

Verhaltensphysiologische und neurochemische Untersuchungen zur Rolle von Adenosin im Nukleus akkumbens der Ratte

Von der Fakultät der Geo- und Biowissenschaften der
Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Jens Nagel

aus

Hamburg

Hauptberichter: Prof. Dr. Wolfgang Hauber

Mitberichterin: Prof. Dr. Franziska Wollnik

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2003

Biologisches Institut der Universität Stuttgart

2003

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
3	ABSTRACT	8
4	EINLEITUNG	10
4.1	Übersicht	10
4.2	Adenosin	11
4.2.1	Das Nukleosid Adenosin	11
4.2.2	Adenosin-Rezeptoren im Zentralnervensystem	12
4.2.3	Liganden von Adenosin-Rezeptoren	14
4.2.4	Wirkung von Adenosin auf Rezeptorebene	16
4.2.5	Interaktionen zwischen Adenosin- und Dopamin-Rezeptoren auf zellulärer Ebene	20
4.2.6	Regulation der extrazellulären Konzentration von Adenosin	22
4.2.7	Faktoren die zur Veränderung der extrazellulären Gewebekonzentration von Adenosin führen	27
4.2.8	Effekte der Neuromodulation durch Adenosin-Rezeptoren	29
4.3	Der Nukleus akkumbens - ein Kerngebiet der Basalganglien	31
4.3.1	Die Substrukturen des Nukleus akkumbens	32
4.3.2	Afferente und efferente Verbindungen des Nukleus akkumbens	33
4.4	Motiviertes Verhalten	33
4.4.1	Die Funktion von motiviertem Verhalten	34
4.4.2	Steuerung von motiviertem Verhalten durch die limbische Funktionsschleife	35
4.5	Einfluss der dopaminergen Neurotransmission im Nukleus akkumbens auf die Verhaltenssteuerung	38
4.5.1	Verhaltens-effekte durch pharmakologisch veränderte dopaminerge Neurotransmission im Nukleus akkumbens	39
4.5.2	Erhöhung der dopaminergen Neurotransmission durch biologisch relevante Stimuli im Nukleus akkumbens	40
4.5.3	Beteiligung der dopaminergen Neurotransmission an der Verarbeitung von Schreckreizen im Nukleus akkumbens	41
4.6	Einfluss der Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf Verhaltenssteuerung	42
4.7	Zielsetzung der durchgeführten Arbeiten	44

5	KURZBESCHREIBUNG DER VERWENDETEN METHODEN	46
5.1	Intrazerebrale Mikroinfusion	46
5.2	Verhaltenstests nach Mikroinfusionen in den Nucleus accumbens	49
5.2.1	Untersuchung der Spontanaktivität (<i>open-field</i> Experiment)	49
5.2.2	Untersuchung des Fressverhaltens	50
5.2.3	Untersuchung der Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion der Ratte	51
5.3	Prinzip der Mikro dialyse	53
5.3.1	Applikation von Pharmaka in den Nucleus accumbens mittels reverser Mikro dialyse	54
5.3.2	Messung der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc mithilfe der Mikro dialyse-Technik	55
5.4	Analyse von extrazellulärem Adenosin durch Mikro dialyse mit anschließender Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion	58
6	DURCHGEFÜHRTE ARBEITEN	60
6.1	Übersicht	60
6.2	Effects of an Adenosine A _{2A} Receptor Blockade in the Nucleus Accumbens on Locomotion, Feeding, and Prepulse Inhibition in Rats	61
6.3	Effects of Salient Environmental Stimuli on Extracellular Adenosine Levels in the Rat Nucleus Accumbens Measured by In Vivo Microdialysis	88
6.4	Reverse Microdialysis of Dopamine D ₁ and D ₂ Receptor Antagonists Alters Extracellular Adenosine Levels in the Rat Nucleus Accumbens	96
6.5	Effekte biologisch relevanter Stimuli auf den extrazellulären Gehalt von Adenosin und Dopamin im Nucleus accumbens der Ratte	116
6.6	Die lokale Applikation von Amphetamin und Kokain hat keinen signifikanten Einfluss auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt im Nucleus accumbens der Ratte	134
7	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	144
7.1	Beteiligung der Adenosin A _{2A} Rezeptoren im NAc an der Kontrolle von Fressverhalten, Spontanaktivität und sensomotorischen Filtermechanismen	145
7.2	Biologisch bedeutsame Stimuli bewirken keine physischen Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc	146
7.3	Blockade der Dopamin D ₂ Rezeptoren im NAc führt zu einem signifikanten Ansteigen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes	149

