

Reconsolidation of episodic-like memory is affected by exposure to the predator odor TMT in mice

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Oscar Pichlmeier

aus

Rosenheim

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Thomas Oertner

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Matthias Kneussel

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Matthias Kneussel

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Christian Büchel

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Tobias Donner

Datum der mündlichen Prüfung: 19.06.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Darstellung der Publikation.....	4
1.1 Einleitung.....	4
1.2 Methoden	6
1.3 Ergebnisse.....	10
1.4 Diskussion	13
2. Artikel	15
3. Zusammenfassung auf Deutsch	27
4. Zusammenfassung auf Englisch	28
5. Literaturverzeichnis	29
6. Abkürzungsverzeichnis	30
7. Tabellenverzeichnis	31
8. Erklärung des Eigenanteils	32
9. Eidesstattliche Versicherung	33
10. Danksagung	34

1. Darstellung der Publikation

Anmerkung: In der folgenden Zusammenfassung enthaltene Verweise auf Abbildungen beziehen sich auf die in *Behavioural Brain Research* publizierte Originalarbeit.

1.1 Einleitung

Lebewesen sind ständig in Kontakt mit Informationen aus der Umwelt und ihrer Innenwelt. Mit dieser Flut an Informationen flexibel umzugehen, ist für die Funktionalität eines Lebewesens von großer Bedeutung. Dafür ist es wichtig, Informationen zu speichern, im richtigen Moment abzurufen und bei veränderten Bedingungen zu aktualisieren. Die dafür benötigten Systeme nennen wir Gedächtnis (Jäncke, 2017).

Das Gedächtnis kann hinsichtlich der Dauer, in der die Informationsverarbeitung stattfindet, eingeteilt werden in Ultrakurzzeitgedächtnis (sensorischer Speicher für wenige Sekunden), Kurzzeitgedächtnis (wenige Sekunden bis wenige Minuten), Arbeitsgedächtnis (zur Informationsbearbeitung) und Langzeitgedächtnis (unbegrenzte Dauer). Das Langzeitgedächtnis lässt sich nach Inhalt in deklaratives und nondeklaratives Gedächtnis unterteilen. Zu Ersterem gehört gelerntes Faktenwissen (semantisches Gedächtnis) und persönliche Erlebnisse (episodisches Gedächtnis), zu Letzterem gehören unbewusste, automatisch ablaufende Prozesse, Handlungen und Konditionierungen. Episodisches Gedächtnis nennt man die gespeicherten Informationen über bestimmte Erfahrungen und Ereignisse, die zu bestimmten Zeiten und an bestimmten Orten stattgefunden haben, ein Gedächtnis für "Was", "Wo" und "Wann" (Danieli et al., 2023; Jäncke, 2017).

Die Entstehung von episodischem Gedächtnis erfolgt über mehrere Schritte. Informationen über Objekte, Raum und Zeit werden im Neokortex gesammelt (temporo-okzipitalen Regionen für nicht-räumliche Informationen und posterior-parietale Regionen für räumliche Informationen) und gebündelt an den Hippocampus und angrenzende Areale weitergeleitet. Dort findet zunächst über mehrere Schritte eine Verarbeitung statt, bevor die Information als Langzeitgedächtnis in höheren kortikalen Arealen gespeichert wird (Danieli et al., 2023). Den Prozess der Stabilisierung von labilem Kurzzeitgedächtnis zu

Langzeitgedächtnis nennt man Konsolidierung. Nach der Konsolidierung sind Gedächtnisinhalte jedoch nicht statisch und unveränderbar abgespeichert. Nach der Reaktivierung von Langzeitgedächtnis - sprich einer Erinnerung - wird das Gedächtnis eine zeitlang labil und veränderbar, bevor es wieder zurückgespeichert wird. Diesen Prozess nennt man Rekonsolidierung. Die Verarbeitungsschritte von gespeichertem Langzeitgedächtnis lassen sich grob in mehrere Phasen unterteilen: Gedächtnisabruf, Destabilisierung und Rekonsolidierung. Erinnerungen sind dadurch dynamische Konstrukte, die nach dem Abrufen verändert werden können. Je nachdem, was während der Rekonsolidierung passiert, kann die Erinnerung verstärkt, abgeschwächt oder aktualisiert werden. Dieser Prozess erlaubt eine funktionale und flexible Anpassung des Gedächtnisses an veränderte Umweltbedingungen (Nader et al., 2000). Ein funktionales Gedächtnis ist von enormer Bedeutung für Lebewesen. Besonders auffällig wird das in Situationen, in denen das Gedächtnis dem Individuum nicht mehr als nützliches Instrument dient, sondern selbst zur Belastung wird. Eine Reihe von psychischen Erkrankungen fallen darunter, wie beispielsweise Traumafolgestörungen, Ängste und Süchte. Der Rekonsolidierungsprozess erlaubt es, Erinnerungen zu verändern. Damit eröffnen sich auch potenzielle Therapiemöglichkeiten, mit dem Ziel, die Rekonsolidierung zu nutzen, um psychisches Leid zu verringern (Kim et al., 2021; Schwabe et al., 2014).

Mit unserer Publikation verfolgen wir zwei Ziele. Erstens wollten wir eine standardisierte Verhaltensmethode im Mausmodell entwickeln, die verlässlich Rekonsolidierung von episodischem Gedächtnis auslöst und mit der Beeinflussungsmöglichkeiten untersucht werden können. Zweitens wollten wir den Effekt von Stress auf die Rekonsolidierung von episodischem Gedächtnis untersuchen und mögliche Mechanismen aufdecken. Es besteht eine umfangreiche Literatur über den Effekt von Stress auf die Konsolidierung und Erinnerung von episodischem Gedächtnis von Nagetieren. Nur wenige Studien untersuchen den Effekt auf die Rekonsolidierung und diese haben entscheidende Limitationen (Pichlmeier et al., 2025). Da das episodische Gedächtnis eine wichtige Rolle für das Selbstverständnis spielt, ist es wichtig, die Auswirkungen von Stress auf die Rekonsolidierung des episodischen Gedächtnisses zu untersuchen.

1.2 Methoden

Im Rahmen der Publikationspromotion konzentrierten wir uns zum Großteil auf zwei Verhaltensexperimente mit unterschiedlichen Protokollen. Zusätzlich führten wir pharmakologische Versuche durch und analysierten die Gehirnaktivität im dorsalen Hippocampus. Als Versuchstiere benutzten wir männliche C57Bl/6J Mäuse im Alter von 4–8 Monaten. Zunächst wurde jede Maus über mehrere Tage durch händische Ortswechsel und Laufen auf dem Untersucherarm an die Interaktion mit Menschen gewöhnt. Damit wurde der Stress durch die Handhabung für die Mäuse minimiert. Außerdem wurde jede Maus im Vorfeld durch unterschiedliche basale Verhaltensexperimente (wie dem „Open-Field Test“ und dem „Y-maze“) charakterisiert und nach Parametern wie Arbeitsgedächtnis, Neugierde und Ängstlichkeit untersucht, um hinsichtlich dieser homogene Gruppen zu bilden. Diese Daten sind in der Publikation und Dissertation nicht abgebildet. Zur Analyse des Rekonsolidierungsprozesses nutzten wir die Verhaltensexperimente „One Trial Spatial Learning Test“ und „Water Maze Test“. Der „One Trial Spatial Learning Test“ wurde validiert, um spontane episodische räumliche Erinnerungen bei Mäusen ohne den Einfluss aversiver oder stressiger Reize zu induzieren und zu bewerten (Fellini & Morellini, 2013). Der Test lief über drei Tage: der erste und dritte Tag fand in einer weißen Kiste, welche durch eine Trennwand mit Durchgangsloch in zwei Kompartimente unterteilt wurden, statt. In der oberen rechten und unteren rechten Ecke befand sich ein durchsichtiger Becher. Am ersten Tag befand sich im oberen Becher eine weibliche Maus und die Versuchstiere lernten für 20 Minuten, wo diese zu finden ist. Am zweiten Tag wurde die Erinnerung vom ersten Tag reaktiviert und Rekonsolidierung induziert. In einem Protokoll wurden die Versuchstiere hierfür unter rotem Licht in einem Käfig mit der weiblichen Maus vom Vortag in Kontakt gebracht und rochen diese für fünf Minuten (Abbildung 1A). In einem anderen Protokoll setzten wir die Mäuse zur Reaktivierung des Gedächtnisses für zwanzig Sekunden dem gleichen Versuchsrahmen wie am Vortag aus, nur dass diesmal beide Becher leer waren (Abbildung 1D). Am dritten Tag waren die Mäuse für zwanzig Minuten in der gleichen Kiste wie am ersten Tag, nur dass diesmal beide Becher leer waren. Somit konnte am dritten Tag ermittelt werden, ob eine Präferenz für einen der Becher - und somit eine Erinnerung an den ersten Versuchstag - existiert.

Im „Water Maze Test“ wurde das räumliche Gedächtnis beurteilt, indem die Mäuse in einem kreisförmigen Becken mit 145cm Durchmesser schwimmend eine Plattform von 14cm Durchmesser finden müssen und sich dabei an am Rand des Beckens hängende Markierungen orientieren können. Wir verwendeten zwei Protokolle: eines zur Induktion der Reaktivierung nach dem Erlernen einer Plattformposition (Abbildung 3A) und eines zur Induktion der Reaktivierung nach dem Umkehrlernen, das heißt nach dem Erlernen einer neuen, veränderten Position der Plattform (Abbildung 3B). Im ersten Fall hatten die Mäuse einen Trainingstag um die Plattformposition zu lernen, wobei sie lernten, von vier unterschiedlichen Startpositionen die Zielplattform zu finden. Im zweiten Fall hatten die Mäuse zwei Tage Zeit, um die Position der ersten Plattform zu lernen. Am dritten Tag durchliefen die Mäuse das Umkehrtraining, wobei sich die Plattform in der Mitte des Quadranten gegenüber der vorherigen Plattformposition befand. Zur Reaktivierung und Induktion der Rekonsolidierung wurden die Mäuse 24 Stunden nach dem letzten Lerntag in einem Protokoll dem Wasserbecken auf einer Plattform sitzend und ohne zu schwimmen für zwanzig Sekunde ausgesetzt (Abbildung 3A+B), in einem weiteren Protokoll verbrachten die Mäuse zwei Minuten unter rotem Licht auf der Zielplattform in einem mit Wasser gefüllten Käfig (Abbildung 3C+D). 24 Stunden später absolvierten alle Mäuse einen Transferversuch, bei dem die Mäuse für 90 Sekunden ohne Zielplattform im Wasserbecken schwammen. Damit wurde das Gedächtnis für die zuvor erlernte Lokalisation der Zielplattform analysiert. Um die Auswirkungen eines akuten Stressors auf die Rekonsolidierung zu testen, verwendeten wir einen für Mäuse angeborenen Stressreiz, nämlich 2,4,5-Trimethylthiazolin (TMT), das den Geruch von Fuchskot imitiert und bei Mäusen angeborene Angst auslöst (Laska et al., 2005). Als Kontrollgeruch verwendeten wir Buttersäure (BA), die TMT ähnelt, aber keine angeborene Angst bei Mäusen auslöst (Endres & Fendt, 2009).

Nach den Protokollen zur Gedächtnisreaktivierung wurden die Mäuse in beiden Verhaltensexperimenten in verschiedene Gruppen eingeteilt: „React“ (welche nach der Gedächtnisreaktivierung zurück in den Heimkäfig gebracht wurde), und „React+TMT“ (welche nach der Reaktivierung in einem separaten Käfig durch TMT fünf Minuten lang gestresst wurden). Im „One Trial Spatial Learning Test“ zusätzlich in „React+BA“ (welche nach der Reaktivierung in einem separaten Käfig

mit Buttersäure-Geruch fünf Minuten verbrachte) und „TMT“ (Exposition gegenüber TMT ohne vorherige Gedächtnisreaktivierung exponiert, um zu testen, ob TMT generell am nächsten Tag einen Einfluss auf das Verhalten hat).

Zwei weitere Experimente wurden im „Water Maze Test“ durchgeführt, um die Hypothese zu testen, dass die Reaktivierungsprotokolle die Reaktivierung des räumlichen Gedächtnisses des Labyrinths und der Plattformposition wirksam induzieren. Im ersten Experiment stellten wir die Hypothese auf, dass eine Gedächtnisreaktivierung, falls sie auftritt, anschließend eine erleichternde Wirkung auf den Gedächtnisabruf haben sollte. Die Mäuse lernten am ersten Tag, wo die Plattform zu finden ist. 24 Stunden später absolvierten alle Mäuse einen Transferversuch. Die Kontrollgruppe führte den Transferversuch ohne vorherige Handhabung durch, die Open-Field-Gruppe wurde 10 Minuten vor dem Transferversuch für 20 Sekunden in ein offenes Feld gesetzt, die Inselgruppe (bei der wir die Hypothese aufgestellt hatten, dass eine Rekonsolidierung stattfindet) wurde 10 Minuten vor dem Transferversuch für 20 Sekunden auf eine Insel in der Mitte des Labyrinths gesetzt und die Plattformgruppe (bei der wir ebenfalls die Hypothese aufgestellt hatten, dass eine Rekonsolidierung stattfindet) wurde 10 Minuten vor dem Transferversuch für zwei Minuten auf die Fluchtplattform in einem kleinen rechteckigen Labyrinth gestellt (Abbildung 4A+B). Im zweiten Experiment testeten wir die Hypothese, dass das Reaktivierungsprotokoll eine Rekonsolidierung der Erinnerung an die Position der Plattform induziert, die dadurch labil und empfänglich für neue Lernerfahrungen werden sollte (Besnard et al., 2012; Nader, 2015). Um diese Hypothese zu testen, trainierten wir die Mäuse mit der Plattform an einer ersten Position, wie in Abbildung 3B dargestellt. Am dritten Tag wurden die Gruppen „Insel“ und „Plattform“ dem jeweiligen Reaktivierungsprotokoll unterzogen. Die andere Gruppe wurde hingegen wie zuvor beschrieben für 20 Sekunden in ein offenes Feld gesetzt („Open Field“). Nach einer zehnminütigen Pause, während der sich die Mäuse in ihrem Heimkäfig befanden, wurden alle Mäuse vier Umkehrlernversuchen unterzogen, bei denen die Plattform an einer gegenüber ihrer vorherigen Position entgegengesetzten Stelle platziert wurde. Am Tag 4, 24 Stunden später, wurden alle Mäuse einem Transfertest unterzogen (Abbildung 4C).

