

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Auswirkungen eines Polymorphismus im PDYN-Gen
(rs1997794) auf die Furchtakquisition und -extinktion in einer fMRT-Studie
unter Einbezug von Hautleitfähigkeitsveränderungen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Alexander Leppig

aus Lima, Peru

Datum der Promotion: 21.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Zusammenfassung / Abstract	VIII / X
1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Neurophysiologie und Neuroanatomie der Furchtakquisition und –extinktion	3
2.2. Dynorphine	5
2.3. PDYN-Gen und Einzelnukleotid-Polymorphismus bei rs1997794	9
2.4. Imaging Genetics	13
2.5. Hypothesen	15
3. Material und Methodik	17
3.1. Experimentelles Design und Versuchsablauf	17
3.2. Psychologische Diagnostik, neuropsychologische Testung und Fragebögen	19
3.3. Rekrutierung, Ein- und Ausschlusskriterien	20
3.4. Funktionelle Magnetresonanztomographie	22
3.4.1. Datenerhebung	22
3.4.2. Datenvorverarbeitung und –analyse	23
3.4.3. Statistik	23
3.5. Hautleitfähigkeitsmessung	24
3.5.1. Ablauf	24
3.5.2. Datenanalyse	25
3.5.3. Statistik	25
3.6. Elektrische Stimulation	26
3.7. DNA-Extraktion und Genotypisierung	26
4. Ergebnisse	27
4.1. Stichprobencharakteristika	27
4.2. Ergebnisse der fMRT-Analysen	30
4.3. Ergebnisse der SCR-Analysen	35
5. Diskussion	40

5.1. Diskussion der fMRT-Ergebnisse	40
5.2. Diskussion der SCR-Ergebnisse	42
5.3. Allgemeine Probleme und Kritik	43
5.4. Schlussfolgerung und Ausblick	44
6. Literaturverzeichnis	45
Eidesstattliche Versicherung	
Lebenslauf	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Anteriorer Cingulärer Cortex
ACQ	Akquisition
ANOVA	Varianzanalyse
BA	basaler Nucleus der Amygdala
BCAN	Berlin Center for Advanced Neuroimaging
BDI-II	Beck-Depressionsinventar II
BDNF	Abkürzung für engl. brain-derived neurotrophic factor
BLA	basolaterale Amygdala
BOLD	Abkürzung für engl. blood oxygen level dependent
CACNA1C	Alpha 1C Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCM	Charité Campus Mitte
CE	zentraler Nucleus der Amygdala
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CP	Abkürzung für engl. caudate putamen
CPA	Abkürzung für engl. conditioned place aversion
CR	konditionierte Reaktion
CRF	Abkürzung für engl. corticotropin releasing factor
CS	konditionierter Stimulus
D-MEQ	Morningness-Eveningness-Questionnaire
D2	Aufmerksamkeits-Belastungs-Test d2
DASS	Depression Anxiety Stress Scale
dB	Dezibel
DISC1	Abkürzung für engl. Disrupted in Schizophrenia 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRN	dorsaler Raphe-Kern
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHI	Edinburgh Handedness Inventory
EPI	Abkürzung für engl. echo planar imaging
ERK	extrazelluläre signal-regulierte Kinasen
EX1	frühe Extinktion

EX2	späte Extinktion
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FOV	Abkürzung für engl. field of view
FWE	Abkürzung für engl. family wise error
FWHM	Abkürzung für engl. full-width at half-maximum
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
Gi/o-Protein	inhibitorisches Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GIRK	Abkürzung für engl. G-protein gated inwardly rectifying potassium channel
GRK3	G-protein-gekoppelte Rezeptor Kinase 3
GSR	Abkürzung für engl. Galvanic Skin Response
GTP	Guanosintriphosphat
GWAS	Abkürzung für engl. genome-wide association study
HIPPO	Hippocampus
HYPO	Hypothalamus
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
ICA	Abkürzung für engl. independent component analysis
IL	infralimbischer Cortex
ISI	Interstimulusintervall
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kHz	Kilohertz
Kir3	Abkürzung für engl. G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel 3
KOR	κ -Opiod-Rezeptor
LA	laterale Amygdala
LC	locus coeruleus
LTP	Langzeitpotenzierung
μ S	mikroSiemens
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mCG	medialer Corpus geniculatum
MHC	Abkürzung für engl. major histocompatibility complex
mPFC	medialer präfrontaler Cortex
mV	Millivolt
MWT-B	Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest

NAc	Nucleus accumbens
NaCl	Kochsalz
NEO-FFI	NEO-Five-Factor-Inventory
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nor-BNI	nor-Binaltorphimin
NS	neutraler Stimulus
NST	Nucleus Striae terminalis
OST	Abkürzung für engl. one-sample t-test
p38	p38 mitogen-aktivierte Protein Kinase
PDYN	Prodynorphin
PFC	präfrontaler Cortex
PIN	posteriorer intralaminarer Nucleus des Thalamus
PSRS-23	Perceived Stress Reactivity Scale
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
ROI	Abkürzung für engl. region of interest
RS-25	Resilienzskala 25
rs1997794	Einzelnukleotid-Polymorphismus im Prodynorphin-Gen
SC	sublimbischer Cortex
SCR	Hautleitfähigkeitsreaktion
SKID-I	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV (Achse-I)
SN	substantia nigra
SNP	Abkürzung für engl. single nucleotide polymorphism
SPM 8	Statistical Parametric Mapping 8
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SRRS	Social Readjustment Rating Scale
SSCS	Screening Scale Chronic Stress
STAI	State-Trait Anxiety Inventory
TE	Abkürzung für engl. time of echo
TR	Abkürzung für engl. time of repetition
UCS	unkonditionierter Stimulus
UR	unbedingte Reaktion
VAS	Visuelle Analogskala
VLMT	Verbaler Lern- und Merkfähigkeitstest
VMPFC	ventromedialer Präfrontaler Cortex

VTA	Abkürzung für engl. ventral tegmental area
WIE-MAT	Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene
ZNF804A	Zinc finger protein 804A

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 KOR-System: Signalling, neuronale Verschaltungen und Verhalten (Shalini Dogra et al. 2015)
- Abbildung 2 Gene, intermediärer Phänotyp und psychiatrische Erkrankung (*Abb. modifiziert in Anlehnung an Hashimoto et. al, 2015*)
- Abbildung 3 Imaging Genetics (*Abb. modifiziert in Anlehnung an Hashimoto et. al, 2015*)
- Abbildung 4 Exemplarischer Ablauf der Versuchsbedingungen *ACQ*, *EX1* und *EX2* in der fMRT
- Abbildung 5 Amygdala-ROI und VMPFC-ROI
- Abbildung 6 Aktivierung der Schmerzmatrix für *CS+* vs. *CS-* (FWE < 0.05 whole brain korrigiert)
- Abbildung 7 Aktivierung der Amygdalae für *CS+* vs. *CS-*
- Abbildung 8 Aktivierung der VMPFC für *CS+* vs. *CS-*
- Abbildung 9 Effekt des PDYN-Polymorphismus auf *GrünExpo EX2*
- Abbildung 10 Korrelation zwischen VMPFC-Aktivierung bei *GrünExpo EX2* und STAI-S (nach *EX2*)
- Abbildung 11 SCR bei *CS+* und *CS-* (unterteilt nach Genotypen) während *ACQ*, *EX1* und *EX2*
- Abbildung 12 Streudiagramm der SCR-Mittelwerte von *CS+* bei *EX2* und des Summenscores von STAI-S (nach *ACQ*)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über Fragebögen und neuropsychologische Tests
Tabelle 2	Übersicht über Probandenausschluss
Tabelle 3	Mittelwertvergleich demographischer Variablen der fMRT-Versuchsgruppen mit ANOVA
Tabelle 4	Mittelwertvergleich demographischer Variablen der fMRT-Versuchsgruppen mit Chi-Quadrat-Test für nominale Variablen
Tabelle 5	Mittelwertvergleich demographischer Variablen der SCR-Versuchsgruppen mit ANOVA
Tabelle 6	Mittelwertvergleich demographischer Variablen der SCR-Versuchsgruppen mit Chi-Quadrat-Test für nominale Variable
Tabelle 7	Test der Innersubjekteffekte bei SCR (Faktoren: Bedingung \times Messzeitpunkt)
Tabelle 8	Test der Zwischensubjekteffekte bei SCR (Faktor: Schockintensität)
Tabelle 9	Test der Zwischensubjekteffekte bei SCR (Faktor: STAI-S (nach <i>ACQ</i>))
Tabelle 10	Test der Zwischensubjekteffekte bei SCR (Faktor: PDYN)

Zusammenfassung

Hintergrund: Untersuchungen der Vorgängerstudie von Bilkei-Gorzo et al. (2012) ergeben Hinweise, dass Prodynorphin (PDYN) einen wesentlichen Einfluss auf Akquisition und Extinktion von schmerzinduziertem Verhalten ausübt. Beim Menschen zeigt sich ein relevanter Einzelnukleotid-Polymorphismus bei *rs1997794* (Promotorregion des PDYN-Gens), wobei homozygote T-Allelträger bei Schmerzreizen eine verstärkte Akquisitions- und eine verringerte Extinktionsleistung der Amygdala im Vergleich zu C-Allelträgern erkennen lassen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die humanexperimentellen Anteile der Vorgängerstudie mit größerer Stichprobe zu replizieren und PDYN-Effekte in der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT) und Hautleitfähigkeitsmessung (engl. Skin Conductance Response, SCR) zu untersuchen.

Methodik: Untersucht wird eine Stichprobe von 104 gesunden Erwachsenen (60 Frauen; Durchschnittsalter: 28,17 Jahre) mittels des von Bilkei-Gorzo et al. (2012) verwendeten fMRT-Paradigmas: Der dreiteilige Versuchsaufbau besteht aus Akquisition (*ACQ*), früher (*EX1*) und später Extinktion (*EX2*). Als unconditionierter Reiz (*UCS*) dient ein Schmerzreiz, der in *ACQ* zeitlich mit dem Erscheinen grüner Quadrate (*CS+*) gekoppelt wird. Bei blauen Quadraten (*CS-*) sowie in beiden Extinktionsphasen erfolgt kein Schmerzreiz. Anhand der Ausprägung des *rs1997794*-Polymorphismus werden drei Gruppen gebildet (TT vs. CT vs. CC) und in der fMRT sowie Hautleitfähigkeitsmessung miteinander verglichen. PDYN-Effekte in der fMRT werden mit SPM8 und einer multiplen Regressionsanalyse untersucht (Regions of interest, ROIs: Amygdala und Ventromedialer Präfrontaler Cortex (VMPFC)). PDYN-Effekte in der Hautleitfähigkeitsmessung werden in SPSS 22 mit einer Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholungen analysiert.

Ergebnisse: In der fMRT-Auswertung mittels multipler Regressionsanalyse können keine PDYN-Effekte auf die Amygdala-Aktivierung in den Extinktionsphasen festgestellt werden. Allerdings zeigt sich ein PDYN-Effekt auf die VMPFC-Aktivität in *EX2*. Die exponentiell ansteigende Aktivität des VMPFC wird während *CS+* (*GrünExpo EX2*) mit steigender Anzahl an T-Allelen (TT > CT > CC) verstärkt. Darüber hinaus korreliert die VMPFC-Aktivität bei *GrünExpo EX2* signifikant mit dem Summenscore des State-Trait-Anxiety Inventory-S (STAI-S; Fragebogen für Ängstlichkeit) nach *EX2*. In keiner der Subtasks zeigt sich ein PDYN-Effekt auf die Hautleitfähigkeitsmessung.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse von Bilkei-Gorzo et al. (2012) können nicht repliziert werden. Spekuliert werden darf allerdings, ob T-Allelträger generell eine Prädisposition zu verstärkter Amygdala-Aktivität bei CS+ besitzen, die sich jedoch nur bei der TT-Subgruppe der Vorgängerstudie manifestiert. In der vorliegenden Replikationsstudie könnte eine vermehrte Amygdala-Aktivität durch den VMPFC supprimiert werden, was sowohl die fehlenden Geneffekte auf die Amygdala-Aktivität als auch den Zusammenhang zwischen VMPFC-Aktivität und T-Allelen zu erklären vermag. Natürlich lässt sich die Nicht-Replizierbarkeit des Geneffektes auch als allgemeine Problematik von Imaging-Genetics-Studien (geringe Einzelgen-Effektstärken und kleine Stichproben) deuten. Zur weiteren Investigation sind Studien mit größeren Stichproben notwendig.

Abstract

Background: Experimental studies from Bilkei-Gorzo et al. (2012) suggest a major impact of prodynorphine (PDYN) on acquisition and extinction of pain-induced behavior. In humans, a corresponding single-nucleotide-polymorphism can be detected at *rs1997794* (PDYN-promoter-region). T-allele-homozygotes at *rs1997794* show increased pain-induced fear acquisition and extinction capabilities compared to C-allele-carriers. The objective of this study is to replicate the human experimental part of the precursor study from Bilkei-Gorzo et al. (2012) in a larger sample and further, to analyze PDYN-effects on functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) and Skin Conductance Responses (SCR).

Methods: A sample of 104 healthy adults (60 women; mean age: 28,17 years) is to be examined using the fMRI-paradigm from Bilkei-Gorzo et al. (2012): The experimental set-up consists of acquisition (*ACQ*), early (*EX1*) and late extinction (*EX2*). A painful stimulus serves as unconditioned stimulus (*UCS*), timed with the appearance of green squares (*CS+*) during *ACQ*. During the extinction phases and during the presentation of blue squares (*CS-*) no painful stimulus is applied. On the basis of *rs1997794*-characteristics three groups (TT vs. CT vs. CC) are established and compared using fMRI and SCR. PDYN-effects in fMRI are investigated with SPM8 and multiple regressions analyses (regions of interest (ROIs): amygdala and ventromedial prefrontal cortex (VMPFC)). PDYN-effects in SCR are analysed in SPSS 22 with an analyses of variance (ANOVA) with multiple measures.

Results: According to the evaluation of fMRI-results of multiple regression analyses no PDYN-effects on amygdala activity in extinction phases can be detected. Nevertheless, a PDYN-effect on VMPFC activity during *EX2* becomes apparent. The exponentially increasing VMPFC activity at the time of *CS+* (*green expo EX2*) is enhanced with an increasing number of T-alleles (TT > CT > CC). Furthermore, VMPFC activity in *green expo EX2* correlates significantly with the State-Trait-Anxiety Inventory-S (STAI-S)-score after-*EX2*. A PDYN-effect on Skin Conductance Responses cannot be demonstrated in any subtask.

Conclusion: The results from Bilkei-Gorzo A. et al. (2012) cannot be replicated. Nonetheless, allowing for speculation, T-allele-carriers might bear a general predisposition to higher amygdala activity at the time of *CS+*, manifesting itself in the TT-subgroup only. In the present replication study an increased amygdala activity might be suppressed by the VMPFC, explaining

the lack of PDYN-effects on amygdala activity and the correlation between VMPFC activity and T-alleles. However, the non-replicability of the PDYN-effects could also be interpreted as a general problem in imaging genetics studies (low single-gene-power and small samples). Large-sample-studies are required for further investigation.

1. Einleitung

Als evolutionäres Erbe sind wir Menschen mit der Fähigkeit ausgestattet, durch verschiedene Anpassungs- und Lernprozesse auf eine sich stetig verändernde Umwelt zu reagieren, ihr aktiv und passiv, bewusst und unbewusst, gewollt und ungewollt zu entgegnen und sich auf die jeweiligen Umweltbedingungen einzustellen. Unter den unspezifischen und weitgefassten Begrifflichkeiten von Lern- und Adaptationsprozessen stellt die Klassische Konditionierung nach Pavlov ein etabliertes Modell aus dem Bereich der behavioralen Lerntheorie dar.

Grundidee der Klassischen Konditionierung ist die Kopplung eines unkonditionierten Stimulus (UCS), z.B. eines aversiven Reizes, an eine unkonditionierte (angeborene) Reaktion (UR) behavioristischer oder physiologischer Art, z.B. vermehrtes Schwitzen oder das Wegziehen des Armes in Folge eines Schmerzreizes. Wird nun ein initial neutraler Stimulus (NS), z.B. ein akustisches oder visuelles Signal, welches alleinig keine spezifische Reaktion auslöst, zeitlich oder situativ mit einem UCS gekoppelt, so wird der ehemals NS zu einem konditionierten Stimulus (CS) transformiert. Im beschriebenen Beispiel bedeutet dies, dass nun das akustische oder visuelle Signal alleine ausreicht, um das Wegziehen des Armes auszulösen. Aus der UR ist damit eine konditionierte Reaktion (CR) geworden.¹

Auch die Furchtakquisition ist ein Lernprozess nach dem Prinzip der Klassischen Konditionierung nach Pavlov. Dieser Anpassungsprozess ist notwendig, um sich auf eine dynamische Umwelt einzustellen sowie durch Verhaltensadaptation antizipatorisch auf aversive Reize zu reagieren und potentielle Gefährdungen abzuwenden. Umstände und Situationen, die eine Vorhersagekraft für einen faktisch oder potenziell noxischen Reiz besitzen, werden erkannt und Anpassungsreaktionen präventiv eingeleitet. Furchtakquisition ist demnach ein sinnvolles Phänomen, welches effektiv unmittelbaren Schaden von uns abwenden kann. Ihrer Bedeutung als protektivem Mechanismus geschuldet, besitzt die Furchtakquisition das Charakteristikum sich schnell und zugleich langanhaltend zu konsolidieren. Je nach Intensität des aversiven Reizes kann eine einmalige Exposition genügen, um einen beständigen Lerneffekt zu erzielen.¹

Trotz der beschriebenen Wichtigkeit der Furchtakquisition zieht eine sich verändernde Umwelt die Notwendigkeit nach sich, eine erlernte Reiz-Reaktions-Kette jederzeit modifizieren zu können, sollte der erwartete Effekt eines CS nicht deckungsgleich mit dem tatsächlich eintretenden Effekt sein. Es besteht demnach die Möglichkeit der Extinktion einer erworbenen Furchtreaktion, die sich in totaler oder partieller Überschreibung der furchtassoziierten Gedächtnisinhalte widerspiegelt. Bleibt ein aversiver Stimulus längerfristig aus, so verliert eine präventive Reaktion nicht nur ihren originären Nutzen, sondern kann auch kontraproduktiv bzw.

schädlich sein. Die Furchtextinktion ist ein langsamer und komplexer inhibitorischer Lernprozess, der typischerweise eine mehrmalige Exposition von CS ohne gekoppelten aversiven Reiz voraussetzt. Auch dieses Charakteristikum ist evolutionär sinnvoll, wenn man bedenkt, dass in gewissen Situationen das protektive Ausmaß der Furchtakquisition ihr mittel- oder langfristig schädliches Potential bei weitem übersteigen kann.¹

Beispielhaft für eine klinisch relevante, pathologisch eingeschränkte Extinktionsleistung ist die Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS) zu erwähnen. Bei der PTBS kann eine konditionierte Angstreaktion nicht ausreichend extinguiert werden, sodass auch noch Monate und Jahre nach einem traumatischen Ereignis eine durch entsprechende Trigger induzierbare, pathologische Angstreaktion auslösbar bleibt. Die S3-Leitlinie „Posttraumatische Belastungsstörung“ (2011; ICD 10: F 43.1) definiert die PTBS folgendermaßen: „Die Posttraumatische Belastungsstörung ist eine mögliche Folgereaktion eines oder mehrerer traumatischer Ereignisse [...], die an der eigenen Person, aber auch an fremden Personen erlebt werden können. In vielen Fällen kommt es zum Gefühl von Hilflosigkeit und durch das traumatische Erleben zu einer Erschütterung des Selbst- und Weltverständnisses. [...] z.B. Erleben von körperlicher und sexualisierter Gewalt, auch in der Kindheit (sogenannter sexueller Missbrauch), Vergewaltigung, gewalttätige Angriffe auf die eigene Person, Entführung, Geiselnahme, Terroranschlag, Krieg, Kriegsgefangenschaft, politische Haft, Folterung, Gefangenschaft in einem Konzentrationslager, Natur- oder durch Menschen verursachte Katastrophen, Unfälle oder die Diagnose einer lebensbedrohlichen Krankheit.“ Die Prävalenz einer PTBS variierte je nach Art des Traumas von 10-25% bei Opfern von Verkehrsunfällen, schweren Organerkrankungen und Gewaltverbrechen bis zu 50% bei Vergewaltigung, Krieg, Vertreibung und Folter.¹⁻³

2. Grundlagen

2.1. Neurophysiologie und Neuroanatomie der Furchtakquisition und -extinktion

Die deutsche S3-Leitlinie „Behandlung von Angststörungen“ definiert Furcht bzw. Angst als „...eine Reaktion auf Gefahrenreize, die sich in körperlichen Reaktionen wie Herzrasen, Schwitzen und anderen Symptomen sowie in psychischen Symptomen wie Unwohlsein oder Unruhe zeigt, wobei der Betroffene versucht, die Gefahrenquelle auszuschalten oder ihr zu entkommen. Angst vor realen Bedrohungen ist sinnvoll, denn die körperlichen Ausdrucksformen der Angst sollen den Körper auf eine Kampf- oder Fluchtreaktion vorbereiten, während die psychischen Ausdrucksformen das Individuum schützen, indem Gefahrensituationen vermieden oder mit erhöhter Vigilanz gemeistert werden. Bei pathologischer Angst kommt es zu übertriebenen, unrealistischen oder auch grundlosen Reaktionen. Trotz ausgearbeiteter Klassifikationskriterien ist es nicht einfach, eine genaue Grenze zwischen angemessener und pathologischer Angst zu ziehen.“^{3,4}

Auf neuronaler Ebene stellt die Amygdala das anatomische Korrelat der Angst und der aus ihr abgeleiteten Angstreaktionen dar. Die Amygdala ist die zentrale Schaltstation des sogenannten Furchtgedächtnisses und moduliert die Gedächtnisbildung auf verschiedene Arten. So gibt es Hinweise, dass insbesondere die basolaterale Amygdala (BLA), ein Subareal der Amygdala, die Gedächtnis-modulierenden Wirkungen adrenerger Stresshormone und weiterer Neurotransmitter vermittelt. Durch Efferenzen zu verschiedenen Hirnregionen, u.a. Nucleus caudatus, Nucleus accumbens und kortikalen Regionen, scheint die BLA einen Einfluss auf die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten auszuüben. Auch bei der Akquisition und der Expression der klassischen Furchtreaktion nach Pavlov stellt die Amygdala die zentrale, zerebrale Struktur dar.^{5,6}

Furchtakquisitions-assoziierte Änderungen der neuronalen Aktivität in der lateralen Amygdala (LA) korrelieren mit der Expression von akquiriertem Furchtverhalten. Neben der akquirierten Furcht kodieren die Neuronen der LA auch für extinguierte Furcht.^{4,7-9}

Eine pharmakologische Inaktivierung der BLA mit Muscimol (GABA_A-Agonist) resultiert beispielsweise in einer Inhibition sowohl der Furchtakquisition als auch der Ausbildung eines Furchtgedächtnisses^{10,11}. Bei Furchtakquisitionsparadigmen im Tierexperiment mit Ratten mittels akustischen UCS zeigen sich direkte Projektionen des medialen Corpus Geniculatum (mCG) und des posterioren intralaminaren Nucleus des Thalamus (PIN) in die BLA, die wiederum über den basalen Nucleus (BA) in den zentralen Nucleus (CE) der Amygdala projiziert¹²⁻¹⁷. Bereits

kleinere Läsionen der beteiligten Strukturen (LA, PIN und mCG) verhindern eine erfolgreiche Akquisition von Furcht^{18,19}.

