoren vorgestellt (Makara et al., 2005).

2.2.3.3 Wiederaufnahme von Endocannabinoiden in die Zelle

Auf welche Art und Weise Endocannabinoiden aus dem synaptischen Spalt wieder in die Zelle gelangen, um dort abgebaut zu werden, ist unklar. Einerseits könnten Endocannabinoiden als einfache Lipide relativ leicht die Membran passieren, andererseits scheint es auch in anderen Systemen für Lipide Carrierproteine in Zellmembranen zu geben (Übersicht siehe Freund et al., 2003). Für den Anandamid-Transport konnte z.B. gezeigt werden, dass dieser vier Kriterien carrier-vermittelten Transports erfüllt (vgl.

Freund et al., 2003). Andererseits unterscheidet sich der Anandamid-Transport vom Transport anderer Amin- oder Aminosäure-Transmitter dadurch, dass weder Energie noch externe Na^+ -Ionen erforderlich sind. Dies könnte auch auf einfache Diffusion von Anandamid in die Zelle hinweisen. Obwohl Anandamid in der Zelle schnell abgebaut wird, was zum Aufbau eines Diffusionsgradienten beitragen könnte, sammeln sich die Hinweise, dass der Anandamid-Transport von der intrazellulären Hydrolyse unabhängig ist. Insgesamt würde dies das Vorhandensein eines Anandamid-Transporters unterstreichen – die große Problematik ergibt sich jedoch daraus, dass bis jetzt trotz intensiver Suche und großer Gendatenbanken kein Protein als Anandamid-Transporter (AT) identifiziert werden konnte (Übersicht siehe Freund et al., 2003; Glaser et al., 2005).

Da 2-AG die Aufnahme von Anandamid in verschiedene Zelltypen verhindert, könnten beide Endocannabinoide um den gleichen Transporter konkurrieren. Des Weiteren werden AEA und 2-AG mit ähnlicher Kinetik in Zellen akkumuliert und eine solche Akkumulation wird durch den Transport-Inhibitor AM404 (Beltramo et al., 1997) verhindert. Trotzdem gibt es Unterschiede zwischen Anandamid- und 2-AG-Transport: auch Arachidonsäure reduziert die Aufnahme von 2-AG in die Zelle, was auf mögliche Konkurrenz um einen hypothetischen 2-AG-Transporter gesehen werden kann (Beltramo & Piomelli, 2000). Außerdem wird die zelluläre Aufnahme von 2-AG durch Triacsin C, einen Inhibitor der Acyl-CoA-Synthese, der mit dem Einbau von Arachidonsäure in Phospholipide interferiert, gehemmt (Beltramo & Piomelli, 2000). Dies deutet darauf hin, dass zwar die Transportmechanismen von Anandamid und 2-AG ähnlich oder gar gleich sein könnten, jedoch der Einfluss intrazellulären Abbaus auf den Transport differiert (Freund et al., 2003).

Neue Belege für die Existenz von Endocannabinoid-Transportern resultieren vor allem aus der Entwicklung neuer Transport-Inhibitoren. Ursprüngliche Transport-Inhibitoren wie AM404 und VDM11 hemmen möglicherweise auch die FAAH, also den Anandamidabbau und sind demzufolge relativ unspezifisch (siehe Glaser et al., 2005). Zu den neueren und spezifischeren Anandamid-Transporter-Inhibitoren zählen unter anderem UCM707 (de Lago et al., 2002; Lopez-Rodriguez et al., 2003), LY2318912 (Moore et al., 2005) und AM1172 (Fegley et al., 2004). Die Wirksamkeit dieser Substanzen konnte teilweise bereits *in vivo* im Tiermodell gezeigt werden, obwohl der Wirkmechanismus aufgrund fehlender Identifikation eines Transporterproteins bisher unzureichend geklärt ist.

2.3 Lokalisation des CB1 Cannabinoidrezeptors

CB1 gehört zu den am weitesten verbreiteten neuromodulatorischen Rezeptoren im Gehirn. Dementsprechend vielfältig sind die Funktionen, die über CB1 vermittelt werden. So beeinflusst die CB1-Aktivierung unter anderem Thermoregulation, Nozizeption, das neuroendokrine System, das motorische System, die Regulation der Nahrungsaufnahme/ Appetit, Lernen und Gedächtnis, Belohnung, Kognition und Stimmungen. Da-

bei können bestimmte Funktionen der CB1-Expression in bestimmten Hirnregionen bzw. in bestimmten Zelltypen zugeschrieben werden, bei anderen Funktionen ist der Mechanismus der CB1-Vermittlung jedoch noch nicht geklärt. Die Verbreitung der CB1-Rezeptoren im Gehirn wurde hauptsächlich mittels Immunoreaktivität mit Antikörpern gegen das CB1-Protein (z.B. Moldrich & Wenger, 2000) und über *In situ*-Hybridisierung mit der mRNA für CB1 (z.B. Marsicano & Lutz, 1999), aber auch über Autoradiographie mit radioaktiv markierten CB1-Liganden bzw. mit [³⁵S]GTPγS, das G-Protein-Aktivität nachweist, in Anwesenheit von CB1-Liganden (z.B. Breivogel & Childers, 1998) untersucht.

CB1-Immunoreaktivität (CB1-IR) wurde in Perikarya, Axonen und Dendriten gefunden (Moldrich & Wenger, 2000). Dabei nutzten die Autoren einen Antikörper gegen den N-Terminus von CB1 und fanden intensive Immunoreaktivität in Prinzipalneuronen von Hippocampus, Striatum, Substantia nigra und im Cortex des Cerebellums inklusive der Purkinjezellen. Mittlere CB1-IR wurde im Bulbus olfactorius, im cingulären, entorhinalen und piriformen Cortex, in der Amygdala und im Nucleus Accumbens gefunden. Eine geringe Dichte von CB1-IR war im Thalamus, Hypothalamus und der Area postrema zu beobachten. Insgesamt stimmt die CB1-Verbreitung, die in dieser Studie gefunden wurde, mit vorangegangenen Untersuchungen weitgehend überein – jedoch konnte in einigen Studien bisher kein CB1 in Prinzipalneuronen gefunden werden (z.B. Katona et al., 2001), was evtl. mit dem dabei verwendeten Antikörper zusammenhängen könnte. Zusammenfassend zeigt sich eine weite CB1-Verbreitung im Vorderhirn, die zum Hirnstamm hin abnimmt (Moldrich & Wenger, 2000). Außerdem konnten Moldrich und Wenger (2000) erstmals die Anwesenheit von CB1 in perivaskulären Gliafasern zeigen, die auf eine Funktion von Endocannabinoiden in der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke hinweisen könnte.

Die Verbreitung von CB1 in bestimmten neuronalen Subpopulationen wurde am Vorderhirn von Mäusen mittels *In situ*-Hybridisierung systematisch untersucht (Marsicano & Lutz, 1999). Dabei zeigte sich, dass die Mehrheit stark CB1-exprimierender Zellen GABAerge Neuronen des Cholecystokinin (CCK)-positiven Subtyps sind. Es gibt aber auch andere CB1-exprimierende GABAerge Interneuronen, die durch Calbindin D28k-Expression gekennzeichnet sind. Von den weniger stark CB1-exprimierenden Zellen sind jedoch nur wenige GABAerg. In Hippocampus, Amygdala und im entorhinalen Cortex fanden die Autoren Prinzipalneuronen, die CB1 exprimieren (Marsicano & Lutz, 1999). Diese Daten, zusammen mit dem Befund, dass konditionale Mausmutanten, die nur in Prinzipalneuronen keinen CB1-Rezeptor exprimieren (diese Tiere besitzen CB1 in GABAergen Interneuronen), im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren stark anfällig für Kainat induzierte Krampfanfälle sind (Marsicano et al., 2003), zeigen eine Expression von CB1 in Prinzipalneuronen bei Mäusen und stimmen somit mit der Studie von Moldrich und Wenger (2000) am Rattenhirn überein.

2.4 Die Rolle von CB1 in Furcht- und Angstantworten

Der Einfluss von CB1 auf Lern- und Gedächtnistests wurde in vielen Studien durch Applikation exogener Cannabinoide, aber auch durch pharmakologische Blockade oder genetische Manipulation von CB1 untersucht. Wenn der CB1 Cannabinoidrezeptor dabei überhaupt involviert war, schien er zumeist eine Beeinträchtigung verschiedener Gedächtnisarten zu vermitteln (Zusammenfassung und Überblick siehe Wotjak, 2005). Es zeigten sich jedoch bemerkenswerte Ausnahmen: Varvel und Lichtman (2002) demonstrierten, dass CB1^{-/-}-Mäuse im Umlernen einer neuen Position der Plattform im Wasserlabyrinth („Water Maze“) beeinträchtigt waren. Auch in der Extinktion (jedoch nicht in der Akquisition) der Furchtkonditionierung sind CB1^{-/-}-Mäuse und Tiere unter pharmakologischer CB1-Blockade beeinträchtigt, was auf eine Rolle des Endocannabinoidsystems in der Extinktion konditionierter Furcht hindeutet (Marsicano et al., 2002; Suzuki et al., 2004; Chhatwal et al., 2005). In der Extinktion einer instrumentellen Konditionierung mit positiver Verstärkung hingegen zeigten sich CB1^{-/-}-Mäuse nicht beeinträchtigt (Holter et al., 2005). Demzufolge scheinen speziell aversive Situationen eine Aktivierung des Endocannabinoidsystems hervorzurufen.

Die Befunde zur Beteiligung von Endocannabinoiden an der Extinktion konditionierter Furcht sind relativ homogen: Marsicano und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass CB1^{-/-}-Mäuse und Tiere mit pharmakologischer Blockade des CB1-Rezeptors durch SR141716A (Rimonabant) eine Beeinträchtigung in der Extinktion, aber nicht in der Akquisition, auditorischer Furchtkonditionierung zeigten. Diese Befunde konnten auf die Extinktion kontextueller Furchtkonditionierung erweitert werden, wobei auch gezeigt wurde, dass CB1 spezifisch die Extinktion und nicht die Rekonsolidierung vermittelte (Suzuki et al., 2004). Ressler und Mitarbeiter erweiterten die bisher an Mäusen gezeigten Resultate auf Ratten, wobei auch die pharmakologische Blockade von CB1 durch SR141716A zu einer Beeinträchtigung der Furchtextinktion führte, was hier mittels furchtpotenzierendem Schreckreflex gemessen wurde (Chhatwal et al., 2005). Außerdem gelang den Autoren sogar eine Verbesserung der Extinktion konditionierter Furcht, indem sie den Endocannabinoid-Wiederaufnahme-Inhibitor AM404 applizierten (Chhatwal et al., 2005). Für die CB1-vermittelte Extinktion der Furchtkonditionierung scheint der basolaterale Nucleus der Amygdala (BLA) eine besondere Rolle zu spielen, da nach der ersten Extinktionssession erhöhte Endocannabinoidlevel (Anandamid und 2-AG) im BLA gefunden wurden (Marsicano et al., 2002).

Die Rolle von Endocannabinoiden bei angeborener Furcht und Angst ist weniger eindeutig als ihre Rolle bei der Extinktion konditionierter Furcht (Übersicht siehe Wotjak, 2005). Navarro und Mitarbeiter zeigten, dass pharmakologische Blockade von CB1 durch SR141716A im „Defensive Withdrawal“-Test, bei dem eine kleine Kammer auf einem Offenfeld steht und beobachtet wird, wie oft und exzessiv die Tiere das Offenfeld erkunden, sowie im EPM anxiogen wirkt (Navarro et al., 1997). Dieser anxiogene Effekt von SR141716A wurde durch Neuheit der Situation noch verstärkt: Bei nicht an das Offenfeld habituierten Ratten verließ (im Gegensatz zu Vehikel-behandelten nicht-habituierten oder zu habituierten SR141716A-behandelten Tieren) keines der 6

SR141716A-behandelten Tiere die Kammer – es fand also überhaupt keine Offenfeld-Erkundung statt (Navarro et al., 1997). Außerdem resultierte pharmakologische Blockade der Anandamidhydrolyse in weniger angstähnlichem Verhalten adulter Tiere auf dem EZM (elevated zero maze) und in Unterdrückung isolationsinduzierter Vokalisation bei neugeborenen Ratten, was die anxiolytische Wirkung von Anandamid unterstreicht (Kathuria et al., 2003). Dementsprechend zeigten $CB1^{-/-}$ -Mäuse mehr angstähnliches Verhalten im Hell-Dunkel-Meidetest, auf dem EPM und im Test sozialer Interaktion (Urighen et al., 2004). Diese Tiere wiesen eine basal niedrige Corticosteron-Konzentration im Blut auf, die nach 10min Stress durch eingeschränkte Bewegungsfreiheit („Restraint Stress“) auf das Doppelte im Vergleich zu Wildtypen anstieg (Urighen et al., 2004). Außerdem war der Effekt anxiolytischer Pharmaka in $CB1^{-/-}$ -Mäusen stark beeinträchtigt, was auf eine Einbeziehung von $CB1$ in den Wirkmechanismus von Anxiolytika hindeuten könnte (Urighen et al., 2004).

Im Gegensatz dazu fanden Marsicano und Mitarbeiter keine signifikanten Unterschiede zwischen $CB1^{-/-}$ -Mäusen und Wildtypen in Bezug auf angstähnliches Verhalten auf dem EPM (Marsicano et al., 2002). Mehr noch, von Degroot und Nomikos (2004) wurde gezeigt, dass $CB1$ -Blockade durch SR141716A-Applikation im ‚Shock-Probe Burying Test‘ einige Aspekte des Angstverhaltens reduziert, was mit $CB1^{-/-}$ -Mäusen bestätigt wurde. Außerdem wurden anxiolytische Effekte von SR141716A auch in Vogels Konflikt-Test und in der MDTB gezeigt (Griebel et al., 2005). Haller und Kollegen (2002) zeigten, dass $CB1^{-/-}$ -Mäuse zwar mehr angstähnliches Verhalten auf dem EPM zeigten, dieses jedoch sowohl in $CB1^{-/-}$ -Mäusen als auch in Wildtypen durch SR141716A reduziert wurde. Dies würde auf einen neuen Cannabinoidrezeptor hindeuten, an den SR141716A ebenfalls bindet und der im Gegensatz zu $CB1$ möglicherweise eher Angst als Anxiolyse vermittelt (Haller et al., 2002; Haller et al., 2004b). Den Autoren gelang es, mit einem anderen $CB1$ -Antagonisten (AM251) eine Erhöhung angstähnlichen Verhaltens auf dem EPM nachzuweisen (Haller et al., 2004b). Außerdem hatte AM251 keinen Effekt auf das angstähnliche Verhalten von $CB1^{-/-}$ -Mäusen, was auf eine höhere $CB1$ -Spezifität von AM251 im Vergleich zu SR141716A hinweist (Haller et al., 2004b). Andere Autoren zeigten jedoch, dass SR141716A nur in testerfahrenen Tieren das angstähnliche Verhalten auf dem EPM reduziert, AM251 wirkte hingegen sowohl in testerfahrenen als auch in testunerfahrenen Tieren anxiogen (Rodgers et al., 2005). Demzufolge könnten einige der widersprüchlichen Ergebnisse auf einen möglichen neuen Cannabinoidrezeptor, an den SR141716A bindet, zurückgeführt werden – es gibt jedoch auch andere Erklärungsmöglichkeiten. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Aversivität der Gesamtsituation für die Einbeziehung des Endocannabinoidsystems eine Rolle spielt: $CB1^{-/-}$ -Mäuse zeigten nur dann mehr angstähnliches Verhalten auf dem EPM, wenn der Test unter hellem Licht stattfand (Haller et al., 2004a). Außerdem führte Neuheitstress (Novelty) zu erhöhten ACTH-Leveln in $CB1^{-/-}$ -Mäusen (Haller et al., 2004a). Diese Verstärkung anxiogener Effekte der $CB1$ -Blockade/ -Abwesenheit durch Neuheitsstress stimmen mit den Beobachtungen von Navarro und Mitarbeitern im ‚Defensive Withdrawal‘-Test (1997) überein und deuten darauf hin, dass auch Aversivität und Neuheit der Testsituation einen großen

Einfluss auf die Einbeziehung von Endocannabinoiden haben können. Die vorliegende Arbeit soll neue Einblicke in die Rolle des Endocannabinoidsystems bei der Extinktion konditionierter Furcht im Hinblick auf mögliche nicht-assoziative Prozesse, sowie in Bezug auf den Einfluss der Testsituation liefern. Eine Zusammenfassung der Ziele dieser Arbeit ist im folgenden Abschnitt zu finden.

Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, neue Erkenntnisse zur Rolle des Endocannabinoidsystems bei der Anpassung an aversive Situationen zu liefern. Ausgehend von der Involvierung des CB1-Rezeptors in die Extinktion der Furchtkonditionierung soll herausgefunden werden, auf welche Art und Weise CB1 eine Furcht-„Erleichterung“ vermittelt.

Auf molekularer Ebene soll untersucht werden, inwiefern intrazelluläre Signalkaskaden an der CB1-vermittelten Extinktion konditionierter Furcht teilnehmen. Dabei sind die durch extrazelluläre Signale regulierten MAP-Kinasen (ERKs) p42 und p44 sowie die durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktivierte Proteinkinase B (AKT) und auch die Phosphatase Calcineurin von besonderem Interesse, da sie sowohl in die Vermittlung der Extinktion konditionierter Furcht wie auch in CB1-vermittelte intrazelluläre Signalkaskaden involviert sind. Demzufolge sollen der Phosphorylierungsstatus der Kinasen, der Auskunft über ihre Aktivität gibt, sowie das Expressionslevel der Phosphatase Calcineurin in ausgewählten Hirnstrukturen von CB1^{-/-}-Mäusen mit dem ihrer Wildtyp-Wurfgeschwister bei der Extinktion konditionierter Furcht verglichen werden. Dabei sollen Hirnregionen untersucht werden, die eine wichtige Rolle für die Extinktion konditionierter Furcht spielen, wie der ventromediale PFC (prälimbischer und infralimbischer Cortex), basolateraler und zentraler Nucleus der Amygdala (BLA und CEA), sowie der dorsale und ventrale Hippocampus. Wenn CB1 in den entsprechenden Hirnregionen intrazelluläre Signalkaskaden bei der Extinktion konditionierter Furcht moduliert, sind Unterschiede im Phosphorylierungsstatus der Kinasen und/ oder im Expressionslevel von Calcineurin zwischen CB1^{-/-}-Mäusen und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern zu erwarten (*Manuskript 1*).

Die Extinktion konditionierter Furcht wird derzeit mit einem Modell assoziativen Lernens erklärt. Interessanterweise gehört die Extinktion konditionierter Furcht zu den wenigen Lernaufgaben, die durch Endocannabinoide gefördert werden. Auf welche Art und Weise dies geschieht, ist allerdings unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob tatsächlich rein assoziative Prozesse zur Furchtkonditionierung und deren Extinktion beitragen, oder ob nicht-assoziative Prozesse, wie z.B. stressbezogene Sensitivierung und Habituation auch eine Rolle spielen. Zu diesem Zweck soll ein der Furchtkonditionierung analoges, jedoch nicht-assoziatives Sensitivierungsparadigma etabliert werden, in dem eine nicht-assoziative Abnahme der Furchtreaktion durch Habituation von anderen Extinktionsprozessen isoliert untersucht werden kann. Dabei sollen die prozeduralen Gemeinsamkeiten von Furchtkonditionierung und Fußschock-Sensitivierung genutzt werden, d.h. der Ton, der während der Konditionierung mit dem Schock gepaart und danach als CS benutzt wird, sollte möglichst auch als Testreiz der nicht-assoziativen Sensitivierung verwendet werden. Als Voraussetzung dafür ist herauszufinden, ob ein solcher Ton, der in naiven

Tieren keine Furchtreaktion auslöst, durch vorherige Applikation eines Fußschocks die Fähigkeit erlangen kann, eine (nicht-assoziative) Furchtreaktion auszulösen. Damit wäre zu erklären, ob die Furchtantwort nach der Furchtkonditionierung tatsächlich auf rein assoziative Prozesse zurückzuführen ist oder ob eine unspezifische Erhöhung der Reaktivität ebenfalls zur Furchtantwort beiträgt. Da auch die Extinktion konditionierter Furcht derzeit mit einem Modell assoziativen Lernens erklärt wird, gilt es ferner zu untersuchen, ob auch hier nicht-assoziative Prozesse, wie Habituation, eine Rolle spielen. (*Manuskript 2*).

Falls neben assoziativen auch nicht-assoziative Lernprozesse zur Extinktion beitragen, gilt es zu klären, in welche dieser Komponenten das Endocannabinoidsystem involviert ist. Dafür sollen CB1^{-/-}-Mäuse und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister in der Sensitivierung sowie in Lernaufgaben zu assoziativem Sicherheitslernen und zur Habituation verglichen werden. Dabei soll untersucht werden, in welcher Art von Lernaufgaben CB1^{-/-}-Mäuse Defizite (oder auch Vorteile) aufweisen, um Rückschlüsse über die CB1-vermittelte Extinktion konditionierter Furcht zu erhalten (*Manuskript 3*).

Besonders bei der akuten Anpassung an aversive Situationen haben sich widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur gezeigt, die auf einen Einfluss der Testsituation hindeuten. Mit dem Paradigma der Fußschock-Sensitivierung soll die Abhängigkeit der Involvierung des Endocannabinoidsystems in die Anpassung an aversive Situationen von der Aversivität selbst, als hervorstechendem Parameter, untersucht werden. Dafür soll der Einfluss von Fußschocks unterschiedlicher Intensität auf die Furchtantwort auf den gleichen Ton hin in CB1^{-/-}-Mäusen und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern verglichen werden. Wichtige Befunde sollen pharmakologisch durch Applikation des CB1-Antagonisten bestätigt werden. Falls sich die Einbeziehung von CB1 in die akute Anpassung an aversive Situationen als abhängig von der Fußschock-Intensität erweist, sollen weitere Pharmaka, wie Wiederaufnahme- und Abbauehemmer des Endocannabinoidsystems zum Einsatz kommen, um den zugrunde liegenden Mechanismus (z.B. fehlende Erregung oder Erschöpfung des Systems) zu erforschen und um Hinweise auf mögliche Therapieansätze zu erhalten (*Manuskript 4*).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der CB1 Cannabinoidrezeptor während der Extinktion konditionierter Furcht den Phosphorylierungsstatus der Kinasen p42, p44 (beides ERKs) und AKT (Proteinkinase B), sowie das Expressionslevel der Phosphatase Calcineurin in verschiedenen Hirnstrukturen unterschiedlich reguliert (Manuskript 1: Cannich et al., 2004). Die Analyse der Verhaltensdaten bestätigte dabei eine beeinträchtigte Extinktion konditionierter Furcht in CB1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu deren Wildtyp-Wurfgeschwistern (CB1^{+/+}; siehe auch Marsicano et al., 2002). Dabei fanden sich im basolateralen Nucleus der Amygdala (BLA) in CB1^{-/-}-Mäusen weniger phosphoryliertes (und damit aktiviertes) p44 und ein geringeres Expressionslevel von Calcineurin – jedoch eine erhöhte Phosphorylierung von AKT und keine signifikante Veränderung in der Phosphorylierung von p42. Überhaupt zeigte sich die Phosphorylierung von p42 lediglich im ventromedialen PFC (vmPFC) signifikant verändert, wobei in CB1^{-/-}-Mäusen die p42-Phosphorylierung abnahm. Auch die p44-Phosphorylierung sowie die Calcineurin-Expression waren im vmPFC von CB1^{-/-}-Mäusen verringert, was die wichtige Rolle dieser Hirnregion bei der Extinktion konditionierter Furcht unterstreicht. Im zentralen Nucleus der Amygdala (CEA) hingegen fand sich eine Erhöhung der Phosphorylierung von p44 und eine erhöhte Calcineurin-Expression bei CB1^{-/-}-Mäusen, was von besonderem Interesse im Zusammenhang mit der Rolle des CEA als Outputstation der Amygdala für Furchtreaktionen und der daraus resultierenden gegensätzlichen Funktionen von CEA und vmPFC bei der Expression und Extinktion konditionierter Furcht sein könnte. Im Hippocampus zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Phosphorylierung von p42 und p44, das Expressionslevel von Calcineurin war sowohl im dorsalen wie auch im ventralen Hippocampus von CB1^{-/-}-Mäusen verringert und die AKT-Phosphorylierung im dorsalen Hippocampus erhöht. Zusammenfassend wurden die Aktivierungsmuster der Kinasen sowie das Expressionslevel von Calcineurin je nach Hirnregion unterschiedlich durch CB1 während der Extinktion konditionierter Furcht beeinflusst, was auf eine sehr differenzierte Einbeziehung von CB1 in die Extinktion konditionierter Furcht hindeutet.

Um herauszufinden, inwieweit die Furchtkonditionierung und deren Extinktion tatsächlich auf assoziative Lernprozesse zurückzuführen sind, wurde untersucht, ob ein Fußschock allein ausreicht, um eine Furchtreaktion auf einen Ton hervorzurufen, der bei naiven Mäusen keine Furcht auslöst (Manuskript 2: Kamprath & Wotjak, 2004). Dabei stellte sich heraus, dass die Erfahrung eines Fußschocks in einer Furchtreaktion auf den Ton resultiert, die erst durch die Verstärkung der Reaktivität durch Sensitivierung sichtbar wurde. Da der gleiche Fußschock und der gleiche Ton auch bei einer auditorischen Furchtkonditionierung Verwendung finden, konnte gezeigt werden, dass die Furchtantwort auf den Ton nach einer Furchtkonditionierung, also einer Ton-Schock-Paarung, nicht auf rein assoziative Lernprozesse allein, d.h. eine Verknüpfung zwischen Ton und Schock, sondern auch auf eine unspezifische Sensitivierungskompo-

nente zurückzuführen ist. So zeigten sowohl Tiere, die eine Furchtkonditionierung erfahren hatten als auch sensitivierte Tiere ein erhöhtes angstähnliches Verhalten im Hell-Dunkel-Meidetest, was nicht allein auf die assoziative Ton-Fußschock-Verknüpfung zurückzuführen ist. Auch für die Extinktion konditionierter Furcht konnte die Beteiligung nicht-assoziativer Prozesse nachgewiesen werden. Allerdings konnte hier keine unspezifische Furchtabnahme im Sinne einer ‚Desensitivierung‘ gezeigt werden. So erwies sich die Abnahme der Furchtreaktionen als stimuluspezifisch und ist folglich Habituationsprozessen zuzuschreiben. Aus diesen Ergebnissen wurde die ‚Zwei-Komponenten-Theorie‘ der Furchtkonditionierung abgeleitet, die besagt, dass die Furchtreaktion nach einer Furchtkonditionierung auf eine assoziative wie auch auf eine nicht-assoziative Komponente des Furchtgedächtnisses zurückzuführen ist. Dabei zeigte sich die nicht-assoziative Komponente als wesentlich anfälliger für Extinktion bzw. Habituation im Vergleich zur assoziativen Komponente. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass nicht alle Befunde, die mittels Furchtkonditionierung erzeugt werden, auf rein assoziatives Lernen zurückgeführt werden können. Da die Furchtkonditionierung auch oft bei der Untersuchung des Verhaltens in Mausmutanten verwendet wird, ist zu berücksichtigen, dass Defizite in der Furchtkonditionierung oder deren Extinktion in Mutanten nicht notwendigerweise Rückschlüsse auf Defizite im assoziativen Lernen zulassen.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob der CB1 Cannabinoidrezeptor die Extinktion konditionierter Furcht eher über assoziative Lernprozesse oder über Habituation vermittelt (Manuskript 3; Kamprath et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurden CB1^{-/-}-Mäuse und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister einer Sensitivierung unterzogen und daraufhin, ähnlich wie bei der Furchtkonditionierung, verlängerte Furchtantworten bei CB1^{-/-}-Mäusen beobachtet. Die Beeinträchtigung in der Abnahme sensitivierter Furcht in CB1^{-/-}-Mäusen zeigte sich sogar noch stärker ausgeprägt als die Beeinträchtigung in der Extinktion konditionierter Furcht. In assoziativem Sicherheitslernen hingegen konnten keine Unterschiede zwischen CB1^{-/-}-Mäusen und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern festgestellt werden. Auch in der Langzeithabituation, jedoch nicht in der Kurzzeitanpassung auf laute Töne hin, zeigten sich naive CB1^{-/-}-Mäuse beeinträchtigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der CB1 Cannabinoidrezeptor Extinktion konditionierter Furcht über Habituationsprozesse vermittelt. Dies erklärt auch, warum CB1 in anderen assoziativen Lernprozessen ohne Involvement der Habituation an aversive Stimuli keine oder gegenteilige Effekte vermitteln kann. Damit ist das Endocannabinoidsystem das erste molekulare System, für das eine spezifische Einbeziehung in die Habituationskomponente der Extinktion konditionierter Furcht nachgewiesen werden konnte.

Damit wurde eine generelle Einbeziehung des Endocannabinoidsystems in die Langzeithabituation an aversive Situationen gezeigt, wobei nicht immer eine Einbeziehung von CB1 in die akute Anpassung beobachtet werden konnte. Um die Involvement des Endocannabinoidsystems in die akute Adaptation an aversive Situationen genauer zu untersuchen, wurden CB1^{-/-}-Mäuse und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister mit Fußschocks

unterschiedlicher Intensität sensitiviert und ihre Furchtreaktion auf einen Ton gemessen (Manuskript 4). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Furchtantwort auf den Ton zwischen den Genotypen nach Vorerfahrung geringer und starker Fußschocks - nur moderate Fußschocks führten zu einer Beeinträchtigung der Kurzzeitanpassung der Furchtreaktion auf den Ton bei CB1^{-/-}-Mäusen. Dies deutet auf einen ‚kritischen Bereich‘ der Aversivität in Bezug auf die Endocannabinoidwirkung hin, wobei eine gewisse Aversivität erreicht werden muss, um das Endocannabinoidsystem zu aktivieren. Warum das Endocannabinoidsystem jedoch nicht die Abnahme starker Furchtreaktionen vermittelt, ist auf andere Gründe zurückzuführen: So erwies sich die Applikation von Endocannabinoid-Wiederaufnahme- und Abbauprozessen bei Inzuchtmäusen als hilfreich, um starke Furchtantworten zu reduzieren. Dies deutet auf eine Restriktion der Endocannabinoidwirkung durch effiziente Wiederaufnahme- und Abbauprozesse hin. Diese Befunde sind in der Hypothese vom ‚kritischen Bereich‘ der Endocannabinoidwirkung zusammengefasst. Evolutiv lässt sich die ‚obere Schranke‘ dieses Bereichs insofern erklären, als dass das Endocannabinoidsystem mittlere Furchtantworten dämpft und somit starke Furchtreaktionen nur in sehr gefährlichen Situationen als adäquate Anpassung sowie mit der Möglichkeit der Bildung eines Furchtgedächtnisses zulässt.

Da die Ergebnisse der einzelnen Experimente in den jeweiligen Manuskripten bereits diskutiert sind, soll im Folgenden vor allem auf übergreifende Probleme, Interpretationen, sowie auf die Einordnung der Arbeit in Bezug auf den derzeitigen Forschungsstand eingegangen werden.

CB1-vermittelte Modulation von Kinasen und Phosphatasen im ‚Furchtkreislauf‘ – assoziative oder nicht-assoziative Prozesse?

Bei der Untersuchung der Modulation des Phosphorylierungsstatus‘ der Kinasen bzw. des Expressionslevels von Calcineurin durch CB1 wurde das Paradigma der Furchtkonditionierung und Extinktion angewandt (Manuskript 1; Cannich et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurden Hirnregionen ausgewählt, deren Einbeziehung in diese Verhaltensparadigma als essenziell beschrieben wurde (Übersicht zum neuronalen Schaltkreis konditionierter Furcht siehe Fendt & Fanselow, 1999; LeDoux, 2000; Pare et al., 2004; Übersicht zur Extinktion konditionierter Furcht siehe Myers & Davis, 2002). Dabei werden im Hippocampus vor allem kontextuelle Informationen verarbeitet (Phillips & LeDoux, 1994; Maren et al., 1997; Richmond et al., 1999; Trivedi & Coover, 2004). Der ventromediale präfrontale Cortex (vmPFC), der den infralimbischen Cortex (IL) beinhaltet, ist hingegen hauptsächlich in die Extinktion konditionierter Furcht einbezogen (Milad & Quirk, 2002; Quirk et al., 2003; Milad et al., 2004). Die zentrale Rolle bei der Furchtkonditionierung wird jedoch der Amygdala zugeschrieben, da der laterale Nucleus der Amygdala (LA) bzw. der basolaterale Komplex der Amygdala (BLAC; bestehend aus LA und basolateralem Nucleus, BLA), als Ort der Assoziation von CS und US während der Furchtkonditionierung identifiziert wurde (Abb. 3, Projektion (1); Überblick und historische Übersicht siehe LeDoux, 1994; LeDoux, 2000). Im intakten

(nicht lädierten) Gehirn stellt neben dem LA auch der BLA ein wichtiges Korrelat der Furchtkonditionierung dar (Anglada-Figueroa & Quirk, 2005), was die Rolle des gesamten BLAC unterstreicht. Außerdem wurde im BLA eine erhöhte Endocannabinoidfreisetzung während der Extinktion konditionierter Furcht beobachtet (Marsicano et al., 2002).

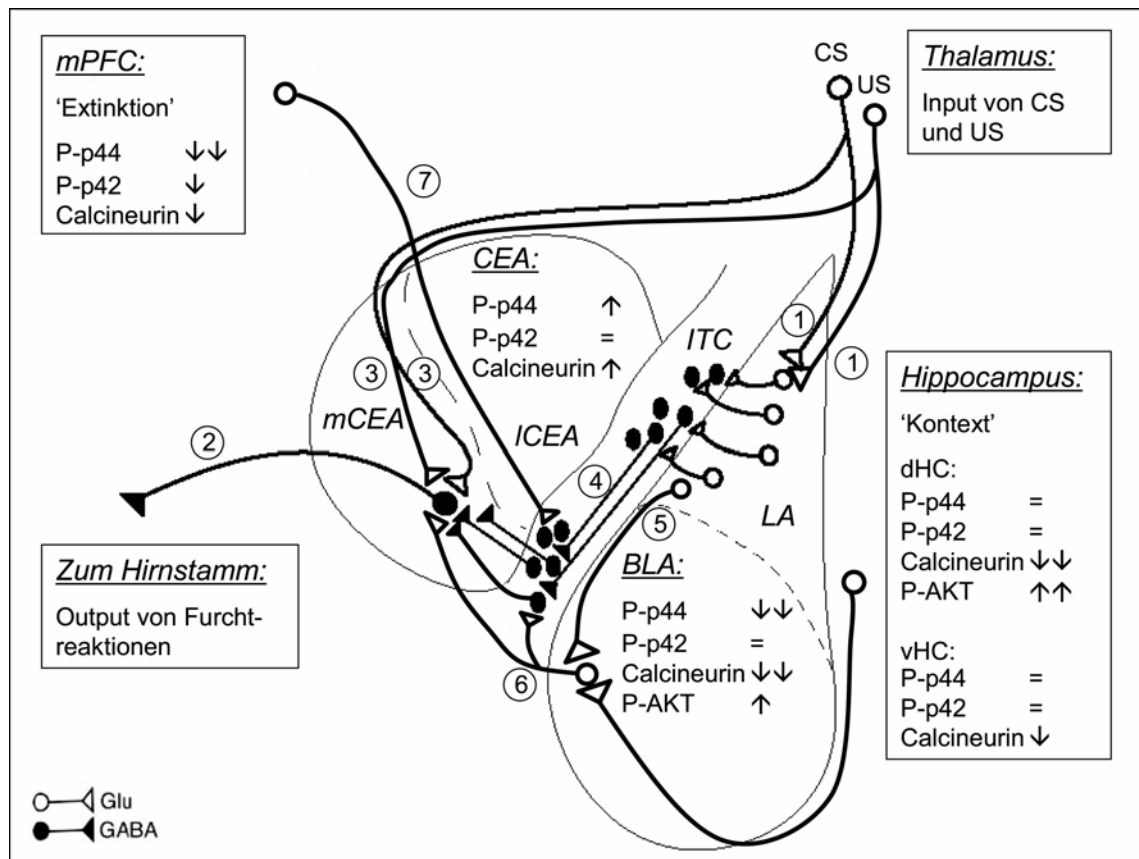


Abbildung 3: Neuronale Schaltkreise der Amygdala, die die Akquisition und Extinktion konditionierter Furcht vermitteln (Erläuterung siehe Text, auch zu den nummerierten Projektionen; Schaltkreise aus Quirk et al., 2003; Pare et al., 2004; modifiziert nach Royer et al., 1999; LeDoux, 2000). Zusätzlich wurden die in Manuskript 1 in $CB1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern gemessenen Veränderungen im Phosphorylierungsstatus der Kinasen p42, p44 und AKT sowie in der Calcineurin-Expression in den jeweiligen Hirnregionen dargestellt. Untersuchungen zu dem abgebildeten Modell und dessen anatomische Grundlagen basierten auf dem Rattenhirn. Im Gegensatz zu anderen Hirnregionen des Furchtkonditionierungsnetzwerks gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt kaum Hinweise, ob entsprechende anatomische Verbindungen der Massa intercalata (ITC) auch bei Mäusen existieren, obwohl auch Mäuse generell eine ITC aufweisen (Millhouse, 1986; Marowsky et al., 2005).

Der zentrale Nucleus der Amygdala (CEA; unterteilt sich in einen medialen Sektor, mCEA und einen lateralen Sektor, ICEA, siehe Abb.3) hingegen projiziert zu Hirnstammarealen, die die Expression von Furchtantworten kontrollieren und gilt somit als Output-Station der Amygdala (siehe Abb.3, Projektion (2); Übersicht siehe LeDoux, 2000). Neue anatomische Befunde zeigten jedoch, dass auch der mCEA auditorischen und nozizeptiven Input vom Thalamus erhält, der Informationen von CS und US vermitteln kann (siehe Abb.3, Projektion (3)). Demnach könnte der CEA mehr als eine bloße

Output-Station von der Amygdala zum Hirnstamm sein und selbst einen Ort assoziativer Plastizität darstellen (Übersicht siehe Pare et al., 2004). In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die Amygdala nicht die einzige Hirnregion assoziativer Plastizität während der Furchtkonditionierung darstellt. So konnte auch im Corpus geniculatum mediale (MGN) des Thalamus (Wepsic, 1966; Love & Scott, 1969; McKernan & Shinnick-Gallagher, 1997), im auditorischen Cortex (Bakin & Weinberger, 1990), sowie in der CA1-Region des Hippocampus (Tang et al., 2003) durch auditorische Furchtkonditionierung assoziative Plastizität induziert werden. In anderen Studien, die die Modulation metabolischer Aktivität von Neuronen in Furchtkonditionierungsexperimenten untersuchten, wurden in der Amygdala von Mäusen und Ratten im Gegensatz zu verschiedenen Regionen des frontalen Cortex' keine signifikanten Veränderungen festgestellt – weder durch die Konditionierung noch durch Extinktion (Barrett et al., 2003; Gonzalez-Lima & Scheich, 1986; Conejo et al., 2005). Diese Resultate lassen Zweifel an der Amygdala als einzigem Ort assoziativer Plastizität während der Furchtkonditionierung aufkommen, wobei manche Autoren argumentieren, dass die Amygdala zwar eine wichtige modulatorische Rolle im Netzwerk des Furchtgedächtnisses spielt, die assoziative Plastizität jedoch in anderen Hirnstrukturen zu suchen ist (vgl. Cahill et al., 1999).

Da kürzlich herausgefunden wurde, dass der LA nicht, wie ursprünglich angenommen, zu den zum Hirnstamm projizierenden Neuronen des mCEA projiziert, wird eine Projektion über GABAerge Zellen, die sich zwischen BLA und CEA befinden und als Massa intercalata (ITC) bezeichnet werden, angenommen (siehe Abb.3, Projektion (4); Pare et al., 2004). Eine weitere mögliche Projektion führt vom LA zum BLA (Abb.3, Projektion (5)), von dem aus Neuronen sowohl zur ITC wie auch zum mCEA projizieren (siehe Abb.3, Projektion (6); Royer et al., 1999), die den mCEA folglich bidirektional modulieren könnten. Dies könnte die reziproke Regulation der p44-Phosphorylierung und Calcineurin-Expression in BLA und CEA von CB1^{-/-}-Mäusen während der Extinktion der Furchtkonditionierung erklären (Manuskript 1; Cannich et al., 2004). Eine CB1-abhängige Modulation intrazellulärer Signalkaskaden im BLA könnte beispielsweise über die LA-BLA-Projektion (Abb.3, Projektion (5)) vermittelt werden, da eine niedrigfrequente Stimulation der LA zur Unterdrückung inhibitorischer postsynaptischer Ströme (LTD_i) in BLA-Neuronen von CB1^{+/+}-Mäusen, jedoch nicht von CB1^{-/-}-Mäusen, führte (Marsicano et al., 2002). Außerdem induzierte eine hochfrequente Stimulation des LA in CB1^{-/-}-Mäusen eine stärkere Langzeitpotenzierung (LTP) im BLA als in ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (Marsicano et al., 2002). Diese Befunde deuten auf eine CB1-abhängige Modulation des BLA durch den LA hin, die in Veränderungen in Signaltransduktionskaskaden im BLA resultieren könnten.

Die ITC sind auch das Projektionsziel glutamaterger Neuronen des vmPFC (Abb.3, Projektion (7)), die auf diesem Wege, d.h. über eine ITC-vermittelte GABAerge Inhibition, den mCEA hemmen und Extinktion vermitteln können (siehe Abb.3; Quirk et al., 2003). Die in Manuskript 1 (Cannich et al., 2004) gefundene Verringerung der Phosphorylierung (und damit Aktivierung) von Kinasen und des Expressionslevels von

Calcineurin im vmPFC von CB1^{-/-}-Mäusen könnte unter Berücksichtigung dieses Modells mit der beeinträchtigten Extinktion dieser Tiere zusammenhängen. Die CB1-vermittelte reziproke Modulation von Signalkaskaden-Proteinen in vmPFC und CEA (Manuskript 1; Cannich et al., 2004) entspricht ebenfalls derzeitigen Extinktionsmodellen, da der vmPFC den CEA über die ITC inhibieren soll. Folglich könnte die Erhöhung der p44-Phosphorylierung sowie des Calcineurinlevels im CEA der CB1^{-/-}-Mäuse eine erhöhte CEA-Aktivität widerspiegeln, die auf Verhaltensebene in verstärkten Furchtreaktionen (und damit weniger Extinktion) resultiert, wie sie in CB1^{-/-}-Mäusen beobachtet wurden. Weitere anatomische Untersuchungen zur CB1-Expression in den Amygdala- und PFC-Subregionen des hier verwendeten Mäusestamms könnten zu einer genaueren Interpretation der Daten wesentlich beitragen, wobei aufgrund der präsynaptischen Lokalisation von CB1 ein geeigneter Antikörper bzw. ein markierter CB1-Ligand einer *In situ*-Hybridisierung vorzuziehen wären.

Die Einbeziehung der in Manuskript 1 (Cannich et al., 2004) untersuchten Phosphatasen und Calcineurins in die Extinktion konditionierter Furcht wurde bereits spezifisch für bestimmte Hirnregionen gezeigt. Dabei spielt die MAPK-Kaskade eine wichtige Rolle im BLA für die Extinktion des furchtpotenziierten Schreckreflexes (Lu et al., 2001) sowie bei der Erleichterung dieser Extinktion durch D-Cycloserin (Yang & Lu, 2005), das möglicherweise Extinktionslernen durch Bindung an die Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors verbessert (Walker et al., 2002; Richardson et al., 2004). Auch im mPFC scheint die MAPK-Kaskade eine wichtige Rolle für die Extinktion zu spielen, da die Blockade der MAPK im mPFC nach der Extinktion den Abruf des Gedächtnisses für die Extinktion konditionierter Furcht beeinträchtigt, wobei die Verhaltensstarre als Maß für das Furchtgedächtnis diene (Hugues et al., 2004). In der Amygdala konnte kürzlich eine Einbeziehung der Phosphatase Calcineurin in die Extinktion des Furchtgedächtnisses gezeigt werden (Lin et al., 2003b; Lin et al., 2003a; Lin et al., 2003c).

Generell wurden in Manuskript 1 Hirnregionen ausgewählt, die im Zusammenhang mit der assoziativen Plastizität der Furchtkonditionierung und Extinktion stehen. In Manuskript 3 (Kamprath et al., 2006) wurde jedoch gezeigt, dass CB1 Habituationsaspekte der Extinktion konditionierter Furcht vermittelt und nicht in deren assoziative Aspekte involviert ist. Dies kann einerseits damit zusammenhängen, dass auch eine auf Assoziation basierende Furchtantwort (bzw. der assoziative Anteil) habituiert werden könnte, aber andererseits können auch die beschriebenen Hirnregionen in verschiedene Funktionen involviert sein. So ist der PFC nicht nur in die Extinktion konditionierter Furcht involviert, sondern auch in unkonditionierte Furchtantworten von Mäusen und Ratten (Morrow et al., 2000; Wall et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Subregionen IL und ventromedialer orbitaler Cortex des PFC komplementäre Funktionen bei der Verarbeitung eines Bedrohungsreizes (Prädator-Stress) übernehmen: der IL scheint dabei in eine Art ‚wachsamer Evaluierung‘ der Bedrohungssituation (‚risk assessment‘) einbezogen zu sein, wohingegen der ventromediale orbitale Cortex ‚voreilige‘ Vermeidungsantworten inhibiert, um die IL-vermittelten adaptiven Verhaltensweisen zu erleichtern (Wall et al., 2004). Außerdem wurde nachgewiesen,

dass der IL gemeinsam mit einer anderen Subregion des vmPFC, dem prälimbischen Cortex (PL), als Detektor für die Kontrollierbarkeit von Stressoren fungiert (Amat et al., 2005; Robbins, 2005). Nicht vorhersagbare Stressoren, wie bestimmte Tonmuster, lösten hingegen eine erhöhte Aktivität in der Amygdala sowie angsthohes Verhalten auf dem EPM aus (Herry et al., 2005). Obwohl hier keine assoziativen Lernvorgänge offensichtlich wurden, erinnern diese Befunde an das Wechselspiel von vmPFC und Amygdala während der Extinktion konditionierter Furcht.

Für die Amygdala wurde angenommen, dass LA, BLA und CEA Teil des Netzwerks für konditionierte Furcht sind, jedoch keine Rolle bei unkonditionierter Furcht spielen (Rosen, 2004). Im Gegensatz zu LA, BLA und CEA, sind der mediale Nucleus der Amygdala sowie der Nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) essenziell, um TMT-induzierte Verhaltensstarre auszulösen (Fendt et al., 2005; Muller & Fendt, 2006). Allerdings zeigten Studien, die nicht auf Läsionen oder Inaktivierung, sondern auf Aktivitätsmessung (c-fos) basieren, dass neben dem medialen Nucleus auch der BLA mit schwacher Aktivierung auf TMT reagiert. Temporäre Inaktivierung des medialen Nucleus der Amygdala resultierte in kompletter Blockade TMT-induzierter Verhaltensstarre. Temporäre Inaktivierung des BLA hingegen führte lediglich zu einer Verzögerung der Verhaltensstarre, was auf einen modulierenden Einfluss des BLA hindeutet (Muller & Fendt, 2006). Jedoch lassen sich diese Befunde zu TMT-induzierter Verhaltensstarre möglicherweise nicht auf unkonditionierte Furchtreaktionen generell übertragen. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass bereits bei jungen Ratten (P14) eine Inaktivierung des medialen Nucleus der Amygdala eine Furchtreaktion auf eine alte Ratte blockiert, eine unkonditionierte Furchtreaktion auf ein lautes Geräusch jedoch nicht. Umgekehrt blockiert eine Inaktivierung des LA die unkonditionierte Verhaltensstarre auf ein lautes Geräusch, jedoch nicht auf eine alte Ratte (Chen et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass der mediale Nucleus der Amygdala vor allem bei der Verarbeitung olfaktorischer Stimuli eine wichtige Rolle spielt, der LA jedoch bei akustischen Stimuli involviert ist. Solche Befunde könnten darauf hindeuten, dass nicht LA für konditionierte Furcht und medialer Nucleus der Amygdala für unkonditionierte Furcht eine Rolle spielen, sondern dass die ‚Eingangsstationen‘ der Amygdala von den Modalitäten der Stimuli abhängen.

Außerdem zeigen Neuronen des CEA nach chronischem Kältestress eine erhöhte Sensibilität gegenüber Fußschocks, was teilweise auf erhöhten BLA-Output zurückzuführen sein könnte und die präfrontale Kontrolle über den CEA-Output wird durch solchen Stress abgeschwächt (Correll et al., 2005). Der CEA wird auch mit Mechanismen passiven Copings (wie z.B. immobilem Verhalten) als Anpassung an stressvolle Situationen in Verbindung gebracht (Roozendaal et al., 1997). Dies deutet darauf hin, dass nicht nur BLA und LA, sondern auch der CEA in unkonditionierte Furchtantworten einbezogen sein kann.

Obwohl in verschiedenen Ansätzen versucht wurde, neurale Substrate konditionierter und unkonditionierter Furcht zu unterscheiden (vgl. Walker & Davis, 1997; Walker et al., 2003; Rosen, 2004), konnten bisher keine Hirnstrukturen identifiziert werden, die

nur in konditionierte Furcht involviert sind und nicht in unkonditionierte Aspekte. Dies zeigt die starke Überlappung der neuronalen Netzwerke für konditionierte und unkonditionierte Furcht. Somit können die CB1-modulierten Veränderungen der Phosphatasen- und Kinasenaktivität in Amygdala, PFC und Hippocampus (Cannich et al., 2004) weder dem einen noch dem anderen Aspekt eindeutig zugeordnet werden. Im Hinblick auf die in Manuskript 3 (Kamprath et al., 2006) gezeigte Beteiligung von CB1 an Habituationsprozessen, aber nicht an assoziativem Lernen während der Extinktion, könnten die in Manuskript 1 gezeigten Veränderungen mit Habituationsprozessen zusammenhängen. Inwieweit dies der Fall ist, und auch welche Rolle Amygdala, PFC und Hippocampus bei der Habituation an aversive Stimuli spielen, bleibt zu klären. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass für die Amygdala bereits gezeigt werden konnte, dass dort habituierte Neuronen existieren (Ben Ari & Le Gal, 1974; Herry et al., 2005).

Schutz vor Übererregbarkeit – eine generelle Funktion von CB1?

In Bezug auf Angsterkrankungen ist das GABAerge System von großer Bedeutung, da Benzodiazepine, eine wichtige Klasse angstlösender Medikamente, ihre Wirkung über den GABA_A-Rezeptorkomplex vermitteln, indem sie die inhibitorische Wirkung von GABA verstärken (Überblick, auch zur Geschichte der Entwicklung angstlösender Medikamente, siehe Snyder, 1994). Dies unterstreicht die Bedeutung inhibitorischer Kontrolle, um Angsterkrankungen zu verhindern. So üben GABAerge Neuronen eine tonische Kontrolle über die neuronalen Substrate defensiven Verhaltens des Mittelhirns aus (Borelli et al., 2005; Brandao et al., 2005). Injektionen des GABA-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin in das dorsolaterale zentrale Höhlengrau (dIPAG) verursachte Fluchtverhalten, Injektionen des Glutaminsäuredecarboxylase (GAD)-Inhibitors Semicarbazid, der die GABA-Synthese hemmt, resultierte hingegen in Verhaltensstarre und einer Erhöhung der Aktivierungsmuster (Fos) im laterodorsalen Nucleus des Thalamus (LD) und im ventrolateralen PAG. Flucht induzierende Bicucullin-Injektionen ins dorsolaterale PAG hingegen führten zu einer Erhöhung der Aktivität in hypothalamischen Kernen, im CEA, im LD, im Nucleus cuneiformis sowie im Locus coeruleus (Borelli et al., 2005). Demnach scheinen GABAerge Mechanismen im Tektum des Mittelhirns am sensorischen ‚Gating‘ während verschiedener emotionaler Zustände beteiligt zu sein (Brandao et al., 2005).

Die Kontrolle von Angstzuständen erfolgt somit über inhibitorische Mechanismen. Neben dem GABAergen System besitzen auch Endocannabinoide eine hemmende Wirkung, wobei die Ausschüttung von Transmittern präsynaptisch inhibiert wird. Somit könnten Endocannabinoide ihre Furcht dämpfende Wirkung entfalten, indem sie vor Übererregung schützen. Ein solcher Schutz vor Übererregbarkeit durch Endocannabinoide konnte bereits in einem anderen Zusammenhang gezeigt werden: So sind konditionale Mausmutanten, die in Prinzipalneuronen des Vorderhirns keinen CB1 exprimieren, wesentlich anfälliger für Kainat-induzierte Krampfanfälle als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister (Marsicano et al., 2003). Kann der Schutz vor neuronaler ‚Übererre-

gung' also eine übergreifende Funktion des Endocannabinoidsystems darstellen? Dagegen spricht, dass CB1 außer auf glutamatergen Neuronen hauptsächlich auf GABAergen Neuronen gefunden wurde (Marsicano & Lutz, 1999). Dort könnten Endocannabinoide die GABAerge Inhibition unterdrücken und somit einen GABA-entgegengesetzten Effekt erzielen. Viele GABAerge Neuronen exprimieren jedoch keinen CB1 und es wurde bisher kein Mechanismus identifiziert, über den der GABA-Rezeptor die Endocannabinoidsynthese stimuliert. Die Ausschüttung von Endocannabinoiden wurde eher im Zusammenhang mit exzitatorischen Neurotransmittern festgestellt, z.B. über metabotrope Glutamatrezeptoren oder eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Diese Differenzen zwischen GABAerem System und Endocannabinoidsystem führen in Bezug auf die Extinktion konditionierter Furcht jedoch nicht unbedingt zu Widersprüchlichkeiten. So bewirkte die systemische Applikation des GABA-Antagonisten Picrotoxin vor dem Extinktionstraining eines aktiven Vermeidungsparadigmas ein verbessertes Extinktionsgedächtnis (McGaugh et al., 1990). Die systemische Gabe des Benzodiazepins Diazepam vor dem Extinktionstraining hingegen führte zu einer Beeinträchtigung des Extinktionsgedächtnisses (Pereira et al., 1989). Obwohl GABA kontrollierend auf Angstzustände wirkt, scheint also das Extinktionstraining aversiver Konditionierungen durch GABA eher beeinträchtigt zu werden (Übersicht siehe Myers & Davis, 2002). Myers und Davis schließen daraus, dass die während der Extinktion erzeugte Plastizität nicht von GABA abhängt und eine GABA-Freisetzung während der Extinktion diese eher beeinträchtigen würde. In diesem Zusammenhang könnte also eine endocannabinoidvermittelte GABA-Hemmung sogar extinktionsfördernd wirken. Dies gilt jedoch nicht für Kurzzeiteffekte (Kurzzeitextinktion, within-session-extinction) und für allgemeine Angstzustände, die wahrscheinlich auf abweichende neuronale Netzwerke zurückgreifen. In Manuskript 3 (Kamprath et al., 2006) konnte eine unterschiedliche Einbeziehung von CB1 in Kurz- und Langzeiteffekte gezeigt werden, die damit zusammenhängen könnte. In dieser Hinsicht könnte der Vergleich konditionaler Mausmutanten wie z.B. von Tieren, die keinen CB1-Rezeptor in GABAergen Neuronen exprimieren ($CB1^{ff;Dlx5/6-Cre}$) mit solchen, die keinen CB1-Rezeptor in Prinzipalneuronen des Vorderhirns exprimieren ($CB1^{ff;CaMKII\alpha-Cre}$) Hinweise auf die unterschiedliche Einbeziehung CB1-exprimierender GABAerger und glutamaterger Neuronen in bestimmte Verhaltensaufgaben liefern. Eine genauere Untersuchung des Zusammenspiels von GABAerem System und Endocannabinoidsystem bei Kurz- und Langzeitanpassung an aversive Situationen könnte zu entscheidenden Einblicken in inhibitorische Kontrollmechanismen des Gehirns führen.