Für die pharmakologischen Experimente mit dem „One Trial Spatial Learning Test“ benutzten wir den Glukokortikoid-Rezeptor Antagonisten Mifepriston (Mif, Merck), welcher zwischen der Gedächtnisreaktivierung und der TMT-Exposition intraperitoneal appliziert wurde. Um einen erhöhten Kortikosteronspiegel zu induzieren, wurde CORT (Corticosteron: HBC-Komplex, Merck) in NaCl verdünnt und 10 Minuten nach dem Reaktivierungsprotokoll in einer Konzentration von 1 mg/kg intraperitoneal injiziert.

In einem weiteren, in der Publikation nicht veröffentlichten Experiment, wurde die Hirnaktivität im dorsalen Hippocampus der Mäuse gemessen. Ziel dabei war herauszufinden, ob die Induktion von Rekonsolidierung nach dem „One Trial Spatial Learning Test“ den dorsalen Hippocampus stärker aktiviert als die Durchführung des Rekonsolidierungsprotokolls (Kontakt mit weiblicher Maus) ohne vorherige Erinnerung und somit ohne Rekonsolidierung. Dafür wurden zwei Gruppen gebildet mit jeweils fünf Mäusen. Die eine Gruppe absolvierte den „One Trial Spatial Learning Test“ und hatte am nächsten Tag Kontakt mit der weiblichen Maus zur Induktion von Rekonsolidierung, genau wie bei den ersten zwei Tagen des Verhaltensprotokolls der vorherigen Experimente (Gruppe „Day 1 Fem“). Die andere Gruppe absolvierte nicht den „One Trial Spatial Learning Test“, sondern wurde nur für 20 Sekunden auf der Hand des Untersuchers geführt und hatte am darauffolgenden Tag Kontakt mit einer weiblichen Maus, was wegen einer nicht existenten Erinnerung an diese Maus nicht zu einer Rekonsolidierung führte (Gruppe „Day 1 No Fem“). Eine Stunde nach dem Kontakt mit der weiblichen Maus wurden die Gehirne der Mäuse entnommen und anschließend per Vibratom bearbeitet und die Aktivität des dorsalen Hippocampus per c-fos Antikörpermarkierung gemessen. Mit dem Konfokalmikroskop wurden Bilder der Untereinheiten des dorsalen Hippocampus (CA1, CA2, CA3 und Gyrus dentatus) und der aktiven Zellen gemacht und diese anschließend ausgewertet.

Als medizinischer Doktorand war ich verantwortlich für die Konzeption und Durchführung der Protokolle der Verhaltensexperimente des „One Trial Spatial Learning Test“ und des „Water Maze Tests“, sowie die Analyse der Ergebnisse. Auch führte ich die Vortests, die Bearbeitung und Analyse der Mausgehirne durch.

1.3 Ergebnisse

Wir konnten durch unsere Experimente zeigen, dass akuter Stress während der Rekonsolidierung von episodischem Gedächtnis zu einer schlechteren Erinnerung im „One Trial Spatial Learning Test“ führt. Wir zeigten klare Unterschiede in der Erinnerungsfähigkeit zwischen den Gruppen an Tag 3. Der Präferenzindex berechnet sich als die verbrachte Zeit am leeren Becher, subtrahiert von der Zeit am Becher, der an Tag 1 die weibliche Maus beinhaltet hat. Er zeigt also die Zeit (in Sekunden) an, die länger am Becher mit der weiblichen Maus verbracht wurde und repräsentiert die Erinnerungsfähigkeit an Tag 3, an dem beide Becher leer waren. Einen positiven Präferenzindex hatten die Gruppen „React“, „TMT“ und „React+BA“, während die Gruppe „React+TMT“ einen Präferenzindex um den Nullpunkt hatte, also gleich viel Zeit an beiden Bechern verbrachte (Abbildung 1B und C). Das heißt, nur die Mäuse, die nach der Gedächtnisreaktivierung und während der Rekonsolidierung gestresst wurden, verloren ihre Erinnerung an die Lokalisation der weiblichen Maus von Tag 1. Gleichzeitig mieden die Mäuse der „React+TMT“-Gruppe den Becher des Weibchens auch nicht, was zeigt, dass sie keine Abneigung gegenüber diesen durch die Intervention an Tag 2 erlernten. Der positive Präferenzindex der „TMT“-Gruppe zeigt überdies, dass die Erinnerung ohne Reaktivierung inaktiv bleibt und Stress keinen Einfluss darauf hat. Diese Ergebnisse zeigten sich bei beiden Protokollen der Gedächtnisreaktivierung (vergleiche Abbildung 1A-C und 1D-F). Eine negative Auswirkung von Stress auf die Geselligkeit und die Motivation, nach dem Weibchen zu suchen, konnte durch weitere Experimente ausgeschlossen werden (Abbildung 2).

Interessanterweise zeigten sich trotz ähnlicher Protokolle abweichende Ergebnisse im „Water Maze Test“. Dort hatte Stress nach der Gedächtnisreaktivierung keinen Einfluss auf die Erinnerung. Sowohl die „React“-Gruppe, als auch die „React+TMT“-Gruppe zeigte an Tag 3 nach dem Erlernen der Lokalisierung der Zielplattform und der jeweiligen Intervention an Tag 2 eine Präferenz für die Position der Plattform, was sich an der Zeit zeigte, die sie an dieser Position verbrachten. Dies konnte bei beiden Protokollen der Gedächtnisreaktivierung gesehen werden (Abbildung 3A und C). Um auszuschließen, dass das Gedächtnis durch die Lernversuche zu stark gefestigt wurde, führten wir weitere Experimente mit weniger gefestigtem Gedächtnis durch.

Dafür benutzten wir drei Umkehrlernversuche an Tag 3, dessen Erinnerung im Nachhinein reaktiviert wurde. Auch hier zeigte sich erhaltene Erinnerung für die neue Lokalisation der Plattform in beiden Gruppen (Abbildung 3B und D). Der fehlende Einfluss von Stress während der Rekonsolidierung könnte dadurch erklärt werden, dass unsere Protokolle im „Water Maze Test“ erst gar keine Reaktivierung der Erinnerung induzieren. Um dies auszuschließen, führten wir weitere Experimente durch. Dabei teilten wir Mäuse nach einem Lerntag in vier Gruppen ein: „Control“, „Open Field“, „Island“ und „Plattform“. Am nächsten Tag machten wir einen Transferversuch ohne Zielplattform, um das Suchverhalten der Mäuse zu analysieren. Die Gruppen, bei denen das ursprüngliche Protokoll der Gedächtnisreaktivierung durchgeführt wurde („Island“ und „Plattform“), schwammen näher an die Plattform heran (Abbildung 4A) und verbrachten mehr Zeit in der Plattformposition (Abbildung 4B) als die anderen Gruppen während der ersten 20 Sekunden des Transferversuchs. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Protokolle zur Reaktivierung des Gedächtnisses des „Water Maze Tests“ die Erinnerung wirksam hervorrufen, was eine Rekonsolidierung des Gedächtnisses induzieren könnte. Wenn eine Rekonsolidierung induziert wird, sollte das Gedächtnis labil und empfänglich für neue Lernerfahrungen werden. Dass auch dies durch unsere Protokolle der Fall ist, zeigten wir anhand eines Protokolls des Umkehrlernens. Bei einem Transferversuch verbrachten die Mäuse der Gruppen „Island“ und „Plattform“ mehr Zeit im Quadranten einer für die Mäuse neuen Plattformposition als die Mäuse, die auf zuvor ein offenes Feld gesetzt wurden (Abbildung 4C). Somit erleichterten die Protokolle zur Reaktivierung des räumlichen Gedächtnisses des „Water Maze Tests“ das Auslösen der zuvor erlernten Reaktion (Suchen an der ersten Plattformposition) und die Rekonsolidierung des Gedächtnisses in Bezug auf die neue Plattformposition. Zusätzlich wollten wir die Mechanismen hinter dem Stresseffekt im „One Trial Spatial Learning Test“ beleuchten. Dafür untersuchten wir, ob die Beeinträchtigung der Rekonsolidierung durch einen Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten (Mifepriston, Mif) blockiert werden kann. Am zweiten Tag des „One Trial Spatial Learning Test“ wurden den Gruppen „React+Veh+TMT“ und „React+Mif+TMT“ nach der Gedächtnisreaktivierung und vor der TMT-Exposition das Vehikel bzw. 30 mg/kg Mif injiziert (Abb. 5A). Um die möglichen Auswirkungen von Mifepriston auf

die Rekonsolidierung zu kontrollieren, wurde einer weiteren Gruppe („React+Mif“) 5 Minuten nach der Gedächtnisreaktivierung ohne Stressprotokoll 30 mg/kg Mif injiziert. Während des Erinnerungsversuchs am dritten Tag zeigte die Gruppe „React+Veh+TMT“ keine Präferenz für die Position des Weibchens, was darauf hindeutet, dass Stress während der Rekonsolidierung das räumliche Gedächtnis negativ beeinflusste. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse in den Gruppen „React+Mif+TMT“, „React+Mif“ und „React“ eine Präferenz für den Standort des Weibchens (Abbildung 5B und C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die pharmakologische Blockade von Glukokortikoidrezeptoren verhindert, dass Stress den Rekonsolidierungsprozess stört.

Das bedeutet, dass hinter dem Mechanismus des Stresseffekts unter anderem die Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren durch Kortikosteron steckt. Um diesen Mechanismen noch besser zu verstehen, untersuchten wir den Effekt einer Injektion von CORT während der Rekonsolidierung im „One Trial Spatial Learning Test“. Diese Injektion erhöhte den Plasmaspiegel von Kortikosteron um einen ähnlichen Wert wie die Exposition gegenüber TMT (Abbildung 6A). Zehn Minuten nach der Reaktivierung an Tag 2 wurde den Mäusen entweder 1 mg/kg CORT (Gruppe „Cort“) oder Kochsalzlösung (Gruppe „Vehicle“) intraperitoneal injiziert, und sie wurden dann in ihre Heimkäfige zurückgebracht. Beide Gruppen verbrachten am Tag 3 mehr Zeit am Standort der weiblichen Maus als am Standort des leeren Bechers (Abb. 6B und C). Folglich stören pharmakologisch erhöhte CORT-Plasmaspiegel den Rekonsolidierungsprozess nicht und ahmen auch nicht die Verhaltenseffekte von Stress nach.

Die Analyse der Mausgehirne im Experiment, welches nicht mit publiziert wurde, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei im Methodenteil beschriebenen Gruppen. Die Tabelle 1 zeigt die Anzahl c-fos aktiver Zellen, eingeteilt in anatomischer Unterteilung des dorsalen Hippocampus und Gruppen.

1.4 Diskussion

Im bisherigen Text wurde die Funktion und Unterteilung des Gedächtnisses beschrieben und die wissenschaftliche und klinische Relevanz der Untersuchung des Rekonsolidierungsprozesses erläutert. Wir konnten eine standardisierte Verhaltensmethode im Mausmodell entwickeln, die verlässlich Rekonsolidierung von episodischem Gedächtnis auslöst und mit der Beeinflussungsmöglichkeiten untersucht werden können. Außerdem zeigten wir, dass Stress während der Rekonsolidierung von episodischem Gedächtnis im „One Trial Spatial Learning Test“ die Erinnerung auslöschen kann und zeigten einen Zusammenhang mit Glukokortikoiden durch pharmakologische Versuche. Dem gegenüber zeigte sich kein Effekt von Stress während Rekonsolidierung im „Water Maze Test“, was bedeuten könnte, dass entweder keine Rekonsolidierung induziert wurde oder der Stress nicht ausreichend hoch war, um den Gedächtnisinhalt zu beeinflussen. Weitere Experimente zeigten, dass unser Reaktivierungsprotokoll das Gedächtnis in anschließenden Tests (sowohl die Erinnerung an eine ursprüngliche Plattformlokalisierung, als auch das Lernen einer neuen Lokalisation) verbesserte, was darauf hindeutet, dass eine Reaktivierung des Gedächtnis und eine Rekonsolidierung eintrat.

Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in den zwei Verhaltenstests ist die unterschiedliche Relevanz der Information für die Mäuse. Im „Water Maze Test“ ist die Information über die korrekte Lokalisation der Plattform für die Maus überlebenswichtig. Aus diesem Grund formt sich ein widerstandstärkeres Gedächtnis, da es für die Mäuse dysfunktional wäre, dass sich solch eine wichtige Erinnerung durch Stress während der Rekonsolidierung verändert.