Vergleichbar mit anderen Lern- und Gedächtnisprozessen basiert auch die Furchtakquisition samt Furchtgedächtnis neurophysiologisch auf Modifikationen der synaptischen Transmission. Innerhalb der LA und in thalamo-amygdalären Projektionen ist besonders die Langzeitpotenzierung (engl. long-term potentiation, LTP) über NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat, Subtyp ionotroper Glutamat-Rezeptoren) ein wichtiger, zugrundeliegender Mechanismus.²⁰⁻²²

Neben der Akquisition spielt die Amygdala auch eine wichtige Rolle bei der Extinktion furchtassoziierter Gedächtnisinhalte⁴. Wie bereits erwähnt ist Extinktion eine Form des inhibitorischen Lernens. Prozesse der Extinktion können durch eine aktive Suppression exzitatorischer Prozesse der Furchtakquisition charakterisiert werden²³. Eine pharmakologische Blockade der Plastizitätsprozesse bzw. der neuronalen Aktivität innerhalb der Amygdala inhibiert die Extinktion von Furcht.^{24,25}

Da furchtkonditionierte Gedächtnisinhalte von Extinktionsprozessen aktiv supprimiert werden müssen, findet keine „Löschung“ der furchtakquirierten Lerninhalte im eigentlichen Wortsinn statt⁴. Neuronale Fußabdrücke der akquirierten Furcht persistieren und sind darüber hinaus nur bedingt dauerhaft supprimierbar, da die erlernte Extinktion kurzlebig und kontextgebunden ist⁴. Trotz wiederholten Extinktionstrainings im Sinne der Therapie bei Angststörungen, vermag eine einmal akquirierte Furcht jederzeit wieder aufzuflammen. Parallel zur Furchtakquisition spielt auch bei der Furchtextinktion die LA eine Schlüsselrolle, indem sie die Kontextabhängigkeit der inhibitorischen Lernprozesse moduliert und durch erfolgreiche Extinktion in ihrer assoziativen Plastizität gehemmt wird.^{4,26,27}

Neben der Amygdala spielen auch der mediale Präfrontale Cortex (mPFC) und der Hippocampus, durch ihre inhibitorische Kontrolle über die Amygdala, eine entscheidende Rolle bei der Furchtextinktion. Neuronen des mPFC zeigen nur marginale Aktivität während der Akquisition, jedoch erhöhte neuronale Feuerraten bei Konfrontation mit einem CS im Rahmen einer erfolgreichen Extinktion²⁸. Insbesondere die infralimbische Region (IL) des medialen PFC hat inhibitorische (feed-forward) Kontrolle auf CE und LA, die IL hat nach der Extinktion eine erhöhte Aktivität⁴. Eine elektrische Stimulation des mPFC bei Säugern führt zur Inhibition von CE und LA. Dies erfolgt vermutlich durch inhibitorische Interneuronen innerhalb der genannten Kerne der Amygdala.^{29,30}

Essenziell ist der mPFC vor allem bei der späten Extinktion nach 24h. Eine frühe Extinktion unmittelbar nach Akquisition ist trotz läsioniertem mPFC möglich, eine späte Extinktion ist jedoch nicht mehr erfolgreich durchführbar.³¹⁻³⁵

Der Hippocampus besitzt ebenfalls eine regulatorische Funktion auf Extinktionsprozesse und scheint das neuroanatomische Korrelat der Kontextspezifität der Furchtextinktion zu sein. So verhindert bei Ratten eine pharmakologische Inhibition des dorsalen Hippocampus die kontextgebundene Extinktion³⁶. Möglicherweise geschieht diese kontextgebundene Extinktion über eine feed-forward Inhibition des Hippocampus auf den IL und die LA.⁴

2.2. Dynorphine

Im Kontext der Furchtextinktion nimmt das endogene Opioidsystem eine besondere Rolle ein. Im Folgenden soll insbesondere die Wirkung der Dynorphine erläutert und ihre Bedeutung in Bezug auf Stress herausgearbeitet werden.

Dynorphine gehören neben Endorphinen und Enkephalinen zu den endogenen Opioiden. Der gemeinsame Vorläufer Prodynorphin (PDYN) bildet verschiedene Dynorphin-Subtypen. Mit hoher Affinität binden Dynorphine an κ -Opiod-Rezeptoren (KOR). Eine KOR-Aktivierung vermittelt Anästhesie, Sedierung, Dysphorie und Anhedonie. Die dysphorische Wirkung ist charakteristisch für Dynorphine und steht dem durch δ - und μ -Opiod-Rezeptor-Aktivierung vermittelten euphorisierenden Effekt entgegen.³⁷⁻⁴⁰

KOR sind im peripheren und zentralen Nervensystem lokalisiert⁴¹. Eine selektive KOR-Agonisierung besitzt u.a. anxiogene Effekte.⁴²

Dynorphine werden wie alle endogenen Opioide in akuten Belastungs- und Stresssituationen ausgeschüttet. Aus evolutionsbiologischer Sicht wird angenommen, dass eine Dynorphin-vermittelte Analgesie und Dysphorie in akuten Stresssituationen die physische Leistungsfähigkeit und die Motivation steigern kann⁴⁰. Dauerhafte KOR-Aktivierung durch chronische Stressexposition kann allerdings zu depressionsähnlichen Verhaltensänderungen führen^{40,43}. Im Tiermodell mit Nagetieren mildert eine KOR-Antagonisierung stressinduzierte, depressionsähnliche Verhaltensweisen ab^{44,45}. Besonders stark ist dieser antidepressive Effekt nach wiederholten Stressexpositionen⁴⁶. Es ist demnach denkbar, dass bei stressinduzierten Depressionen, KOR-Antagonisten eine zukünftige therapeutische Alternative bzw. Ergänzung zu den etablierten Antidepressiva darstellen würden.

Als Neuropeptide, werden Dynorphine im Gegensatz zu klassischen Neurotransmittern sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch als Folge andauernder erhöhter neuronaler Aktivität

sezerniert. Wie alle Neuropeptide unterliegen Dynorphine langsamen Degradationsprozessen durch Peptidasen, die eine zeitlich prolongierte Wirkung ermöglichen sowie durch größere Diffusionsstrecken nicht nur zwischen Einzelneuronen, sondern in komplexeren neuronalen Netzwerken agieren können.^{40,47}

Dynorphine werden aus *large dense core*-Vesikeln sezerniert und führen hauptsächlich zu KOR-Aktivierungen, die über sogenannte G-Proteine (GTP-bindende Proteine) an intrazelluläre Second-Messenger-Systeme vermittelt. G-Proteine sind rezeptorgekoppelte Proteinkomplexe, die stets aus einer α -, β - und γ -Untereinheit bestehen. Im inaktiven Zustand bindet ein GDP (Guanosindiphosphat)-Molekül an die α -Untereinheit. Bindet ein Agonist, in diesem Fall Dynorphin, an den KOR, so spaltet sich das GDP von der α -Untereinheit ab und ein GTP (Guanosintriphosphat)-Molekül bindet an die freigewordene Bindungsstelle. Der Komplex aus α -Untereinheit und GTP löst sich nun vom ursprünglichen α - β - γ -Komplex ab und entfaltet intrazellulär zahlreiche Wirkungen. Auf Grund der inhibitorischen Wirkung wird die aktivierte α -Untereinheit, die mit dem KOR assoziiert ist, auch als inhibitorisches G-Protein (Gi/o-Protein) bezeichnet. Die Hauptwirkungen dieses Gi/o-Proteins im Falle von Dynorphin sind die Inhibition der Adenylatzyklase mit konsekutiver Drosselung der cAMP (zyklischen Adenosinmonophosphat)-Produktion, die Inhibition spannungsabhängiger Calciumkanäle und die Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle mit daraus resultierender Hemmung der synaptischen Aktivität (*Abb 1*).⁴⁸⁻⁵⁴

Möglicherweise kann durch präsynaptische KOR-Aktivierung auch direkt eine Vesikelfusion inhibiert werden. Darüber hinaus sind KOR in der Lage über Signaltransduktionskaskaden Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und so die Genexpression zu beeinflussen.^{55,56}

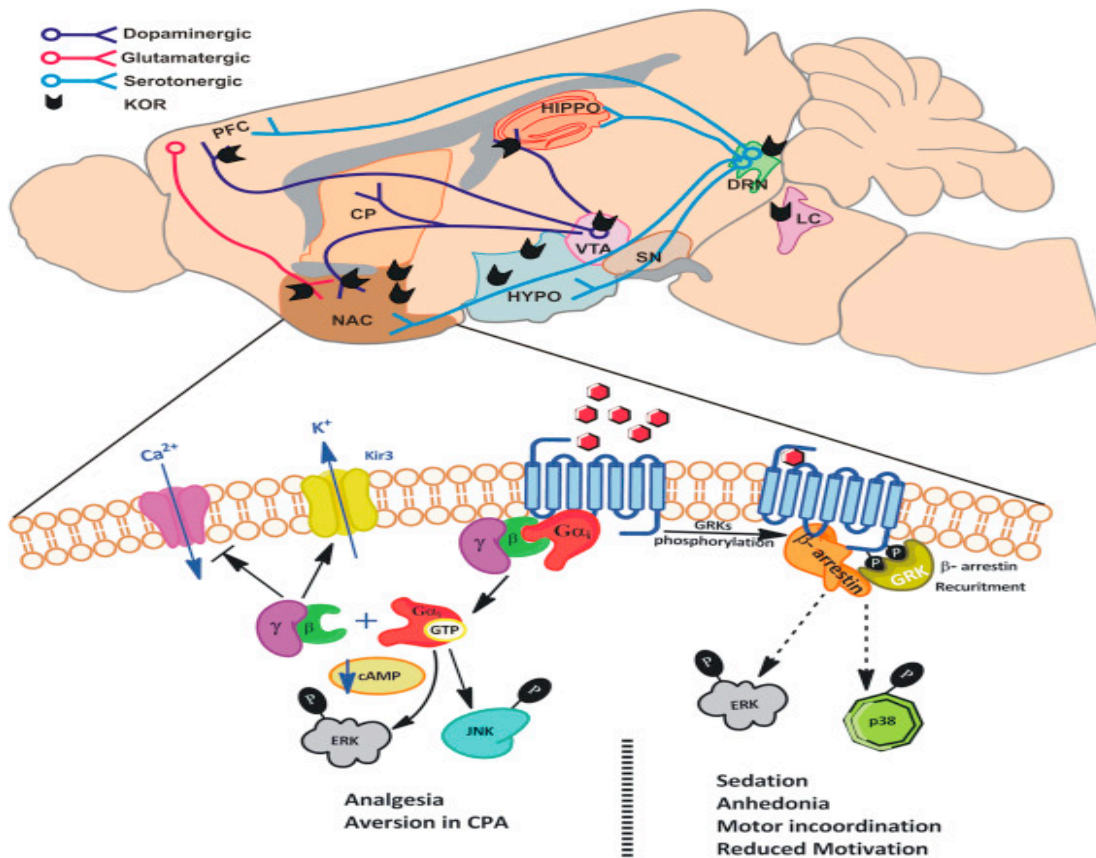


Abb. 1.

Die Übersicht und Teile der Beschriftung wurden von Shalini Dogra et al. 2015 übernommen. Sie zeigt die Verteilung von KOR in verschiedenen Hirnregionen, deren Verschaltung sowie die intrazelluläre Signalkaskade bei Rezeptorbindung im NAC zusammen mit der Auswirkung auf Psyche und Verhalten.

Das KOR/Dynorphin-System beeinflusst Transmittersysteme in unterschiedlichen Hirnarealen und entfaltet seine inhibitorische Wirkung im serotonergen (DRN), dopaminergen (VTA und SN) und noradrenergen System (LC). Durch Ligandenbindung löst sich der Gαi-β-γ-Komplex in eine β-γ- und eine αi-Untereinheit auf. Letztere inhibiert die Adenylatzyklase. Die ebenfalls freigewordene β-γ-Untereinheit aktiviert einen Kaliumkanal, den sogenannten GIRK (G-protein gated inwardly rectifying potassium channel), der eine Membranhypolarisation und eine Inhibition der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle bewirkt und letztlich zu einer Hyperpolarisation der Neuronen führt. Des Weiteren resultiert eine KOR-Aktivierung mithilfe von GRK3 und β-Arrestin in einer Phosphorylierung des jeweiligen Rezeptors. KOR-Aktivierung führt außerdem zu einer Phosphorylierung von ERK und JNK. Es wird angenommen, dass die G-Protein vermittelten Signalkaskaden für Analgesie und Aversion verantwortlich sind, wohingegen β-Arrestin vermittelte

Signalkaskaden in Sedierung, Anhedonie, Lustlosigkeit und Koordinationsstörungen resultieren.

*CP=caudate putamen, CPA=conditioned place aversion, HIPPO=Hippocampus, HYPO=hypothalamus, DRN=dorsal raphe nucleus, KOR=kappa opioid receptor, LC=locus coeruleus, NAC=nucleus accumbens, PFC=prefrontal cortex, SN=substantia nigra, VTA=ventral tegmental area*⁵⁷

Es gibt zunehmend Hinweise, dass die Dynorphinausschüttung einen Weg der neuronalen Autoregulation darstellt. Hippocampus und Hypothalamus beispielsweise sezernieren Dynorphine, um exzitatorische Afferenzen durch retrograde Aktivierung präsynaptischer KOR zu neutralisieren. Diese Selbstregulationsmechanismen könnten für weitere Regionen gelten, in denen KOR exprimiert werden.^{47,49,55,58,59}

Die Expression von KOR und Dynorphin ist in vielen Strukturen des limbischen Systems, sowohl im mesolimbischen, dopaminergenⁱ, als auch im serotonergen und noradrenergenⁱⁱ System nachweisbar (*Abb. 1*). Das limbische System ist maßgeblich an der Entstehung von Emotionen beteiligt, so wird ihm eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie von affektiven Störungen zugeschrieben. KOR sind beteiligt an der Regulation der dopaminergen, serotonergen und noradrenergen Systeme.^{40,57,59,37,40,60-69,70}

Darüber hinaus besteht eine komplexe Interaktion und wechselseitige Regulation zwischen KOR-System und HPA-Achse (engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA). KOR-Agonisierung führt beim Menschen und im Tiermodell mit Ratten zu einer hypothalamischen CRF-Sekretion (engl. corticotropin releasing factor, CRF), mit folgendem Cortisol- bzw. Corticosteron-Anstieg im Serum. KOR-Antagonisierung bei wild-typ Mäusen als auch Messungen bei PDYN -/- Mäusen zeigen erniedrigte CRF-Spiegel in Teilen der Amygdala und des Hypothalamus, eine Erniedrigung des Serum-Corticosterons sowie eine Inhibition der CRF-Wirkung⁷⁶. Jedoch existieren auch andersartige Ergebnisse, nach denen PDYN -/- Mäuse eine unveränderte oder gar prolongierte Stressantwort aufweisen. Spiegelbildlich dazu scheint auch die HPA-Achse, das KOR-System stimulieren zu können.^{40,71-75}

CRF bewirkt eine Sekretion von Dynorphin im Hypothalamus sowie eine KOR-Aktivierung in

ⁱ ventrales Tegmentum (VTA), Nucleus Accumbens (NAc) und PFC

ⁱⁱ dorsale Raphe-Kerne, Locus Coeruleus, erweiterte Amygdala (extended Amygdala; beinhaltet den CE, den Nucleus Striae terminalis (NST) und die Schalenregion des NAc (NAc shell), die basolaterale Amygdala, den Hippocampus (HIPPO) und den Hypothalamus).

Teilen der Amygdala und des Hippocampus, die mit Angst- und Furchtverarbeitung assoziiert sind.⁷⁷⁻⁷⁹

Auch wenn die Interaktion zwischen HPA-Achse und KOR-System noch nicht im Detail verstanden sind, scheint erwiesen, dass wechselseitige Steuerungs- und Feinregulationsmechanismen bestehen. Außerdem gibt es Anzeichen, dass die beschriebene Interaktion zwischen HPA-Achse und KOR-System innerhalb der erweiterten Amygdala eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der aversiven und anxiogenen Stresskomponenten spielt. Trotz der beschriebenen Interaktionen sind sowohl die HPA-Achse als auch das KOR-System auch unabhängig voneinander in der Lage, ihre Funktion auszuüben. So findet beispielsweise trotz KOR-Antagonisierung bei wild-typ Mäusen sowie bei PDYN -/- Mäusen eine stressbedingte HPA-Achsen-Aktivierung statt.^{40,79,80}

In der Zusammenschau hat das KOR-System somit viele Angriffspunkte, um neuromodulatorisch wirksam zu sein und Einfluss auf Emotionen und Verhalten zu haben.