Das Tiermodell: $CB1^{-/-}$ - und Inzuchtmäuse

Obwohl die Verwendung von *knockout* Mäusen große Fortschritte bei der Erforschung der Funktion bestimmter Genprodukte mit sich bringt, ist sie doch mit einigen Problemen behaftet. Neben der Problematik, dass viele homozygote *knockout* Mäuse bei Erreichen bestimmter Entwicklungsstufen nicht mehr lebensfähig sind bzw. über ernste Beeinträchtigungen verfügen, ist ein anderer offensichtlicher Nachteil die Möglichkeit der Kompensation. Fehlt ein Genprodukt von Beginn der Entwicklung an, so wird die-

ser Verlust, wenn möglich, über andere Mechanismen kompensiert. Insbesondere im Gehirn, das über eine hohe Plastizität verfügt, kann der Verlust eines Genprodukts beispielsweise zu anatomischen Änderungen führen, deren Auswirkungen auf den Phänotyp nicht direkt mit dem fehlenden Genprodukt selbst zusammenhängen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass $CB1^{-/-}$ -Mäuse mit zunehmendem Alter einen schnelleren Verfall kognitiver Funktionen aufweisen als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister (Bilkei-Gorzo et al., 2005). In dieser experimentellen Serie wurden junge (6-7 Wochen), adulte (3-5 Monate) und alte (14-17 Monate) Tiere in verschiedenen Lernaufgaben verglichen. Dabei zeigten junge $CB1^{-/-}$ -Mäuse keine Unterschiede zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern, adulte $CB1^{-/-}$ -Mäuse jedoch zeigten eine kognitive Beeinträchtigung, die ungefähr der von alten Wildtyp-Wurfgeschwistern entsprach. Dies deutet auf einen schnelleren Verfall kognitiver Funktionen in Abwesenheit des CB1 Rezeptors hin. Interessanterweise korrelierte dieser Verfall kognitiver Funktionen mit einem Verlust von Neuronen insbesondere in der CA1-, aber auch in der CA3-Region des Hippocampus in $CB1^{-/-}$ -Mäusen (Bilkei-Gorzo et al., 2005). Diese Befunde könnten mit der Rolle des CB1-Rezeptors als ‚Schutzmechanismus‘ gegen die Übererregbarkeit von hippocampalen Neuronen zusammenhängen (Marsicano et al., 2003). Außerdem ist die Neurogenese in adulten $CB1^{-/-}$ -Mäusen im Gyrus dentatus sowie in der subventrikulären Zone beeinträchtigt (Jin et al., 2004). Diese Ergebnisse werden dadurch unterstützt, dass CB1-Agonisten Neurogenese im Hippocampus vermitteln können (Jiang et al., 2005). Außerdem wurde in $CB1^{-/-}$ -Mäusen, nicht aber in ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern, eine altersabhängige Erhöhung der Aktivität der FAAH sowie eines möglichen Anandamidtransporters mit der Folge signifikanter Abnahme der Anandamidkonzentration im Hippocampus, aber nicht im Cortex, festgestellt (Maccarrone et al., 2002). Die hier beschriebenen Besonderheiten von $CB1^{-/-}$ -Mäusen betreffen folglich vor allem Veränderungen im Hippocampus, die mit zunehmendem Alter der Tiere zu beobachten sind. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Kontrolleexperimenten, z.B. mit akuter pharmakologischer Blockade des CB1-Rezeptors in Wildtyp-Mäusen. Aus diesem Grund wurden alle Schlüsselexperimente in dieser Arbeit, die $CB1^{-/-}$ -Mäuse beinhalteten, durch pharmakologische Blockade des CB1 Rezeptors mit dem Antagonisten SR141716A in C57BL/6NCrI-Inzuchtmäusen, dem Hintergrundstamm der $CB1^{-/-}$ -Mäuse, bestätigt. Die Befunde in dieser Arbeit, die SR141716A einbeziehen, ähneln generell sehr stark denen in $CB1^{-/-}$ -Mäusen, und lassen sich damit tatsächlich auf eine Einbeziehung von CB1 zurückführen. Die hier verwendeten $CB1^{-/-}$ -Mäuse und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister zeigten außerdem keine signifikanten Unterschiede in ihrer Schmerzschwelle den Fußschock betreffend, im angstähnlichen Verhalten auf dem EPM, sowie im Offenfeld unter nicht-aversiven Bedingungen (kein helles Licht), was auf eine ähnliche basale Emotionalität schließen lässt (Marsicano et al., 2002). Allerdings fanden sich in anderen als den hier verwendeten $CB1^{-/-}$ -Mäusen Unterschiede in der Emotionalität, d.h. ein angstähnliches Verhalten im Hell-Dunkel-Meidetest, erhöhte Aggressivität im ‚Resident-Intruder‘-Test (auf Territorialverhalten basierender sozialer Stress) und eine depressionsähnliche Antwort in einem chronischen nicht-vorhersagbaren milden Stressparadigma (Martin et al., 2002). Solche Unterschiede zwischen verschiedenen

Studien mit $CB1^{-/-}$ -Mäusen lassen sich nicht nur auf verschiedene Testsituationen (Involvierung von $CB1$ in Abhängigkeit von der Aversivität – siehe auch die Hypothese vom ‚kritischen Bereich‘ der Endocannabinoidwirkung, Manuskript 4), sondern auch auf verschiedene Hintergrundstämme der Mausmutanten zurückführen (Unterschiede zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen in Verhaltenstests). Neben den hier verwendeten $CB1^{-/-}$ -Mäusen, die auf C57BL/6NCrI-Hintergrund bis zur F5/F6-Generation zurückgekreuzt wurden (Marsicano et al., 2002), gibt es $CB1^{-/-}$ -Mäuse auf C57BL/6J-Hintergrund (Zimmer et al., 1999), auf C57BL/6-Hintergrund (ohne nähere Angaben; Robbe et al., 2002) sowie auf CD1-Hintergrund (Ledent et al., 1999). Dieser genetische Hintergrund spielt auch eine wichtige Rolle in Bezug auf flankierende Bereiche der genetischen Manipulation (Crusio, 2004). So gibt es Hinweise darauf, dass manche Veränderungen in Phänotypen nicht dem manipulierten Gen selbst, sondern damit eng verbundenen, flankierenden Genen, die sich je nach Hintergrundstamm unterscheiden können, zuzuschreiben sind (Crusio, 2004; Routtenberg, 2002). Der genetische Hintergrund hat somit einen Einfluss auf das ‚Gen-Targeting‘ selbst, auf genregulatorische Mechanismen, die die Gen-Dosis im Wildtyp im Vergleich zum *knockout* bestimmen, sowie auf kompensatorische Mechanismen (Übersicht siehe Routtenberg, 2002). Folglich können Unterschiede im Endocannabinoidsystem verschiedener Mausstämmen, die beispielsweise auf Gen-Dosis-Effekte zurückzuführen sind, zu unterschiedlichen ‚Wildtypen‘ führen, die, entsprechend der Hypothese vom ‚kritischen Bereich‘ der Endocannabinoidwirkung (Manuskript 4), in verschiedenen Ergebnissen bei den jeweiligen Verhaltenstests resultieren können. Wenn also ein bestimmter Verhaltenstest das Endocannabinoidsystem in Wildtyp 1 aktiviert, in Wildtyp 2 jedoch nicht oder übermäßig, was zur ‚Erschöpfung‘ des Systems führt, wären in diesem Verhaltenstest nur Unterschiede zwischen $CB1^{-/-}$ -Mäusen und Wildtyp 1 erkennbar. Gewisse Diskrepanzen in der Literatur sind demzufolge unter Berücksichtigung der Hypothese von ‚kritischen Bereich‘ der Endocannabinoidwirkung sowie der verwendeten Hintergrundstämme der Mausmutanten erklärbar. Somit spielen die *a priori* Unterschiede zwischen den verschiedenen Hintergrundstämmen in Verhaltensaufgaben eine große Rolle. In diesem Zusammenhang wurden beispielsweise die B6- und 129-Inzuchtstämme besonders für Rotarod-, Offenfeld- und Furchtkonditionierungstest als Hintergrundstämme für genetische Manipulationen empfohlen (Bothe et al., 2004). Auch bei der Auswahl der Unterstämme können sich Unterschiede in bestimmten Verhaltensaufgaben zeigen, wie z.B. zwischen C57BL/6NCrI und C57BL/6JOlaHsd in der Extinktion der Furchtkonditionierung (Stiedl et al., 1999; Siegmund et al., 2005). In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass im Manuskript 2 (Kamprath & Wotjak, 2004) die Experimente an C57BL/6JOlaHsd durchgeführt wurden, in den anderen Manuskripten jedoch an $CB1^{-/-}$ -Mäusen und deren Hintergrundstamm C57BL/6NCrI. Die Ursache ist darin zu suchen, dass C57BL/6JOlaHsd eine bessere Extinktion konditionierter Furcht und weniger kontextuelles Gedächtnis als C57BL/6NCrI zeigen, weshalb die Verwendung von C57BL/6JOlaHsd in dieser Studie (Manuskript 2: Kamprath & Wotjak, 2004) zu homogeneren Daten führte. Die Applikation von $3\text{mg/kg}_{\text{Körpergewicht}}$ SR141716A führte in C57BL/6JOlaHsd ähnlich wie in $CB1^{-/-}$ -Mäusen zu einer Beeinträchtigung der Extink-

tion konditionierter Furcht (Marsicano et al., 2002). Im Gegensatz zu $CB1^{-/-}$ -Mäusen konnte die gleiche Dosis SR141716A in C57BL/6J OlaHsd jedoch keine Beeinträchtigung bei der Abnahme sensitivierter Furcht auslösen – erst eine Erhöhung der Aversivität (3 Fußschocks von 0,7mA) und gleichzeitige Erhöhung der SR141716A-Dosis auf 10mg/kg_{Körpergewicht} führte in C57BL/6J OlaHsd zu einer signifikanten Beeinträchtigung in der Abnahme sensitivierter Furcht (Kamprath & Wotjak, unveröffentlichte Daten). In C57BL/6NCrl hingegen, dem Hintergrundstamm der $CB1^{-/-}$ -Mäuse, genügte wie in den Mausmutanten eine moderate Aversivität (ein Fußschock von 0,7mA) sowie 3mg/kg_{Körpergewicht} SR141716A, um eine Beeinträchtigung der Abnahme sensitivierter Furcht zu erzielen (Manuskript 3; Manuskript 4). Auch im angsthellen Verhalten konnten unterschiedliche Wirkungen verschiedener SR141716A-Dosen in verschiedenen Mausstämmen beobachtet werden (Akinshola et al., 1999). Zusammenfassend deutet dies auf Unterschiede im Endocannabinoidsystem zwischen den Mausstämmen hin, die z.B. in Gen-Dosis-Effekten begründet sein könnten. In Bezug auf die Hypothese vom ‚kritischen Bereich‘ der Endocannabinoidwirkung bedeutet dies, dass beispielsweise die Aktivierungsschwelle des Endocannabinoidsystems bei C57BL/6J OlaHsd höher liegt als bei C57BL/6NCrl. Ist das Endocannabinoidsystem einmal aktiviert, war bei C57BL/6J OlaHsd die Applikation einer höheren SR141716A-Dosis nötig, um eine signifikante Verhaltensänderung in Bezug auf sensitivierte Furcht zu beobachten als in C57BL/6NCrl, was eine verstärkte $CB1$ -Aktivierung (z.B. durch verstärkte Endocannabinoidfreisetzung) in C57BL/6J OlaHsd bedeuten könnte. Eine solche stärkere $CB1$ -Aktivierung in C57BL/6J OlaHsd könnte auch zu deren besserer Extinktion konditionierter Furcht im Vergleich zu C57BL/6NCrl beitragen (Stiedl et al., 1999; Siegmund et al., 2005).

Ein generelles Problem bei B6-Inzuchtstämmen bezieht sich auf Hinweise, dass bei diesen Tieren ab einem Alter von ca. 6 Monaten die Hörfähigkeit zurückgeht und demzufolge Experimente, die beispielsweise eine Furchtreaktion auf Töne untersuchen, in älteren Tieren nicht durchgeführt werden sollten (Li, 1992; McFadden et al., 2001; Bartolome et al., 2002). Probleme dieser Art sind in Inzuchtstämmen nicht selten anzutreffen, was auf eine gewisse genetische Degeneration zurückzuführen ist. Ein anderes Beispiel dafür ist der Verlust von α -Synuclein (involviert in dopaminerges System, siehe Clayton & George, 1998; Abeliovich et al., 2000) in C57BL/6J OlaHsd, aber nicht in anderen eng verwandten B6-Unterstämmen (Specht & Schoepfer, 2001; Siegmund et al., 2005). Eine solche genetische Degeneration in Inzuchtstämmen hängt mit dem limitierten Genpool zusammen. Dieser ermöglicht jedoch eine genetische Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Experimente (Übersicht siehe van Zutphen et al., 1995). Da interindividuelle Unterschiede im Genotyp durch den Einsatz von Inzuchttieren theoretisch ausgeschlossen werden können, ist eine Varianz in den Resultaten auf Faktoren (mikro)biologischer (Infektionsdruck etc.), physikalischer (Temperatur, Licht, etc.), chemischer (Ernährung, Einstreu, etc.) und sozialer (Haltungsbedingungen, mütterliche Zuwendung, etc.) Art zurückzuführen (Übersicht siehe Beynen et al., 1995), die - soweit möglich - über die experimentellen Serien gleich gehalten wurden. Allerdings sind viele nicht genetische Parameter, wie z.B. der mütterliche Einfluss auf die Nach-

kommen, nicht durch den Experimentator kontrollierbar und führen zu einer gewissen Streuung in den Ergebnissen. Besonders auffällig in dieser Hinsicht ist die zweigipflige Verteilung, die sich bei beeinträchtigter Abnahme der Furchtreaktion sowohl in CB1^{-/-}-Mäusen als auch in Wildtyp-Tieren unter Applikation des CB1-Antagonisten SR141716A einstellte (vgl. Manuskript 4, Fig. 2a; auch in den anderen Experimenten beobachtet, jedoch in den Daten nicht dargestellt). Dabei verhielt sich ein Teil der Tiere ohne bzw. mit blockiertem CB1 wie die entsprechenden Kontrolltiere. Der andere Teil der Tiere ohne bzw. mit blockiertem CB1 war jedoch umso stärker in der Furchtabnahme beeinträchtigt, so dass sich insgesamt signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren ergaben. Dies deutet darauf hin, dass genetische Beeinträchtigungen im Endocannabinoidsystem ein wichtiger Vulnerabilitätsfaktor für die Entwicklung von Störungen bei der Anpassung an aversive Situationen sein könnten. Jedoch scheinen in den hier beschriebenen Experimenten zusätzliche, nicht-genetische Faktoren, die nicht durch den Experimentator kontrolliert werden konnten, ebenfalls zu den Anpassungsstörungen beizutragen. Bei intaktem Endocannabinoidsystem können diese Faktoren jedoch möglicherweise kompensiert werden und so nur sehr geringen Einfluss ausüben. Die Identifikation dieser Faktoren kann eine wichtige Rolle bei der Erforschung der Ätiologie von Angsterkrankungen spielen. Da die genetischen und experimentellen Bedingungen relativ gut kontrollierbar sind, könnte z.B. der mütterliche Einfluss auf die Nachkommenschaft von großer Bedeutung sein (Meaney, 2001; Champagne et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Stress bei Müttern beispielsweise zu Veränderungen im Stresssystem der Nachkommen führen kann, was sich unter anderem in Furchtkonditionierungs- und Sensitivierungsexperimenten bemerkbar machen könnte (Übersicht siehe Korte, 2001).

Zur Interpretation von Sensitivierungsexperimenten

Wenn aus normalen Furchtantworten abnormale Angst wird, spielen Sensitivierungsprozesse die Hauptrolle, indem sie eine Übererregbarkeit neuronaler Schaltkreise erzeugen (Marks & Tobena, 1990; Rosen & Schulkin, 1998). Pathologische Angst kann hingegen nicht durch einfache assoziative Konditionierung erklärt werden (Übersicht siehe Rosen & Schulkin, 1998). Experimentelle Ansätze, die unausweichliche Fußschocks verwenden, erhöhen generalisierte Angstsymptome und können lang anhaltende Veränderungen im endokrinen System und im Verhalten auslösen (van Dijken et al., 1992a; van Dijken et al., 1992b; van Dijken et al., 1992c; van Dijken et al., 1993; Stam et al., 2000; Bruijnzeel et al., 1999; Bruijnzeel et al., 2001; Stam et al., 2002; Rosen & Schulkin, 1998). In diesem Zusammenhang wurde die Sensitivierung des akustischen Schreckreflexes durch Fußschock-Applikation als Paradigma zur Erforschung unkonditionierter Schockeffekte beschrieben (Davis, 1989). Darauf basierend wurden erste Untersuchungen zur Identifikation der zugrunde liegenden neuralen Substrate unternommen (Boulis & Davis, 1989; Hitchcock et al., 1989). Allerdings konnte in späteren Arbeiten gezeigt werden, dass die Effekte des Fußschocks auf den Schreckreflex nicht auf unkonditionierte Prozesse, sondern auf kontextuelle Konditionierung zurückzuführen sind (Richardson & Elsayed, 1998; Richardson, 2000). Außerdem wurden

auch die Ursachen für eine durch Fußschocks ausgelöste Verhaltensstarre auf ihren konditionierten oder unkonditionierten Ursprung hin untersucht, und wiederum konnte kontextuelle Konditionierung als Ursache festgestellt werden (Fanselow, 1980). Diese Versuche zur Schock-Sensitivierung des Schreckreflexes sowie zur Verhaltensstarre nach Schockapplikation wurden an Ratten unternommen. Bei Mäusen hingegen zeigte sich stammabhängig ein differenzierteres Bild: so wurde für BALB/c-Mäuse tatsächlich eine unkonditionierte Schock-Sensitivierung ohne kontextuelle Konditionierung des Schreckreflexes gezeigt - für C57BL/6NCrl war jedoch das Gegenteil der Fall (Dirks et al., 2001).

Eine nicht-assoziative Sensitivierung, die eine wichtige Rolle in der Ätiologie bestimmter Angsterkrankungen spielen könnte, ist also von einer assoziativen kontextuellen Konditionierung zu unterscheiden. Die Gefahr der Verwechslung assoziativer und nicht-assoziativer Prozesse bei der Fußschock-Sensitivierung ist auf die prozedurale Ähnlichkeit von Sensitivierung und kontextueller Furchtkonditionierung zurückzuführen. Während beider Paradigma erfolgt die Applikation eines Fußschocks in einem bestimmten Kontext. Darauf folgend wird bei der kontextuellen Furchtkonditionierung die Furchtreaktion auf den Schock-Kontext getestet, die auf eine Schock-Kontext-Assoziation zurückzuführen ist. Bei der Sensitivierung hingegen wird die Furchtreaktion auf andere (unspezifische) Stimuli in einem anderen Kontext gemessen, um Assoziationen möglichst zu vermeiden. Trotzdem kann es durch die gesamte experimentelle Prozedur oder durch die Ähnlichkeit der Kontexte zu einer Kontextgeneralisierung kommen, d.h. die Tiere können den neuen Test-Kontext nicht vom Schock-Kontext unterscheiden und zeigen eine Furchtreaktion auf den vermeintlichen (assoziierten) Schock-Kontext hin. Deshalb ist es bei Sensitivierungsexperimenten wichtig zu zeigen, dass die Tiere zwischen den verwendeten Kontexten diskriminieren können und demzufolge die Furchtantwort nicht auf Kontextgeneralisierung zurückzuführen ist. Aus diesem Grund sind für die Einführung der Sensitivierung in C57BL/6J01aHsd in Manuskript 2 sowie in CB1^{-/-}-Mäusen und C57BL/6NCrl in Manuskript 3 (Kamprath et al., 2006) die Furchtantworten auf den Testkontext nach der Sensitivierung, aber vor der Tonpräsentation, dargestellt. Diese Furchtantworten sind gering (wesentlich geringer als die Furchtantwort während der Tonpräsentation) und es gibt keine Unterschiede zwischen CB1^{-/-}-Mäusen und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Somit kann in den hier vorliegenden Daten eine Kontextgeneralisierung weitgehend ausgeschlossen werden und die Furchtantwort auf den Ton nach der Sensitivierung scheint tatsächlich auf nicht-assoziative Prozesse zurückzuführen zu sein.

Die Experimente, bei denen der Ton bereits vor der Sensitivierung zum ersten Mal vorgespielt wurde („Ton-Vorapplikation“), erinnern an latente Inhibition (Übersicht siehe Lubow, 1973). Latente Inhibition beschreibt die verringerte Furchtantwort auf einen konditionierten Stimulus (nach der Konditionierung), wenn dieser Stimulus bereits vor der Konditionierung zum ersten Mal appliziert wurde. Dabei scheint es zu einer Interferenz beider Gedächtnisinhalte (der ‚ungefährlichen‘ Präsentation des konditionierten Stimulus und der Assoziation desselben konditionierten Stimulus mit dem Schock)

während des Gedächtnisabrufs zu kommen, die in einer Verringerung der Furchtantwort resultiert (Bouton, 1993). Allerdings erscheint das Intervall von fünf Tagen zwischen der ‚Vorapplikation‘ des Tons und Konditionierung/ Sensitivierung für eine latente Inhibition relativ lang: bisher konnte ein solch langes Intervall nur bei latenter Inhibition konditionierter Geschmacksaversion (conditioned taste aversion; CTA) nachgewiesen werden (De la Casa & Lubow, 2005). Ein weiterer Unterschied zur latenten Inhibition besteht darin, dass die Sensitivierung statt Konditionierung verwendet wurde. Dabei erfahren die Tiere während der Vorapplikation den Ton im Testkontext, darauf folgend den Schock in einem anderen Kontext - danach wird die Furchtantwort auf den Ton wiederum im Testkontext untersucht, was somit keine echte latente Inhibition darstellt und eine Interferenz nur zu erwarten wäre, wenn die Tiere den Kontext generalisieren. Allerdings deutet die Furchtantwort von $CB1^{-/-}$ -Mäusen und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern auf den Testkontext vor der Tonpräsentation und nach der Schockapplikation, wie bereits beschrieben, nicht auf Kontextgeneralisierung hin.

Generell spielt der Kontext für viele Lernaufgaben eine große Rolle. Von den hier näher betrachteten Paradigmen ist nur die unspezifische Sensitivierung vom Kontext nicht beeinflusst, Konditionierung, Extinktion und auch Habituation sind kontextabhängige Lernprozesse, die durch einen Kontextwechsel unterbrochen werden können (Bouton, 1993; Marlin & Miller, 1981). Da es auch Hinweise auf eine Beeinflussung des kontextuellen Lernens bei Furchtkonditionierung und Extinktion durch den $CB1$ Cannabinoidrezeptor gibt (Suzuki et al., 2004; Pamplona & Takahashi, 2006), stellt sich die Frage, inwieweit der Kontext die $CB1$ -vermittelte Habituation beeinflusst. Vergleicht man im Manuskript 3 (Kamprath et al., 2006) die Abbildungen zur Abnahme sensitivierter und kontext-konditionierter Furcht, fällt auf, dass nach Schockapplikation die (konditionierte) Furchtantwort auf den Schockkontext von $CB1^{-/-}$ -Mäusen und ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (Suppl. Fig. 2) geringer ist als auf einen (sensitivierten) Ton in einem anderen Kontext (Fig.1, Fig.3), was im Widerspruch zu den Befunden der Sensitivierung des Schreckreflexes in C57BL/6NCrl steht (Dirks et al., 2001). Über wiederholte Präsentation des konditionierten Schockkontexts entwickelten $CB1^{-/-}$ -Mäuse im Gegensatz zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern jedoch eine verstärkte Furchtantwort auf den Kontext, die während weiteren Kontextexpositionen wieder abklang. Nach dieser Extinktion der Furcht auf den Schockkontext zeigten die $CB1^{-/-}$ -Mäuse eine erhöhte Furchtantwort auf einen lauten Ton im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Dies deutet auf die Involvierung unterschiedlicher Prozesse in die kontextuelle Verarbeitung bzw. in die Habituation an aversive Situationen, die jedoch beide $CB1$ -abhängig sind. Dies wird durch Befunde unterstützt, die eine Einbeziehung von $CB1$ in die Akquisition kontextueller, aber nicht auditorischer Furchtkonditionierung zeigten (Pamplona & Takahashi, 2006). Zusammenfassend geschieht also eine Beeinflussung kontextuellen Lernens durch $CB1$ wahrscheinlich unabhängig von $CB1$ -vermittelter Habituation an aversive Ereignisse.

Furchtkonditionierung und Stress

Die Furchtkonditionierung ist dadurch gekennzeichnet, dass ein neutraler Stimulus durch Paarung mit einem stark aversiven Reiz die Fähigkeit erlangt, Furchtantworten auf Verhaltensebene, wie z.B. Verhaltensstarre und den furchtpotenzierten Schreckreflex, aber auch auf autonomer und neuroendokriner Ebene, wie z.B. eine Aktivierung der HPA-Achse (LeDoux, 2000; Korte, 2001; Herman et al., 2003), auszulösen. In diesem Zusammenhang kann ein CS nach der Furchtkonditionierung als ‚antizipatorischer Stressor‘ betrachtet werden (Herman et al., 2003). Furchtantworten auf endokriner und Verhaltensebene sind jedoch kein einzigartiges Merkmal für die Furchtkonditionierung, sondern auch bei angeborener Furcht oder nach Applikation eines Fußschocks zu beobachten (van Dijken et al., 1992a; van Dijken et al., 1992c; van Dijken et al., 1993; Übersicht siehe Herman et al., 2003). Wenn also der während der Furchtkonditionierung applizierte Fußschock selbst bereits zu Veränderungen im neuroendokrinen System und im Verhalten führt, stellt sich die Frage, inwiefern nach der Furchtkonditionierung auf den CS hin gemessene Veränderungen, beispielsweise in der HPA-Achse, tatsächlich auf assoziativen Prozessen beruhen. Dabei ist auf eine generelle Problematik der Furchtkonditionierung hinzuweisen: Allgemein besagt das Konzept der klassischen Konditionierung, dass bei zeitlicher Paarung eines neutralen (konditionierten) Reizes mit einem unkonditionierten Reiz, der eine bestimmte (unkonditionierte) Reaktion auslöst, der konditionierte Stimulus über assoziative Prozesse die Fähigkeit erlangt, ebenfalls diese Reaktion auszulösen, die dann (wenn sie durch den CS ausgelöst wird) als konditionierte Reaktion bezeichnet wird. Im Gegensatz zu verschiedenen anderen, vor allem appetitiven, Arten der klassischen Konditionierung, unterscheidet sich bei der Furchtkonditionierung jedoch die erlernte ‚konditionierte‘ Reaktion (z.B. Verhaltensstarre) von der unkonditionierten Reaktion, die der Fußschock als unkonditionierter Stimulus auslöst (Aktivitätsausbruch, ‚activity burst‘). Auf Verhaltensebene wird also nicht die eigentliche Reaktion auf den aversiven Stimulus, sondern die ‚Erwartung‘ einer Gefahr wiedergespiegelt, die neben assoziativen Prozessen durchaus auf anderen, nicht-assoziativen Prozessen beruhen kann.

Auch für die Extinktion stellt sich die Frage, inwieweit Prozesse wie beispielsweise der Rückgang der HPA-Achsen-Aktivierung tatsächlich top-down durch Lernereignisse gesteuert sind. Der Rückgang einiger Aspekte der Furchtantwort könnte auch mit selbstregulatorischen Mechanismen bestimmter Systeme zusammenhängen, wie z.B. negativen Rückkopplungsschleifen. Im Gegensatz zu erlernter Furcht erweist sich angeborene Furcht jedoch als ‚extinktionsresistenter‘, was darauf schließen lässt, dass selbstregulatorische Mechanismen wahrscheinlich keine entscheidende Rolle bei der Langzeit-Abnahme der Furchtreaktion spielen, denn solche Mechanismen wären auch bei angeborenen Furchtantworten zu erwarten. Eine starke Ähnlichkeit ist hingegen zwischen der Extinktion konditionierter Furcht und der Habituation an einen homotypischen Stressor zu beobachten, denn der wiederholt präsentierte CS, der Furchtreaktionen auslöst, erfüllt in diesem Zusammenhang durchaus Eigenschaften, die antizipatorischen Stressoren zugeschrieben werden (Herman et al., 2003).

Endocannabinoide und Stress

Somit stellt sich die Frage, ob das Endocannabinoidsystem möglicherweise seine Furcht dämpfenden Eigenschaften über eine zentralnervöse Modulation des neuroendokrinen Systems vermittelt. Für diesen Fall wäre eine Modulation von Stressantworten durch Endocannabinoide auf einer Ebene, die auch Verhaltensantworten vermittelt, zu erwarten, da Endocannabinoide solche Furchtantworten auf Verhaltensebene beeinflussen, die über Projektionen vom CEA zum Hirnstamm vermittelt werden.

Die hier gezeigte Rolle des Endocannabinoidsystems bei der Langzeithabituation an aversive Situationen erinnert in diesem Zusammenhang stark an die Involvierung des Endocannabinoidsystems in die Habituation an einen homotypischen Stressor (Stress durch eingeschränkte Bewegungsfreiheit; Patel et al., 2005). Der Ton, der nach Sensitivierung und Konditionierung wiederholt präsentiert wurde, könnte in diesem Zusammenhang auch als antizipatorischer, homotypischer Stressor betrachtet werden. Patel und Mitarbeiter (2005) untersuchten die Auswirkung einer SR141716A-Applikation auf die Anpassung von Mäusen an wiederholten Stress durch eingeschränkte Bewegungsfreiheit („Restraint Stress“). Dabei wurde immunohistochemisch die Fos-Expression in CG, PL, IL, LS, NAC, BLA, CEA, MEA und BNST nach der ersten und der fünften Stresssession verglichen. Im CG, LS und NAC steigerte SR141716A die stressinduzierte Fos-Expression bereits nach der ersten Session, also akut. In PL und IL konnte nach der ersten Session eine SR141716A-unabhängige, also rein stressinduzierte, Erhöhung der Fos-Expression beobachtet werden – nach der fünften Session hingegen ging in PL und IL die Fos-Expression nur in vehikel-, nicht aber in SR141716A-behandelten Tieren zurück (Patel et al., 2005). Außerdem konnte im gesamten Vorderhirn sowie in der Amygdala eine Erhöhung des 2-AG-Spiegels, jedoch nicht des Anandamid-Spiegels, von der ersten zur fünften Stresssession beobachtet werden. Die Fos-Expression in der Amygdala ergab jedoch keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die SR141716A-vermittelte Beeinträchtigung der Langzeithabituation, was auf einen basalen Effekt von SR141716A zurückzuführen war. Damit scheinen besonders PL und IL eine Rolle in der endocannabinoidvermittelten Langzeithabituation an einen homotypischen Stressor zu spielen. Interessanterweise sind genau diese Regionen auch als wichtige neurale Substrate der Extinktion konditionierter Furcht beschrieben, und in $CB1^{-/-}$ -Mäusen wurde in diesen Regionen (vmPFC) bei der Extinktion konditionierter Furcht eine Abnahme der p42/p44-Phosphorylierung sowie der Calcineurin-Expression nachgewiesen (Manuskript 1, Cannich et al., 2004). Außerdem bewirkte die Hemmung des Anandamid-Abbaus eine erhöhte GABAerge Transmission in PFC und BLA bei gestressten Ratten („Forced Swimming“; Cassano et al., 2005). Ob Endocannabinoide im IL oder PL auch an der Vermittlung der Langzeithabituation an den Ton nach sensitivierter Furcht beteiligt sind, bleibt zu erforschen.

Auch für die Anpassung an andere Stressoren ist ein Zusammenhang mit dem Endocannabinoidsystem zu beobachten (Fride et al., 2005; Hill et al., 2005; Übersicht siehe Hill & Gorzalka, 2005a). In einer Studie von Mechoulam und Mitarbeitern in $CB1^{-/-}$ -Mäusen zeigten sich ebenfalls Anpassungsschwierigkeiten an wiederholten Stress –

hier handelte es sich um ‚Klingelstress‘ (wiederholte Präsentation eines 4 min andauernden ca. 100dB lauten Klingeltones) sowie ‚Forced Swimming‘ (Fride et al., 2005). Auffällig dabei war die Verhaltensinhibition in CB1^{-/-}-Mäusen. Interessanterweise fanden die Autoren keine Beeinträchtigung von CB1^{-/-}-Mäusen in der akuten Stressanpassung – eine solche Beeinträchtigung war nur bei starkem akuten Stress zu beobachten (Fride et al., 2005). Diese Ergebnisse passen folglich gut mit der Hypothese vom ‚kritischen Bereich‘ der Endocannabinoidwirkung (Manuskript 4) zusammen. In einer anderen Studie resultierte die Applikation des Endocannabinoid-Wiederaufnahmehemmers AM404 und verschiedener CB1-Agonisten in verringerter Immobilität in ‚Porsolts Forced Swim Test‘ (im Unterschied zum ‚Forced Swimming‘ gilt hier erst die zweite Session als ‚Testsession‘; Hill & Gorzalka, 2005b), was die Befunde von Mechoulam und Mitarbeitern unterstützt. Die Applikation des Endocannabinoid-Wiederaufnahmehemmers AM404 resultierte auch bei der Präsentation des Prädatorengeruchs TMT in einer Abnahme defensiver Verhaltensweisen (Kambo et al., 2005). Weiterhin gibt es Hinweise, dass nicht nur das Endocannabinoidsystem Verhaltensantworten auf Stress beeinflusst, sondern auch dass Stress Veränderungen im Endocannabinoidsystem bewirkt. So führte chronischer nicht-vorhersagbarer Stress (über 3 Wochen täglich je 2-3 folgender Stressoren: eingeschränkte Bewegungsfreiheit, weißes Rauschen, Stroboskoplicht, ‚Forced Swimming‘, Nahrungs-/ Wasserdeprivation, Käfigrotation, soziale Isolation) zu einer Abnahme der CB1-Expression und des 2-AG-Gehalts im Hippocampus, was zur Beeinträchtigung der Flexibilität im Verhalten nach chronischem nicht-vorhersagbarem Stress beitragen könnte (Hill et al., 2005).

Die ‚stressdämpfenden‘ Eigenschaften des Endocannabinoidsystems könnten auch mit einer Modulation der hypothalamo-adenohypophysäre-adrenale (HPA-) Achse und/ oder des hypothalamo-neurohypophysären Systems (HNS) durch Endocannabinoide zusammenhängen. Die Aktivierung der HPA-Achse geschieht im Zusammenhang mit passiven Coping-Strategien als Hauptantwort auf psychologische und physiologische Stressoren, wobei nicht kontrollierbare, lang andauernde Stressoren in einer anhaltenden Aktivierung der HPA-Achse resultieren kann, die zur Ätiologie bestimmter psychiatrischer Erkrankungen wie Angsterkrankungen und Depression beitragen könnte (Übersicht siehe Engelmann et al., 2004). Eine stressinduzierte Aktivierung der HPA-Achse impliziert eine Aktivierung parvozellulärer CRH- (Corticotropin freisetzendes Hormon) und Vasopressin-Neuronen im PVN des Hypothalamus, die daraufhin CRH und Vasopressin von der Eminentia mediana in das Portalblut freisetzen. Beide Neuropeptide gelangen so zur Adenohypophyse, wo sie synergistisch die Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) in die Blutbahn stimulieren. In der Nebennierenrinde erfolgt daraufhin die Freisetzung des Steroidhormons Corticosteron (CORT), das unter anderem in einer negativen Rückkopplungsschleife die HPA-Achse wiederum hemmen kann. Obwohl Steroidhormone normalerweise über intrazelluläre Rezeptoren eine genregulatorische Wirkung entfalten, scheinen schnelle Glucocorticoidwirkungen über Membranrezeptoren und nicht-genomische intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt zu werden (Falkenstein et al., 2000). Außerdem deuten viele Befunde darauf hin, dass die HPA-Achse auf verschiedenen Ebenen durch das HNS reguliert werden kann

(Übersicht siehe Engelmann et al., 2004). Das HNS besteht aus magnozellulären Neuronen des supraoptischen Nucleus (SON) und des PVN des Hypothalamus, die Vasopressin und Oxytocin synthetisieren. Vasopressin, das von Axonen magnozeller Neuronen freigesetzt wird, potenziert die ACTH-Sekretion auf der Ebene der Adenohypophyse. Wenn andererseits im PVN und SON von den gleichen Neuronen Vasopressin somatisch und dendritisch freigesetzt wird, limitiert dies die Aktivierung der HPA-Achse und bewirkt so möglicherweise ein ‚Fein-Tuning‘ der HPA-Achse (Übersicht siehe Engelmann et al., 2004).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Wirkungen des Endocannabinoidsystems, stressbezogene Verhaltensantworten eher zu verringern, scheint eine exogene Applikation von Cannabinoiden eine Aktivierung der HPA-Achse und Auslösung stressbezogener Verhaltensantworten zu bewirken (Wenger et al., 1997; Wenger et al., 2003; Hill & Gorzalka, 2004; Finn et al., 2004). Dabei erscheint es jedoch fraglich, ob die Aktivierung der HPA-Achse durch exogene Cannabinoide auf CB1-vermittelte Effekte zurückzuführen ist. So wurde eine HPA-Achsen-Aktivierung vor allem durch hohe Dosen exogener Cannabinoide, jedoch nicht bei Applikation geringer Dosen berichtet (Patel et al., 2004; Übersicht siehe Viveros et al., 2005), was eher auf unspezifische Effekte hindeutet. Außerdem hatte der CB1-Antagonist SR141716A keinen Effekt auf die HPA-Achsen-Aktivierung durch exogene Cannabinoide (Wenger et al., 1997; Finn et al., 2004), und eine solche HPA-Achsen-Aktivierung konnte auch in CB1^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (Wenger et al., 2003). Die Aktivierung der HPA-Achse durch exogene Cannabinoide, besonders in hohen Dosen, könnte auch zu den anxiogenen und unangenehmen Effekten, die Cannabinoide in sehr hohen Dosen besitzen, beitragen (Chaperon & Thiebot, 1999; Finn et al., 2004).

Endogene Cannabinoide scheinen hingegen eine gegenteilige Wirkung auf die HPA-Achse zu besitzen (Di et al., 2003; Patel et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Applikation des CB1-Antagonisten SR141716A zu einer Potenzierung der stressinduzierten CORT-Erhöhung (Stress durch eingeschränkte Bewegungsfreiheit) sowie zu erhöhter Fos-Expression im Hypothalamus führte (Patel et al., 2004). Applikation von Endocannabinoid-Wiederaufnahme- und Abbauehemmern sowie geringer Dosen eines CB1-Agonisten bewirkten hingegen eine Absenkung der stressinduzierten CORT-Erhöhung, woraus die Autoren auf eine negative Modulation der stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse durch Endocannabinoide schließen (Patel et al., 2004). In CB1^{-/-}-Mäusen fanden sich erhöhte ACTH- und CORT-Spiegel im Plasma, sowohl basal als auch nach Neuheitsstress, was auf eine Hyperreaktivität der HPA-Achse in CB1^{-/-}-Mäusen hindeutet (Barna et al., 2004). Applikation des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason unterdrückte die ACTH-Sekretion jedoch sowohl in CB1^{-/-}-Mäusen wie auch in ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern, woraus die Autoren schließen, dass CB1 nicht in die negative Rückkopplung der HPA-Achse involviert ist (Barna et al., 2004). Allerdings wurde für Dexamethason gezeigt, dass es die Blut-Hirn-Schranke nicht einfach überwinden kann und deshalb wahrscheinlich auf der Ebene der Hypophyse stressinduzierte ACTH-Freisetzung blockiert (Meijer et al.,

1998). Demzufolge zeigen die Befunde von Barna und Mitarbeitern, dass CB1 wahrscheinlich nicht in Rückkopplungsmechanismen der HPA-Achse auf Hypophysenebene involviert ist, obwohl zumindest in der humanen Hypophyse CB1 anzutreffen ist und die Hormonfreisetzung moduliert (Pagotto et al., 2001).

Eine Einbeziehung von CB1 und Endocannabinoiden in schnelle negative Rückkopplungsmechanismen der stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse (durch Applikation von Glucocorticoiden nachgeahmt) konnte jedoch in einer Reihe von *In vitro*-Experimenten auf der Ebene des Hypothalamus nachgewiesen werden (Di et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnten Tasker und Mitarbeiter zeigen, dass Glucocorticoide die Hemmung der Glutamatfreisetzung auf parvozelluläre Neuronen über Endocannabinoide vermitteln. Dabei scheinen Glucocorticoide über einen membranständigen Glucocorticoidrezeptor die retrograde Freisetzung von Endocannabinoiden zu stimulieren, die wiederum über einen präsynaptisch lokalisierten CB1-Rezeptor die Freisetzung von Glutamat hemmen (Di et al., 2003). Zu den cannabinoid- bzw. glucocorticoidsensitiven parvozellulären Neuronen des PVN zählten solche, die CRH, Vasopressin und Oxytocin exprimieren, was eher auf einen generellen Mechanismus schließen lässt (Di et al., 2003). Auch für das HNS, genauer für magnozellanäre Oxytocin-freisetzende Neuronen des SON, konnte ein Zusammenspiel mit dem Endocannabinoidsystem gezeigt werden (Hirasawa et al., 2004). Dabei bindet freigesetztes Oxytocin an Autorezeptoren der magnozellanären Neuronen des SON, was zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und darauf folgender retrograder Endocannabinoidfreisetzung erfolgt, die präsynaptisch exzitatorische Inputs hemmen (Hirasawa et al., 2004). Für magnozellanäre Neuronen des PVN und SON konnte auch eine schnelle Inhibition glutamaterger Inputs durch Glucocorticoide gezeigt werden, die durch Endocannabinoide vermittelt wird (Di et al., 2005b). So erhöhen Glucocorticoide die Anandamid- und 2-AG-Spiegel in hypothalamischen Hirnschnitten und Applikation eines CB1-Antagonisten hemmt die Inhibition glutamaterger Inputs (Di et al., 2005b). Ein solcher glutamaterger Input im SON kann beispielsweise durch Stressoren ausgelöst werden (Engelmann et al., 2004). Für die magnozellanären Neuronen des SON konnte in elektrophysiologischen Experimenten nachgewiesen werden, dass die Freisetzung von 2-AG und Anandamid tatsächlich aktivitätsabhängig geschieht und dass auf solche aktivitätsabhängige Art und Weise exzitatorischer synaptischer Input auf diese Neuronen über Endocannabinoide gehemmt wird (Di et al., 2005a). Obwohl die Ergebnisse dieser *In vitro*-Experimente auf eine allgemeine Involvierung von Endocannabinoiden in glucocorticoidvermittelte schnelle Inhibitionsmechanismen exzitatorischer Inputs auf hypothalamischer Ebene hindeuten, stehen sie doch im Widerspruch zu *In vivo*-Experimenten, die eine Anandamid- und 2-AG-Abnahme im Hypothalamus als Antwort auf akuten Stress zeigten, die erst bei wiederholtem Stress durch eingeschränkte Bewegungsfreiheit in einem Anstieg der Endocannabinoide resultierte (Patel et al., 2004). In diesem Zusammenhang stellten Hillard und Mitarbeiter die Hypothese auf, dass die HPA-Achse, wenn sie nicht durch Stress aktiviert ist, eher einer tonischen Endocannabinoidhemmung unterliegt, die im Falle von akutem Stress wegfällt und bei chronischem Stress im Zusammenspiel mit der ‚abgestumpften‘ HPA-Achse wieder eintreten

kann (Patel et al., 2004). Diese Hypothese wird durch die Befunde erhöhter basaler CORT- und ACTH-Spiegel in CB1^{-/-}-Mäusen unterstützt (Barna et al., 2004). Wenn die in der vorliegenden Arbeit verwendete wiederholte Präsentation des Tons nach Furchtkonditionierung und Sensitivierung als Stressor betrachtet wird, könnte eine Modulation der HPA-Achse durch das Endocannabinoidsystem zur Langzeithabituation beitragen. Inwieweit dies der Fall ist, bleibt zu erforschen. Ein Zusammenhang von Furchtkonditionierung, deren Extinktion und auch unkonditionierter Furcht mit einer Modulation der HPA-Achse konnte in verschiedener Hinsicht nachgewiesen werden (Übersicht siehe Korte, 2001). Außerdem zeigte sich eine starke Koexpression von CB1 mit dem CRH-Rezeptor Typ1 in verschiedenen limbischen und corticalen, aber auch in thalamischen und hypothalamischen Nuclei (Hermann & Lutz, 2005), die auf ein Zusammenwirken beider Systeme hinweisen könnte.

Eine Einbeziehung der endocannabinoidvermittelten HPA-Achsen-Modulation in die Kurzzeitanpassung, wie sie in *In vitro*-Experimenten gezeigt wurde (Di et al., 2003; Di et al., 2005a; Di et al., 2005b), ist jedoch für die akute endocannabinoidvermittelte ‚Furchtdämpfung‘ unwahrscheinlich, da die Stimulation von Glucocorticoidrezeptoren in der Amygdala die Extinktion konditionierter Furcht erleichtert (Yang et al., 2005). Eine endocannabinoidvermittelte Hemmung der HPA-Achse und damit der Glucocorticoidausschüttung kann also die beobachtete endocannabinoidvermittelte Furchtdämpfung nicht erklären.

Ausblick

Adäquate Coping-Strategien in aversiven Situationen sind überlebenswichtig für den Organismus. Endocannabinoide spielen bei der Langzeitanpassung an aversive Situationen eine wichtige Rolle, sind jedoch, abhängig von der Aversivität, nicht immer in die Kurzzeitanpassung an aversive Situationen involviert (Manuskript 3,4; Kamprath et al., 2006). In den letzten Jahren mehrten sich die Beweise, dass Endocannabinoide insbesondere bei der Langzeitanpassung an Stressoren von Bedeutung sind. In diesem Zusammenhang bleibt zu erforschen, inwieweit Endocannabinoide die HPA-Achse während der Habituation und Extinktion nach sensitivierter und konditionierter Furcht modulieren und ob es einen Zusammenhang zu den bereits gezeigten endocannabinoidvermittelten Veränderungen in der HPA-Achse gibt. Endocannabinoidvermittelte, stressbedingte Veränderungen wurden jedoch nicht nur in der HPA-Achse sondern auch in spezifischen Hirnarealen festgestellt (Patel et al., 2005). Insofern ist es von großem Interesse, Hirnregionen zu identifizieren, in denen Endocannabinoide die Abnahme von Furchtreaktionen vermitteln. Insbesondere der mPFC mit IL und PL könnte von großer Bedeutung sein, obwohl sich dort, im Gegensatz zur Amygdala, keine Erhöhung der Endocannabinoidlevel bei Extinktion konditionierter Furcht fand (Marsicano et al., 2002). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier andere PFC-Subregionen, namentlich hauptsächlich der CG und etwas PL, jedoch kaum der IL, untersucht wurden (Marsicano et al., 2002). Aber auch andere Hirnregionen, wie z.B. die Amygdala könnten für die endocannabinoidvermittelte Furchtabnahme von Bedeu-

tung sein. In diesen Regionen wurde außerdem eine Modulation von Kinasen und Calcineurin durch CB1 bei der Extinktion konditionierter Furcht festgestellt, wobei zu erforschen bleibt, inwieweit diese Modulation andere intrazelluläre Vorgänge beeinflusst und solche Veränderungen an der endocannabinoidvermittelten Kurz- oder Langzeitanpassung von Furchtantworten teilnehmen. Die Modulation von Kinasen und Phosphatasen könnte über Phosphorylierungsänderung von Effektorproteinen zur Kurzzeitanpassung sowie über Phosphorylierungsänderung von genregulatorischen Proteinen zur Langzeitanpassung beitragen. Welche dieser Mechanismen *in vivo* einbezogen sind, bleibt zu klären. Auch auf welche Art und Weise und im Zusammenhang mit welchen Hirnregionen der enge Bereich, in dem Endocannabinoide Kurzzeitanpassung vermitteln, definiert wird, bleibt herauszufinden. Mit der Sensitivierung als nicht-assoziativem Lernparadigma, das der Furchtkonditionierung sehr ähnlich ist, steht ein ‚Werkzeug‘ zur Verfügung, das wichtige Daten zur Furchtanpassung liefern kann – insbesondere im Zusammenhang mit Angsterkrankungen, die durch eine ‚Übererregbarkeit‘ des Systems gekennzeichnet sind (Rosen & Schulkin, 1998). Das Endocannabinoidsystem zeigt sich in dieser Hinsicht auffällig, da Endocannabinoide sowohl auf zellulärer Ebene einen Schutzmechanismus gegen Übererregbarkeit von Neuronen liefern (Marsicano et al., 2003), als auch auf der Ebene des Organismus eine Abnahme der durch Sensitivierung erzeugten Hyperreaktivität vermitteln. Zukünftige Forschung zur Einbeziehung des Endocannabinoidsystems in die Anpassung an aversive Situationen könnte sich auf das Wechselspiel von Furcht, Angst und Stress fokussieren, da jüngste Forschungsergebnisse auf diesen Gebieten auf eine gemeinsame Involvierung des Endocannabinoidsystems hinweisen.

Begriffsdefinitionen – zur Erläuterung psychologischer Begriffe

Desensitivierung: Die Desensitivierung beschreibt eine unspezifische Abnahme der Reaktivität auf verschiedene Stimuli hin, vereinfacht ausgedrückt eine allgemeine Entspannung.

Erneuerung (,renewal'): Das Phänomen der Erneuerung betont die Kontextabhängigkeit der Extinktion: präsentiert man nach vollzogener Extinktion den CS in einem anderen als dem Extinktionskontext (z.B. Konditionierungskontext oder neuer Kontext), kann man wiederum eine Furchtreaktion auf den CS hin beobachten (Bouton, 1993; Myers & Davis, 2002).

Extinktion: Extinktion wird als Form des Lernens definiert, bei dem Amplitude und Frequenz der konditionierten Reaktion als Folge wiederholter, nicht-verstärkter Präsentation des CS abnehmen (Pavlov, 1927). Auf die auditorische Furchtkonditionierung bezogen bedeutet das, dass wenn nach der Konditionierung der Ton wiederholt ohne Schock-Präsentation dargeboten wird, mit einer Abnahme der Furchtreaktion auf den Ton zu rechnen ist (der Ton sagt den Schock nicht mehr voraus).

Furchtkonditionierung: Während der Furchtkonditionierung wird ein neutraler Reiz mit einem bedrohlichen Reiz zeitlich gepaart, so dass der ursprünglich neutrale Reiz nach der Konditionierung in der Lage ist, Furchtantworten auszulösen. Dabei wird der ursprünglich neutrale Reiz als ‚konditionierter Stimulus‘ (CS, conditioned stimulus), der bedrohliche Reiz als ‚unkonditionierter Stimulus‘ (US, auch UCS, unconditioned stimulus) und die Furchtantwort, die nach der Konditionierung durch den ursprünglich neutralen Reiz (CS) ausgelöst wird, als ‚konditionierte Reaktion‘ (CER, conditioned emotional response; auch CR – conditioned response, allgemein nach klassischer Konditionierung) bezeichnet. Im Tierexperiment mit Ratten oder Mäusen wird als CS häufig ein Ton verwendet (‚auditorische Furchtkonditionierung‘), aber auch ein Lichtreiz oder ein ‚neutraler‘ Geruch werden oft genutzt. Als US wird zumeist ein milder Stromschlag appliziert (Übersicht siehe LeDoux, 2000).

Habituation: Habituation (‚Reizgewöhnung‘) beschreibt die Abnahme der Stärke der Reaktion auf einen wiederholt auftretenden Reiz und findet im ‚Stimulus-Reaktions-Weg‘ statt. Oft wird zwischen Habituation und ‚Adaptation‘ unterschieden, wobei die Adaptation die Anpassung von Sinnesrezeptoren bei wiederholter Reizpräsentation beschreibt. Die Habituation als Lernvorgang wird hingegen Prozessen im Gehirn zugeschrieben. Insofern ist Habituation auch von ‚Ermüdung/ Erschöpfung‘ (fatigue) von Systemen, die ebenfalls aus wiederholter bzw. anhaltender Stimulation resultieren kann, zu unterscheiden.

Kontextuelle Furchtkonditionierung: Außer einem definierten Reiz, wie einem Ton, Licht oder Geruch, kann auch der Kontext, in dem der US (z.B. milder Stromschlag)

verabreicht wurde als konditionierter Reiz dienen. Dann erfolgt die Präsentation des US ohne zeitliche Paarung mit einem anderen Reiz – lediglich der Kontext wird mit dem US assoziiert. Setzt man das Tier nach der Konditionierung dem Konditionierungskontext (CS) aus, so werden artspezifische Furchtreaktionen ausgelöst. Bei der kontextuellen Furchtkonditionierung kann der CS (Kontext) als polymodal oder konfigural, im Gegensatz zur unimodalen ‚cued‘ Furchtkonditionierung, bezeichnet werden, da der Kontext aus Reizen verschiedener Modalitäten (z.B. Aussehen, Geruch, Textur der Materialien etc.) besteht, und die Rolle einer einzelnen Modalität bzw. eines Elements des Kontexts für die Furchtkonditionierung dem Experimentator als unzugänglich zu betrachten ist (zur Rolle einzelner Kontextelemente bei kontextueller Furchtkonditionierung siehe Rudy et al., 2004).

Kontiguität: zeitliche Paarung von CS und US während der Konditionierung. Je größer das Zeitintervall zwischen der Präsentation von CS und US wird, umso geringer wird die Kontiguität, d.h. umso ‚schwächer‘ die Assoziation.

Kontingenz: die ‚Vorhersagekraft‘ des konditionierten Stimulus. Die Kontingenz lässt sich während der Konditionierung durch das Verhältnis von CS-US-Paarung zu ‚ungepaarten‘ Präsentationen von CS oder US beeinflussen. Dies bedeutet, dass ein CS, der während der Konditionierung oft allein und selten zeitlich gepaart mit dem US präsentiert wird weniger ‚Vorhersagekraft‘ erwirbt als ein CS, der während der Konditionierung immer mit dem US gepaart wurde.

Preparedness: (Seligman, 1971) vererbte Bereitschaft zum Erlernen bestimmter Reaktionen auf bestimmte Stimuli, d.h. Furchtreaktionen werden leichter gelernt, wenn furchtrelevante Reize zur Konditionierung verwendet werden.

Rekonsolidierung: Kürzlich wurde gezeigt, dass der Abruf des Gedächtnisses (CS-Präsentation nach Konditionierung – wie sie auch während der Extinktion verwendet wird) dieses in einen labilen Zustand versetzt: Infusion des Proteinsynthese-Inhibitors Anisomycin in den lateralen Nucleus des Corpus amygdaloideum vor der CS-Präsentation 24 Stunden nach der Konditionierung resultierte in Amnesie (Nader et al., 2000). Die daraus abgeleitete Hypothese besagt, dass das Gedächtnis nicht nur eine Konsolidierung (Übergang vom Kurz- zum Langzeitgedächtnis) voraussetzt, sondern bei jedem Abruf außerdem eine Rekonsolidierung, um aus dem labilen Stadium zurück in ein stabiles Stadium zu gelangen (Übersicht siehe Nader, 2003).

Sensitivierung: Die Sensitivierung gehört zu den nicht-assoziativen Lernarten, bei denen das Tier etwas über die Eigenschaften eines Stimulus lernt. Sensitivierung beschreibt einen Anstieg der Empfindlichkeit bzw. eine Verstärkung der Reaktion auf verschiedene Reize nach der Erfahrung eines besonders intensiven (oder schädlichen) Reizes. Der Begriff der Sensitivierung wird in der Psychologie und Neurobiologie oft im Zusammenhang mit Suchtverhalten und der zugrunde liegenden neuronalen Plastizität gebraucht und Untersuchungen zum mesolimbischen dopaminergen System haben große Fortschritte auf diesem Gebiet gebracht (Robinson & Berridge, 1993). Im Kontext der vorliegenden Arbeit soll jedoch auf die Sensitivierung als Ursache von defensi-

ven bzw. Furchtreaktionen eingegangen werden – in dieser Hinsicht wird auch von ‚Stress-Sensitivierung‘ gesprochen (Überblick siehe Stam et al., 2000). Beispielsweise reagiert ein Tier sehr viel empfindlicher auf leichte Berührungs- und andere Reize, wenn es zuvor einen bedrohlichen Reiz wie einen milden elektrischen Stromschlag erfahren hat. So kann bereits ein einziger Bedrohungsreiz zu lang anhaltenden Veränderungen im Gehirn, im endokrinen System (van Dijken et al., 1993), und auf Verhaltenesebene führen (Übersicht siehe Wiedenmayer, 2004; van Dijken et al., 1992a; van Dijken et al., 1992c).