Ein weiterer Faktor ist das Ausmaß des Stresses, dem die Mäuse während der beiden unterschiedlichen Verhaltenstests ausgesetzt waren. Der „Water Maze Test“ ist für die Mäuse eine stressige Erfahrung, während „One Trial Spatial Learning Test“ vergleichsweise weniger stressig ist. Folglich könnte Stress während der Rekonsolidierung einer bereits stressigen Erfahrung weniger beeinträchtigend sein als Stress, der während einer weniger stressigen Erfahrung erlebt wird. Zudem könnte das Gedächtnis im „One Trial Spatial Learning Test“

von Natur aus emotional aufgeladener sein als das im „Water Maze Test“, wodurch es während der Rekonsolidierungsphase anfälliger für Stress ist.

Um auszuschließen, dass der durch TMT induzierte Stress das Sozialverhalten der Mäuse verändert und die Interpretation unserer Daten verfälscht, führten wir weitere Experimente durch. Wir stellten fest, dass die Mäuse im „One Trial Spatial Learning Test“ am Tag nach der Stresserfahrung immer noch das Weibchen bevorzugten und der durch TMT induzierte Stress also keinen Effekt auf das Sozialverhalten hat.

Unsere pharmakologischen Versuche zeigten, dass der negative Effekt von Stress auf das Gedächtnis durch eine Blockade von Glukokortikoidrezeptoren inhibiert werden konnte. Gleichzeitig reichten erhöhte CORT-Spiegel allein nicht aus, um den TMT-Effekt nachzuahmen. Ein neuer, realer Stressor muss also mit erhöhten CORT-Spiegeln während der Rekonsolidierung einhergehen, um das Gedächtnis zu beeinflussen.

Das Ergebnis des nicht publizierten Experiments, in welchem die Anzahl der c-fos aktiven Zellen im dorsalen Hippocampus in zwei Gruppen (mit und ohne Induktion von Rekonsolidierung) ausgezählt wurde, ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Es hätte erwartet werden können, dass in der Gruppe „Day 1 Fem“ durch die Induktion der Rekonsolidierung mehr aktive (und damit c-fos positive) Zellen im dorsalen Hippocampus sichtbar sind als in der Gruppe „Day 1 No Fem“. Interessanterweise waren im gesamten Hippocampus jedoch mehr c-fos positive Zellen in der „Day 1 No Fem“ Gruppe (4914 Zellen zu 4530 Zellen, siehe, siehe Tabelle 1 Spalte „Grand Total“). Der fehlende signifikante Unterschied zwischen den Gruppen könnte daran liegen, dass eine Interaktion mit der weiblichen Maus (Rekonsolidierungsprotokoll) an Tag 2 den dorsalen Hippocampus selbst ohne vorherige Erinnerung an diese Maus stark aktiviert.

Unser Protokoll des „One Trial Spatial Learning Test“ bietet eine kontrollierte Methode, um speziell auf den Rekonsolidierungsprozess abzielen und unerwünschten Stress und den Einfluss neuer Lernprozesse zu minimieren. Wir glauben daher, dass unsere Ergebnisse neue Einblicke in den Rekonsolidierungsprozess liefern und ein verfeinertes Protokoll für zukünftige Forschungen mit Nagetieren bieten.

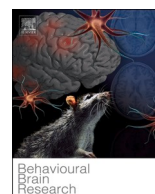
2. Artikel

Oscar Pichlmeier, Ebru Caner, Levi von Kalben, Lynn Michelle Grodzki, Nicole Weigelt, Chiara Pepe, Fabio Morellini

Reconsolidation of episodic-like memory is affected by exposure to the predator odor TMT in mice

Behavioral Brain Research, Volume 495, 18 October 2025, 115817

DOI: 10.1016/j.bbr.2025.115817



Research article

Reconsolidation of episodic-like memory is affected by exposure to the predator odor TMT in mice

Oscar Pichlmeier, Ebru Caner, Levi von Kalben, Lynn Michelle Grodzki, Nicole Weigelt, Chiara Pepe¹, Fabio Morellini^{*}

Research Group Behavioral Biology, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Falkenried 94, Hamburg D-20251, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Memory
Mifepristone
Mouse
Reconsolidation
Stress
TMT

ABSTRACT

When a memory is reactivated, it undergoes a reconsolidation phase, during which it becomes unstable and can be modulated. Several studies have shown that cortisol in humans and corticosterone in rodents play essential roles in learning, consolidating, and retrieving new memories. This study investigates the influence of an acute innate psychological stressor on the reconsolidation of newly acquired memories in male C57BL/6 J mice. We designed new protocols to reactivate previously learned memories in two spatial learning tasks, aiming to induce reconsolidation of hippocampus-dependent episodic-like memory and affect it through stress caused by exposure to 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), a chemical that mimics the scent of fox feces and induces innate fear in mice. We observed that exposure to TMT after memory reactivation impaired reconsolidation in a paradigm for one-trial spatial learning. Moreover, the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone blocked the adverse effects of stress on reconsolidation. On the other hand, the effects of stress were not mimicked by the injection of corticosterone. Finally, stress did not affect the reconsolidation of spatial memories in the water maze task. Our results support the assumption that it is not the elevation of plasma corticosterone per se, but rather the stress context following memory reactivation, that negatively influences the reconsolidation process and subsequent memory retrieval. In conclusion, this study highlights the complexity of stress responses, which cannot be pharmacologically mimicked but require the proper behavioral and environmental context, and it provides new mouse models for investigating the reconsolidation of spatial memories.

1. Introduction

Our memory enables us to recall past events, allowing us to act more effectively. Numerous studies have shown that when a memory is retrieved, it temporarily enters a labile state, necessitating a process known as reconsolidation to restabilize the previously formed memory [1,2]. Initially proposed in the early 2000s, memory reconsolidation has gained considerable attention in neuroscience, as it suggests that memories are not static entities but dynamic constructs that can be modified upon retrieval [3–9]. This process has, indeed, profound implications for understanding how memories can be strengthened, altered, or erased. When a memory is retrieved, it becomes temporarily malleable, allowing for the updating or integration of new information. This flexibility can be advantageous, allowing individuals to adjust their memories in response to new experiences. The process can be broadly

divided into several stages: memory retrieval, destabilization, and reconsolidation. Memory retrieval begins with retrieving a memory, rendering it labile or susceptible to modification. The evolutionary importance of the reconsolidation process is suggested by the fact that its dynamics are conserved throughout evolution [10–13]. For instance, phylogenetically distant species exhibit vulnerability to pharmacological interventions during reconsolidation, ranging from protein synthesis inhibitors to neuromodulator agonists or antagonists and behavioral interventions [14–19].

Stress is one of the most commonly used behavioral manipulations to interfere with memory experimentally. When an individual experiences an acute stressor, the body releases a cascade of hormones, including cortisol. These stress hormones can alter brain function, particularly in regions associated with memory, such as the hippocampus and the amygdala [20–22]. The hippocampus is crucial for forming and recalling

^{*} Corresponding author.

E-mail address: fabio.morellini@zmnh.uni-hamburg.de (F. Morellini).

¹ Present address: Functional Neuroimaging Laboratory - CNCS, Instituto Italiano di Tecnologia.

declarative memories, whereas the amygdala plays a role in processing emotional memories [23]. Episodic memory, which pertains to our long-term recollection of personal experiences and events, plays a crucial role in self-understanding. Consequently, examining the impact of stress on the reconsolidation of episodic memory is of significant importance. A few studies have investigated the effects of an acute stressor on the reconsolidation of episodic memories in humans, suggesting that stress can significantly influence reconsolidation, often with detrimental effects on memory accuracy and stability [24–27].

Interestingly, despite the extensive literature on the effects of stress on hippocampus-dependent episodic-like memory consolidation and retrieval in animal models [28–30], the few studies on reconsolidation in rodents used recognition associative pavlovian memories such as those tested in the novel-object recognition test [31] or conditioned place preference induced by drugs of abuse [32,33]. To our knowledge, only one study has investigated the impact of stress on reconsolidation of hippocampus-dependent memories in rodents: Yang et al. [34] reported that cold water stress 12 h after retrieval in the contextual fear conditioning test impaired the persistence of the long-term fear of the conditioned context in rats, although it remains unclear whether reconsolidation is still ongoing 12 h after retrieval [2,4]. Here, to avoid the confounding factors of using stress to impact the recall of emotional and stress-related memories, we investigated the impact of an acute psychological stressor—namely, exposure to a predator's odor—on the reconsolidation of episodic memories. Moreover, one significant challenge in reconsolidation studies is accurately targeting the process without inducing a new learning event or extinction [35]. Thus, we designed two protocols to induce reconsolidation without causing learning or extinction of episodic memories that are not expected to heighten the anxiety and fear response in mice.

2. Methods

2.1. Animals and husbandry

C57Bl/6 J male mice at the age of 4–8 months were kept in a vivarium with an inverted 12:12 light:dark cycle (light off at 7:00). They were maintained in groups of 4 siblings under standard housing conditions (22 ± 1 °C, 40–60 % humidity, food and water ad libitum). Experiments were performed between 9:30 and 17:30 in a room illuminated with red light (< 10 lux). Three cohorts of animals were tested at different time points. Experiments were conducted in accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC), and the State of Hamburg approved the procedures. Care was taken to minimize pain or discomfort for the animals.

2.2. One-trial spatial learning test

The test was validated to induce and assess spontaneous episodic-like spatial memories in mice without the influence of aversive or stressful stimuli [36]. The experiments were conducted in a compartmentalized square arena measuring 50 cm $\times$ 50 cm and 40 cm high, constructed from white polycarbonate and illuminated with white light (20 lux). A white partition wall divided the arena into two equally sized compartments, with a central hole that served as a passageway. In one corner of each compartment, a transparent plastic beaker was placed; one beaker contained a female mouse during the learning trial, while the other beaker was empty. Holes (1 cm in diameter) at the base of the beakers allowed for interaction between the male and female mice. During the recall trial, both beakers were empty. In the learning trial, the experimental mouse was introduced to the arena with its nostrils contacting the beaker containing the female mouse, and was allowed to move freely between the two compartments for 20 min. For the recall trial, which also lasted 20 min, the experimental mouse was positioned at the opening between the two compartments. Both beakers remained empty and were never used to restrain a female mouse. The mazes were cleaned

between trials using soap, water, and 70 % ethanol. All trials were video recorded with a camera positioned vertically above the maze and analyzed using Ethovision XT (Noldus). The preference index was calculated by subtracting the time spent at the empty beaker from the time spent at the female's beaker. The chance level is therefore zero: Values around zero indicate no preference, negative values indicate a preference for the empty beaker, and positive values indicate a preference for the female's beaker.

2.3. Water maze test

This test was designed to assess the retrieval of spatial memory. Before testing in the water maze, mice were familiarized with swimming and climbing onto a platform (14 cm in diameter) over two days using a small rectangular maze (40 cm $\times$ 30 cm and 50 cm high) filled with water at a temperature of 22 °C. This rectangular maze was located in the same room as the water maze. During pretraining, the room was kept dark and illuminated with dim red light (5 lux). The platform's position was alternated between the left and right halves during trials, maintaining a 5 cm distance from the walls. The mice were trained until they learned to climb onto the platform immediately, remain there for 10 s, and then climb onto a wire mesh grid that facilitated their return to their home cage. All mice successfully learned this task within 2 or 3 training trials, and training in the water maze commenced the following day. The water maze was a circular pool with a diameter of 145 cm, filled with opaque water using non-toxic white watercolor, at a temperature of 21 °C. The maze was situated in a corner of a room, separated from the rest of the space by brown curtains. Illumination was provided by four spotlights placed on the floor around the maze, producing uniform lighting of 60 lux on the water's surface. To escape the water, the mice needed to locate an escape platform, 14 cm in diameter, positioned 1 cm below the water's surface. Four distinct visual cues, approximately 40 cm $\times$ 40 cm in size, were placed asymmetrically around the maze. During training trials, mice were lowered into the maze from one of four pseudo-randomized starting positions along the wall. If a mouse did not find the platform within 90 s, it was guided to it. After staying on the platform for 10 s, the mice were returned to their home cage and warmed under an infrared light. Transfer trials were conducted to evaluate whether the animals developed a preference for searching near the platform's location. During these trials, the platform was removed, and the mice were allowed to swim for 60 s, starting from the center of the maze. To prevent the extinction of the learned behavior, the transfer trials were followed by two additional training trials. All trials were video recorded with a camera positioned vertically above the maze and analyzed using Ethovision XT. We used two learning protocols, one to induce reactivation after learning of one platform position, and one to induce reactivation after reversal learning (Fig. 1A), i.e. after learning a new position of the platform (Fig. 1B). In the first case, mice had one training day to learn the platform position and underwent four training trials, one transfer trial and two training trials. In the second case, mice had two days to learn the position of the first platform. On day 1, they underwent four learning trials, and on day 2, they completed two learning trials, one transfer trial, and two additional learning trials. On day 3, mice underwent the reversal training protocol, with the platform located in the center of the quadrant opposite to the previous platform position. The mice completed three training trials, followed by a transfer trial. Two further experiments were conducted to test the hypothesis that the reactivation protocols effectively induce the reactivation of the spatial memory of the maze and platform position. In the first experiment, we hypothesized that if memory reactivation occurs, it should have facilitatory effects on memory retrieval when tested in a transfer trial. The mice underwent four learning trials, one transfer trial, and two training trials on day 1. On day 2, 24 h after the last training trial on day 1, all mice underwent a transfer trial. The control group performed the transfer trial without prior handling. In contrast, the open field group was placed in an open field (with the same illumination as the water