2.3. PDYN-Gen und Einzelnukleotid-Polymorphismus bei rs1997794

Das PDYN-Gen liegt auf dem kleinen Arm des Chromosom 20 (Position: 20p13) und kodiert für Prodynorphin, ein opioides Vorläufermolekül, welches proteolytisch gespalten wird und Beta-Neoendorphin, Dynorphin, Leu-Enkephalin, Rimorphin und Leumorphin als sezernierbare Opioide bildet. In der Promotorregion des PDYN-Gens ist ein funktionell relevanter Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) bei *rs1997794* bekannt. Die Vermutung liegt nahe, dass die spezielle Position des SNPs in der Promotorregion einen Einfluss auf die Expression von Prodynorphin hat. Bisher konnte allerdings noch keine direkte Beeinflussung der Genexpression oder des Spleißens durch den SNP in *rs1997794* nachgewiesen werden. SNPs in *rs1997794* sind jedoch u.a. mit einem gesteigerten Risiko einer Alkoholabhängigkeit assoziiert sowie mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine Opiatabhängigkeit bei Frauen. Des Weiteren zeigte sich eine Assoziation von *rs1997794* SNPs mit dem episodischen Gedächtnis bei älteren Menschen.⁸¹⁻⁸⁷

Im Folgenden wird nun die Studie von Bilkei-Gorzo et al. (2012) (basierend u.a. auf den Erkenntnissen von Bilkei-Gorzo et al. (2007)) ausführlicher dargestellt, da sie eine zentrale Rolle des SNPs bei *rs1997794* sowie des KOR-Systems in Bezug auf die Akquisition und die Extinktion von Furcht im Zusammenhang mit der Applikation von Schmerzreizen belegt^{83,88}. Die Studie besteht aus Paradigmen im Tierexperiment und im Versuch am Menschen. Im ersten Paradigma werden Mäuse als Versuchstiere verwendet und an ihnen die Auswirkungen einer

pharmakologischen KOR-Blockade sowie eines genetischen KOR-Knockouts in Bezug auf Furchtakquisition und –extinktion untersucht. Das Tierexperiment wird an männlichen PDYN -/- Nullmutant-Mäusen sowie an wild-typ Mäusen durchgeführt. Zur pharmakologischen Blockade des KOR wird nor-Binaltorphimin (nor-BNI) eingesetzt. In einer Kontext-abhängigen Versuchsanordnung werden die Versuchstiere an Tag 1 für 5min in ein offenes Areal mit einem Gitterboden ausgesetzt und die Zeit gemessen, in der sie ein sogenanntes *freezing*-Verhalten zeigen. *Freezing* bezeichnet bei Mäusen eine Art motorische Schockstarre, die sie bei Angst und Furcht zeigen. Unmittelbar im Anschluss findet eine Phase der Furchtakquisition statt, in der die Versuchstiere 10 unausweichliche Stromstöße am Fuß appliziert bekommen, jeweils mit einer Dauer von 2sec und einer Intensität von 0,5mV mit einer Pause von 30sec zwischen 2 Stromstößen. Nach 24h, 48h, 72h und 96h erfolgt eine Phase der Furchtextinktion, in der die Versuchstiere für 5min am gleichen Ort platziert werden. Abermals wird nun die Zeit gemessen, in der die Mäuse mit *freezing*-Verhalten reagieren. In den Extinktionsphasen wird kein Stromstoß appliziert. Um die zeitliche Dimension der pharmakologischen KOR-Blockade der wild-typ Mäuse zu untersuchen, werden die Versuchstiere in 3 Gruppen aufgeteilt. Bei Gruppe A erfolgt die Injektion 30min vor der Furchtakquisition, bei Gruppe B direkt nach der Furchtakquisition und bei Gruppe C direkt nach der Furchtextinktion. Verabreicht wird entweder nor-BNI per intraperitonealer Injektion oder eine NaCl-Injektion als Placebo. Für ein weiteres Signal-abhängiges Furchtakquisitions- und -extinktionsparadigma werden die Versuchstiere in einen Käfig aus Plexiglas und Drahtgitter platziert. Metallstangen befinden sich auf dem Boden des Käfigs auf einer vibrations sensitiven Plattform, welche die Schreckreaktion detektieren kann. Die Käfige stehen jeweils in einer belüfteten, schall- und lichtisolierten Kammer. In einer Gewöhnungsphase von 5min vor Beginn der Furchtakquisition wird die *freezing*-Zeit und –Frequenz gemessen. Als *freezing* gilt ein Intervall von mehr als 3sec, in dem keine Bewegung detektiert wird. Nach der Gewöhnungsphase ertönt ein Signalton (9kHz, 80dB, 20sec), der zeitgleich mit einem Stromstoß am Fuß endet (1sec, 0,5mV). Dieser Signalton ertönt insgesamt 10 Mal in der Akquisitionsphase, jeweils gekoppelt an einen Stromstoß und mit einem Intervall von 30sec zwischen den Ereignissen. In der Extinktionsphase 24h und 6 Tage nach der Akquisition werden die Mäuse auf den gleichen Bewegungsdetektor platziert, mit dem Unterschied, dass dieses Mal ein Glaszylinder (6cm Durchmesser) den Käfig ersetzt. Nach einer Gewöhnungsphase von 5min ohne Ereignis ertönt der Signalton für 3min ohne Applikation eines Stromstoßes. Berechnet werden Mittelwert und Standardfehler der Zeit, welche die Mäuse mit *freezing* verbringen.

Sowohl wild-typ als auch PDYN -/- Mäuse zeigen im Kontext-abhängigen Paradigma ein signifikant vermehrtes *freezing* in der Phase der Akquisition, welche mit Schmerzreizen einhergeht. In den folgenden Extinktionsphasen, die in Intervallen von 24h stattfinden, zeigt sich bei PDYN +/+ (wild-typ) ein gradueller Rückgang des *freezing*-Verhaltens, das sich dem Ausgangsniveau, vor Beginn der Akquisition, annähert. Dieser Prozess entspricht einer Furchtextinktion. Bei PDYN -/- Mäusen bleibt das *freezing*-Verhalten auf einem konstant hohen Niveau. Bei den Nullmutanten findet demnach eine normale Furchtakquisition, jedoch eine auffallend inhibierte Extinktion der akquirierten Schreckreaktion statt.

Beim Signal-abhängigen Paradigma, in welchem der schmerzhafte Stromstoß mit einem akustischen Signal assoziiert ist, finden sich Gruppenunterschiede, die denen des Kontext-abhängigen Paradigmas ähneln. Die Zeit, die mit *freezing* verbracht wird, ist bei wild-typ Mäusen in der frühen Extinktionsphase nach 24h signifikant erhöht. In der späten Extinktionsphase nach 6 Tagen kehren die Werte jedoch wieder auf dasselbe Ausgangsniveau zurück wie vor Beginn der Akquisition. Im Gegensatz dazu verbleibt das *freezing*-Verhalten bei PDYN -/- Mäusen in beiden Extinktionsphasen auf einem gleichbleibend hohen Niveau. Auch zeigen die Nullmutanten über den gesamten Versuch hinweg mehr *freezing*.

Weitere interessante Erkenntnisse liefert das Paradigma, in dem der KOR von wild-typ Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten pharmakologisch mittels intraperitonealer nor-BNI Injektion blockiert wird. Erfolgt die nor-BNI Injektion vor oder unmittelbar nach der Furchtakquisition, so zeigt sich kein Effekt auf die Ausbildung eines Furchtgedächtnisses oder seiner Extinktion. In der Subgruppe mit pharmakologischer KOR-Blockade nach der Phase der Extinktion, wird die Extinktion des Furchtgedächtnisses inhibiert.⁸³

In dem Versuch von Bilkei-Gorzo et al. (2012) ein entsprechendes Paradigma beim Menschen zu schaffen werden 33 gesunde, deutsche Probanden europäischer Abstammung in Bonn rekrutiert. Im Einzelnukleotid-Polymorphismus *rs1997794* sind 8 CC homozygot, 13 CT heterozygot und 12 TT homozygot. Alle Probanden haben eine blande Eigen- oder Familienanamnese bezüglich affektiver Störungen. Es bestehen keine Gruppenunterschiede in Bezug auf Alter und Geschlecht. Der Versuchsaufbau findet in der fMRT statt. Als CS dienen grüne und blaue Quadrate, UCS ist ein mittelstarker Schmerzreiz durch Laserapplikation am Fuß. Die CS erscheinen jeweils für 4sec. Zwischen den CS erfolgt ein reizfreies Interstimulusintervall (ISI) von 12sec. Die grünen Quadrate fungieren als CS+ und sind zeitlich mit einem UCS assoziiert. Die blauen Quadrate dienen als CS- und damit als Vergleichsbedingung ohne UCS. Alle Ereignisse erfolgen in pseudorandomisierter Reihenfolge.

Die Studie wird an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt und besteht aus drei Subtasks: Akquisition (*ACQ*) und frühe Extinktion (*EX1*) finden am ersten Versuchstag statt. Hierbei folgt *EX1* unmittelbar auf *ACQ*. Die späte Extinktion (*EX2*) findet etwa 24h zeitversetzt am zweiten Versuchstag statt. *ACQ* beinhaltet insgesamt 50 hintereinander gezeigte Quadrate (20 blaue Quadrate, 20 grüne Quadrate ohne Schmerzreiz, 10 grüne Quadrate mit Schmerzreiz). *EX1* besteht aus je 20, *EX2* aus je 22 grünen und blauen Quadraten. Während der Extinktionsphasen werden keine Schmerzreize appliziert. Die Telexperimente unterscheiden sich durch die unterschiedliche Anzahl an Quadraten leicht in der Gesamtdauer: *ACQ* ~ 14min, *EX1* ~ 11min und *EX2* ~ 12min. Jeweils vor Beginn einer Subtask wird den Probanden mitgeteilt, dass sie blaue und grüne Quadrate sehen und möglicherweise bei den grünen Quadraten einen Schmerzreiz erhalten würden.

Neben den fMRT-Messungen wird die Hautleitfähigkeit (engl. skin conductance responses, SCR) per Elektrode auf dem Fußspann abgeleitet. Eine erhöhte SCR kann als Hinweis auf ein durch sympathikogene Schweißsekretion gesteigertes Stress- bzw. Angstniveau gedeutet werden. Homozygote Träger des T-Allels zeigen hierbei eine im Vergleich zu Trägern des C-Allels (CT und CC) signifikant verstärkte Aktivierung der rechten Amygdala während *ACQ* und *EX2* als Reaktion auf den *CS+*. Bei *EX1* hingegen werden keine Effekte des *rs1997794*-Polymorphismus gefunden.⁸³

Träger des T-Allels an *rs1997794* zeigen darüber hinaus eine reduzierte funktionelle Konnektivität zwischen Amygdala und ventromedialem Präfrontalen Cortex (VMPFC)⁸³. Der VMPFC stellt eine Struktur dar, die bekanntermaßen an der Extinktion von furchtkonditionierten Gedächtnisinhalten beteiligt ist^{4,88}. Während der Extinktion ist die Aktivität im PFC erhöht, welche inhibitorisch auf die Amygdala wirkt und somit die Furchtreaktivität aktiv verringert^{34,89,90}. Eine reduzierte Konnektivität zwischen VMPFC und Amygdala könnte demnach einer Disinhibition der Amygdala gleichkommen und eine Erklärung für die mangelhafte Extinktion der Furcht bieten. Möglicherweise könnte das T-Allel mit geringeren Dynorphinspiegeln im entsprechenden Organismus einhergehen, da bei Trägern des T-Allels ähnliche furchtassoziierte Verhaltensweisen und neuronale Aktivitätsveränderungen entdeckt wurden, wie sie PDYN -/- Mäuse zeigen.⁸³

Bezüglich der SCR als Indikator für eine stress- oder angstbedingte Sympathikus-Aktivierung zeigen die homozygoten Träger des T-Allels eine im Vergleich zu Trägern des C-Allels signifikant verstärkte Reaktion in *EX2*, welche hinweisend auf eine verlängerte und/oder verstärkte Stressreaktivität sein könnte. Bei *ACQ* und *EX1* gibt es keine signifikanten Geneffekte in der SCR.⁸³

Die beschriebenen neuronalen Aktivitätsdifferenzen zwischen den Trägern der *rs1997794*-Polymorphismen basieren nicht auf Faktoren, welche die Schmerzwahrnehmung verändern könnten, z.B. Depressionen oder Ängstlichkeit. So gibt es Hinweise, dass eine Depression die Schmerzwahrnehmung beeinflusst, dergestalt, dass sie die Schwelle der Schmerzwahrnehmung und die Schmerztoleranz herabsetzt. Jedoch existieren auch widersprüchliche Ergebnisse, die eine reduzierte Schmerzsensitivität bei depressiven Individuen feststellen, eventuell einem depressionsassoziierten, verringerten Level an Aufmerksamkeit geschuldet. Auch Ängstlichkeit vermag die Schmerzwahrnehmung zu beeinflussen. So scheint zwar die Schwelle der Schmerzempfindung nicht durch Ängstlichkeit modifizierbar, allerdings vermag eine erhöhte Ängstlichkeit zu einer verstärkten subjektiven Schmerzempfindung zu führen. Der *rs1997794*-Polymorphismen hat keinen Einfluss auf subjektive Schmerzempfindung, Depressions- und Angstskalen.^{83,92-94}

2.4. Imaging Genetics

Imaging Genetics bezeichnet eine Forschungsmethode, die Neuroimaging mit Genetik kombiniert, um die Auswirkungen von genetischen Variationen auf die zerebrale Struktur und Funktion zu untersuchen. Die Vorgängerstudie von Bilkei-Gorzo et al. (2012) sowie die vorliegende Replikationsstudie verbinden eine genetische Fragestellung mit einer funktionellen neuronalen Bildgebung und lassen sich daher als Imaging-Genetics-Studien bezeichnen. Im Allgemeinen unterscheidet man zwei grundlegende Ansätze: Zum einen besteht die Möglichkeit des genomweiten Screenings nach Risikogenen (GWAS, engl. Genome-wide association study), die mit einer gegebenen Erkrankung assoziiert sind. Auf der anderen Seite können mögliche Effekte von bereits identifizierten genetischen Risikovarianten auf neuronale Strukturen und Funktionen aufgefunden gemacht werden (*Abb. 3*).

Die ersten Imaging-Genetics-Studien untersuchten die Zusammenhänge von Hirnmorphologie und Polymorphismen in zahlreichen, bekannten SNPs wie COMT (Catechol-O-Methyltransferase), BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) oder DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1). GWAS fanden weitere Genloci, die mit psychiatrischen Erkrankungen assoziiert sind (u.a. ZNF804A, Neurogranin, MHC-Region). Die biologische Funktion dieser Kandidatengene war jedoch oftmals noch unbekannt und so diente Imaging Genetics in erster Linie dazu, durch Analyse des sogenannten intermediären Phänotyps, Hinweise auf die Wirkungsweise der Gene zu finden. Der intermediäre Phänotyp stellt eine Art Zwischenstufe zwischen Genetik und klinischer Manifestation einer psychiatrischen Erkrankung dar (*Abb. 2*).

Auch dank der Etablierung des intermediären Phänotyps erfreut sich Imaging Genetics wachsenden Interesses in der psychiatrischen Forschungsgemeinschaft. Notwendige Voraussetzung für die Erforschung psychiatrischer Erkrankungen mittels Imaging Genetics ist es jedoch, dass der intermediäre Phänotyp vererbbar, psychometrisch erfassbar, zeitlich konsistent, mit der Erkrankung assoziiert und zudem auch bei nicht-betroffenen Verwandten detektierbar ist. Der intermediäre Phänotyp bezeichnet demnach eine Struktur und Funktionsweise des Gehirns, welche eine psychiatrische Erkrankung besser abzubilden vermag als die alleinige Betrachtung der Genetik.⁹⁵

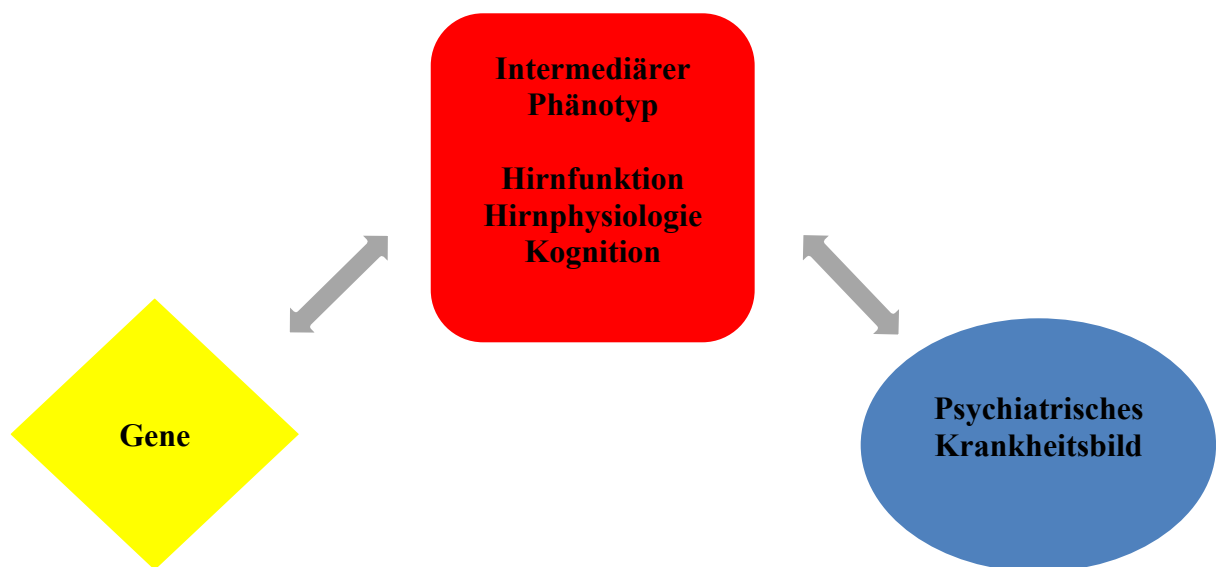


Abb. 2.

Zusammenhang von Genen, intermediärem Phänotyp und psychiatrischer Erkrankung (Abb. modifiziert in Anlehnung an Hashimoto et. al, 2015)⁹⁵

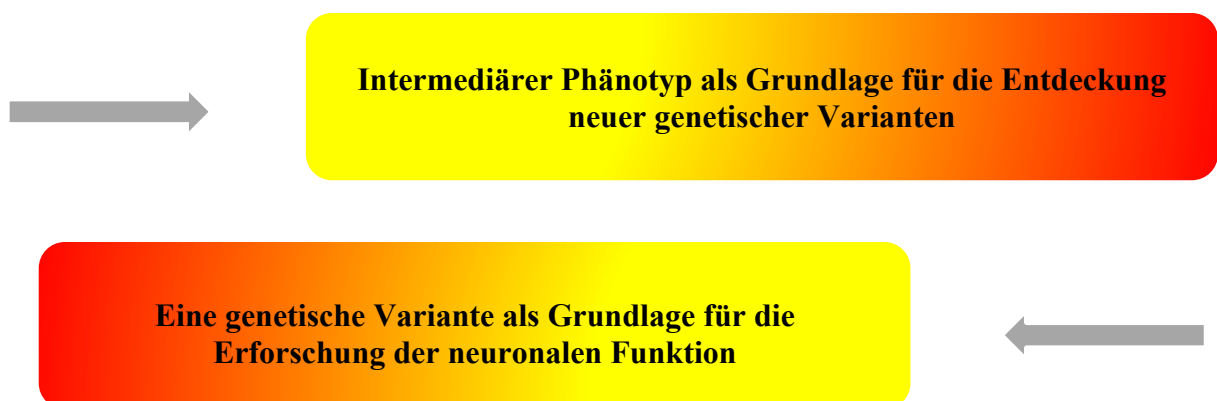


Abb. 3.

Zwei Ansätze von Imaging Genetics (*Abb.* modifiziert in Anlehnung an Hashimoto et. al, 2015)⁹⁵

Problematisch sind allerdings die meist geringen Stichprobengrößen der Imaging-Genetics-Studien. Die Effektstärke einzelner Gene ist oftmals sehr gering und eine Replikation identifizierter Geneffekte gelingt in vielen Fällen nicht. Die Notwendigkeit größerer Stichprobengrößen führte zur Errichtung groß angelegter, kollaborativer Konsortien wie ENIGMA, CHARGE oder IMAGEN, mit denen man sich erhoffte, auch Risikogene mit sehr geringer Effektstärke identifizieren zu können. Ebenso können aufwendigere statistische Methoden, wie z.B. die Unabhängigkeitsanalyse (engl. independent component analysis, ICA) oder polygenetische Analysen, die statistische Power erhöhen.⁹⁵

2.5. Hypothesen

Ausgehend von den Ergebnissen der Vorgängerstudie von Bilkei-Gorzo et al. (2012) werden für die vorliegende erweiterte Replikationsstudie folgende Hypothesen aufgestellt:

- I. Zu erwarten ist eine Replikation der Hauptergebnisse von Bilkei-Gorzo et al. (2012) in Bezug auf den *rs1997794*-Polymorphismus. Demnach wird mit einem Geneffekt des PDYN-Polymorphismus auf *EX2* bei der fMRT gerechnet. Konkret bedeutet dies einen negativen Effekt der Anzahl der T-Allele (TT>CT>CC) auf die Extinktionsleistung furchtassoziierter Gedächtnisinhalte, messbar durch eine gesteigerte Amygdala-Aktivität in der fMRT bei *EX2*. Konkret bedeutet das: Je mehr T-Allele, desto schwächer die erwartete Extinktionsleistung und stärker die Amygdala-Aktivität.
- II. Parallel zu den fMRT-Hypothesen erwarten wir bei der SCR einen ähnlichen negativen Effekt der Anzahl der T-Allele auf die Extinktionsleistung furchtassoziierter Gedächtnisinhalte, die sich bei steigender Anzahl an T-Allelen in kräftigeren SCR-Ausschlägen bei *CS+* während *EX2* manifestiert.
- III. Wir erwarten, dass die Stärke des Schmerzreizes (Schockintensität) und die subjektive Bewertung (visuelle Analogskala) auch unabhängig vom Genotyp sowohl die neuronale Aktivität in der fMRT als auch in der Höhe der SCR-Ausschläge bei *CS+* jeweils in allen Subtasks beeinflusst.

IV. Im Rahmen explorativer Analysen werden neuropsychologische Fragebögen (*siehe 3.2. Psychologische Diagnostik, Neuropsychologische Testung und Fragebögen*) durchgeführt, die eine Reihe, im Kontext von Angst und Schmerz, relevanter Parameter ergeben. Hier erwarten wir, dass erhöhte Werte in Fragebögen der Themengebiete „Ängstlichkeit“, „Depressivität“ und „Stress“ eine verstärkte Furchtreaktion bedingen. In der fMRT könnte sich eine verstärkte Furchtreaktion durch erhöhte Amygdala-Aktivität und in der SCR durch kräftigere Ausschläge bei CS+ in EX1 und EX2 manifestieren.