Spontanerholung (,spontaneous recovery‘): Die Spontanerholung beschreibt das Phänomen, dass bei CS-Präsentation einige Zeit nach der Extinktion die (eigentlich ‚ausgelöschte‘) konditionierte Reaktion in vollem Umfang wieder zu beobachten sein kann (Bouton, 1993; Myers & Davis, 2002).

Unimodale Furchtkonditionierung: Furchtkonditionierung, bei der (im Gegensatz zur kontextuellen Furchtkonditionierung) ein unimodaler Stimulus (z.B. Ton, Licht oder Geruch) als konditionierter Stimulus (CS) dient. Auch bei der unimodalen Furchtkonditionierung werden CS und US in einem bestimmten Kontext gepaart, der ebenfalls im Furchtgedächtnis abgespeichert wird und nach der Konditionierung Furchtantworten hervorrufen kann. Jedoch sind in diesem Fall die Furchtantworten auf den Konditionierungskontext in der Regel geringer als auf den konditionierten Reiz. Deshalb wird hier von einer ‚Hintergrund-Kontext-Konditionierung‘ gesprochen, wohingegen bei der eigentlichen kontextuellen Furchtkonditionierung auch von einer ‚Vordergrund-Kontext-Konditionierung‘ gesprochen werden kann. Um nach der unimodalen Furchtkonditionierung möglichst nur das Furchtgedächtnis für den CS, nicht aber für den Konditionierungskontext zu messen, werden die Furchtreaktionen auf den CS in einem anderen ‚Test‘-Kontext untersucht, der sich möglichst stark vom Konditionierungskontext unterscheiden sollte.

Wiederherstellung (,reinstatement‘): Bei der Wiederherstellung wird nach der Extinktion der US (Schock) allein präsentiert, was wiederum zur vollen Furchtreaktion auf den CS führt – allerdings nur wenn der Test im gleichen Kontext wie die US-Applikation stattfindet. Kritisch betrachtet wirft dies die Frage auf, ob es sich hierbei tatsächlich um eine ‚Wiederherstellung‘ der ursprünglichen Furchtreaktion handelt oder um eine neue Kontextkonditionierung (Bouton, 1993; Myers & Davis, 2002).

Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., & Rosenthal, A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **25**, 239-252.
- Akinshola, B. E., Chakrabarti, A., & Onaivi, E. S. (1999). In-vitro and in-vivo action of cannabinoids. *Neurochem.Res.* **24**, 1233-1240.
- Alger, B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog.Neurobiol.* **68**, 247-286.
- Amat, J., Baratta, M. V., Paul, E., Bland, S. T., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat.Neurosci.* **8**, 365-371.
- Anglada-Figueroa, D. & Quirk, G. J. (2005). Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *J.Neurosci.* **25**, 9680-9685.
- Antoniadis, E. A. & McDonald, R. J. (2001). Amygdala, hippocampus, and unconditioned fear. *Exp.Brain Res.* **138**, 200-209.
- Bakin, J. S. & Weinberger, N. M. (1990). Classical conditioning induces CS-specific receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig. *Brain Res.* **536**, 271-286.
- Balogh, S. A. & Wehner, J. M. (2003). Inbred mouse strain differences in the establishment of long-term fear memory. *Behav.Brain Res.* **140**, 97-106.
- Barna, I., Zelena, D., Arszovszki, A. C., & Ledent, C. (2004). The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci.* **75**, 2959-2970.
- Barrett, D., Shumake, J., Jones, D., & Gonzalez-Lima, F. (2003). Metabolic mapping of mouse brain activity after extinction of a conditioned emotional response. *J.Neurosci.* **23**, 5740-5749.
- Bartolome, M. V., del, C. E., Lopez, L. M., Carricondo, F., Poch-Broto, J., & Gil-Loyzaga, P. (2002). Effects of aging on C57BL/6J mice: an electrophysiological and morphological study. *Adv.Otorhinolaryngol.* **59**, 106-111.
- Beltramo, M. & Piomelli, D. (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport* **11**, 1231-1235.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**, 1094-1097.
- Ben Ari, Y. & Le Gal, I. S. (1974). Lateral amygdala unit activity: II. Habituating and non-habituating neurons. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* **37**, 463-472.
- Berlyne, D. E. (1960). *Conflict, arousal and curiosity* McGraw-Hill, New York.

- Beynen, A. C., Gärtner, K., & van Zutphen, L. F. M. (1995). Standardisierung von Tierversuchen. In *Grundlagen der Versuchstierkunde*, eds. van Zutphen, L. F. M., Baumans, V., & Beynen, A. C., pp. 93-100. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Valverde, O., Otto, M., Michel, K., Sastre, M., & Zimmer, A. (2005). Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 15670-15675.
- Birbaumer, N. & Schmidt, R. F. (1999a). Emotionen. In *Biologische Psychologie* pp. 642-674. Springer, Berlin.
- Birbaumer, N. & Schmidt, R. F. (1999b). Plastizität, Lernen, Gedächtnis. In *Biologische Psychologie* pp. 565-601. Springer, Berlin.
- Blair, H. T., Sotres-Bayon, F., Moita, M. A., & LeDoux, J. E. (2005). The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Neuroscience* **133**, 561-569.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2001a). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **25**, 205-218.
- Blanchard, D. C., Hynd, A. L., Minke, K. A., Minemoto, T., & Blanchard, R. J. (2001b). Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **25**, 761-770.
- Blanchard, R. J. & Blanchard, D. C. (1990). Anti-predator defense as models of animal fear and anxiety. In *Fear and Defence*, eds. Brain, P. F., Parmigiani, S., Blanchard, R. J., & Mainardi, D., pp. 89-108. Church and Harwood Academic Publishers.
- Borelli, K. G., Ferreira-Netto, C., Coimbra, N. C., & Brandao, M. L. (2005). Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res.* **1051**, 100-111.
- Bothe, G. W., Bolivar, V. J., Vedder, M. J., & Geistfeld, J. G. (2004). Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes Brain Behav.* **3**, 149-157.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem.J.* **312 (Pt 2)**, 637-641.
- Boulis, N. M. & Davis, M. (1989). Footshock-induced sensitization of electrically elicited startle reflexes. *Behav.Neurosci.* **103**, 504-508.
- Bouton, M. E. (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol.Bull.* **114**, 80-99.
- Brandao, M. L., Anseloni, V. Z., Pandossio, J. E., De Araujo, J. E., & Castilho, V. M. (1999). Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **23**, 863-875.
- Brandao, M. L., Borelli, K. G., Nobre, M. J., Santos, J. M., Albrechet-Souza, L., Oliveira, A. R., & Martinez, R. C. (2005). Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **29**, 1299-1311.

- Breivogel, C. S. & Childers, S. R. (1998). The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol.Dis.* **5**, 417-431.
- Breivogel, C. S., Griffin, G., Di Marzo, V., & Martin, B. R. (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol.Pharmacol.* **60**, 155-163.
- Bruijnzeel, A. W., Stam, R., Compaan, J. C., Croiset, G., Akkermans, L. M., Olivier, B., & Wiegant, V. M. (1999). Long-term sensitization of Fos-responsivity in the rat central nervous system after a single stressful experience. *Brain Res.* **819**, 15-22.
- Bruijnzeel, A. W., Stam, R., Compaan, J. C., & Wiegant, V. M. (2001). Stress-induced sensitization of CRH-ir but not P-CREB-ir responsivity in the rat central nervous system. *Brain Res.* **908**, 187-196.
- Cahill, L., Weinberger, N. M., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1999). Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron* **23**, 227-228.
- Cain, C. K., Blouin, A. M., & Barad, M. (2002). L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J.Neurosci.* **22**, 9113-9121.
- Cain, C. K., Godsil, B. P., Jami, S., & Barad, M. (2005). The L-type calcium channel blocker nifedipine impairs extinction, but not reduced contingency effects, in mice. *Learn.Mem.* **12**, 277-284.
- Cannich, A., Wotjak, C. T., Kamprath, K., Hermann, H., Lutz, B., & Marsicano, G. (2004). CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn.Mem.* **11**, 625-632.
- Cassano, T., Morgese, M. G., Cuomo, V., & Piomelli, D. Inhibition of anandamide hydrolysis enhances GABAergic transmission in the basolateral amygdala and prefrontal cortex of stressed rats. Abstract Viewer/Itinerary Planner 678.11. 2005. Washington, DC, Society for Neuroscience. 2005.
- Casseday, J. H. & Covey, E. (1996). A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav.Evol.* **47**, 311-336.
- Castellucci, V. F., Carew, T. J., & Kandel, E. R. (1978). Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science* **202**, 1306-1308.
- Catherall, D. R. (2003). How fear differs from anxiety. *Traumatology* **9**, 76-92.
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav.* **79**, 359-371.
- Chaperon, F. & Thiebot, M. H. (1999). Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit Rev.Neurobiol.* **13**, 243-281.
- Chen, S. W., Shemyakin, A., & Wiedenmayer, C. P. (2006). The role of the amygdala and olfaction in unconditioned fear in developing rats. *J.Neurosci.* **26**, 233-240.
- Chhatwal, J. P., Davis, M., Maguschak, K. A., & Ressler, K. J. (2005). Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* **30**, 516-524.
- Clayton, D. F. & George, J. M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* **21**, 249-254.

- Conejo, N. M., Lopez, M., Cantora, R., Gonzalez-Pardo, H., Lopez, L., Begega, A., Vallejo, G., & Arias, J. L. (2005). Effects of Pavlovian fear conditioning on septohippocampal metabolism in rats. *Neurosci.Lett.* **373**, 94-98.
- Correll, C. M., Rosenkranz, J. A., & Grace, A. A. (2005). Chronic cold stress alters prefrontal cortical modulation of amygdala neuronal activity in rats. *Biol.Psychiatry* **58**, 382-391.
- Cortright, D. N. & Szallasi, A. (2004). Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur.J.Biochem.* **271**, 1814-1819.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**, 83-87.
- Crusio, W. E. (2004). Flanking gene and genetic background problems in genetically manipulated mice. *Biol.Psychiatry* **56**, 381-385.
- Davis, M. (1989). Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. *Behav.Neurosci.* **103**, 495-503.
- De la Casa, L. G. & Lubow, R. E. (2005). Delay-induced super-latent inhibition as a function of order of exposure to two flavours prior to compound conditioning. *Q.J.Exp.Psychol.B* **58**, 1-18.
- de Lago, E., Fernandez-Ruiz, J., Ortega-Gutierrez, S., Viso, A., Lopez-Rodriguez, M. L., & Ramos, J. A. (2002). UCM707, a potent and selective inhibitor of endocannabinoid uptake, potentiates hypokinetic and antinociceptive effects of anandamide. *Eur.J.Pharmacol.* **449**, 99-103.
- De Petrocellis, L., Cascio, M. G., & Di Marzo, V. (2004). The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br.J.Pharmacol.* **141**, 765-774.
- Degroot, A. & Nomikos, G. G. (2004). Genetic deletion and pharmacological blockade of CB1 receptors modulates anxiety in the shock-probe burying test. *Eur.J.Neurosci.* **20**, 1059-1064.
- Demuth, D. G. & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sci.* **78**, 549-563.
- Derkinderen, P., Valjent, E., Toutant, M., Corvol, J. C., Enslin, H., Ledent, C., Trzaskos, J., Caboche, J., & Girault, J. A. (2003). Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J.Neurosci.* **23**, 2371-2382.
- Deutsch, D. G. & Chin, S. A. (1993). Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem.Pharmacol.* **46**, 791-796.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., III, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol.Pharmacol.* **34**, 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946-1949.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A., & Bisogno, T. (2002). Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **66**, 377-391.

- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* **21**, 521-528.
- Di, S., Boudaba, C., Popescu, I. R., Weng, F. J., Harris, C., Marcheselli, V. L., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2005a). Activity-dependent release and actions of endocannabinoids in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. *J.Physiol* **569**, 751-760.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C., & Tasker, J. G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J.Neurosci.* **23**, 4850-4857.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, V. L., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2005b). Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* **146**, 4292-4301.
- Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., & Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 10819-10824.
- Dirks, A., de Jongh, R., Groenink, L., van der, G. J., Hijzen, T. H., & Olivier, B. (2001). Footshock-induced sensitization of the acoustic startle response in two strains of mice. *Behav.Brain Res.* **123**, 17-21.
- Doherty, J. & Dingledine, R. (2003). Functional interactions between cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Curr.Opin.Pharmacol.* **3**, 46-53.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu.Rev.Psychol.* **55**, 51-86.
- Eisenberg, J. F. (1981). *The mammalian radiations: an analysis of trends in evolution, adaptation, and behavior* University of Chicago Press, Chicago.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E., & Dudai, Y. (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* **301**, 1102-1104.
- Elphick, M. R. & Egertova, M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **356**, 381-408.
- Engelmann, M., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* **25**, 132-149.
- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., & Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol.Rev.* **52**, 513-556.
- Fanselow, M. S. (1980). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov.J.Biol.Sci.* **15**, 177-182.
- Fegley, D., Kathuria, S., Mercier, R., Li, C., Goutopoulos, A., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (2004). Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 8756-8761.

- Fendt, M., Endres, T., Lowry, C. A., Apfelbach, R., & McGregor, I. S. (2005). TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **29**, 1145-1156.
- Fendt, M. & Fanselow, M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **23**, 743-760.
- Finn, D. P., Jhaveri, M. D., Beckett, S. R., Kendall, D. A., Marsden, C. A., & Chapman, V. (2004). Cannabinoids modulate ultrasound-induced aversive responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **172**, 41-51.
- Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* **83**, 1017-1066.
- Frey, P. W. & Butler, C. S. (1977). Extinction after aversive conditioning: An associative or nonassociative process? *Learning and Motivation* **8**, 1-17.
- Fride, E., Suris, R., Weidenfeld, J., & Mechoulam, R. (2005). Differential response to acute and repeated stress in cannabinoid CB1 receptor knockout newborn and adult mice. *Behav.Pharmacol.* **16**, 431-440.
- Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gomez, d. P., Velasco, G., & Guzman, M. (2002). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol.Pharmacol.* **62**, 1385-1392.
- Gaoni, Y. & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J.Am.Chem.Soc.* 1646-1647.
- Giang, D. K. & Cravatt, B. F. (1997). Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 2238-2242.
- Glaser, S. T., Kaczocha, M., & Deutsch, D. G. (2005). Anandamide transport: a critical review. *Life Sci.* **77**, 1584-1604.
- Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., & Guzman, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem.J.* **347**, 369-373.
- Gonzalez-Lima, F. & Scheich, H. (1986). Classical conditioning of tone-signaled bradycardia modifies 2-deoxyglucose uptake patterns in cortex, thalamus, habenula, caudate-putamen and hippocampal formation. *Brain Res.* **363**, 239-256.
- Gray, J. A. & McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry in to the Functions of the Septo-hippocampal System*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
- Griebel, G., Stemmelin, J., & Scatton, B. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol.Psychiatry* **57**, 261-267.
- Groves, P. M. & Thompson, R. F. (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychol.Rev.* **77**, 419-450.
- Gulyas, A. I., Cravatt, B. F., Bracey, M. H., Dinh, T. P., Piomelli, D., Boscia, F., & Freund, T. F. (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur.J.Neurosci.* **20**, 441-458.

- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., & Freund, T. F. (2002). The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur.J.Neurosci.* **16**, 1395-1398.
- Haller, J., Varga, B., Ledent, C., Barna, I., & Freund, T. F. (2004a). Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur.J.Neurosci.* **19**, 1906-1912.
- Haller, J., Varga, B., Ledent, C., & Freund, T. F. (2004b). CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav.Pharmacol.* **15**, 299-304.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* **24**, 151-180.
- Hermann, H. & Lutz, B. (2005). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with the corticotropin-releasing hormone receptor type 1 in distinct regions of the adult mouse forebrain. *Neurosci.Lett.* **375**, 13-18.
- Herry, C., Bach, D., Scheffler, K., Seifritz, E., & Luthi, A. The amygdala as a detector of unpredictability in mice and humans. Abstract Viewer/Itinerary Planner 416.1. 2005. Washington, DC, Society for Neuroscience. 2005.
- Hill, M. N. & Gorzalka, B. B. (2004). Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur.J.Pharmacol.* **499**, 291-295.
- Hill, M. N. & Gorzalka, B. B. (2005a). Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav.Pharmacol.* **16**, 333-352.
- Hill, M. N. & Gorzalka, B. B. (2005b). Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur.Neuropsychopharmacol.* **15**, 593-599.
- Hill, M. N., Patel, S., Carrier, E. J., Rademacher, D. J., Ormerod, B. K., Hillard, C. J., & Gorzalka, B. B. (2005). Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. *Neuropsychopharmacology* **30**, 508-515.
- Hirasawa, M., Schwab, Y., Natah, S., Hillard, C. J., Mackie, K., Sharkey, K. A., & Pittman, Q. J. (2004). Dendritically released transmitters cooperate via autocrine and retrograde actions to inhibit afferent excitation in rat brain. *J.Physiol* **559**, 611-624.
- Hitchcock, J. M., Sananes, C. B., & Davis, M. (1989). Sensitization of the startle reflex by footshock: blockade by lesions of the central nucleus of the amygdala or its efferent pathway to the brainstem. *Behav.Neurosci.* **103**, 509-518.
- Holahan, M. R. & White, N. M. (2004). Amygdala c-Fos induction corresponds to unconditioned and conditioned aversive stimuli but not to freezing. *Behav.Brain Res.* **152**, 109-120.
- Holter, S. M., Kallnik, M., Wurst, W., Marsicano, G., Lutz, B., & Wotjak, C. T. (2005). Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. *Eur.J.Pharmacol.* **510**, 69-74.
- Hugues, S., Deschaux, O., & Garcia, R. (2004). Postextinction infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into the medial prefrontal cortex impairs memory of the extinction of conditioned fear. *Learn.Mem.* **11**, 540-543.

- Iversen, L. L. (2000). *The Science of marijuana* Oxford University Press, New York.
- Izquierdo, I., Cammarota, M., Vianna, M. M., & Bevilaqua, L. R. (2004). The inhibition of acquired fear. *Neurotox.Res.* **6**, 175-188.
- Jiang, W., Zhang, Y., Xiao, L., Van Cleemput, J., Ji, S. P., Bai, G., & Zhang, X. (2005). Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J.Clin.Invest* **115**, 3104-3116.
- Jin, K., Xie, L., Kim, S. H., Parmentier-Batteur, S., Sun, Y., Mao, X. O., Childs, J., & Greenberg, D. A. (2004). Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol.Pharmacol.* **66**, 204-208.
- Kambo, J. S., Hill, M. N., Sun, J. C., Gorzalka, B. B., & Galea, L. A. Endogenous cannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal cell proliferation and activation of defensive behaviors. Abstract Viewer/Itinerary Planner 639.14. 2005. Washington, DC, Society for Neuroscience. 2005.
- Kamprath, K. & Wotjak, C. T. (2004). Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn.Mem.* **11**, 770-786.
- Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, Lutz B, & Wotjak C.T. (2006). Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J.Neurosci.* **26**, 6677-6686.
- Karlsson, M., Contreras, J. A., Hellman, U., Tornqvist, H., & Holm, C. (1997). cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J.Biol.Chem.* **272**, 27218-27223.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., & Piomelli, D. (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat.Med.* **9**, 76-81.
- Katona, I., Rancz, E. A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., & Freund, T. F. (2001). Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J.Neurosci.* **21**, 9506-9518.
- Kierkegaard, S. (1844). *Der Begriff Angst*. pp. 50. Reclam, 1992, Ditzingen.
- Korte, S. M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **25**, 117-142.
- Kozak, K. R., Rowlinson, S. W., & Marnett, L. J. (2000). Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J.Biol.Chem.* **275**, 33744-33749.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Vianna, D. M., Castilho, V. M., Cruz-Morales, S. E., & Brandao, M. L. (2002). The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res.* **950**, 186-194.
- Landgraf, R. & Wigger, A. (2002). High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav.Genet.* **32**, 301-314.
- Lang, P. J., Davis, M., & Ohman, A. (2000). Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J.Affect.Disord.* **61**, 137-159.

- Lanuza, E., Nader, K., & LeDoux, J. E. (2004). Unconditioned stimulus pathways to the amygdala: effects of posterior thalamic and cortical lesions on fear conditioning. *Neuroscience* **125**, 305-315.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J. F., Beslot, F., Bohme, G. A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B. P., Vassart, G., Fratta, W., & Parmentier, M. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**, 401-404.
- LeDoux, J. (1994). Das Gedächtnis für Angst. *Spektrum der Wissenschaft* **8**.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu.Rev.Neurosci.* **23**, 155-184.
- Li, H. S. (1992). Genetic influences on susceptibility of the auditory system to aging and environmental factors. *Scand.Audiol.Suppl* **36**, 1-39.
- Lichtman, A. H., Hawkins, E. G., Griffin, G., & Cravatt, B. F. (2002). Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **302**, 73-79.
- Lin, C. H., Lee, C. C., & Gean, P. W. (2003a). Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol.Pharmacol.* **63**, 44-52.
- Lin, C. H., Yeh, S. H., Leu, T. H., Chang, W. C., Wang, S. T., & Gean, P. W. (2003b). Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J.Neurosci.* **23**, 1574-1579.
- Lin, C. H., Yeh, S. H., Lu, H. Y., & Gean, P. W. (2003c). The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J.Neurosci.* **23**, 8310-8317.
- Llano, I., Leresche, N., & Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* **6**, 565-574.
- Lopez-Rodriguez, M. L., Viso, A., Ortega-Gutierrez, S., Fowler, C. J., Tiger, G., de Lago, E., Fernandez-Ruiz, J., & Ramos, J. A. (2003). Design, synthesis, and biological evaluation of new inhibitors of the endocannabinoid uptake: comparison with effects on fatty acid amidohydrolase. *J.Med.Chem.* **46**, 1512-1522.
- Love, J. A. & Scott, J. W. (1969). Some response characteristics of cells of the magnocellular division of the medial geniculate body of the cat. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **47**, 881-888.
- Lu, K. T., Walker, D. L., & Davis, M. (2001). Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J.Neurosci.* **21**, RC162.
- Lubow, R. E. (1973). Latent inhibition. *Psychol.Bull.* **79**, 398-407.
- Maccarrone, M., Valverde, O., Barbaccia, M. L., Castane, A., Maldonado, R., Ledent, C., Parmentier, M., & Finazzi-Agro, A. (2002). Age-related changes of anandamide metabolism in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: correlation with behaviour. *Eur.J.Neurosci.* **15**, 1178-1186.
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A., & Kano, M. (2001). Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* **31**, 463-475.

- Makara, J. K., Mor, M., Fegley, D., Szabo, S. I., Kathuria, S., Astarita, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Rivara, S., Freund, T. F., & Piomelli, D. (2005). Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat. Neurosci.* **8**, 1139-1141.
- Maren, S., Aharonov, G., & Fanselow, M. S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.* **88**, 261-274.
- Marks, I. (2002). Innate and learned fears are at opposite ends of a continuum of associability. *Behav. Res. Ther.* **40**, 165-167.
- Marks, I. & Tobena, A. (1990). Learning and unlearning fear: a clinical and evolutionary perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **14**, 365-384.
- Marlin, N. A. & Miller, R. R. (1981). Associations to contextual stimuli as a determinant of long-term habituation. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process* **7**, 313-333.
- Marowsky, A., Yanagawa, Y., Obata, K., & Vogt, K. E. (2005). A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron* **48**, 1025-1037.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S. C., Cascio, M. G., Gutierrez, S. O., van der, S. M., Lopez-Rodriguez, M. L., Casanova, E., Schutz, G., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V., Behl, C., & Lutz, B. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**, 84-88.
- Marsicano, G. & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 4213-4225.
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V., & Lutz, B. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**, 530-534.
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., & Valverde, O. (2002). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* **159**, 379-387.
- Martinez, R. C., de Oliveira, A. R., & Brandao, M. L. (2006). Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. *Neurobiol. Learn. Mem.* **85**, 58-65.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561-564.
- McFadden, S. L., Ding, D., & Salvi, R. (2001). Anatomical, metabolic and genetic aspects of age-related hearing loss in mice. *Audiology* **40**, 313-321.
- McGaugh, J. L., Castellano, C., & Brioni, J. (1990). Picrotoxin enhances latent extinction of conditioned fear. *Behav. Neurosci.* **104**, 264-267.
- McKernan, M. G. & Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* **390**, 607-611.
- McKinney, M. K. & Cravatt, B. F. (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 411-432.

- McSweeney, F. K. & Swindell, S. (2002). Common processes may contribute to extinction and habituation. *J.Gen.Psychol.* **129**, 364-400.
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu.Rev.Neurosci.* **24**, 1161-1192.
- Mechoulam, R., Ben Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., & . (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem.Pharmacol.* **50**, 83-90.
- Meijer, O. C., de Lange, E. C., Breimer, D. D., de Boer, A. G., Workel, J. O., & de Kloet, E. R. (1998). Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1A* P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* **139**, 1789-1793.
- Milad, M. R. & Quirk, G. J. (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* **420**, 70-74.
- Milad, M. R., Vidal-Gonzalez, I., & Quirk, G. J. (2004). Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behav.Neurosci.* **118**, 389-394.
- Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog.Neurobiol.* **70**, 83-244.
- Millhouse, O. E. (1986). The intercalated cells of the amygdala. *J.Comp Neurol.* **247**, 246-271.
- Mineka, S. & Ohman, A. (2002). Phobias and preparedness: the selective, automatic, and encapsulated nature of fear. *Biol.Psychiatry* **52**, 927-937.
- Moldrich, G. & Wenger, T. (2000). Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* **21**, 1735-1742.
- Mongeau, R., Miller, G. A., Chiang, E., & Anderson, D. J. (2003). Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. *J.Neurosci.* **23**, 3855-3868.
- Monory, K., Tzavara, E. T., Lexime, J., Ledent, C., Parmentier, M., Borsodi, A., & Hanoune, J. (2002). Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **292**, 231-235.
- Moody, J. S., Kozak, K. R., Ji, C., & Marnett, L. J. (2001). Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase. *Biochemistry* **40**, 861-866.
- Moore, S. A., Nomikos, G. G., Dickason-Chesterfield, A. K., Schober, D. A., Schaus, J. M., Ying, B. P., Xu, Y. C., Phebus, L., Simmons, R. M., Li, D., Iyengar, S., & Felder, C. C. (2005). Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 17852-17857.
- Morrow, B. A., Redmond, A. J., Roth, R. H., & Elsworth, J. D. (2000). The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Res.* **864**, 146-151.
- Mowrer, O. H. (1939). A stimulus-response analysis of anxiety and its role as a reinforcing agent. *Psychological Review* **46**, 553-565.

- Muller, M. & Fendt, M. (2006). Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behav. Brain Res.* **167**, 57-62.
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61-65.
- Myers, K. M. & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* **36**, 567-584.
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends Neurosci.* **26**, 65-72.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**, 722-726.
- Navarro, M., Hernandez, E., Munoz, R. M., Del, A., I, Villanua, M. A., Carrera, M. R., & Rodriguez, d. F. (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* **8**, 491-496.
- Nunez, E., Benito, C., Pazos, M. R., Barbachano, A., Fajardo, O., Gonzalez, S., Tolon, R. M., & Romero, J. (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* **53**, 208-213.
- Nyiri, G., Cserep, C., Szabadits, E., Mackie, K., & Freund, T. F. (2005). CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* **136**, 811-822.
- Ohman, A. & Mineka, S. (2001). Fears, phobias, and preparedness: toward an evolved module of fear and fear learning. *Psychol.Rev.* **108**, 483-522.
- Ohno-Shosaku, T., Shosaku, J., Tsubokawa, H., & Kano, M. (2002). Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur.J.Neurosci.* **15**, 953-961.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Fezza, F., Theodoropoulou, M., Grubler, Y., Stalla, J., Arzberger, T., Milone, A., Losa, M., Di, M., V, Lutz, B., & Stalla, G. K. (2001). Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 2687-2696.
- Pamplona, F. A. & Takahashi, R. N. (2006). WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci.Lett.* **397**, 88-92.
- Pare, D., Quirk, G. J., & LeDoux, J. E. (2004). New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J.Neurophysiol.* **92**, 1-9.
- Patel, S., Roelke, C. T., Rademacher, D. J., Cullinan, W. E., & Hillard, C. J. (2004). Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **145**, 5431-5438.
- Patel, S., Roelke, C. T., Rademacher, D. J., & Hillard, C. J. (2005). Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur.J.Neurosci.* **21**, 1057-1069.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned Reflexes* Oxford University Press, London.

- Peeke, H. V. S. & Petrinovich, L. (1984). Approaches, constructs and terminology for the study of response change in the intact organism. In *Habituation, sensitization, and behavior*, eds. Peeke, H. V. S. & Petrinovich, L., pp. 1-14. Academic Press, New York.
- Pereira, M. E., Rosat, R., Huang, C. H., Godoy, M. G., & Izquierdo, I. (1989). Inhibition by diazepam of the effect of additional training and of extinction on the retention of shuttle avoidance behavior in rats. *Behav. Neurosci.* **103**, 202-205.
- Pertwee, R. G. & Ross, R. A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**, 101-121.
- Phillips, R. G. & LeDoux, J. E. (1994). Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* **1**, 34-44.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 873-884.
- Pitler, T. A. & Alger, B. E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.* **12**, 4122-4132.
- Quirk, G. J., Likhtik, E., Pelletier, J. G., & Pare, D. (2003). Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J. Neurosci.* **23**, 8800-8807.
- Rescorla, R. A. (2001). Experimental Extinction. In *Contemporary learning theories*, eds. Mowrer, R. R. & Klein, S. B., pp. 119-154. Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, NJ.
- Rescorla, R. A. & Wagner, A. R. (1972). A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and non-reinforcement. In *Classical Conditioning II: Current Research and Theory*, eds. Black, A. & Prokasy, W. F., pp. 64-99. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Richardson, R. (2000). Shock sensitization of startle: learned or unlearned fear? *Behav. Brain Res.* **110**, 109-117.
- Richardson, R. & Elsayed, H. (1998). Shock sensitization of startle in rats: the role of contextual conditioning. *Behav. Neurosci.* **112**, 1136-1141.
- Richardson, R., Ledgerwood, L., & Cranney, J. (2004). Facilitation of fear extinction by D-cycloserine: theoretical and clinical implications. *Learn. Mem.* **11**, 510-516.
- Richmond, M. A., Yee, B. K., Pouzet, B., Veenman, L., Rawlins, J. N., Feldon, J., & Bannerman, D. M. (1999). Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav. Neurosci.* **113**, 1189-1203.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8384-8388.
- Robbins, T. W. (2005). Controlling stress: how the brain protects itself from depression. *Nat. Neurosci.* **8**, 261-262.
- Robinson, T. E. & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **18**, 247-291.

- Rodgers, R. J., Evans, P. M., & Murphy, A. (2005). Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naive and plus-maze-experienced mice. *Behav.Pharmacol.* **16**, 405-413.
- Rooszendaal, B., Koolhaas, J. M., & Bohus, B. (1997). The role of the central amygdala in stress and adaption. *Acta Physiol Scand.Suppl* **640**, 51-54.
- Rosen, J. B. (2004). The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neuro-behavioral system analysis of the amygdala. *Behav.Cogn Neurosci.Rev.* **3**, 23-41.
- Rosen, J. B. & Schulkin, J. (1998). From normal fear to pathological anxiety. *Psychol.Rev.* **105**, 325-350.
- Routtenberg, A. (2002). Targeting the "species gene ensemble". *Hippocampus* **12**, 105-108.
- Royer, S., Martina, M., & Pare, D. (1999). An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J.Neurosci.* **19**, 10575-10583.
- Rubino, T., Forlani, G., Vigano, D., Zippel, R., & Parolaro, D. (2004). Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol.Cell Neurosci.* **25**, 355-362.
- Rudy, J. W., Huff, N. C., & Matus-Amat, P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **28**, 675-685.
- Sanchez, M. G., Ruiz-Llorente, L., Sanchez, A. M., & Diaz-Laviada, I. (2003). Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal.* **15**, 851-859.
- Schmid, P. C., Zuzarte-Augustin, M. L., & Schmid, H. H. (1985). Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J.Biol.Chem.* **260**, 14145-14149.
- Seligman, M. E. P. (1971). Phobias and Preparedness. *Behav.Ther.* **2**, 307-320.
- Siegmund, A., Langnaese, K., & Wotjak, C. T. (2005). Differences in extinction of conditioned fear in C57BL/6 substrains are unrelated to expression of alpha-synuclein. *Behav.Brain Res.* **157**, 291-298.
- Snyder, S. H. (1994). *Chemie der Psyche* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Specht, C. G. & Schoepfer, R. (2001). Deletion of the alpha-synuclein locus in a sub-population of C57BL/6J inbred mice. *BMC.Neurosci.* **2**, 11.
- Stam, R., Bruijnzeel, A. W., & Wiegant, V. M. (2000). Long-lasting stress sensitisation. *Eur.J.Pharmacol.* **405**, 217-224.
- Stam, R., van Laar, T. J., Akkermans, L. M., & Wiegant, V. M. (2002). Variability factors in the expression of stress-induced behavioural sensitisation. *Behav.Brain Res.* **132**, 69-76.
- Stiedl, O., Radulovic, J., Lohmann, R., Birkenfeld, K., Palve, M., Kammermeier, J., Sananbenesi, F., & Spiess, J. (1999). Strain and substrain differences in context- and tone-dependent fear conditioning of inbred mice. *Behav.Brain Res.* **104**, 1-12.
- Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S., & Waku, K. (2002). Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **66**, 173-192.

- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem.Biophys.ResCommun.* **215**, 89-97.
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J.Neurosci.* **24**, 4787-4795.
- Tang, J., Wagner, S., Schachner, M., Dityatev, A., & Wotjak, C. T. (2003). Potentiation of amygdaloid and hippocampal auditory-evoked potentials in a discriminatory fear-conditioning task in mice as a function of tone pattern and context. *Eur.J.Neurosci.* **18**, 639-650.
- Thompson, R. F. & Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol.Rev.* **73**, 16-43.
- Trivedi, M. A. & Coover, G. D. (2004). Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiol.Learn.Mem.* **81**, 172-184.
- Troncoso, A. C., Cirilo-Junior, G., Sandner, G., & Brandao, M. L. (1998). Signaled two-way avoidance learning using electrical stimulation of the inferior colliculus as negative reinforcement: effects of visual and auditory cues as warning stimuli. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **31**, 391-398.
- Urighuen, L., Perez-Rial, S., Ledent, C., Palomo, T., & Manzanares, J. (2004). Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* **46**, 966-973.
- Valjent, E., Pages, C., Rogard, M., Besson, M. J., Maldonado, R., & Caboche, J. (2001). Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur.J.Neurosci.* **14**, 342-352.
- van Dijken, H. H., de Goeij, D. C., Sutanto, W., Mos, J., de Kloet, E. R., & Tilders, F. J. (1993). Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* **58**, 57-64.
- van Dijken, H. H., Mos, J., van der Heyden, J. A., & Tilders, F. J. (1992a). Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav.* **52**, 945-951.
- van Dijken, H. H., Tilders, F. J., Olivier, B., & Mos, J. (1992b). Effects of anxiolytic and antidepressant drugs on long-lasting behavioural deficits resulting from one short stress experience in male rats. *Psychopharmacology (Berl)* **109**, 395-402.
- van Dijken, H. H., van der Heyden, J. A., Mos, J., & Tilders, F. J. (1992c). Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav.* **51**, 787-794.
- van Zutphen, L. F. M., Hedrich, H. J., van Oortmerssen, G. A., & Prins, J. B. (1995). Genetische Standardisierung. In *Grundlagen der Versuchstierkunde*, eds. van Zutphen, L. F. M., Baumans, V., & Beynen, A. C., pp. 117-136. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Varma, N., Carlson, G. C., Ledent, C., & Alger, B. E. (2001). Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J.Neurosci.* **21**, RC188.
- Varvel, S. A. & Lichtman, A. H. (2002). Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **301**, 915-924.

- Vazdarjanova, A., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (2001). Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *Eur.J.Neurosci.* **14**, 709-718.
- Viveros, M. P., Marco, E. M., & File, S. E. (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **81**, 331-342.
- Waddell, J., Dunnett, C., & Falls, W. A. (2004). C57BL/6J and DBA/2J mice differ in extinction and renewal of extinguished conditioned fear. *Behav.Brain Res.* **154**, 567-576.
- Wagner, A. R. & Rescorla, R. A. (1972). Inhibition and learning. In *Inhibition in Pavlovian conditioning*, eds. Boakes, R. A. & Halliday, M. S., Academic Press, London.
- Walker, D. L. & Davis, M. (1997). Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J.Neurosci.* **17**, 9375-9383.
- Walker, D. L., Ressler, K. J., Lu, K. T., & Davis, M. (2002). Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *J.Neurosci.* **22**, 2343-2351.
- Walker, D. L., Toufexis, D. J., & Davis, M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur.J.Pharmacol.* **463**, 199-216.
- Wall, P. M., Blanchard, R. J., Yang, M., & Blanchard, D. C. (2004). Differential effects of infralimbic vs. ventromedial orbital PFC lidocaine infusions in CD-1 mice on defensive responding in the mouse defense test battery and rat exposure test. *Brain Res.* **1020**, 73-85.
- Wenger, T., Jamali, K. A., Juaneda, C., Leonardelli, J., & Tramu, G. (1997). Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **237**, 724-728.
- Wenger, T., Ledent, C., & Tramu, G. (2003). The endogenous cannabinoid, anandamide, activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Neuroendocrinology* **78**, 294-300.
- Wepsic, J. G. (1966). Multimodal sensory activation of cells in the magnocellular medial geniculate nucleus. *Exp.Neurol.* **15**, 299-318.
- Wiedenmayer, C. P. (2004). Adaptations or pathologies? Long-term changes in brain and behavior after a single exposure to severe threat. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **28**, 1-12.
- Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* **296**, 678-682.
- Wotjak, C. T. (2003). C57BLack/BOX? The importance of exact mouse strain nomenclature. *Trends Genet.* **19**, 183-184.
- Wotjak, C. T. (2005). Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini.Rev.Med.Chem.* **5**, 659-670.
- Yang, Y. L., Chao, P. K., & Lu, K. T. (2005). Systemic and Intra-Amygdala Administration of Glucocorticoid Agonist and Antagonist Modulate Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology*.

Yang, Y. L. & Lu, K. T. (2005). Facilitation of conditioned fear extinction by d-cycloserine is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase cascades and requires de novo protein synthesis in basolateral nucleus of amygdala. *Neuroscience* **134**, 247-260.

Young, A. M. (2004). Increased extracellular dopamine in nucleus accumbens in response to unconditioned and conditioned aversive stimuli: studies using 1 min microdialysis in rats. *J.Neurosci.Methods* **138**, 57-63.

Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M., & Bonner, T. I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 5780-5785.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei Dr. Carsten T. Wotjak für die Betreuung der Promotion sowie für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe ‚Neuronale Plastizität / Mausverhalten‘ am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München bedanken. Dr. Wotjaks Unterstützung in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei und seine Offenheit für neue Ideen ermöglichte es mir, einen individuellen Zugang zu den wissenschaftlichen Fragestellungen zu finden. In diesem Zusammenhang bin ich besonders für seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft dankbar, die zur Entwicklung von den in dieser Arbeit dargelegten Konzepten und Hypothesen führte.

Prof. Dr. Rainer Landgraf und Prof. Dr. Gerd Schuller möchte ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten, herzlich danken. Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer danke ich für die Möglichkeit, die Promotion am Max-Planck-Institut für Psychiatrie durchzuführen.

Mein Dank gebührt auch der gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Lutz am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, die die hier verwendeten Mausmutanten herstellten, züchteten, genotypisierten und re-genotypisierten, Pharmaka zur Verfügung stellten und mir bei molekularbiologischen und biochemischen Arbeitstechniken mit Rat und Tat zur Seite standen. Die vielen fruchtbaren Diskussionen mit Prof. Dr. Beat Lutz, Dr. Krisztina Monory und insbesondere mit Dr. Giovanni Marsicano trugen maßgeblich zur konzeptuellen Entwicklung und experimentellen Planung in Hinsicht auf die Einbeziehung des Endocannabinoidsystems bei.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe ‚Neuronale Plastizität / Mausverhalten‘ möchte ich für die konstruktive und freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Viele wichtige Ideen entstanden bei Gesprächen mit Klaus Wanisch über biochemische Aspekte und mit Anja Siegmund über psychologische Aspekte der Arbeit, aber auch mit Dr. Rudi Marsch und Wolfgang Jacob – vielen Dank für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung! Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt Ania Mederer für ihre experimentelle Unterstützung und unermüdliche Videoanalyse sowie Martina Reents für die Genotypisierung von Mausmutanten.

Für ihre freundschaftliche und fachliche Unterstützung danke ich Corinna Haupt und all den nicht namentlich genannten Freunden und Bekannten, die mir direkt oder indirekt bei dieser Arbeit zur Seite standen.

Mein ganz spezieller Dank gilt jedoch meinen Eltern, meinem Bruder und Mathias Jung, die mich durch Rat und Tat dabei unterstützten, meinen Weg zu verfolgen. Dabei danke ich besonders meinem Bruder für die große Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit sowie meiner gesamten Familie für das fleißige Korrekturlesen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen. Die vorliegende Dissertation liegt weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vor.

Diese Dissertation wurde von Dr. Carsten T. Wotjak betreut.

Ort, Datum

Unterschrift Kornelia Kamprath

Erklärung zum Eigenanteil bei Koautorenschaft

Manuskript 1: 15% (Planung und Durchführung der Verhaltensexperimente und Manuskriptarbeiten)

Manuskript 2: 50% (Konzept, Experimente, Datenauswertung, Manuskript)

Manuskript 3: 60% (Konzept, Experimente - ausgenommen Elektrophysiologie und Endocannabinoidmessung, Datenauswertung, Manuskript)

Manuskript 4: 75% (Konzept, Experimente, Datenauswertung, Manuskript)

Ort, Datum

Unterschrift

Bestätigung durch den Betreuer:

Ort, Datum

Unterschrift (Carsten T. Wotjak)

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Kornelia Kamprath
Geburtsdatum: 04.10.1975
Geburtsort: Vacha
Nationalität: deutsch

Bildungsweg

1982 – 1990 Polytechnische Oberschule in Vacha und Schmalkalden
1990 – 1994 Goethe-Gymnasium Ilmenau, Besuch der Spezialklassen mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung, Spezialisierung: Biologie
1994 Abitur
1994 – 1996 Bauhaus-Universität Weimar: Architekturstudium
1996 – 2001 Friedrich-Schiller-Universität Jena: Biologiestudium
1998 Vordiplom
SS1999 Vrije Universiteit Amsterdam, Department Molekulare Neurobiologie, Forschungsprojekt: ‚Identification of differentially regulated transcripts in rat nucleus accumbens shell after long-term extinction of heroin self-administration‘
2000 – 2001 Diplomarbeit: ‚Klonierung von GAP-43-Homologen und ihre Auswirkung auf die Morphologie von Nervenzellen‘
2001 Diplom Biologie
2001 – 2002 Friedrich-Schiller-Universität Jena, AG Molekulare und zelluläre Biophysik, Projekt: ‚Untersuchungen zu molekularen Interaktionen von Kaliumkanalproteinen mit intrazellulären Proteinen‘
Friedrich-Schiller-Universität Jena: Teilzeitstudium Philosophie
Seit 2002 Max-Planck-Institut für Psychiatrie, AG Neuronale Plastizität / Mausverhalten (Dr. Carsten T. Wotjak), Doktorarbeit ‚Untersuchungen zur Rolle des Endocannabinoidsystems bei der Anpassung an aversive Situationen‘

Publikationen

Jacobs EH, Spijker S, Verhoog CW, Kamprath K, de Vries TJ, Smit AB, Schoffelmeer AN. Active heroin administration induces specific genomic responses in the nucleus accumbens shell. *FASEB J.* 2002 Dec;16(14):1961-3. Epub 2002 Oct 18.

Cannich A, Wotjak CT, Kamprath K, Hermann H, Lutz B, Marsicano G. CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem.* 2004 Sep-Oct;11(5):625-32.

Kamprath K, Wotjak CT. Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem.* 2004 Nov-Dec;11(6):770-86. Epub 2004 Nov 10.

Kamprath K, Marsicano G, Tang J, Monory K, Bisogno T, Di Marzo V, Lutz B, Wotjak CT. Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. *J.Neurosci.* 2006 June; 26(25): 6677-86.

Kamprath K, Marsicano G, Monory K, Lutz B, Wotjak CT. Fear-alleviating effects of endocannabinoids depend on the extent of prior stress sensitization. Submitted to: *European Journal of Neuroscience.*

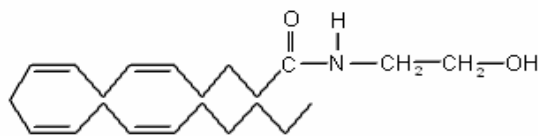
Anhang I: Übersicht zur Pharmakologie des Endocannabinoidsystems des Gehirns

Es gibt Hinweise darauf, dass Cannabinoidrezeptoren nicht nur bei Säugern, sondern allgemein bei ‚höheren‘ Vertebraten (bei dem Fisch *Fugu* wurden CB1-Gene gefunden, nicht aber beim Neunauge) vorkommen. Obwohl bei Invertebraten wie *Drosophila* Cannabinoid-Bindungsstellen identifiziert wurden, konnte kein CB1/CB2-ähnlicher Rezeptor identifiziert werden und Sequenzhomologien zeigen, dass die Cannabinoidrezeptor-ähnlichsten Sequenzen bei *Drosophila* für GPCRs für Insekten-Catecholamine codieren (Übersicht siehe Elphick & Egertova, 2001). Beide Cannabinoidrezeptoren, CB1 und CB2, gehören neben z.B. geruchsspezifischen GPCRs zur Gruppe 1 der GPCR-Familie A (Elphick & Egertova, 2001). Trotzdem zeigten sich zwischen CB1 und CB2 nur 44% Aminosäure-Sequenzhomologie, allerdings 68% Homologie innerhalb der Transmembrandomänen (Munro et al., 1993). Große Unterschiede waren auch im Expressionsmuster von CB1 und CB2 zu finden: CB1 wurde zuerst im Gehirn, aber auch in den Testes identifiziert, CB2 hingegen im Immunsystem (Überblick siehe Demuth & Molleman, 2006). Demzufolge wurden psychoaktive Effekte von Cannabinoiden vor allem CB1-vermittelten Mechanismen zugeschrieben. CB2 hingegen scheint in das Immunsystem involviert, wobei kürzlich auch in der Mikroglia im Gehirn unter Entzündungsbedingungen CB2 identifiziert werden konnte, was die Annahme, dass die CB2-Expression auf periphere Bereiche beschränkt sei, widerlegt (Nunez et al., 2004).

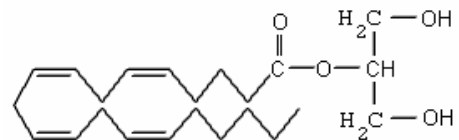
CB1 und CB2 unterscheiden sich auch in ihren Bindungseigenschaften in Bezug auf verschiedene Agonisten und Antagonisten, wodurch synthetisch Agonisten und Antagonisten mit hoher Spezifität hergestellt werden konnten (z.B. SR141716A/ Rimonabant als CB1-Antagonist, SR144528 als CB2-Antagonist bzw. inverser Agonist). Aber auch endogene Cannabinoide unterscheiden sich in ihren Bindungseigenschaften an CB1 und CB2. Anandamid z.B. bindet zwar mit nur marginal erhöhter Affinität, jedoch mit viel höherer Wirksamkeit an CB1 als an CB2 (Überblick siehe Pertwee & Ross, 2002). Von Anandamid und WIN55212-2, einem synthetischen CB1-Agonisten, konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sie im Gehirn von CB1^{-/-}-Mäusen über GPCRs Aktivität vermitteln (Breivogel et al., 2001), was auf einen neuen Cannabinoidrezeptor hindeutet, insbesondere weil diese Effekte nicht für CP55940, was hohe CB1-Spezifität aufweist, gezeigt werden konnten. Ähnliches konnte auch in einem anderen Stamm von CB1^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, wobei sich hier ein anderes Verteilungsmuster des möglichen neuen Cannabinoidrezeptors ergab (Monory et al., 2002). Allerdings wurde für Anandamid auch eine gewisse Affinität zu Serotonin- und muscarinergen Rezeptoren gezeigt (Übersicht siehe Di Marzo et al., 2002). Anandamid ist jedoch nicht nur an GPCRs aktiv, sondern teilt sich auch mit Capsaicin (einem Inhaltsstoff von Chilischoten) ein molekulares Target: den Vanilloidrezeptor VR1 (auch 'TRPV1', Di Marzo et al., 2002). VR1 ist ein nicht-selektiver Kationen-Kanal, der aus 6 Transmembrandomänen

besteht und vorrangig durch Hitze, Hydrogenionen und Capsaicin aktiviert wird, woraufhin ein Ca^{2+} -Influx in die Zelle und Neurotransmitterfreisetzung die Folge sind (Übersicht siehe Cortright & Szallasi, 2004). Die Funktion des VR1 wird heute als molekularer Integrator noxischer Stimuli gesehen (Cortright & Szallasi, 2004). Interessanterweise kann Anandamid, das über die Aktivierung des CB1-Rezeptors eine Hemmung der Transmitterausschüttung bewirkt, über VR1 die Transmitterausschüttung aktivieren. Auch bestimmte VR1-Agonisten, wie z.B. Olvanil, haben eine gewisse Affinität zu CB1 und synthetische Hybride zwischen Anandamid und Capsaicin, wie z.B. Arvanil, deuten auf eine gewisse Überlappung von Cannabinoid- und Vanilloidsystem hin (Überblick siehe Di Marzo et al., 2002). Trotz dieser Vielfalt spielt der CB1-Rezeptor unter anderem aufgrund seiner großen Verbreitung im Gehirn eine herausragende Rolle bei der Vermittlung psychogener Effekte von (Endo-)Cannabinoiden – dazu sind auch Effekte auf das Furchtgedächtnis zu zählen. Im Folgenden werden darum ausgewählte CB1-Agonisten und –Antagonisten sowie Wiederaufnahme- und Abbauhemmer von Anandamid zusammengefasst.

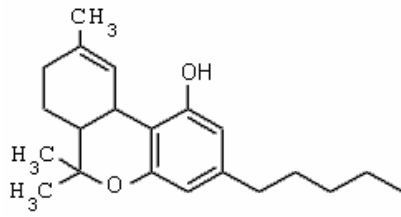
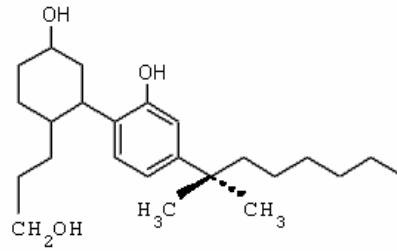
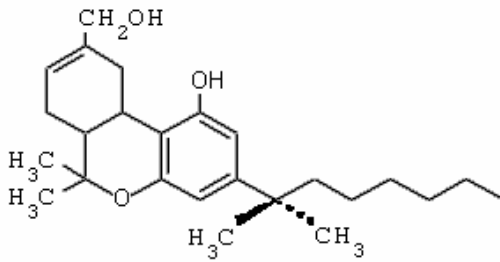
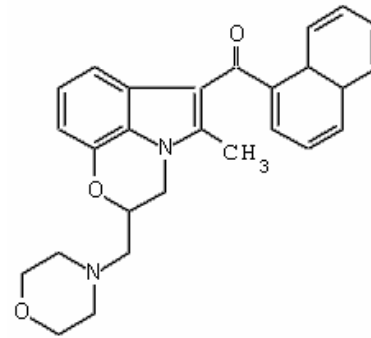
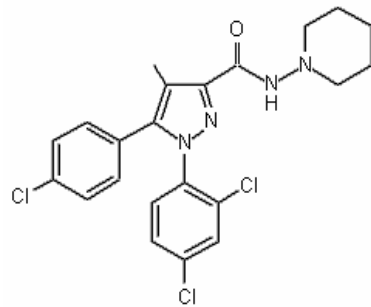
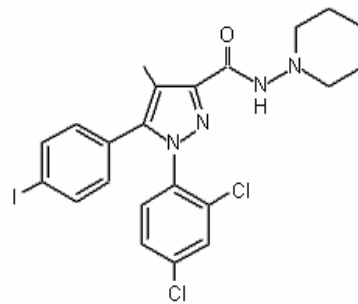
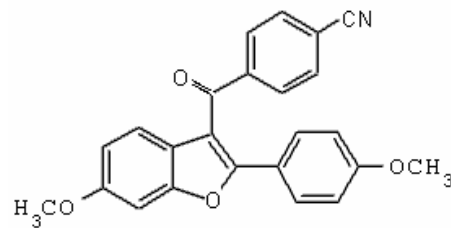
'Haupt'-Endocannabinoide:



Anandamid (AEA)

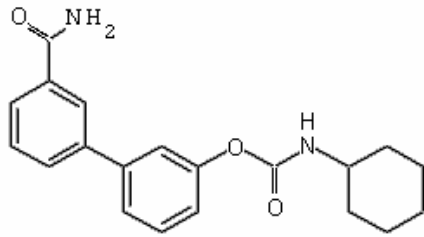


2-Arachidonylglycerol (2-AG)

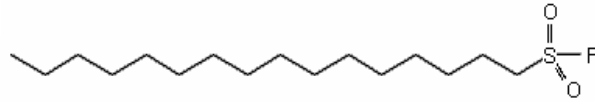
Exogene CB1-Agonisten:**Δ⁹-Tetrahydrocannabinol (Δ⁹-THC)****CP55,940****HU210****WIN55,212-2****CB1-Antagonisten:****SR141716A****AM251****LY320135**

FAAH-Inhibitoren:

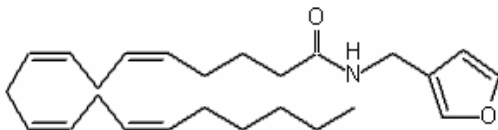
URB597



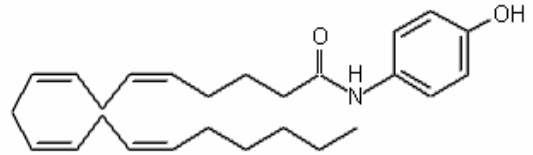
AM374

**Inhibitoren des Anandamidtransports:**

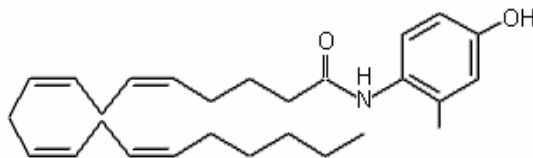
UCM707



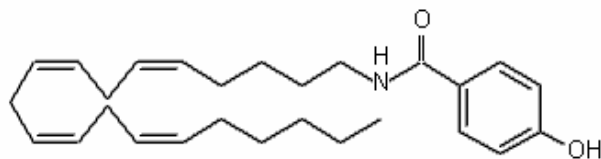
AM404



VDM11



AM1172



Manuskript 1

CBI Cannabinoid Receptors Modulate Kinase and Phosphatase Activity During Extinction of Conditioned Fear in Mice

Astrid Cannich,¹ Carsten T. Wotjak,² Kornelia Kamprath,² Heike Hermann,¹ Beat Lutz,¹ and Giovanni Marsicano^{1,3}

Groups of ¹Molecular Genetics of Behavior and ²Neuronal Plasticity/Mouse Behavior, Max Planck Institute of Psychiatry, 80804 Munich, Germany

Cannabinoid receptors type 1 (CBI) play a central role in both short-term and long-term extinction of auditory-cued fear memory. The molecular mechanisms underlying this function remain to be clarified. Several studies indicated extracellular signal-regulated kinases (ERKs), the phosphatidylinositol 3-kinase with its downstream effector AKT, and the phosphatase calcineurin as potential molecular substrates of extinction behavior. To test the involvement of these kinase and phosphatase activities in CBI-dependent extinction of conditioned fear behavior, conditioned CBI-deficient mice (CBI^{-/-}) and wild-type littermates (CBI^{+/+}) were sacrificed 30 min after recall of fear memory, and activation of ERKs, AKT, and calcineurin was examined by Western blot analysis in different brain regions. As compared with CBI^{+/+}, the nonreinforced tone presentation 24 h after auditory-cued fear conditioning led to lower levels of phosphorylated ERKs and/or calcineurin in the basolateral amygdala complex, ventromedial prefrontal cortex, dorsal hippocampus, and ventral hippocampus of CBI^{-/-}. In contrast, higher levels of phosphorylated p44 ERK and calcineurin were observed in the central nucleus of the amygdala of CBI^{-/-}. Phosphorylation of AKT was more pronounced in the basolateral amygdala complex and the dorsal hippocampus of CBI^{-/-}. We propose that the endogenous cannabinoid system modulates extinction of aversive memories, at least in part via regulation of the activity of kinases and phosphatases in a brain structure-dependent manner.