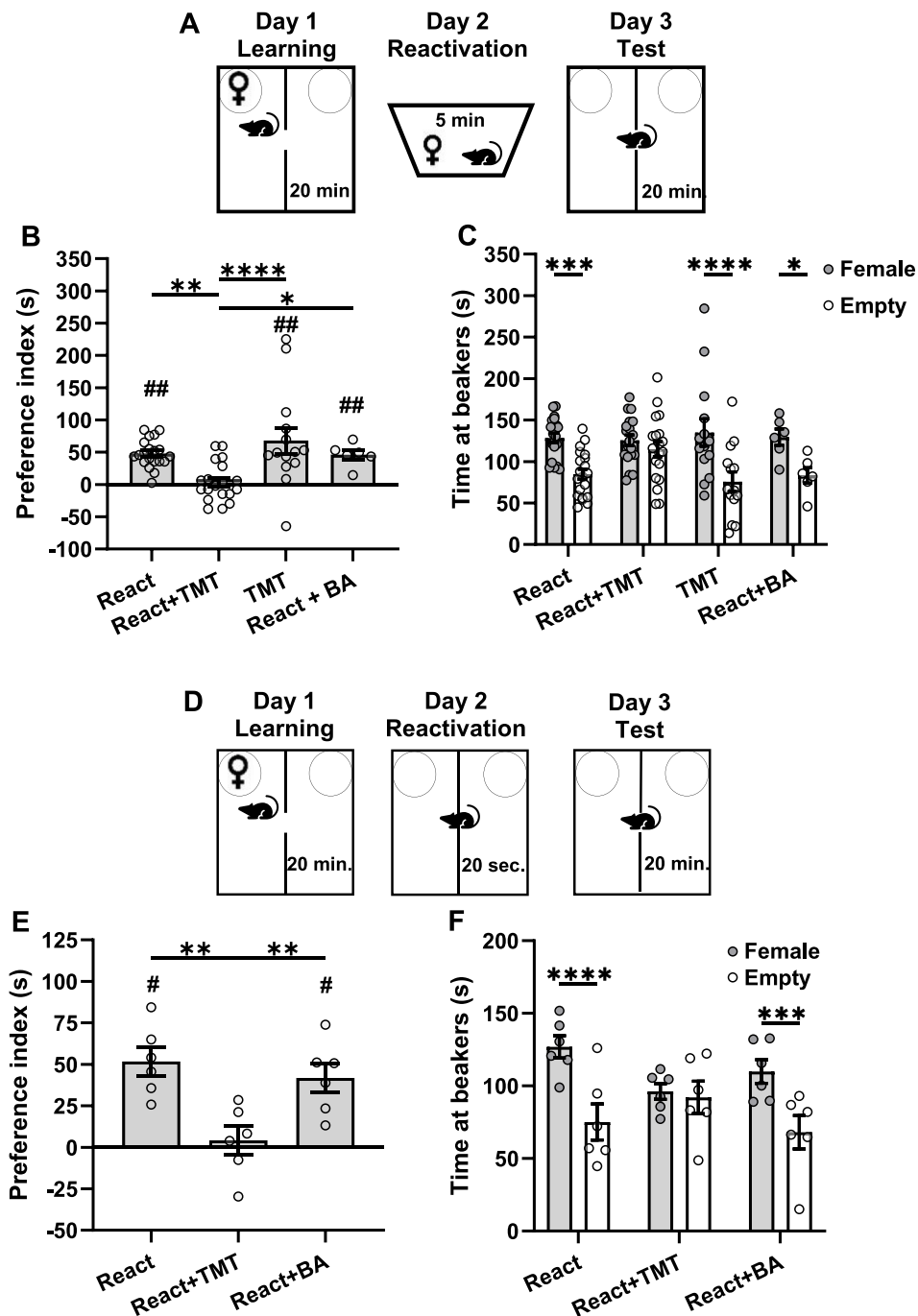


Fig. 1. Acute stress following memory reactivation hinders subsequent recollection in a one-trial test for spontaneous learning of episodic-like memories. The impact of stress on reconsolidation was examined using a one-trial spatial learning test. On day 1, the mice learned the location of a female in a maze. On day 2, the mice underwent memory reactivation by being placed in a cage with a beaker containing a female mouse for 5 min (A-C) or in the maze in the absence of the female mouse for 20 s (D-F). Following the reactivation protocol, the mice were undisturbed (React) or subjected to a stress protocol using TMT (React+TMT). A separate group of mice underwent the TMT stress protocol on day 2 without prior memory reactivation (TMT). On day 3, the mice's preference for the female's location was assessed. B,E During the test trial on day 3, the React+TMT group showed no preference for the female location compared to the React and TMT groups. C,F. The time spent at the beakers during the test trial on day 3 was analyzed, with the female beaker representing the location of the female (Female) on day 1 and the empty beaker (Empty) representing the location that was empty on day 1. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared to chance of 0 (Wilcoxon Signed-Rank test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ (post-hoc test after 1- or mixed 2-way ANOVA). React ($n = 20$ in B,C; $n = 6$ in E,F), React+TMT ($n = 19$ in B,C; $n = 6$ in E,F), TMT ($n = 14$ in B,C; $n = 6$ in E,F), React+BA ($n = 6$ in B,C,E,F).

maze) for 20 s, 10 min before the transfer trial. The island group (in which we hypothesized that reconsolidation occurs) was placed on an island in the middle of the maze for 20 s, 10 min before the transfer trial. The platform group (in which we hypothesized that reconsolidation occurs) was placed for two minutes on the escape platform in a small

rectangular maze (25 cm×40 cm) filled with water, surrounded by black curtains, illuminated with dim light (10 lux), and in the absence of any landmarks, 10 min before the transfer trial. In the second experiment, we tested the hypothesis that the reactivation protocol induces reconsolidation of the memory of the platform position, which should

therefore become labile and susceptible to new learning experiences [37,38]. To test this hypothesis, we trained the mice with the platform at a first position as done for the protocol indicated in Fig. 1B. On day 3, the groups island and platform underwent the respective reactivation protocol. In contrast, the other group was placed in an open field for 20 s as previously described (open field). After a ten-minute break during which the mice were in their home cage, all mice underwent four reversal learning trials in which the platform was placed in an opposite location to its previous position. On day 4, 24 h after the last training trial on day 1, all mice underwent a transfer trial.

2.4. Protocols for memory reactivation

To investigate the effects of stress on memory reconsolidation, mice underwent memory reactivation protocols designed to induce this process. The reactivation protocols were done one day after the last learning day. For both cognitive tasks used (i.e., the water maze and the one-trial spatial learning test), we designed two different protocols to reactivate the spatial memory. In one case, the protocol aimed at exposing the mice to the maze used during learning, and for which they supposedly created a cognitive map, without experiencing the salient reward and stimulus typical for each test (i.e., climbing on the escape platform of the water maze or sniffing the female mouse in the one-trial spatial learning task). In the water maze, this was done by placing the mouse on a 20 cm × 20 cm island located in the center of the maze for 20 s, after which it was returned to its home cage without any swimming experience. In the one-trial spatial learning test, this was achieved by placing the mice in the maze for 20 s, as in the learning trial on day 1, in the absence of the female mouse, before returning them to their home cage. The other set of protocols was designed to expose the mice to salient stimuli of the cognitive tasks (i.e., staying on the escape platform submerged under water for the water maze test and the presence of a female mouse for the one-trial spatial learning test) but in a new setup without the spatial information that they had learned and memorized. In the water maze, this was achieved by placing the mice on the escape platform for 2 min in a rectangular maze (25 cm × 40 cm) filled with water, surrounded by black curtains, and illuminated with red light (10 lux). In the one-trial spatial learning test, the memory reactivation protocol consisted of placing the mice under red light for 5 min in a standard cage (30 cm × 20 cm × 15 cm) with fresh bedding and a beaker containing a female mouse.

2.5. TNT-induced acute stress

To test the effects of an acute stressor on reconsolidation, we used an innate stressful stimulus for mice, namely 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT; W332518, Sigma-Aldrich), which mimics the scent of fox feces and is known to induce innate fear in mice [39]. As a control odor, we used butyric acid (BA; B103500, Sigma-Aldrich) that resembles TMT but does not elicit innate fear in mice [40]. Following the memory reactivation protocols, the mice were divided into three groups: React, React+TMT, and React+BA. All mice were then returned to their home cage. The React group was left undisturbed. In contrast, mice in the React+TMT and React+BA groups were placed in a Type III cage (42 cm × 26 cm × 15 cm) without bedding for 5 min 10 min after the reactivation protocol: The cage contained 1 µl of either TMT (React+BA group) or BA (React+BA group) on a 2 cm × 2 cm Whatman paper attached to one wall. Additionally, a third group (TMT) underwent the stress protocol with TMT without prior memory reactivation. This group was included to determine whether any observed effects of stress on memory recall were due to its interaction with the reactivation protocol or were instead the result of generalized fear induced in the mice. The day after the reactivation protocol, the mice participated in a test trial (either a 60-second transfer trial in the water maze or a 20-minute recall trial in the one-trial spatial memory test) to analyze the potential effects of stress on reconsolidation.

2.6. Corticosterone assay and pharmacology

Blood was collected in heparinized collection tubes (Sarstedt) and centrifuged at 2500 g for 20 min at 4 °C. The plasma was then collected and stored at −20 °C. Plasma corticosterone (CORT) levels were measured using a competitive ELISA kit for CORT (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. CORT (Corticosterone: HBC complex, Merck) was diluted in NaCl and injected intraperitoneally at a concentration of 1 mg/kg, 10 min after the reactivation protocol. Mifepristone (Mif; Merck) was diluted in 1 % ethanol in polyethylene glycol (PEG 400) (Hampton Research). Mif (30 mg/kg) or vehicle was injected intraperitoneally 5 min after the reactivation protocol and 5 min before the TMT exposure.

2.7. Statistical analysis

The Wilcoxon ranked test was used to compare the group median against a median of 0 for the preference index (calculated as “time at the female beaker” minus “time at the empty beaker”) in the test trial of the one-trial spatial learning test. When appropriate, one-way ANOVA and mixed two- or three-way ANOVA tests were applied, followed by post hoc Šidák's multiple comparisons tests. All tests were two-tailed, and the significance level was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Acute stress after reactivation impairs further recollection of episodic-like memories in the one-trial spatial learning test

During the exposure trial on day 1 of the one-trial spatial learning test, all mice spent more time at the beaker containing a female mouse compared to the empty beaker (data not shown). The mice were then assigned to four groups (React, React+TMT, TMT, and React+BA), ensuring that their performance on day 1 was comparable across all groups. On day 2, mice in the React, React+TMT, and React+BA groups underwent the reactivation protocols, either by being placed for 5 min in a fresh cage with a beaker containing a female mouse (Fig. 1A-C) or for 20 s in the maze with both beakers empty (Fig. 1D-F). The mice were then returned to their home cage. Ten minutes after reactivation, the React+TMT and React+BA groups were placed in a Type III cage containing TMT or BA, respectively, for 5 min, and then returned to their home cage. During the recall trial on day 3, the control groups (React, TMT, and React+BA) exhibited a preference for the female's beaker, indicating that they remembered the spatial information learned on day 1 (Fig. 1B,E). In contrast, the React+TMT groups showed no preference that was significantly reduced compared to the other groups (Fig. 1B, one-way ANOVA: $F_{3,55} = 6.00$, $p = 0.0005$; Fig. 1E, one-way ANOVA: $F_{2,15} = 8.42$, $p = 0.003$). Specifically, the React+TMT groups spent an equal amount of time at the female's beaker and the empty beaker during the recall on day 3 (Fig. 1C, effect of the interaction between groups and beakers by a mixed 2-way ANOVA: $F_{3,55} = 3.32$, $p = 0.029$; Fig. 1F, effect of the interaction between groups and beakers by a mixed 2-way ANOVA: $F_{2,15} = 8.42$, $p = 0.003$). The mice in the React+TMT groups did not avoid the beaker at the female location on day 3, indicating that they did not develop a learned aversion to the female's beaker following the TMT intervention (Fig. 1C, F). These findings suggest that stress impairs the reconsolidation of recently acquired memories when memory reactivation occurs immediately before stress induction. Conversely, if reactivation is omitted, the memory remains inactive, and stress does not affect it. Notably, the same results were obtained regardless of the reactivation protocol used. It could be hypothesized that the lack of a preference for the female beaker during the recall trial was not caused by impaired memory reconsolidation, but rather by an adverse effect of stress on sociability and the motivation to search for the female. To test this hypothesis, a new cohort of mice underwent the same protocols with the only difference that during the

test trial on day 3 a beaker contained a female mouse as during the learning trial on day 1 (Fig. 2A). All groups showed a preference for the beaker containing the female mouse compared to the empty beaker, suggesting that the stress protocol did not affect the motivation to investigate the female mouse (Fig. 2B,C).