3. Material und Methodik

3.1. Experimentelles Design und Versuchsablauf

Das Studiendesign entspricht der 2012 in The Journal of Neuroscience publizierten fMRT-Studie von Bilkei-Gorzo A. et al. Grundlage des Experiments ist die Klassische Konditionierung nach Pavlov. Als konditionierte Stimuli dienen blaue (CS-) und grüne (CS+) Quadrate. Der Proband kann diese Quadrate im MRT liegend auf einem am Kopfende befindlichen Bildschirm über einen an der Kopfspule montierten Spiegel einsehen. Das Experiment gliedert sich in drei Subtasks: *ACQ*, *EX1* und *EX2*. An Tag 1 erfolgt *ACQ* (t=0), etwa 15 min später *EX1* (t~15min). An Tag 2 erfolgt *EX2* (t~24h). Die blauen und grünen Quadrate erscheinen in allen Subtasks in pseudorandomisierter Reihenfolge. Die farbliche Abfolge ändert sich zwischen den Subtasks, ist jedoch innerhalb einer Subtask konstant, um eine interindividuelle Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Die Quadrate erscheinen jeweils für 4 sec. Zwischen den Quadraten erfolgt ein reizfreies Interstimulusintervall (ISI) von 12 sec.^{83,96,97}

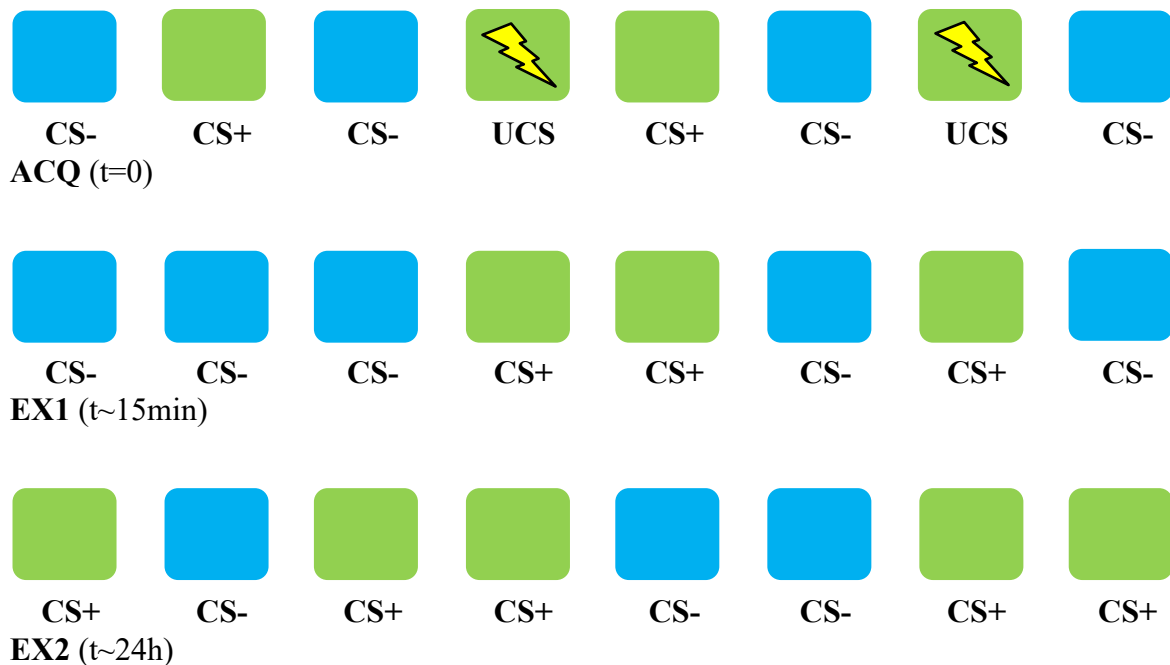


Abb. 4.

Exemplarischer Ablauf der Versuchsbedingungen in der fMRT. *ACQ* und *EX1* finden an Tag 1, *EX2* an Tag 2 statt. Abfolge der farbigen Quadrate erfolgt stets in

pseudorandomisierter Reihenfolge. Bei *ACQ* wird bei einem Teil der grünen Quadrate ein Schmerzreiz (Blitzsymbol) appliziert. Bei *EX1* und *EX2* wird kein Schmerzreiz abgegeben. Blaue Quadrate sind niemals mit einem Schmerzreiz assoziiert. (eigene Graphik)

Der *UCS* ist ein moderater Schmerzreiz, der als elektrischer Reiz über eine Elektrode in der Mitte des linken Fußspannes appliziert wird. Die Applikation des elektrischen Reizes erfolgt ohne Zeitverzögerung mit Erscheinen des Farbquadrates. Die Kopplung von grünem Quadrat und Schmerzreiz in *ACQ* erfolgt ebenfalls pseudorandomisiert und ohne für den Probanden erkennbares Muster (siehe Abb. 4).

Vor Beginn des Experimentes an Tag 1 wird die Stärke des elektrischen Reizes vom jeweiligen Probanden eigens determiniert. Vom Versuchsleiter wird hierbei als subjektive Zielgröße vorgegeben, dass eine Intensität erreicht werden soll, die vom Probanden als „unangenehm bis sehr unangenehm“ empfunden werde, sie aber auch „nicht quälen oder leiden lassen“ dürfe, damit der Proband keinen Schaden davontrage. Begonnen wird stets mit einer unter- bis niederschweligen Reizstärke von 70mV. Zusammen mit dem Probanden wird die Stromstärke sukzessive in kleinen Schritten erhöht, bis die gewünschte Toleranzgrenze erreicht ist. Der erzielte Wert wird im Laufe des Experimentes nicht mehr verändert.

ACQ beinhaltet insgesamt 50 hintereinander gezeigte Quadrate (20 blaue Quadrate, 20 grüne Quadrate ohne Schmerzreiz, 10 grüne Quadrate mit Schmerzreiz). *EX1* besteht aus je 20, *EX2* aus je 22 grünen und blauen Quadraten. Während der frühen (*EX1*) und der späten Extinktion (*EX2*) werden keine Schmerzreize appliziert. Die Subtasks unterscheiden sich durch die unterschiedliche Anzahl an Quadraten geringgradig in der Gesamtdauer: *ACQ* ~ 14min, *EX1* ~ 11min und *EX2* ~ 12min. Vor Beginn jeder Subtask erfolgt eine vom Versuchsleiter verlesene Instruktion, gemäß derer nach grünen Quadraten ein Schmerzreiz in der vor Versuchsbeginn vom Probanden festgelegten Intensität erfolgen könne, nach blauen Quadraten jedoch niemals ein Schmerzreiz abgegeben würde sowie die Abfolge der Quadrate nach dem Zufallsprinzip erfolge. Eventuellen Nachfragen seitens der Probanden - besonders nach dem Ausbleiben von Schmerzreizen in *EX1* und *EX2* - wird stets gleichförmig entgegnet, dass die Abfolge der Quadrate und die Abgabe von Schmerzreizen zufällig von Statten gehe und der Versuchsleiter darauf keinen Einfluss habe. Die Messungen erfolgen zwischen 12-14Uhr (früher Messslot) oder 14-16Uhr (später Messslot). Zwischen *ACQ* und *EX1* an Tag 1 und *EX2* an Tag 2 liegen stets ~24h. Aus diesem Grund wird ein Proband an beiden Messtagen jeweils im gleichen Messslot gemessen. Unmittelbar nach Beendigung von *ACQ* wird der Proband gebeten, auf einer

Analogskala von 0 bis 10 (0=kein Schmerz, 10=unerträglicher Schmerz) den empfundenen Schmerz einzuordnen.

3.2. Psychologische Diagnostik, neuropsychologische Testung und Fragebögen

Für jeden Probanden findet an einem gesonderten Termin eine einstündige psychologische Diagnostik statt, die insbesondere ein Strukturiertes Klinisches Interview (SKID-I) zur Diagnostik von Achse-I Störungen nach DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV) sowie den SKID-II (Fragebogen mit nachfolgendem Kurzinterview) zur Erfassung von Achse-II-Störungen (Persönlichkeitsstörungen) umfasst.⁹⁸

Da die vorliegende Arbeit zu Furchtakquisition und –extinktion eine Teilstudie im Kontext einer größeren Hauptstudie zum Thema Depression und Bipolarer Störung darstellt, werden zahlreiche demographischeⁱⁱⁱ und biometrische^{iv} Daten erhoben, schmerzrelevante Parameter^v erfasst sowie psychometrische Fragebögen^{vi} durchgeführt, die auch für die vorliegende Studie von Relevanz sind. Auch wenn diese Parameter mehrheitlich keinen direkten Einfluss auf Furchtakquisition und –extinktion haben, so sind diese Kennwerte Ausdruck der neuropsychiatrischen Grundsituation der Probanden und könnten somit indirekt das Verhalten während des Experimentes beeinflussen.

Die Fragebögen werden im Rahmen der psychologischen Diagnostik^{vii} oder im Anschluss an den MRT Tag 1^{viii} erhoben. Der STAI-S^{ix} wird jeweils nach *ACQ* und *EX2* an beiden MRT Messtagen durchgeführt, um den Grad der Ängstlichkeit zum Zeitpunkt der Befragung zu erheben. Sämtliche Fragebögen und neuropsychologische Tests sind in *Tab. 1* aufgeführt.

ⁱⁱⁱ Alter oder Geschlecht

^{iv} Geburtsgewicht

^v Intensität des Schocks und subjektives Schmerzempfinden

^{vi} Fragebögen im Themenspektrum von Depressivität, Ängstlichkeit, Stress und Stressreaktivität, Resilienz, Persönlichkeit, Chronotyp, Gedächtnis, Händigkeit, Konzentrationsfähigkeit und Bildung

^{vii} d2, MWT-B, VLMT, WIE-MAT und SRRS

^{viii} SSCS, PSRS-23, RS-25, BDI-II, D-MEQ, NEO-FFI, DASS, EHI und STAI-T

^{ix} Der STAI-S erfasst einen Zustand der Ängstlichkeit zum Zeitpunkt der Erhebung. Im Gegensatz dazu bildet der STAI-T das Ängstlichkeitsniveau als beständiges Persönlichkeitsmerkmal ab.

Tab. 1. Übersicht über Fragebögen und neuropsychologische Tests

Fragebogen / Test	Kürzel	Thema / Interpretation
Social Readjustment Rating Scale ⁹⁹	SRRS	Stressreiche Erfahrungen in den vergangenen zwei Jahren
Screening Scale Chronic Stress ¹⁰⁰	SSCS	Erlebter Stress der vergangenen drei Monate
Perceived Stress Reactivity Scale ¹⁰¹	PSRS-23	Stressreaktivität auf Misserfolge, soziale Konflikte, Arbeitsüberbelastung und sozialer Bewertung
Resilienzskala 25 ^{102,103}	RS-25	Resilienz
State-Trait Anxiety Inventory ¹⁰⁴	STAI-S bzw. STAI-T	momentane Ängstlichkeit (STAI-S); allgemeine Ängstlichkeit (STAI-T)
Beck-Depressionsinventar II ¹⁰⁵	BDI-II	Depressivität in den letzten zwei Wochen
Morningness-Eveningness- Questionnaire ^{106,107}	D-MEQ	Chronotyp
NEO-Five-Factor-Inventory ^{108,109}	NEO-FFI	Persönlichkeit
Depression Anxiety Stress Scale ^{110,111}	DASS	Depressivität, Ängstlichkeit, Stress
Edinburgh Handedness Inventory ¹¹²	EHI	Händigkeit
Verbaler Lern- und Merkfähigkeitstest ¹¹³ ; Subskalen:	VLMT	Episodisches Gedächtnis Interpretation:
1. Summe Durchgang 1 bis 5	-Sum-Dg1-5	1. <i>Lernen bzw. Datenakquisition</i>
2. Differenz Durchgang 5 - 6	-Diff-Dg5-6	2./3. <i>Konsolidierung ins Langzeitgedächtnis</i>
3. Differenz Durchgang 5 - 7	-Diff-Dg5-7	
4. Korr. Wiedererkennungslleistung	-Diff-W-F	4. <i>Wiedererkennungslleistung</i>
Aufmerksamkeits-Belastungs-Test D2 ¹¹⁴ ; Subskalen:	D2	Konzentrationsfähigkeit
1. Gesamtzahl	-GZ	
2. Gesamtzahl abzüglich Fehler	-GZ-F	
3. Konzentrationsleistung	-KL	
Mehrfachwahl-Wortschatz- Intelligenztest ¹¹⁵	MWT-B	Kristalline Intelligenz bzw. Bildung
Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene (Subtest: Matrizenest) ¹¹⁶	WIE-MAT	Fluide Intelligenz

3.3. Rekrutierung, Ein- und Ausschlusskriterien

Die Probanden werden zwischen Januar 2013 und Februar 2014 in Berlin rekrutiert und gemessen. Alle Probanden sind mitteleuropäischer Abstammung (Eltern, Großeltern, Urgroßeltern). Keiner der Probanden hat eine affektive Störung in der Vorgeschichte oder leidet zum Zeitpunkt der Datenerhebung an einer psychiatrischen Erkrankung. Ebenso wenig weisen

die eingeschlossenen Probanden eine relevante, familiäre, psychiatrische Belastung auf. So werden Probanden ausgeschlossen, sofern bei Verwandten 1. Grades eine DSM-IV Achse 1-Störung^{117,118} oder bei Verwandten 2. Grades eine bipolare oder psychotische Störung vorliegt. DSM-IV Achse 1-Störungen umfassen psychische Störungen, die mit einer Beeinträchtigung des Soziallebens und der Lebensqualität einhergehen, wie z.B. affektive Störungen, Schizophrenie, Angststörungen, Schlafstörungen, Essstörungen und substanzinduzierte Störungen.

Alle Probanden werden zuerst in einem ausführlichen Telefoninterview auf ihre Eignung geprüft. Erfragt werden hierbei insbesondere sicherheitsrelevante Aspekte wie Metallfreiheit und Abwesenheit elektronischer Geräte (Herzschrittmacher etc.) sowie psychiatrische Anamnese, allgemeine Anamnese (internistisch, neurologisch, chirurgisch, onkologisch), psychiatrische und allgemeine Familienanamnese, Drogen- und Genussmittelanamnese, Medikamentenanamnese, ophthalmologische Anamnese, Sozialanamnese, Abstammung, Bildungsstand, Schlafverhalten, Geburtskomplikationen, Händigkeit, Allergien und Schmerzen.

Des Weiteren erfolgt eine mündliche und schriftliche Aufklärung zu Studienablauf, Studienzweck und zur Verwendung der erhobenen Daten. Die Probanden geben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme. Die Aufwandsentschädigung beträgt 8€ pro Stunde. *MATLAB*-basierte Qualitätschecks stellen sicher, dass beispielsweise die Amygdala bei jedem Einzelprobanden beidseitig in der fMRT komplett erfasst wird (*Amygdala-ROI Checks*) oder detektiert abrupte Kopfbewegungen von >2mm (*Art Repair* Skript).

Weitere Ausschlussfaktoren sind Artefakte, mangelhafte fMRT-Bildqualität, fehlerhafte fMRT-Schichtführung, technische Probleme bei der Furchtkonditionierung, Dropouts, zerebrale Strukturanomalien (Parenchymstörung), fehlendes Blutmaterial zur genetischen Testung, SCR-Datenfehler und technische Probleme bei der fMRT. Eine detaillierte Übersicht über die Ausschlüsse ist in *Tab. 2* aufgeführt.

Tab. 2. Übersicht über Probandenausschluss								
Ausschlussgrund	SCR				fMRT			
	ACQ	EX1	EX2	komplett	ACQ	EX1	EX2	komplett
Mangelhafte fMRT-Bildqualität					2			3
Bewegungsartefakte					2		1	1
fMRT-Schichtführungsfehler					1	1		
Technische Probleme bei Furchtkonditionierung				7				7
Dropout				1			1	
ZNS-Parenchymstörung								1
fehlendes Blutmaterial zur genetischen Testung				1				1
Amygdala nicht komplett erfasst								1
SCR-Datenfehler	1		1	8				
Technische Probleme in der fMRT						1		

3.4. Funktionelle Magnetresonanztomographie

3.4.1. Datenerhebung

Die fMRT-Datenerhebung erfolgt mit einem SIEMENS MAGNETOM TrioTim syngo MR B17 (3 Tesla) im Berlin Center for Advanced Neuroimaging (BCAN), Campus Charité Mitte (CCM), Berlin. Für die Subtasks *ACQ*, *EX1* und *EX2* werden die im Folgenden beschriebenen Scanner-Einstellungen gewählt. Die fMRT-Messungen erfolgen mit Hilfe einer echo planar imaging (EPI)-Sequenz. Um die interessierenden Bereiche des Gehirns zu erfassen, wird ein quaderförmiges Messvolumen benutzt, das den Messbereich markiert. Um auch die basalen Hirnstrukturen zu erfassen, wird dieses dreidimensionale Messvolumen nach dorsal gekippt und so platziert, dass beide Amygdalae sowie inferiore präfrontale Strukturen innerhalb des Messbereichs liegen. Das Messvolumen besteht aus 36 nach dorsal gekippten Schichten (Schichtdicke= 2,4 mm; Sichtfeld (FOV) 192 mm; Wiederholungszeit (TR)= 1960 ms; Echozeit (TE)= 25 ms; Voxelgröße= 3,0 x 3,0 x 2,4 mm³, flip angle= 80°).

3.4.2. Datenvorverarbeitung und -analyse

Sämtliche Vorverarbeitungsschritte werden mit Statistical Parametric Mapping 8 (SPM8) (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm8/>; accessed 28 November, 2013) in MATLAB 2012a durchgeführt und beinhalten Bewegungskorrektur (realignment), Akquisitionskorrektur (slice timing), räumliche Normalisierung auf ein Standard-EPI (echo planar imaging)-Template, d.h. auf ein standardisiertes dreidimensionales Gehirn. Des Weiteren findet eine Glättung (smoothing) der Rohdaten mit einem FWHM (full-width at half-maximum) Gauß-Filter statt. Die gesamten fMRT-Datenanalysen werden, wie auch schon die Vorverarbeitung, mit Hilfe von SPM8 und MATLAB 2012a vollzogen. Zu Beginn erfolgen die statistischen Analysen auf Einzelprobandenebene.

Das Regressionsmodell umfasst zwei (*EX1* und *EX2*: blaue Quadrate (*CS-*), grüne Quadrate (*CS+*)) bzw. drei (*ACQ*: blaue Quadrate (*CS-*), grüne Quadrate (*CS+*) und grüne Quadrate mit Schmerzreiz (*UCS*)) Regressoren, welche den durchblutungsbedingten BOLD-Effekt (blood oxygen level dependent, BOLD) erfassen. Weitere sechs Regressoren beschreiben Rotations- und Translationsbewegungen (je drei).

Für jeden Probanden wird in allen Subtasks der Kontrast *grüne Quadrate vs. blaue Quadrate* (*CS+* vs. *CS-*) errechnet. Bei *ACQ* kommt zusätzlich der Kontrast *grüne Quadrate mit Schmerzreiz vs. blaue Quadrate* (*UCS* vs. *CS-*) hinzu.

Darüber hinaus werden für *EX1* und *EX2* Analysen für einen linearen (*GrünDecay EX1* und *GrünDecay EX2*), sowie für *EX2* eine zusätzliche Analyse für einen exponentiellen Abfall (*GrünExpo EX2*) der zerebralen Aktivität bei *CS+* über die Zeit durchgeführt.

Die Gruppenanalysen entsprechen im Wesentlichen der Analyse auf Einzelprobandenebene. Hier werden die auf Einzelprobandenebene errechneten Kontraste auf Gruppenebene betrachtet.

Folgende Kontraste werden untersucht: *grüne Quadrate vs. blaue Quadrate* (*CS+* vs. *CS-*) bei *ACQ*, *EX1* und *EX2*, *grüne Quadrate mit Schmerzreiz vs. blaue Quadrate* (*UCS* vs. *CS-*) bei *ACQ*, *GrünDecay* bei *EX1* und *EX2* sowie *GrünExpo* bei *EX2*.

3.4.3. Statistik

Zur Testung der fMRT-Haupteffekte der Faktorenanalyse auf Gruppenebene wird mit SPM8 ein One-Sample T-Test (OST) durchgeführt. Genetische Gruppeneffekte in der fMRT (*CC > CT > TT*) werden mit SPM8 mittels einer multiplen Regressionsanalyse untersucht. In der fMRT

werden PDYN-Effekte mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mit FWE-Korrektur^x (family wise errors) innerhalb der ROI (region of interest, ROI) analysiert¹¹⁹.

Sämtliche ROIs werden dem Pick Atlas der Wake Forest University entnommen bzw. aus den vorhandenen ROIs konstruiert (<http://fmri.wfubmc.edu/software/PickAtlas>; accessed 28 November, 2013).