Inhaltsverzeichnis	5
7.4 Schlussfolgerungen für die Bedeutung von Adenosin im NAc	150
8 LITERATURVERZEICHNIS DER KAPITEL 4, 5 UND 7	155
9 DANKESWORTE	177
10 LEBENSLAUF	179

2 Abkürzungsverzeichnis

A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	Subtypen von Adenosin-Rezeptoren
Abb	Abbildung
aCSF	künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
ADA	Adenosindeaminase
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
AK	Adenosin-Kinase
ASR	<i>acoustic startle response</i>
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
ANOVA	Varianzanalyse
cAMP	zyklisches AMP
CMA	Firmenname
CPu	Caudatus-Putamen
CREP	<i>Ca²⁺-responsive-element binding protein</i>
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
D ₁ , D ₂	Subtypen von Dopamin-Rezeptoren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EP	entopedunkularer Nukleus
FEP	Perfluorethylenpropylen-Copolymer
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
G _i	G-Protein inhibierend
G _o	Olfaktorisches G-Protein (stimulierend)
G _s	G-Protein stimulierend
HPLC	<i>High-Performance-Liquid-Chromatography</i> Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
IEG	<i>immediate-early genes</i>
IP ₃	Inositol-Tri-Phosphat
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
MEZ	Mitteuropäische Zeit
MSX-3	Vorläufersubstanz von MSX-2
MSX-2	Adenosin A _{2A} Rezeptor Antagonist

NAC (NAC)	Nukleus akkumbens
NACc	Nukleus akkumbens <i>core</i>
NACs	Nukleus akkumbens <i>shell</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P ₁ , P ₂	Subtypen von Purin-Rezeptoren
PFC	präfrontaler Kortex
PLC	Phospholipase C
PPI	<i>prepulse inhibition</i>
RP	<i>reversed-phase</i> ; Umkehrphase
SAH	S-Adenosylhomocystein
SCH23390	Dopamin D ₁ Rezeptor Antagonist
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNR	Substantia nigra pars reticulata
Tab	Tabelle
VP	ventrales Pallidum
VTA	ventrales tegmentales Areal
ZNS	Zentralnervensystem

Fremdsprachliche Ausdrücke sind durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

3 Abstract

The purine nucleoside adenosine is an important modulator of neuronal activity through actions on four distinct G-protein coupled cell-surface receptors termed as A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 receptors. Extracellular adenosine originates from degradation of vesicularly released purine nucleotides and from intracellular adenosine released by a transmembrane transport out of the cell. Neuromodulation by adenosine plays a crucial role in the basal ganglia, a group of interconnected forebrain nuclei. The nucleus accumbens (NAc), a subregion of the ventral striatum, is a key component of the basal ganglia, involved in motivation and reward. In the NAc, A_{2A} receptors are expressed with high density and have been implicated in selection and execution of adaptive behaviour.

The NAc subserves in particular behaviours governed by natural rewards, i.e. feeding or exploration and has been implicated in control of prepulse inhibition (PPI), a measure of sensorimotor gating. The first experiment of the present study sought to determine whether a tonic stimulation of adenosine A_{2A} receptors in the rat NAc is involved in control of spontaneous locomotor activity, feeding behaviour and PPI. To this end bilateral microinfusions of a prodrug (MSX-3) (3 μg and 5 μg in 1 μl per side) of the selective A_{2A} receptor antagonist MSX-2 or vehicle (1 μl per side) were administered into the NAc. Results show that blockade of intra-NAc adenosine A_{2A} receptors by a high (5 μg), not by a low (3 μg), dose of MSX-3 increased locomotor activity in an open field, reduced food intake and delayed intake onset in food deprived rats examined in a test cage with standard laboratory chow. Furthermore PPI was significantly disrupted after intra-NAc infusion of 5 μg , but not of 3 μg , MSX-3. These findings suggest that locomotor activity as well as intact PPI and feeding behaviour rely on tonic activation of intra-NAc A_{2A} receptors. The data add further support to the view that adenosine is a tonically active modulator of striatal function through actions on A_{2A} receptors.

The NAc subserves behaviour governed by salient stimuli in the environment, but it is unknown whether such stimuli and the behavioural effects elicited are associated with changes of extracellular adenosine levels in the NAc. In order to further characterise the neuromodulatory actions of adenosine, the second experiment of the present study investigated effects of four prototypical stimuli known to involve NAc processing on extracellular levels of adenosine in the nucleus accumbens. Using *in vivo* microdialysis, the following stimuli were examined: (1) an appetitive, unfamiliar stimulus (palatable food), (2) an appetitive, familiar stimulus (standard laboratory food), (3) an aversive stimulus (handling)

and (4) a novelty stimulus (cage change). Results revealed that neither of these stimuli significantly changed extracellular adenosine levels in the NAc. These findings demonstrate that accumbal extracellular adenosine is not responsive to a number of prototypical salient stimuli in the environment. Thus the data provide no clues to suggest that transient changes of extracellular adenosine in the nucleus accumbens modulate behavioural responses governed by these stimuli.