3.2. As tested in the water maze paradigm, acute stress after reactivation does not affect further recollection of spatial memory

In the water maze test, all mice quickly learned the location of the hidden platform, as evidenced by the low distance they traveled to reach the platform at the end of the learning session (318.34 cm $\pm$ 27.15 cm) and their search strategies during the transfer trial on day 1 (time in target quadrant: 52.51 % $\pm$ 6.02 %). Mice were then assigned to the React and React+TMT groups to ensure that there were no differences in their performance on day 1. On day 2, the mice underwent the reactivation protocols, either by being placed for 20 s on an island in the center of the maze (Fig. 3A), or 2 min on the escape platform in a small rectangular maze (Fig. 3C). Afterward, the mice were returned to their home cage. The mice of the React+TMT groups were placed in a Type III cage with the TMT odor for 5 min, ten minutes after the reactivation protocol. Memory for the platform position was assessed using a transfer trial on day 3. Both groups showed a preference for the platform location, as indicated by the time spent in the platform's position (Fig. 3A; React 2.75 s $\pm$ 0.8 s, React+TMT 2.68 s $\pm$ 0.9 s, $p > 0.05$) (Fig. 3C; React 2.80 s $\pm$ 0.9 s, React+TMT 2.85 s $\pm$ 0.9 s, $p > 0.05$) and the average minimal distance to the platform border (Fig. 3A; React 30.05 cm $\pm$ 5.20 cm, React+TMT 31.85 cm $\pm$ 4.92 cm, $p > 0.05$) (Fig. 3C; React 29.48 cm $\pm$ 5.92 cm, React+TMT 30.93 cm $\pm$ 6.42 cm, $p > 0.05$). Thus, exposure to a stressor after memory reactivation did not affect the reconsolidation and retrieval of the platform position memory.

The lack of an effect of stress could have been due to the memory being strongly established after training, rendering it resistant to modification by stress during reconsolidation. We wondered whether the reconsolidation of a newly learned platform position, following three reversal learning trials, could be susceptible to the effects of stress. We, therefore, performed a new experiment with three reversal learning trials on day 3, during which the platform was located opposite the position used during the initial learning sessions on days 1 and 2. On day 4, the mice underwent the memory reactivation protocols, with half of them subjected to the stress protocol 10 min afterward (Fig. 3B,D). When the mice underwent a transfer trial on day 5, they showed a preference for the new target quadrant, and no differences were detected between the React and React+TMT groups (Fig. 3B,D).

3.3. The memory reactivation protocols in the water maze test facilitate memory retrieval and reversal learning

It could be argued that the lack of an effect of stress in the water maze tests may be due to the protocols used being insufficient to induce memory reactivation and, thereby, reconsolidation. To test this hypothesis, we conducted a new experiment using the water maze task, assuming that if memory reactivation occurs, it should facilitate subsequent memory retrieval. We assigned the mice to four groups: control, open field, island, and platform groups, ensuring that there were no differences in their performance during the transfer trial on training day 1. All mice underwent a transfer trial on day 2, 24 h after the last training trial on day 1. The control group performed the transfer trial without prior handling. In contrast, the open field, island, and platform groups underwent a behavioral manipulation 10 min before being tested in the transfer trial: the open field group an open field (with the same illumination as the water maze) for 20 s, the island group was placed on an island in the middle of the maze for 20 s, and the platform group was

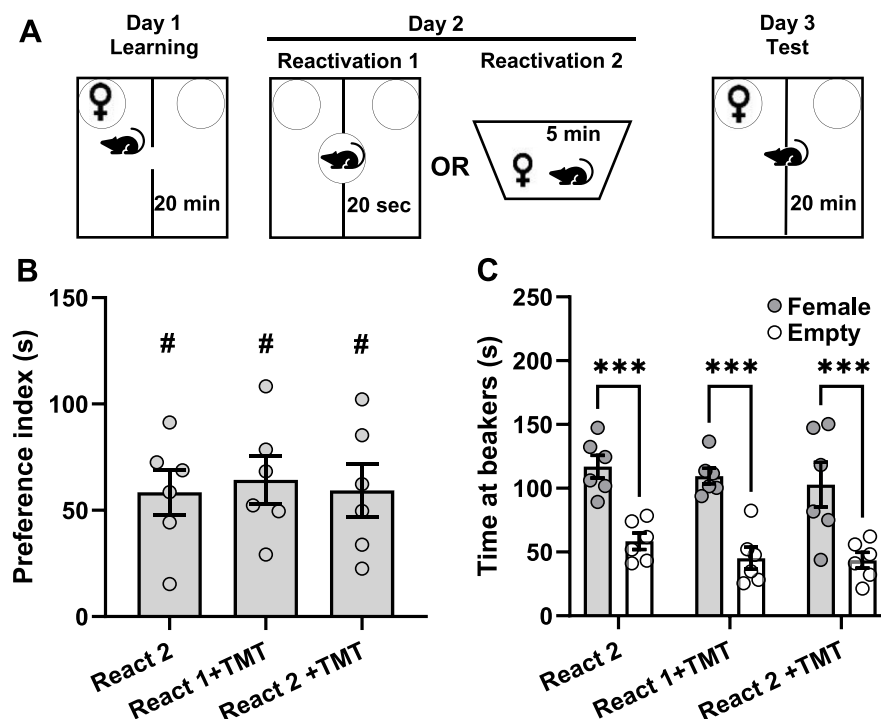


Fig. 2. Acute stress following memory reactivation does affect the preference for a female mouse. A. On day 1, the mice learned the location of a female in a maze. On day 2, the mice underwent memory reactivation by being placed in a cage with a beaker containing a female mouse for 5 min (React 1) or in the maze in the absence of the female mouse for 20 s (React 2). Following the reactivation protocol, the mice were undisturbed (React 2) or subjected to a stress protocol using TMT (React 1 +TMT and React2 +TMT). On day 3, the mice's preference for the female was assessed. B. All groups showed a preference for the beaker located at the female's position. # $p < 0.05$ compared to chance of 0 (Wilcoxon Signed-Rank test). C. All groups spent more time at the beaker located at the female position (Female) compared to the other beaker (Empty). The sample size was $n = 6$ for each group.

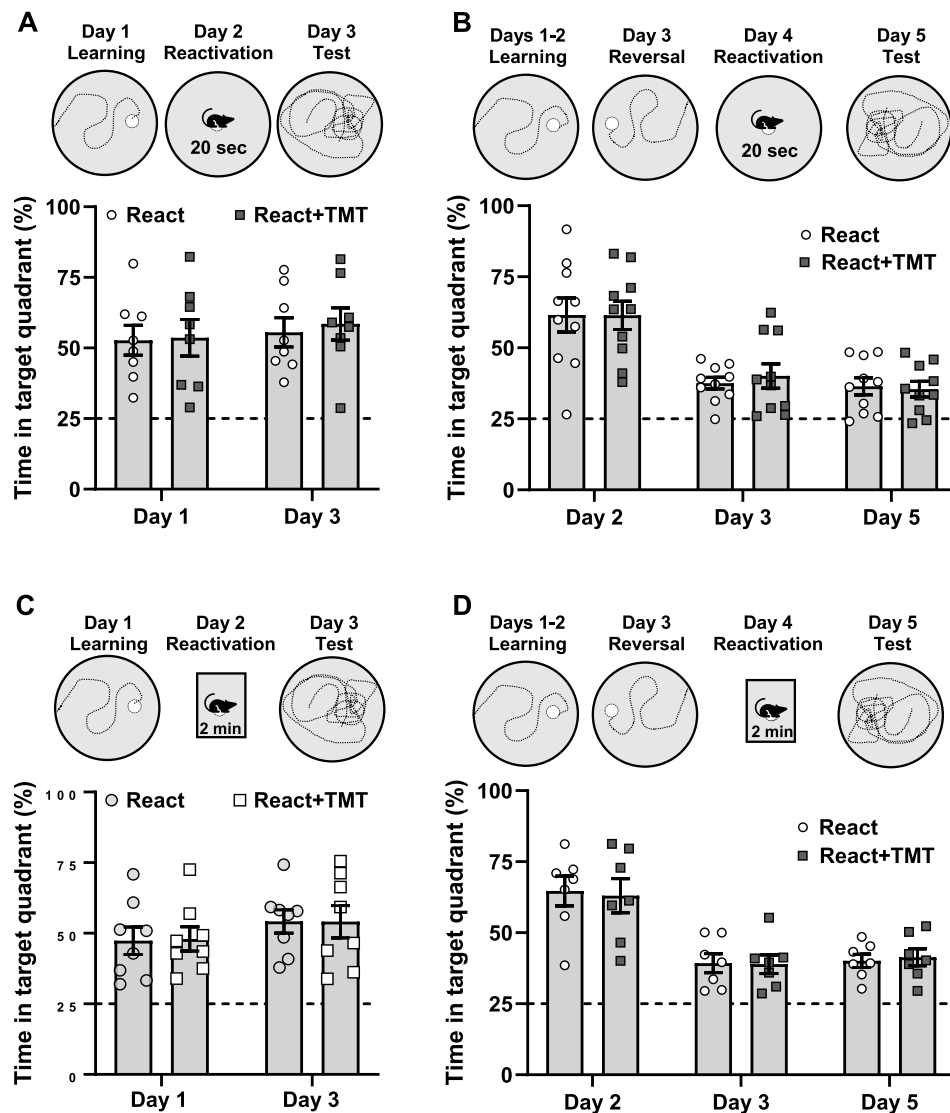


Fig. 3. Acute stress following memory reactivation does not impact the reconsolidation of spatial memory in the water maze test. A,B. In the water maze paradigm, mice that underwent the stress protocol 10 min after being placed for 20 s on an island in the middle of the water maze on day 2 (React+TMT) exhibited normal spatial memory retrieval during the transfer trial one day after spatial learning (A) and reversal learning (B), indicating preserved memory as the mice that received no stress after reactivation (React). C,D. In the water maze paradigm, mice that underwent the stress protocol 10 min after being placed for 2 min on the escape platform placed in a small squared maze on day 2 (React+TMT) exhibited normal spatial memory retrieval during the transfer trial one day after spatial learning (C) and reversal learning (D), indicating preserved memory as the mice that received no stress after reactivation (React). That target quadrant on days 3 and 5 in B,D was opposite to the target quadrant on day 2. The sample size was $n = 8$ for each group in A and B, $n = 10$ for each group in B, and $n = 7$ for each group in D. The dotted lines indicate the chance of 25 %.

placed on a platform in a small rectangular water maze for 2 min. All groups showed a preference for the target quadrant and target position (Fig. 4A,B); however, the island and platform groups swam closer to the platform (Fig. 4A); effect of the interaction between group and day: $F_{3,37} = 5.85$, $p = 0.002$ and spent more time in the platform position (Fig. 4B; effect of the interaction between group and day: $F_{3,37} = 6.39$, $p = 0.013$) as compared to the control and open field groups during the first 20 s of the transfer trial. These results indicate that the protocols used to reactivate the memory of the water maze effectively prompted recollection, suggesting they can induce memory reconsolidation. If reconsolidation is induced, the memory should become labile and susceptible to new learning experiences. To test this hypothesis, we trained a new cohort of mice for two days. On day 3, two groups underwent the reactivation protocols: one by being placed for 20 s on an island in the water maze (island) and the other group being placed for 2 min on a platform in the small rectangular maze (platform). A third group was placed in an open field for 20 s (open field). After a ten-minute break, all

mice underwent four reversal learning trials in which the platform was placed opposite its previous location (Fig. 4C). When tested in a transfer trial one day thereafter, the mice from the island and platform groups spent more time in quadrant of the new platform position compared to the mice placed in the open field (Fig. 4C; effect of the interaction between group and position: $F_{2,23} = 6.42$, $P = 0.006$). Thus, the protocols used to reactivate the spatial memory of the water maze facilitated the extinction of the previously learned response (searching at the first platform position) and the consolidation of the memory related to the new platform position.

3.4. The GR antagonist mifepristone blocks the effects of stress on reconsolidation in the one-trial spatial learning test

Subsequently, we tested whether the impairment of reconsolidation induced by the stress response following TMT exposure could be pharmacologically prevented by blocking the glucocorticoid receptor (GR)