Folgende ROIs werden verwendet: *beidseitige Amygdala*-ROI, *beidseitige Schmerzmatrix*-ROI (Insula + Thalamus + Anteriores Cingulum) und *beidseitige VMPFC*-ROI (Rectus + Midorb). Die Untersuchung der Schmerzmatrix dient der Bestätigung, dass die Schmerzreize adäquat und mit ausreichender Intensität appliziert werden und sind somit ein Beleg für eine korrekte Versuchsdurchführung. Alle fMRT-Analysen werden mit den Kovariaten *Geschlecht*, *Alter*, *Schockintensität*, *Schmerzempfinden* durchgeführt, um potentielle Störfaktoren zu vermeiden.

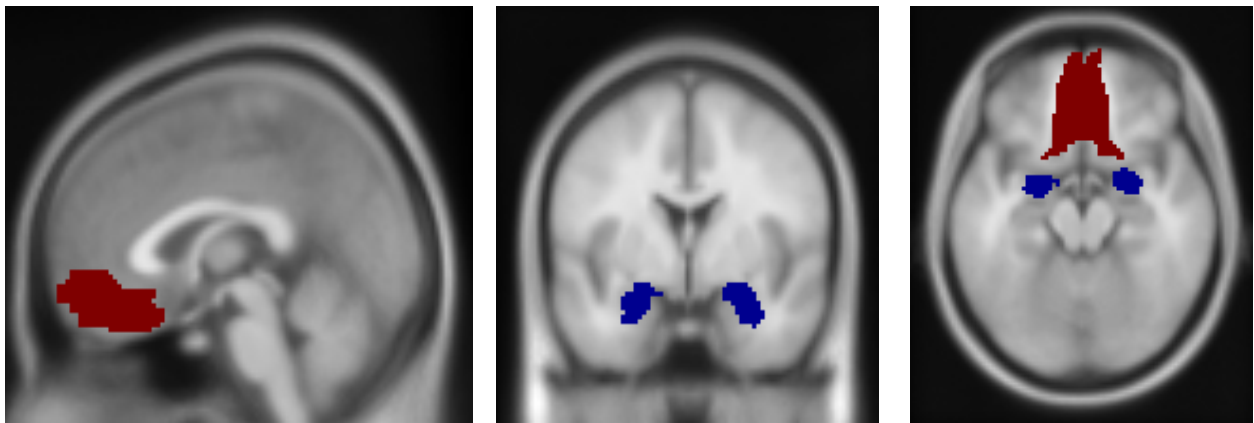


Abb. 5.

Amygdala-ROI (blau) und VMPFC-ROI (rot) (Konstruktion mittels Pick Atlas der Wake Forest University (<http://fmri.wfubmc.edu/software/PickAtlas>))

3.5. Hautleitfähigkeitsmessung

3.5.1. Ablauf

Die Messung der Hautleitfähigkeit (SCR) und deren Veränderungen wird mit dem BrainVision GSR (Galvanic Skin Response)-MR-Modul während der fMRT-Messungen durchgeführt (Signalaufnahme, -verstärkung und -Output). Hierbei werden die GSR-MR Elektroden (klassische Ag/AgCl Elektroden) auf die palmare Hautfläche der intermedialen Phalangen des

^x Korrektur von multiplen Testungen

linken Zeige- und Mittelfingers aufgeklebt. Die Ansicht und Aufnahme des digitalisierten SCR-Signals erfolgt mit Hilfe des Brain Vision Recorders (Sampling Rate=5000 Hz).

3.5.2. Datenanalyse

Die Analyse der Hautleitfähigkeitsdaten erfolgt mit dem BrainVision Analyzer 2. Ein zuvor mit MATLAB erstelltes Markerfile, welches die Zeitmarker für die Stimuli (Quadrate) enthält, wird auf die SCR-Rohdaten übertragen. Die SCR-Daten werden auf eine Sampling Rate von 5 Hz umgestellt, um eine bessere Glättung der Daten, ohne Verlust relevanter Informationen, zu erreichen. Mit dem Beginn der Stimuli (Quadrate) als Referenzpunkt ($t=0$ sec) werden Segmentierungen von $t=-2$ sec (prä-Stimulus) bis $t=+10$ sec (post-Stimulus) durchgeführt. Hierbei wird der Mittelwert des Zeitintervalls von $t=-2$ sec bis $t=0$ sec als Baseline definiert. Alle Baselines werden auf dasselbe Niveau korrigiert (Baseline Correction), so dass alle Baselines aller Einzelsegmente auf $0 \mu\text{S}$ (mikroSiemens) determiniert waren. Zwischen Zeitpunkten $t=0$ sec und $t=10$ sec der Segmente werden die Maxima der SCR-Ausschläge bestimmt und ausgelesen. Die Maxima sind demnach relative Werte (Differenz zwischen Baseline und Maxima) und enthalten keinerlei Information über die zugrundeliegenden absoluten Werte.

3.5.3. Statistik

Zur Analyse von Haupt- und Gruppeneffekten wird mit SPSS 22 für jede Subtask eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholungen durchgeführt (Innersubjektfaktoren: Bedingung ($CS+$ und $CS-$) und Messzeitpunkt, Zwischensubjektfaktor: Genotyp (PDYN; 3 Versuchsgruppen: CC, CT und TT)). In den SCR-Analysen wird das Signifikanzniveau auf $p<0,001$ festgelegt. Parallel zu den fMRT-Analysen werden auch die genetischen Analysen der SCR (PDYN als Zwischensubjektfaktor) mit den Kovariaten *Geschlecht*, *Alter*, *Schockintensität*, *Schmerzempfinden* durchgeführt. Auch hier soll sichergestellt werden, dass keine potentiellen Störfaktoren den alleinigen Geneffekt des PDYN-Polymorphismus verfälschen.

3.6. Elektrische Stimulation

Die elektrische Stimulation erfolgt in der Mitte des linken Fußrückens auf halber Strecke zwischen Zehen und Malleolengabel. Befestigt wird die Elektrode mit Leukotape und mäßigem Anpressdruck.

3.7. DNA-Extraktion und Genotypisierung

Die venöse Blutentnahme von 3 x 10 ml EDTA-Blut erfolgt im Anschluss an Tag 2 der fMRT-Messung. Die DNA-Extraktion und Genotypisierung des SNPs bei *rs1997794* erfolgen in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Bonn.

4. Ergebnisse

4.1. Stichprobencharakteristika

Die anfänglich 104 Probanden reduzieren sich durch nachträgliche, komplette Ausschlüsse oder Ausschlüsse aus Teilanalysen (siehe *Tab. 2*) auf 90 Probanden für die fMRT Analysen und 87 Probanden für die SCR Analysen. Für die Teilanalysen der fMRT stehen bei *ACQ* 85 Probanden, bei *EX1* und *EX2* je 88 Probanden zur Verfügung. Bei Analysen mit der Schockintensität als Kovariate muss ein weiterer Proband aufgrund fehlender Dokumentation des Parameters ausgeschlossen werden.

Von den 90 in die fMRT Analysen eingeschlossenen Probanden sind 11 *rs1997794* CC homozygot, 36 CT heterozygot und 43 TT homozygot. In der fMRT-Stichprobe herrschen demnach Allelfrequenzen von C=0,322 und T=0,678. Die Allelfrequenzen sind im Hardy-Weinberg Gleichgewicht ($\chi^2=0,02$, $p=0,990$).

Für die Teilanalysen der SCR stehen bei *ACQ* 86, bei *EX1* 87 und bei *EX2* 86 Probanden zur Verfügung (jeweils abzüglich eines Probandens bei Analysen mit der Kovariate Schockintensität). Von den 87 in die SCR Analysen eingeschlossenen Probanden sind 11 CC homozygot, 34 CT heterozygot und 42 TT homozygot für *rs1997794*. In der SCR-Stichprobe herrschen demnach Allelfrequenzen von C=0,322 und T=0,678. Auch diese Allelfrequenzen sind im Hardy-Weinberg Gleichgewicht ($\chi^2=0,02$, $p=0,990$). In *Tab. 3-6* sind demographische, psychometrische und biometrische Daten sowie schmerzrelevante Parameter der Subgruppen CC, CT und TT dargestellt. Es finden sich keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede.

Tab. 3. Vergleich der fMRT-Versuchsgruppen (Mittelwerte mit Standardabweichung; ANOVA)

Variable	TT (n=43)	CT (n=36)	CC (n=11)	p-Wert
Alter (in Jahren)	27,14 +/- 6,06	28,31 +/- 7,01	29,64 +/- 9,43	0,518
Schockintensität (in mV)	781,38 +/- 970,77	696,19 +/- 645,31	655,00 +/- 441,74	0,847
Schmerzempfinden (VAS)	6,21 +/- 1,77	6,60 +/- 1,28	6,09 +/- 1,28	0,451
Geburtsgewicht (in Gramm)	3288,06 +/- 426,81	3470,72 +/- 467,68	3582,86 +/- 608,87	0,171
NEO-FFI-N	14,56 +/- 6,24	14,58 +/- 6,09	11,36 +/- 6,59	0,283
PSRS-23	18,76 +/- 6,01	17,06 +/- 6,45	16,82 +/- 6,69	0,418
RS-25	137,79 +/- 17,46	139,36 +/- 16,00	147,45 +/- 15,77	0,235
SSCS	12,27 +/- 7,70	12,09 +/- 7,85	10,82 +/- 4,22	0,846
STAI-T	32,98 +/- 6,52	32,94 +/- 7,77	30,55 +/- 5,15	0,558
BDI-II	3,71 +/- 4,14	5,40 +/- 5,59	3,55 +/- 3,75	0,250
SRRS	273,32 +/- 150,80	241,66 +/- 148,10	335,73 +/- 170,93	0,202
DASS	7,48 +/- 7,38	8,36 +/- 8,52	6,91 +/- 5,65	0,814
STAI-S (nach ACQ)	36,36 +/- 7,05	34,42 +/- 7,67	39,09 +/- 13,55	0,245
STAI-S (nach EX2)	32,63 +/- 5,45	31,33 +/- 6,20	35,18 +/- 13,52	0,293
D-MEQ	50,90 +/- 8,91	49,29 +/- 9,30	51,64 +/- 5,56	0,633
D2-GZ	519,65 +/- 55,31	510,33 +/- 73,18	549,27 +/- 70,12	0,224
D2-GZ-F	503,26 +/- 59,25	494,11 +/- 74,41	529,82 +/- 77,10	0,316
D2-KL	205,35 +/- 35,09	202,56 +/- 40,90	218,91 +/- 42,25	0,465
VLMT- Sum-Dg1-5	66,47 +/- 6,31	65,72 +/- 6,03	66,64 +/- 3,91	0,830
VLMT- Diff-Dg5-6	0,63 +/- 1,11	0,25 +/- 1,18	0,00 +/- 0,89	0,153
VLMT- Diff-Dg5-7	0,53 +/- 1,14	0,47 +/- 1,98	-0,09 +/- 0,83	0,466
VLMT- Diff-W-F	14,70 +/- 0,71	14,67 +/- 0,72	14,91 +/- 0,30	0,576
WIE-MAT	22,53 +/- 2,27	21,75 +/- 2,14	22,91 +/- 2,51	0,188
MWT-B	31,09 +/- 2,19	31,39 +/- 2,49	32,55 +/- 2,51	0,194

Tab. 4. Vergleich der fMRT-Versuchsgruppen (Chi-Quadrat-Test für nominale Variablen)

Variable	TT (n=43)	CT (n=36)	CC (n=11)	Chi-Quadrat-Wert nach Pearson	p-Wert
Geschlecht	18 ♂, 25 ♀	14 ♂, 22 ♀	6 ♂, 5 ♀	0,851	0,653
Messslot	25 früh, 18 spät	15 früh, 21 spät	6 früh, 5 spät	2,187	0,335
EHI (re-/li-/beidhändig)	40/1/2	35/0/1	10/1/0	3,815	0,432

Tab. 5. Vergleich der SCR-Versuchsgruppen (Mittelwerte mit Standardabweichung; ANOVA)

Variable	TT (n=42)	CT (n=34)	CC (n=11)	p-Wert
Alter (in Jahren)	26,88 +/- 5,21	28,38 +/- 7,18	29,64 +/- 9,43	0,389
Schockintensität (in mV)	787,63 +/- 981,53	754,41 +/- 684,70	655,00 +/- 441,74	0,893
Schmerzempfinden (VAS)	6,24 +/- 1,78	6,47 +/- 1,20	6,09 +/- 1,28	0,705
Geburtsgewicht (in Gramm)	3310,42 +/- 428,31	3464,32 +/- 463,78	3582,86 +/- 608,87	0,252
NEO-FFI-N	14,63 +/- 6,33	15,18 +/- 5,36	11,36 +/- 6,59	0,184
PSRS-23	18,73 +/- 5,81	17,06 +/- 6,04	16,82 +/- 6,69	0,412
RS-25	137,59 +/- 17,62	136,53 +/- 15,52	147,45 +/- 15,77	0,156
SSCS	12,28 +/- 7,40	12,56 +/- 7,44	10,82 +/- 4,22	0,777
STAI-T	33,15 +/- 6,54	33,62 +/- 6,62	30,55 +/- 5,15	0,383
BDI-II	3,80 +/- 4,15	5,21 +/- 5,33	3,55 +/- 3,75	0,361
SRRS	262,36 +/- 144,15	222,42 +/- 121,53	335,73 +/- 170,93	0,067
DASS	7,49 +/- 7,37	8,21 +/- 7,94	6,91 +/- 5,68	0,854
STAI-S (nach ACQ)	36,58 +/- 6,94	34,71 +/- 8,01	39,09 +/- 13,56	0,305
STAI-S (nach EX2)	32,73 +/- 5,41	31,76 +/- 6,28	35,18 +/- 13,52	0,397
D-MEQ	50,60 +/- 8,87	48,06 +/- 8,50	51,64 +/- 5,56	0,313
D2-GZ	520,02 +/- 55,87	500,56 +/- 69,49	549,27 +/- 70,12	0,079
D2-GZ-F	504,43 +/- 59,85	485,12 +/- 71,42	529,82 +/- 77,10	0,137
D2-KL	206,38 +/- 35,16	198,26 +/- 39,15	218,91 +/- 42,25	0,272
VLMT- Sum-Dg1-5	66,14 +/- 6,40	65,41 +/- 5,99	66,64 +/- 3,91	0,795
VLMT- Diff-Dg5-6	0,60 +/- 1,15	0,21 +/- 1,18	0,00 +/- 0,89	0,176
VLMT- Diff-Dg5-7	0,52 +/- 1,17	0,18 +/- 1,31	-0,09 +/- 0,83	0,229
VLMT- Diff-W-F	14,67 +/- 0,72	14,68 +/- 0,68	14,91 +/- 0,30	0,546
WIE-MAT	22,45 +/- 2,30	21,82 +/- 2,01	22,91 +/- 2,51	0,281
MWT-B	31,07 +/- 2,12	31,35 +/- 2,53	32,55 +/- 2,51	0,183

Tab. 6. Vergleich der SCR-Versuchsgruppen (Chi-Quadrat-Test für nominale Variablen)

Variable	TT (n=42)	CT (n=34)	CC (n=11)	Chi-Quadrat-Wert nach Pearson	p-Wert
Geschlecht	18 ♂, 24 ♀	14 ♂, 20 ♀	6 ♂, 5 ♀	0,626	0,731
Messslot	24 früh, 18 spät	15 früh, 19 spät	6 früh, 5 spät	1,317	0,518
EHI (re-/li-/beidhändig)	39/1/2	32/1/1	10/1/0	1,804	0,772

4.2. Ergebnisse der fMRT-Analysen

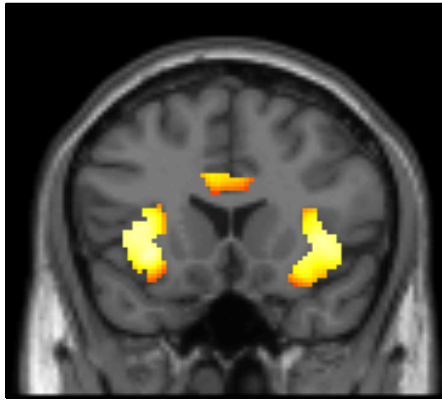
Als Indiz für eine erfolgreiche Furchtkonditionierung über alle Versuchsgruppen hinweg können in *ACQ*, *EX1* und *EX2* signifikante Aktivierungen der Schmerzmatrix (*Abb. 6*) (bestehend aus Insula, anteriorem Cingulum (ACC) und Thalamus), der beidseitigen Amygdalae (*Abb. 7*) sowie des VMPFC (*Abb. 8*) für die Analyse *grüne Quadrate > blaue Quadrate* (*CS+ > CS-*) festgestellt werden.

Bei weiteren Untersuchungen der Amygdalae in der fMRT zeigt sich bei *CS+* eine in *Abb. 7* illustrierte, statistisch signifikante, linear abfallende Aktivität bei *EX1* (*GrünDecay EX1*) und exponentiell abfallende Aktivität bei *EX2* (*GrünExpo EX2*) beim gesamten Probandenkollektiv. Außerdem zeigen Analysen des VMPFC eine linear ansteigende Aktivität bei *EX1* (*GrünDecay EX1*) und eine exponentiell zunehmende Aktivität bei *EX2* (*GrünExpo EX2*), die in *Abb. 8* dargestellt wird.

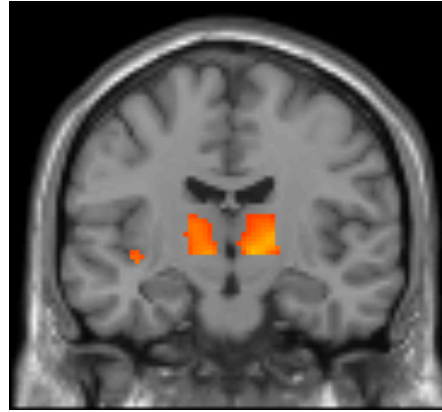
Es kann ein signifikanter Geneffekt des PDYN-Polymorphismus auf die fMRT-Aktivität des VMPFC während *CS+* bei *GrünExpo EX2* nachgewiesen werden. Hierbei zeigt sich ein Zusammenhang der VMPFC-Aktivität mit der Anzahl der vorliegenden T-Allele in der PDYN-Promotorregion *rs1997794*. Je mehr T-Allele in *rs1997794* vorliegen (TT>CT>CC), desto stärker fällt die VMPFC-Aktivität in der Analyse *GrünExpo EX2* aus (multiple Regressionsanalyse in SPM 8: CC=0, CT=1, TT=2, $p<0,05$; FWE korrigiert innerhalb der ROI; Kovariaten: Geschlecht, Alter, Schockintensität, Schmerzempfinden; Peak in 0/54/-18, T=3,76) (*Abb. 9*). Bezüglich der VMPFC-Aktivität in *EX1* zeigt sich kein PDYN-Geneffekt.

Es können keine signifikanten Geneffekte des *rs1997794*-Polymorphismus auf die Amygdala-Aktivität in *ACQ* sowie in den Extinktionsphasen *EX1* und *EX2* nachgewiesen werden.

Des Weiteren ergeben Analysen eine signifikante Korrelation zwischen VMPFC-Aktivität bei *GrünExpo EX2* und dem Summenscore des STAI-S (nach *EX2*) (bivariate Korrelationsanalyse mit SPSS, einseitige Testung, Pearsonscher Korrelationskoeffizient: $r=-0,194$, $p=0,038$). Höhere Werte im STAI-S gehen hierbei mit einer geringeren VMPFC-Aktivität einher. Der signifikante Effekt ist insbesondere durch die Subgruppe der CC-Allelträger bedingt (*Abb. 10*).



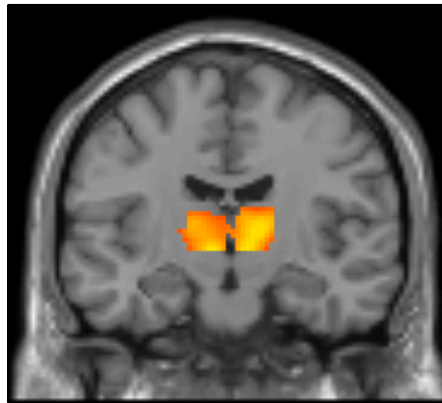
ACQ



ACQ



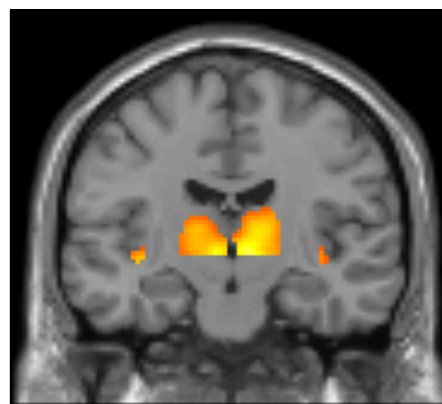
EX1



EX1



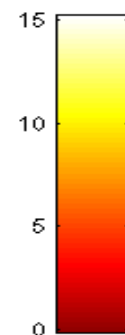
EX2

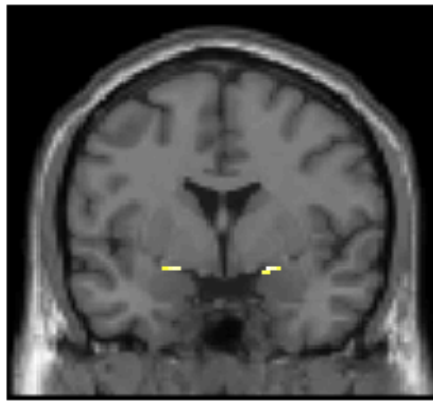


EX2

Abb. 6.