The formation of fear memory is an important adaptive response of animals and humans to potentially dangerous environmental cues. This process can be studied in the laboratory by means of fear-conditioning paradigms. Under experimental conditions, the pairing of a neutral explicit cue (conditioned stimulus, CS, e.g., tone) with a punishment (unconditioned stimulus, US, e.g., electric footshock) leads to the formation of a fear memory with the consequence that re-exposure to the same CS elicits a marked fear response (conditioned response, CR, e.g., freezing or potentiated startle; LeDoux 2000; Davis and Whalen 2001). Repeated or sustained presentation of the CS in absence of the US results in a progressive decrease of the fear response, a phenomenon called extinction (Rescorla 2001; Myers and Davis 2002). In recent years, several cellular and molecular mechanisms have been proposed to be specifically involved in extinction processes in different brain regions, including intracellular phosphorylation and dephosphorylation processes. Pharmacological and biochemical studies showed that extinction training involves the activation of extracellular signal-regulated MAP kinases (ERKs; Lu et al. 2001; for review, see Myers and Davis 2002), of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase) and of its downstream target AKT (Lin et al. 2003b), and the protein phosphatase 2b, also called calcineurin (Lin et al. 2003a; Mansuy 2003).

A number of brain structures have been implicated in memory extinction. For instance, the basolateral amygdala complex (BLAC) seems to play a central role not only in acquisition of fear behavior (LeDoux 2000), but also in its extinction (Falls et al. 1992; Lu et al. 2001; for review, see Myers and Davis 2002;

Walker and Davis 2002; Lin et al. 2003a,b). Other brain regions implicated in extinction include the central amygdala (CE), ventromedial prefrontal cortex (VPC), and hippocampus. The activity of the CE as the major output center of the amygdala complex seems to be inversely related to the activity of BLAC (Royer et al. 1999; Royer and Paré 2002) and VPC (Quirk et al. 2003) during extinction. Furthermore, the VPC and, in particular, the infralimbic cortex, have been shown to play a central role in long-term storage of extinction memories (Morgan et al. 1993; Milad and Quirk 2002; Quirk et al. 2003). Finally, both dorsal (DH) and ventral hippocampus (VH) might be involved in extinction processing (Clark et al. 1992), possibly by encoding information about contextual features of the environment where extinction occurs (Corcoran and Maren 2001).

Animal models that are specifically impaired in extinction represent useful tools for a better understanding of the molecular mechanisms involved in these processes. We could recently show that tone presentation during an extinction trial triggered an increase in the levels of endocannabinoids (the endogenous ligands of CB1 receptors) (Di Marzo et al. 1998; Piomelli 2003) in selected brain regions of wild-type mice, and that mutant mice lacking the cannabinoid receptor type 1 (CB1^{-/-}) are specifically impaired in extinction (Marsicano et al. 2002). These data indicate that the endogenous cannabinoid system is activated during extinction training to eventually lead to both short-term and long-term extinction (Marsicano et al. 2002; Suzuki et al. 2004).

The cellular mechanisms underlying the involvement of the endogenous cannabinoid system in extinction of aversive memories are unknown. However, there is some evidence that they might include phosphorylation and dephosphorylation processes. At the level of intracellular signaling, the activation of CB1 receptors is able to stimulate activation of ERKs both in vitro

³Corresponding author.

E-MAIL giovanni@mpipsykl.mpg.de; FAX 49 (0)89-30-622-610.

Article and publication are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.77904>.

(Bouaboula et al. 1995; Howlett et al. 2002; Derkinderen et al. 2003) and in vivo (Valjent et al. 2001; Derkinderen et al. 2003; Marsicano et al. 2003), as well as the PI-3 kinase pathway and its downstream effector AKT (Gomez del Pulgar et al. 2000; Galve-Roperh et al. 2002; Guzman et al. 2002). Importantly, at least under certain conditions, the phosphorylation of ERKs appears to depend on the physiological on-demand activation of the endogenous cannabinoid system (Marsicano et al. 2003). So far, no direct evidence has been shown for the existence of a link between CB1 receptors and calcineurin activity or expression in neurons. However, considering the involvement of this phosphatase in extinction of fear behavior and its proposed interaction with ERKs activity (Lin et al. 2003a), it is conceivable that the endogenous cannabinoid system might also modulate the activity of calcineurin during extinction training.

The present study was designed to verify the hypothesis that the activation of the endogenous cannabinoid system during extinction training leads to alterations in phosphorylation and dephosphorylation processes. To this end, we subduced CB1^{-/-} and wild-type littermate controls (CB1^{+/+}) to an auditory fear-conditioning task. Mice were killed 30 min after recall of the fear memory on the next day, and their brains were removed for dissection of BLAC, CE, VPC, DH, and VH. The activation of ERKs, AKT, and calcineurin was examined in these brain structures by Western blot analyses. The levels of tone-induced activation of kinases and phosphatase were profoundly different between CB1^{+/+} and CB1^{-/-} mice. These results provide novel information concerning the functions of the endogenous cannabinoid system during extinction of fear behavior, and help to further clarify the general mechanisms of this adaptive behavior.

RESULTS

CB1^{-/-} Mice Show Impaired Short- and Long-Term Extinction of Conditioned Fear

As shown in Figure 1, a 3-min tone presentation 24 h after conditioning resulted in a prominent fear reaction in both CB1^{-/-} and CB1^{+/+} as compared with mice without tone presentation (Factor *Tone*: $F_{(1,55)} = 54.7$, $P < 0.0001$). The freezing response during the first 100 sec of the tone presentation was not different between the two genotypes. With ongoing tone presentation, however, CB1^{+/+} but not CB1^{-/-} showed a decrease in freezing (Factor *Genotype*: $F_{(1,55)} = 1.6$, $P = 0.205$; *Genotype* × *Tone* × *Interval* interaction: $F_{(8,440)} = 2.1$, $P < 0.05$, Fig. 1B). This difference was not due to differences in context generalization, as CB1^{+/+} and CB1^{-/-} showed a similarly low freezing response to the test context without tone presentation (*Genotype* × *Tone* interaction: $F_{(1,55)} = 0.1$, $P = 0.704$, Fig. 1B).

About half of the animals of the tone groups were exposed to the 3-min tone for a second time 5 d later (d6, Fig. 1), in order to assess long-term extinction. At day 6, the amount of freezing was significantly different between the genotypes throughout tone presentation (Factor *Genotype*: $F_{(1,20)} = 8.3$, $P < 0.01$; *Genotype* × *Interval* interaction: $F_{(8,160)} = 1.4$, $P = 0.220$, Fig. 1B). In summary, data of the behavioral analyses confirm that, other than CB1^{+/+}, CB1^{-/-} show strongly impaired short-term and long-term extinction of auditory-cued fear memory.

Altered Levels of ERK and AKT Phosphorylation and of Calcineurin Expression in CB1 Mutant Mice

About half of the animals of the tone groups and all animals of the no-tone groups were killed 30 min after the tone presentation and exposure to the test context without tone presentation at day 1, respectively (d1, Fig. 1A). Levels of phosphorylated ERKs,

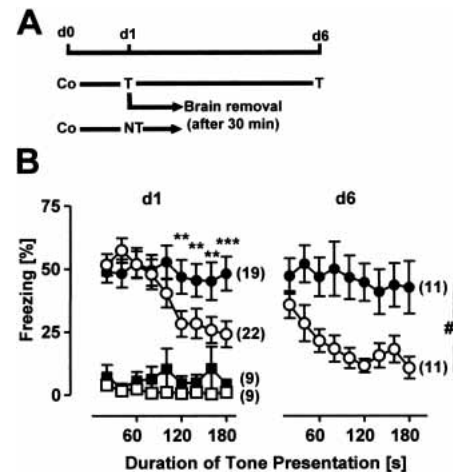


Figure 1 CB1^{-/-} mice show normal acquisition but impaired short-term and long-term extinction of auditory-cued fear memory. (A) Schematic representation of the fear-conditioning experiment. All animals were conditioned with a single tone-shock pairing (Co) at day 0. On the next day (d1), both CB1^{+/+} and CB1^{-/-} were assigned to two groups. Mice of the first group were exposed to a 3-min tone in a neutral test context (T), mice of the second group were only placed into the test context without tone presentation (NT). About half of the animals of the first group were exposed to the tone for a second time on day 6 (d6). All of the other mice were killed 30 min after their exposure to the test context (with or without tone presentation) on d1. (B) Percentage of freezing of CB1^{+/+} (open symbols) and CB1^{-/-} (filled symbols) shown on d1 and d6 during tone presentation (circles) or in the same context without tone presentation (squares). Data were analyzed in 20-sec bins, normalized to the analysis interval and expressed as mean ± SEM. Numbers in brackets indicate the sample sizes for the behavioral experiments on d1 and d6. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ as compared with CB1^{+/+} with tone presentation; (##) $P < 0.01$.

of phosphorylated AKT, and of calcineurin protein were measured in dissected BLAC, CE, VPC, DH, and VH by Western blot. Densitometric analyses revealed the following differences between tone groups and no-tone groups and the two genotypes.

Basolateral Amygdala Complex (BLAC)

The levels of phosphorylation of p44 ERK were significantly increased in CB1^{+/+} of the tone group as compared with respective no-tone controls ($148.1 \pm 21.8\%$ vs. $100 \pm 11.4\%$, $P < 0.05$, Fig. 2B, top graph). In contrast, the phosphorylation levels of p42 ERK were unchanged by the tone presentation (Fig. 2B, bottom graph). In CB1^{-/-} mice, the phosphorylation levels of p42 ERK were also unchanged by the tone presentation (Fig. 2B, bottom graph). However, tone presentation caused a reduction in phosphorylated p44 ERK as compared with CB1^{-/-} of the no-tone group ($68.5 \pm 6.2\%$ vs. $100.0 \pm 10.9\%$, $P < 0.05$, Fig. 2B, top graph), thus resulting in a significant difference between genotypes in the relative tone-induced levels of phosphorylated p44 ($P < 0.01$, Fig. 2B, top graph, Table 1).

The protein levels of calcineurin were significantly increased by tone presentation in CB1^{+/+} ($197.0 \pm 16.6\%$ vs. $100.0 \pm 8.8\%$, $P < 0.01$, Fig. 2C), but decreased in CB1^{-/-} mice ($80.5 \pm 5.3\%$ vs. $100.0 \pm 7.1\%$, $P < 0.05$, Fig. 2C). Consequently, also the comparison of the relative tone-induced levels of calcineurin revealed a significant difference between the two genotypes ($P < 0.001$, Fig. 2C, Table 1).

The phosphorylation levels of AKT were not significantly changed by tone presentation in either genotype as compared with the respective no-tone controls (Fig. 2D). However, the relative tone-induced AKT phosphorylation was significantly higher

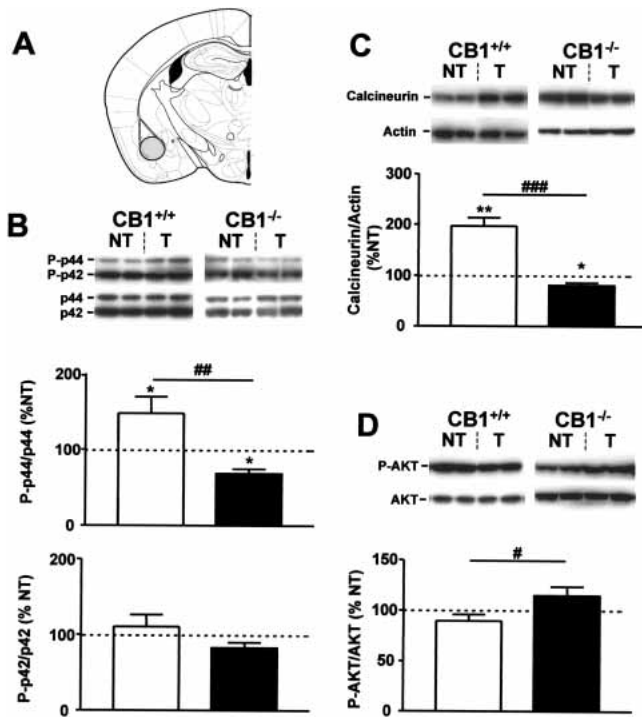


Figure 2 Tone-induced activation of ERKs, calcineurin, and AKT in the basolateral amygdala complex of $CB1^{+/+}$ and $CB1^{-/-}$ mice. (A) Schematic drawing depicting the dissected area according to Paxinos and Franklin (2001). (B) Levels of phosphorylation of ERKs. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to phosphorylated forms of ERKs (P-p44 and P-p42) and to respective total ERK protein (p44 and p42). (Graphs) Densitometric quantification of tone-induced p44 ERK (top graph) and of p42 ERK (bottom graph) phosphorylation in $CB1^{+/+}$ (open bars) and $CB1^{-/-}$ mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (average: 100%, dotted line). (C) Levels of calcineurin expression. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to calcineurin and to respective actin. (Graph) Densitometric quantification of tone-induced calcineurin expression in $CB1^{+/+}$ (open bars) and $CB1^{-/-}$ mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (average: 100%, dotted line). (D) Levels of phosphorylation of AKT. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to phosphorylated form of AKT (P-AKT) and to respective total AKT protein (AKT). (Graph) Densitometric quantification of tone-induced AKT phosphorylation in $CB1^{+/+}$ (open bars) and $CB1^{-/-}$ mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). (NT) no-tone mice; (T) tone mice. $N = 7-11$ mice per group. Data are mean \pm SEM. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (#) $P < 0.05$; (###) $P < 0.01$; (####) $P < 0.001$. Note that extracts from $CB1^{+/+}$ and $CB1^{-/-}$ mice were analyzed on separate immunoblots. Therefore, direct comparison of band intensities between genotypes is not possible.

in $CB1^{-/-}$ than in $CB1^{+/+}$ littermates ($114.8 \pm 9.0\%$ vs. $89.6 \pm 6.4\%$, $P < 0.05$, Fig. 2D, Table 1).

Central Nucleus of Amygdala (CE)

Tone presentation failed to significantly affect phosphorylation of p44 and p42 ERKs in either genotype (Fig. 3B). In contrast, the relative tone-induced levels of p44 ERK phosphorylation were significantly higher in $CB1^{-/-}$ than in $CB1^{+/+}$ ($114.7 \pm 8.8\%$ vs. $79.9 \pm 7.6\%$, $P < 0.01$, Fig. 3B, top graph, Table 1).

Calcineurin protein levels were not changed in the CE of $CB1^{+/+}$ of the tone group as compared with respective no-tone animals (Fig. 3C). In contrast, tone exposure increased the levels of calcineurin in $CB1^{-/-}$ ($147.9 \pm 13.8\%$ vs. $100.0 \pm 14.3\%$, $P < 0.05$, Fig. 3C). Accordingly, the relative tone-induced levels of calcineurin were significantly higher in $CB1^{-/-}$ than in $CB1^{+/+}$ littermates ($P < 0.01$, Fig. 3C, Table 1).

Ventromedial Prefrontal Cortex (VPC)

Phosphorylation levels of p44 and p42 ERKs were not significantly changed by tone presentation in either genotype (Fig. 4B), although trends toward a decrease of both p44 and p42 activation were observed in $CB1^{-/-}$, as compared with the respective no-tone controls ($P = 0.08$ for both kinases, Fig. 4B). However, the relative tone-induced phosphorylation of both ERKs was significantly higher in $CB1^{+/+}$ as compared with $CB1^{-/-}$ (P-p44: $141.7 \pm 20.0\%$ vs. $52.8 \pm 8.2\%$, $P < 0.01$; P-p42: $108.6 \pm 12.5\%$ vs. $69.5 \pm 7.9\%$, $P < 0.05$, Fig. 4B, Table 1).

The protein levels of calcineurin were significantly increased by tone presentation in both genotypes as compared with respective no-tone groups ($CB1^{+/+}$: $162.6 \pm 12.8\%$ vs. $100.0 \pm 17.0\%$, $P < 0.05$; $CB1^{-/-}$: $126.9 \pm 8.9\%$ vs. $100.0 \pm 7.0\%$, $P < 0.05$, Fig. 4C). However, the stimulation of calcineurin expression by the tone was significantly less pronounced in $CB1^{-/-}$ than in $CB1^{+/+}$ ($P < 0.05$, Fig. 4C, Table 1).

Dorsal Hippocampus (DH)

Phosphorylation levels of p44 and p42 ERKs were not significantly altered by tone presentation either in $CB1^{-/-}$ or in $CB1^{+/+}$. Also the relative tone-induced levels were not different between the two genotypes (statistics not shown, Fig. 5B, Table 1).

Calcineurin levels were not significantly changed by tone presentation in $CB1^{+/+}$ ($126.8 \pm 11.4\%$ vs. $100.0 \pm 4.8\%$, $P = 0.05$, Fig. 5C), but were significantly decreased in $CB1^{-/-}$ ($63.6 \pm 7.9\%$ vs. $100.0 \pm 6.9\%$, $P < 0.01$, Fig. 5C). Comparison of the relative tone-induced levels of calcineurin revealed a significant difference between the genotypes ($P < 0.01$, Fig. 5C, Table 1).

Tone presentation during extinction training did not modify the phosphorylation levels of AKT in $CB1^{+/+}$ (Fig. 5D), whereas it strongly activated AKT phosphorylation in $CB1^{-/-}$ ($239.0 \pm 30.1\%$ vs. $100.0 \pm 11.0\%$, $P < 0.001$, Fig. 5D). Consequently, tone-induced AKT phosphorylation was significantly higher in $CB1^{-/-}$ as compared with $CB1^{+/+}$ littermates ($P < 0.001$, Fig. 5D, Table 1).

Ventral Hippocampus (VH)

Tone presentation failed to affect the phosphorylation levels of ERKs in either genotype (statistics not shown, Fig. 6B, Table 1). In contrast, calcineurin levels were significantly increased in $CB1^{+/+}$ ($183.7 \pm 28.7\%$ vs. $100.0 \pm 13.4\%$, $P < 0.05$, Fig. 6C), but not in $CB1^{-/-}$ (Fig. 6C). Comparison of the relative tone-induced levels

Table 1. Tone-Induced Phosphorylation and Protein Levels in $CB1^{-/-}$ as Compared With $CB1^{+/+}$ Littermates

	Brain regions				
	BLAC	CE	VPC	DH	VH
P-p44 ERK	↓↓	↑	↓↓	=	=
P-p42 ERK	=	=	↓	=	=
Calcineurin	↓↓	↑	↓	↓↓	↓
P-AKT	↑	ND	ND	↑↑	ND

Arrows indicate the changes in the relative tone-induced levels of kinase phosphorylation (P-p44 ERK, P-p42 ERK, P-AKT) and of calcineurin protein expression between $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ mice following recall of the fear memory. (=) No significant variation; (ND) not determined; (BLAC) basolateral amygdaloid complex; (CE) central nucleus of amygdala; (VPC) ventromedial prefrontal cortex; (DH) dorsal hippocampus; (VH) ventral hippocampus.

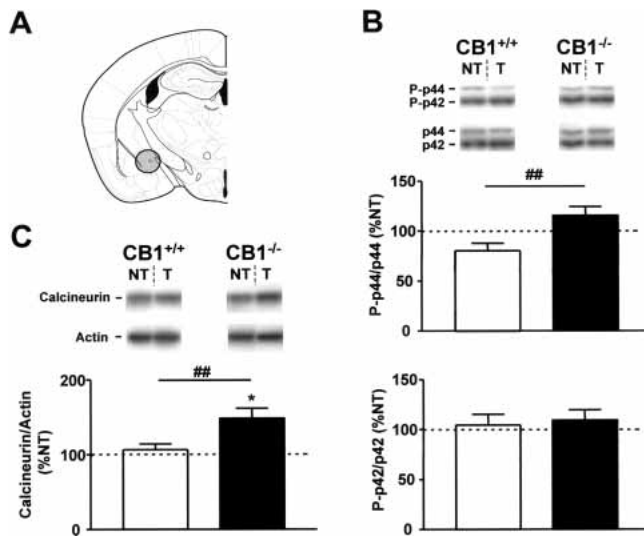


Figure 3 Tone-induced activation of ERKs and calcineurin in the central nucleus of amygdala of CB1^{+/+} and CB1^{-/-} mice. (A) Schematic drawing depicting the dissected area according to Paxinos and Franklin (2001). (B) Levels of phosphorylation of ERKs. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to phosphorylated forms of ERKs (P-p44 and P-p42) and to respective total ERK protein (p44 and p42). (Graphs) Densitometric quantification of tone-induced p44 and p42 ERK phosphorylation in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). (C) Levels of calcineurin expression. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to calcineurin and to respective actin. (Graph) Densitometric quantification of tone-induced calcineurin expression in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). $N = 7-11$ per group. Data expression and symbols are as in Figure 2.

of calcineurin between genotypes revealed higher amounts of the protein in CB1^{+/+} than in CB1^{-/-} mice ($P < 0.05$, Fig. 6C, Table 1).

DISCUSSION

In the present study, we used a genetic mouse model (CB1-deficient mice) with specific impairments in extinction behavior (Marsicano et al. 2002) to further characterize cellular and molecular mechanisms underlying extinction. We analyzed the activation of kinases and phosphatases in different brain regions after recall of an auditory-cued fear memory that leads to short-term and long-term extinction of conditioned fear in CB1^{+/+}, but not in CB1^{-/-} (Fig. 1; Marsicano et al. 2002).

The aim of this study was to determine the extent of extinction-induced kinase and phosphatase activation in the presence of CB1 receptors (normal extinction) and in their absence (impaired extinction) in different brain regions. For this reason, we compared the levels of calcineurin expression and kinase phosphorylation in conditioned mice with or without recall of the aversive memory separately per genotype, and used the ratio of the two parameters for comparing the molecular consequences of memory recall/extinction training between the two genotypes. Due to methodological limitations, we were not able to assess differences between genotypes in basal levels of calcineurin expression and kinase phosphorylation before conditioning or before extinction. Therefore, it could be argued that a general dysregulation of intracellular pathways in CB1^{-/-} mice already under basal conditions, rather than a specific alteration during extinction training, might cause the alterations observed after extinction trials. We consider this argument unlikely for the following reasons: Kinase- and phosphatase-dependent intracellular

pathways play central roles in acquisition and consolidation of memory (Le Doux 2000; Lin et al. 2003b; Mansuy 2003). Consequently, a general dysregulation of kinase/phosphatase pathways in CB1^{-/-} mice would likely also cause alterations in these phases of fear memory processing. However, CB1^{-/-} mice and wild-type mice acutely treated with a CB1 antagonist show normal acquisition and consolidation of fear memory (Marsicano et al. 2002), but a selective impairment of extinction behavior (Fig. 1; Marsicano et al. 2002). Therefore, we believe that the observed alterations in kinase and phosphatase activities in CB1^{-/-} mice depend on the specific and transient activation of the endogenous cannabinoid system during extinction training rather than on differences in basal protein expression and/or phosphorylation.

Recall of the aversive memory was followed by different activation and expression of various kinases and of the phosphatase calcineurin, depending on the brain structure studied (Table 1). The observed alterations were not the same in all brain regions, and in some cases, they even showed opposite trends in different brain regions of the same animals. These results strongly indicate that such alterations are caused by a specific CB1-dependent differential regulation of kinase and phosphatase activities during extinction of fear behavior.

Memory recall caused an increase in p44 phosphorylation and expression of calcineurin in the BLAC and the VPC of CB1^{+/+} as compared with the respective no-tone controls. In contrast, the levels of phosphorylated p44 and calcineurin were significantly reduced in CB1^{-/-} upon tone presentation. These results indicate that an activation of the endogenous cannabinoid system on memory recall affects intracellular signaling cascades in brain regions implicated in acquisition and consolidation of ex-

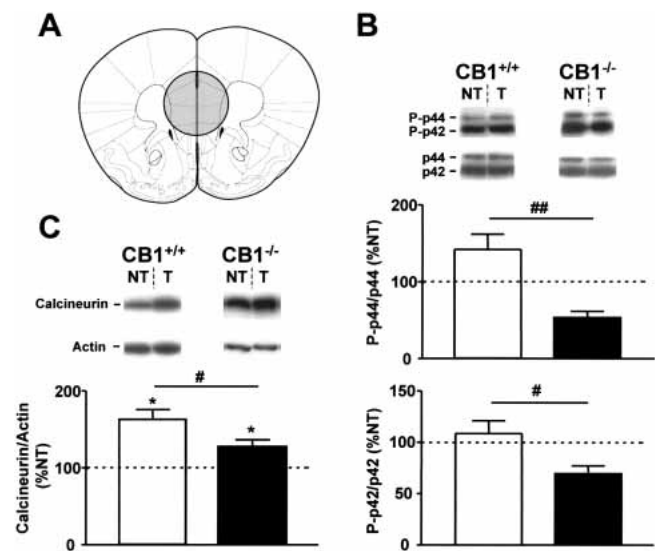


Figure 4 Tone-induced activation of ERKs and calcineurin in the ventromedial prefrontal cortex of CB1^{+/+} and CB1^{-/-} mice. (A) Schematic drawing depicting the dissected area according to Paxinos and Franklin (2001). (B) Levels of phosphorylation of ERKs. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to phosphorylated forms of ERKs (P-p44 and P-p42) and to respective total ERK protein (p44 and p42). (Graphs) Densitometric quantification of tone-induced p44 and p42 ERK phosphorylation in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). (C) Levels of calcineurin expression. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to calcineurin and to respective actin. (Graph) Densitometric quantification of tone-induced calcineurin expression in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). $N = 7-11$ per group. Data expression and symbols are as in Figure 2.

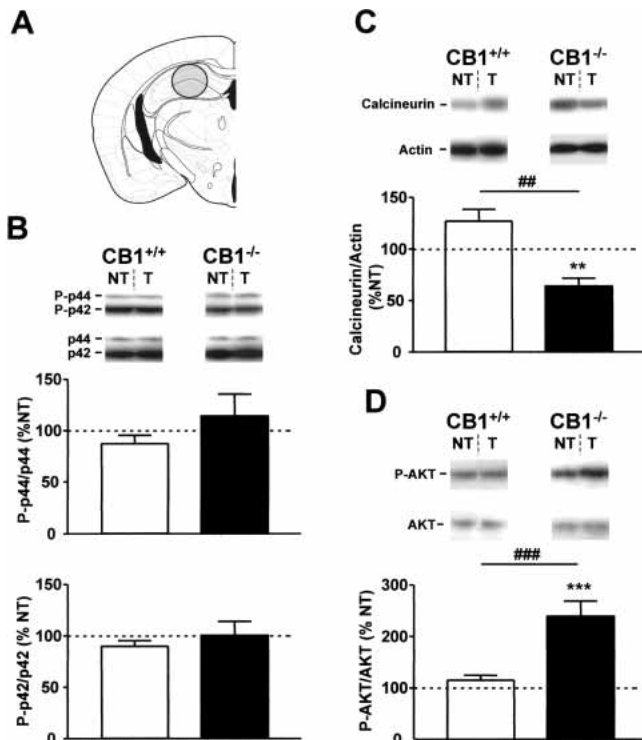


Figure 5 Tone-induced activation of ERKs, calcineurin, and AKT in the dorsal hippocampus of CB1^{+/+} and CB1^{-/-} mice. (A) Schematic drawing depicting the dissected area according to Paxinos and Franklin (2001). (B) Levels of phosphorylation of ERKs. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to phosphorylated forms of ERKs (P-p44 and P-p42) and to respective total ERK protein (p44 and p42). (Graphs) Densitometric quantification of tone-induced p44 ERK (top graph) and of p42 ERK (bottom graph) phosphorylation in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (average: 100%, dotted line). (C) Levels of calcineurin expression. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to calcineurin and to respective actin. (Graph) Densitometric quantification of tone-induced calcineurin expression in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (average: 100%, dotted line). (D) Levels of phosphorylation of AKT. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to phosphorylated form of AKT (P-AKT) and to respective total AKT protein (AKT). (Graph) Densitometric quantification of tone-induced AKT phosphorylation in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). Data expression and symbols are as in Figure 2. (***) $P < 0.001$.

tion behavior (Milad and Quirk 2002; Myers and Davis 2002; Lin et al. 2003b; Quirk et al. 2003). These data are in agreement with the increased levels of endocannabinoids in the BLAC of wild-type mice immediately after a tone presentation (Marsicano et al. 2002). In the same study, we failed to detect significant changes in endocannabinoid levels in the medial prefrontal cortex (Marsicano et al. 2002). It remains to be determined whether recall of the fear memory increases endocannabinoid levels specifically in the infralimbic cortex, which was carefully targeted in the present study, because of its selective involvement in extinction as compared with surrounding areas (Milad and Quirk 2002). Alternatively, it might be that activation of the endogenous cannabinoid system in regions functionally connected with VPC, such as the amygdala (Garcia et al. 1999), induces alterations in intracellular signaling pathways in this brain region.

Interestingly, the effects of tone presentation on activation of kinases and calcineurin in CE were opposite to those in the

BLAC and VPC. Higher relative levels of p44 ERK phosphorylation and calcineurin expression in the CE of CB1^{-/-} as compared with CB1^{+/+} littermates accompanied memory recall during extinction training. These observations support the proposed reciprocal activity of BLAC and VPC as compared with CE during extinction (Royer and Paré 2002; Quirk et al. 2003).

Extinction training also induced differential activation of calcineurin and AKT in the DH of CB1^{-/-} as compared with CB1^{+/+} littermates. The hippocampus is generally considered not to be involved in acquisition of cued fear memory (LeDoux 2000). However, it seems to play a role in extinction, possibly in relation to processing of contextual components of this phase of learning (Corcoran and Maren 2001; Hobin and Maren 2003). Moreover, recall of the fear memory was shown to be accompanied by an increased neuronal activity in the CA1 region of the DH (Tang et al. 2003). Our data support the notion of an involvement of the hippocampus in extinction of tone-induced fear behavior, as they suggest an interaction between the endogenous cannabinoid system and intracellular signaling cascades in this brain region.

Some common features of the dysregulation of extinction-induced kinase and phosphatase activity become apparent in CB1^{-/-}, regardless of the brain region examined. In BLAC, VPC, and CE, the activity of ERK corresponds to the expression of calcineurin, with lower levels in the BLAC and the VPC, and higher levels in the CE, respectively. This observation is in agreement with the recently proposed regulation of calcineurin protein synthesis by ERKs during extinction of acquired fear behavior (Lin et al. 2003b). A regulation of ERKs activity by calcineurin via the tyrosine phosphatase STEP was recently shown in primary

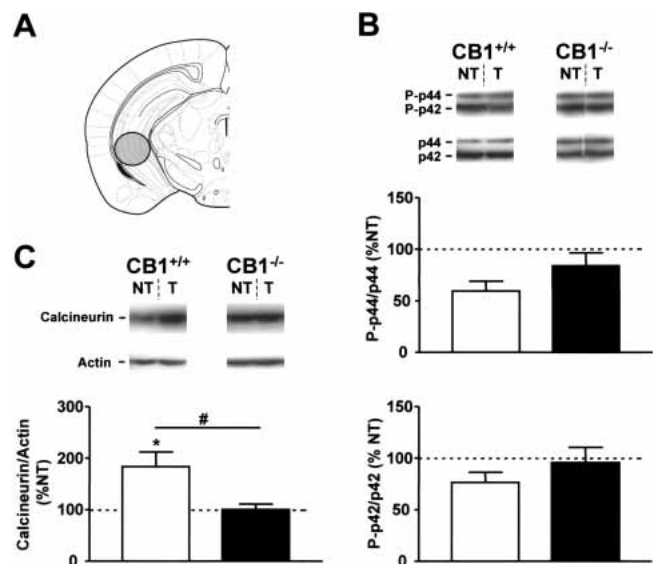


Figure 6 Tone-induced activation of ERKs and calcineurin in the ventral hippocampus of CB1^{+/+} and CB1^{-/-} mice. (A) Schematic drawing depicting the dissected area according to Paxinos and Franklin (2001). (B) Levels of phosphorylation of ERKs. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to phosphorylated forms of ERKs (P-p44 and P-p42) and to respective total ERK protein (p44 and p42). (Graphs) Densitometric quantification of tone-induced p44 and p42 ERK phosphorylation in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). (C) Levels of calcineurin expression. (Photographs) Western immunoblots showing bands corresponding to calcineurin and to respective actin. (Graph) densitometric quantification of tone-induced calcineurin expression in CB1^{+/+} (open bars) and CB1^{-/-} mice (filled bars), relative to respective no-tone mice (100%, dotted line). $N = 7-11$ per group. Data expression and symbols are as in Figure 2.

neuronal cultures (Paul et al. 2003). Therefore, by regulating both ERKs and calcineurin activities, the endogenous cannabinoid system might contribute to the reciprocal regulation between phosphorylation and dephosphorylation processes during extinction of aversive memories.

The exact mechanisms of how the activation of the endogenous cannabinoid system during memory recall with its subsequent effects on kinases and phosphatases leads to memory extinction are not known. In general, endocannabinoids might exert their effects on extinction via their participation either in the formation of an inhibitory association between CS and US (Myers and Davis 2002) or via the weakening of the original memory traces of the associative and nonassociative memory components or via habituation-like processes (McSweeney and Swindell 2002; Lin et al. 2003b).

In recent years, evidence has been accumulating that retrograde endocannabinoid signaling plays a pivotal role in distinct forms of synaptic plasticity at inhibitory GABAergic synapses, such as depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampus (DSI) (Wilson and Nicoll 2001; Alger 2002) and long-term depression of inhibitory postsynaptic currents in hippocampus (I-LTD) (Chevalleyre and Castillo 2003) and amygdala (LTD; Marsicano et al. 2002; S.C. Azad, K. Monory, G. Marsicano, B.F. Cravatt, B. Lutz, W. Zieglgänsberger, G. Rammes, in prep.). These forms of synaptic depression of inhibitory currents were shown to facilitate long-term potentiation of excitatory transmission in specific pathways in the hippocampus (Carlson et al. 2002; Chevalleyre and Castillo 2003) and in the amygdala (S.C. Azad, K. Monory, G. Marsicano, B.F. Cravatt, B. Lutz, W. Zieglgänsberger, G. Rammes, in prep.). Therefore, activation of the endogenous cannabinoid system during extinction training might participate in active potentiation of selected neural circuits coding for new information (extinction learning). In fact, the CB1-dependent activation of ERKs and AKT, as observed in this study, might occur in specific extinction-encoding neuronal pathways that might be potentiated by the nonreinforced CS presentation. In this context, it would be interesting to verify whether endocannabinoid-dependent forms of synaptic plasticity, such as DSI, I-LTD, and LTD_i involve the activation of similar intracellular pathways. If endocannabinoids indeed mediate memory extinction via the formation of new memories, it is interesting to note that these new memories are likely to be mediated by specific extinction-induced mechanisms, as acquisition and consolidation of fear memories do not involve the activation of the endogenous cannabinoid system (Marsicano et al. 2002).

Expression and extinction of conditioned fear in mice seems to be critically determined by sensitization and habituation mechanisms (K. Kamprath and C.T. Wotjak, in prep.), pointing to the possibility that the endogenous cannabinoid system might modulate such processes (C.T. Wotjak, unpubl.). In this context, in addition to participating in the formation of new extinction learning, activation of the endogenous cannabinoid system during recall of aversive memories might contribute to the weakening of the original memory trace, which was proposed to partly mediate extinction processes (e.g., Lin et al. 2003b). At synaptic levels, calcium influx appears to play a central role in the regulation of intracellular kinases and phosphatases, with higher levels predominantly stimulating kinases and lower levels stimulating phosphatases (Winder and Sweatt 2001). Stimulation of CB1 receptors is well known to decrease intracellular calcium influx (Howlett et al. 2002). Therefore, it is conceivable that CB1-mediated modulation of calcium influx, as induced by NMDA receptors and/or voltage-gated calcium channels (Cain et al. 2002; Falls et al. 1992), might represent a coincidence factor able to bias intracellular cascades toward activation of phosphatase pathways (Winder and Sweatt 2001; Mansuy 2003). Therefore,

the combined action of CB1 receptors and of calcineurin might specifically participate in the regulation of synaptic activity during extinction. In this context, it will be interesting to investigate in more detail the mechanism(s) of the control of calcineurin expression by CB1 receptors activation both in behaving animals (e.g., during extinction of fear) and in cellular models of neuronal plasticity.

Altogether, the present data and previous work suggest that the endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories by different means. On the one hand, it might facilitate the formation of new extinction memories by the potentiation of selective neuronal circuits via stimulation of kinases and facilitation of cell-specific forms of long-term potentiation of glutamatergic transmission. On the other hand, it might participate in the extinction-induced weakening of transmission along the circuits previously potentiated by acquisition of fear memory via stimulating calcineurin expression, regulating ion channels, and modulation of long-term plasticity of glutamatergic synaptic transmission. The manipulation of the endogenous cannabinoid system represents a powerful tool for the study of basic mechanisms of extinction processing and might provide a unique target for treatment of diseases characterized by altered modulation of fear.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male CB1^{+/+} and CB1^{-/-} littermates (8 to 14 wk old; F₆ generation back-crossed to C57BL/6NCRl mice) were used for the experiments. The generation of the mouse mutant line has been previously described (Marsicano et al. 2002). Mice were housed individually under an inverse 12:12 h light/dark cycle (lights off: 08:00 h) for at least 2 wk before starting the experiments. Experiments were performed in the dark phase (i.e., the active phase of the animals). Experimental procedures were approved by the Committee on Animal Health and Care of local Government.

Behavioral Procedures

For conditioning (d0, Fig. 1A), animals were placed into conditioning chambers (MED Associates). After 3 min, a 20-sec tone (9 kHz, 80 dB) was presented that coterminated with a 2-sec electric footshock (0.7 mA). Animals were returned to their home cages 60 sec after shock application. A total of 24 h after conditioning (d1, Fig. 1A), animals were placed into transparent Plexiglas cylinders that differed from the conditioning context in shape, material, bedding, and cleaning solution, and a 3-min tone was presented 3 min later (extinction trial, tone groups). Animals were returned to their home cages after another 60 sec. Control mice were conditioned as described above and placed in the same cylinder for the same amount of time at d1, but without tone presentation (no-tone groups). All animals belonging to the no-tone groups and about half of the animals of the tone groups were sacrificed 30 min after the end of the tone (or equivalent time in cylinder, Fig. 1A), and the brains were quickly removed and frozen on dry ice (Fig. 1A). The remaining tone animals of both genotypes were left in their home cage for 5 d, and then exposed again to a tone in the test context (d6, Fig. 1A). The animals' behavior was videotaped at day 1 and day 6. Freezing behavior (defined as the absence of all movements except for respiration) was quantified off-line by trained observers blind to genotype over the course of the entire tone presentation (tone groups) and the respective time in the test context (no-tone controls).

Isolation of Brain Regions

Brain regions were punched from the frozen brains using a cryocut and cylindrical brain punches (Fine Science Tools; internal diameter 2.0 mm for VPC, 1.0 mm for DH and VH, and 0.8 mm for BLAC and CE, respectively). The location and length of the punches were chosen on the basis of a stereotaxic atlas (Paxinos

and Franklin 2001) as follows: 1.2 mm for BLAC (starting at 0.8 mm posterior to bregma; including the whole basolateral amygdaloid nucleus and part of lateral and basomedial amygdaloid nuclei, Fig. 2A); 1.2 mm for CE (starting at 0.8 mm posterior to bregma; including the whole central nucleus of amygdala and part of amygdalostriatal transition area, of medial amygdaloid nucleus and of the intra-amygdaloid division of the bed nucleus of the stria terminalis, Fig. 3A); 1.4 mm for VPC (starting at 2.5 mm anterior to bregma; including the whole prelimbic and infralimbic cortices, and part of the medial orbital and cingulate cortices, Fig. 4A); 1.2 mm for DH (starting at 1.6 mm posterior to bregma; including dentate gyrus, CA1, and part of CA3 hippocampal regions, Fig. 5A); 1.2 mm for VH (starting at 2.5 mm posterior to bregma; including DG, CA1, and CA3 hippocampal regions, Fig. 6A). After punching, the actual site of dissection was checked by histological analysis of cresyl violet-stained sequential sections. Punches not corresponding to the expected anatomical region were excluded from further analysis. Brain punches were kept frozen at -80°C until processing for Western blot analysis.

Western Blot Analysis

Brain samples were homogenized, suspended in protease inhibitor solution (complete Mini TM EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets in H_2O ; Roche Diagnostics) containing phosphatase inhibitors (phosphatase inhibitor cocktails I and II, Sigma), and sonicated. Protein contents were determined by Bradford assay. Sample buffer was added immediately and samples were aliquoted and stored at -80°C . The aim of this study was to analyze the differential effect of extinction training on the levels of phosphorylation of ERKs and AKT and of expression of calcineurin in different brain regions of $\text{CB1}^{-/-}$ and $\text{CB1}^{+/+}$, respectively. As basal differences in expression between genotypes were not the focus of the present study, samples from a given brain structure of all tone and no-tone animals of the same genotype were loaded onto the same gel in order to allow direct comparison of band intensities. A total of 10 or 20 μg of sample were boiled for 5 min, electrophoresed on a 10% SDS-polyacrylamide gel and then blotted electrophoretically to Immobilon-P (Millipore). Blots were blocked in TBST (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, at pH 7.6) containing 5% fat-free milk powder, for 1 h at room temperature. Blots were incubated with rabbit polyclonal anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; 1:1000; #9101; Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-phospho-AKT (Ser473; 1:1000, #9271, Cell Signaling), and mouse monoclonal anti-calcineurin (1:1000, #610260, BD Biosciences) antibodies, diluted in 5% fat-free milk powder in TBST overnight at 4°C . After washing, the blots were incubated with appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:2000 in TBST containing 5% fat-free milk powder; DAKO) and developed using the enhanced chemoluminescence method (ECL+plus, Amersham). After stripping (in 2% SDS, 50 mM DTT, 50 mM Tris/HCl at pH 7.0 for 30 min at 70°C), the blots previously probed with anti-phospho-ERKs were incubated with a polyclonal antibody anti-ERK1/2 (total ERKs, 1:1000; #9102; Cell Signaling), the ones previously probed with anti-phospho-AKT, with a polyclonal anti-AKT antiserum (total AKT, 1:1000; #9272; Cell Signaling), and the ones previously probed with anti-calcineurin, with a mouse monoclonal anti-actin antibody (1:20,000, #MAB1501, Chemicon Intl.). Densitometric analysis of bands was performed using the Quantity One software (BioRad).

Data Analysis and Statistics

Behavioral data were normalized to 20-sec observation intervals. Relative phospho-ERKs levels were calculated by normalizing densitometric values of phospho-ERKs bands (P-p44 and P-p42) to the corresponding total ERKs (p44 and p42) values. Relative phospho-AKT (P-AKT) levels were calculated by normalizing densitometric values of phospho-AKT bands to the corresponding total AKT values. Relative calcineurin levels were calculated by normalizing densitometric values of calcineurin bands to the corresponding actin values. Data for each genotype were expressed

as the percentage of the averaged values in no-tone controls of the same genotype (relative tone-induced values).

The freezing responses of $\text{CB1}^{-/-}$ and $\text{CB1}^{+/+}$ with and without tone presentation were compared by a 3-way ANOVA (Genotype, Tone, Interval) for repeated measures (Interval) for day 1 and by a 2-way ANOVA (Genotype, Interval) for repeated measures (Interval) for day 6, followed by Newman-Keuls post-hoc tests. Data of the Western blots were analyzed by Student's *t*-test, comparing tone versus no-tone values for each genotype and relative tone-induced values between genotypes. *P* values <0.05 were considered to be statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Wölfel and A. Mederer for excellent technical help, P. Weber for advice in computer graphics, and Drs. K. Monory and F. Massa for fruitful comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (D.F.G.) (LU755/1-3), the Volkswagen Foundation (I/78 560), and by a scholarship from the Hertie Foundation (to B.L.).

REFERENCES

- Alger, E. 2002. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.* **68**: 247–286.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourri, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., LeFur, G., and Casellas, P. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.* **312**: 637–641.
- Cain, C.K., Blouin, A.M., and Barad, M. 2002. L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J. Neurosci.* **22**: 9113–9121.
- Carlson, G., Wang, Y., and Alger, B.E. 2002. Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **5**: 723–724.
- Chevalyere, V. and Castillo, P.E. 2003. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: A novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* **38**: 461–472.
- Clark, A.J., Feldon, J., and Rawlins, J.N. 1992. Aspiration lesions of rat ventral hippocampus disinhibit responding in conditioned suppression or extinction, but spare latent inhibition and the partial reinforcement extinction effect. *Neuroscience* **48**: 821–829.
- Corcoran, K.A. and Maren, S. 2001. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J. Neurosci.* **21**: 1720–1726.
- Davis, M. and Whalen, P.J. 2001. The amygdala: Vigilance and emotion. *Mol. Psychiatry* **6**: 13–34.
- Derkinderen, P., Valjent, E., Toutant, M., Corvol, J.C., Enslin, H., Ledent, C., Trzaskos, J., Caboche, J., and Girault, J.A. 2003. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci.* **23**: 2371–2382.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. 1998. Endocannabinoids: Endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* **21**: 521–528.
- Falls, W.A., Miserendino, M.J., and Davis, M. 1992. Extinction of fear-potentiated startle: Blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J. Neurosci.* **12**: 854–863.
- Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., and Guzman, M. 2002. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol. Pharmacol.* **62**: 1385–1392.
- Garcia, R., Vouimba, R.M., Baudry, M., and Thompson, R.F. 1999. The amygdala modulates prefrontal cortex activity relative to conditioned fear. *Nature* **402**: 294–296.
- Gomez del Pulgar, T., Velasco, G., and Guzman, M. 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* **347**: 369–373.
- Guzman, M., Sanchez, C., and Galve-Roperh, I. 2002. Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol. Ther.* **95**: 175–184.
- Hobin, J.A. and Maren, S. 2003. Hippocampal inactivation eliminates the context-specific firing of lateral amygdala neurons after extinction. *Soc. Neurosci. Abstr.*, New Orleans, LA.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **54**: 161–202.
- LeDoux, J.E. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**: 155–184.

- Lin, C.H., Yeh, S.H., Leu, T.H., Chang, W.C., Wang, S.T., and Gean, P.W. 2003a. Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J. Neurosci.* **23**: 1574–1579.
- Lin, C.H., Yeh, S.H., Lu, H.Y., and Gean, P.W. 2003b. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J. Neurosci.* **23**: 8310–8317.
- Lu, K.T., Walker, D.L., and Davis, M. 2001. Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J. Neurosci.* **21**: RC162–RC166.
- Mansuy, I.M. 2003. Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**: 1195–1208.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., et al. 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**: 530–534.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutierrez, S.O., Van, D., et al. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**: 84–88.
- McSweeney, F.K. and Swindell, S. 2002. Common processes may contribute to extinction and habituation. *J. Gen. Psychol.* **129**: 364–400.
- Milad, M.R. and Quirk, G.J. 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* **420**: 70–74.
- Morgan, M.A., Romanski, L.M., and LeDoux, J.E. 1993. Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* **163**: 109–113.
- Myers, K.M. and Davis, M. 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* **36**: 567–584.
- Paul, S., Nairn, A.C., Wang, P., and Lombroso, P.J. 2003. NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nat. Neurosci.* **6**: 34–42.
- Paxinos, G. and Franklin, K.B.J. 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Piomelli, D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**: 873–884.
- Quirk, G.J., Likhtik, E., Pelletier, J.G., and Paré, D. 2003. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J. Neurosci.* **23**: 8800–8807.
- Rescorla, R.A. 2001. Experimental extinction. In *Handbook of contemporary learning theories* (eds. R.R. Mowrer and S. Klein), pp. 119–154. Erlbaum, Mahawah, NJ.
- Royer, S. and Paré, D. 2002. Bidirectional synaptic plasticity in intercalated amygdala neurons and the extinction of conditioned fear responses. *Neuroscience* **115**: 455–462.
- Royer, S., Martina, M., and Paré, D. 1999. An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J. Neurosci.* **19**: 10575–10583.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., and Kida, S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* **24**: 4787–4795.
- Tang, J., Wagner, S., Schachner, M., Dityatev, A., and Wotjak, C.T. 2003. Potentiation of amygdaloid and hippocampal auditory-evoked potentials in a discriminatory fear-conditioning task in mice as a function of tone pattern and context. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 639–650.
- Valjent, E., Pages, C., Rogard, M., Besson, M.J., Maldonado, R., and Caboche, J. 2001. Delta 9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* **14**: 342–352.
- Walker, D.L. and Davis, M. 2002. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**: 379–392.
- Wilson, R.I. and Nicoll, R.A. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* **410**: 588–592.
- Winder, D.G. and Sweatt, J.D. 2001. Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**: 461–474.

Received April 2, 2004; accepted in revised form August 10, 2004.

Manuskript 2

Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice

Kornelia Kamprath and Carsten T. Wotjak¹

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, AG Neuronale Plastizität / Mausverhalten, D-80804 Munich, Germany

Freezing to a tone following auditory fear conditioning is commonly considered as a measure of the strength of the tone-shock association. The decrease in freezing on repeated nonreinforced tone presentation following conditioning, in turn, is attributed to the formation of an inhibitory association between tone and shock that leads to a suppression of the expression of fear. This study challenges these concepts for auditory fear conditioning in mice. We show that acquisition of conditioned fear by a few tone-shock pairings is accompanied by a nonassociative sensitization process. As a consequence, the freezing response of conditioned mice seems to be determined by both associative and nonassociative memory components. Our data suggest that the intensity of freezing as a function of footshock intensity is primarily determined by the nonassociative component, whereas the associative component is more or less categorical. We next demonstrate that the decrease in freezing on repeated nonreinforced tone presentation following conditioning shows fundamental properties of habituation. Thus, it might be regarded as a habituation-like process, which abolishes the influence of sensitization on the freezing response to the tone without affecting the expression of the associative memory component. Taken together, this study merges the dual-process theory of habituation with the concept of classical fear conditioning and demonstrates that sensitization and habituation as two nonassociative learning processes may critically determine the expression of conditioned fear in mice.

Our current knowledge about the relationship between emotions and learning is largely based on studies using fear conditioning. Fear conditioning has emerged as a leading paradigm to investigate fear memory and its extinction on the behavioral, cellular, and molecular level. Many conclusions drawn from fear-conditioning experiments rely on its associative nature, as fear conditioning is generally regarded as a typical example of classical Pavlovian conditioning (Blair et al. 2001; Maren 2001; Schafe et al. 2001). In classical conditioning, the subject learns about the relationship between two stimuli, an unconditioned stimulus (US), which produces a strong, consistent, overt unconditioned response, and a conditioned stimulus (CS), which on itself produces either no overt response or a weak response usually unrelated to the response that eventually will be learned. In the case of auditory fear conditioning, a tone (CS) is paired with a mild electric footshock (US). After conditioning, presentation of the tone alone elicits a fear reaction, which is measured, for instance, as freezing duration or potentiation of startle response (Davis 2000). Without additional shocks, the fear reaction to the tone decreases on repeated stimulus presentation (extinction). It is generally accepted that this process represents a form of new learning, whereby a second, inhibitory association between CS and US will be formed that suppresses the original fear reaction (for reviews, see Falls 1998; Myers and Davis 2002).

To us, today's view that expression and extinction of conditioned fear are based on associative memory processes appears to be too shortsighted. Decades ago, authors already proposed that the fear response following fear conditioning and extinction training might be partially affected by nonassociative memory components (Harris 1943; Mackintosh 1974, and references therein). On the one hand, very intensive or harmful stimuli (such as the US) may increase the general responsiveness of the

organism even to harmless stimuli (such as the CS) independently from CS-US contingencies, a process called sensitization or pseudoconditioning. On the other hand, extinction of conditioned fear seems to include aspects of habituation (Harris 1943; McSweeney and Swindell 2002). Habituation describes the decrease in responsiveness to a certain stimulus when this stimulus is presented repeatedly or for a prolonged time (Thompson and Spencer 1966). According to the dual-process theory of habituation posted by Groves and Thompson (1970), every encounter of a given stimulus activates two independent processes, habituation in the stimulus-response circuit and sensitization in a general state system. In a recent critical survey of the literature, McSweeney and Swindell (2002) applied this concept to extinction; in their habituation hypothesis of extinction, they state that common processes contribute to extinction and habituation. They demonstrate that behavior undergoing extinction shares numerous fundamental properties with habituation (criteria modified from Thompson and Spencer 1966).

Despite these general arguments for a contribution of non-associative memory processes to expression and extinction of conditioned fear, it is still uncertain whether these processes play a significant role in fear conditioning in mice. With one to three pairings of a tone with a footshock of intermediate intensity, conventional conditioning protocols for mice appear far less aversive than those reported for sensitization or other nonassociative changes in behavioral performance (for reviews, see Korte and de Boer 2003; Wiedenmayer 2004). Therefore, the present study sought to investigate the impact of sensitization and habituation on expression and extinction of conditioned fear exemplarily in C57BL/6JOLA^{Hsd} mice.

The study splits into two parts. The first part characterized the contribution of sensitization to the freezing response of conditioned mice. The second part assessed the extent to which habituation may account for the decrease in freezing on repeated nonreinforced tone presentation to conditioned mice. We refer to procedures with tone-shock pairings as conditioning proce-

¹Corresponding author.

E-mail wotjak@mpipsykl.mpg.de; fax 49-89-30622-610.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.86104>.

dures and with shock-presentation only as sensitization procedures. The term sensitization describes the general increase in responsiveness to potentially harmful stimuli following sensitization procedures. Accordingly, we call mice that underwent sensitization procedures sensitized mice and mice that underwent conditioning procedures conditioned mice. The freezing response of naive (i.e., nonshocked) mice to a tone is called unconditioned freezing. We termed tones that were presented to naive mice CS₀, those presented to sensitized mice CS_n, and those presented to conditioned mice CS₊. The experimental procedures are schematically summarized in the first panel of the figures. Table 1 displays the symbols and abbreviations used in those schemes.

To study the contribution of sensitization to the freezing response of conditioned mice, we first integrated different innate and acquired components that may affect the freezing response to a tone into a general scheme (Fig. 1). According to this scenario, auditory fear conditioning leads to the formation of an associative memory of the tone-footshock contiguity. At the same time, animals might form an association between the footshock and the conditioning context (contextual memory) that could be generalized to a test context (context generalization) (Fanselow 1980; Richardson 2000). On the other hand, the footshock applied during the conditioning procedure may unspecifically sensitize the animals (i.e., lead to the formation of nonassociative memory components), resulting in a general increase in responsiveness to potentially harmful stimuli. Importantly, the influence of sensitization on freezing to the tone would become evident for those CS only, which have the general capacity to reflexly elicit freezing. Therefore, we first demonstrated that the tone has the general capacity to elicit a freezing response in naive mice, and that this response might be potentiated by footshocks as a function of footshock intensity, independently of whether or not the footshocks have been paired with the tone (Experiment 1). To rule out the possibility that this potentiating effect of footshocks simply relates to context generalization, we studied (1) how different footshock intensities affected freezing to the test context without tone presentation (baseline) and during tone presentation (Experiments 1 and 4), and (2) how pre-exposure to the tone or test context before sensitization procedures, conditioning procedures and (re-)exposure to the tone, respectively, affects the subsequent freezing response to the tone (Experiments 4 and 6). In addition, (3) we minimized the contribution of handling to context generalization (Experiments 4 and 6). Finally, (4) we studied the consequences of a single footshock on general changes in animals' emotionality in an environment that was completely different from the conditioning chamber. For this purpose, we compared the behavioral performance of conditioned and sensitized mice in a light-dark test (Experiment 2). We introduced calculations aimed at dissecting the contribution of

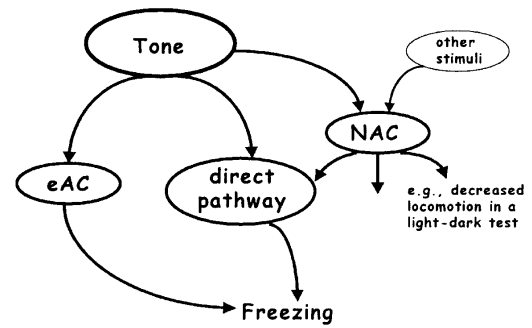


Figure 1. Neural circuits determining freezing to a tone following auditory fear conditioning. There are at least three different neural pathways, which may influence freezing to the tone. Firstly, a tone may reflexly elicit freezing via a direct pathway as a function of the stimulus intensity (unconditioned freezing). Secondly, presentation of a tone together with the footshock eventually leads to the formation of associative memories about the tone-footshock and the conditioning context-footshock contiguity (excitatory associative memory components, eAC). Subsequent tone presentation activates the eAC, and thus triggers a freezing response independently of direct tone effects on freezing. Note-worthy, generalization of the conditioning context to the test context might also influence the freezing response to the tone. Thirdly, an aversive encounter (e.g., electric footshock) leads to an activation of nonassociative memory components (NAC; sensitization). Subsequent nonreinforced tone presentation potentiates the unconditioned response to the tone via this pathway. Note that the NAC affect the processing of various stimuli in an unspecific manner.

associative and nonassociative learning processes to the freezing response to the tone of conditioned mice (Experiment 1).