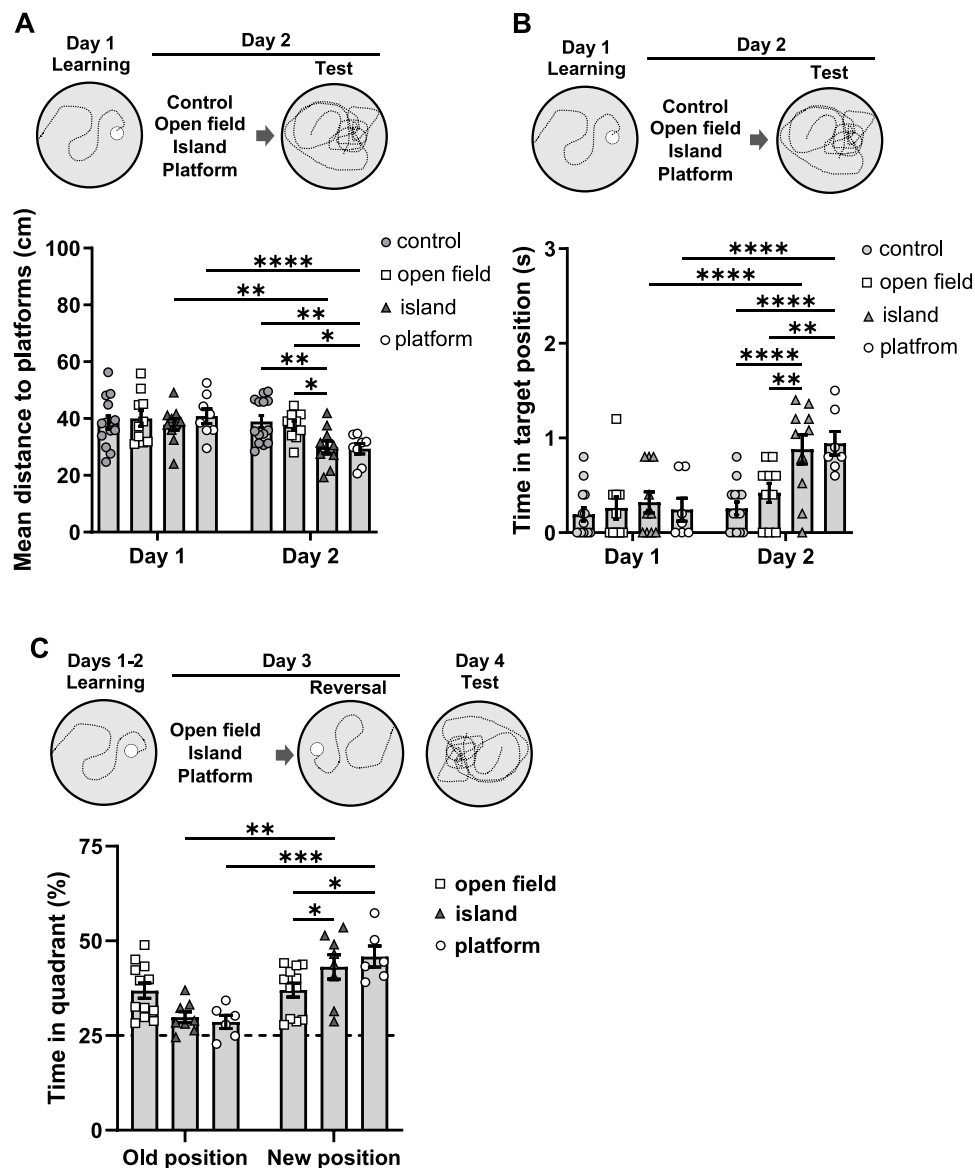


Fig. 4. The reactivation protocols improve memory retrieval and facilitate reversal learning. A, B. The mice were trained in the water maze on day 1. On day 2, they were tested in a transfer trial without having been handled beforehand (control), 10 min after being placed either in an open field for 20 s (open field), on an island in the water maze for 20 s (island), or on the escape platform in a small rectangular maze for 2 min (platform). During the transfer trial on day 2, mice of the island and platform groups stayed at a shorter distance from the platform position (A), and spent more time in the platform position (B) compared to the control and open field groups, and compared their performance during a transfer trial on day 1. C. Ten minutes before being trained in a reversal learning protocol, mice were either placed in an open field for 20 s (open field), on an island in the water maze for 20 s (island), or on the escape platform in a small rectangular maze for 2 min (platform). After reversal learning, the island and platform groups spent more time in the quadrant corresponding to the new platform position than the open field group, and also spent more time in the quadrant corresponding to the old platform position. The dotted line in A-C indicates the chance of 25 %. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ (post-hoc test after a mixed 2-way ANOVA). Sample size in A,B: control ($n = 14$), open field ($n = 10$), island ($n = 10$), platform ($n = 8$). Sample size in C: control ($n = 12$), island ($n = 7$), platform ($n = 6$).

using the GR antagonist mifepristone (Mif). For this purpose, four groups were established. On day 2, 24 h after the learning trial in the one-trial spatial learning test, the React+Veh+TMT and React+Mif+TMT groups were injected with the vehicle or 30 mg/Kg Mif, respectively, 5 min after memory reactivation (by placing the mice 5 min in a fresh cage with a beaker containing a female mouse) and 5 min before being exposed to TMT (Fig. 5A). A control group (React) underwent memory reactivation without receiving injections or experiencing stress. To control the possible effects of Mif on reconsolidation, another group (React+Mif) was injected with 30 mg/kg Mif 5 min after memory reactivation without undergoing the stress protocol. During the recall trial on day 3, the React+Veh+TMT group showed no preference for the female's position, indicating that stress during the

reconsolidation phase negatively affected spatial memory (Fig. 5B; one-way ANOVA on preference index: $F_{3,49} = 3.68$, $p = 0.018$) (Fig. 5C; effect of the interaction between group and beaker after a mixed 2-way ANOVA: $F_{3,49} = 3.48$, $p = 0.042$). In contrast, the mice in the React+Mif+TMT and React+Mif groups exhibited a preference for the female's location, showing no significant difference from the React group (Fig. 5B,C). These results suggest that the pharmacological blockade of GRs can prevent stress from disrupting the reconsolidation process.

3.5. Pharmacologically-induced high plasma CORT concentration does not affect memory reconsolidation in the one-trial spatial learning test

Finally, we tested the hypothesis that the stress-induced

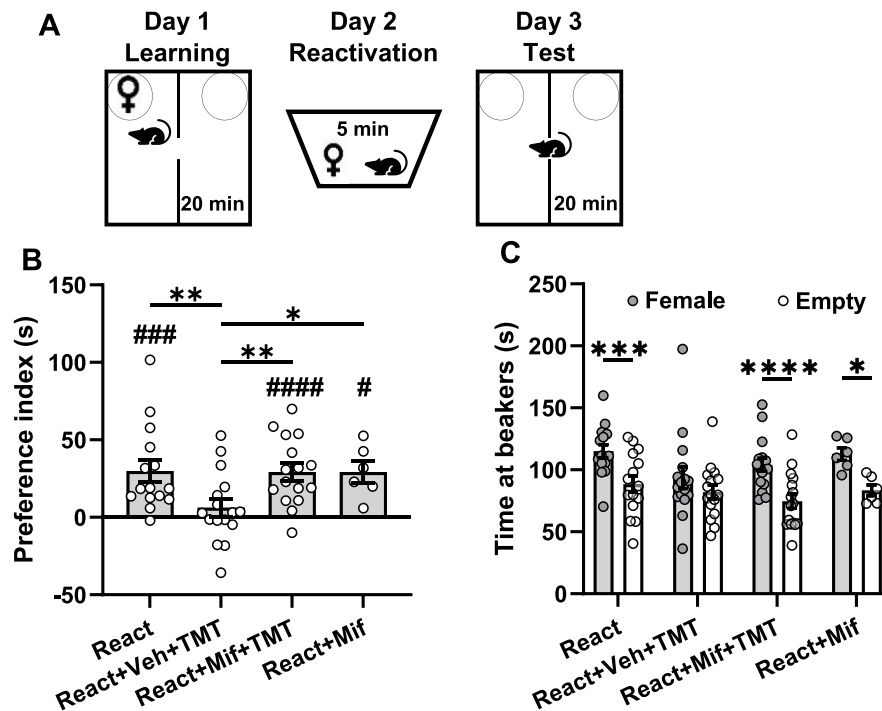


Fig. 5. The effects of stress on reconsolidation are pharmacologically inhibited by the glucocorticoid receptor antagonist Mif. A-C. On day 3 of the one-trial spatial learning test (A), mice injected with a vehicle solution before the stress protocol with TMT (React+Veh+TMT, $n = 16$) exhibited a lower preference index for the female's location compared to mice that were not stressed after the reactivation protocol (React, $n = 15$), to those injected with 30 mg/kg of Mif before the TMT stress protocol (React+Mif+TMT, $n = 16$) and to those injected with 30 mg/kg of Mif after the reactivation protocol (React+Mif, $n = 6$) (B). C. The time spent at the beakers during the test trial on day 3 was analyzed, with the female beaker representing the location of the female on day 1 and the empty beaker representing the location that was empty on day 1. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared to chance of 0 (Wilcoxon Signed-Rank test); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ (post-hoc test after 1- or mixed 2-way ANOVA).

reconsolidation impairment can be triggered solely by the injection of CORT. Before this, we tested whether an injection of 1 mg/kg CORT increases CORT concentration in blood plasma similarly to that induced by a 5-minute exposure to TMT. Four groups were established: one treated with the vehicle, one with 1 mg/kg CORT, one exposed to TMT for 5 min, and one left undisturbed in the home cage before blood sampling (cage control). The mice were sacrificed 15 and 30 min after the injection of TMT, and the CORT concentration in the extracted blood plasma was measured using an ELISA. Fifteen- and thirty-minutes post-injection, the plasma CORT concentration in the 1 mg/kg CORT group was comparable to levels observed following TMT exposure and higher than those in the vehicle and cage control groups (Kruskal-Wallis test 15 min $P = 0.003$; Kruskal-Wallis test 30 min $P = 0.004$; Fig. 6A). Based on the ELISA results, we can conclude that exogenous CORT administration is sufficient to achieve CORT levels comparable to those measured during stress (Fig. 6A). We then tested whether 1 mg/kg CORT could affect reconsolidation similarly to what was observed with exposure to TMT. On experimental day 2, one day after learning in the one-trial spatial learning test, the mice underwent the reactivation protocol by exposing them to a female mouse in a fresh cage. Ten minutes thereafter, they were intraperitoneally injected with either 1 mg/kg CORT or saline, and then returned to their home cages. On the following day (experimental day 3), all mice underwent the recall trial (20 min in the arena with both beakers empty). The behavioral data indicate no effect of CORT on reconsolidation. Both the CORT and saline groups spent significantly more time at the female's location than at the empty beaker location in the test trial on day 3 (Fig. 6B; t -test on the preference index: $t_{26} = 0.44$, $p = 0.66$) (Fig. 6C; effect of the interaction between group and beaker: $F_{1,26} = 0.20$, $p = 0.66$). Consequently, pharmacologically elevated CORT plasma levels do not disrupt the reconsolidation process or mimic the behavioral effects of stress.

4. Discussion

Memory reconsolidation represents an opportunity to modify or disrupt a memory trace, which can be particularly useful in treating various psychiatric and psychological disturbances [41,42]. At the same time, the experience that leads to reactivation should not result in a new learning experience, whether by reinforcing the memory through the presentation of a reinforcer or by inducing reversal learning or extinction. Typically, reactivation in animal studies is achieved by exposing the mice to previous conditions with or without the reinforcing stimulus, which could potentially induce extinction or a new learning process, respectively [17,43]. For example, in the water maze, reactivation is induced either by a transfer trial, where the mice swim in the pool without the reward (i.e., the escape platform), or by a learning trial, where the mice swim and find the escape platform. It is, therefore, expected that the protocol without the platform could cause extinction. In contrast, the protocol with the escape platform builds on previous learning sessions to reinforce the conditioned response to search at the platform position. To avoid similar effects, we designed new protocols to induce reactivation under conditions that exclude the possibility of extinction or new learning processes.

Forcato and colleagues [44] proposed that the proper reminder should be sufficient to induce reconsolidation without inducing extinction, have an adequate time offset with a clear end, and not include reinforcement, creating a discrepancy between the animal's expectation and the actual outcome. Following these criteria, we designed two sets of protocols in which the mice were exposed only to a subset of the stimuli typical of the learning experience: either to the maze without the reinforcement, or to the reinforcement but in a new environment without the salient visual cues learned for navigation. If our protocols were sufficient to induce reconsolidation, the memory should become vulnerable to perturbations after reactivation. Indeed, when tested 24 h

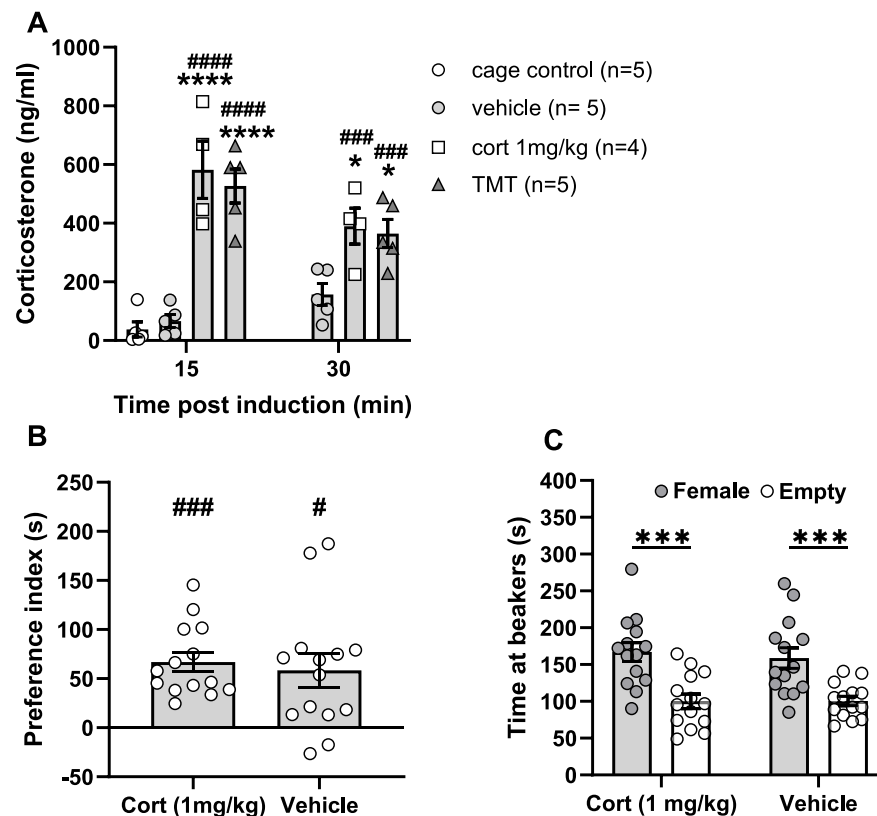


Fig. 6. Pharmacologically induced elevated plasma CORT levels following memory reactivation do not influence memory reconsolidation. **A.** Intraperitoneal application of CORT (1 mg/kg) induces similar CORT plasma levels as the TMT-exposure used to induce stress after memory reactivation. **B.** CORT (1 mg/kg) injected after the reactivation protocol on day 2 of the one-trial spatial learning paradigm did not affect the preference for the female location as tested on day 3. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared to chance of 0 (Wilcoxon Signed-Rank test). **C.** The time spent at the beakers during the test trial on day 3 was analyzed, with the female beaker representing the location of the female on day 1 and the empty beaker representing the location that was empty on day 1. *** $p < 0.001$ (post-hoc test after a mixed 2-way ANOVA). The sample size for each group in B and C was $n = 14$.

after reactivation, the stressed mice did not show a preference for the female's location in the one-trial spatial learning test, suggesting that the reactivation protocols successfully induced reconsolidation. Conversely, stress after the reactivation protocols did not affect memory retrieval in the water maze test. There are two possible explanations for the lack of an effect: either the protocols did not induce reconsolidation, or the stress was insufficient to interfere with the reconsolidation process, resulting in the memory being stabilized rather than erased. We observed that mice undergoing the reactivation protocols showed a more precise platform localization during a subsequent transfer trial. This indicates that the protocols effectively reactivated the spatial memory of the maze and the platform's location. Moreover, the reactivation protocols facilitated the acquisition of a new platform position, suggesting that the memory of the old platform position was weakened by its reactivation, supporting the hypothesis that reconsolidation occurred [37,38]. Thus, despite the lack of an effect of stress on reconsolidation, the behavioral data from the water maze test suggest that the reactivation protocols lead to spatial memory reconsolidation and could be used as a behavioral model to investigate the mechanisms underlying the reconsolidation of episodic-like memory using the water maze task.