Aktivierung der **Schmerzmatrix** für *grüne Quadrate vs. blaue Quadrate (CS+ vs. CS-)* bei *ACQ, EX1* und *EX2*; FWE < 0,05 whole brain korrigiert, maskiert innerhalb der ROI. Links die Schnittebene von Insula und ACC. Rechts die Schnittebene von Thalamus. Auf die Angabe von Peaks wird hier verzichtet. Der Balkenplot zeigt die Effektstärke an (T-Wert).

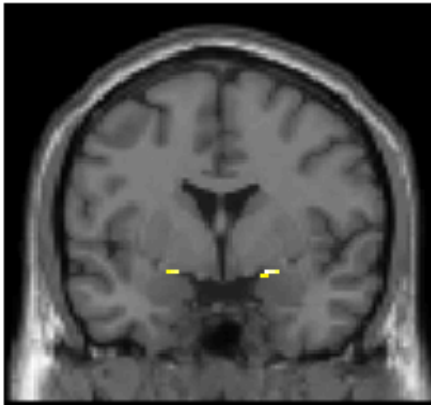




ACQ



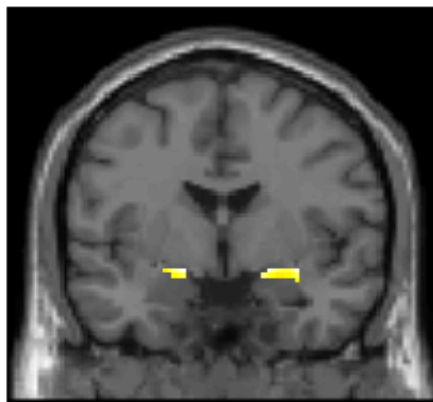
GrünTime EX1



EX1



GrünDecay EX2



EX2

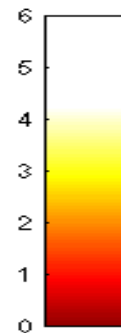


Abb. 7.

Linke Spalte: Amygdala-Aktivierung für grüne Quadrate vs. blaue Quadrate (CS+ vs. CS-) bei ACQ, EX1 und EX2; FWE < 0,05 korrigiert innerhalb der ROI. Peaks in ACQ: 20/0/-12, T=4,23; in EX1: 20/0/-12, T=4,86 und in EX2: -16/-2/-12, T=5,15.

Rechte Spalte: Linearer Abfall der Amygdala-Aktivierung bei EX1 (GrünTime EX1) und exponentieller Abfall bei EX2 (GrünDecay EX2), FWE < 0,05 korrigiert innerhalb der ROI. Peaks in GrünTime EX1: 20/-2/12, T=4,23 und GrünDecay EX2: 20/0/-12, T=4,66. Der Balkenplot zeigt die Effektstärke an (T-Wert).

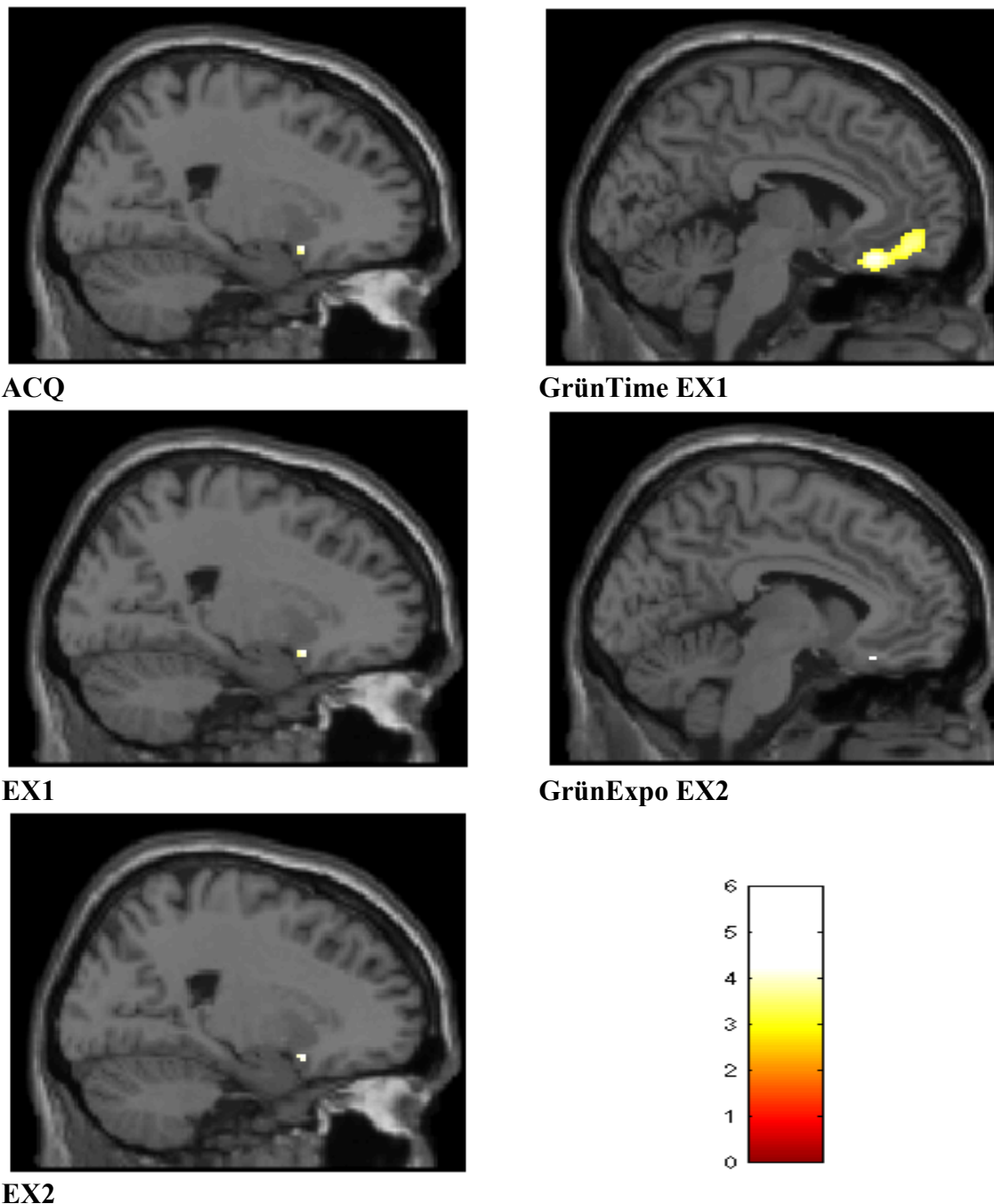
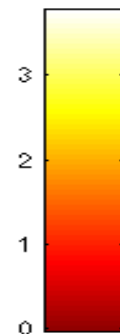
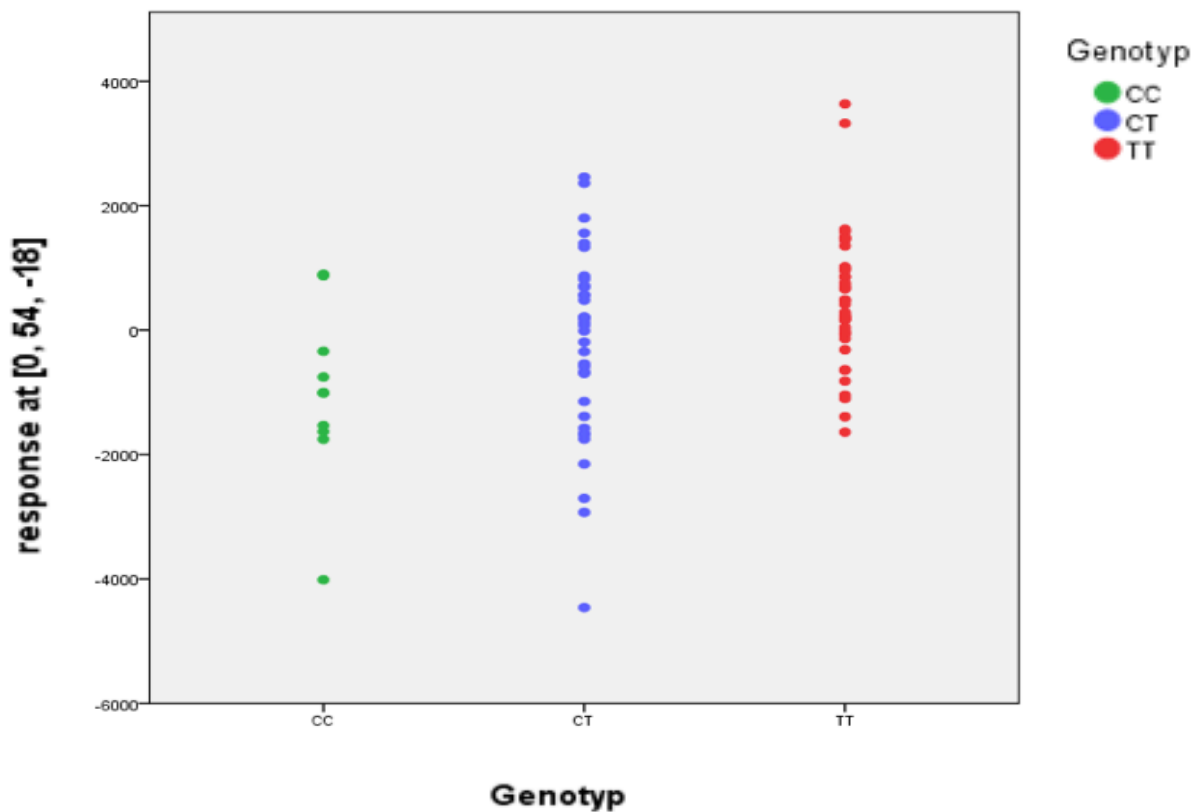


Abb. 8.

Linke Spalte: VMPFC-Aktivierung für *grüne Quadrante vs. blaue Quadrante (CS+ vs. CS-)* bei *ACQ*, *EX1* und *EX2*; FWE < 0,05 korrigiert innerhalb der ROI. Peaks in *ACQ*: 22/14/-14, T=4,99; in *EX1*: 22/14/-14, T=6,10 und in *EX2*: 22/14/-14-, T=4,26.

Rechte Spalte: Linearer Anstieg der VMPFC-Aktivierung bei *EX1 (GrünTime EX1)* und exponentieller Anstieg bei *EX2 (GrünExpo EX2)*, FWE < 0,05 korrigiert innerhalb der ROI. Peaks in *GrünTime EX1*: -4/30/-18, T=5,26 und *GrünExpo EX2*: -6/28/-18, T=3,82. Der Balkenplot zeigt die Effektstärke an (T-Wert).



GrünExpo EX2

Abb. 9.

Oben: Streuplot der VMPFC-Aktivität (Peak in 0/54/-18) bei *GrünExpo EX2*. Aufteilung nach Genotyp (CC=grün, CT=blau, TT=rot). Jeder Punkt entspricht einem Probanden.

Unten: Effekt des PDYN-Polymorphismus auf die VMPFC-Aktivität bei *GrünExpo EX2*. Die VMPFC-Aktivität bei *GrünExpo EX2* nimmt mit der Anzahl an T-Allelen bei rs1997794 zu. Multiple Regressionsanalyse in SPM8: CC=0, CT=1, TT=2, $p < 0,05$; FWE korrigiert innerhalb der ROI; Kovariate: Geschlecht, Alter, Schockintensität, Schmerzempfinden; Peak in 0/54/-18, $T=3,76$. Der Balkenplot zeigt die Effektstärke an (T-Wert).

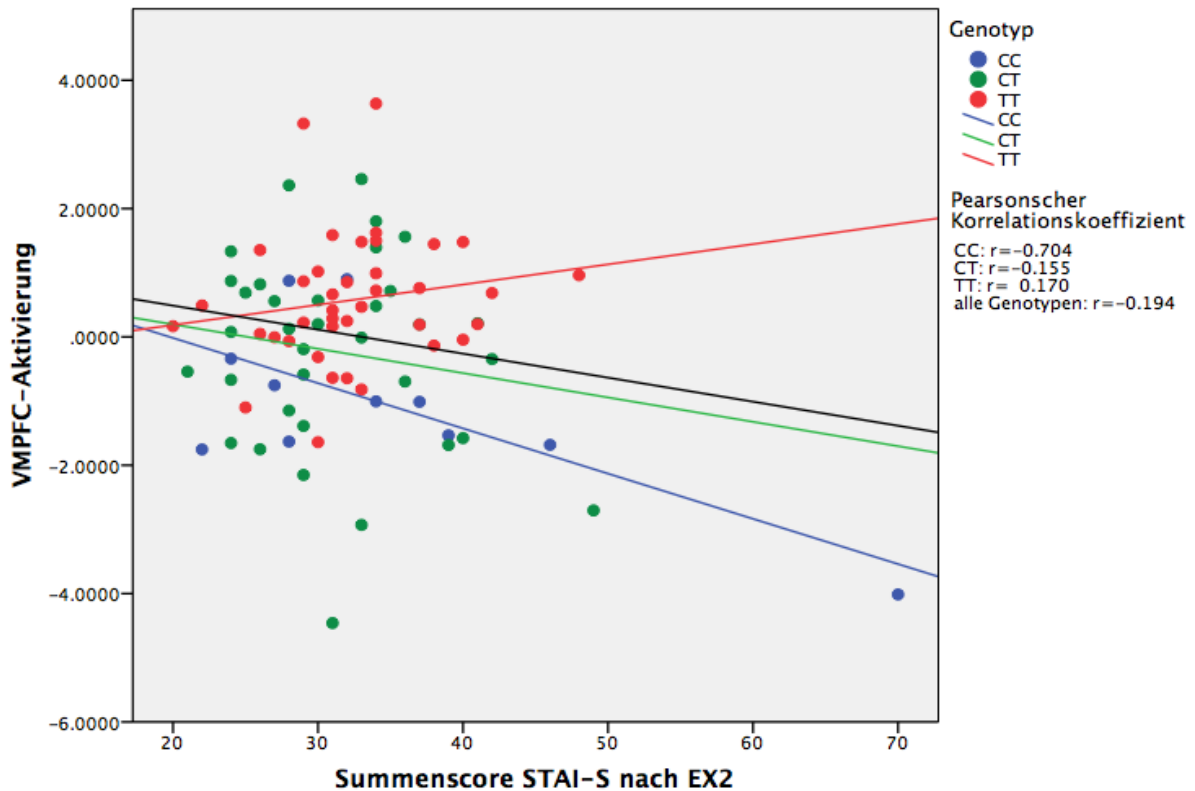


Abb. 10.

Streudiagramm zur Visualisierung der Korrelation zwischen VMPFC-Aktivierung bei *GrünExpo EX2* und Summenscore von STAI-S (nach *EX2*). Jeder Punkt entspricht einem Probanden. Farbe der Punkte nach Genotyp (CC=blau, CT=grün, TT=rot).

Anpassungslinien für die Gesamtkorrelation (alle Genotypen; schwarz) und die einzelnen Genotypen (blau, grün, rot). Bivariate Korrelationsanalyse der Gesamtkorrelation mit SPSS, einseitige Testung, Pearsonscher Korrelationskoeffizient: $r=-0,194$, $p=0,038$.

4.3. Ergebnisse der SCR-Analysen

Die Analyse der Haupteffekte über alle Versuchsgruppen hinweg zeigt bei *ACQ*, *EX1* und *EX2* signifikante Effekte der Bedingung (*CS+* und *CS-*) und des Messzeitpunktes (20 Messwiederholungen bei *ACQ* und *EX1* bzw. 22 bei *EX2*) (*Tab.7* und *Abb. 11*). Zudem finden sich signifikante Interaktionseffekte zwischen Bedingung und Messzeitpunkt in *ACQ*, *EX1* und *EX2* (*Tab. 7*).

In *ACQ*, *EX1* und *EX2* liegt eine Verletzung der Sphärizitätsannahme^{xi}, sowohl in Bezug auf die Bedingung als auch auf den Messzeitpunkt, vor. Die Ablehnung der Sphärizitätsannahme bedeutet, dass die Varianzen der einzelnen Faktorstufen (Messwiederholungen) und auch die Korrelationen zwischen ihnen inhomogen sind. Da die Sphärizität eine Voraussetzung für die Realisierung einer ANOVA mit Messwiederholungen darstellt, muss bei fehlender Sphärizität eine Anpassung der Freiheitsgrade durchgeführt werden. Daraufhin wird eine Korrektur der Freiheitsgrade nach Greenhouse-Geisser angewandt (ANOVA mit Messwiederholungen, Test der Innersubjekteffekte; Innersubjektfaktoren: Bedingung und Messzeitpunkt; *Tab. 7*).

Im Vergleich der Versuchsgruppen (CC vs. CT vs. TT) zeigt sich jeweils kein signifikanter PDYN-Geneffekt auf die SCR bei *CS+* während *ACQ*, *EX1* und *EX2* (ANOVA mit Messwiederholungen, Bedingung: *CS+* und *CS-*, Test der Zwischensubjekteffekte, PDYN x jeweilige Subtask, Kovariate: Alter, Geschlecht, Schockintensität und subjektives Schmerzempfinden; *Tab. 10* und *Abb. 11*).

Die Schockintensität beeinflusst signifikant die SCR bei *CS+* während *ACQ* und *EX1*, nicht jedoch während *EX2*. Bei zunehmender Schockintensität während *ACQ* zeigen sich auch in *ACQ* und *EX1* bei *CS+* stärkere SCR-Anstiege (ANOVA mit Messwiederholungen, Bedingung: *CS+* und *CS-*, Test der Zwischensubjekteffekte, Schockintensität x Subtask; *Tab. 8*).

Zwischen Summenscore im STAI-S (nach *ACQ*) und SCR bei *CS+* während *EX2* zeigt sich eine signifikante Interaktion (ANOVA mit Messwiederholungen, Test der Zwischensubjekteffekte, STAI-S (nach *ACQ*) x Subtask, *Tab. 9*).

Zur genaueren Untersuchung in welcher Weise die Summenscores im STAI-S (nach *ACQ*) und die SCR bei *CS+* während *EX2* interagieren, werden die Mittelwerte der SCR bei *CS+* während *EX2* gebildet und diese mit den Summenscores der STAI-S (nach *ACQ*) in einem Streudiagramm aufgetragen (*Abb. 12*). Eine bivariate Korrelationsanalyse (Summenscores im STAI-S (nach *ACQ*) x SCR bei *CS+* während *EX2*) erbringt kein signifikantes Ergebnis (Daten nicht dargestellt).

Weitere Faktoren wie Geschlecht, Alter, subjektives Schmerzempfinden (Schmerzskala) und STAI-S (nach *EX2*) haben keinen signifikanten Einfluss auf die SCR bei den Bedingungen *UCS* in *ACQ* und *CS+* in allen Subtasks (ANOVA mit Messwiederholungen, Test der Zwischensubjekteffekte; Faktor x Subtask; Daten nicht dargestellt).