The second part of the study characterized the contribution of nonassociative memory processes to extinction of conditioned fear. To this end, we compiled different associative and nonassociative memory processes, which may generally account for the decrease in freezing to a tone following its repeated nonreinforced presentation (Fig. 2). First, repeated nonreinforced tone presentation may lead to the formation of an inhibitory associative memory component (Falls 1998; Myers and Davis 2002), which predicts that the tone will not be followed by the punishment anymore and suppresses the expression of the excitatory associative memory (inhibition/masking; Fig. 2A). Second, activation of the excitatory associative memory component may turn it into a labile state, thus leading to reconsolidation (Sara 2000; Nader 2003; Fig. 2B). This process could involve undoing the acquired ability to reconstruct a certain spatiotemporal neuronal state without undoing the connections that have created this acquired state (i.e., deconsolidation/depotentialization) (Dudai 2004). Third, molecular and cellular processes responsible for sensitization might be reversed (desensitization) or might decay with the passage of time (decay) (Fig. 2C). As a consequence, mice should show a general relaxation that is stimulus unspecific. Fourth, habituation processes in the direct tone-freezing pathway may lead to reduced freezing (Fig. 2D). Under these circumstances, the decrease in freezing has to be stimulus specific, as the nonassociative memory components remain activated, but fail to still influence unconditioned freezing to the tone.

As stated before, this study largely focused on the potential role of the nonassociative memory processes in extinction of conditioned fear. Therefore, we first ruled out that the decrease in freezing on re-

Table 1. Symbols and codes used for description of the experimental procedures

Symbol	Code	Description
$(\text{---})_n$		Sensitization procedure (i.e., footshock only), repeated n-times
$(\text{---} \oplus \text{---})_n$		Conditioning procedure (i.e., pairing of tone and footshock), repeated n-times
$\text{---} / \text{---}$		Context exposure without presentation of tone and footshock
$\text{---} \text{---}$	CS _n	Tone exposure to mice following sensitization procedures
$\text{---} \oplus \text{---}$	CS ₊	Tone exposure to mice following conditioning procedures
---	CS ₀	Tone exposure to naive mice

Symbols used for description of the contexts are explained in Table 2.

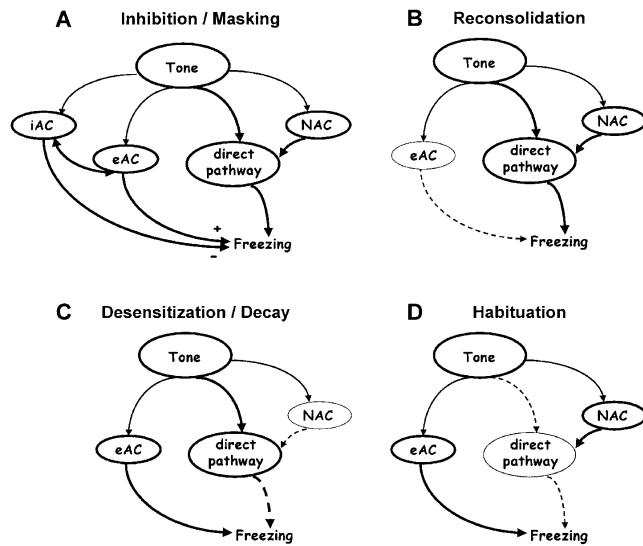


Figure 2. Principles of extinction. The decreased expression of conditioned fear on a second nonreinforced tone presentation to conditioned mice might be attributed to at least four fundamentally different processes that are illustrated by means of the scheme of Figure 1. The thickness of the lines indicates the activity status of a given pathway. (A) Tone presentation after conditioning predicts the occurrence of the footshock. In absence of the expected punishment, conditioned mice eventually form an inhibitory association between tone and shock (iAC). Subsequent tone presentations trigger the iAC to inhibit the expression of excitatory associative memory components (eAC) that had been formed during fear conditioning (cf. Fig. 1). (B) Nonreinforced tone presentations might render the eAC labile again (reconsolidation). As a consequence, the original eAC might not be appropriately retrieved in the future. Under these circumstances, the freezing response to the tone would be determined primarily by nonassociative memory components formed during fear conditioning (NAC; sensitization; cf. Fig. 1). (C) A nonreinforced tone presentation reverses the modifications in the NAC (desensitization). After desensitization, the freezing response to a second nonreinforced tone presentation would be primarily determined by the eAC. Desensitization does not necessarily require tone presentation, but might also be triggered by other stimuli, or even occur spontaneously with the passage of time (decay). The consequences of desensitization are not specific for the freezing response to the tone, but affect also the processing of other stimuli. (D) Habituation in the direct pathway abolishes the potentiating influence of the NAC in a stimulus-specific manner. As a consequence, the freezing response on a second nonreinforced tone presentation is primarily determined by the eAC. Note that the NAC is still activated and might influence the behavioral response to other stimuli. It is likely that the four processes interact at multiple levels and determine extinction of conditioned fear in parallel, depending on the species, strain, and protocols.

peated nonreinforced tone presentation simply relates to decay (Experiment 4) or active reversal of sensitization (i.e., desensitization; Experiment 5). We next confirmed that extinction of conditioned fear shares fundamental properties with habituation processes (Thompson and Spencer 1966; McSweeney and Swindell 2002). Most of the criteria used for the characterization of extinction as the formation of an inhibitory associative memory (i.e., spontaneous recovery, context specificity, reinstatement, renewal) (Myers and Davis 2002), apply also for habituation processes (Groves and Thompson 1970; McSweeney and Swindell 2002). To demonstrate that habituation plays a role in extinction of the freezing response to the tone also in conditioned mice, we focused on those criteria, which can be explained best by habituation (Fig. 2D) rather than by inhibition/masking (Fig. 2A). In this context, we studied (1) whether freezing declines as a negative exponential function of the length of the tone exposure (short-term habituation, Experiment 1), (2) whether habituation

without responding does exist, and (3) whether extinction is similar in conditioned and sensitized mice (i.e., independent of an excitatory associative memory component).

Our data provide evidence that the intensity of the freezing response of mice to a tone following auditory fear conditioning with a few tone-shock pairings is critically determined by sensitization rather than by the strength of the tone-shock association. The decline in freezing on repeated nonreinforced tone presentation, in contrast, apparently involves habituation-like processes.

Results

Experiment 1: Freezing to a tone in naive, sensitized, and conditioned mice

Experiment 1 assessed the reflexive nature of freezing to a tone by exposing naive mice to tones of different intensity. Next, potentiation of this freezing response by a footshock (sensitization) was measured in other groups of mice as a function of footshock intensity. The behavior of sensitized mice was compared with that of conditioned mice in order to estimate the contribution of nonassociative memory components to the expression of conditioned fear.

As a representative example for all experimental groups, we plotted the ethograms of the freezing responses of naive mice, of mice conditioned with a single 0.70-mA shock, and of mice sensitized with a single 0.70-mA shock before (baseline) and during presentation of an 80-dB tone at day 1 (Fig. 3A). The freezing response of the animals was scattered (Fig. 3A) and characterized by bouts of activity (typically associated with a redirection of the head) (K. Kamprath and C.T. Wotjak, unpubl.). To quantify the differences in freezing between the groups, we first analyzed the total freezing response shown during the entire 3-min observation periods before and during tone presentation (Fig. 3B). A two-way ANOVA (Group, Tone presentation) for repeated measures (Tone presentation) revealed significant effects of the two main factors (Group: $F_{(1,27)} = 18.2$, $P < 0.0001$; Tone presentation: $F_{(1,27)} = 34.5$, $P < 0.0001$) as well as a significant factor interaction ($F_{(2,27)} = 23.5$, $P < 0.0001$). Subsequent analysis of group differences by one-way ANOVA, performed separately for baseline and tone presentation, revealed a significantly increased baseline freezing of sensitized mice compared to naive animals ($F_{(2,27)} = 7.2$, $P = 0.003$; CSn > CS0, $P = 0.002$, Newman-Keuls post-hoc test). During tone presentation, conditioned mice showed significantly more freezing than naive and sensitized animals ($F_{(2,27)} = 21.1$, $P < 0.0001$; CS+ > CSn and CS0, $P < 0.001$, Newman-Keuls). Upon first glance, visual inspection of the ethograms suggests group differences between CS+ and CSn during baseline as well as between CSn and CS0 during tone presentation. However, statistical analyses of the data failed to reach significance. Therefore, we decided to analyze the data in shorter observation intervals, which allow us to detect differences in dynamic changes of the freezing response between the three experimental groups. We selected 20 sec as duration of the observation intervals, because this analysis interval corresponds with the duration of tone presentation during conditioning. Using this procedure, separate analyses of baseline and tone freezing by two-way ANOVA (Group, Interval) for repeated measures (Interval) revealed a significant factor interaction both during baseline ($F_{(16,216)} = 4.1$, $P < 0.0001$) and during tone presentation ($F_{(16,216)} = 16.7$, $P < 0.0001$; Fig. 3C). Post-hoc analyses demonstrated significant differences between sensitized versus naive and conditioned mice during the first minute in test context 1. During the subsequent tone presentation, conditioned mice showed significantly more freezing than sensitized and naive mice. Moreover, sensitized mice showed significantly more freez-

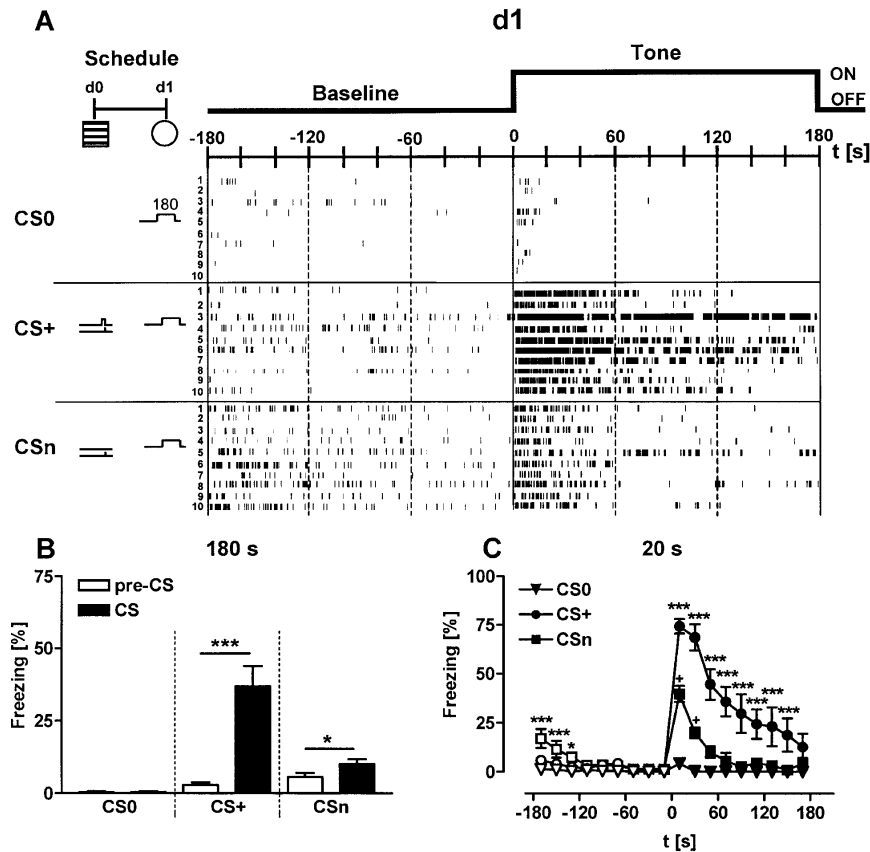


Figure 3. Analysis of freezing behavior. (A) Mice were randomly assigned to three groups. One group remained nonshocked (naive mice). Two groups received a 0.70-mA footshock of 2-sec duration in the conditioning chamber at d0, either in combination with a 20-sec tone (conditioning procedure) or without tone presentation (sensitization procedure). At day 1, all mice were exposed to a 3-min tone (80 dB) in test context 1 (cf. Table 2). Tone presentation was preceded by a 3-min baseline period. The tone was designated CS0 for naive, CS+ for conditioned, and CSn for sensitized mice (cf. Table 1). Freezing before (pre-CS, Baseline) and during tone presentation (CS, Tone) was scored throughout the entire test session by typing preset keys on a computer keyboard. Periods of freezing are indicated for each individual subject ($n = 10$ per group; one subject per row) by black bars (ethogram). The length of the horizontal bars depicts the duration of a given freezing episode. Freezing was interrupted by bouts of activity. Some animals failed to show freezing at all. For statistical purposes, the individual freezing responses have been analyzed (B) as the sum of freezing shown over the entire 180 sec before and during tone presentation, respectively, and (C) in 20-sec intervals (corresponding to the length of CS+ at d0). Apparently, analysis in 20-sec intervals provides more information about the time course of the freezing response. For description of symbols and codes, see Tables 1 and 2. Mean \pm SEM. Statistics for B: (*) $P < 0.05$, (***) $P < 0.001$ (paired t-test). Statistics for C: (*) $P < 0.05$, (***) $P < 0.001$ vs. the two other groups; + $P < 0.05$ vs. CS0 (2-way ANOVA for repeated measures, performed separately for baseline and for tone presentation, followed by Newman-Keuls post-hoc test).

ing during the first 40 sec of tone presentation than naive animals.

We next studied the effects of tone intensity on the freezing response of naive mice (Fig. 4B). As expected, there were no differences in basal freezing between the three groups of naive mice (Group: $F_{(2,27)} = 0.44$, $P = 0.650$; Group \times Interval: $F_{(16,216)} = 0.52$, $P = 0.934$). During the subsequent tone presentation, however, groups differed significantly (Group: $F_{(2,27)} = 22.8$, $P < 0.0001$; Group \times Interval: $F_{(16,216)} = 17.6$, $P < 0.0001$). Post-hoc analyses revealed that increasing the tone intensity from 80 to 95 dB or 98 dB caused an increased freezing during the first 40 sec of tone presentation.

Analysis of the influence of the shock intensity on the freezing response of sensitized mice (Fig. 4C) revealed no significant differences in baseline freezing (Group: $F_{(3,36)} = 1.1$, $P = 0.356$; Group \times Interval: $F_{(24,288)} = 1.4$, $P = 0.119$), but during tone pre-

sentation (Group: $F_{(3,36)} = 7.1$, $P < 0.001$; Group \times Interval: $F_{(24,288)} = 3.5$, $P < 0.0001$). Animals submitted to the strongest sensitization protocol (three 0.70-mA shocks; 0.70–3) showed more freezing than all other groups, whereas animals submitted to the weakest protocol (three 0.40-mA shocks; 0.40–3) showed the lowest freezing response.

Analysis of the influence of the shock intensity on the freezing response of conditioned mice (Fig. 4D) revealed no significant differences in baseline freezing (Group: $F_{(3,36)} = 0.3$, $P = 0.790$; Group \times Interval: $F_{(24,288)} = 0.6$, $P = 0.941$), but during tone presentation (Group: $F_{(3,36)} = 6.6$, $P = 0.001$) with no significant Group \times Interval interaction ($F_{(24,288)} = 0.7$, $P = 0.828$). Post-hoc analysis demonstrated that animals with the strongest conditioning protocol (three 0.70-mA shocks; 0.70–3) showed more freezing than all other groups ($P < 0.05$ vs. 0.70–1, $P < 0.01$ vs. 0.55–3 and 0.40–3).

As revealed by three-way ANOVA (CS, Protocol, Interval) for repeated measures (Interval) for all shock protocols freezing to the tone was significantly more pronounced in conditioned mice than in mice of the respective sensitization group (CS: $F_{(1,72)} = 57.5$, $P < 0.0001$; CS \times Protocol: $F_{(3,576)} = 2.5$, $P = 0.068$).

For all groups (i.e., naive, sensitized, and conditioned mice), the freezing response to the tone decreased toward the end of tone presentation (Interval: $F_{(8,216)} = 83.5$ for CS0, $F_{(8,288)} = 94.0$ for CSn, and $F_{(8,288)} = 117.5$ for CS+, $P < 0.0001$, each). To assess possible differences in the decrement of freezing at day 1, individual data were fitted with a single-exponential decay function (Fig. 5), as recommended for analysis of habituation processes (Petrunovich and Widaman 1984). Except for naive animals exposed to the 80 dB tone (data not shown), and a few animals of the other groups (0–1 animal per group), curve fitting was significant for all mice (Fig. 5A,B,C; $r^2 > 0.94$ for averaged data of each group).

Successful curve fitting allowed us to assess the (theoretical) initial freezing response F_0 and the decay constant τ for each experimental subject. Comparison of F_0 for all experimental groups by one-way ANOVA revealed a significant group difference ($F_{(9,96)} = 2.1$, $P = 0.042$; Fig. 5D), which related to a significantly smaller F_0 in mice sensitized with the weakest shock protocol (three 0.40-mA shocks). All other groups had a similar F_0 of $\sim 100\%$. Comparison of τ , in contrast, revealed a highly significant group difference ($F_{(9,96)} = 8.6$, $P < 0.0001$; Fig. 5E), related to significant differences between conditioned and sensitized mice (CS: $F_{(1,75)} = 28.6$, $P < 0.0001$) and to the shock intensity during conditioning ($F_{(3,36)} = 6.6$, $P = 0.001$; 0.70–3 vs. 0.40–3, $P < 0.001$; 0.70–3 vs. 0.55–3 and 0.70–1, $P < 0.05$) and sensitization procedures ($F_{(3,36)} = 3.3$, $P = 0.033$), respectively. Together, curve fitting with a single-exponential decay function indicates that, except for the weakest sensitization protocol, acute adaptation to the tone is based on similar mechanisms with

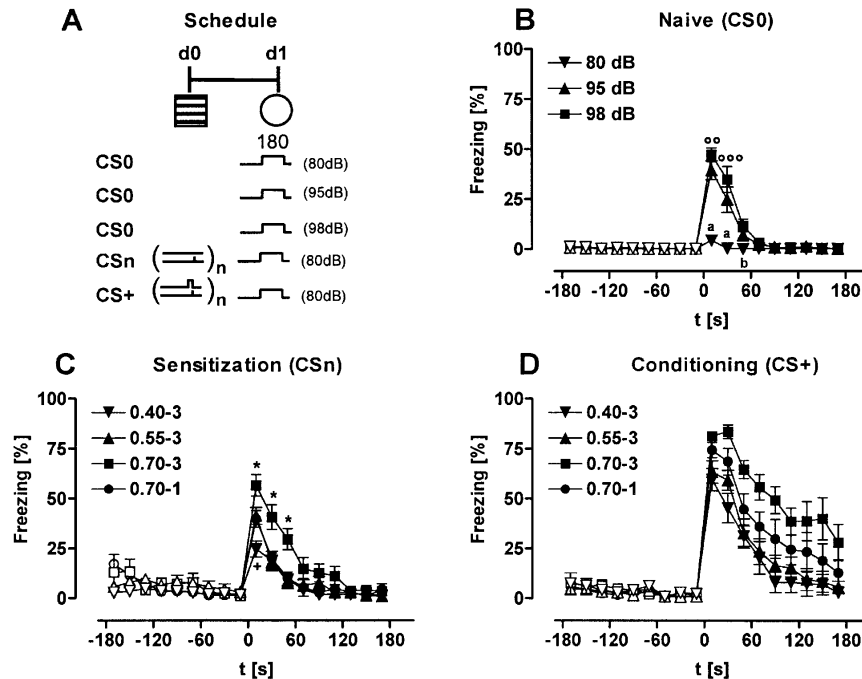


Figure 4. Freezing to a tone in naive, sensitized, and conditioned mice. (A) Mice were randomly assigned to 11 groups ($n = 10$, each). Three groups of naive mice were exposed to 3-min tones of different intensity in test context 1. Four groups were sensitized in the conditioning chamber with 1 or 3 footshocks of different intensities (0.40, 0.55, or 0.70 mA). Four groups were conditioned with 1 or 3 tone-shock pairings in the conditioning chamber with shock intensities of 0.40, 0.55, or 0.70 mA. Group codes indicate shock intensity (first part) and number of shocks (second part). All sensitized and conditioned mice were exposed to a 3-min tone (80 dB) in test context 1 at day 1. Freezing of (B) naive, (C) sensitized, and (D) conditioned mice was analyzed in 20-sec intervals during the 3-min baseline period preceding tone presentation (open symbols) and during the 3-min tone presentation (filled symbols) and normalized to the analysis interval. Mice sensitized with three 0.55-mA shocks (0.55-3) or a single 0.70 mA shock (0.70-1) showed a similar freezing response to the tone, resulting in overlapping curves. The groups (1) naive mice with an 80-dB tone, and (2) sensitized, or (3) conditioned mice with a single 0.70-mA shock (0.70-1) are the same as in Figure 3. For description of symbols and codes, see Tables 1 and 2. Mean \pm SEM. (°) $P < 0.01$; (°°) $P < 0.001$ vs. 95 dB; (*) $P < 0.001$ vs. the two other groups; (°) $P < 0.05$ vs. 98 dB; (*) $P < 0.05$ vs. all other groups; (+) $P < 0.05$ vs. 0.55-3 and 0.70-1 (2-way ANOVA for repeated measures, performed separately for baseline and for tone presentation, followed by Newman-Keuls post-hoc test).

similar initial freezing responses, but differences in the decay of freezing. Furthermore, curve fitting reveals that the decrement of freezing has the steepest slope within the first 60 sec of tone presentation, reaching asymptotic levels with ongoing tone presentation. Thus, in support of our analysis of the ethograms shown in Figure 3, the first 60 sec of tone presentation contain most of the relevant information about an animal's freezing response.

If one compares the freezing responses of the conditioned and sensitized mice during the first 60 sec of tone presentation, a two-way ANOVA (Procedure, Shock Intensity) reveals general differences in the amount of freezing related to Procedure ($F_{(1,72)} = 121.3$, $P < 0.0001$) and Shock Intensity ($F_{(3,72)} = 16.7$, $P < 0.0001$). However, there was no significant factor interaction ($F_{(3,72)} = 0.8$, $P = 0.515$), indicating that the shock intensity influences freezing to the tone in conditioned and sensitized mice in a similar manner (Fig. 6A).

If the shock alone modulates the animals' freezing to the tone, this nonassociative learning process may also occur during conditioning, as we observe a similar modulation in conditioned mice. Thus, the freezing response following conditioning may be composed of memory of the tone-shock association and a non-associative sensitization memory component coding for the

shock intensity. We isolated the freezing response, which relates to the associative memory component, by subtracting from each conditioned mouse the mean freezing response of the respective sensitization group. After this calculation, differences between the conditioning groups seen at day 1 ($F_{(3,36)} = 8.0$, $P < 0.001$; Fig. 6A) disappeared ($F_{(3,36)} = 1.1$, $P = 0.341$; Fig. 6B), leaving an associative memory component independent from the shock intensity. Information about the shock intensity seems to be stored by the nonassociative memory component (i.e., by sensitization; Fig. 6C).

Experiment 2: Effects of conditioning and sensitization procedures on behavioral performance in the light-dark test

Experiment 2 addressed the question as to whether or not sensitization and conditioning procedures have similar consequences on the fear response measured in a completely novel test situation with light as the dominant aversive stimulus. To this end, naive, conditioned, and sensitized mice were tested in a light-dark avoidance task (Fig. 7A). Detailed analysis of the behavioral parameters in 3-min intervals by two-way ANOVA (Group, Interval) for repeated measures (Interval) revealed significant differences between naive, conditioned, and sensitized mice in horizontal locomotion (Group: $F_{(2,33)} = 30.0$, $P < 0.0001$; Group \times Interval: $F_{(18,297)} = 2.6$, $P < 0.001$; Fig. 7B), rearings (Group: $F_{(2,33)} = 26.8$, $P < 0.0001$; Group \times Interval: $F_{(18,297)} = 1.6$, $P = 0.067$; Fig. 7C) and resting time (Group: $F_{(2,33)} = 14.7$, $P < 0.0001$; Group \times Interval: $F_{(18,297)} = 1.2$, $P = 0.240$; Fig. 7D). There were no significant differences between the three groups in the relative time spent in the dark compartment (Group: $F_{(2,33)} = 2.9$, $P = 0.066$; Group \times Interval: $F_{(18,297)} = 0.9$, $P = 0.596$; Fig. 7E) and the relative distance traveled in the dark compartment (Group: $F_{(2,33)} = 1.4$, $P = 0.258$; Group \times Interval: $F_{(18,297)} = 0.7$, $P = 0.822$; Fig. 7F). Post-hoc analyses revealed that significant group differences always related to differences between naive animals versus conditioned and sensitized animals, with no differences between the latter two. This observation indicates that in conditioned mice, the shock not only mediates associative memory of the tone-shock pairing, but also affects the fear response in a nonassociative manner, similar to sensitized mice.

Our failure to detect significant differences in the two parameters time in dark and distance in dark likely relates to the high variability in the behavioral performance of conditioned and sensitized mice. Therefore, we additionally analyzed the consequences of sensitization and conditioning procedures on the adaptation to the light separately per group by one-way ANOVAs for repeated measures (Interval). Naive mice adapted to the light over the course of the 30-min exposure (Time in Dark: $F_{(9,99)} = 6.1$, $P < 0.0001$; Distance in Dark: $F_{(9,99)} = 5.5$, $P < 0.0001$) to finally reach chance levels that indicate that the mice equally explored the lit and the dark compartment (Fig. 7E,F). In contrast, neither sensitized (Time in Dark: $F_{(9,99)} = 1.4$,

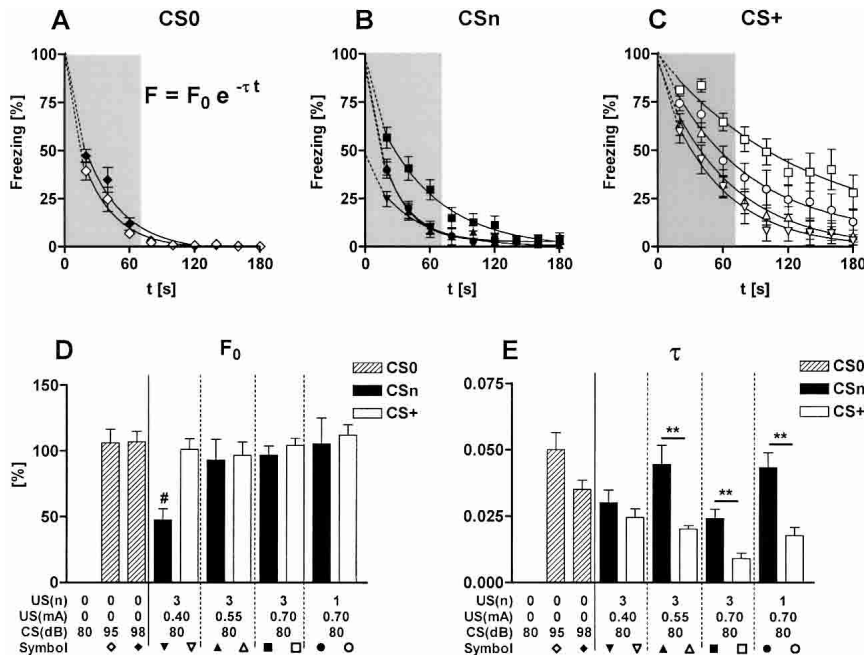


Figure 5. Freezing shows a single-exponential decay over the course of a 3-min tone presentation at day 1. Data of Figure 4 were fitted with the single-exponential decay function $F(t) = F_0 * e^{-\tau t}$, with $F(t)$ representing the actual freezing response at a given time point t , F_0 representing the initial freezing response and τ representing the decay constant. (A) Curve fitting for the freezing responses to tones of either 95 or 98 dB (CS0) measured in naive mice. Freezing responses to an 80-dB tone could not be fitted with the decay function. (B) Curve fittings for the freezing responses to an 80-dB tone (CSn) measured in sensitized mice. (C) Curve fittings for the freezing responses to a 80-dB tone (CS+) measured in conditioned mice. The freezing response showed the steepest decay during the first minute of tone presentation (gray area), reaching asymptotic levels toward the end of tone presentation. (D) The initial freezing response F_0 and (E) the decay constant τ were calculated separately for each individual animal and averaged per group (mean \pm SEM). Sensitization and conditioning groups with the same number [US(n)] and intensity [US(mA)] of the footshocks are plotted adjacently. A small number of animals had to be excluded from analysis, as the individual curve fitting failed to reach statistical significance. Therefore, the resulting sample sizes were 9 or 10 of 10 per group. (#) $P < 0.01$ vs. all other groups (ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test); (**) $P < 0.01$ (Student's t-test).

$P = 0.187$; Distance in Dark: $F_{(9,99)} = 1.1$, $P = 0.366$), nor conditioned mice (Time in Dark: $F_{(9,99)} = 0.7$, $P = 0.729$; Distance in Dark: $F_{(9,99)} = 0.6$, $P = 0.824$) showed a similar adaptation to the light (Fig. 7E,F).

Experiment 3: Freezing of sensitized and conditioned mice on repeated tone presentation

Experiment 3 studied long-term changes in the freezing response to a tone. Conditioned and sensitized mice of Experiment 1 were exposed to the 3-min tone for a second time 6 d after the first tone presentation (Fig. 8A). As revealed by a three-way ANOVA (Protocol, Interval, Day) for repeated measures (Interval, Day), conditioned mice showed a general decrease in freezing from day 1 to day 7 (Day: $F_{(1,36)} = 74.5$, $P < 0.0001$; Fig. 8B) and a significant factor interaction ($F_{(3,36)} = 9.3$, $P < 0.0001$), indicating that the group differences relating to different conditioning protocols at day 1 (Experiment 1; Fig. 8B, d1) disappeared at day 7 (Fig. 8B, d7). This conclusion was verified by a two-way ANOVA (Protocol, Interval) for repeated measures (Interval) which failed to reveal a significant effect of Protocol ($F_{(3,36)} = 1.0$, $P = 0.403$) or a significant factor interaction ($F_{(24,288)} = 1.5$, $P = 0.078$) for day 7. Sensitized mice also showed a decrease in freezing at day 7 compared with day 1 (Day: $F_{(1,36)} = 34.2$, $P < 0.0001$; Fig. 8C). Again, there was a significant factor interaction ($F_{(3,36)} = 9.3$, $P < 0.0001$), re-

lating to the disappearance of the group differences from day 1 (Experiment 1; Fig. 8C, d1) at day 7 (Protocol: $F_{(3,36)} = 1.5$, $P = 0.221$; Protocol \times Interval: $F_{(24,288)} = 0.7$, $P = 0.865$; Fig. 8C, d7).

Conditioned mice showed, in general, more spontaneous recovery of their freezing response from day 1 to day 7 than sensitized mice (CS: $F_{(1,72)} = 52.2$, $P < 0.0001$), independent of the conditioning and sensitization protocols [Protocol: $F_{(3,72)} = 1.1$, $P = 0.373$; CS \times Protocol: $F_{(3,72)} = 0.1$, $P = 0.979$; 2-way ANOVA (CS, Protocol); Fig. 8D]. One-way ANOVAs confirmed that spontaneous recovery was similar for all sensitized ($F_{(3,36)} = 1.0$, $P = 0.418$), and conditioned mice ($F_{(3,36)} = 0.4$, $P = 0.777$), respectively (Fig. 8D).

Experiment 4: Temporal decay of sensitization and context-dependency of extinction

In the first experimental series (Fig. 9A), repeated tone presentation to sensitized mice resulted in a significantly decreased freezing response to the tone at day 7 compared with day 1 [Day: $F_{(1,8)} = 18.1$, $P = 0.003$; Day \times Interval: $F_{(8,64)} = 9.0$, $P < 0.0001$; 2-way ANOVA (Day, Interval) for repeated measures (Day, Interval); Fig. 9B]. To exclude the possibility that this decrease in freezing from day 1 to day 7 simply relates to temporal decay of sensitization, a second group of mice had remained undisturbed in their home cages after the sensitization procedure, and had been exposed to the tone for the first time at day 7. Mice of this group showed a more pronounced freezing response to the tone than animals of the first group did at day 1 (Group: $F_{(1,16)} = 4.6$, $P = 0.048$; Group \times Interval: $F_{(8,128)} = 1.2$, $P = 0.317$) and, in particular, at day 7 [Group: $F_{(1,16)} = 18.7$, $P = 0.0005$; Group \times Interval: $F_{(8,128)} = 4.3$, $P = 0.0001$; 2-way ANOVA (Group, Interval) for repeated measures (Interval); Fig. 9B]. These data indicate that the decrease in freezing to the tone from day 1 to day 7 requires tone presentation at day 1, and cannot simply be ascribed to decay processes.

To assess the contribution of context generalization to the freezing response to the tone, a third group of mice was familiarized with the test context at day 1 without tone presentation and exposed to the tone in the same test context at day 7. At day 1, mice without tone presentation in the test context froze significantly less than mice with tone presentation (Group: $F_{(1,16)} = 24.7$, $P = 0.0001$; Group \times Interval: $F_{(8,128)} = 11.8$, $P < 0.0001$; Fig. 9B). Exposure to the test context without tone presentation failed to affect freezing to the tone at day 7, as the animals of this group froze at similarly high levels as mice that had remained undisturbed in their home cages after the sensitization procedure (Group: $F_{(1,16)} = 0.0$, $P = 0.953$; Group \times Interval: $F_{(8,128)} = 0.7$, $P = 0.648$; Fig. 9B), indicating that familiarization with the test context had no influence on the freezing response to the tone.

In the second experimental series (Fig. 9C), we investigated whether experimental handling during the sensitization procedure might have contributed to context generalization and thus,

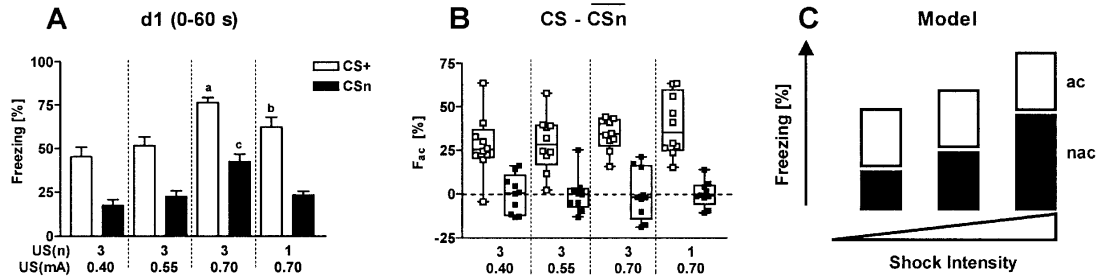


Figure 6. Nonassociative, rather than associative memory components define the intensity of freezing to the tone following conditioning. (A) Freezing response during the first 60 sec of tone presentation at day 1 (mean \pm SEM), measured in the same sensitized (CSn) and conditioned mice (CS+) as shown in Figures 4 and 5. Sensitization and conditioning groups, respectively, differed by the number [US(n)] and intensity [US(mA)] of the footshocks. Conditioned mice: (^a) $P < 0.001$ vs. 0.40–3, $P < 0.01$ vs. 0.55–3, and $P < 0.05$ vs. 0.70–1; (^b) $P < 0.05$ vs. 0.40–3 and 0.70–3. Sensitized mice: (^c) $P < 0.001$ vs. all other groups (ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test). (B) Using the data set shown in A, the mean freezing response of the respective sensitization group was subtracted from each individual freezing value of conditioned (open symbols) and sensitized mice (filled symbols). Thus, mean freezing responses of sensitization groups are set at zero (dotted line). Individual data with box plots indicate that the group differences between the conditioning groups seen in A disappear after this calculation. (C) Model for the interrelation between fear memory and intensity of the conditioning procedure. On the basis of the results of A and B, we propose that fear memory consists mainly of two summative components, an associative [association between tone and shock, (ac)] and a nonassociative component [sensitization due to the footshock, (nac)]. Values calculated under B suggest that conditioning with 1–3 tone-shock pairings leads to the formation of a categorical memory about the tone-shock association. The intensity of the footshock, in contrast, is predominantly encoded by sensitization.

to the subsequently potentiated freezing response to the tone. Freezing to the tone was less pronounced at day 1 in handled mice than in naive mice that underwent the same strong sensitization procedure (Experiment 1, group 0.70–3) or in naive mice that underwent a weaker sensitization procedure (Experiment 1, group 0.70–1; Experiment 4, first experimental series; Fig. 9D; statistics not shown). Despite this general decrease in the intensity of freezing, statistical analyses otherwise revealed essentially the same results as reported for the first experimental series,

namely, that mice froze significantly more to the 3-min tone at day 1 than mice of the other group to the test context in absence of tone presentation (Group: $F_{(1,21)} = 11.9$, $P = 0.002$; Group \times Interval: $F_{(8,168)} = 4.3$, $P < 0.0001$; Fig. 9D, d1). These data are consistent with the idea that handling caused a decrease in the susceptibility to sensitization.

We next studied the context dependency of the decrease in freezing on repeated tone presentation. Re-exposure to the tone in test context 2 (Table 2) led to a decrease in freezing at day 7 compared with day 1 (Day: $F_{(1,11)} = 11.2$, $P = 0.007$; Day \times Interval: $F_{(8,88)} = 2.2$, $P = 0.089$), indicating that the decrease in freezing was independent of the extinction context. At day 7, mice without exposure to the tone at day 1 showed significantly more freezing than mice with pre-exposure to the tone (Group \times Interval: $F_{(8,168)} = 2.7$, $P = 0.008$; Fig. 9D, d7). The freezing response to the tone shown in test context 2 at day 7 by mice without pre-exposure to the tone was comparable to that shown by animals of the other group in test context 1 at day 1 [Group: $F_{(1,21)} = 0.0$, $P = 0.988$; Group \times Interval: $F_{(8,168)} = 0.5$, $P = 0.871$; 2-way ANOVA (Group, Interval) for repeated measures (Interval)], indicating that neither the test context nor the passage of time affected freezing to the tone.

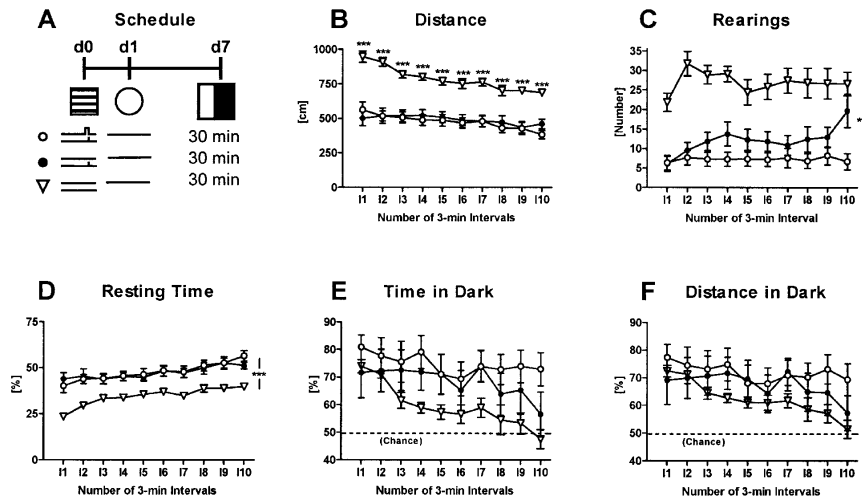


Figure 7. Altered behavioral performance in a light–dark avoidance task following conditioning and sensitization procedures. (A) Mice were randomly assigned to three groups. At d0, all animals were placed into the conditioning chamber. Two groups received a single 0.70-mA footshock with (conditioning procedure) or without tone presentation (sensitization procedure). The third group did not receive a shock in the conditioning chamber. All animals were placed into test context 1 for 7 min without any tone presentation at d1, and into a light–dark avoidance box for 30 min at d7. The light–dark box was located in a different room and consisted of a light and a dark compartment of similar dimensions that were connected by a doorway. Several behavioral parameters were automatically recorded over the course of the 30-min light–dark test and analyzed in 3-min intervals. These behavioral parameters included (B) horizontal locomotion, (C) vertical exploration (rearings), (D) resting time (normalized to the observation period), (E) relative time spent in the dark compartment (normalized to the observation period), and (F) relative distance moved in the dark (normalized to the total horizontal locomotion shown in the respective observation period). For description of symbols and codes see Tables 1 and 2. Mean \pm SEM. ($n = 12$ per group). (***) $P < 0.001$ nonshocked mice vs. the two other groups (2-way ANOVA for repeated measures, followed by Newman-Keuls post-hoc test).

Experiment 5: Stimulus specificity of the adaptive changes to the tone

As the low freezing response to the tone at day 7 required prior exposure to the tone and did not simply develop over time (cf. Experiment 4), we wondered whether the reduced response is specific for auditory stimuli or due to a more general relaxation in a state system (desensitization). To this end, we compared the behavioral performance of naive, conditioned and sensitized mice with or without tone presentation at day 1 in a light–dark test at day 7 after the

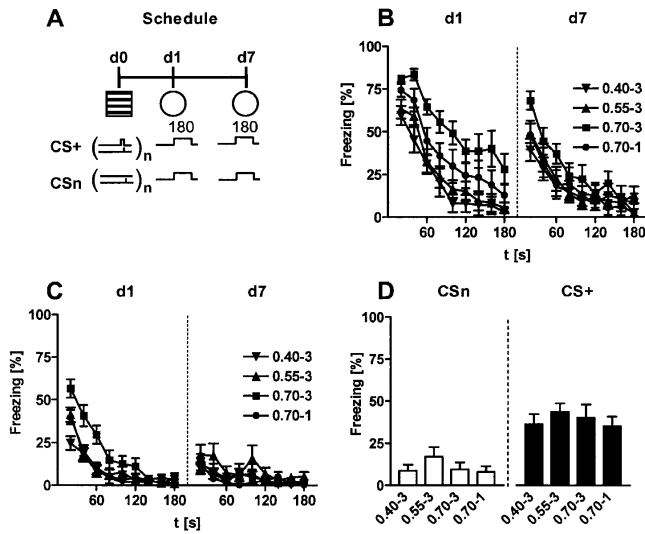


Figure 8. Freezing of sensitized and conditioned mice on repeated tone presentation. (A) The same conditioned and sensitized mice shown in Figure 4 were exposed to the 3-min tone (80 dB) in test context 1 (cf. Table 2) for a second time, 6 d after the first exposure (d7). Conditioning and sensitization groups, respectively, differed in the number and intensity of the footshocks. Group codes indicate shock intensity (first part) and number of shocks (second part). (B) Conditioned mice showed a reduction in their freezing response to a tone (CS+) from d1 to d7. The significant group differences seen at d1 disappeared at d7. (C) Also, sensitized mice showed a reduction in their freezing response to a tone (CSn) from d1 to d7. Again, the significant group differences seen at d1 disappeared at d7. (D) Spontaneous recovery expressed as difference between the freezing value of the first 20-sec interval of tone presentation at day 7 and the freezing value of the last 20-sec interval of tone presentation at day 1. Conditioned mice showed, in general, more spontaneous recovery than sensitized mice. The intensity of the aversive encounter, however, had no influence on spontaneous recovery either in sensitized or in conditioned mice. Mean \pm SEM. Freezing was analyzed in 20-sec bins and normalized to the length of the analysis interval. Freezing data at d1 are identical to those of Figure 4C,D. For description of symbols and codes see Tables 1 and 2.

aversive encounter (Fig. 10A). For the sake of brevity and clarity, data were analyzed and presented for the entire 30-min exposure. Analysis in 3-min bins revealed essentially the same results (data and statistics not shown). In all cases, except for the relative time spent in the dark, behavioral and autonomous responses of naive mice differed significantly from that of the two conditioning and the two sensitization groups. Naive mice showed more horizontal locomotion (naive vs. conditioning groups: $F_{(3,35)} = 35.4$, $P < 0.0001$; naive vs. sensitization groups: $F_{(3,35)} = 39.0$, $P < 0.0001$; Fig. 10B) and rearings (naive vs. conditioning groups: $F_{(3,35)} = 26.0$, $P < 0.0001$; naive vs. sensitization groups: $F_{(3,35)} = 29.5$, $P < 0.0001$; Fig. 10C), less resting time (naive vs. conditioning groups: $F_{(3,35)} = 14.0$, $P = 0.005$; naive vs. sensitization groups: $F_{(3,35)} = 22.5$, $P < 0.0001$; Fig. 10D), less time in the dark (naive vs. conditioning groups: $F_{(3,35)} = 3.9$, $P = 0.030$; but not naive vs. sensitization groups: $F_{(3,35)} = 1.2$, $P = 0.321$; Fig. 10E) and less defecation (naive vs. conditioning groups: $P = 0.007$; naive vs. sensitization groups: $P = 0.002$; Kruskal-Wallis; Fig. 10F). Only in the case of rearings had there been a difference between conditioned mice with and without pre-exposure to the tone. In no other case, was the behavior of the animals in the light-dark task significantly affected by pre-exposure to the tone, indicating that the decrease in freezing on repeated tone presentation is largely stimulus specific.

Experiment 6: Pre-exposure to the tone before sensitization and conditioning procedures

This experiment investigated whether exposure to a tone causes the same long-lasting decrease in freezing independently of whether or not it has been presented before or after conditioning and sensitization procedures, respectively. A two-way ANOVA (Day, Interval) for repeated measures (Day, Interval) revealed that repeated exposure of naive mice to a 98-dB tone caused a significant decrease in the freezing response at day 7 compared with day 1 (Day: $F_{(1,9)} = 9.8$, $P = 0.012$; Day \times Interval: $F_{(8,72)} = 9.9$, $P < 0.001$; Fig. 11B), with clear evidence of spontaneous recovery (statistics not shown). Also, conditioned mice without pre-exposure to the tone showed a decrease in freezing on repeated nonreinforced tone presentation after conditioning (Day: $F_{(1,9)} = 56.0$, $P < 0.0001$; Fig. 11C; animals are identical to group

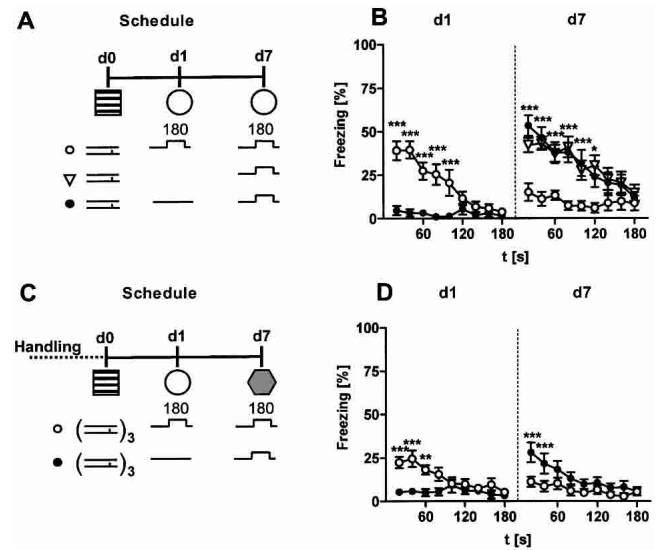


Figure 9. Reduced freezing to the tone at day 7 requires prior tone presentation and does not depend on the extinction context. (A) In the first experimental series, naive mice were sensitized with a single 0.70-mA footshock in the conditioning chamber (d0). The next day (d1), mice were assigned to three groups ($n = 9$, each). The first group was subsequently exposed to a 3-min tone (80 dB) in test context 1, the second group remained undisturbed in their home cages, and the third group was placed into test context 1, but without tone presentation. Six days later (d7), all mice were exposed to a 3-min tone in test context 1. (B) Freezing response to the tones and to the respective silent periods shown by the mice of the first experimental series. Note that at d1, mice of the first group froze significantly more to the tone than mice of the third group to the test context. Moreover, the freezing response to the tone was independent of the familiarity with the test context and handling procedure, as mice of the third group showed essentially the same freezing to the tone at d7 as mice of the second group. (C) In the second experimental series, mice were frequently handled prior to the experiment. At d0, all mice were sensitized with three 0.70-mA footshocks in the conditioning chamber. The next day (d1), mice were assigned to two groups ($n = 11-12$) and placed into test context 1. Only one of the two groups was exposed to a 3-min tone (80 dB). Six days later (d7), both groups were placed into test context 2 and exposed to the 3-min tone. (D) Freezing response to the tones and to the respective silent periods shown by the mice of the second experimental series. Extensive handling before sensitization caused a general decrease in freezing to the tone (cf. Fig. 8C, group 0.70-3), but did not abolish the sensitization effects seen in the first experimental series (Fig. 9B). The decrease in freezing to the tone from d1 to d7 appeared to be unaffected by the test context. Data were analyzed in 20-sec bins and normalized to the length of the analysis interval. For description of symbols and codes, see Tables 1 and 2. Mean \pm SEM. (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$ vs. the other group (2-way ANOVA for repeated measures, followed by Newman-Keuls post-hoc test).

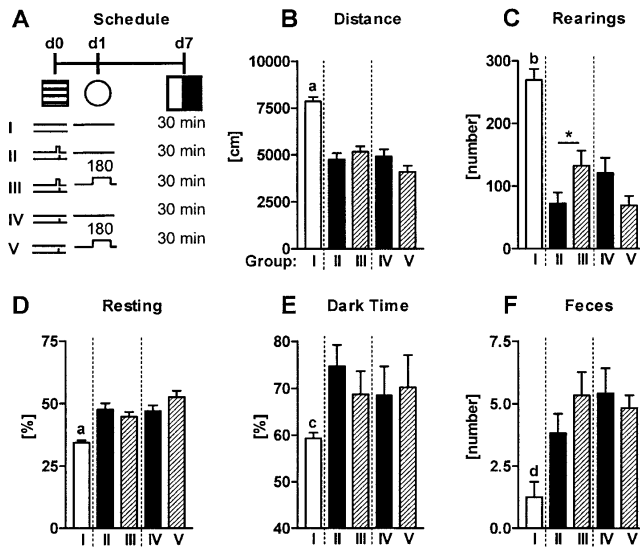


Figure 10. No effect of tone presentation following conditioning and sensitization procedures on behavioral performance in a light–dark avoidance task. (A) Mice were randomly assigned to five groups. At d0, all animals were placed into the conditioning chambers. One group did not receive a shock (group I). Four groups received a single 0.70-mA footshock either with (conditioning procedures, groups II and III) or without tone presentation (sensitization procedures, groups IV and V). The next day (d1), all groups were placed into test context 1 (cf. Table 2) either without (groups I, II, and IV) or with subsequent presentation of a 3-min tone (80dB, groups III and V). Note that groups I, II, and IV are identical to those shown in Figure 7. At d7, all groups were tested in the light–dark avoidance task for 30 min. Several behavioral and autonomic parameters were recorded over the course of the 30-min light–dark test, including (B) horizontal locomotion, (C) vertical exploration (rearing), (D) resting time (normalized to the observation period), (E) relative time spent in the dark compartment (normalized to the observation period), and (F) defecation. For description of symbols and codes, see Tables 1 and 2. Mean \pm SEM. ($n = 12$ per group). (*) $P < 0.001$ vs. all other groups; (b) $P < 0.01$ vs. groups III and IV, $P < 0.001$ vs. groups II and V; (c) $P < 0.05$ vs. group II; (d) $P < 0.01$ vs. groups III, IV, and V; (*) $P < 0.05$ (A–E: ANOVA, performed separately for groups I+II+III and I+IV+V, followed by Newman-Keuls post-hoc test; F: Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s post-hoc test).

0.70–1 of Experiment 1). Pre-exposure to an 80-dB tone before conditioning caused a significantly smaller freezing response to the same 80-dB tone at day 1 following conditioning, compared with conditioned mice without pre-exposure to that tone [Group: $F_{(1,18)} = 5.7$, $P = 0.027$; Fig. 11D; two-way ANOVA (Group \times Interval) for repeated measures (Interval)]. Furthermore, the freezing response during the second exposure to the 3-min 80-dB tone was similar, no matter whether the first exposure to the same tone occurred before or after conditioning (Group: $F_{(1,18)} = 0.0$, $P = 0.921$; Fig. 11E). The effects of pre-exposure to the tone on freezing to an 80-dB tone at day 1 after conditioning were more pronounced if the pre-exposed tone had the same intermediate intensity as during conditioning and tone exposure at day 1 (80 vs. 98 dB; Group: $F_{(1,18)} = 5.7$, $P = 0.027$; Fig. 11F).

In the second part of Experiment 6, we confirmed the results of tone pre-exposure on conditioned freezing and extended our study by analyzing the effects of tone pre-exposure on sensitization. This time, all mice were placed into test context 1 with or without tone presentation 5 d before conditioning and sensitization procedures, respectively (Fig. 12A). Both conditioned (Group: $F_{(1,18)} = 5.2$, $P = 0.034$; Group \times Interval: $F_{(8,144)} = 6.4$, $P < 0.0001$; Fig. 12C) and sensitized mice (Group: $F_{(1,18)} = 21.5$, $P = 0.0002$; Group \times Interval: $F_{(8,144)} = 5.3$, $P < 0.0001$; Fig. 12B) with tone pre-exposure showed significantly less freezing to the tone at day 1 than mice without tone pre-exposure. These group

differences disappeared at day 7 (Figs 12B,C; statistics not shown). As in the first part of Experiment 6 (Fig. 11E), mice again showed a similar freezing response during the second exposure to the 3-min tone, irrespective of whether the tone had been presented for the first time before or after conditioning (Group: $F_{(1,18)} = 0.0$, $P = 0.980$; Group \times Interval: $F_{(8,144)} = 1.3$, $P = 0.246$; Fig. 12D). The same was the case for sensitized mice (Group: $F_{(1,18)} = 2.6$, $P = 0.127$; Group \times Interval: $F_{(8,144)} = 0.8$, $P = 0.647$; Fig. 12D).

Long-term changes in the freezing response to the tone were assessed separately per group by one-way ANOVAs for repeated measures (Day). For the sake of brevity, we present data and statistical analysis of the total freezing response shown during the 3-min tone presentation. Analysis of the data in 20-sec bins revealed essentially the same results (statistics not shown). All groups of mice showed a decrease of freezing over the course of repeated tone presentation from day 1 to day 7 and, in most cases, also to day 8 (sensitized mice without pre-exposure to the tone: $F_{(2,29)} = 13.6$, $P = 0.0003$; sensitized mice with pre-exposure to the tone: $F_{(2,29)} = 5.6$, $P = 0.013$; conditioned mice without pre-exposure to the tone: $F_{(2,29)} = 29.9$, $P < 0.0001$; conditioned mice with pre-exposure to the tone: $F_{(2,29)} = 5.7$, $P = 0.012$; Fig. 12E). Changing of the test context failed to significantly influence the freezing response to the tone, as freezing shown in test context 2 at day 8 was similar to that shown in test context 1 the day before or even reduced, except for sensitized mice with pre-exposure to the tone (Fig. 12E). Importantly, mice of all groups showed an increased defecation in test context 2 at day 8 compared with test context 1 at day 7 [Context: $F_{(1,36)} = 22.7$, $P < 0.0001$; three-way ANOVA (Pre-exposure \times Shock protocol \times Context) for repeated measures (Context); Fig. 12F]. This indicates that they recognized test context 2 as a novel environment and demonstrates the persistence of sensitization despite the decrease in freezing in response to the tone. Noteworthy, the effects of tone pre-exposure on freezing to the tone at day 1 were mirrored at the autonomic level, as tone pre-exposure led to less defecation (Pre-exposure: $F_{(1,36)} = 6.9$, $P = 0.012$) independently of the shock protocol (Pre-exposure \times Shock protocol: $F_{(1,36)} = 0.2$, $P = 0.622$; two-way ANOVA; Fig. 12F).