It remains unclear why stress affected reconsolidation in the one-trial spatial learning test but not in the water maze. Both paradigms are designed to test similar types of memory, specifically episodic-like spatial memory. One possible explanation is the relevance of the two memories to the animal's fitness. In the water maze test, locating the escape platform is crucial for the animal's survival. In contrast, information about the female's location might be necessary for the animal's fitness, but does not affect its chances of survival. Thus, it could be argued that the different relevance of the two memories influences their

resilience to disturbances. In other words, it would be maladaptive for a memory relevant to survival to be susceptible to erasure by disturbances during the reconsolidation process. On the other hand, it is adaptive to modify memory in response to significant new experiences, which explains why reversal learning in the water maze test was improved by reactivating previous memories. Another factor to consider is the level of stress experienced by the mice during the two different behavioral paradigms. The water maze is inherently a mildly stressful experience for the mice, while the one-trial spatial learning test is comparatively less stressful. Consequently, stress during reconsolidation of an already stressful experience, such as the water maze, might be less impairing than stress experienced during a less stressful experience, like the one-trial spatial learning test. Alternatively, memory in the one-trial spatial learning test, driven by social and sexual motivation, may be inherently more salient or emotionally charged than that formed in the water maze, making it more vulnerable, during the reconsolidation phase, to stress induced by emotionally relevant stimuli such as TMT.

Our data indicate that stress can impair reconsolidation of hippocampus-dependent spatial memories, at least as analyzed in the one-trial spatial learning test. This observation aligns with and adds to other studies that have investigated the effects of stress on memory reconsolidation in rodents. Although the study by Yang et al. [34] did not focus on reconsolidation and instead examined the impact of stress on long-term memory, they found that restrained stress impaired long-term memory when administered within a specific time window—12 h after retrieval of contextual fear memories. They referred to this as late reconsolidation, although it occurs well beyond the conventional reconsolidation window targeted in most studies [3]. Moreover, stress during the reconsolidation phase has been reported to disrupt

cocaine-induced conditioned place preference [45]. Although not involving spatial and hippocampus-dependent memories, but instead recognition and familiarity, Maroon & Akirav [31] reported that stress impaired reconsolidation in the new object recognition test. However, it should be noted that stressed mice exhibited avoidance of the novel object and a preference for the familiar one, suggesting that stress did not disrupt reconsolidation of recognition memory, but rather influenced novelty-seeking behavior, promoting a neophobic strategy. Indeed, stress can modulate several aspects of mouse behavior, including anxiety, novelty-seeking, and social motivation, thereby affecting their performance on cognitive tasks. For instance, in our study, TMT-induced innate fear could have reduced social drive, leading to a lack of interest in the female location during the recall trial. To test this possibility, we exposed the mice to the maze again, this time with a female confined inside a beaker, after they had undergone the stress protocol with TMT. We found that the mice still preferred the female, spending more time at the female's beaker than at the empty beaker. Whether we tend to exclude that stress reduced the social motivation of the mice, it cannot be excluded that, in the case of the one-trial spatial learning task, stress may have interfered with the reconsolidation of the memory of the experience with the female, rather than with the reconsolidation of the spatial memory of the maze.

We observed that the GR antagonist mifepristone blocks the impairing effects of TMT-induced stress on reconsolidation, suggesting that the mechanism by which stress impairs memory reconsolidation involves the activation of the GR. A similar effect has been observed by Yang et al. [34], who reported that the detrimental impact of stress on reconsolidation of morphine-induced conditioned place preference could be blocked by the injection of a GR antagonist in the basolateral amygdala. By contrast, CORT injections after memory reactivation did not produce the same impairing effects on reconsolidation of the memory in the one-trial spatial learning test as the TMT intervention did. This observation indicates that elevated CORT levels alone cannot account for the impact of TMT on reconsolidation. A new, real-life stressor must be associated with increased CORT levels during reconsolidation to impact memory. This observation underscores the significance of psychological stress in influencing memory during reconsolidation. This might explain the contradictory data regarding the effects of pharmacological treatments on the reconsolidation of aversive and fear memories in humans [46], whereas CORT has no effects [47] or even facilitatory effects [48]. Indeed, many protocols investigating pharmacological interventions during the reconsolidation of aversive memories do not adequately exclude potential nonspecific factors affecting memory recollection or reactivation [46]. In this context, our one-trial spatial learning test protocol provides a controlled method to target the reconsolidation process specifically, minimizing unwanted stress and the influence of new learning processes. We thus believe that our results provide new insights into the reconsolidation process and offer a refined protocol for future research with rodents.

CRedit authorship contribution statement

Nicole Weigelt: Writing – review & editing, Investigation. **Chiara Pepe:** Writing – review & editing, Investigation. **Levi von Kalben:** Writing – review & editing, Investigation. **Lynn Michelle Grodzki:** Writing – review & editing, Investigation. **Oscar Pichlmeier:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Investigation, Conceptualization. **Ebru Caner:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation. **Fabio Morellini:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Investigation, Conceptualization.

Acknowledgements

The authors are grateful to Tanja Stoessner and Karen Kessler for excellent mouse husbandry. This study was supported by the Deutsche

Forschungsgemeinschaft (DFG) through Collaborative Research Center CRC 936 (#178316478) Project B7 (F.M.).

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] K. Nader, G.E. Schafe, J.E. LeDoux, The labile nature of consolidation theory, *Nat. Rev. Neurosci.* 1 (2000) 216–219, <https://doi.org/10.1038/35044580>.
- [2] D.C. Riccio, P.M. Millin, A.R. Bogart, Reconsolidation: a brief history, a retrieval view, and some recent issues, *Learn. Mem.* 13 (2006) 536–544, <https://doi.org/10.1101/lm.290706>.
- [3] M.H. Monfils, K.K. Cowansage, E. Klann, J.E. LeDoux, Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories, *Science* 324 (2009) 951–955, <https://doi.org/10.1126/science.1167975>.
- [4] R.L. Clem, R.L. Huganir, Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure, *Science* 330 (2010) 1108–1112, <https://doi.org/10.1126/science.1195298>.
- [5] J.L. Lee, Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content, *Front. Behav. Neurosci.* 4 (2010) 168, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00168>.
- [6] D. Schiller, et al., Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms, *Nature* 463 (2010) 49–53, <https://doi.org/10.1038/nature08637>.
- [7] D.Y. Chen, et al., A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement, *Nature* 469 (2011) 491–497, <https://doi.org/10.1038/nature09667>.
- [8] M.C. Inda, E.V. Muravieva, C.M. Alberini, Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction, *J. Neurosci.* 31 (2011) 1635–1643, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4736-10.2011>.
- [9] T. Agren, et al., Disruption of reconsolidation erases a fear memory trace in the human amygdala, *Science* 337 (2012) 1550–1552, <https://doi.org/10.1126/science.1223006>.
- [10] C.R. Menzel, Unprompted recall and reporting of hidden objects by a chimpanzee (*Pan troglodytes*) after extended delays, *J. Comp. Psychol.* 113 (1999) 426–434, <https://doi.org/10.1037/0735-7036.113.4.426>.
- [11] A. Barco, C.H. Bailey, E.R. Kandel, Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory, *J. Neurochem.* 97 (2006) 1520–1533, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03870.x>.
- [12] D.L. Glanzman, Common mechanisms of synaptic plasticity in vertebrates and invertebrates, *Curr. Biol.* 20 (2010) R31–R36, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.023>.
- [13] Y. Dudai, R.G. Morris, Memorable trends, *Neuron* 80 (2013) 742–750, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.039>.
- [14] J. Przybylski, S.J. Sara, Reconsolidation of memory after its reactivation, *Behav. Brain Res.* 84 (1997) 241–246, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(96\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(96)00153-2).
- [15] K. Nader, G.E. Schafe, J.E. LeDoux, Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval, *Nature* 406 (2000) 722–726, <https://doi.org/10.1038/35021052>.
- [16] M. Eisenberg, T. Kobilo, D.E. Berman, Y. Dudai, Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance, *Science* 301 (2003) 1102–1104, <https://doi.org/10.1126/science.1086881>.
- [17] M.E. Pedreira, H. Maldonado, Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration, *Neuron* 38 (2003) 863–869, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00352-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00352-0).
- [18] K. Lukowiak, M. Fras, K. Smyth, C. Wong, K. Hittel, Reconsolidation and memory infidelity in *lymnaea*, *Neurobiol. Learn. Mem.* 87 (2007) 547–560, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.12.002>.
- [19] L. Chen, S. Tian, J. Ke, Rapid eye movement sleep deprivation disrupts consolidation but not reconsolidation of novel object recognition memory in rats, *Neurosci. Lett.* 563 (2014) 12–16, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.024>.
- [20] M. Joëls, H. Karst, J.G. Tasker, The emerging role of rapid corticosteroid actions on excitatory and inhibitory synaptic signaling in the brain, *Front. Neuroendocrin.* 74 (2024) 101146, <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2024.101146>.
- [21] C. Rosada, R. Lipka, S. Metz, C. Otte, H. Heekeren, K. Wingefeld, Effects of stress-related neuromodulators on amygdala and hippocampus resting state functional connectivity, *J. Psychopharmacol.* 38 (2024) 604–614, <https://doi.org/10.1177/02698811241260972>.
- [22] R.C. Dos-Santos, B.L.W. Sweeten, C.E. Stelly, J.G. Tasker, The neuroendocrine impact of acute stress on synaptic plasticity, *Endocrinology* 164 (2023) bqad149, <https://doi.org/10.1210/edocr/bqad149>.
- [23] L.R. Squire, B.J. Knowlton, The medial temporal lobe, the hippocampus, and memory systems of the brain. *The New Cognitive Neurosciences*, edn 2. Edited by Gazzaniga M.S. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, 2000, pp. 765–780, <https://doi.org/10.1126/science.1896849>.
- [24] B. Dongaonkar, A. Hupbach, R. Gomez, L. Nadel, Effects of psychosocial stress on episodic memory updating, *Psychopharmacol. (Berl.)* 226 (2023) 769–779, <https://doi.org/10.1007/s00213-013-2998-8>.
- [25] L. Schwab, O.T. Wolf, Stress impairs the reconsolidation of autobiographical memories, *Neurobiol. Learn. Mem.* 94 (2010) 153–157, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.05.001>.