^{xi} signifikanter Mauchly-Test auf Sphärizität

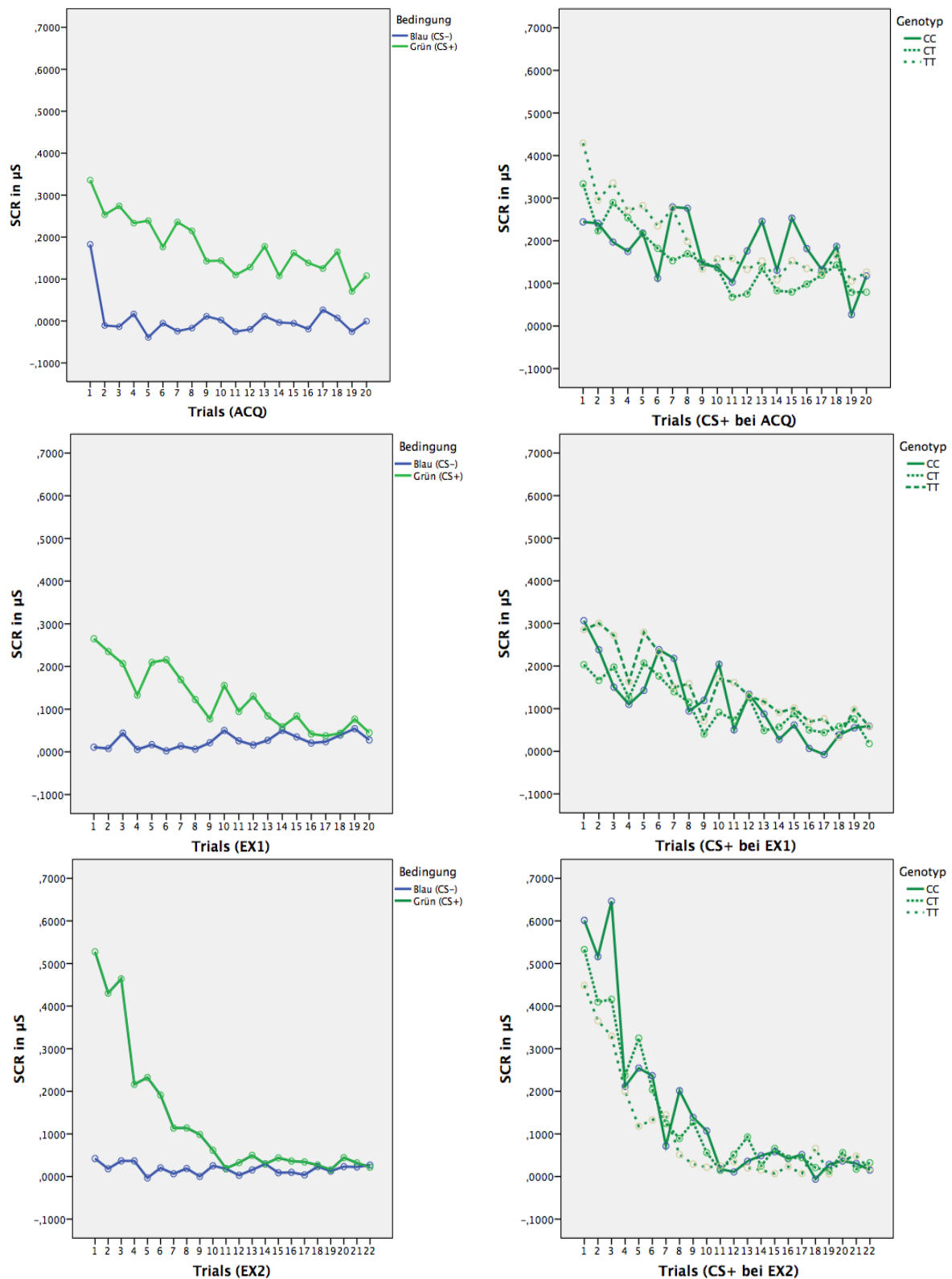


Abb. 11.

Linke Spalte: SCR bei Grün (CS+) und Blau (CS-) während ACQ (obere Reihe), EX1 (mittlere Reihe) und ACQ (untere Reihe).

Rechte Spalte: SCR bei Grün (CS+) während ACQ (obere Reihe), EX1 (mittlere Reihe) und ACQ (untere Reihe), jeweils unterteilt nach Genotypen.

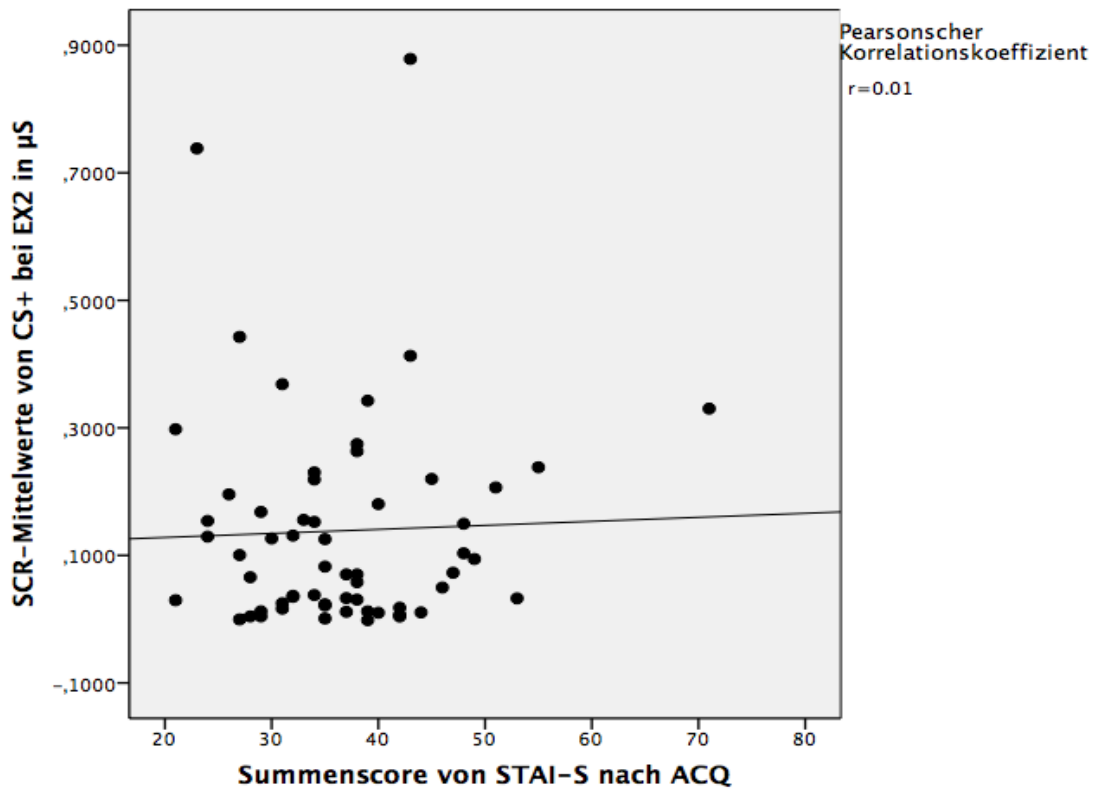


Abb. 12.

Streudiagramm der SCR-Mittelwerte von *CS+* bei *EX2* und der Summenscores von STAI-S (nach *ACQ*). Jeder Punkt entspricht einem Probanden. Anpassungslinie für die Korrelation.

Tab. 7. Test der Innersubjekteffekte bei SCR. Faktoren: Bedingung (*CS+* und *CS-*) und Messzeitpunkt (20 Messwiederholungen bei *ACQ* und *EX1* bzw 22 bei *EX2*) in den Subtasks *ACQ*, *EX1* und *EX2*. ANOVA mit Messwiederholungen.

Faktor	Task	F-Wert^{xii}	Signifikanz (p)
Bedingung	ACQ	26,86 (1,83)	<0,001
Messzeitpunkt	ACQ	9,82 (6,58;544,26)	<0,001
Bedingung x Messzeitpunkt	ACQ	3,84 (6,58;545,87)	0,001
Bedingung	EX1	11,26 (1,83)	0,001
Messzeitpunkt	EX1	4,87 (6,13;508,79)	<0,001
Bedingung x Messzeitpunkt	EX1	6,58 (6,12;507,62)	<0,001
Bedingung	EX2	45,42 (1,85)	<0,001
Messzeitpunkt	EX2	17,87 (3,65;310,01)	<0,001
Bedingung x Messzeitpunkt	EX2	19,89 (4,65;395,31)	<0,001

Tab. 8. Test der Zwischensubjekteffekte bei SCR. Faktor: Schockintensität in den Subtasks *ACQ*, *EX1* und *EX2*. ANOVA mit Messwiederholungen. Bedingungen: *CS+* und *CS-*.

Faktor	Task	F-Wert	Signifikanz (p)
Schockintensität	ACQ	5,93 (46;39)	<0,001
Schockintensität	EX1	5,56 (46;39)	<0,001
Schockintensität	EX2	2,00 (44;42)	0,013

Tab. 9. Test der Zwischensubjekteffekte bei SCR. Faktor: STAI-S (nach *ACQ*) in der Subtask *EX2*. ANOVA mit Messwiederholungen. Bedingungen: *CS+* und *CS-*.

Faktor	Task	F-Wert	Signifikanz (p)
STAI-S (nach ACQ)	EX2	3,58 (28;31)	<0,001

Tab. 10. Test der Zwischensubjekteffekte bei SCR. Faktor: PDYN in den Subtasks *ACQ*, *EX1* und *EX2*. ANOVA mit Messwiederholungen. Bedingungen: *CS+* und *CS-*.

Faktor	Task	F-Wert	Signifikanz (p)
PDYN ^{xiii}	ACQ	0,39 (2;78)	0,677
PDYN ¹⁴	EX1	0,26 (2;78)	0,769
PDYN ¹⁴	EX2	1,11 (2;78)	0,336

xii Freiheitsgrade korrigiert nach Greenhouse-Geiser

xiii Kovariaten: Alter, Geschlecht, Schockintensität und subjektives Schmerzempfinden

5. Diskussion

5.1. Diskussion der fMRT-Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weichen von den Hypothesen ab, die auf der Basis der Vorgängerstudie von Bilkei-Gorzo et al. (2012) aufgestellt wurden. Trotz größerer Versuchsgruppe können deren Hauptergebnisse zum PDYN-Polymorphismus nicht repliziert werden⁸³. Insbesondere lässt sich der Effekt des *rs1997794*-Polymorphismus auf die Amygdala-Aktivität in EX2 nicht replizieren.

Die Annahme, dass eine steigende Anzahl an T-Allelen mit einer geringeren exponentiellen Aktivitätssteigerung des VMPFC (*GrünExpo*) einhergehe, kann nicht bestätigt werden.

Interessanterweise können jedoch PDYN-Geneffekte auf die VMPFC-Aktivität nachgewiesen werden, die in dieser Form in der Vorgängerstudie nicht beschrieben wurden. So zeigt sich eine unter 4.2. *Ergebnisse der fMRT-Analysen* beschriebene, mit der Anzahl an T-Allelen (TT>CT>CC) stärker werdende VMPFC-Aktivierung bei *GrünExpo EX2*.

In der Literatur gibt es Hinweise (u.a. auch in der Vorgängerstudie angedeutet), dass eine VMPFC-Aktivierung eine inhibitorische Wirkung auf die Amygdala-Aktivität haben könnte und somit die Angstreaktion supprimieren könnte^{4,83}. So darf spekuliert werden, ob die mit der Anzahl an T-Allelen in Verbindung stehende, verstärkte VMPFC-Aktivität bei *GrünExpo EX2* ein Ausdruck der Inhibition der Amygdala ist.

In der Vorgängerstudie von Bilkei-Gorzo et al. (2012) weisen TT-Allelträger eine verstärkte Amygdala-Aktivität bei CS+ während EX2 auf. Möglicherweise könnte sowohl bei den T-Allelträgern unserer Replikationsstudie, als auch bei den TT-Allelträgern der Vorgängerstudie eine Prädisposition zu verstärkter Amygdala-Aktivität vorliegen, die sich bemerkenswerterweise nur in der Vorgängerstudie manifestiert. In der vorliegenden Replikationsstudie hingegen könnte diese Prädisposition zu erhöhter Amygdala-Aktivität ebenfalls latent vorhanden sein, durch die supprimierende VMPFC-Aktivität jedoch daran gehindert werden, sich zu manifestieren.

Dieser Interpretationsansatz könnte sowohl den Zusammenhang zwischen VMPFC-Aktivität und steigender Anzahl an T-Allelen (TT>CT>CC) erklären, als auch das Fehlen signifikanter Geneffekte auf die Amygdala-Aktivität. Demnach wären die Geneffekte auf die Amygdala-Aktivität durchaus latent vorhanden, jedoch nur in den Fällen nachweisbar, in denen die inhibitorische Wirkung der VMPFC-Aktivität nicht ausreicht, um die Amygdala vollständig

zu supprimieren.

Die Inkongruenz der Ergebnisse der Vorgänger- und der Replikationsstudie lässt nach wie vor keine eindeutige Aussage zum PDYN-Polymorphismus zu. Es ist zu vermuten, dass der PDYN-Polymorphismus mit weiteren genetischen und neurobiologischen Faktoren interagiert und erst in deren Zusammenspiel seine vielfältigen Wirkungen entfaltet.

Ebenfalls interessant erscheint der Nachweis der negativen Korrelation zwischen VMPFC-Aktivität in *GrünExpo EX2* und Summenscore des STAI-S (nach *EX2*). Hohe Werte im STAI-S gehen demnach tendenziell mit niedriger VMPFC-Aktivität einher. Die Subgruppe der CC-Allelträger ist hierbei hauptverantwortlich für den beschriebenen Geneffekt.

Ein hoher Summenscore im STAI-S (nach *EX2*) spiegelt eine ausgeprägte Ängstlichkeit während und nach *EX2* wider.

Setzt man den zuvor beschriebenen Gedankengang fort, kann davon ausgegangen werden, dass der VMPFC die Amygdala in gewissem Maße inhibiert, wie dies auch aus tierexperimentellen Studien bekannt ist⁴. Eine gesteigerte Ängstlichkeit, reflektiert durch hohe STAI-S Werte, könnte durch geringere VMPFC-Aktivität verursacht oder begünstigt werden und auf diese Weise zu einer Disinhibition der Amygdala führen.

Prädisponierte Probanden könnten demnach nur unzureichend befähigt sein diesen Zustand der Ängstlichkeit durch VMPFC-Aktivität zu kompensieren und indirekt über eine Inhibition der Amygdala zu nivellieren. Die VMPFC-Aktivität könnte demnach als „Stellgröße“ fungieren, um die Aktivität der Amygdala feinzustieren.

C-Allele werden seit der Vorgängerstudie von Bilkei-Gorzo et al. (2012) als „protektive“ Variante des PDYN-Polymorphismus betrachtet⁸³. Es wird die These aufgestellt, dass bei C-Allelträgern eine geringere, inhibitorische VMPFC-Aktivität auf die Amygdala notwendig sei, um bei anxiogenen Reizen das Niveau der Amygdala-Aktivität konstant zu halten.

Ebengenanntes Phänomen könnte somit erklären, dass auch bei hohen Summenscores im STAI-S (nach *EX2*) C-Allelträger eine geringere VMPFC-Aktivität „benötigen“, um die Amygdala gleichermaßen zu inhibieren. TT-Allelträger hingegen zeigen in *GrünExpo EX2* eine mit steigender Ängstlichkeit höhere VMPFC-Aktivierung. Dies lässt sich sinnvoll begründen durch die Annahme, dass TT-Allelträger mit einer Prädisposition für verstärkte Angstreaktivität ausgestattet sind und somit bei stärkerer Ängstlichkeit eine erhöhte inhibitorische VMPFC-Aktivität „aufwenden“ müssen, um die Aktivität der Amygdala kompensatorisch zu drosseln. CT-Träger könnten hier eine Mittelstellung zwischen TT- und CC-Allelträgern einnehmen. Selbstverständlich sind diese Interpretationen noch spekulativ

und können nur durch weitere Untersuchungen bestätigt oder widerlegt werden.

5.2. Diskussion der SCR-Ergebnisse

In den Analysen zur SCR können entgegen der Erwartungen keine Geneffekte nachgewiesen werden. Denkbar wäre, dass auch in den SCR Analysen weitere bisher unbekannte Faktoren Einfluss auf die phänotypische Manifestation des PDYN-Polymorphismus nehmen. Hier wären insbesondere genetische Unterschiede im Bereich der für das Opiatsystem und andere Transmittersysteme kodierenden DNA-Abschnitte denkbar.

Die Schockintensität beeinflusst die SCR bei *CS+* während *ACQ* und *EX1* signifikant. Diese Interaktion der Schockintensität und der SCR ist in der *EX2* nicht mehr nachweisbar.

Begründet werden könnte dieser Umstand damit, dass *ACQ* und *EX1* an Tag 1 der Versuchsanordnung stattfindet und die Intensität des Schocks durch die zeitnahe Abfolge noch nachwirkt. *EX2* wird an Tag 2 durchgeführt und könnte somit außerhalb des relevanten Zeitfensters liegen.

Erwähnenswert ist, dass die Stärke des elektrischen Reizes wie unter 3.1. *Experimentelles Design und Versuchsablauf* beschrieben vom jeweiligen Probanden vor Beginn des Experimentes selbst festgelegt wird und sich allein nach der subjektiven Zielgröße „unangenehm bis sehr unangenehm“ richtet. Hiermit bestätigt sich somit die allgemein bekannte Problematik der „Unschärfe“ subjektiver Zielgrößen. Die Korrelation zwischen Schockintensität und SCR-Ausschlägen bekräftigt die Annahme, dass der absolute, numerische Wert der Schockintensität ein besserer Indikator wäre und letztlich eine bessere Vergleichbarkeit der Probanden untereinander bzw. deren Versuchsergebnisse ermöglichen könnte. Zur Optimierung der Versuchsanordnung könnte in Zukunft ein einheitlicher Absolutwert für die Schockintensität gewählt werden. Problematisch ist hierbei natürlich die, durch den veränderten Versuchsaufbau, kompromittierte Vergleichbarkeit mit der Vorgängerstudie.

Ein interessanter Nebenbefund ist die signifikante Interaktion zwischen Summenscore im STAI-S (nach *ACQ*) und der SCR bei *CS+* während *EX2* (*Tab. 9*). Die Visualisierung der Summenscores im STAI-S (nach *ACQ*) und der SCR bei *CS+* während *EX2* (*Abb. 12*) lässt eine leichtgradige Tendenz erkennen, nach der höhere Summenscores des STAI-S (nach *ACQ*) mit stärkeren SCR-Ausschlägen bei *CS+* während *EX2* einhergehen. Verdeutlicht wird die Komplexität der Analyse durch die in *Abb. 11* visualisierte annähernd exponentielle

Abnahme der SCR-Werte bei CS+ im Verlauf von EX2.

Eine ergänzende bivariate Korrelationsanalyse bleibt ohne signifikantes Ergebnis (Korrelationsanalyse mit Mittelwerten der SCR bei CS+ während EX2; *Abb. 11*). Hier ist jedoch anzumerken, dass die Bildung der reinen Mittelwerte der SCR, als Versuch der Simplifizierung, eine gewisse Verfälschung der zu Grunde liegenden Daten in sich birgt und somit als statistische Analyse nur eine eingeschränkte Aussagekraft hat.

5.3. Allgemeine Probleme und Kritik

Die Dimension der Studie bringt bereits diverse Schwierigkeiten mit sich, die potenziell die Ergebnisse mitbeeinflussen. So führt das im Abschnitt *Material und Methodik* beschriebene Telefonscreening aus multiplen Gründen zu einem Nichteinschluss in die Studie.

Beispielsweise ist es nicht möglich, Probanden mit gefärbten Haaren in die Studie zu integrieren, da dies die - in anderen Teiluntersuchungen der Forschungsgruppe relevante - Messung des Cortisolspiegels im Haupthaar beeinflusst, obgleich diese Probanden für die fMRT- und die SCR-Untersuchungen durchaus geeignet wären. Durch dieses und weitere Ausschlusskriterien ergibt sich ein Selektionsbias, der sich von jenem der Vorgängerstudie unterscheidet. Bei Bilkei-Gorzo et al. (2012) werden beispielsweise keine Haarproben entnommen, welches zu unterschiedlichen Einschlusskriterien führt. Auch weitere Merkmale wie z.B. Alter und Geschlechterverteilung der Stichproben unterscheiden sich, wenn auch geringfügig, zwischen Vorgängerstudie und Replikationsstudie.

Eine weitere Schwierigkeit ist die Größe der Stichprobe. Zwar wurde die Zahl der eingeschlossenen Probanden im Vergleich zur Vorgängerstudie nahezu verdreifacht (Vorgängerstudie n=33, Replikationsstudie n=90 bei fMRT bzw. n=87 bei SCR), trotzdem bleibt die Gruppengröße auch in der Replikationsstudie vergleichsweise klein.

Möglicherweise sind größere Versuchsgruppen notwendig, um stabile und reproduzierbare Effekte zu finden.

Wie bereits in 2.4. *Imaging Genetics* ausgeführt, weisen Fragestellungen im Bereich der Imaging Genetics Besonderheiten auf, welche die Replizierbarkeit von Ergebnissen erschweren. Problematisch sind hier insbesondere die oftmals kleinen Gruppengrößen der Imaging-Genetics-Studien sowie die geringe Effektstärke von Einzelgenen.

Darüber hinaus erwähnenswert ist der Umstand, dass die SCR eine sehr sensible Untersuchungsmethode mit einer Vielzahl an potentiellen Störfaktoren darstellt. So

erschweren beispielsweise unterschiedliche Fingerdicken und Hautbeschaffenheit sowie interindividuelle Schwankungen der Hautfeuchtigkeit die Anbringung der Elektroden. Optimale Vergleichsbedingungen können durch die fehlende Gewährleistung eines konstanten, bei allen Probanden identischen Anpressdruckes nicht garantiert werden. Eine interindividuell variable Aufmerksamkeit ist ein weiterer Störfaktor für die SCR- und fMRT-Messungen, welcher allerdings für die Vorgänger- und Replikationsstudie gleichermaßen gilt. Hier könnten insbesondere die fehlenden Schmerzreize in *EX1* und *EX2* bei einem Teil der Probanden zu Aufmerksamkeitsdefiziten führen. Die konsekutiv mangelnde Angstausslösung könnte somit auch angstbedingte SCR- und fMRT-Veränderungen verhindern.