Discussion

The present study was designed to assess the contribution of nonassociative learning processes to expression and extinction of conditioned fear in mice. We demonstrate that acquisition of conditioned fear is usually accompanied by a nonassociative sensitization process, which occurs in a general state system rather than in the stimulus-response pathway (Groves and Thompson 1970). Extinction, in contrast, shares many fundamental properties with the nonassociative habituation process (McSweeney and Swindell 2002), which occurs in a certain stimulus-response pathway.

In the context of the present study, sensitization describes the phenomenon that an aversive encounter (e.g., perception of a footshock) leads to a general potentiation of the responsiveness to sensory stimuli. This potentiation becomes evident for those stimuli, which have the general capacity to reflexly elicit fear. We could show that tones meet this criterion, as they are able to elicit freezing in naive mice. In line with this observation, Lamprea et al. (2002) demonstrated in naive rats that electric stimulation of the inferior colliculus, a central relay station of auditory inputs to thalamic and cortical structures, with currents of rising intensity, induces the whole spectrum of behavioral fear responses, including freezing. In our experiments, the freezing response of non-shocked mice to a loud tone was similar to that of shocked mice to a tone of intermediate volume, indicating that the footshock sensitized the animals to the tone.

This interpretation is not unequivocally accepted, as the potentiated freezing response does not necessarily relate to sensitization, but might result from context generalization as well (Fanselow 1980; Richardson 2000). In fact, the sensitization protocols used in the present study represent a form of foreground contextual conditioning, which might lead to a strong association between the shock and the context in which the shock was applied. If this contextual memory is generalized to the test context, the freezing response observed in sensitized mice would relate to the shock-context association and not to nonassociative sensitization. Conditioned mice, in contrast, underwent background contextual conditioning and might develop less contextual memory and context generalization, as the tone serves as a predictor of the punishment and reduces the attention paid toward the conditioning context (Rescorla and Wagner 1972). Accordingly, we observed that sensitized mice showed slightly more freezing in the test context before tone presentation than conditioned mice. Nevertheless, several arguments render it unlikely that context generalization represents a critical determinant of the freezing response to the tone in sensitized mice as follows. (1) To minimize the risk of context generalization, our test contexts differed considerably from the conditioning context in shape, material, bedding, and odor. As a consequence, mice were able to

discriminate between the different test contexts (Experiment 6), as well as between the test contexts and the conditioning context (K. Kamprath and C.T. Wotjak, unpubl.). Furthermore, we excluded a significant contribution of experimental handling to context generalization (Experiment 4). (2) Sensitized mice froze significantly more to the tone than to the test context. This was the case, in particular, for sensitization procedures with lower shock intensities, which completely failed to elicit freezing to the test context, but caused a prominent freezing response to the tone (Experiment 1). (3) The differences in the intensity of the sensitization protocols were mirrored in the freezing response to the tone, but not to the test context. Noteworthy, sensitized mice froze differently to the tone, although they showed the same low levels of freezing during the 140 sec preceding tone presentation (Experiment 1). (4) Other than pre-exposure to the tone, pre-exposure to the test context before sensitization procedures had no effect on the freezing response to the tone after the aversive encounter (Experiment 6). Accordingly, exposure to the test context 1 after sensitization procedures also was not sufficient to reduce freezing to the tone presented in the same test context or in a novel test context 6 d later (Experiment 4). Importantly, animals with exposure to the test context at day 1 showed essentially the same pronounced freezing response at day 7 as mice

that had remained undisturbed in their home cages. If the shock would have produced generalized context conditioning, exposure to the test context prior to the tone presentation would have been expected to reduce or eliminate the freezing to the tone. However, our data clearly demonstrate that familiarization with the test context (i.e., extinction of generalized contextual fear) failed to affect the freezing response to the tone. (5) Sensitized and conditioned mice showed the same alterations in their behavioral performance in a light-dark test that was performed in a completely different room and setup (Experiment 2). Taken together, our data do not preclude the existence of context generalization following sensitization procedures. However, they provide clear evidence that the freezing response to the tone following sensitization procedures was not critically influenced by context generalization, and can thus be regarded as a measure of non-associative learning (i.e., sensitization).

The footshock might sensitize the animals, not only if administered alone, but also if presented together with a tone during conditioning. Consequently, the freezing response to the tone following conditioning might be determined not only by associative, but also by nonassociative memory components. To dissect the contribution of associative and nonassociative memory components, we assume that the freezing response following sensitization and sensitization protocols using the same number and intensities of footshocks. This assumption is justified by the observation that conditioned mice showed the same behavioral alterations in the light-dark test as sensitized mice. The contribution of the

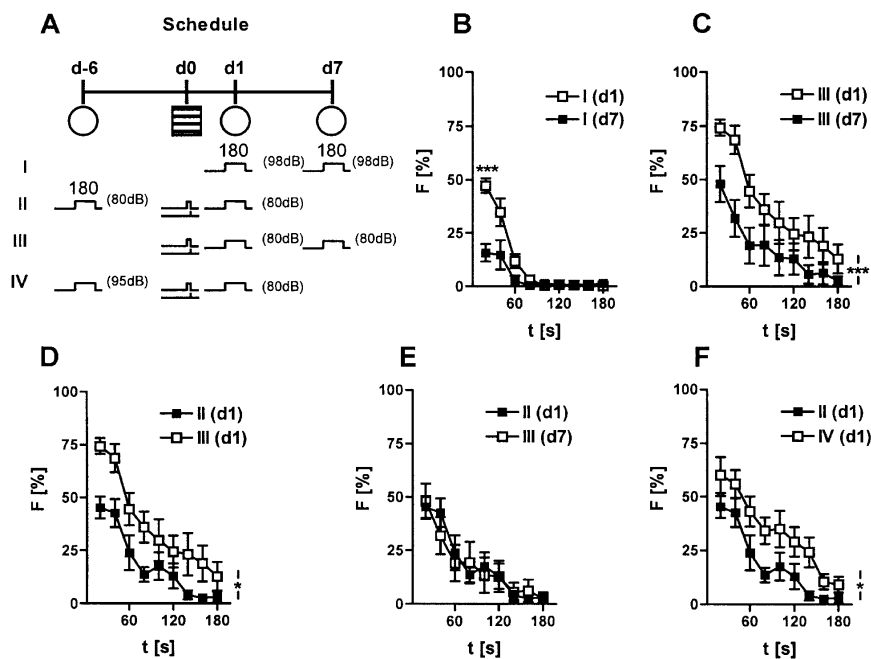


Figure 11. Effects of tone presentation before conditioning on the freezing response to the tone. (A) Animals were randomly assigned to four groups. Naive mice of group I were repeatedly exposed to a 3-min tone of 98 dB in test context 1 at d1 and d7. Animals of group II were pre-exposed to the 3-min tone (80dB) in test context 1, followed by conditioning with a single 0.70-mA footshock at d0 and re-exposure to the 3-min tone the next day (d1). Mice of group III were exposed to the tone in test context 1 at d1 and d7 following conditioning. Mice of group IV were treated identically to group II, except for the tone intensity during tone pre-exposure at d-6 (95 dB instead of 80 dB). Note that group I is identical to group 98 dB of Figure 4B, group III with group 0.70–1 of Figure 4D, and group IV with group 95 dB of Figure 4B. (B) Reduced freezing to a loud tone on repeated tone presentation in naive mice (group I). (C) Reduced freezing to the tone on repeated tone presentation in conditioned mice (group III). (D) Pre-exposure to the tone led to a significantly reduced freezing response at d1 following conditioning (groups II and III). (E) The freezing response of group II at d1 was identical to that of group III at d7. (F) Pre-exposure to a loud tone had significantly less effects on freezing to the tone at d1 following conditioning than pre-exposure to a tone of the same intermediate intensity as used for conditioning and re-exposure to the tone at d1 (groups II and IV). For description of symbols and codes, see Tables 1 and 2. Data were analyzed in 20-sec bins and normalized to the length of the analysis interval. Mean \pm SEM. ($n = 10$ per group). (*) $P < 0.05$; (***) $P < 0.001$ vs. the other group (2-way ANOVA for repeated measures, followed by Newman-Keuls post-hoc test).

nonassociative memory component to expression of conditioned fear can thus be estimated from the freezing response of sensitized mice. The associative component, in contrast, is not accessible to our measurements and has to be calculated. To this end, we neglect a possibly complex relationship between associative and nonassociative memory components and assume that a simple summation of associative and nonassociative memory components determines the freezing response of conditioned mice (Harris 1943). On the basis of this assumption, we calculated the associative memory component by subtracting the freezing response of sensitized mice (nonassociative component) from the freezing response of conditioned mice (sum of both components). Such calculations were only performed between those conditioning and sensitization groups that experienced the footshocks in the same number and intensity. After this calculation, the significant differences in freezing between mice that were conditioned with different shock intensities disappeared. This suggests that the intensity of the freezing response of conditioned mice was primarily determined by nonassociative memory components, whereas associative memory components were more or less categorical. This conclusion questions attempts to interpret shock intensity-dependent changes in freezing as a measure of the strength of the associative memory in fear conditioning experiments similar to those of the present study (Cordero and Sandi 1998; Cordero et al. 1998; Sapolsky 2003). Modifications in the strength of the associative memory might be achieved primarily via changing the contingency between CS and US (Harris 1943; Mackintosh 1974). Our data indicate that more than three tone-shock pairings are required in C57BL/6JOLA^{Hsd} mice to significantly strengthen the associative memory component. As fear-conditioning experiments in mice typically use very few tone-shock pairings (1–3), the relationship between contingency and strength of the associative memory is accessible easier in conditioning procedures, which require more intensive training, such as eyeblink conditioning.

The hypothesis that sensitization partially determines the fear response of conditioned animals dates back to the first half of the last century (e.g., Harris 1943, and references therein) and has been repeatedly brought into discussion since then (Mackintosh 1974; Richardson 2000). So far, however, long-lasting consequences of aversive encounters like sensitization have been described for severe stressors only, including social defeat or footshocks of high intensity or frequency (for review, see Stam et al. 2000; Korte and de Boer 2003; Wiedenmayer 2004). Footshocks of intermediate intensity, in contrast, caused only transient changes in fear-related behavior that were confined to a relatively narrow time window after the aversive incident (Boulis and Davis 1989; Davis 1989; Korte and de Boer

2003). To the best of our knowledge, this is the first report that sensitization due to a footshock of intermediate intensity (as commonly used in fear-conditioning experiments with mice) persists for at least 1 wk after the aversive encounter. We conclude that the animals adopted an allostatic state after the stressful experience (for review, see McEwen 2000; Korte and de Boer 2003) with sensitization representing one feature of the chronic deviation of regulatory systems from their normal homeostatic operating levels (allostatic load; McEwen 2000).

The data of the first part of the study lead to the two-component theory of fear conditioning (Fig. 13), which predicts

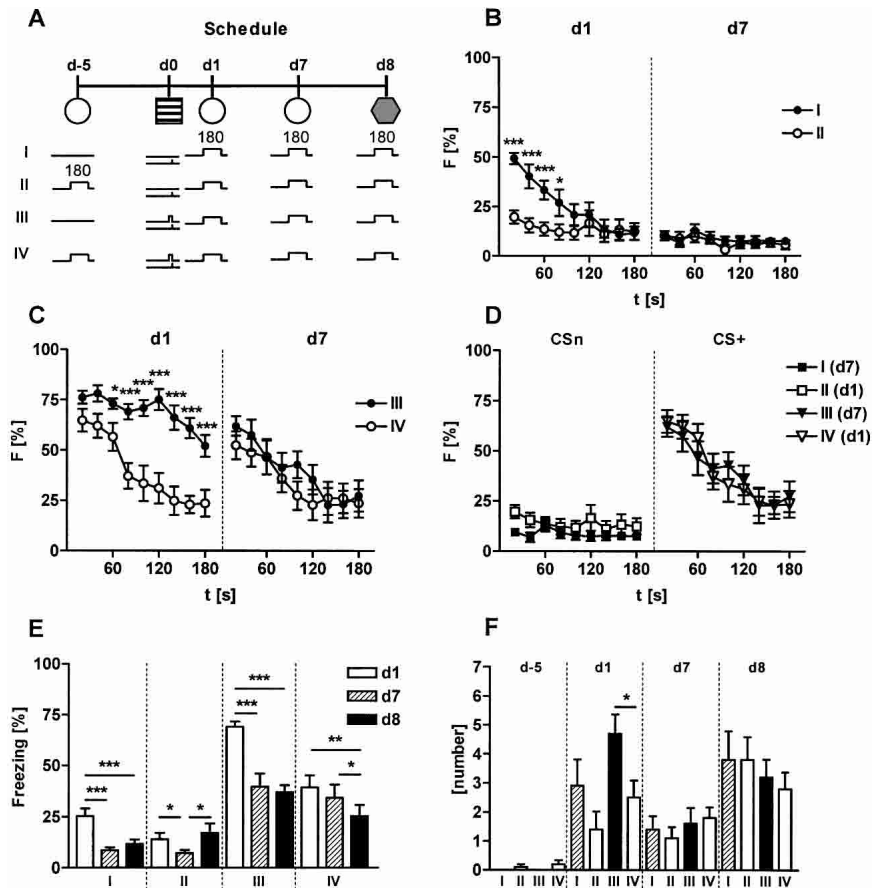


Figure 12. Effects of tone presentation before sensitization and conditioning procedures on the freezing response to the tone. (A) Animals were randomly assigned to four groups. All mice were placed into test context 1 (cf. Table 2) at d-5. Two groups of mice were subsequently exposed to a 3-min tone (80 dB); the two other groups remained in the test context without tone presentation. Five days later (d0), one group with and one group without pre-exposure to the tone were sensitized with a single footshock (0.70 mA, 2 sec). The two other groups were conditioned with a single tone-shock association. All mice were exposed to 3-min tones (80 dB) in test context 1 at d1 and d7 and in test context 2 at d8 following sensitization and conditioning procedures, respectively. (B) Pre-exposure to the tone led to a significantly reduced freezing response at d1 following sensitization procedures (groups I and II). Both group I and group II showed virtually no freezing to the tone at d7. (C) Pre-exposure to the tone led to a significantly reduced freezing response at d1 following conditioning (groups III and IV). These group differences disappeared at d7. (D) The freezing response of group I at d7 was similar to that of group II at d1. The same was the case for the freezing response of group III at d7 and group IV at d1. (E) Freezing response to the tone at d1, d7, and d8. In all groups, freezing decreased from d1 to d7 and d8. Only in the case of group II, tone presentation in the unfamiliar test context 2 at d8 led to an increase in freezing compared with d7. (F) Defecation score (number of feces) counted at the end of the respective test trial. Freezing data were analyzed in 20-sec bins (B,C,D) or for the total 180-sec tone presentation (E) and normalized to the length of the respective analysis interval. For description of symbols and codes, see Tables 1 and 2. Mean \pm SEM. ($n = 10$ per group). (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$ vs. the other group (1-way or 2-way ANOVA for repeated measures, followed by Newman-Keuls post-hoc test).

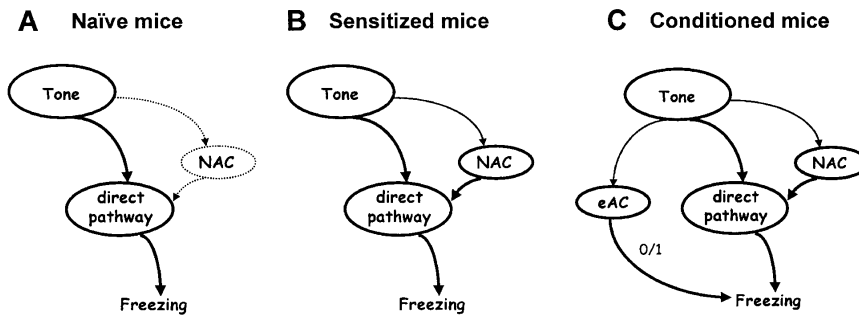


Figure 13. The two-component theory of fear conditioning. (A) In naïve mice, the tone reflexly elicits freezing via the direct pathway. In addition, tone presentation might transiently activate nonassociative memory components (NAC), which, in turn, potentiate tone processing via the direct pathway (dual process theory of habituation; Groves and Thompson 1970). (B) In sensitized mice, chronically activated NAC potentiate the unconditioned fear response to the tone. (C) The two-component theory of fear conditioning predicts that fear conditioning causes the formation of both associative (eAC) and nonassociative memories (NAC) that enable the animals to separately encode qualitative (0/1, eAC) and quantitative information (NAC) about an aversive encounter. Consequently, two components of the fear memory, the eAC and the NAC, determine expression of the freezing response in conditioned mice. The thickness of the lines indicates the activity status of a given pathway. For further details see legend to Figure 1.

that fear conditioning may cause the formation of both associative and nonassociative memories, which enable the animals to separately encode qualitative and quantitative information about an aversive encounter. We propose that associative memories enable the recognition of predictors of potentially harmful situations, whereas nonassociative memories determine the strength of the fear reaction, depending on the intensity of the aversive experience. The contribution of the nonassociative component to expression of conditioned fear might differ between different mouse strains, different species, and different conditioning procedures. As sensitization occurs in a state system rather than in a specific stimulus-response pathway (Groves and Thompson 1970), nonassociative memories put the animal on a general alert, which allows a flexible adjustment of conditioned and unconditioned defense reactions to the actual situation. It is tempting to speculate that the two components of fear memory are homolog to the two neural systems proposed for the expression of fear and anxiety (Davis 1998; Grillon 2002; Walker et al. 2003).

The first part of this study characterized the role of the non-associative sensitization process in expression of conditioned fear. The second part addressed the question of whether non-associative processes also account for the development of the fear response over time, with respect to both acute adaptation to the tone and changes on repeated nonreinforced tone presentation. Acute adaptation to the tone was mediated by a decrease in the freezing reaction that followed a single exponential decay function. Such a negative exponential function resembled the exponential decay of behavior undergoing habituation (Petrinovich and Widaman 1984) and described the course of the freezing response of each experimental group very well, no matter which shock intensity or paradigm (conditioning, sensitization, freezing of naïve animals to a loud tone) was used. This similarity suggests that the decrease in freezing relates to similar habituation-like processes, not only in naïve and sensitized mice, but also in conditioned mice.

To interpret the decrease in freezing in conditioned mice on repeated nonreinforced tone presentation (i.e., extinction of conditioned fear), one has to recall that extinction might be explained by at least four different processes (Fig. 2). Although it is very likely that a mixture of all four options finally mediates the decrease in freezing on the second tone presentation, the present

study attempted to dissect their contribution to extinction of the unconditioned fear. Alterations in the nonassociative memory component were studied exemplarily in sensitized mice. Tone presentation led to an almost complete extinction of the freezing response to a second tone presentation, irrespective of the differences in the intensity of sensitization. This decrease in freezing required prior tone presentation, and was thus not related to temporal decay of the nonassociative memory component. Tone presentation caused a decrease in freezing on a second tone exposure, but failed to affect the behavioral alterations in the light-dark test. Moreover, the decrease in freezing on repeated tone presentation persisted in a novel test context, although the animals still perceived this context as an unpleasant and potentially dangerous environment. These observations demonstrate the stimulus specificity of the decrease in freezing and rule out that exposure and acute adaptation to a potentially harmful stimulus

(i.e., a tone) led to a general relaxation of the animals by desensitization (Fig. 2C).

The stimulus specificity of the decrease in freezing in sensitized mice might be explained by habituation-like processes in the direct pathway (Fig. 2D). The existence of habituation in this pathway was proven by measuring the freezing response of naïve mice to repeated presentation of a loud tone. If habituation plays a role also in sensitized mice and habituation without responding (below baseline) exists (Groves and Thompson 1970), it should not matter to the freezing response to a second tone presentation whether the first tone presentation occurred before or after sensitization procedures. This was the case in the present study.

Long-term habituation may also contribute to the decrease in freezing on the second nonreinforced tone presentation in conditioned mice (McSweeney and Swindell 2002). This notion is supported by the similar freezing response to the second tone presentation in mice, which perceived the first tone before or after conditioning (below baseline habituation). The inverse relationship between habituation and stimulus intensity (Groves and Thompson 1970) would, furthermore, explain our observation that pre-exposure to a louder tone than used in the subsequent nonreinforced tone presentations was less effective than pre-exposure to a tone of the same intermediate intensity.

Habituation of the freezing response to the tone appears to be maximal after a single 3-min tone presentation (S. Neuweiler and C.T. Wotjak, unpubl.). As a consequence, nonassociative memory components cannot potentiate the freezing response to the tone anymore (Fig. 2D), and sensitized mice show little freezing on a second nonreinforced tone presentation. The influence of the associative memory components, in contrast, remains intact. The freezing response of conditioned mice shown at day 7 thus appears to be primarily determined by the associative memory components, with the consequence that conditioned mice still show a prominent freezing response to a second nonreinforced tone presentation. Therefore, conditioned mice displayed a greater spontaneous recovery of their freezing response from day 1 to day 7, compared with sensitized mice.

Several arguments render it unlikely that the formation of an inhibitory association between the tone and the shock (i.e., inhibition/masking; Fig. 2A) and/or reconsolidation of the associative memory component (Fig. 2B) played an important role in

extinction of conditioned fear in the present study. First, the tone had the same consequences on extinction whether presented before or after conditioning. Second, a third nonreinforced tone presentation failed to cause a further decrease in freezing. Third, if the associative component encodes categorical information about fear conditioning, reconsolidation or inhibition of this component should also have categorical consequences. However, the freezing response to a second or third tone presentation was still prominent. Fourth, massed tone presentations were more effective than spaced tone presentations in generating short-term and long-term extinction of conditioned fear in a different study using a similar mouse strain (Cain et al. 2003). If the decrease in freezing would relate to the formation of an inhibitory association between tone and shock, one would have expected the opposite, namely, spaced tone presentations to be more effective than the massed protocols. If, however, the decrease in freezing is based on habituation processes, then protocols with shorter inter-trial intervals should be more effective (McSweeney and Swindell 2002), as habituation is faster for higher rates of stimulus presentation (Groves and Thompson 1970). In this context, the 3-min tone presentations used in our study might be regarded as extreme forms of massed tone presentation, which would explain the high efficacy of our extinction protocol. Interestingly, spaced tone presentations caused even a slight increase in freezing (Cain et al. 2003). This is in agreement with the competition between habituation and sensitization processes, proposed by the dual process theory of habituation (Groves and Thompson 1970). Our data do not preclude that the formation of an inhibitory association between the tone and the shock may contribute to extinction of conditioned fear in mice. However, they indicate that more intensive extinction protocols than used in the present study are required to initiate this process (e.g., Cain et al. 2003).

Taken together, data of the second part of our study demonstrate that the decrease in freezing on repeated tone presentation shows fundamental properties of a behavior undergoing habituation (Thompson and Spencer 1966; McSweeney and Swindell 2002), namely, an exponential decay, lasting changes, inverse relationship to stimulus intensity, stimulus specificity, and habituation without responding. Additional criteria, such as a direct relationship to stimulus frequency and a coactivation of habituation and sensitization processes during tone presentation, are met by the data of others (Cain et al. 2003). On the basis of these findings, we propose that the decrease in freezing in conditioned C57BL/6JOLA^{Hsd} mice primarily relates to a nonassociative learning process (i.e., habituation). Habituation leaves both the associative and the nonassociative memory components of the fear memory unaffected, but abolishes the influence of the nonassociative memory components on the freezing response to the tone (Fig. 2D). Consequently, the freezing response of conditioned mice to a second nonreinforced tone presentation appears to be primarily determined by associative memory components. Under these circumstances, the fact that mice, which underwent conditioning procedures of different intensities, showed a similar freezing response to a second nonreinforced tone supports our two-component theory of fear conditioning (Fig. 13), according to which the associative memory component is supposed to encode primarily categorical information about the conditioning event.

In light of the proposed role of classical conditioning and sensitization in the etiology of distinct psychiatric disorders (e.g., generalized anxiety disorder and post-traumatic stress disorder; Jacobs and Nadel 1985; Marks and Tobena 1990; Dykman et al. 1997; Rosen and Schulkin 1998; Stam et al. 2000; Öhman and Mineka 2001), future studies have to pay more attention to the development of reconsolidation and desensitization protocols in

order to reveal novel therapeutic strategies that target the cause of the stress-related diseases (i.e., the associative and nonassociative memory components) instead of alleviating its consequences for certain situations only.

Conclusion

The present study demonstrates that nonassociative learning processes critically influence the freezing response to a tone following auditory fear conditioning in C57BL/6JOLA^{Hsd} mice. Whereas sensitization determines the intensity of freezing after conditioning procedures with a few tone-shock pairings, habituation-like processes seem to be responsible for the decrease in freezing on repeated tone presentations. Habituation does not provide a complete explanation of extinction, which is certainly determined by multiple processes (McSweeney and Swindell 2002; Myers and Davis 2002). However, our study describes an important role of sensitization and habituation for expression and extinction of conditioned fear in mice in situations with common conditioning and testing protocols. The generality of both the two-component theory of fear conditioning and the habituation hypothesis of extinction remains to be shown in other mouse strains and species (including humans) and for other conditioning and extinction protocols. However, a potential contribution of nonassociative learning processes to expression and extinction of aversive memories has generally to be considered for those CS, which are able to elicit an unconditioned fear response.

Materials and Methods

All experiments were approved by the Committee on Animal Health and Care of the local governmental body and performed in strict compliance with the EEC recommendations for the care and use of laboratory animals (86/609/CEE).

Animals

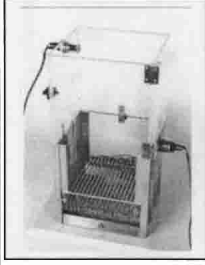
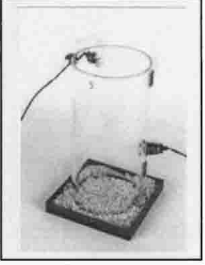




A total of 251 male C57BL/6JOLA^{Hsd} mice were purchased from Harlan Winkelmann Germany (Dutch breeding stock) at an age of 6–8 wk. After their arrival in the institute, animals were kept singly in standard Macrolon type II cages with sawdust bedding (Altromin Faser Einstreu, Altromin GmbH), tap water, and food ad libitum, at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ room temperature and $55\% \pm 5\%$ humidity, under an inverse 12 h:12 h light-dark cycle (lights off: 08:00 a.m.). Animals were transferred from the vivarium to the laboratory 1–2 d before the experiment during the light phase of their cycle. During experiments, animals were kept in the same behavioral laboratory in which they were conditioned and tested (except for the light-dark avoidance task), but behind a sound- and light-tight curtain.

Unconditioned freezing, conditioning procedures, and sensitization procedures

Setup

Three different contexts were used that differed considerably in material, shape, surface texture, bedding, and odor of the cleaning solutions (Table 2). Both conditioning and sensitization procedures were performed in mouse-conditioning chambers (ENV-307A, MED Associates) with house light (0.6 Lux, ENV-215M, MED Associates), elongated walls, and mouse-shock floor (grid harness package: ENV-407; Shocker/Scrambler: ENV-414, MED Associates). The conditioning context had a cubic shape with two metal walls and two Plexiglas walls, and a grid floor. Grid and walls were cleaned with 70% ethanol. For memory tests and unconditioned freezing, two neutral test contexts were used. Test context 1 consisted of a Plexiglas cylinder with sawdust as bedding. It was illuminated with a house light (0.3 Lux, ENV-215M, MED Associates) and cleaned with 1% acetic acid. Test context 2 had the shape of a hexagonal prism, with opaque side walls with

Table 2. Detailed description of the three different contexts used in the experiments

	Conditioning Chamber	Test Context 1	Test Context 2
Picture			
Shape	Cubicle	Cylinder	Hexagonal Prism
Symbol			
Walls	Aluminum / transparent Plexiglas	Transparent Plexiglas	Non-transparent Plexiglas with rough surface; transparent Plexiglas
Floor	Metal rods	Sawdust (same as in home cage)	Silica sand
Cleaning /odor	70% EtOH	1% CH ₃ COOH	Isoamylacetate
Illumination	House light (0.6 Lux)	House Light (0.3 Lux)	Stimulus Light (12 Lux)
Dimensions	L19 x W14 x H30 cm	∅15 x H30 cm	L15 x W13 x H30 cm

Particular care was taken to adjust their dimensions in order to ensure comparable sound pressure levels.

rough surface, except for the back plane that was made of Plexiglas, and silica sand used as bedding. Test context 2 was illuminated with a stimulus light (12 Lux, ENV-221M, MED Associates) and cleaned with water containing isoamylacetate (1:2000; banana aroma) as a monomolecular odor.

All contexts were located in soundproof isolation cubicles (ENV-018M, MED Associates) that were additionally isolated with acoustic foam (Conrad Electronics). Tones were generated by audio stimulus generators (ANL-926, MED Associates) and applied by speakers (DTW 110 NG, Visaton) mounted to the ceiling of the isolation cubicle over the respective contexts, which were open at the top. Sound-pressure levels were checked by means of the SPL Measurement Package (ANL-929A-PC, MED Associates) at floor level. Similar dimensions ensured that sound-pressure levels were comparable for the three contexts. Small CCD cameras (Conrad Electronics) were mounted to the back plane of the isolation cubicles to enable behavioral observation. Experiments were controlled by commercial software (MED-PC for Windows v1.17) via interfaces (DIG 715) and the respective control panels (SG 215, all MED Associates). Two conditioning or four testing setups were used simultaneously.

Experimental procedure

For conditioning, mice were placed into the conditioning chamber, and the house light was switched on. Three minutes later, a 20-sec tone (80 dB, 9 kHz sine wave, 10-msec raising and falling time) was presented that coterminated with a scrambled electric footshock of 1 sec (in case of repeated conditioning) or 2-sec duration (in case of a single tone-shock association). In case of repeated conditioning, the conditioning procedure was repeated two times with inter-tone intervals of 110 and 140 sec. Animals were returned to their home cages 60 sec after the last footshock. For sensitization, mice were treated in the same manner as for conditioning, except that the tone presentation was omitted.

To measure the freezing response to the tone without confounding influences of contextual memory, conditioned, sensitized, and naive mice were tested in a neutral environment (test contexts 1 or 2; cf. Table 2). Mice were placed into the test context, and the house light was switched on. Three minutes later, a

3-min tone was presented (9 kHz; 80 dB, if not stated otherwise). Mice were returned to their home cages 60 sec after the end of tone presentation.

In a few cases, animals were placed into the conditioning chamber and test context 1, respectively, without tone and shock presentation for the same amount of time as the other experimental groups with tone presentation.

All behaviors of the mice in the experimental setup were videotaped for subsequent off-line behavioral analysis. In selected cases, the number of feces was counted in the end of the exposures. Contexts were cleaned thoroughly after each exposure, including changing the bedding.

Light-dark avoidance

Setup

The light-dark avoidance task was performed in a different room from the conditioning and sensitization experiments (different illumination and lab environment). Animals were tested in boxes (Coulbourn Instruments), which were divided into two equally sized compartments (L13 × W26 × H38 cm). The light compartment had three transparent Plexiglas walls and was illuminated with 700 Lux white light. The dark compartment was made of black plastic, not illuminated, and covered by a black roof. The two compartments were connected by a 7.5-cm × 7.5-cm doorway. Two infrared sensor rings (sensor spacing 1.52 cm) allowed the measurement of horizontal and vertical activity in the two compartments. Both sensor rings were connected via an interface to a computer equipped with the Tru Scan Software Vers. 99 (Coulbourn Instruments). The sampling rate was 4 Hz. Each box, including the sensor rings, was surrounded by an additional box made of opaque Plexiglas side walls (L47 × W47 × H38 cm) without roof and floor. Before and after the experiment, animals were separated from the setup by a light-tight curtain.

Experimental procedure

In the beginning of the experiment, mice were placed into the center of the dark compartment, and their three-dimensional movements were automatically recorded over the course of 30 min. At the end of the experiment, mice were returned to their home cages, defecation was scored by counting the number of feces in the test box, and test boxes were carefully cleaned with soap, followed by clear water.

Experiments

All experiments were performed during the activity phase of the animals between 09:30 and 17:00 h. Experiments were designed to minimize the number of animals tested. Animals of a given experiment depicted in the respective schematic drawings derived from the same batch and were tested simultaneously. Experiments had been performed over the course of 2 yr.

Experiment 1: Freezing to a tone in naive, sensitized, and conditioned mice

Mice were randomly assigned to 11 groups ($n = 10$, each; Fig. 4A). Three groups of naive mice were exposed to 3-min tones of different intensities (80, 95, or 98 dB) in test context 1 at day 1. Four groups were sensitized in the conditioning chamber with one (0.70 mA) or three footshocks of different intensities (0.40, 0.55, or 0.70 mA). Four groups were conditioned with one or three tone-shock pairings in the conditioning chamber similar to the sensitization procedure. All sensitized and conditioned mice were exposed to a 3-min tone (80 dB) in test context 1 at day 1.

The number of the tone-footshock presentations, as well as the intensities of the footshocks, were chosen from the literature in order to cover most of the fear-conditioning procedures commonly used for studies in mice.

Experiment 2: Effects of conditioning and sensitization procedures on behavioral performance in the light–dark test

Mice were randomly assigned to three groups ($n = 12$, each; Fig. 7A). At day 0, all animals were placed into the conditioning chambers. Two groups received a single 0.70-mA footshock with (conditioning procedures) or without tone presentation (sensitization procedures). A third group received neither a tone nor a footshock in the conditioning context. The following day, all groups were placed in test context 1 for 7 min without tone presentation. Six days later, all groups were tested in a light-dark avoidance task, which was performed in another lab.

Experiment 3: Freezing of sensitized and conditioned mice on repeated tone presentation

The sensitized and conditioned mice of Experiment 1 were exposed to the 3-min tone in test context 1 for a second time, 6 d after the first tone presentation (Fig. 8A).

Experiment 4: Temporal decay of sensitization and context-dependency of extinction

Experiments were performed in two independent series. The first experimental series (Fig. 9A) studied (1) whether the decrease in freezing from day 1 to day 7 requires tone presentation at day 1 or results from temporal decay of sensitization, and (2) whether the freezing response to the tone is affected by the familiarity with the test context. To this end, naive mice were sensitized with a single 0.70-mA footshock in the conditioning chamber, and randomly assigned to three groups ($n = 9$, each). At the following day 1 (d1), mice of the first group were exposed to a 3-min tone in test context 1, mice of the second group remained undisturbed in their home cages and mice of the third group were exposed to the test context 1 without tone presentation. At day 7 (d7), all mice were exposed to a 3-min tone in test context 1.

The second experimental (Fig. 9C) series investigated (1) whether experimental handling is responsible for the freezing response to the tone, as it reminds the animals to the sensitization procedure and thus mediates context generalization, and (2) whether the decrease in freezing from day 1 to day 7 depends on the extinction context. To this end, mice were extensively handled (10 min per mouse and day for 4 d) before sensitization with three 0.70-mA footshocks in the conditioning chamber (d0). The next day (d1), mice were randomly assigned to two groups ($n = 11$ – 12 per group). Both groups of mice were placed into test context 1 at day 1 (d1). However, only one group perceived a 3-min tone. At day 7 (d7), all mice were exposed to a 3-min tone in test context 2.

Experiment 5: Stimulus specificity of the adaptive changes to the tone

Mice were randomly assigned to five groups ($n = 12$, each; Fig. 10A). At day 0, all animals were placed into the conditioning chambers. Two groups received a single 0.70-mA footshock with (conditioning procedures) and two groups without tone presentation (sensitization procedures). One group received neither a tone nor a footshock in the conditioning context. The next day, all groups were placed in test context 1. One conditioning group and one sensitization group were subsequently exposed to a 3-min tone. Six days later, all groups were tested in a light-dark avoidance task that was performed in another lab. The three groups without tone presentation at day 1 are identical to those of Experiment 2.

Experiment 6: Pre-exposure to the tone before sensitization and conditioning procedures

In the first part of Experiment 6, animals were randomly assigned to four groups ($n = 10$, each; Fig. 11A). Naive mice of the first

group were exposed to a 3-min tone of 98 dB in test context 1 at days 1 and 7. Animals of the second group were pre-exposed to the 3-min tone (80 dB) in test context 1, 6 d before conditioning with a single 0.70-mA footshock (day 0). They were again exposed to the 3-min tone in test context 1 at the following day (day 1). The third group was conditioned with a single footshock (0.70 mA, 2 sec) without pre-exposure to the tone, followed by exposure to the 3-min tone in test context 1, 1 and 7 d later. Mice of the fourth group were treated identically to those of the second group, except for the tone intensity during tone pre-exposure (95 dB instead of 80 dB). Part of the data of the groups was used for Experiments 1 and 3.

In the second part of Experiment 6, we analyzed the influence of tone pre-exposure on the freezing response to this tone, not only following conditioning procedures (as a confirmation of the findings of the first part of this experiment), but also following sensitization procedures. To this end, animals from a new batch of mice were randomly assigned to four groups ($n = 10$, each; Fig. 12A). All animals were placed into test context 1. Two groups of mice were subsequently exposed to a 3-min tone (9 kHz, 80 dB), the two other groups remained in the test context without tone presentation. Five days later, one group with and one group without pre-exposure to the tone were sensitized with a single footshock (0.70 mA, 2 sec). The two other groups were conditioned with a single tone (9 kHz, 80 dB)-shock (0.70 mA, 2 sec) association. All mice were repeatedly exposed to 3-min tones (9 kHz, 80 dB) in test context 1 at day 1 and 7 and in test context 2 at day 8 following sensitization and conditioning procedures, respectively.

Behavioral analysis

The natural repertoire of fear responses in mice includes various exploratory and defensive behaviors (Fanselow 1994; Blanchard et al. 1997; Gerlai 1998; Laxmi et al. 2003) that can be assigned to three different phases; firstly, a primarily exploratory phase during which the animals show increased vigilance and orientation toward the sound source (e.g., frequent rearings and risk assessment), secondly by a passive defensive phase (characterized by freezing), and thirdly, by an active defensive phase (characterized by panic-like flight responses such as jumping and digging in the bedding) (K. Kamprath and C.T. Wotjak, unpubl.). In our experiments, we focused on freezing as a measure of fear. This response is (1) most frequently used in studies with aversive classical conditioning, (2) relatively easy to quantify, and (3)—other than the first phase of fear responses—not induced in naive mice by the neutral conditioned stimulus of intermediate intensity. Freezing to the tone was scored off-line by two trained observers that were blind to the animals' treatment (intra- and inter-rater reliability of behavioral scoring of a randomly chosen subset of animals; $r^2 < 0.8$, $P < 0.0001$). Freezing was defined as the absence of all movements, except for those related to respiration. As an additional criterion, the head of the animals had to be in a plane position and not oriented toward the speaker. We scored every immobility phase that met these criteria, by pressing preset keys on a computer keyboard, using a customized freeware software (EVENTLOG; Robert Hendersen 1986). The resulting 1-channel ethogram was further processed by customized software (Winrat Vers. 2.31; Heinz Barthelmes, MPI Munich).

The three-dimensional tracks obtained during the light-dark avoidance task were analyzed off-line by means of customized macros implemented into Microsoft Excel in order to extract the following behavioral parameters: (1) horizontal locomotion (assessed from breakings of the infrared beams of the lower infrared sensor ring), (2) vertical exploration (i.e., rearings; assessed from breakings of the upper infrared sensor ring), (3) resting time (normalized to the observation period), (4) time spent in the dark compartment (normalized to the observation period), and (5) distance moved in the dark (normalized to the total horizon-

tal locomotion assessed during the respective observation period).

Statistical analysis

Data analysis

Data were analyzed in distinct intervals (freezing: 20, 60, or 180 sec; light-dark: 3 or 30 min) as indicated in the text, and normalized to the respective time interval. Normalization was performed by expressing the duration of a certain behavior (freezing data and selected behavioral parameters of the light-dark avoidance task) as a percentage of the respective analysis interval. Criteria for the selection of the respective analysis intervals are discussed in the Results section (Experiment 1; cf. Figs. 3 and 5).

Differences in the freezing response between two groups may generally relate to one of two extreme cases. In the first case, animals of a group 1 may consistently freeze at a higher level than mice of a group 2. In the second case, mice of group 2 may show the same initial freezing response as mice of group 1, but an accelerated adaptation to the tone. To compare the acute adaptation to the tone of conditioned, sensitized, and unconditioned mice at day 1 (Experiment 1), we followed the advice of Petrinovich and Widaman (1984), and fitted the individual freezing data (20-sec intervals) with a single exponential decay function (1), using SigmaPlot 5.0 (SPSS Inc.):

$$F(t) = F_0 * e^{-\tau t} \quad (1)$$

$F(t)$ describes the freezing response at a certain time with F_0 being the initial freezing response, t being the time, and τ the decay constant. Differences in F_0 indicate freezing at different levels of intensity (first case). Differences in τ refer to an accelerated or decelerated adaptation to the tone (second case).

Furthermore, we tried to isolate the associative component of the freezing response (F_{ac}) for conditioning groups at day 1 (Experiment 1) by equation 2:

$$F_{ac} = F_{CS+,d1} - \overline{F_{CSn,d1}} \quad (2)$$

$F_{CS+,d1}$ describes the individual freezing response of a mouse belonging to one of the conditioning groups and $\overline{F_{CSn,d1}}$ the mean freezing response of all mice of the respective sensitization group, thus representing freezing due to the nonassociative memory component (F_{nac}). Similar calculations were performed for sensitized mice by using the same equation 2 and replacing $F_{CS+,d1}$ with $F_{CSn,d1}$. In general, F_{ac} was calculated for the freezing response shown during the first minute of tone presentation. During this time period, the freezing reaction of all mice of Experiment 1 showed a steep, almost linear decay, and was not asymptotic to the x -axis yet (cf. Fig. 5; Results).

Spontaneous recovery of the freezing response from day 1 to day 7 was calculated as the difference between the freezing value of the first 20-sec interval of tone presentation at day 7 and the freezing value of the last 20-sec interval of tone presentation at day 1.

Statistics

Data were analyzed by paired t-test and analysis of variance (ANOVA) as specified in the Results section. Post-hoc comparisons were performed by Newman-Keuls test, if appropriate. Statistical significance was accepted if $P < 0.05$. Defecation scores of Experiment 5 were not normally distributed, and thus, analyzed by Kruskal-Wallis test. For the sake of clarity and brevity, only relevant results of the statistical analyses will be reported.

Acknowledgments

We thank Anja Siegmund (Munich) and Mario Engelmann (Magdeburg) for their valuable comments on this manuscript. This study was supported by a grant of the *VolkswagenStiftung* to C.T.W. (I/78 562).

References

- Blair, H.T., Schafe, G.E., Bauer, E.P., Rodrigues, S.M., and LeDoux, J.E. 2001. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: A cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn. Mem.* **8**: 229–242.
- Blanchard, R.J., Griebel, G., Henrie, J.A., and Blanchard, D.C. 1997. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**: 783–789.
- Boulis, N.M. and Davis, M. 1989. Footshock-induced sensitization of electrically elicited startle reflexes. *Behav. Neurosci.* **103**: 504–508.
- Cain, C.K., Blouin, A.M., and Barad, M. 2003. Temporally massed CS presentations generate more fear extinction than spaced presentations. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* **29**: 323–333.
- Cordero, M.I. and Sandi, C. 1998. A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: Dependence upon training intensity. *Brain Res.* **786**: 11–17.
- Cordero, M.I., Merino, J.J., and Sandi, C. 1998. Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **112**: 885–891.
- Davis, M. 1989. Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. *Behav. Neurosci.* **103**: 495–503.
- . 1998. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol. Psychiatry* **44**: 1239–1247.
- . 2000. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In *The amygdala. A functional analysis* (ed. J.P. Aggleton), pp. 213–287. Oxford UP, New York.
- Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engraving? *Annu. Rev. Psychol.* **55**: 51–86.
- Dykman, R.A., Ackerman, P.T., and Newton, J.E.O. 1997. Posttraumatic stress disorder: A sensitization reaction. *Integr. Physiol. Behav. Sci.* **32**: 9–18.
- Falls, W.A. 1998. Extinction: A review of theory and evidence suggesting that memories are not erased with nonreinforcement. In *Learning and behavior therapy* (ed. W. O'Donohue), pp. 205–229. Allyn & Bacon, Boston, MA.
- Fanselow, M.S. 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.* **15**: 177–182.
- . 1994. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon. Bull. Rev.* **1**: 429–438.
- Gerlai, R. 1998. Contextual learning and cue association in fear conditioning in mice: A strain comparison and a lesion study. *Behav. Brain Res.* **95**: 191–203.
- Grillon, C. 2002. Startle reactivity and anxiety disorders: Aversive conditioning, context, and neurobiology. *Biol. Psychiatry* **52**: 958–975.
- Groves, P.M. and Thompson, R.F. 1970. Habituation: A dual-process theory. *Psychol. Rev.* **77**: 419–450.
- Harris, J.D. 1943. Studies on nonassociative factors inherent in conditioning. *Com. Psychol. Monogr.* **18**: 1–74.
- Jacobs, W.J. and Nadel, L. 1985. Stress-induced recovery of fear and phobias. *Psychol. Rev.* **92**: 512–531.
- Korte, M.S. and De Boer, S.F. 2003. A robust animal model of state anxiety: Fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* **463**: 163–175.
- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Vianna, D.M., Castilho, V.M., Cruz-Morales, S.E., and Brandao, M.L. 2002. The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res.* **950**: 186–194.
- Laxmi, T.R., Stork, O., and Pape, H.C. 2003. Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behav. Brain Res.* **145**: 89–98.
- Mackintosh, N.J. 1974. Classical conditioning: Basic operations. In *The psychology of animal learning*, pp. 8–40. Academic Press, London.
- Maren, S. 2001. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 897–931.
- Marks, I. and Tobena, A. 1990. Learning and unlearning fear: A clinical and evolutionary perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **14**: 365–384.
- McEwen, B.S. 2000. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* **886**: 172–189.

- McSweeney, F.K. and Swindell, S. 2002. Common processes may contribute to extinction and habituation. *J. Gener. Psychol.* **129**: 364–400.
- Myers, K.M. and Davis, M. 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* **36**: 567–584.
- Nader, K. 2003. Memory traces unbound. *Trends Neurosci.* **26**: 65–72.
- Öhman, A. and Mineka, S. 2001. Fears, phobias, and preparedness: Toward an evolved module of fear and fear learning. *Psychol. Rev.* **108**: 483–522.
- Petrinovich, L. and Widaman, K.F. 1984. An evaluation of statistical strategies to analyze repeated-measures data. In *Habituation, sensitization, and behavior* (eds. H.V.S. Peeke and L. Petrinovich), pp.157–201. Academic Press, Orlando, FL.
- Rescorla, R.A. and Wagner, A.R. 1972. A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In *Classical conditioning II: Current theory and research* (eds. A.H. Black and W.F. Prokasy), pp. 65–99. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Richardson, R. 2000. Shock sensitization of startle: Learned or unlearned fear? *Behav. Brain Res.* **110**: 109–117.
- Rosen, J.B. and Schulkin, J. 1998. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol. Rev.* **105**: 325–350.
- Sapolsky, R.M. 2003. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem. Res.* **28**: 1735–1742.
- Sara, S.J. 2000. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* **7**: 73–84.
- Schafe, G.E., Nader, K., Blair, H.T., and LeDoux, J.E. 2001. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: A cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.* **24**: 540–546.
- Stam, R., Buijnzeel, A.W., and Wiegant, V.M. 2000. Long-lasting stress sensitization. *Eur. J. Pharmacol.* **405**: 217–224.
- Thompson, R.F. and Spencer, W.A. 1966. Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol. Rev.* **73**: 16–43.
- Walker, D.L., Toufexis, D.J., and Davis, M. 2003. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress and anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* **463**: 199–216.
- Wiedemayer, C.P. 2004. Adaptations or pathologies? Long-term changes in brain and behavior after a single exposure to severe threat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**: 1–12.

Received April 2, 2004; accepted in revised form September 10, 2004.

Manuskript 3

Cannabinoid CB1 Receptor Mediates Fear Extinction via Habituation-Like Processes

Kornelia Kamprath,¹ Giovanni Marsicano,^{2,4} Jianrong Tang,¹ Krisztina Monory,^{2,4} Tiziana Bisogno,³ Vincenzo Di Marzo,³ Beat Lutz,^{2,4} and Carsten T. Wotjak¹

¹Neuronal Plasticity/Mouse Behavior Group and ²Molecular Genetics of Behavior Group, Max Planck Institute of Psychiatry, D-80804 Munich, Germany,

³Endocannabinoid Research Group, Institute Biomolecular Chemistry, 80078 Pozzuoli/Naples, Italy, and ⁴Department of Physiological Chemistry, Johannes Gutenberg University, 51099 Mainz, Germany

The interplay between fear expression and fear extinction provides an important prerequisite for adequate coping with aversive encounters. Current models propose that extinction of conditioned fear is mediated by associative safety learning. Here, we demonstrate that the cannabinoid CB1 receptor, which is crucially involved in fear extinction, is dispensable for associative safety learning. In fact, our results indicate that CB1 mediates fear extinction primarily via habituation-like processes. CB1 null-mutant mice were severely impaired not only in extinction of the fear response to a tone after fear conditioning but also in habituation of the fear response to a tone after sensitization with an inescapable footshock. Surprisingly, long-term habituation was generally affected even in situations with proper short-term adaptation, suggesting the existence of two separated CB1-dependent effector systems for short- and long-term fear adaptation. Our findings underscore the importance of habituation as a determinant of fear extinction in mice and characterize the cannabinoid CB1 receptor as an essential molecular correlate of this process.

Key words: sensitization; fear conditioning; anxiety; memory; endocannabinoids; stress

Introduction

In laboratory animals, a discrete stimulus (e.g., a tone) can elicit fear reactions (e.g., freezing) in multiple ways: for example, a tone may trigger an innate fear response in naive animals once its intensity exceeds a certain threshold (Ohman and Mineka, 2001; Lamprea et al., 2002). This threshold critically depends on the life history of the animals, because previous aversive encounters (e.g., a footshock) are able to sensitize animals to tones (Kamprath and Wotjak, 2004). Sensitization is a nonassociative learning process characterized by the general increase in responsiveness to potentially harmful stimuli after an aversive/stressful experience. Accordingly, inescapable footshocks result in long-lasting alterations in behavioral and endocrine parameters (Van Dijken et al., 1992a,b, 1993). On the other hand, if a tone was explicitly paired with a punishment, as done in fear conditioning paradigms, re-exposure to the tone activates the memory of the tone–punishment association and thus causes a conditioned freezing response (LeDoux, 2000; Maren and Quirk, 2004). In a typical fear-conditioning task, however, associative learning and sensitization (caused by application of an inescapable footshock during fear conditioning) may occur in parallel, with the consequence

that freezing responses of conditioned mice to the tone are determined by both associative and nonassociative memory components (Kamprath and Wotjak, 2004).

In an auditory fear-conditioning task, not only fear acquisition but also fear extinction can be achieved by associative and/or nonassociative learning processes. On the one hand, animals might form an association between the tone and the nonappearance of the predicted punishment (safety learning) that suppresses expression of the memory of the tone–shock association in a process called extinction (for review, see Myers and Davis, 2002). On the other hand, repeated nonreinforced tone presentations may decrease the responsiveness to the tone in the stimulus–response pathways because of habituation-like processes (Thompson and Spencer, 1966; Groves and Thompson, 1970; McSweeney and Swindell, 2002; Kamprath and Wotjak, 2004). In the recent years, molecular correlates of extinction were identified (for review, see Myers and Davis, 2002). Among them, the cannabinoid CB1 receptor (CB1) (for review, see Di Marzo et al., 2004) plays a special role, because its implication in extinction seems to be restricted to aversive test conditions: whereas genetic ablation or pharmacological blockade of CB1 impairs the extinction of fear memories (Marsicano et al., 2002; Suzuki et al., 2004; Chhatwal et al., 2005) and spatial memories acquired under stressful conditions (Varvel and Lichtman, 2002; Varvel et al., 2005), CB1 does not seem to be important for memory extinction in operant conditioning tasks involving positive reinforcement (Holter et al., 2005). One explanation might be that CB1 is not involved in associative extinction learning but rather plays a role in nonassociative learning processes (e.g., habituation), which contribute to the decrease in the fear response (Kamprath and

Received Jan. 13, 2006; revised April 5, 2006; accepted April 25, 2006.

This work was supported by VolkswagenStiftung Grants I/78 560 (B.L.), I/78 561 (V.D.M.), and I/78 562 (C.T.W.), Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Lu755/1-3 (B.L.), and by a Marie Curie Postdoctoral Fellowship to K.M. (Contract QLGI-CT-2002-51742).

Correspondence should be addressed to Dr. Carsten T. Wotjak at the above address. E-mail: wotjak@mpipsykl.mpg.de.

J. Tang's present address: Department of Neuroscience, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0153-06.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/266677-10\$15.00/0

Wotjak, 2004). Here, we tested this hypothesis by examining the role of CB1 in extinction and habituation of acquired fear responses. Our results point to an involvement of endocannabinoids in the modulation of habituation-like processes during fear extinction, whereas CB1 seems to be dispensable for associative safety learning.

Materials and Methods

Animals

All experiments were approved by the Committee on Animal Health and Care of the State of Bavaria (Regierung von Oberbayern) and performed in strict compliance with the European Union recommendations for the care and use of laboratory animals (86/609/CEE).

A total of 118 male cannabinoid CB1 receptor null-mutant mice (CB1^{-/-}), 135 male wild-type littermate controls (CB1^{+/+}), and 34 male C57BL/6NCrl mice (Charles River, Sulzfeld, Germany) were included in the experiments. CB1^{-/-} and CB1^{+/+} derived from heterozygous breeding pairs [backcrossed to C57BL/6NCrl to F5/F6 generation (Marsicano et al., 2002)] that were kept in the vivaria of the Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (Neuherberg, Germany) and the Max Planck Institute of Psychiatry in Munich, Germany. Mice were genotyped after weaning and regentyped at the end of the experiments as described previously (Marsicano et al., 2002).

All animals were separated at the age of 6–14 weeks and kept singly in standard macrolon type II cages with sawdust bedding (Altromin Faser Einstreu; Altromin, Lage-Lippe, Germany), water and food *ad libitum*, at 22 ± 2°C room temperature and 55 ± 5% humidity, under an inverse 12 h light/dark cycle (lights off at 8:00 A.M.) for at least 14 d before starting the experiment.

Experiments

All experiments were performed during the activity phase (dark phase) of the animals between 9:30 A.M. and 5:00 P.M. Experiments were designed to minimize the number of animals tested. Animals of a given experiment derived from the same batch and were tested simultaneously. Experiments were performed over the course of 3 years.

Conditioning, sensitization, backward conditioning, and unconditioned freezing. Setups and procedures were essentially the same as described previously (Kamprath and Wotjak, 2004). Briefly, two different contexts were used (conditioning chamber and test context) that differed considerably in material, shape, surface texture, bedding, and odor of the cleaning solutions. Mice received the footshocks via metal grid floors in the conditioning chamber (MED Associates, St. Albans, VT). Tones were generated by audio stimulus generators (MED Associates). The animals' behavior was videotaped.

For conditioning, mice were placed in the conditioning context. Three minutes later, a tone (80 dB, 9 kHz sine wave, 10 ms rising and falling time) was presented to the animals for 20 s that coterminated with a 2 s scrambled electric footshock of 0.7 mA. Mice were returned to their home cages 60 s later. For sensitization, mice were treated similarly to the conditioning procedure, except for the fact that only the 2 s footshock (0.7 mA) was presented, but not the tone. For backward conditioning, tone and footshock were presented in reverse order compared with the conventional conditioning procedure (i.e., mice perceived a 2 s footshock of 0.7 mA 198 s after insertion into the conditioning chamber that was immediately followed by a 20 s tone).

To measure the freezing response to the tone without confounding influences of contextual memory, sensitized and conditioned mice were placed into a neutral environment (test context), and the house light was switched on. Three minutes later, a 3 min tone was presented (9 kHz; 80 dB if not stated otherwise). Mice were returned to their home cages 60 s after the end of tone presentation. For measuring the innate fear response to the tone, naive mice underwent the same test procedure, but with a tone intensity of 95 dB without previous sensitization/conditioning procedures.