- [26] H. Heinbockel, A.D. Wagner, L. Schwabe, Post-retrieval stress impairs subsequent memory depending on hippocampal memory trace reinstatement during reactivation, *Sci. Adv.* 10 (2024) eadm7504, <https://doi.org/10.1126/sciadv.adm7504>.
- [27] M.G. Bos, J. Schuijjer, F. Lodestijn, T. Beckers, M. Kindt, Stress enhances reconsolidation of declarative memory, *Psychoneuroendocrinology* 46 (2014) 102–113, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.04.011>.
- [28] P. Faucher, C. Huguet, N. Mons, J. Micheau, Acute pre-learning stress selectively impairs hippocampus-dependent fear memory consolidation: behavioral and molecular evidence, *Neurobiol. Learn Mem.* 188 (2022) 107585, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2022.107585>.
- [29] M.V. Baratta, S.B. Kodandaramaiah, P.E. Monahan, J. Yao, M.D. Weber, P.A. Lin, B. Gisabella, N. Petrossian, J. Amat, K. Kim, A. Yang, C.R. Forest, E.S. Boyden, K. A. Goosens, Stress enables reinforcement-elicited serotonergic consolidation of fear memory, *Biol. Psychiatry* 79 (2016) 814–822, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.06.02>.
- [30] S.A. Torrisi, S. Rizzo, S. Laudani, A. Ieraci, F. Drago, G.M. Leggio, Acute stress alters recognition memory and AMPA/NMDA receptor subunits in a sex-dependent manner, *Neurobiol. Stress* 25 (2023) 100545, <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2023.100545>.
- [31] M. Maroun, I. Akirav, Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory, *Neuropsychopharmacol* 33 (2008) 394–405, <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301401>.
- [32] M.T.J. Exton-McGuinness, M.L. Drame, C.R. Flavell, J.L.C. Lee, On the resistance to relapse to Cocaine-Seeking following impairment of instrumental cocaine memory reconsolidation, *Front Behav. Neurosci.* 13 (2019) 242, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00242>.
- [33] X.Y. Wang, M. Zhao, U.E. Ghitza, Y.Q. Li, L. Lu, Stress impairs reconsolidation of drug memory via glucocorticoid receptors in the basolateral amygdala, *J. Neurosci.* 28 (2008) 5602–5610, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0750-08.2008>.
- [34] C. Yang, J.F. Liu, B.S. Chai, Q. Fang, N. Chai, L.Y. Zhao, Y.X. Xue, Y.X. Luo, M. Jian, Y. Han, H.S. Shi, L. Lu, P. Wu, J.S. Wang, Stress within a restricted time window selectively affects the persistence of long-term memory, *PLoS One* 8 (2013) e59075, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059075>.
- [35] J.L.C. Lee, K. Nader, D. Schiller, An update on memory reconsolidation updating, *Trends Cogn. Sci.* 21 (2017) 531–545, <https://doi.org/10.1016/j.tics.2017.04.006>.
- [36] L. Fellini, F. Morellini, Mice create what-where-when hippocampus-dependent memories of unique experiences, *J. Neurosci.* 33 (2013) 1038–1043, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2280-12.2013>.
- [37] A. Besnard, J. Caboche, S. Laroche, Reconsolidation of memory: a decade of debate, *Prog. Neurobiol.* 99 (2012) 61–80, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.07.002>.
- [38] K. Nader, Reconsolidation and the dynamic nature of memory, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a021782, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021782>.
- [39] M. Laska, et al., Detecting danger—or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals, *Physiol. Behav.* 84 (2005) 211–215, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.11.006>.
- [40] T. Endres, M. Fendt, Aversion- vs fear-inducing properties of 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline, a component of fox odor, in comparison with those of butyric acid, *J. Exp. Biol.* 212 (2009) 2324–2327, <https://doi.org/10.1242/jeb.028498>.
- [41] C.R. Brewin, Memory and forgetting, *Curr. Psychiatry Rep.* 20 (2018) 87, <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0950-7>.
- [42] J. Deng, X. Lin, Y. Zheng, S. Su, X. Liu, K. Yuan, L. Shi, Y. Bao, L. Lu, Manipulating critical memory periods to treat psychiatry disorders, *Sci. Bull.* 68 (2023) 2477–2486, <https://doi.org/10.1016/j.scib.2023.08.050>.
- [43] M. Eisenberg, Y. Dudai, Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in medaka: old fears Don't die, *Eur. J. Neurosci.* 20 (2004) 3397–3403, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03818.x>.
- [44] C. Forcato, P.F. Argibay, M.E. Pedreira, H. Maldonado, Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: the relevance of the reminder structure, *Neurobiol. Learn Mem.* 91 (2009) 50–57, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.011>.
- [45] M.T.J. Exton-McGuinness, M.L. Drame, C.R. Flavell, J.L.C. Lee, On the resistance to relapse to Cocaine-Seeking following impairment of instrumental cocaine memory reconsolidation, *Front Behav. Neurosci.* 13 (2009) 242, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00242>.
- [46] S.M. Drexler, C.J. Merz, T.C. Hamacher-Dang, M. Tegenthoff, O.T. Wolf, Effects of cortisol on reconsolidation of reactivated fear memories, *Neuropsychopharmacology* 40 (2015) 3036–3043, <https://doi.org/10.1038/npp.2015.160>.
- [47] S. Meir Drexler, C.J. Merz, T.C. Hamacher-Dang, O.T. Wolf, Cortisol effects on fear memory reconsolidation in women, *Psychopharmacol. (Berl.)* 233 (2016) 2687–2697, <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4314-x>.
- [48] L.M. Bolsoni, A.W. Zuardi, Pharmacological interventions during the process of reconsolidation of aversive memories: a systematic review, *Neurobiol. Stress* 11 (2019) 100194, <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100194>.

3. Zusammenfassung auf Deutsch

Das Gedächtnis beinhaltet eine Vielzahl von unterschiedlichen Inhalten und erlaubt uns einen funktionalen Umgang mit unserer Außen- und Innenwelt. Ein wichtiger Prozess, der uns erlaubt, dass unser Gedächtnis flexibel und funktional bleibt, ist die Rekonsolidierung. Der Rekonsolidierungsprozess beginnt nach der Reaktivierung von Langzeitgedächtnis und macht dieses veränderbar. Diesen Prozess zu nutzen, birgt Chancen in der Behandlung von gedächtnisassoziierten Erkrankungen. Deshalb ist es von großer Wichtigkeit, die Rekonsolidierung und die Einflussfaktoren darauf besser zu verstehen.

Das im Journal *Behavioural Brain Research* publizierte Paper „Reconsolidation of episodic-like memory is affected by exposure to the predator odor TMT in mice“ befasst sich mit dem Effekt von Stress auf die Rekonsolidierung von episodischem Gedächtnis. Bisherige Studien untersuchten den Effekt von Stress auf verschiedene Gedächtnisprozesse, der genaue Effekt auf die Rekonsolidierung wurde bisher jedoch ungenügend untersucht und ein Mausmodell zur klaren Induktion von Rekonsolidierung von episodischem Gedächtnis mit Ausschluss von Störfaktoren fehlte.

In unserer Publikation stellen wir ein solches Mausmodell vor, bei dem der Rekonsolidierungsprozess zuverlässig induziert wird und damit analysierbar wird. Wir zeigen, dass in den beiden von uns kreierten Protokollen der Verhaltensexperimente „One Trial Spatial Learning Test“ und „Water Maze Test“ Rekonsolidierung induziert wird und dass Stress während der Rekonsolidierung das Gedächtnis im ersteren auslöscht, während das Gedächtnis im letzteren nicht verändert wird. Darüber hinaus decken wir den Mechanismus hinter der Stresswirkung auf und zeigen, dass Glukokortikoide zwar eine wichtige Rolle spielen, es jedoch einen echten Stresskontext für die Beeinflussung der Rekonsolidierung braucht.

Diese Publikationspromotion ist ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis des komplexen Rekonsolidierungsprozesses und gibt Forschern in Zukunft eine Möglichkeit, Einflussfaktoren auf die Rekonsolidierung klarer zu erkennen.

4. Zusammenfassung auf Englisch

Memory contains a wide variety of different content and allows us to interact functionally with the world - externally as well as internally. An important process that allows our memory to remain flexible and functional is called Reconsolidation. After the reactivation of long-term memory, the Reconsolidation process begins and makes the memory content changeable. Using this process offers opportunities in the treatment of memory-related disorders. Therefore, it is very important to better understand Reconsolidation and the factors that influence it.

The paper "Reconsolidation of episodic-like memory is affected by exposure to the predator odor TMT in mice", published in the journal *Behavioural Brain Research*, deals with the effect of stress on the Reconsolidation of episodic memory. Previous studies have investigated the effect of stress on various memory processes, but the exact effect on the Reconsolidation process has not been sufficiently studied, and a mouse model for the clear induction of Reconsolidation of episodic memory with the exclusion of confounding factors has been lacking.

In our publication, we present such a mouse model in which the Reconsolidation process is reliably induced and thus becomes analysable more clearly. We show that Reconsolidation is induced in the two behavioural experiment protocols we created, the "One Trial Spatial Learning Test" and the "Water Maze Test", and that stress during Reconsolidation erases memory in the former, while memory in the latter remains unchanged. Furthermore, we uncover the mechanism behind the effect of stress and show that although glucocorticoids play an important role, a real stress context is needed to influence Reconsolidation.

This doctoral thesis is an important step towards a better understanding of the complex Reconsolidation process and will enable researchers to more easily discover factors that influence Reconsolidation in the future.

5. Literaturverzeichnis

Besnard, A., J. Caboche and S. Laroche (2012). "Reconsolidation of memory: a decade of debate." *Prog Neurobiol* 99(1): 61-80.

Danieli, K., A. Guyon and I. Bethus (2023). "Episodic Memory formation: A review of complex Hippocampus input pathways." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 126: 110757.

Endres, T. and M. Fendt (2009). "Aversion- vs fear-inducing properties of 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline, a component of fox odor, in comparison with those of butyric acid." *J Exp Biol* 212(Pt 15): 2324-2327.

Fellini, L. and F. Morellini (2013). "Mice create what-where-when hippocampus-dependent memories of unique experiences." *J Neurosci* 33(3): 1038-1043.

Jäncke, L. (2017). *Lehrbuch kognitive Neurowissenschaften*, Hogrefe, S. 417-421.

Kim, G., M. Kwon, W. Kang and S. H. Lee (2021). "Is Reconsolidation a General Property of Memory?" *Front Hum Neurosci* 15: 643106.

Laska, M., M. Fendt, A. Wieser, T. Endres, L. T. Hernandez Salazar and R. Apfelbach (2005). "Detecting danger--or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals." *Physiol Behav* 84(2): 211-215.

Nader, K. (2015). "Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(10): a021782.

Nader, K., G. E. Schafe and J. E. LeDoux (2000). "The labile nature of consolidation theory." *Nat Rev Neurosci* 1(3): 216-219.

Pichlmeier, O., E. Caner, L. von Kalben, L. M. Grodzki, N. Weigelt, C. Pepe and F. Morellini (2025). "Reconsolidation of episodic-like memory is affected by exposure to the predator odor TMT in mice." *Behav Brain Res* 495: 115817.

Schwabe, L., K. Nader and J. C. Pruessner (2014). "Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance." *Biol Psychiatry* 76(4): 274-280.

6. Abkürzungsverzeichnis

BA	Butyric acid
CA	Cornu Ammonis
CORT	Corticosteron
CRC	Collaborative Research Center
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DG	Dental Gyrus
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fem	Female
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
Mif	Mifepriston
NaCl	Natriumchlorid
React	Reactivation
TMT	2,4,5-Trimethylthiazolin

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1

Mouse number	CA1	CA2	CA3	DG	Grand Total
Day 1 Fem	1021	11	1403	2095	4530
26364	258	1	253	340	852
26369	232	4	334	573	1143
26389	213	1	294	470	978
26394	194	2	312	370	878
26399	124	3	210	342	679
Day 1 No Fem	1396	22	1608	1888	4914
26354	357	10	355	301	1023
26359	407	3	239	408	1057
26374	214	1	305	384	904
26379	195	3	359	453	1010
26384	223	5	350	342	920
Grand Total	2417	33	3011	3983	9444

Anzahl der c-fos positiven Zellen in den Gruppen „Day 1 Fem“ und „Day 1 No Fem“.

Die Tabelle zeigt die absolute Anzahl an c-fos positiven Zellen in den zwei Gruppen. Pro Gruppe wurden fünf Mausgehirne analysiert. Dabei wurde der dorsale Hippocampus im gesamten (Spalte „Grand Total“) und in seinen strukturellen Untereinheiten (CA1, CA2, CA3 und DG für Gyrus dentatus) ausgezählt. Ein signifikanter Unterschied war zwischen den Gruppen nicht zu finden.

8. Erklärung des Eigenanteils

Die Konzeptualisierung und Planung der Studie erfolgten durch Dr. Fabio Morellini und meine Person. In Vorbereitung für das Forschungsprojekt habe ich eine eigenständige umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt. Folgende Experimente wurden durch mich durchgeführt und ausgewertet: „Open-Field Test“, „Y-maze“, „One Trial Spatial Learning Test“ und „Water Maze Test“ in verschiedenen Ausführungen samt Stressinduktion mit TMT, ELISA für Corticosteron, Bearbeitung von Gehirnschnitten mit Vibratome, c-fos Antikörperfärbung und Auswertung mit Konfokalmikroskop. Unterstützt wurde die Datenerhebung durch Nicole Weigelt, Chiara Pepe, Levi von Kalben, Lynn Michelle Grodzki und Ebru Caner.

Die pharmakologischen Experimente mit Mifepriston und der intraperitonealen Applikation von Kortikosteron wurden von Ebru Caner und Dr. Fabio Morellini durchgeführt.

Das Manuskript der Originalpublikation wurde durch Dr. Fabio Morellini und mich gemeinsam erstellt. Alle in der Publikation aufgeführten Ko-Autoren führten vor Einreichung ein kritisches Proof- Reading des Manuskripts durch.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Rosenheim, 23.10.2025

Ort, Datum

Unterschrift

10. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Betreuer Dr. Fabio Morellini für die vorbildliche Haltung gegenüber wissenschaftlichem Arbeiten und der Unterstützung meiner Doktorarbeit. Ich habe enorm viel von dir lernen dürfen und du standest während des gesamten Projekts hilfsbereit an meiner Seite, selbst in sehr anstrengenden und herausfordernden Lebensphasen. Das weiß ich sehr zu schätzen und nehme deine klaren Ansichten zu richtigem wissenschaftlichem Arbeiten mit auf meinen weiteren Lebensweg.

Auch möchte ich Prof. Dr. Thomas Oertner dafür danken, mein Promotionsvorhaben als Doktorvater zu begleiten.

Großer Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem assoziierten Graduiertenkolleg SFB 936 „Multi-Site Communication in the Brain“. Dank Vernetzung mit anderen Forschenden lernte ich neue wissenschaftliche Methoden und Projekte kennen und durfte mich mit den Seminarangeboten auch über mein eigenes Projekt hinaus weiterbilden. Die finanzielle Förderung erlaubte mir, mich ganz meinem Projekt zu widmen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der AG Verhaltensbiologie bedanken, mit denen ich täglich zusammengearbeitet habe, Ideen austauschen durfte und Freude am wissenschaftlichen Arbeiten teilte. Danke Ebru, Chiara, Aadyasha und Levi, es war eine tolle Zeit! Danke auch an Lynn und Nicole, die vor meiner Zeit im Labor wichtige Daten gesammelt haben. Danke an die technischen Assistenten Stefan und Kathrin, die für jede Frage offen und hilfsbereit waren.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie bedanken, die mich während der gesamten Zeit und darüber hinaus unterstützt.