5.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Studienlage zum PDYN-Polymorphismus bei *rs1997794* im Kontext der Furchtkonditionierung und -extinktion ist zurzeit noch spärlich. Die Vorgängerstudie bringt in Zusammenschau mit der aktuellen, von uns durchgeführten Studie bestenfalls Hinweise auf die möglichen Auswirkungen der verschiedenen Genotypen. Die divergierenden Resultate beider Studien erfordern Replikationsstudien mit größeren Kohorten, die der Fragestellung und damit der Bedeutung des PDYN-Polymorphismus weiter auf den Grund gehen. Erst mit einer größeren Anzahl an Studien ist eine valide wissenschaftliche Aussage möglich.

Gegebenenfalls könnte es sinnvoll sein, die Fragestellung auf Kombinationseffekte von PDYN-Polymorphismen mit weiteren in diesem Kontext relevanten Genloci auszuweiten, z.B. dem *CACNA1C*-Polymorphismus, um Interaktionseffekte zu untersuchen. Mutationen in der Alpha 1C Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals (*CACNA1C*) spielen u.a. eine Rolle in adaptiver Stressregulation und könnten somit in Interaktion mit dem PDYN-Polymorphismus zu nachweisbaren Effekten in Bezug auf Angst- und Stressreaktionen führen und auf diese Weise in unserem Versuchsaufbau neue Hinweise zur Wirkungsweise beider Systeme liefern ¹²⁰.

6. Literaturverzeichnis

1. VanElzakker MB, Dahlgren MK, Davis FC, Dubois S, Shin LM. From Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiology of learning and memory* 2014;113:3-18.
2. Flatten G, Gast U, Hofmann A, Knaevelsrud Ch, Lampe A, Liebermann P, Maercker A, Reddemann L, Wöller W. S3 - Leitlinie PTSTB. 2011; *Trauma & Gewalt* 3: 202-10.
3. Bandelow B, Wiltink J, Alpers W, Benecke C, Deckert J, Eckhardt-Henn A, Ehrig C, Engel E, Falkai P, Geiser F, Gerlach A, Harfst T, Hau S, Joraschky P, Kellner M, Köllner V, Kopp I, Langs G, Lichte T, Liebeck H, Matzat J, Reitt M, Rüddel HP, Rudolf S, Schick G, Schweiger U, Simon R, Springer A, Staats H, Ströhle A, Ströhm W, Waldherr B, Watzke B, Wedekind D, Zottl C, Zwanzger P, Beutel ME. Deutsche S3-Leitlinie Behandlung von Angststörungen 2014.
4. Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory. *Nature reviews Neuroscience* 2004;5:844-52.
5. McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual review of neuroscience* 2004;27:1-28.
6. Fanselow MS, LeDoux JE. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 1999;23:229-32.
7. Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual review of neuroscience* 2001;24:897-931.
8. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience* 2000;23:155-84.
9. Davis M, Shi C. The amygdala. *Current biology : CB* 2000;10:R131.
10. Gilmartin MR, Kwapis JL, Helmstetter FJ. Trace and contextual fear conditioning are impaired following unilateral microinjection of muscimol in the ventral hippocampus or amygdala, but not the medial prefrontal cortex. *Neurobiology of learning and memory* 2012;97:452-64.
11. Helmstetter FJ, Bellgowan PS. Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on Acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behavioral neuroscience* 1994;108:1005-9.

12. LeDoux JE, Sakaguchi A, Iwata J, Reis DJ. Interruption of projections from the medial geniculate body to an archi-neostriatal field disrupts the classical conditioning of emotional responses to acoustic stimuli. *Neuroscience* 1986;17:615-27.
13. Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in neurosciences* 1997;20:517-23.
14. Pare D, Smith Y. Intrinsic circuitry of the amygdaloid complex: common principles of organization in rats and cats. *Trends in neurosciences* 1998;21:240-1.
15. LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1990;10:1043-54.
16. Iwata J, LeDoux JE, Meeley MP, Arneric S, Reis DJ. Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain research* 1986;383:195-214.
17. LeDoux JE, Sakaguchi A, Reis DJ. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1984;4:683-98.
18. LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1990;10:1062-9.
19. Romanski LM, LeDoux JE. Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1992;12:4501-9.
20. Maren S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends in neurosciences* 1999;22:561-7.
21. Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learning & memory* 2001;8:229-42.
22. Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends in neurosciences* 2001;24:540-6.
23. Bouton ME, Rosengard C, Achenbach GG, Peck CA, Brooks DC. Effects of contextual conditioning and unconditional stimulus presentation on performance in appetitive

conditioning. *The Quarterly journal of experimental psychology B, Comparative and physiological psychology* 1993;46:63-95.

24. Lu KT, Walker DL, Davis M. Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001;21:RC162.
25. Falls WA, Miserendino MJ, Davis M. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1992;12:854-63.
26. Rothbaum BO, Schwartz AC. Exposure therapy for posttraumatic stress disorder. *American journal of psychotherapy* 2002;56:59-75.
27. Bouton ME, Mineka S, Barlow DH. A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. *Psychological review* 2001;108:4-32.
28. Hobin JA, Goosens KA, Maren S. Context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala represents fear memories after extinction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003;23:8410-6.
29. Royer S, Martina M, Pare D. An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999;19:10575-83.
30. Szinyei C, Heinbockel T, Montagne J, Pape HC. Putative cortical and thalamic inputs elicit convergent excitation in a population of GABAergic interneurons of the lateral amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000;20:8909-15.
31. Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000;20:6225-31.
32. Lebron K, Milad MR, Quirk GJ. Delayed recall of fear extinction in rats with lesions of ventral medial prefrontal cortex. *Learning & memory* 2004;11:544-8.
33. Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience letters* 1993;163:109-13.
34. Milad MR, Quirk GJ. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 2002;420:70-4.

35. Herry C, Garcia R. Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002;22:577-83.
36. Corcoran KA, Maren S. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001;21:1720-6.
37. Schwarzer C. 30 years of dynorphins--new insights on their functions in neuropsychiatric diseases. *Pharmacology & therapeutics* 2009;123:353-70.
38. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 11. Auflage. München: Elsevier 2011.
39. Wadenberg ML. A review of the properties of spiradoline: a potent and selective kappa-opioid receptor agonist. *CNS drug reviews* 2003;9:187-98.
40. Knoll AT, Carlezon WA, Jr. Dynorphin, stress, and depression. *Brain research* 2010;1314:56-73.
41. Chavkin C, James IF, Goldstein A. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 1982;215:413-5.
42. Gonzalez D, Riba J, Bouso JC, Gomez-Jarabo G, Barbanoj MJ. Pattern of use and subjective effects of *Salvia divinorum* among recreational users. *Drug and alcohol dependence* 2006;85:157-62.
43. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2008;33:88-109.
44. Newton SS, Thome J, Wallace TL, Shirayama Y, Schlesinger L, Sakai N, Chen J, Neve R, Nestler EJ, Duman RS. Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002;22:10883-90.
45. Bruchas MR, Land BB, Aita M, Xu M, Barot SK, Li S, Chavkin C. Stress-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation mediates kappa-opioid-dependent dysphoria. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007;27:11614-23.
46. Mague SD, Pliakas AM, Todtenkopf MS, Tomasiewicz HC, Zhang Y, Stevens WC Jr, Jones RM, Portoghese PS, Carlezon WA Jr. Antidepressant-like effects of kappa-opioid

receptor antagonists in the forced swim test in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2003;305:323-30.

47. Ludwig M, Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nature reviews Neuroscience* 2006;7:126-36.

48. Cho HJ, Basbaum AI. Ultrastructural analysis of dynorphin B-immunoreactive cells and terminals in the superficial dorsal horn of the deafferented spinal cord of the rat. *The Journal of comparative neurology* 1989;281:193-205.

49. Drake CT, Terman GW, Simmons ML, Milner TA, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Chavkin C. Dynorphin opioids present in dentate granule cells may function as retrograde inhibitory neurotransmitters. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1994;14:3736-50.

50. Weisskopf MG, Zalutsky RA, Nicoll RA. The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation. *Nature* 1993;365:188.

51. Rusin KI, Giovannucci DR, Stuenkel EL, Moises HC. Kappa-opioid receptor activation modulates Ca²⁺ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1997;17:6565-74.

52. Hjelmstad GO, Fields HL. Kappa opioid receptor activation in the nucleus accumbens inhibits glutamate and GABA release through different mechanisms. *Journal of neurophysiology* 2003;89:2389-95.

53. Simmons ML, Chavkin C. κ -Opioid receptor activation of a dendrotoxin-sensitive potassium channel mediates presynaptic inhibition of mossy fiber neurotransmitter release. *Molecular pharmacology* 1996;50:80-5.

54. Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 1997;390:611-4.

55. Iremonger KJ, Bains JS. Retrograde opioid signaling regulates glutamatergic transmission in the hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009;29:7349-58.

56. Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 2004;5:173-83.

57. Dogra S, Yadav PN. Biased agonism at kappa opioid receptors: Implication in pain and mood disorders. *European journal of pharmacology* 2015;763:184-90.

58. Brown CH, Bourque CW. Autocrine feedback inhibition of plateau potentials terminates phasic bursts in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *The Journal of physiology* 2004;557:949-60.
59. Kreibich A, Reyes BA, Curtis AL, Ecke L, Chavkin C, Van Bockstaele EJ, Valentino RJ. Presynaptic inhibition of diverse afferents to the locus ceruleus by kappa-opiate receptors: a novel mechanism for regulating the central norepinephrine system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008;28:6516-25.
60. Yakovleva T, Bazov I, Cebers G, Marinova Z, Hara Y, Ahmed A, Vlaskovska M, Johansson B, Hochgeschwender U, Singh IN, Bruce-Keller AJ, Hurd YL, Kaneko T, Terenius L, Ekström TJ, Hauser KF, Pickel VM, Bakalkin G. Prodynorphin storage and processing in axon terminals and dendrites. *FASEB journal* 2006;20:2124-6.
61. Reyes BA, Johnson AD, Glaser JD, Commons KG, Van Bockstaele EJ. Dynorphin-containing axons directly innervate noradrenergic neurons in the rat nucleus locus coeruleus. *Neuroscience* 2007;145:1077-86.
62. Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in neurosciences* 1995;18:22-9.
63. Sukhov RR, Walker LC, Rance NE, Price DL, Young WS, 3rd. Opioid precursor gene expression in the human hypothalamus. *The Journal of comparative neurology* 1995;353:604-22.
64. Hurd YL. Differential messenger RNA expression of prodynorphin and proenkephalin in the human brain. *Neuroscience* 1996;72:767-83.
65. Peckys D, Landwehrmeyer GB. Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* 1999;88:1093-135.
66. Shuster SJ, Riedl M, Li X, Vulchanova L, Elde R. The kappa opioid receptor and dynorphin co-localize in vasopressin magnocellular neurosecretory neurons in guinea-pig hypothalamus. *Neuroscience* 2000;96:373-83.
67. Alheid GF. Extended amygdala and basal forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;985:185-205.
68. Nestler EJ, Carlezon WA, Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological psychiatry* 2006;59:1151-9.
69. Koob GF. A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 2008;59:11-34.

70. Zakharova E, Collins SL, Aberg M, Kumar A, Fernandez JB, Izenwasser S. Depletion of serotonin decreases the effects of the kappa-opioid receptor agonist U-69593 on cocaine-stimulated activity. *European journal of pharmacology* 2008;586:123-9.
71. Wittmann W, Schunk E, Rosskothien I, Gaburro S, Singewald N, Herzog H, Schwarzer C. Dynorphin-derived peptides are critical modulators of anxiety and regulate neurochemistry and corticosterone. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:775-85.
72. Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Mauer D, Zimmer A, Klingmüller D, Zimmer A. Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:425-36.
73. McLaughlin JP, Li S, Valdez J, Chavkin TA, Chavkin C. Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:1241-8.
74. Laorden ML, Milanes MV. Effects of U-50,488H and U-50,488H withdrawal on catecholaminergic neurons of the rat hypothalamus. *Life sciences* 2000;66:803-15.
75. Ur E, Wright DM, Bouloux PM, Grossman A. The effects of spiradoline (U-62066E), a kappa-opioid receptor agonist, on neuroendocrine function in man. *British journal of pharmacology* 1997;120:781-4.
76. Pfeiffer A, Herz A, Loriaux DL, Pfeiffer DG. Central kappa- and mu-opiate receptors mediate ACTH-release in rats. *Endocrinology* 1985;116:2688-90.
77. Nikolarakis K, Pfeiffer A, Stalla GK, Herz A. The role of CRF in the release of ACTH by opiate agonists and antagonists in rats. *Brain research* 1987;421:373-6.
78. Nikolarakis KE, Almeida OF, Herz A. Stimulation of hypothalamic beta-endorphin and dynorphin release by corticotropin-releasing factor (in vitro). *Brain research* 1986;399:152-5.
79. Nikolarakis KE, Almeida OF, Herz A. Feedback inhibition of opioid peptide release in the hypothalamus of the rat. *Neuroscience* 1987;23:143-8.
80. Land BB, Bruchas MR, Lemos JC, Xu M, Melief EJ, Chavkin C. The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin kappa-opioid system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008;28:407-14.
81. National Center for Biotechnology Information 2014. Accessed 3/27, 2014, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5173>.

82. Babbitt CC, Silverman JS, Haygood R, Reininga JM, Rockman MV, Wray GA. Multiple Functional Variants in cis Modulate PDYN Expression. *Molecular biology and evolution* 2010;27:465-79.
83. Bilkei-Gorzo A, Erk S, Schürmann B, Mauer D, Michel K, Boecker H, Scheef L, Walter H, Zimmer A. Dynorphins regulate fear memory: from mice to men. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012;32:9335-43.
84. Karpyak VM, Winham SJ, Preuss UW, Zill P, Cunningham JM, Walker DL, Lewis KA, Geske JR, Colby CL, Abulseoud OA, Hall-Flavin DK, Loukianova LL, Schneekloth TD, Frye MA, Bazov I, Heit JA, Bakalkin G, Mrazek DA, Biernacka JM. Association of the PDYN gene with alcohol dependence and the propensity to drink in negative emotional states. *The international journal of neuropsychopharmacology*;16:975-85.
85. Clarke TK, Ambrose-Lanci L, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Dackis CA, Pettinati HM, O'Brien CP, Oslin DW, Lohoff FW. Genetic association analyses of PDYN polymorphisms with heroin and cocaine addiction. *Genes, brain, and behavior* 2012;11:415-23.
86. Clarke TK, Krause K, Li T, Schumann G. An association of prodynorphin polymorphisms and opioid dependence in females in a Chinese population. *Addiction biology* 2009;14:366-70.
87. Kölsch H, Wagner M, Bilkei-Gorzó A, Toliat MR, Pentzek M, Fuchs A, Kaduszkiewicz H, van den Bussche H, Riedel-Heller SG, Angermeyer MC, Weyerer S, Werle J, Bickel H, Mösch E, Wiese B, Daerr M, Jessen F, Maier W, Dichgans M. Gene polymorphisms in prodynorphin (PDYN) are associated with episodic memory in the elderly. *Journal of neural transmission* 2009;116:897-903.
88. Bilkei-Gorzo A, Michel K, Noble F, Roques BP, Zimmer A. Preproenkephalin knockout mice show no depression-related phenotype. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32:2330 –2337.
89. Myers-Schulz B, Koenigs M. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Molecular psychiatry* 2012;17:132-41.
90. Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Pare D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003;23:8800-7.

91. Milad MR, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ. Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behavioral neuroscience* 2004;118:389-94.
92. Zambito Marsala S, Pistacchi M, Tocco P, Gioulis M, Fabris F, Brigo F, Tinazzi M. Pain perception in major depressive disorder: A neurophysiological case-control study. *Journal of the neurological sciences* 2015;357:19-21.
93. Dickens C, McGowan L, Dale S. Impact of depression on experimental pain perception: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosomatic medicine* 2003;65:369-75.
94. Tang J, Gibson SJ. A psychophysical evaluation of the relationship between trait anxiety, pain perception, and induced state anxiety. *The journal of pain: official journal of the American Pain Society* 2005;6:612-9.
95. Hashimoto R, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Watanabe Y, Fukunaga M, Takeda M. Imaging genetics and psychiatric disorders. *Curr Mol Med* 2015;15:168-75.
96. Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature reviews Neuroscience* 2013;14:417-28.
97. Li SS, McNally GP. The conditions that promote fear learning: Prediction error and Pavlovian fear conditioning. *Neurobiology of learning and memory* 2014;108C:14-21.
98. Wittchen H-U, Zaudig M, Fydrich T. *Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV*. Göttingen: Hogrefe; 1997.
99. Holmes TH, Rahe RH. The Social Readjustment Rating Scale. *Journal of psychosomatic research* 1967;11:213-8.
100. Schulz P, Schlotz W, Becker P. *TICS Trierer Inventar zum chronischen Stress*. Manual. . Göttingen: Hogrefe; 2004
101. Schlotz W, Yim IS, Zoccola PM, Jansen L, Schulz P. The Perceived Stress Reactivity Scale: measurement invariance, stability, and validity in three countries. *Psychological assessment* 2011;23:80-94.
102. Wagnild G. A review of the Resilience Scale. *Journal of nursing measurement* 2009;17:105-13.
103. Wagnild GM, Young HM. Development and psychometric evaluation of the Resilience Scale. *Journal of nursing measurement* 1993;1:165-78.

104. Spielberger CD. State–Trait Anxiety Inventory: a comprehensive bibliography. Palo Alto: CA: Consulting Psychologists Press; 1989.
105. Hautzinger M, Keller F, Kühner C. BDI-II. Beck-Depressions-Inventar. Revision. 2. Auflage. . Frankfurt: Pearson Assessment; 2009.
106. Griefahn B. Ein valider Fragebogen zur Bestimmung des Morgen- und des Abendtyps als Grundlage zur Teilnahme an Schichtarbeit. Med Review 2001;2.
107. Griefahn B, Künemund C, Bröde P, Mehnert P. Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg. Somnologie - Schlafforschung und Schlafmedizin 2001;5:71-80.
108. Borkenau P, Ostendorf, F. NEO-Fünf-Faktoren-Inventar (NEO-FFI) nach Costa und McCrae (deutsche Ausgabe). Göttingen: Hogrefe; 1993.
109. Marshall GN, Wortman CB, Vickers RR, Jr., Kusulas JW, Hervig LK. The five-factor model of personality as a framework for personality-health research. Journal of personality and social psychology 1994;67:278-86.
110. Lovibond PF, Lovibond SH. Manual for the Depression Anxiety Stress Scales (2nd ed.). Sydney: Psychology Foundation of Australia 1995.
111. Brown TA, Chorpita BF, Korotitsch W, Barlow DH. Psychometric properties of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS) in clinical samples. Behav Res Ther 1997;35:79-89.
112. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. Neuropsychologia 1971;9:97-113.
113. Helmstaedter C, Lendt M, Lux S. VLMT. Göttingen: Beltz Test; 2001.
114. Brickenkamp R. Aufmerksamkeits-Belastungs-Test d2 (8. Aufl.). Hogrefe; 1994.
115. Lehrl S. Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest MWT-B. Spitta Verlag 2005.
116. Aster M, Horn R. Wechsler Intelligenztest für Erwachsene (WIE). Pearson; 2006.
117. Nelson-Gray RO. DSM-IV: empirical guidelines from psychometrics. Journal of abnormal psychology 1991;100:308-15.
118. Widiger TA, Frances AJ, Pincus HA, Davis WW, First MB. Toward an empirical classification for the DSM-IV. Journal of abnormal psychology 1991;100:280-8.
119. Meyer-Lindenberg A, Nicodemus KK, Egan MF, Callicott JH, Mattay V, Weinberger DR. False positives in imaging genetics. NeuroImage 2008;40:655-61.
120. Erk S, Meyer-Lindenberg A, Linden DEJ, Lancaster T, Mohnke S, Grimm O, Degenhardt F, Holmans P, Pocklington A, Schmierer P, Haddad L, Mühleisen TW,

Mattheisen M, Witt SH, Romanczuk-Seiferth N, Tost H, Schott BH, Cichon S, Nöthen MM, Rietschel M, Heinz A, Walter H. Replication of brain function effects of a genome-wide supported psychiatric risk variant in the CACNA1C gene and new multi-locus effects. *NeuroImage* 2014;94:147-54.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Jonas Alexander Leppig, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Auswirkungen eines Polymorphismus im PDYN-Gen (rs1997794) auf die Furchtakquisition und -extinktion in einer fMRT-Studie unter Einbezug von Hautleitfähigkeitsveränderungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort/Datum _____

Unterschrift _____

Jonas Alexander Leppig

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern von Herzen für die bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und ebenso bei der Anfertigung dieser Promotion danken. Ohne Euch wäre das alles unmöglich gewesen. Euch widme ich diese Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. med. Dr. phil Henrik Walter für die Überlassung des Promotionsthemas danken.

Danken möchte ich auch PD Dr. med. Susanne Erk für die langjährige Betreuung der Promotion.

Ein Dank auch an alle weiteren Menschen, die mich auf die eine oder andere Weise unterstützt haben.