Recording of auditory-evoked potentials. CB1^{-/-} ($n = 12$) and CB1^{+/+} ($n = 12$) were chronically equipped with a bipolar recording electrode aimed at the CA1 region of the dorsal hippocampus essentially as described previously (Tang et al., 2003). A recovery period of 14 d was

followed by a test period, in which the optimal tone intensity for auditory-evoked potential recordings was defined for each animal and tone frequency (6 or 12 kHz). Furthermore, the stability of responses was assessed. Animals not showing stable auditory-evoked potentials were excluded from the experiment. Test recordings were followed by the experimental period, which consisted of 2 d of baseline recording, the conditioning day without recording, and 2 d of post-conditioning recording (compare Fig. 2A for the temporal schedule). At each recording day, mice were slightly anesthetized with isoflurane to connect them to the recording device (Tang et al., 2003) and placed into the test context. After a recovery period of 30 min, auditory-evoked potentials were triggered by series of 90 50 ms tones of either 6 or 12 kHz presented at one tone per second. The two tone series were separated by a 3 min interval. Tones of 6 kHz always preceded the tones of 12 kHz. Three days before conditioning (day -3), intensity–response curves were established for each animal and each tone frequency. Afterward, the intensity of the tones was adjusted individually to cause a 40–50% maximal excitatory field potential in the subsequent baseline recordings and kept constant throughout the experiment. Basal responses were recorded at days -2 and -1 before conditioning by presenting a single series of 6 and 12 kHz tones. If the basal responses were stable, mice were conditioned the next day (day 0). For each mouse, one of the two tone frequencies was chosen for the conditioned stimulus (CS) in a counterbalanced manner per genotype. The CS+ (paired tone) consisted of a series of 20 50 ms tones of the same characteristics as used for the baseline recordings. The CS+ coterminated with a 1 s footshock of 0.7 mA. The conditioning procedure was repeated two more times. We have made an effort to minimize the number of tone–shock pairings as well as the intensity of the shock. In our experience (J. Tang and C. T. Wotjak, unpublished observations), the protocol used here is the weakest procedure that consistently caused a potentiation of auditory-evoked potentials in wild-type mice. Most other experiments aimed at measuring learning-induced changes in auditory-evoked potentials used 5–10 tone–shock pairings (Rogan et al., 1997; Tang et al., 2001, 2003). For post-conditioning recordings, mice were transferred back to the electrophysiology laboratory, and the baseline procedure was repeated in the test context.

For data analysis, the 90 auditory-evoked potentials evoked by the 50 ms tones were averaged per tone series and recording day. Averaged auditory-evoked potentials were analyzed off-line by measuring peak latencies, amplitudes, and slopes of the most negative components as described previously (Tang et al., 2003). Data were normalized to the averaged preconditioning values (baseline, 100%) separately per animal and tone frequency.

After completion of the experiment, mice were deeply anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg), and an anodal current (200 μ A, 4 s) was passed through the tungsten wire to identify the electrode placement. Approximately 15 min later, animals were killed by an overdose of isoflurane and their brains were removed. Electrode placement was assessed in 20 μ m cryosections stained with cresyl violet. Animals with a misplaced recording electrode were excluded from analysis.

Drugs. SR141716A [Rimonabant, 3 mg/kg; kindly provided by the National Institute of Mental Health (Bethesda, MD) Chemical Synthesis and Drug Supply Program] was dissolved in vehicle solution (2.5% DMSO and 1 drop of Tween 80 per 3 ml of saline) and injected subcutaneously at 20 ml/kg body weight 30 min before the behavioral test. Injections were given under light isoflurane anesthesia.

Analyses

Behavioral analysis. The behavior of the mice was videotaped and scored off-line by trained observers that were blind to the animals' treatment as described previously (Kamprath and Wotjak, 2004). Freezing was defined as the absence of all movements, except for those related to respiration.

Statistical analysis. Data were summarized to distinct intervals, as indicated in the text or the figure legends, and normalized to the respective time. If not stated otherwise, data were analyzed by two-way (genotype/drug, interval) ANOVA for repeated measures (interval) separately per test day (analysis of the freezing data in 20 s intervals) or by two-way ANOVA (genotype/drug, day) for repeated measures (day; analysis of the

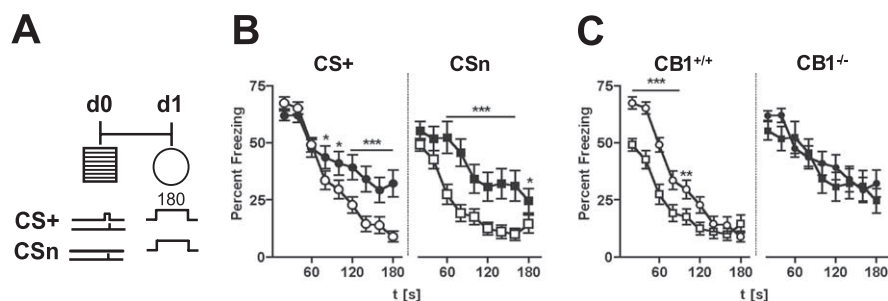


Figure 1. $CB1^{-/-}$ mice are impaired in within-session extinction and adaptation, but not in acquisition, of conditioned and sensitized fear. **A**, $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ littermate controls were either conditioned with a single tone–shock pairing or sensitized with a footshock only in the conditioning chamber. All animals were exposed to a 180 s tone in a neutral environment 24 h after the conditioning (CS+) and the sensitization (CSn) procedure, respectively. d0, Day 0; d1, day 1. **B**, Both conditioned $CB1^{-/-}$ (●, $n = 36$) and sensitized $CB1^{-/-}$ (■, $n = 20$) showed a sustained freezing response over the course of the 180 s tone presentation compared with the respective $CB1^{+/+}$ (○, $n = 37$; □, $n = 26$). **C**, As revealed by comparison of the freezing responses with the tone after conditioning (CS+; ●, ○) and sensitization procedures (CSn; ■, □) separately per genotype, conditioned $CB1^{+/+}$ showed a stronger freezing response than sensitized $CB1^{+/+}$, whereas conditioned and sensitized $CB1^{-/-}$ froze at the same level. Data were normalized to the 20 s observation intervals (mean \pm SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus $CB1^{+/+}$ (**B**) or sensitized $CB1^{+/+}$ (**C**). CS+, Tone after conditioning procedure; CSn, tone after sensitization procedure.

freezing data averaged over the entire 3 min observation period). *Post hoc* comparisons were performed by the Newman–Keuls test, if appropriate. Statistical significance was accepted if $p < 0.05$. For the sake of clarity and brevity, only relevant results of the statistical analyses are reported. Statistical analyses were performed by specialized software [GraphPad Prism 3.0 (GraphPad, San Diego, CA), Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK), and SPSS version 11.0 (SPSS, Chicago, IL)].

Results

We refer to procedures with tone–shock pairings as conditioning procedures, with reverse order of shock and tone presentation as backward conditioning (“safety learning”) and with shock presentation only as sensitization procedures. The term “sensitization” describes the general increase in responsiveness to potentially harmful stimuli after perception of a punishment, on the basis of nonassociative learning processes. Accordingly, we call mice that underwent sensitization procedures sensitized mice and mice that underwent conditioning procedures conditioned mice. The freezing response of naive (i.e., nonshocked) mice to a tone is called unconditioned freezing or innate fear response. Fear adaptation generally describes the development of the fear response to a tone. More specifically, the decrease in freezing over the course of tone presentation is called within-session extinction after conditioning and within-session adaptation after sensitization procedures. Accordingly, the decrease in freezing from the first to a second tone presentation is called long-term extinction and long-term adaptation/habituation, respectively.

$CB1^{-/-}$ mice are impaired in within-session extinction and adaptation, but not in acquisition, of conditioned and sensitized fear

CB1 plays a crucial role in extinction of the freezing response after fear-conditioning procedures (Marsicano et al., 2002). We wondered whether CB1 is involved in processing of associative or nonassociative memory components that determine extinction of the freezing response of conditioned mice (Kamprath and Wotjak, 2004). Because sensitization of a behavioral response is thought to be a nonassociative learning process that is diminished by counteracting nonassociative adaptation processes (Kamprath and Wotjak, 2004), we compared the tone-induced freezing responses of mice with genetic ablation of CB1 [$CB1^{-/-}$

(cf. Marsicano et al., 2002)] with that of their wild-type littermate controls ($CB1^{+/+}$) after conditioning and sensitization procedures.

For conditioning, $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ received a 0.7 mA footshock in the conditioning chamber in association with a 20 s, 80 dB tone. On the next day, mice were re-exposed to the same tone in a novel environment (test context) for 3 min (Fig. 1A). $CB1^{-/-}$ showed a prolonged freezing reaction to the tone compared with $CB1^{+/+}$ (genotype: $F_{(1,71)} = 4.0$, $p = 0.049$; genotype-by-interval interaction: $F_{(8,568)} = 9.5$, $p < 0.0001$) (Fig. 1B), thus confirming our previous observation of impaired within-session extinction in $CB1^{-/-}$ (Marsicano et al., 2002; Cannich et al., 2004). It is of note that both genotypes showed similar freezing in the very beginning of the first nonreinforced tone presentation after the conditioning procedure pointing to a normal acquisition of

fear conditioning in $CB1^{-/-}$ (Marsicano et al., 2002).

For sensitization, $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ received a 0.7 mA footshock in the conditioning chamber without any tone presentation. Mice were subsequently exposed to a 3 min tone in a novel environment (test context) on the next day, similarly to conditioned mice (Fig. 1A). Again, $CB1^{-/-}$ mice showed a prolonged and stronger freezing reaction to the tone compared with $CB1^{+/+}$ (genotype: $F_{(1,44)} = 9.7$, $p = 0.003$; genotype-by-interval interaction: $F_{(8,352)} = 3.5$, $p < 0.001$) (Fig. 1B). Importantly, both $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ showed the same levels of freezing at the beginning of tone presentation, indicating that CB1 is not involved in the sensitization process per se. Taking into consideration that the freezing response to a tone after inescapable footshocks is primarily determined by sensitization and nonassociative adaptation processes, the sustained freezing response of $CB1^{-/-}$ over the course of tone presentation suggests that CB1 deficiency delays fear adaptation in a nonassociative manner.

To estimate the contribution of associative memory components to the freezing response of the animals, we compared the freezing response of conditioned and sensitized mice separately per genotype. As expected, conditioned $CB1^{+/+}$ showed significantly more freezing to the tone than sensitized $CB1^{+/+}$ (CS: $F_{(1,61)} = 8.8$, $p = 0.004$; CS-by-interval interaction: $F_{(8,488)} = 8.2$, $p < 0.0001$) (Fig. 1C), indicating that fear conditioning comprises the parallel processing of a stimulus–punishment association and nonassociative sensitization with the consequence that associative and nonassociative memory components together determine the freezing response after conditioning procedures (Kamprath and Wotjak, 2004). In contrast, $CB1^{-/-}$ showed a similar freezing response to a tone, no matter whether they had received a shock only or whether the tone had been paired with a shock before (CS: $F_{(1,54)} = 0.3$, $p = 0.582$; CS-by-interval interaction: $F_{(8,432)} = 1.6$, $p = 0.117$) (Fig. 1C). At first sight, these data imply that $CB1^{-/-}$ were not able to associate tone and footshock during the conditioning procedure, with the consequence that their freezing response was solely determined by nonassociative memory components. However, an intact tone–shock association in $CB1^{-/-}$ cannot be entirely ruled out by behavioral data alone, because an impaired adaptation of nonassociative memory com-

ponents might simply have masked differences in freezing between conditioned and sensitized CB1^{-/-}. Therefore, we decided to investigate whether CB1^{-/-} are able to form an associative memory at all by electrophysiological means. To this end, we recorded auditory-evoked potentials in the CA1 region of the dorsal hippocampus of freely behaving CB1^{-/-} and CB1^{+/+}. Evidence exists that conditioning-related changes in auditory-evoked potentials recorded from the lateral amygdala and the CA1 region are exclusively determined by the associative history of the CS (Goossens et al., 2003; Tang et al., 2003). Because both brain structures show a high synchronicity in memory-related changes in neuronal activity (Seidenbecher et al., 2003; Tang et al., 2003), we targeted the more easily accessible CA1 region instead of the lateral amygdala. Moreover, we confirmed that recall of auditory cued fear memories activates the endocannabinoid system not only within the amygdala (Marsicano et al., 2002) but also within the dorsal hippocampus (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Potentiation of auditory-evoked potentials after auditory fear conditioning points to normal memory of the tone–shock association in CB1^{-/-} mice

Mice were chronically equipped with a recording electrode aimed at the CA1 region of the dorsal hippocampus and tested in a discriminatory fear-conditioning task (Fig. 2A). At first, both 6 and 12 kHz tones were presented to the animals at 2 consecutive days to record a stable baseline. For conditioning, only one of these frequencies was used (i.e., series of either 6 or 12 kHz tones were paired with a footshock). At the 2 d after conditioning, series of both 6 and 12 kHz tones were presented to the mice to assess frequency-specific potentiation of auditory-evoked potentials.

Of the 24 animals equipped with electrodes, 11 showed stable responses to the tone series with correct placement of the electrode in the CA1 region of the dorsal hippocampus (Fig. 2B). During test recordings, CB1^{-/-} ($n = 5$) and CB1^{+/+} ($n = 6$) showed a similar sensitivity to 6 and 12 kHz tones of increasing intensity (data not shown). Furthermore, there were no genotype differences in basic characteristics of the auditory-evoked potentials assessed at days -2 and -1 before the conditioning procedure (Table 1). Fear conditioning led to a significant potentiation of amplitude [CS: $F_{(1,9)} = 13.6$, $p = 0.005$; time: $F_{(3,27)} = 6.9$, $p = 0.001$; CS-by-time interaction: $F_{(3,27)} = 5.7$, $p = 0.004$; three-way ANOVA (genotype, CS, time) for repeated measures (CS, time)] (Fig. 2C) and slope (CS: $F_{(1,9)} = 11.8$, $p = 0.007$; time: $F_{(3,27)} = 14.4$, $p < 0.0001$; CS-by-time interaction: $F_{(3,27)} = 8.1$, $p = 0.001$) (Fig. 2D) of the most-negative-going component of the field EP-

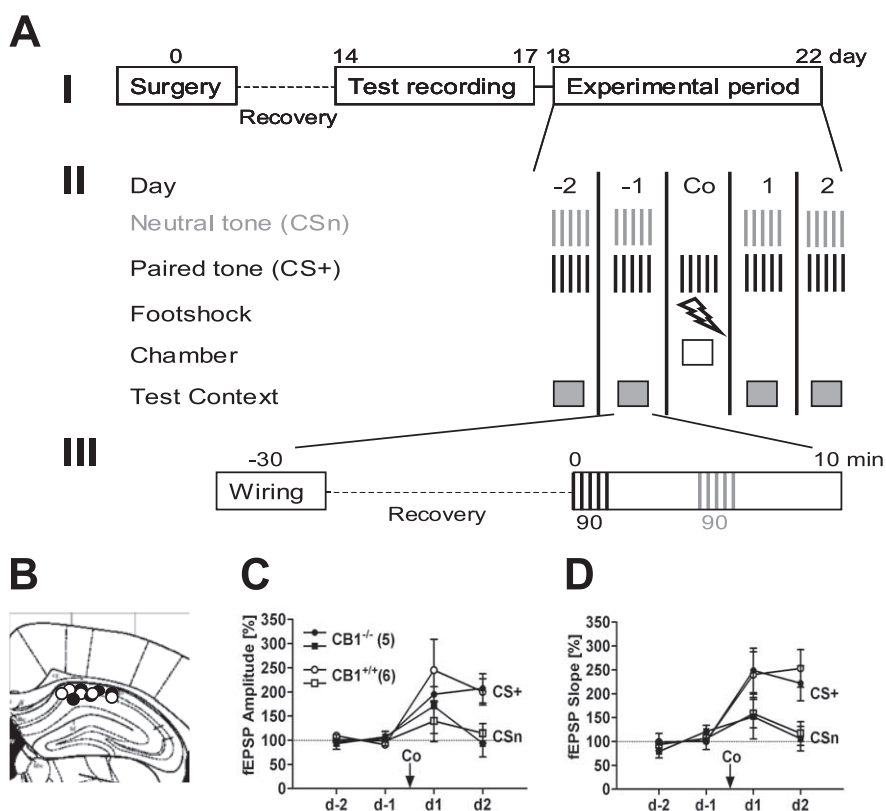


Figure 2. CB1 deficiency does not affect the formation of associative fear memories. **A**, Experimental procedure of the discriminatory fear-conditioning task. **I**, General timetable of the experiments. CB1^{-/-} ($n = 5$) and CB1^{+/+} ($n = 6$) were chronically equipped with a recording electrode aimed at the CA1 region of the dorsal hippocampus. After a recovery period of 14 d, the optimal tone intensity for auditory-evoked potential recordings ($\sim 40\%$ of maximal response) was defined per animal and tone frequency (6 and 12 kHz), followed by measurement of the stability of the responses (test recording). **II**, Schematic representation of the procedures used in the experimental period. Conditioning was performed after 2 d of baseline recordings. At the conditioning day, a series of 20 50 ms tones of either 6 or 12 kHz coterminated with an electric footshock (flash) in the conditioning chamber. The conditioning procedure was repeated two times. Tone series of the frequency used for the conditioning procedures were termed paired tones, and those of the other frequency, which was not presented at the conditioning day, were termed neutral tones. Tone frequencies for the conditioning procedure were counterbalanced among the animals of a given genotype. During the two preconditioning and the two postconditioning days, paired and neutral tones were presented in the neutral test context. **III**, Time schedule for a recording day. Animals were slightly anesthetized with isoflurane to connect the electrode assembly to the recording hardware. After a 27 min recovery period, the video recorder was switched on. Three minutes later, two 90 tone series, one of 6 kHz and the other of 12 kHz, were presented at a 3 min interval. **B**, Schematic brain section according to Franklin and Paxinos (1997) showing the correct placement of the electrodes within the CA1 region of the dorsal hippocampus in CB1^{-/-} (●) and CB1^{+/+} (○). **C**, **D**, Both amplitude (**C**) and slope (**D**) of the most-negative-going component of the auditory-evoked potentials were potentiated for the paired tone (●, ○) but not for the neutral tone (■, □) after conditioning. Data (mean \pm SEM) were normalized individually to the averaged preconditioning responses (dotted line, 100%). ■ and ●, CB1^{-/-}; □ and ○, CB1^{+/+}. Co, Conditioning day; CS+, paired tones; CSn, neutral tones; fEPSP, field EPSP.

SPs evoked by the paired tones, with no significant differences between CB1^{-/-} and CB1^{+/+} in either parameter (genotype: $F_{(1,9)} < 0.06$, $p > 0.810$; CS by genotype: $F_{(1,9)} < 0.4$, $p > 0.560$; CS by time by genotype: $F_{(1,9),9} < 1.3$, $p > 0.300$).

These data show that genetic ablation of CB1 does not alter the potentiation of auditory-evoked potentials induced by the formation of a tone–shock association, indicating that both CB1^{+/+} and CB1^{-/-} were able to discriminate between paired and neutral tones and therefore to form an associative memory component during fear conditioning. There is still the option that CB1^{-/-} might be able to form a tone–shock association after three tone–shock pairings (as used here) but not after a single tone–shock pairing, as used in the behavioral experiments. However, the similar initial freezing response of CB1^{-/-} and CB1^{+/+} at day 1 (Fig. 1B) as well as our previous study showing that

Table 1. Basic characteristics of auditory-evoked potentials evoked by tone series of two different frequencies within the CA1 region of the dorsal hippocampus in $CB1^{-/-}$ ($n = 5$) and $CB1^{+/+}$ ($n = 6$) during the baseline period day -2 and day -1 (compare Fig. 2)

Genotype	6 kHz			12 kHz		
	Latency (ms)	Amplitude (μV)	Slope ($\mu V/ms$)	Latency (ms)	Amplitude (μV)	Slope ($\mu V/ms$)
$CB1^{-/-}$	28.9 ± 2.2	195.6 ± 44.3	-24.6 ± 6.0	28.1 ± 1.8	172.3 ± 41.3	-21.2 ± 3.9
$CB1^{+/+}$	27.3 ± 3.1	113.4 ± 25.0	-21.3 ± 4.5	27.3 ± 2.6	144.7 ± 25.3	-26.3 ± 5.5

None of these parameters differed significantly between the two genotypes and the two tone frequencies (genotype: $F_{(1,10)} < 1.9, p > 0.202$; frequency: $F_{(1,10)} < 0.5, p > 0.510$; genotype by frequency: $F_{(1,10)} < 1.6, p > 0.240$).

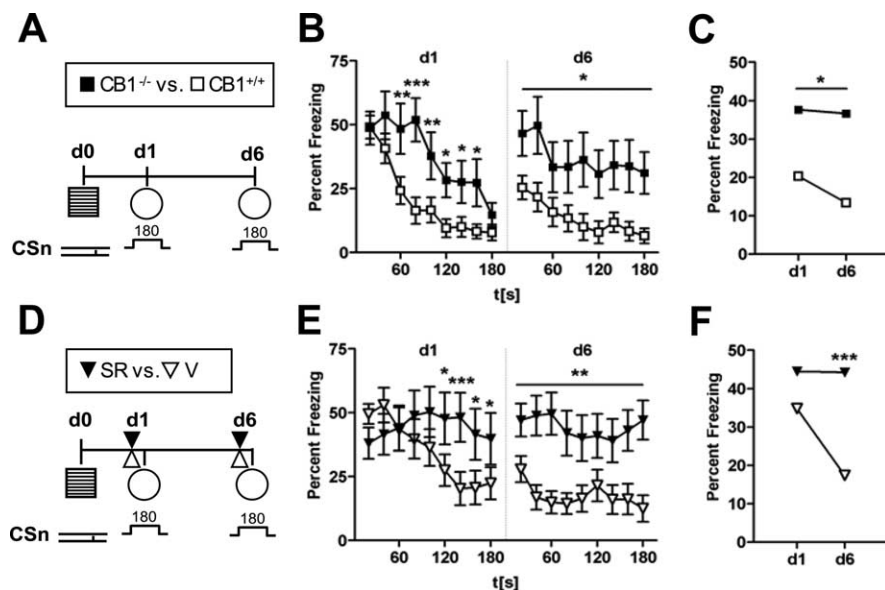


Figure 3. $CB1$ deficiency impairs both within-session and long-term adaptation of sensitized fear. **A, D**, Mice with genetic ablation of $CB1$ (**A**; $CB1^{-/-}$, $n = 10$; $CB1^{+/+}$, $n = 15$; included in Fig. 1*B*) and inbred mice with acute pharmacological blockade of $CB1$ before tone presentation [**D**; 3 mg/kg SR141716A (SR), $n = 17$; vehicle (V), $n = 17$] were exposed to a 180 s tone not only 1 d but also 6 d after sensitization. **B, E**, Genetic ablation (**B**) and pharmacological inactivation (**E**) of $CB1$ caused similar impairments in the decrease in sensitized fear during the first tone presentation. These impairments became even more pronounced during the second tone presentations (mean \pm SEM). **C, F**, Both genetic ablation (**C**) and acute pharmacological blockade (**F**) of $CB1$ impaired the long-term decrease in the freezing response from the first to the second tone presentation (mean). Data were normalized either to 20 s observation intervals (**B, D**) or to the entire 180 s observation period (**C, F**). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CSn, Tone after sensitization procedure; \blacksquare , $CB1^{-/-}$; \square , $CB1^{+/+}$; \blacktriangledown , C57BL/6N mice treated with 3 mg/kg SR141716A; \triangledown , C57BL/6N mice treated with vehicle; d0, day 0; d1, day 1; d6, day 6.

pharmacological blockade of $CB1$ before tone re-exposure, but not before conditioning, leads to a sustained freezing response to the tone (Marsicano et al., 2002) strongly argue against impairments in memory acquisition because of $CB1$ deficiency. Consequently, the similarities in the freezing response of conditioned and sensitized $CB1^{-/-}$ (Fig. 1*C*) cannot be explained by impairments in the formation of associative memories (Varvel and Lichtman, 2002; Cannich et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Holter et al., 2005; Varvel et al., 2005), but rather by alterations in the processing of nonassociative memory components after fear conditioning and sensitization procedures.

To further characterize the role of $CB1$ in fear extinction, from now on we mainly focused on sensitization experiments, because nonassociative memories are directly accessible in such tasks and not confounded by the behavioral expression of associative memory components. Importantly, the nonassociative nature of the sensitization procedures could be confirmed in a control experiment, which demonstrates not only that the increased freezing response to the tone after sensitization persists for ~ 1 month but also that it is independent from contextual memory/context generalization (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). To substantiate this conclusion, we ad-

ditionally analyzed freezing responses to the novel context before tone presentation and observed either no or no consistent involvement of $CB1$ that would support the idea that alterations in context generalization or interference learning could explain the sustained freezing response of $CB1^{-/-}$ to the tone (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

$CB1$ controls both within-session and long-term fear adaptation after sensitization

In previous studies, we showed that $CB1^{-/-}$ are impaired in both within-session extinction and long-term extinction after fear conditioning (Marsicano et al., 2002; Cannich et al., 2004). Now we investigated the role of $CB1$ in the decrease in the freezing response after repeated tone presentations after sensitization procedures (Fig. 3*A*). $CB1^{-/-}$ showed a prolonged and stronger freezing reaction to the tone than $CB1^{+/+}$ not only during the first tone presentation (genotype: $F_{(1,23)} = 7.0, p = 0.014$; genotype by interval: $F_{(8,184)} = 2.9, p = 0.004$) but also during the second tone presentation 5 d later (genotype: $F_{(1,22)} = 7.8; p = 0.010$) (Fig. 3*B*). The same was the case in wild-type C57BL/6N mice with pharmacological blockade of $CB1$ with SR141716A before tone presentation (Fig. 3*D*), both at day 1 (drug by interval: $F_{(8,256)} = 5.4, p < 0.0001$) and at day 6 (drug: $F_{(1,32)} = 9.8; p = 0.003$) (Fig. 3*E*). Accordingly, analysis of the development of the total freezing response from day 1 to day 6 revealed significant effects of genotype ($F_{(1,22)} = 7.3; p = 0.012$) (Fig. 3*C*) and drug ($F_{(1,32)} = 4.7; p = 0.036$) as well a significant drug-by-day interaction ($F_{(1,32)} = 4.7; p = 0.037$) (Fig. 3*F*). Whereas $CB1^{+/+}$ showed a decrease in freezing from day 1 to day 6 ($t_{(14)} = 2.3; p = 0.039$; paired t test), $CB1^{-/-}$ failed to do so ($t_{(9)} = 0.24; p = 0.815$) (Fig. 3*C*). Also, vehicle-treated ($t_{(16)} = 4.5; p < 0.0001$) but not antagonist-treated ($t_{(16)} = 0.03; p = 0.971$) C57BL/6N mice (Fig. 3*F*) showed a significant decrease in freezing from day 1 to day 6. Together, these data demonstrate that the phenotype of $CB1^{-/-}$ cannot be ascribed to developmental effects of the mutation or altered fear sensitization but to an acute involvement of $CB1$ in within-session and in long-term fear adaptation.

$CB1^{-/-}$ mice show normal safety learning

In general, the impairment of $CB1^{-/-}$ in extinction of the fear response could be explained by an involvement of $CB1$ either in inhibitory associative (i.e., safety) learning [tone–no shock association (Myers and Davis, 2002)] or in habituation-like processes

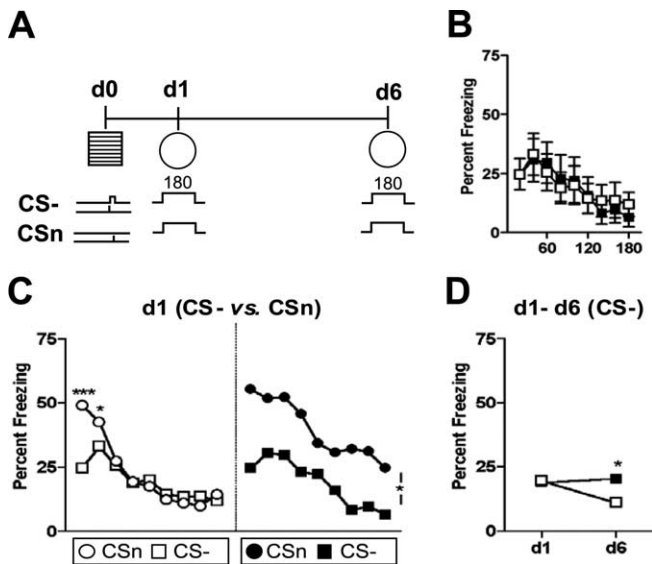


Figure 4. CB1 deficiency does not affect safety learning in a backward conditioning task. **A**, Both CB1^{-/-} and CB1^{+/+} underwent a backward conditioning procedure in the conditioning chamber, during which application of the footshock preceded the presentation of the 20 s tone. Mice were re-exposed to the tone for 180 s in the test context the next day and 6 d later. **B**, CB1^{-/-} (■, *n* = 10) and CB1^{+/+} (□, *n* = 12) showed the same freezing response to the tone at day 1 after the backward conditioning procedure (mean ± SEM). **C**, Both CB1^{-/-} and CB1^{+/+} showed a significantly smaller freezing response to the tone after the backward conditioning procedure compared with the respective sensitized mice (●, ○; compare Fig. 1C). **D**, CB1^{+/+}, but not CB1^{-/-}, showed a decrease in the freezing responses to the tones from day 1 to day 6 (mean). Data were normalized either to 20 s observation intervals (**B**, **C**) or to the entire 180 s observation period (**D**). **p* < 0.05; ****p* < 0.001. ■ and ●, CB1^{-/-}; □ and ○, CB1^{+/+}. CS-, tone after backward conditioning procedure; CSn, tone after sensitization procedure; d0, day 0; d1, day 1; d6, day 6.

(McSweeney and Swindell, 2002; Kamprath and Wotjak, 2004). The first option seems to be unlikely, because CB1 is dispensable for the formation of associative memories (i.e., tone–shock associations) (Figs. 1, 2) and extinction in an appetitive conditioning task (Holter et al., 2005). Nevertheless, because acquisition and extinction of fear behavior could rely on different molecular mechanisms (Suzuki et al., 2004), CB1 could be specifically implicated in extinction of aversive memories through the formation of “tone–no shock” associations. To address this possibility, we tested the tone–no shock association (i.e., safety learning) of CB1^{-/-} in a backward conditioning task (Moscovitch and LoLordo, 1968; Mackintosh, 1974), in which the shock preceded the tone presentation (Fig. 4A). After this procedure, there were no significant differences between CB1^{-/-} and CB1^{+/+} in the freezing response to the tone on the next day (Fig. 4B and data not shown). However, both CB1^{+/+} and CB1^{-/-} froze at substantially lower levels than the respective sensitized mice (compare Fig. 1B), indicating that not only CB1^{+/+} (protocol by interval: $F_{(8,288)} = 4.5$, $p < 0.0001$) (Fig. 4C) but also CB1^{-/-} (protocol: $F_{(1,28)} = 5.6$, $p = 0.025$) (Fig. 4C) were able to form an inhibitory association between the tone and the shock that partially suppressed expression of sensitized fear.

Importantly, although the two genotypes froze at comparable levels at day 1, they differed in the development of the freezing response from day 1 to day 6 (genotype by day: $F_{(1,20)} = 6.4$, $p = 0.020$) (Fig. 4D) with CB1^{+/+} ($t_{(11)} = 3.1$; $p = 0.001$; paired *t* test) but not CB1^{-/-} ($t_{(9)} = 0.5$; $p = 0.606$) decreasing their freezing response on repeated tone presentation. Because safety learning seems to be intact in CB1^{-/-}, these differences point to an involvement of CB1 in long-term habituation.

CB1^{-/-} mice are impaired in long-term habituation to a tone

To test whether CB1 receptors are generally involved in habituation to a tone, we exposed naive (nonshocked) CB1^{+/+} and CB1^{-/-} mice to a loud 3 min tone of 95 dB at days 1 and 6 (Fig. 5A). At day 1, CB1^{-/-} and CB1^{+/+} showed a similar freezing response to this loud tone (genotype: $F_{(1,26)} = 0.0$, $p = 0.952$; interval: $F_{(8,208)} = 31.0$, $p < 0.0001$; genotype-by-interval interaction: $F_{(8,208)} = 0.4$, $p = 0.919$) (Fig. 5B), indicating that CB1 does not affect perception of and behavioral response to a loud tone. At day 6, however, CB1^{-/-} consistently froze at higher levels than CB1^{+/+} (genotype: $F_{(1,26)} = 5.3$, $p = 0.029$) (Fig. 5B), with no difference in baseline freezing (supplemental Fig. 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Comparison of the development of the total freezing response from day 1 to day 6 revealed a significant genotype-by-day interaction ($F_{(1,26)} = 5.8$; $p = 0.022$), reflecting the inability of CB1^{-/-} ($t_{(12)} = 0.3$; $p = 0.803$; paired *t* test) but not CB1^{+/+} ($t_{(14)} = 6.0$; $p < 0.0001$) to decrease their freezing response from day 1 to day 6 (Fig. 5C). These data indicate that CB1 plays an important role in long-term habituation to an aversive tone in mice without previous shock experience, even in situations when CB1 is not acutely involved in within-session adaptation during the first tone presentation.

Impairments in the decrease in freezing to a tone in sensitized CB1^{-/-} mice relate to impaired habituation

To confirm that CB1-mediated habituation processes are responsible for the decrease in freezing after repeated tone presentation in sensitized mice, we studied the consequences of pre-exposure to a 3 min tone of 80 dB on the freezing response to the same tone presented 1 and 6 d after sensitization (Fig. 6A). If long-term habituation processes indeed account for adaptation of acquired fear responses, as assessed during a second tone presentation, it should not matter whether the first tone presentation (i.e., the induction of long-term habituation to that stimulus) occurred before or after the sensitization procedure (Kamprath and Wotjak, 2004). Indeed, on day 1 after the sensitization procedure, CB1^{+/+} with pre-exposure to the tone froze significantly less than CB1^{+/+} without tone pre-exposure (protocol: $F_{(1,31)} = 11.1$, $p = 0.002$; protocol by interval: $F_{(8,248)} = 2.8$, $p = 0.006$) (Fig. 6B). Moreover, CB1^{+/+} showed similarly low freezing levels during the second tone presentation, regardless of whether the first tone presentation occurred before or after the sensitization procedure (Fig. 6D). CB1^{-/-}, in contrast, showed a strong freezing response at day 1 (protocol: $F_{(1,25)} = 0.3$, $p = 0.541$; protocol by interval: $F_{(8,200)} = 1.3$, $p = 0.228$) (Fig. 6B), regardless of whether the tone was previously presented or not. Noteworthy, tone pre-exposure at day 5 (Fig. 6A) elicited only a negligible freezing response compared with mice without tone presentation (CB1^{+/+}: $3.0 \pm 0.7\%$ vs $0.1 \pm 0.0\%$; CB1^{-/-}: $3.7 \pm 1.6\%$ vs $0.5 \pm 0.2\%$) with no differences between the two genotypes (statistics not shown), indicating that expression of fear is not necessary for induction of CB1-dependent long-term habituation to the tone.

At day 6, CB1^{-/-} showed a generally increased freezing response compared with CB1^{+/+} (genotype: $F_{(1,56)} = 10.6$, $p = 0.002$) (Fig. 6C), independently of the protocol [genotype by protocol: $F_{(1,56)} = 0.0$, $p = 0.902$; genotype by protocol by interval: $F_{(8,448)} = 0.8$, $p = 0.602$; three-way ANOVA (genotype, protocol, interval) for repeated measures (interval)]. As illustrated in Figure 6E, CB1^{-/-} were not at all able to adapt to the tone, despite repeated tone presentations [genotype: $F_{(1,56)} = 5.0$, $p = 0.029$; genotype by day: $F_{(1,56)} = 15.8$, $p < 0.001$; genotype by protocol

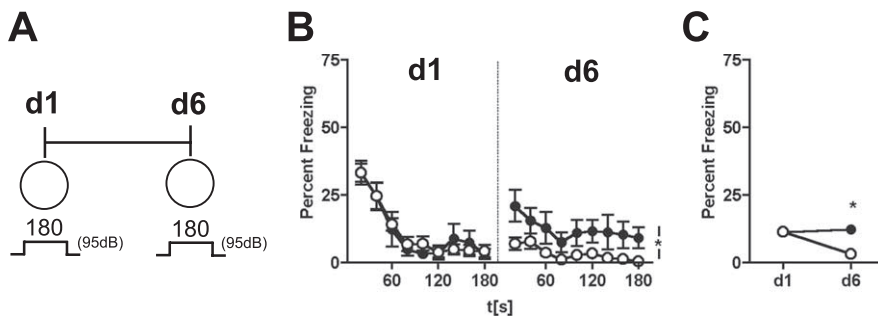


Figure 5. CB1 deficiency impairs long-term habituation to a loud tone. **A**, Naive CB1^{-/-} ($n = 13$) and CB1^{+/+} ($n = 15$) were exposed to a loud tone of 95 dB at days 1 and 6. **B**, CB1^{-/-} and CB1^{+/+} showed a similar short-term habituation to the first tone presentation but differed in their freezing response to the second tone presentation (mean \pm SEM). **C**, CB1^{+/+}, but not CB1^{-/-}, showed a decrease in the freezing responses to the tones from day 1 to day 6 (mean). Data were normalized either to 20 s observation intervals (**B**) or to the entire 180 s observation period (**C**). * $p < 0.05$. ●, CB1^{-/-}; ○, CB1^{+/+}; d1, day 1; d6, day 6.

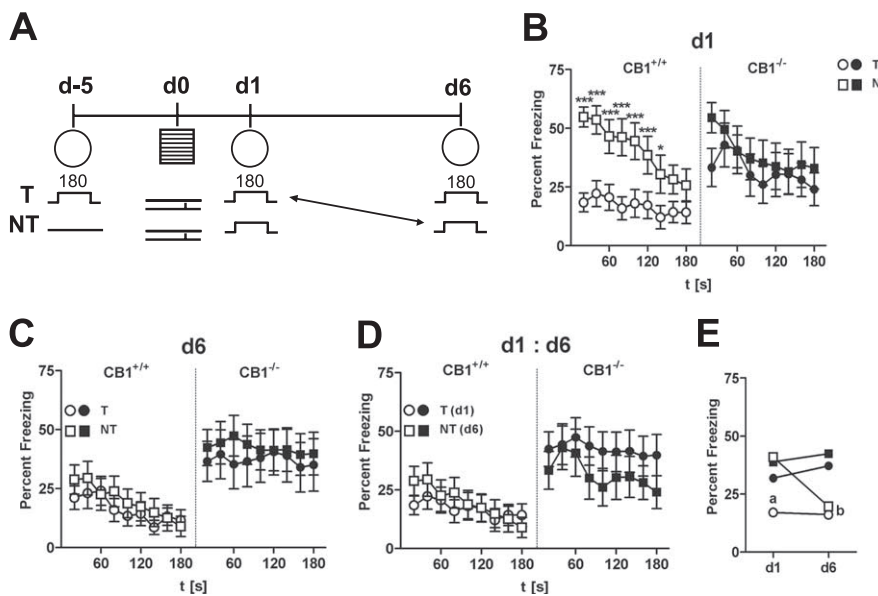


Figure 6. Impaired long-term adaptation in CB1-deficient mice after sensitization results from impaired long-term habituation. **A**, CB1^{-/-} and CB1^{+/+} were randomly assigned to one of two groups. Mice of the first group [tone (T); CB1^{-/-}, $n = 12$; CB1^{+/+}, $n = 17$] were exposed to a 180 s tone in the test context 5 d before the sensitization procedure. Mice of the second group [no tone (NT); CB1^{-/-}, $n = 15$; CB1^{+/+}, $n = 16$] were also placed into the test context 5 d before the sensitization procedure, but without tone presentation. All mice were exposed to 180 s tones at days 1 and 6 after sensitization with a single 0.7 mA footshock. **B**, Freezing response to the tone at day 1. **C**, Freezing responses to the tone at day 6. **D**, Freezing response to the second tone presentation of mice with (T, day 1) and without (NT, day 6) tone presentation before the sensitization procedure. **E**, Development of the freezing responses to the tones from days 1–6. Data were normalized either to 20 s observation intervals (mean \pm SEM; **B–D**) or to the entire 180 s observation period (mean; **E**). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ^a $p < 0.001$ versus all other groups; ^b $p < 0.0005$ versus the two CB1^{-/-} groups. ■, CB1^{-/-} without tone pre-exposure; ●, CB1^{-/-} with tone pre-exposure; □, CB1^{+/+} without tone pre-exposure; ○, CB1^{+/+} with tone pre-exposure; d-5, 5 d before the sensitization procedure; d0, day 0; d1, day 1; d6, day 6.

by day: $F_{(1,56)} = 5.7$, $p = 0.021$; three-way ANOVA (genotype, protocol, day) for repeated measures (day)]. *Post hoc* analyses revealed that, at day 1, only CB1^{+/+} with pre-exposure to the tone froze significantly less than all of the other groups ($p < 0.001$). At day 6, both CB1^{+/+} groups (with and without pre-exposure to the tone) froze at similar levels and considerably less than CB1^{-/-} ($p < 0.001$). In accordance with our previous observations in naive mice (compare Fig. 5C), in mice after sensitization (Fig. 3, compare C, F), and in mice after backward conditioning procedures (compare Fig. 4D), CB1^{+/+} without pre-exposure to the tone showed a significant decrease in freezing from day 1 to day 6 ($t_{(15)} = 32.6$; $p < 0.0001$; paired t test),

whereas the two CB1^{-/-} groups failed to do so ($t < 1.2$; $p > 0.297$).

Together, these data demonstrate that in wild-type mice, the decrease in freezing on repeated tone presentation is independent of whether the first tone presentation occurred before or after the sensitization procedure. In CB1-deficient mice, in contrast, pre-exposure to the tone failed to significantly affect the freezing response to a second tone presentation. The most parsimonious interpretation of these observations is that CB1 plays a central role in long-term habituation to the tone and that CB1-dependent habituation primarily accounts for the decrease in acquired fear after sensitization procedures.

Discussion

Extinction of aversive memories involves at least two different processes: learning about the association between a stimulus and the nonappearance of a punishment [here called safety learning (cf. Myers and Davis, 2002)] and habituation to a repeatedly presented stimulus (cf. McSweeney and Swindell, 2002; Kamprath and Wotjak, 2004). Recent work has shown that different molecular mechanisms relate to different aspects of extinction processing. NMDA receptors, for instance, seem to mediate predominantly associative memory components of extinction (Falls et al., 1992; Santini et al., 2001; Walker et al., 2002). The same is the case for L-type voltage-gated calcium channels (Cain et al., 2002), which are also involved in latent inhibition but not in reduced contingency effects (Cain et al., 2005). Calcineurin, in contrast, mediates extinction by circuit depotentiation (i.e., weakening of the original signaling) (Lin et al., 2003).

Although extinction of conditioned fear critically depends on the endocannabinoid system of the brain (Marsicano et al., 2002; Cannich et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Chhatwal et al., 2005), the mechanism by which CB1 mediates fear extinction remained speculative. This study points to a specific involvement of the endocannabinoid system in the habituation component of fear extinction. However,

besides habituation, there are still alternative explanations for the data of the present study. For example, the experiment using tone pre-exposure (Fig. 6) strongly resembles latent inhibition procedures, in which pre-exposure to the to-be CS (e.g., a tone) before conditioning results in a decreased conditioned response (e.g., freezing) after conditioning (for review, see Lubow, 1973). When we applied tone pre-exposure before sensitization, we observed a decreased freezing response to the tone after sensitization in CB1^{+/+} but not in CB1^{-/-}. Thus, CB1^{-/-} are possibly impaired in latent inhibition, which belongs, like extinction, to interference paradigms. However, we did not use a true latent inhibition

paradigm because we used sensitization instead of conditioning: Mice received tone pre-exposure in the test context; 5 d later they were sensitized in a different context without tone presentation and re-exposed to the tone in the test context. To obtain interference in terms of latent inhibition, the animals should generalize between the different contexts (Bouton, 1993).

Context generalization is known to be a general problem of shock-sensitization paradigms, which relates to the fact that the procedure of shock sensitization is essentially the same as the contextual fear-conditioning procedure. The important difference between these paradigms relates to the test stimuli used for memory retrieval: in contextual fear conditioning, the response to the conditioning context is tested, and in sensitization, the response to an unrelated (“nonassociative”) stimulus is tested in a different context. Because shock sensitization of the startle response, which was originally attributed to nonassociative processes (Davis, 1989), was shown to relate to context generalization (Richardson, 2000), the nonassociative nature of fear responses after sensitization is arguable. Thus, freezing responses to the tone after sensitization could be attributed to the fact that the entire experimental procedure, including experimental handling, signals the aversive experience, thus leading to interference learning and context generalization. However, after a contextual fear-conditioning/sensitization procedure, both CB1^{-/-} and CB1^{+/+} displayed less conditioned freezing to the “shock context” than to an unconditioned tone in a different context [supplemental Fig. 2 (available at www.jneurosci.org as supplemental material) vs Fig. 3], indicating that the animals used in our experiments are inferior in contextual learning. On repeated non-reinforced exposures to the shock context, CB1^{-/-} initially developed a more pronounced freezing response, which was later extinguished (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Nevertheless, CB1^{-/-} still showed considerably more freezing than CB1^{+/+} to a subsequently presented tone. These results indicate that behavioral adaptation of contextual fear and of unconditioned fear to the tone rely on different mechanisms both involving CB1.

In general, the context is known to play a crucial role in different learning paradigms, for instance in extinction and latent inhibition but also in habituation (Marlin and Miller, 1981; for review, see Bouton, 1993). To further investigate the role of the context in sensitized fear, we additionally analyzed the fear responses to the test context before tone presentation (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). It became evident that CB1^{-/-} froze even less in the test context than CB1^{+/+}. Moreover, freezing responses to the tone were more pronounced than freezing responses to the test context, thus rendering it unlikely that they result from context generalization. However, application of the CB1 antagonist SR141716A to wild-type mice resulted in slightly increasing fear responses to the context, which was not observed in CB1^{-/-} before the first tone exposure (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and might therefore relate to unspecific effects of SR141716A. Baseline freezing before the second tone exposure was generally increased compared with baseline freezing before the first tone exposure (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). This could be explained by a secondary learning process associating the test context with the aversive tone exposure. Additional experiments are necessary to verify this hypothesis. However, in summary, our data indicate that the role of CB1 in adaptation of sensitized fear to the tone cannot be ascribed to context generalization and thus to differences in extinction of

contextual memory. Nevertheless, CB1 seems to be involved, in some aspects, in contextual learning (Suzuki et al., 2004; Pamplona and Takahashi, 2006). The underlying mechanisms remain to be investigated, but they seem to be independent from CB1-mediated habituation of the fear response to the tone.

In some of our experiments (e.g., unconditioned freezing to a loud tone, backward conditioning, tone pre-exposure), CB1 was shown to mediate long-term habituation without affecting within-session fear adaptation during the first tone presentation. It is likely that the sensitization procedure acutely activates certain neurotransmitter/modulator systems (e.g., corticotrophin-releasing hormone) (Koob et al., 1993; Walker et al., 2003), which in turn increase the general responsiveness to potentially dangerous stimuli. During the first tone presentation, endocannabinoids may counteract this potentiation as retrograde messengers that reduce neurotransmitter release from presynaptic terminals (Schlicker and Kathmann, 2001; Alger, 2002; Wilson and Nicoll, 2002; Freund et al., 2003) once the averseness of the situation exceeds a certain intensity. This downregulation of neuronal activation might explicitly involve a reduction in glutamatergic transmission (Marsicano et al., 2003; Azad et al., 2003). For long-term habituation, in contrast, processing of the tone might be accompanied by an activation of the endocannabinoid system within an innate stimulus–response pathway (e.g., Mongeau et al., 2003), even if the tones are not sufficient per se for inducing a significant freezing response. In this scenario, activation of CB1 would lead to changes in neuronal excitability in the stimulus–response pathway [e.g., by changing the activity status of kinases and phosphatases (Cannich et al., 2004) that have been implicated in long-term retention of extinction of conditioned fear (Lu et al., 2001; Lin et al., 2003)]. The differences in the involvement of CB1 in short-term adaptation and long-term habituation might also relate to CB1 activation on different neuronal populations (Marsicano and Lutz, 1999; Marsicano et al., 2003). It is conceivable that physicochemical characteristics of CB1 (e.g., binding affinity to endocannabinoids) or the spatial proximity of CB1 to the release sites of endocannabinoids differ between GABAergic interneurons and glutamatergic neurons. In addition, CB1 might be coupled to different intracellular pathways, in particular, because GABAergic interneurons do not express the phosphatase calcineurin (Sik et al., 1998).

In general, the involvement of CB1 in fear extinction strikingly resembles the role of the endocannabinoid system in adaptation of stress responses (for review, see Hill and Gorzalka, 2005; Viveros et al., 2005). This has potential implications for the interaction of the two processes (for review, see Korte, 2001), in particular because tone presentations after fear conditioning or sensitization procedures can be regarded as psychological stressors. Nevertheless, it seems to be unlikely that a sustained activation of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis in CB1-deficient mice after stressor exposure (Cota et al., 2003; Di et al., 2003) plays a significant role in within-session extinction of the fear response, because unrestrained release of corticosterone attributable to CB1 deficiency would be expected to facilitate rather than to attenuate fear extinction (Yang et al., 2006). Long-term fear extinction, in contrast, might well share common mechanisms with adaptation to homotypic stressors. In this context, Patel et al. (2005) showed that the endocannabinoid system mediates habituation to repeated restraint stress. They observed an increase in the level of 2-arachidonoyl glycerol in brain punches from the amygdala complex from the first to the fifth restraint stress episode. Furthermore, pharmacological blockade of CB1 during the fifth restraint episode resulted in a reversal of the

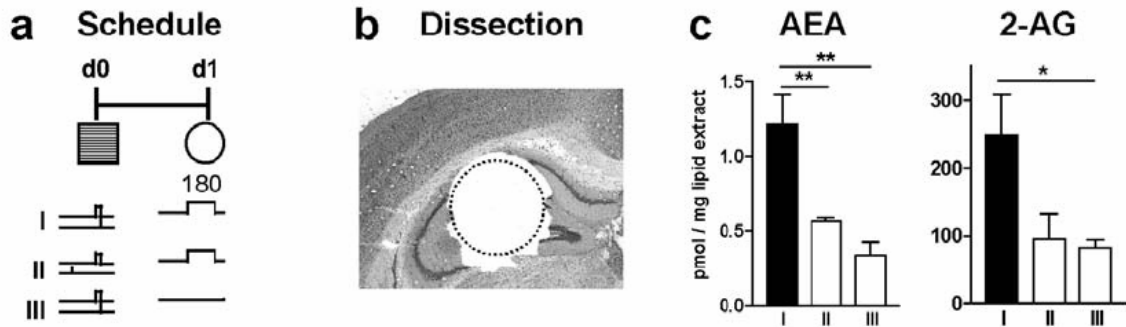
habituation-like reduction in Fos expression in the infralimbic and prelimbic cortices (Patel et al., 2005). Interestingly, these brain regions are known to play a pivotal role in extinction of conditioned fear (Milad and Quirk, 2002; Quirk et al., 2003; Pare et al., 2004) and therefore may be involved in the endocannabinoid-mediated long-term habituation described in the present study as well.

In summary, our study provides a new conceptual framework for understanding the role of CB1 in short- and long-term adaptation to aversive situations and emphasizes the importance of CB1-mediated habituation in extinction of acquired fear. Our protocol of prolonged stimulus presentations resembles the principle of exposure therapy, which is successfully used for the treatment of phobias and posttraumatic stress disorder (Wolpe, 1958; Bartling et al., 1980; Ost et al., 1991; Foa and Riggs, 1993). Our findings imply that the success of such therapies is, at least partially, based on successful habituation, thus suggesting the endocannabinoid system as both a vulnerability factor and potential therapeutic target of anxiety disorders.

References

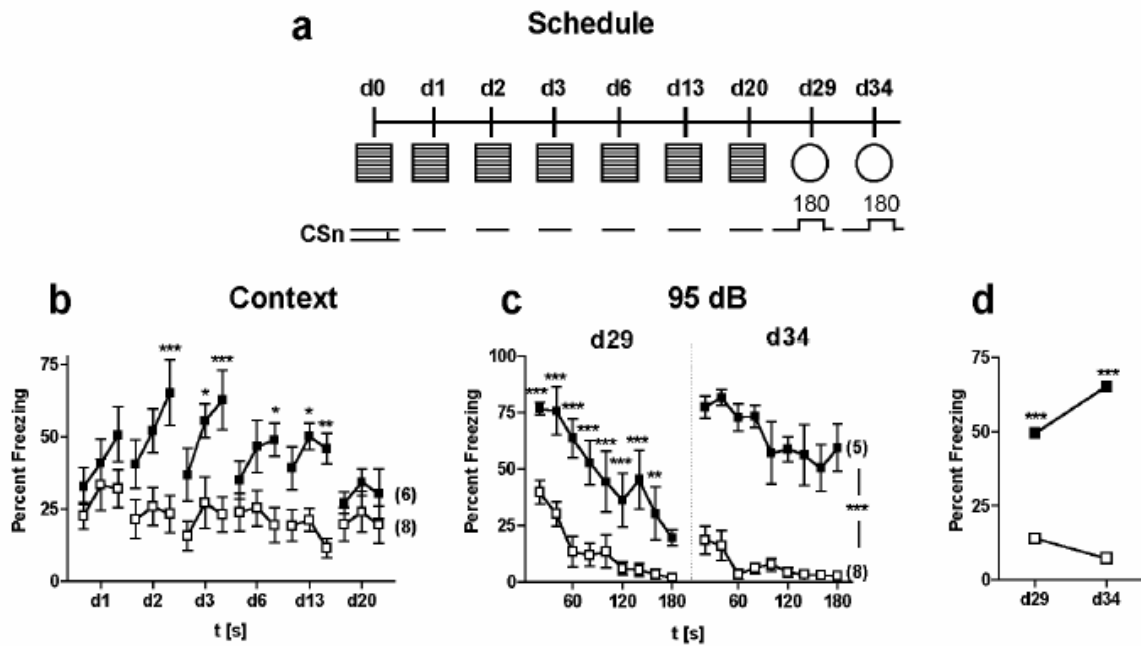
- Alger BE (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68:247–286.
- Azad SC, Eder M, Marsicano G, Lutz B, Zieglansberger W, Rammes G (2003) Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn Mem* 10:116–128.
- Bartling G, Fiegenbaum W, Krause R (1980) Reizüberflutung. Theorie und Praxis. Stuttgart, Germany: Kohlhammer.
- Bouton ME (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114:80–99.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M (2002) L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J Neurosci* 22:9113–9121.
- Cain CK, Godsil BP, Jami S, Barad M (2005) The L-type calcium channel blocker nifedipine impairs extinction, but not reduced contingency effects, in mice. *Learn Mem* 12:277–284.
- Cannich A, Wotjak CT, Kamprath K, Hermann H, Lutz B, Marsicano G (2004) CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11:625–632.
- Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ (2005) Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 30:516–524.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423–431.
- Davis M (1989) Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. *Behav Neurosci* 103:495–503.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23:4850–4857.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3:771–784.
- Falls WA, Miserendino MJ, Davis M (1992) Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci* 12:854–863.
- Foa EB, Riggs DS (1993) Post-traumatic stress disorder in rape victims. In: *American Psychiatric Press review of psychiatry* (Oldham J, Riba MB, Tasman A, eds), pp 273–303. Washington, DC: American Psychiatric.
- Franklin KN, Paxinos G (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. London: Academic.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017–1066.
- Goosens KA, Hobin JA, Maren S (2003) Auditory-evoked spike firing in the lateral amygdala and Pavlovian fear conditioning: mnemonic code or fear bias? *Neuron* 40:1013–1022.
- Groves PM, Thompson RF (1970) Habituation: a dual-process theory. *Psychol Rev* 77:419–450.
- Hill MN, Gorzalka BB (2005) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol* 16:333–352.
- Holter SM, Kallnik M, Wurst W, Marsicano G, Lutz B, Wotjak CT (2005) Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. *Eur J Pharmacol* 510:69–74.
- Kamprath K, Wotjak CT (2004) Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11:770–786.
- Koob GF, Heinrichs SC, Pich EM, Menzaghi F, Baldwin H, Miczek K, Britton KT (1993) The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. *Ciba Found Symp* 172:277–289.
- Korte SM (2001) Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 25:117–142.
- Lamprea MR, Cardenas FP, Vianna DM, Castilho VM, Cruz-Morales SE, Brandao ML (2002) The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res* 950:186–194.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155–184.
- Lin CH, Yeh SH, Leu TH, Chang WC, Wang ST, Gean PW (2003) Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:1574–1579.
- Lu KT, Walker DL, Davis M (2001) Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J Neurosci* 21:RC162(1–5).
- Lubow RE (1973) Latent inhibition. *Psychol Bull* 79:398–407.
- Mackintosh NJ (1974) The psychology of animal learning. London: Academic.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5:844–852.
- Marlin NA, Miller RR (1981) Associations to contextual stimuli as a determinant of long-term habituation. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 7:313–333.
- Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci* 11:4213–4225.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglansberger W, Di M, V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530–534.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der SM, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglansberger W, Di M, V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84–88.
- McSweeney FK, Swindell S (2002) Common processes may contribute to extinction and habituation. *J Gen Psychol* 129:364–400.
- Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70–74.
- Mongeau R, Miller GA, Chiang E, Anderson DJ (2003) Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. *J Neurosci* 23:3855–3868.
- Moscovitch A, LoLordo VM (1968) Role of safety in the Pavlovian backward fear conditioning procedure. *J Comp Physiol Psychol* 66:673–678.
- Myers KM, Davis M (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567–584.
- Ohman A, Mineka S (2001) Fears, phobias, and preparedness: toward an evolved module of fear and fear learning. *Psychol Rev* 108:483–522.
- Ost LG, Salkovskis PM, Hellstrom K (1991) One-session therapist-directed exposure vs self-exposure in the treatment of spider phobia. *Behav Ther* 22:407–422.
- Pamplona FA, Takahashi RN (2006) WIN 55212–2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett* 397:88–92.
- Pare D, Quirk GJ, LeDoux JE (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* 92:1–9.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005) Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 21:1057–1069.

- Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Pare D (2003) Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J Neurosci* 23:8800–8807.
- Richardson R (2000) Shock sensitization of startle: learned or unlearned fear? *Behav Brain Res* 110:109–117.
- Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390:604–607.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ (2001) Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci* 21:9009–9017.
- Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:565–572.
- Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301:846–850.
- Sik A, Hajos N, Gulacsi A, Mody I, Freund TF (1998) The absence of a major Ca^{2+} signaling pathway in GABAergic neurons of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3245–3250.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787–4795.
- Tang J, Wotjak CT, Wagner S, Williams G, Schachner M, Dityatev A (2001) Potentiated amygdaloid auditory-evoked potentials and freezing behavior after fear conditioning in mice. *Brain Res* 919:232–241.
- Tang J, Wagner S, Schachner M, Dityatev A, Wotjak CT (2003) Potentiation of amygdaloid and hippocampal auditory-evoked potentials in a discriminatory fear-conditioning task in mice as a function of tone pattern and context. *Eur J Neurosci* 18:639–650.
- Thompson RF, Spencer WA (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev* 73:16–43.
- Van Dijken HH, Van der Heyden JA, Mos J, Tilders FJ (1992a) Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav* 51:787–794.
- Van Dijken HH, Mos J, Van der Heyden JA, Tilders FJ (1992b) Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav* 52:945–951.
- Van Dijken HH, de Goeij DC, Sutanto W, Mos J, de Kloet ER, Tilders FJ (1993) Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* 58:57–64.
- Varvel SA, Lichtman AH (2002) Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther* 301:915–924.
- Varvel SA, Anum EA, Lichtman AH (2005) Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 179:863–872.
- Viveros MP, Marco EM, File SE (2005) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81:331–342.
- Walker DL, Ressler KJ, Lu KT, Davis M (2002) Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *J Neurosci* 22:2343–2351.
- Walker DL, Toufexis DJ, Davis M (2003) Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 463:199–216.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678–682.
- Wolpe J (1958) *Psychotherapy by reciprocal inhibition*. Stanford, CA: Stanford UP.
- Yang YL, Chao PK, Lu KT (2006) Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 31:912–924.



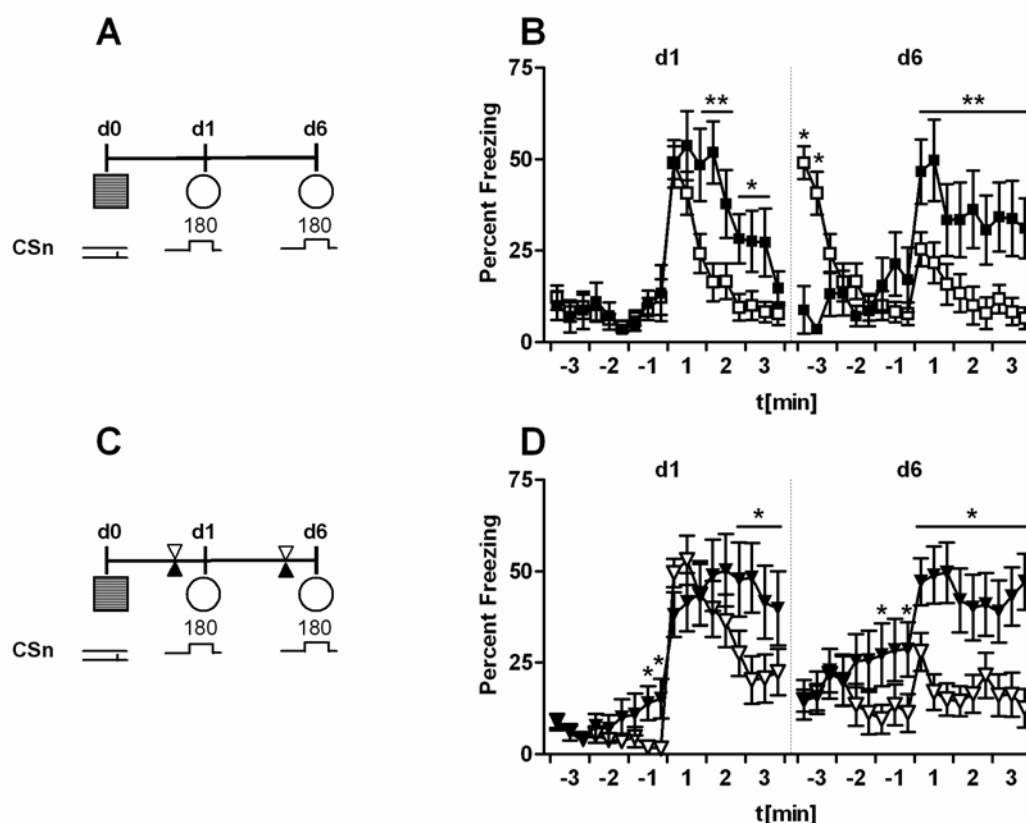
Supplementary Figure 1: Recall of aversive memories activates the endocannabinoid system within the dorsal hippocampus of C57BL/6J0laHsd mice.

(a) Experimental procedure: Naive C57BL/6J0laHsd mice were randomly assigned to three groups (n = 20, each). Mice of the first and the third group were conditioned with a single tone-shock pairing. Mice of the second group received the same tone and shock but in explicitly unpaired manner. Mice of the first and the second groups were exposed to a 180-s tone in the test context at day 1 (d1) after the conditioning procedure. Mice of the third group were just placed into the test context without tone presentation. All mice were killed immediately in the end of the test exposure and the brains were removed within 5 min. Because of the limited detectability of endocannabinoids in tissue samples from the dorsal hippocampus, we pooled the samples of 5 animals in order to obtain a single data point (N), resulting in a sample size of N = 4 per protocol. Measurements of endocannabinoids were performed essentially as described before (Marsicano et al., 2002) (b) Histological section stained with cresyl violet depicting the dissected area of the dorsal hippocampus (circle indicates the inner diameter of the brain puncher). (c) Recall of auditory-cued fear memory caused an increase in anandamide (AEA; $F_{2,11} = 12.4$, $P = 0.003$) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG; $F_{2,11} = 4.8$, $P = 0.038$) levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (1-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test).



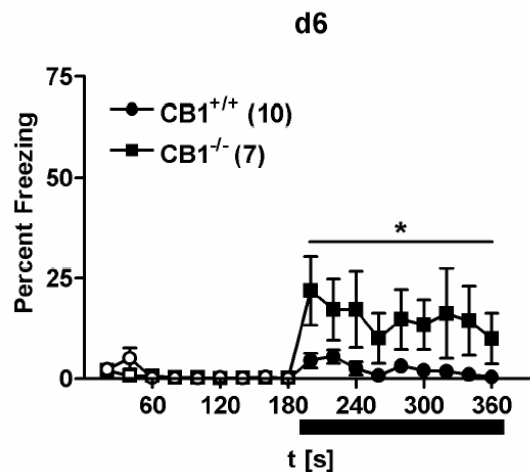
Supplementary Figure 2: Impairments in adaptation of sensitized fear in $CB1^{-/-}$ mice are independent from extinction of contextual fear.

(a) Experimental procedure: $CB1^{-/-}$ (■, n = 6) and $CB1^{+/+}$ (□, n = 8) were sensitized with a single footshock in the conditioning chamber, and repeatedly re-exposed to the conditioning chamber for 3 min without tone or footshock presentation at days 1, 2, 3, 6, 13 and 20 after the sensitization procedure. At days 29 (d29) and 34 (d34), mice were exposed to 3-min tones of 95 dB in the test context. (b) Freezing in the conditioning chamber in absence of tone presentation. With repeated context exposure, $CB1^{-/-}$ mice initially showed significantly more contextual freezing than wild-type controls. However, these differences disappeared towards day 20 (statistics not shown). (c) Freezing to a tone of 95 dB at d29 and d34. Although the differences in contextual freezing between the two genotypes disappeared towards the end of context exposures, $CB1^{-/-}$ froze significantly more to the tone both at d29 (*Genotype*: $F_{1,11} = 22.0$, $P < 0.001$; *Genotype x Interval*: $F_{8,88} = 2.2$, $P = 0.036$) and at d34 (*Genotype*: $F_{1,11} = 179.0$, $P < 0.0001$). It is of note that one $CB1^{-/-}$ mouse died during tone presentation because of an audiogenic seizure. Together with the data of the freezing response to the context, these data indicate that freezing to the tone does not simply reflect generalized contextual fear. (d) Development of the freezing response to the tone from d29 to d34. The highly significant differences in tone freezing between $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ became evident also if the development of the total freezing response from day 29 to day 34 was considered (*Genotype*: $F_{1,11} = 137$, $P < 0.0001$; *Genotype x Day* interaction: $F_{1,11} = 5.7$, $P = 0.036$). The significant interaction of the two main factors relates to the fact that $CB1^{+/+}$, but not $CB1^{-/-}$, showed a decrease in freezing from day 29 to day 34 (statistics not shown). Data (mean \pm SEM) were normalized either to 20-s (C), or to 60-s (B) or to 3-min (D) observation intervals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. $CB1^{+/+}$ (2-way ANOVA for repeated measurements, followed by Newman-Keuls post-hoc test).



Supplementary Figure 3: Differential involvement of CB1 in regulation of pre-tone and tone freezing following sensitization procedures.

(A) Experimental procedure: Mice with genetic ablation of CB1 ($CB1^{-/-}$, ■, $n = 10$; $CB1^{+/+}$, □, $n = 15$; cf. Fig. 3A) and **(C)** inbred C57BL/6N mice with acute pharmacological blockade of CB1 (3mg/kg SR141716A, SR; ▼, $n = 17$; vehicle, V; ▽, $n = 17$; cf. Fig. 3D) before tone presentation were exposed to a 180-s tone one and six days after sensitization. **(B)** Genetic inactivation of CB1 failed to affect pre-tone freezing to the test context (day 1; *Genotype x Interval*: $F_{8,184} = 0.26$, $P = 0.978$), but caused a sustained freezing response to the subsequently presented tone (black bar indicates duration of tone presentation). Because of yet unknown reasons, $CB1^{+/+}$ showed a more pronounced pre-tone freezing before the second tone presentation than $CB1^{-/-}$ (day 6; *Genotype x Interval*: $F_{8,176} = 3.57$, $P < 0.001$). **(D)** Mice with pharmacological blockade of CB1 showed a slight increase in freezing towards the onset of tone presentation both at day 1 (*Drug x Interval*: $F_{8,256} = 2.67$, $P = 0.007$) and at day 6 (*Drug x Interval*: $F_{8,256} = 2.71$, $P = 0.007$). Tone presentation (black bar indicates duration of tone presentation) caused a sharp increase in freezing in both antagonist and vehicle treated mice. 2-way ANCOVAs [(*Drug, Interval*) for repeated measures (*Interval*)] with the covariate *Freezing before tone* still revealed a significant *Drug x Interval* interaction at day 1 ($F_{8,256} = 5.5$, $P < 0.0001$) as well as a significant effect of *Drug* at day 6 ($F_{1,31} = 5.8$, $P = 0.021$), even if the last 20-s before tone presentation were considered as covariate, indicating that pharmacological blockade of CB1 caused a sustained freezing response to the tone independently of potential influences on pre-tone behavior. Data were normalized to 20-s observation intervals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. other genotype. Together these data indicate that genetic ablation and pharmacological blockade of CB1 have inconsistent effects on pre-tone freezing but consistently cause a sustained freezing response to the tone. Apparently, CB1 differentially affects pre-tone and tone freezing with the consequence that context generalization unlikely accounts for the sustained freezing response to the tone.



Supplementary Figure 4: Persistent freezing to a loud tone in $CB1^{-/-}$ is unrelated to contextual fear memory.

Naïve $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ (cf. Fig. 5) were exposed to a loud tone of 95 dB at two days (d1, d6). Here we show the freezing response before (open symbols; randomly chosen subset of animals) and during tone presentation at d6 (filled symbols; black bar indicates duration of tone presentation). As revealed by 2-way ANOVAs (*Genotype, Interval*) for repeated measures (*Interval*), $CB1^{-/-}$ and $CB1^{+/+}$ showed a similar freezing response to the test context before the second presentation of the loud tone (*Genotype*: $F_{1,15} = 0.9$, $p = 0.352$; *Genotype* \times *Interval*: $F_{8,120} = 1.6$, $p = 0.128$). During tone presentation, in contrast, the freezing response was significantly more pronounced in $CB1^{-/-}$ than in $CB1^{+/+}$ (*Genotype*: $F_{1,15} = 5.2$, $p = 0.038$). A 3-way ANOVA (*Genotype, Tone, Interval*) for repeated measures (*Tone, Interval*) revealed significant effects of *Tone* ($F_{1,15} = 8.6$, $p = 0.010$), a significant *Tone* \times *Genotype* interaction ($F_{1,15} = 5.8$, $P = 0.029$) and a significant effect of *Genotype* ($F_{1,15} = 4.5$; $p = 0.051$). Taken together, these data demonstrate that the first presentation of the loud tone at day 1 does not act as an aversive US that triggers contextual conditioning, which would become evident by an increase in pre-tone freezing at day 6. Moreover, pre-tone freezing appears to be unrelated to the sustained freezing response to the tone of $CB1^{-/-}$. Data (mean \pm SEM) were normalized to the 20-s observation intervals. * $P < 0.05$ vs. $CB1^{+/+}$

Manuskript 4

Fear-alleviating effects of endocannabinoids depend on the extent of prior stress sensitization

Kornelia Kamprath¹, Giovanni Marsicano^{2,3}, Krisztina Monory^{2,3}, Beat Lutz^{2,3}, Carsten T. Wotjak^{1*}

¹Group Neuronal Plasticity/Mouse Behaviour, ²Group Molecular Genetics of Behaviour, Max Planck Institute of Psychiatry, D-80804 Munich, Germany, ³Dept. Physiological Chemistry, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

*Correspondence: wotjak@mpipsykl.mpg.de

Running Title: Critical range of endocannabinoid action

Keywords: anxiety, stress, CB1, URB597, UCM707, SR141716A

Submitted to: European Journal of Neuroscience

Abstract

Stress sensitization can lead to hyperexcitability of neural fear circuits, which contributes to excessive and sustained fear responses in anxiety disorders. Recent data suggest that endocannabinoids are involved in the decrease of fear responses, but their exact role remains yet unclear. In this study we tested the hypothesis that endocannabinoids mediate behavioral adaptation following stress sensitization. We applied inescapable footshocks of different intensities to different groups of Cannabinoid receptor type1 (CB1) null mutant mice and their wild-type littermates. At the following day we measured the fear responses of these differentially sensitized animals to the same tone. Only sensitization with a single footshock of 0.7mA, but not with lower shock intensities (pain threshold or 0.5 mA) or with three 0.7-mA footshocks, resulted in an impaired adaptation of the fear response to the tone in CB1 null mutant mice. Application of the CB1 antagonist SR141716A in C57BL/6NCrl mice before tone presentation confirmed the phenotype observed in CB1 null mutant mice and indicates that CB1 does not influence the sensitization process itself, but the subsequent adaptation of the fear response. Application of the endocannabinoid re-uptake inhibitor UCM707 and the anandamide degradation inhibitor URB597 facilitated fear adaptation following three 0.7mA-footshocks, but not following a single 0.7mA-footshock in C57BL/6NCrl mice. Our data indicate that the fear-alleviating effects of endocannabinoids depend on the extent of prior stress sensitization and are restricted by efficient re-uptake and degradation mechanisms.

Introduction

Stressful experiences are able to sensitize animals to subsequent aversive encounters (Steckler, 2005). The application of inescapable footshocks, for instance, results in long-term neuroendocrine and behavioral changes, including exaggerated anxiety-like behaviors (van Dijken *et al.*, 1992a;van Dijken *et al.*, 1992b;van Dijken *et al.*, 1992c;van Dijken *et al.*, 1993;Stam *et al.*, 2000). Stress sensitization implies that the exposure to a severe stressor (e.g., a footshock) lowers the activation threshold of neural systems in response to other stimuli, thus causing hyperexcitability of neural fear circuits (Rosen and Schulkin, 1998). In anxiety disorders such as phobias, panic disorder or post-traumatic stress disorder, such hyperexcitability may lead to excessive and sustained fear responses to non-harmful stimuli or situations, as compared to the moderate and waning fear responses shown by normal individuals under similar conditions (Rosen and Schulkin, 1998;Viveros *et al.*, 2005). Thus, the therapy of anxiety disorders would benefit from a better understanding of the biological mechanisms involved in fear adaptation. Among those mechanisms, the endocannabinoid system may play an important role because of its potential anxiolytic properties (Viveros *et al.*, 2005;Wotjak, 2005), its involvement in extinction of conditioned fear (Marsicano *et al.*, 2002;Suzuki *et al.*, 2004;Cannich *et al.*, 2004;Chhatwal *et al.*, 2005), and its involvement in the adaptation of stress responses (Di *et al.*, 2003;Patel *et al.*, 2005;for review see Hill and Gorzalka, 2005). Endocannabinoids are fatty acid derivatives that exert their effects on motivational behavior, pain perception, neuroprotection and emotional behavior primarily via central cannabinoid CB1 receptors.(Piomelli, 2003). They are synthesized and released on demand from postsynaptic areas and act as retrograde messengers at presynaptic terminals where they activate CB1 and thereby suppress transmitter release (Wilson and Nicoll, 2002). The availability of endocannabinoids is determined not only by the rate of synthesis and release, but also by very effective re-uptake and degradation mechanisms (Piomelli, 2003;Di Marzo *et al.*, 2004;McKinney and Cravatt, 2005). Although endocannabinoids were consistently shown to mediate extinction of conditioned fear via CB1 (Marsicano *et al.*, 2002;Suzuki *et al.*, 2004;Chhatwal *et al.*, 2005), their role in anxiety-related behavior remains controversial (Degroot and Nomikos, 2004;Griebel *et al.*, 2005;Viveros *et al.*, 2005). Different studies demonstrated anxiolytic properties of endocannabinoids or

anxiogenic properties of genetic ablation or pharmacological blockade of CB1 (Navarro *et al.*, 1997; Kathuria *et al.*, 2003; Uriguen *et al.*, 2004). Other studies, in contrast, showed either no involvement of endocannabinoids in anxiety-related behavior (Marsicano *et al.*, 2002) or anxiolytic properties of a CB1 antagonist, SR141716A (Haller *et al.*, 2002; Degroot and Nomikos, 2004; Griebel *et al.*, 2005). These contradictory results may relate to unspecific effects of SR141716A and/or to the averseness of the respective test situation (Haller *et al.*, 2004).

In this study we tested the hypothesis that endocannabinoids mediate behavioral adaptation following stress sensitization. We aimed at investigating the impact of the averseness of the previously encountered stressful experience on the involvement of endocannabinoids in fear adaptation. To this end we applied inescapable footshocks of different intensities to CB1 null mutant mice (Marsicano *et al.*, 2002) and their wild-type littermates and measured the fear responses to a tone at the following day. Our data demonstrate an important role of the endogenous cannabinoid system in the adaptation of fear responses following sensitization and indicate that the fear-alleviating effects of endocannabinoids depend on the extent of prior stress sensitization.

Material and Methods

All experiments were approved by the Committee on Animal Health and Care of the State of Bavaria (Regierung von Oberbayern, Germany) and performed in strict compliance with the EEC recommendations for the care and use of laboratory animals.

Animals: Male cannabinoid CB1 receptor null mutant mice (CB1^{-/-}; n = 63) and their male wild-type littermate controls (CB1^{+/+}; n = 73) derived from heterozygous breeding pairs (Marsicano *et al.*, 2002; back-crossed to C57BL/6NCrl to F5/F6 generation; 6-14 weeks old). Adult male C57BL/6NCrl mice (n = 109) were purchased from Charles River (Bad Sulzfeld, Germany) at an age of 6 weeks. Animals were housed singly under an inverse 12h:12h light-dark cycle (lights off: 09:00h) with food and water *ad libitum* for at least 14 days before starting the experiments.

Experimental procedures: Experiments were performed at two consecutive days with application of the footshock(s) at day 1 and exposure to the tone at day 2. Drugs were applied before tone presentation at day 2. All experiments were performed during the activity phase of the animals between 09:30h and 17:00h.

Sensitization: Mice were placed into the shock context where they received either a single inescapable footshock of 2s duration or three inescapable footshocks of 1s duration essentially as described before (Kamprath and Wotjak, 2004). Shock sensitization at the individual pain threshold was achieved by manually raising the shock intensity until the animal showed first signs of pain and discomfort (jumping and/or vocalization). The respective current intensity was maintained for 2s, before the current was switched off. Naïve (non-shocked) controls were not placed into the shock context.

Tone presentation: At the day following stress sensitization, mice were placed into a new 'test context' that differed from the shock context in various aspects, including shape, odor, illumination, and bedding (see Kamprath and Wotjak, 2004 for details). After 3min, a tone of 9 kHz and 80 dB was presented for 3min.

Experiment 1: Interrelation between CB1-deficiency, footshock intensity and subsequent fear response to a tone. CB1^{-/-} and CB1^{+/+} were randomly assigned to 5 experimental groups, which differed in the intensity of the stress sensitization procedure as follows: the first group remained non-shocked (0 mA), the second group received a footshock at the individual pain threshold (PT), the third group received a footshock with a current intensity of 0.5 mA, the fourth group received a footshock with a current intensities of 0.7 mA and the fifth group received three footshocks with current intensity of 0.7 mA (3x 0.7 mA). The extent of sensitization was assessed by measuring the freezing response to a 3-min tone at the next day.

Experiment 2: Pharmacological blockade of CB1 before tone presentation. C57BL/6NCrl mice (the background strain of the mutants) were sensitized with a single footshock of 0.7 mA. At the next day, mice were randomly assigned to two groups, which were treated either with the CB1 antagonist SR141716A (3 mg/kg) or with vehicle 30 min before presentation of the 3-min tone.

Experiment 3: Pharmacological blockade of endocannabinoid degradation and uptake before tone presentation. C57BL/6NCrl mice were sensitized either with a single footshock of 0.7 mA or with three footshocks of 0.7 mA. At the next day, mice of each sensitization procedure were randomly assigned to two groups, which were treated either with a mixture of the endocannabinoid uptake inhibitor UCM707 (3mg/kg) and the degradation blocker URB597 (1mg/kg) or with vehicle 60 min before presentation of the 3-min tone.

Behavioral analysis: The behavioral response to the tone was videotaped. Fear was assessed off-line by a trained observer who scored the freezing response of the animals unaware of the genotype or treatment condition essentially as described before (Kamprath and Wotjak, 2004). Freezing was defined as the absence of all movements except for that related to respiration.

Drug treatment: SR141716A [rimonabant; *N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide; kindly provided by NIMH Chemical Synthesis and Drug Supply Program, (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994)],

UCM707 [*N*-(3-furylmethyl)eicosa-5,8,11,14-tetraenamide; kindly provided by Maria L. Lopez-Rodriguez, Universidad de Complutense Madrid, Spain, (Lopez-Rodriguez et al., 2001; de Lago et al., 2002)] and URB597 [Cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester; Cayman, Michigan, USA, (Kathuria et al., 2003)] were dissolved in vehicle solution (1 drop Tween-80 in 3 ml 2.5% dimethylsulphoxide in saline) and injected subcutaneously at 20ml per kg body weight under light isoflurane anesthesia.

Data analysis and Statistics: For analysis, the total time of tone presentation was subdivided into distinct time intervals (20 s or 180 s) with one data point representing one interval. For every interval the duration of freezing was expressed as a percentage of the total time of the interval ('freezing time' per interval / total interval time). Data were analyzed by 2-way or 3-way ANOVA for repeated measurements or chi²-test as indicated in the text, using STATISTICA 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) or GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Newman-Keuls test was used as post-hoc test if appropriate. The selection criterion for "strong responders" was arbitrarily defined as duration of 'freezing' that lasts for more than 1/3 of the total tone presentation. Data were presented as mean \pm SEM. Statistical significance was accepted if $p < 0.05$.

Results

Experiment 1: Fear alleviating effects of endocannabinoids depend on the intensity of the previously encountered footshock

Based on the observation that severe aversive experiences lead to hyperexcitability to other stimuli in a process called sensitization (Kamprath and Wotjak, 2004), we applied inescapable footshocks of different intensities to different groups of CB1-deficient mice (CB1^{-/-}) and their wild-type littermates (CB1^{+/+}). One day later we assessed the behavioral responses of all groups of mice to the same novel stimulus, an 80 dB-tone (Fig. 1A). Both CB1^{-/-} ($F_{4,62} = 11.8$, $p < 0.0001$; 1-way ANOVA; Fig. 1B, right panel) and CB1^{+/+} ($F_{4,63} = 17.1$, $p < 0.0001$; Fig. 1B, left panel) showed an increase in freezing to the tone with increasing shock intensities. Significant genotype differences in the development of the freezing response over the course of tone presentation became evident only after sensitization with one footshock of 0.7mA (*Genotype*: $F_{1,44} = 9.7$, $p = 0.003$; *Genotype x Interval*: $F_{8,352} = 3.5$, $p < 0.001$; Fig. 1C), but not in the case of the other sensitization protocols (statistics not shown).

Experiment 2: Pharmacological blockade of CB1 impairs fear adaptation to the tone following a single 0.7-mA footshock

To distinguish between an involvement of CB1 in the sensitization process itself (day 1) *versus* the subsequent adaptation of the fear response (day 2), we sensitized C57BL/6NCrl mice with a single 0.7-mA footshock and treated them with a CB1 receptor antagonist SR141716A before tone presentation at day 2 (Fig. 2A). Antagonist-treated mice showed a sustained freezing response to the tone, compared to vehicle-treated controls [*Drug*: $F_{1,67} = 8.2$, $p = 0.005$; *Drug x Interval*: $F_{8,536} = 6.4$, $p < 0.0001$; 2-way ANOVA (*Drug*, *Interval*) on repeated measures (*Interval*); Fig. 2B], thus demonstrating an acute involvement of CB1 in fear adaptation.

Experiment 3: Blockade of endocannabinoid re-uptake and degradation promotes fear adaptation following highly aversive encounters

Following sensitization with three 0.7-mA footshocks, not only CB1^{-/-}, but also CB1^{+/+} showed a sustained freezing response to the tone (cf. Fig. 1C). To assess whether wild-type mice would benefit from an increased signaling of endocannabinoids, we

sensitized C57BL/6NCrl mice either with a single or with three 0.7-mA footshocks and treated them with a mixture of endocannabinoid uptake and degradation inhibitors before tone presentation at the next day (Fig. 3A). Vehicle-treated controls showed a rapidly waning fear response following sensitization with a single 0.7-mA footshock, but displayed sustained fear following the stronger protocol [*Shock Intensity*: $F_{1,18}=4.90$, $p=0.039$; *Shock Intensity x Interval*: $F_{8,144}=1.98$, $p=0.053$; 2-way ANOVA (*Shock intensity, Interval*) on repeated measures (*Interval*); Fig. 3B], thus corroborating the observations in CB1^{+/+} (cf. Fig. 1C). Blockade of endocannabinoid uptake and degradation failed to significantly affect the fear response following sensitization with a single 0.7-mA footshock (Fig. 3B, left panel; statistics not shown). The sustained fear response to the tone in vehicle-treated mice following sensitization with three 0.7-mA footshocks, in contrast, was transformed into a declining fear response [*Drug*: $F_{1,18}=5.2$, $p=0.034$; *Drug x Interval*: $F_{8,144}=4.6$, $p<0.0001$; 2-way ANOVA (*Drug, Interval*) on repeated measures (*Interval*); Fig. 3B, right panel], thus indicating that endocannabinoid re-uptake and degradation mechanisms limit their fear-alleviating effects. The dependency of the drug effects on the shock intensity could be confirmed by significant *Drug x Shock Intensity* ($F_{1,36}=4.84$, $p=0.034$) as well as *Drug x Shock Intensity x Interval* interactions [$F_{8,288}=3.4$; $p=0.001$; 3-way ANOVA (*Drug, Shock Intensity, Interval*) on repeated measures (*Interval*)].

Inter-individual differences in the involvement of CB1 in fear adaptation

On closer inspection of the individual freezing responses of mice with genetic ablation and pharmacological blockade of CB1, respectively, we observed a bimodal distribution of the fear responses to the tone following sensitization with a single 0.7-mA footshock: One subset of mice showed similarly low fear responses as the respective controls, whereas the other subset showed excessive fear (Fig. 4A). If we designated animals, which spent more than 60s out of the 3min of tone presentation in freezing behavior, as ‘strong responders’, genetic ablation or pharmacological blockade of CB1 resulted in a significant higher proportion of strong responders to the tone (CB1-deficient mice: $\chi^2=6.5$, $p=0.011$; antagonist-treated mice: $\chi^2=5.5$, $p=0.019$; Fig. 4B). Apparently, even in the case of sensitization with a single 0.7-mA footshock, which resulted in genotype differences and differences between

antagonist- and vehicle-treated groups, only a subset of the respective groups depended on the endocannabinoid system to restrain the fear response to the tone.

Discussion

In order to investigate the interrelation between the extent of stress sensitization and involvement of endocannabinoids in fear adaptation, we applied inescapable footshocks of different intensities to different groups of mice with genetic ablation or pharmacological blockade of CB1 and studied their fear responses to a subsequently presented tone. In general, the stress sensitization procedure directly modified the intensity of the fear response to the subsequently presented tone in a dose-dependent manner (Fig.1; see also Kamprath and Wotjak, 2004). These data indicate that footshocks of different intensities lead to different extents of sensitization as measured by alterations in the fear response to the same tone. As we investigated and discussed in detail elsewhere (Kamprath & Wotjak, 2004; Kamprath *et al.*, submitted – manuscript 3), it is unlikely that the footshock-induced increase in freezing to the tone can be ascribed to associative processes such as context generalization.

The fear-alleviating effects of endocannabinoids became evident following moderate (a single footshock of 0.7 mA), but not weak (current intensity: ≤ 0.5 mA) or strong sensitization procedures (three 0.7-mA footshocks). These data underscore the general importance of intensity-response studies for testing the modulation of fear responses and for evaluating the involvement of different neuronal systems in these processes. The impairments in fear adaptation observed in CB1 deficient mice did not relate to differences in pain perception, because there were no differences between the two genotypes neither in the individual pain thresholds (Marsicano *et al.*, 2002) nor in the fear response to a subsequently presented tone. Moreover, data obtained by pharmacological blockade of CB1 before tone presentation indicate that endocannabinoids are acutely involved in the adaptation of the fear response to the tone following sensitization rather than in the sensitization process *per se*.

There are at least two different scenarios conceivable that would explain why endocannabinoids exert their fear-alleviating effects only following a sufficient extent of sensitization. The first scenario assumes that the prior footshock experience determines whether the tone sufficiently activates the endocannabinoid system. As stated before, endocannabinoids are synthesized on demand following depolarization of the postsynaptic membrane. Sensitization might either increase glutamatergic transmission (for review see Adamec, 1997; Adamec *et al.*, 2001) or modulate the

depolarization of the postsynaptic membrane via other transmitter systems. The second scenario stipulates that stronger shock intensities are required for altering the activity of fear-modulating transmitter systems that are under control of endocannabinoids. However, except for invertebrates (Walters, 1987; Hawkins *et al.*, 1998), there is still too little known about the neural and molecular mechanisms underlying sensitization to draw definitive conclusions about the exact mechanisms underlying the interrelation between the extent of sensitization and fear-alleviating effects of endocannabinoids. It is of note that both scenarios would also explain why anxiolytic properties of the endocannabinoid system depend on the averseness of the test situation (Haller *et al.*, 2004). In this study the averseness of the test situation (*i.e.*, light intensity) rather than prior stressful experiences directly determined the activity of the endocannabinoid system and/or of CB1-controlled fear-modulating transmitter systems.

Our data demonstrate that the involvement of endocannabinoids in the adaptation of the fear response to the tone following sensitization is constrained not only by a lower but also an upper threshold. Following sensitization with three 0.7-mA shocks, not only CB1 deficient mice, but also wild-type controls showed a sustained freezing response to the tone. As we could show by pharmacological means, this lack of genotype differences can be explained by endocannabinoid uptake and degradation processes, which limit the capacity of the endocannabinoid system in wild-type mice. The fact that the pharmacological blockade of endocannabinoid uptake and degradation failed to affect the course of fear adaptation following sensitization with a single 0.7-mA footshock points to an optimally activated endocannabinoid system under those circumstances and rules out that the effects observed in mice following sensitization with three 0.7-mA shocks simply relate to unspecific effects of the drugs on tone perception or expression of freezing. In the context of the present study we decided to administer only a mixture of URB597 and UCM707, in order to maximize the availability of endocannabinoids at their receptors. Future studies might dissect the specific contribution of degradation versus uptake mechanisms in respect to the broadening of endocannabinoid action observed. Furthermore, also the exact nature of the endocannabinoids involved in fear adaptation remains to be shown. Upon recall of conditioned fear, both anandamide and 2-arachidonoyl glycerol become activated within the basolateral amygdala (Marsicano *et al.*, 2002), a brain structure which has been implicated in stress sensitization (Adamec *et al.*, 2001; Rodriguez

Manzanares *et al.*, 2005;Adamec *et al.*, 2005). In this context it is of note that URB597 specifically blocks the degradation of anandamide by inhibiting the degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (Kathuria *et al.*, 2003;for review see McKinney and Cravatt, 2005), whereas the other major endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol remains unaffected. UCM707, in contrast, blocks the uptake of both endocannabinoids (de Lago *et al.*, 2002;Lopez-Rodriguez *et al.*, 2003).

On basis of our data we propose the critical-range hypothesis of endocannabinoid action (Fig. 5). This hypothesis stipulates that stimuli have to exceed a certain threshold to depolarize the postsynaptic membrane sufficiently for endocannabinoid synthesis and release and/or to activate CB1-controlled fear-modulating transmitter systems. A stimulus can pass this activation threshold, either if its intensity reaches a certain averseness by itself (Haller *et al.*, 2004), or if a strong aversive stimulus has sensitized the animal, i.e. caused an increased responsiveness to other stimuli (present study). Below this threshold, fear responses rapidly decline without involvement of endocannabinoids. Above the activation threshold, endocannabinoids attenuate fear via CB1 receptors. However, uptake and degradation processes efficiently limit the action of the endocannabinoids, with the consequence that endocannabinoids can no longer exert their fear-alleviating effects following highly aversive experiences and/or in highly aversive situations. Interestingly, a limited range of action of the endocannabinoid system was recently described in respect to two electrophysiological phenomena within the CA1 region of the hippocampus. On the one hand, endocannabinoids were shown to regulate long-term potentiation only after moderate but not after strong stimulation protocols (Slanina *et al.*, 2005). On the other hand, endocannabinoid-dependent depolarization-induced suppression of inhibition was exerted only when the firing rate of GABAergic interneurons was below a certain threshold (Foldy *et al.*, 2006). These data indicate that the critical range hypothesis of endocannabinoid action applies not only to endocannabinoid-dependent behavioral responses, but also to cellular models of synaptic plasticity.

In our study, CB1 deficiency led to a bimodal distribution of the fear responses, indicating that fear-alleviating effects of CB1 became evident in a subset of animals only. The factors determining the individual fear susceptibility remain to be characterized. Certainly genetic factors will influence both processing of the inescapable footshocks (Balogh and Wehner, 2003) and range of endocannabinoid action (Akinshola *et al.*, 1999). However, we observed a bimodal distribution of fear

responses also in inbred mice (i.e., in genetically identical animals) following acute pharmacological blockade of CB1, thus demonstrating a significant contribution of non-genomic factors, such as maternal behavior (Meaney, 2001; Champagne et al., 2003) as well. The influence of these factors was only observed when CB1 was pharmacologically blocked or genetically ablated, indicating that an intact endocannabinoid system is able to mask inter-individual differences in fear susceptibility to a large extent.

In summary, our data imply that the endocannabinoid system, once activated, acts as a “high-pass filter” that reduces fear in moderately aversive situations, but leaves fear to highly dangerous stimuli unaffected. Such a gating mechanism ensures that the organisms develop strong and prolonged fear reactions in harmful situations only. Genetic and developmental factors may influence the capacity of the endocannabinoid system, which may eventually result in inadequately strong fear responses also to irrelevant stimuli, known as a key symptom of anxiety (Rosen and Schulkin, 1998). Altogether, our data provide a behavioral and mechanistic rationale to the exploitation of the endocannabinoid system as a therapeutic target for the treatment of disorders associated with disturbed gating of neuronal activation, which include not only anxiety disorders (Kathuria et al., 2003; Chhatwal et al., 2005) but also chronic pain (Piomelli, 2003) or epileptic seizures (Marsicano et al., 2003).

Acknowledgements

We thank Maria L. Lopez-Rodriguez (Universidad de Complutense Madrid, Spain) for kindly providing UCM707, and Walter Zieglgänsberger, Anja Siegmund (both MPI of Psychiatry, Munich) and Mario Engelmann (Otto von Guericke University, Magdeburg) for their valuable comments on the manuscript. This study was supported by grants from the *VolkswagenStiftung* to C.T.W. (I/78 562) and B.L. (I/78 560), from the DFG to B.L. (Lu755/1-3) and by a Marie Curie Postdoctoral Fellowship to K.M. (Contract No: QLGI-CT-2002-51742).

References

- Adamec R (1997) Transmitter systems involved in neural plasticity underlying increased anxiety and defense - implications for understanding anxiety following traumatic stress. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 755-765.
- Adamec R, Blundell J, Burton P (2005) Neural circuit changes mediating lasting brain and behavioral response to predator stress. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1225-1241.
- Adamec R, Blundell J, Collins A (2001) Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 721-744.
- Akinshola BE, Chakrabarti A, Onaivi ES (1999) In-vitro and in-vivo action of cannabinoids. *Neurochem Res* 24: 1233-1240.
- Balogh SA, Wehner JM (2003) Inbred mouse strain differences in the establishment of long-term fear memory. *Behav Brain Res* 140: 97-106.
- Cannich A, Wotjak CT, Kamprath K, Hermann H, Lutz B, Marsicano G (2004) CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11: 625-632.
- Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ (2003) Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 79: 359-371.
- Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ (2005) Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 30: 516-524.
- de Lago E, Fernandez-Ruiz J, Ortega-Gutierrez S, Viso A, Lopez-Rodriguez ML, Ramos JA (2002) UCM707, a potent and selective inhibitor of endocannabinoid uptake, potentiates hypokinetic and antinociceptive effects of anandamide. *Eur J Pharmacol* 449: 99-103.
- Degroot A, Nomikos GG (2004) Genetic deletion and pharmacological blockade of CB1 receptors modulates anxiety in the shock-probe burying test. *Eur J Neurosci* 20: 1059-1064.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3: 771-784.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23: 4850-4857.
- Foldy C, Neu A, Jones MV, Soltesz I (2006) Presynaptic, activity-dependent modulation of cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of GABA release. *J Neurosci* 26: 1465-1469.

- Griebel G, Stemmelin J, Scatton B (2005) Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry* 57: 261-267.
- Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF (2002) The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci* 16: 1395-1398.
- Haller J, Varga B, Ledent C, Barna I, Freund TF (2004) Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 19: 1906-1912.
- Hawkins RD, Cohen TE, Greene W, Kandel ER (1998) Relationships between dishabituation, sensitization, and inhibition of the gill- and siphon-withdrawal reflex in *Aplysia californica*: effects of response measure, test time, and training stimulus. *Behav Neurosci* 112: 24-38.
- Hill MN, Gorzalka BB (2005) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol* 16: 333-352.
- Kamprath K, Wotjak CT (2004) Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11: 770-786.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9: 76-81.
- Lopez-Rodriguez ML, Viso A, Ortega-Gutierrez S, Fowler CJ, Tiger G, de Lago E, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA (2003) Design, synthesis, and biological evaluation of new inhibitors of the endocannabinoid uptake: comparison with effects on fatty acid amidohydrolase. *J Med Chem* 46: 1512-1522.
- Lopez-Rodriguez ML, Viso A, Ortega-Gutierrez S, Lastres-Becker I, Gonzalez S, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA (2001) Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors. *J Med Chem* 44: 4505-4508.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der SM, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302: 84-88.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418: 530-534.
- McKinney MK, Cravatt BF (2005) Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 74: 411-432.
- Meaney MJ (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24: 1161-1192.

Navarro M, Hernandez E, Munoz RM, Del A, I, Villanua MA, Carrera MR, Rodriguez dF (1997) Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* 8: 491-496.

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005) Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 21: 1057-1069.

Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-884.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, . (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350: 240-244.

Rodriguez Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA (2005) Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci* 25: 8725-8734.

Rosen JB, Schulkin J (1998) From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev* 105: 325-350.

Slanina KA, Roberto M, Schweitzer P (2005) Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology* 49: 660-668.

Stam R, Buijnzeel AW, Wiegant VM (2000) Long-lasting stress sensitisation. *Eur J Pharmacol* 405: 217-224.

Steckler T (2005) The neuropsychology of stress. In: *Handbook of stress and the brain* (Steckler T, Kalin NH, Reul JM, eds), pp 25-42. Amsterdam: Elsevier B.V.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24: 4787-4795.

Uriguen L, Perez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J (2004) Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* 46: 966-973.

van Dijken HH, de Goeij DC, Sutanto W, Mos J, de Kloet ER, Tilders FJ (1993) Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* 58: 57-64.

van Dijken HH, Mos J, van der Heyden JA, Tilders FJ (1992a) Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav* 52: 945-951.

van Dijken HH, Tilders FJ, Olivier B, Mos J (1992b) Effects of anxiolytic and antidepressant drugs on long-lasting behavioural deficits resulting from one short stress experience in male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 109: 395-402.

van Dijken HH, van der Heyden JA, Mos J, Tilders FJ (1992c) Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav* 51: 787-794.

Viveros MP, Marco EM, File SE (2005) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 331-342.

Walters ET (1987) Multiple sensory neuronal correlates of site-specific sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci* 7: 408-417.

Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-682.

Wotjak CT (2005) Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem* 5: 659-670.

Figure 1

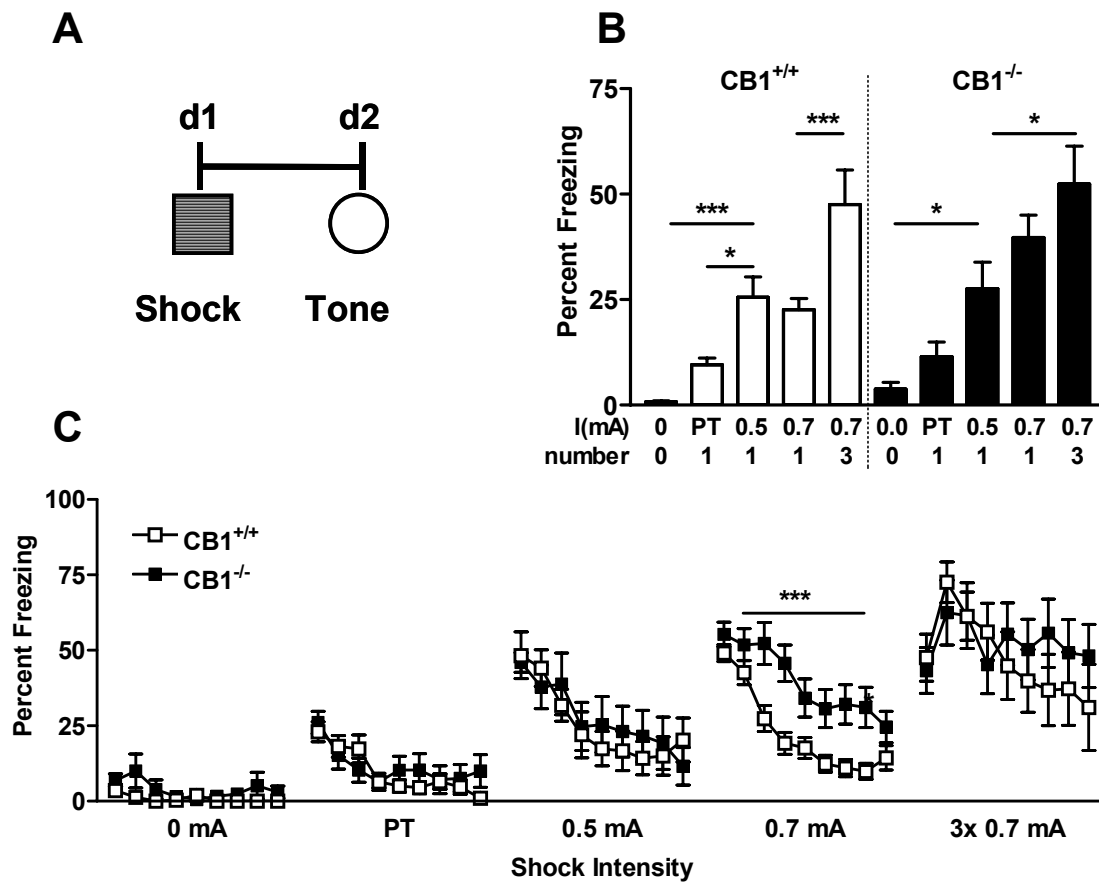


Figure 1: Fear alleviating effects of endocannabinoids depend on the intensity of the previously encountered footshock. (A) Experimental schedule: Different groups of CB1-deficient mice (CB1^{-/-}, ■) and their wild-type littermate controls (CB1^{+/+}, □) received an inescapable footshock of different intensity [I(mA)] and number, ranging from no shock (0 mA) over one shock at the individual pain threshold (PT) up to three shocks with 0.7 mA (3x 0.7 mA). At the next day, all mice were exposed to a 3-min tone in a neutral test context. Freezing to the tone served as a measure of a sensitization induced fear response to the tone. (B) The freezing responses of both CB1^{-/-} and CB1^{+/+} showed a clear dependency on the intensity of the previously encountered sensitization procedure. (C) If the development of the freezing response over the course of tone presentation is considered, genetic ablation caused a sustained freezing response only following sensitization with a single 0.7-mA footshock. Data were expressed as the freezing response shown during the entire tone presentation (B) or during the nine 20-s intervals of the tone presentation normalized to the respective observation period. The sample sizes (CB1^{+/+}/CB1^{-/-}) for the different sensitization protocols were as follows: 0 mA: 10/15; PT: 9/8; 0.7 mA: 26/20; 3x 0.7 mA: 8/10. * p < 0.05, *** p < 0.001. Note that data from mice which received a single 0.7-mA shock are identical to those of manuscript 3 (Fig1,3).

Figure 2

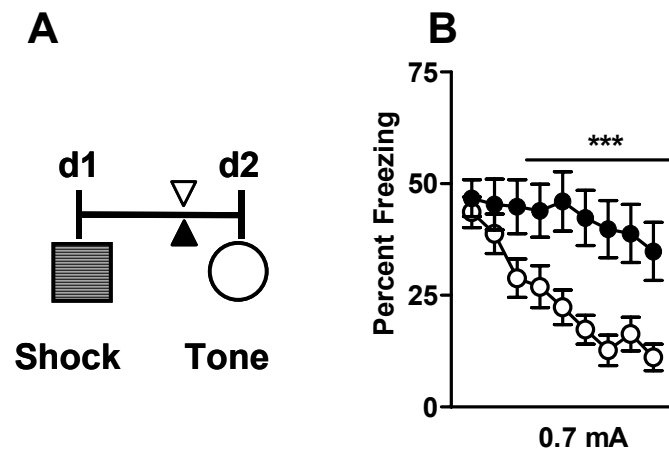


Figure 2: Pharmacological blockade of CB1 interferes with the adaptation of a fear response to a tone following sensitization. (A) Experimental schedule: C57BL/6NCrl mice were sensitized with a single 0.7-mA footshock and treated either with the CB1 antagonist SR141716A (●, n = 34) or with vehicle (○, n = 35) before tone presentation at the next day. (B) Pharmacological blockade of CB1 led to a sustained freezing response to the tone. Data were expressed as the freezing response shown during the nine 20-s intervals of the tone presentation normalized to the observation period. *** p < 0.001.

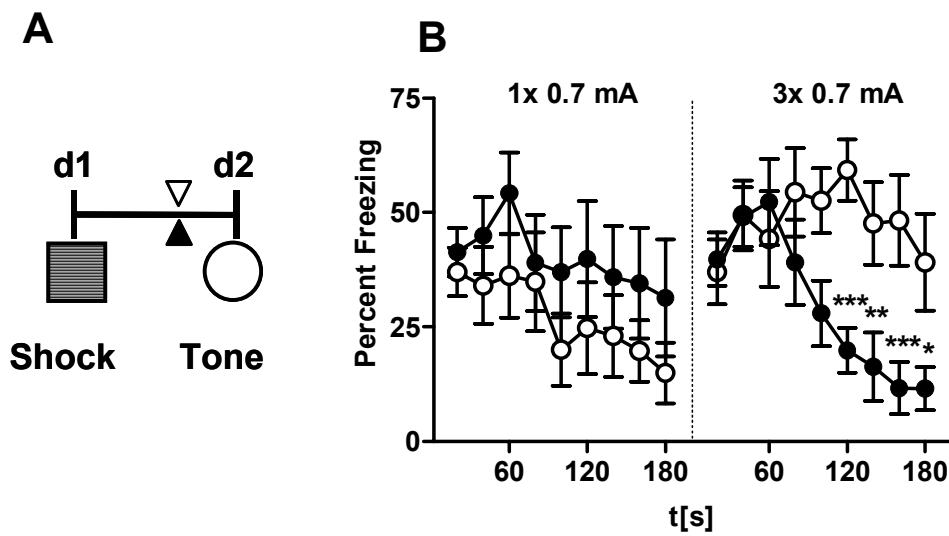
Figure 3

Figure 3: Blockade of endocannabinoid re-uptake and degradation promotes fear adaptation following highly aversive encounters. (A) Experimental schedule: C57BL/6N mice received either a single or three 0.7-mA shocks. At the next day, half of the animals of each sensitization protocol were treated with vehicle (○, n = 10 each) the other half with a mixture of the endocannabinoid uptake and degradation blockers UCM707 and URB597 (●, n = 10 each) 60 min before presentation of the tone. (B) Vehicle-treated mice showed a rapid decline of freezing to the tone following sensitization with a single 0.7-mA shock, but sustained freezing response following sensitization with three 0.7-mA shocks. Inhibition of endocannabinoid uptake and degradation transformed this sustained freezing response into a rapidly waning response. Data were expressed as the freezing response shown during the nine 20-s intervals of the tone presentation normalized to the observation period. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Figure 4

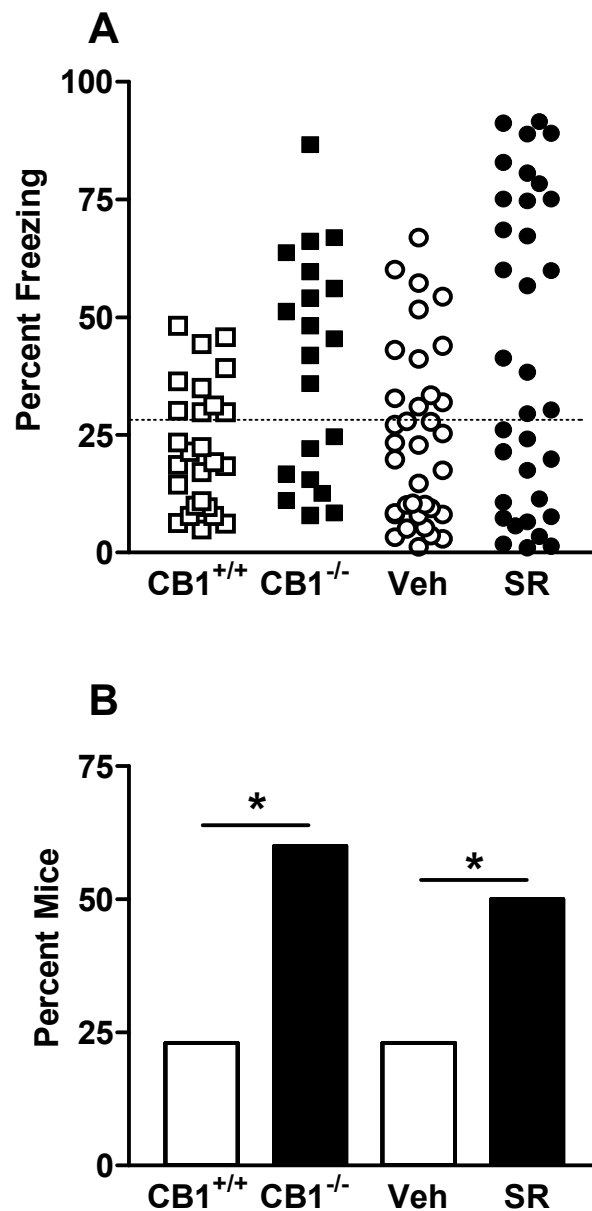


Figure 4: CB1 deficiency or blockade causes sustained fear responses in a subset of mice only. (A) Analysis of the individual freezing responses shown during the entire tone presentation revealed that the significant effects of CB1 deficiency (cf. Fig.1) and blockade (Fig. 2) that could be observed after application of a single 0.7-mA footshock, relate to excessive fear of a subset of animals only. (B) Assignment of the animals to “strong responders” [more than 60s freezing; dotted line in (A)], or “weak responders” revealed that a higher proportion of CB1-deficient (CB1^{-/-}) and antagonist-treated mice (SR) showed a strong fear response as compared to the respective controls (V, CB1^{+/+}). * p<0.05.

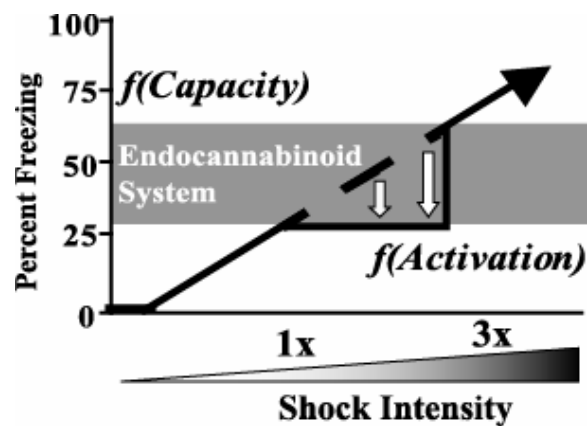
Figure 5

Figure 5: The “critical-range hypothesis of endocannabinoid action”. The “critical-range hypothesis of endocannabinoid action” stipulates that the shock intensity has to exceed a certain threshold [e.g., a single 0.7-mA shock (1x) in case of this study], before a subsequently presented tone is capable of activating the endocannabinoid system and/or other CB1-controlled fear-modulating transmitter systems. After sensitization with high shock intensities (e.g., three 0.7-mA shocks, 3x), in contrast, highly efficient re-uptake and degradation processes limit the activity of the endocannabinoid system.