Although a precise regulation of extracellular levels of adenosine in the NAc is probably essential, the detailed physiological mechanisms are still elusive. Recent evidence suggests that modulation of dopaminergic transmission alters striatal levels of extracellular adenosine. Therefore the third experiment of the present study used reverse microdialysis of the selective dopamine receptor antagonists raclopride and SCH23390 to investigate whether a blockade of dopamine D₁ or D₂ receptors modifies extracellular adenosine concentrations in the NAc. Results reveal that perfusion of raclopride produced an increase of dialysate adenosine which was significant with a high (10 mM) and intermediate (1 mM) drug concentration, but not with lower drug concentrations (10 µM, 100 µM). Perfusion of SCH23390 (10 µM, 100 µM, 1mM) did not significantly elevate dialysate adenosine concentrations in the nucleus accumbens, only the highest concentration (10 mM) produced a massive increase. The main finding of this experiment is that a selective blockade of dopamine D₂ receptors in the NAc produced a pronounced increase of extracellular adenosine. The cellular mechanisms underlying this effect are yet unknown. It is suggested that the increase of extracellular adenosine might be related to a homeostatic modulatory mechanism proposed to be a key function of adenosine in response to neuronal metabolic challenges.

Taken together, the present studies provide evidence for the notion that adenosine by tonic activation of A_{2A} receptors in the nucleus accumbens is involved in control of behaviour governed by natural rewards, i.e. locomotion and feeding as well as sensorimotor gating. Furthermore, the present results reveal that transient changes of extracellular adenosine in the nucleus accumbens are probably not involved in modulation of behavioural responses governed by biologically significant stimuli, such as novelty or stress. This contrasts with actions of dopamine, another major neuromodulator of the nucleus accumbens, which plays in functional terms a role opposite to adenosine. Rather, it seems that extracellular levels of adenosine appear to augment with increasing neuronal activity in the nucleus accumbens. The precise cellular mechanisms underlying this effect are yet unknown. The increase of extracellular adenosine in the NAc might reflect the homeostatic modulatory role proposed to be a key function of adenosine in response to neuronal metabolic challenges.

4 Einleitung

4.1 Übersicht

In vorliegenden Arbeiten werden verschiedene Aspekte der Rolle des Neuromodulators Adenosin bei der Steuerung von Verhalten bei Ratten untersucht. Zu Beginn der Einleitung wird zunächst das Molekül Adenosin mit seinen vielfältigen biologischen Funktionen vorgestellt. Anschließend folgt eine Abhandlung über die Wirkungsweise von Adenosin im Zentralnervensystem (ZNS) und deren Regulation auf zellulärer Ebene. In diesem Zusammenhang werden die Kenntnisse über die zellulären Wechselwirkungen zwischen Adenosin und dem Neurotransmitter Dopamin dargestellt. Dopamin ist, wie im weiteren Verlauf der Einleitung erläutert wird, ein chemischer Botenstoff, der maßgeblich an der Steuerung von motiviertem Verhalten beteiligt ist. Die allgemeine Vorstellung des Neuromodulators Adenosin schließt mit den aktuellen Hypothesen zu dessen möglicher physiologischer Bedeutung.

Der zweite Abschnitt der Einleitung widmet sich dem Nucleus accumbens (NAc). Dieser bildet als Bestandteil des Striatums einen Teil der Basalganglien. Ein wichtiger Modulator der Aktivität der Neurone im NAc ist das Dopamin. Der Darstellung über die neuronale Einbindung des NAc folgt ein Überblick über die Hypothesen zur Bedeutung des Dopamin-Signals im NAc bei der Verhaltenssteuerung.

Anschließend wird dargestellt, welchem neuronalen System die Steuerung motivierten Verhaltens zugeschrieben wird und wie der NAc als wesentlicher Vermittler zwischen dem System der Motivationsgenerierung (limbische Funktionsschleife) und dem System der motorischen Steuerung eingebunden ist.

Im letzten Abschnitt der Einleitung werden die bisherigen Erkenntnisse über die Bedeutung der Neuromodulation durch Adenosin-Rezeptoren im NAc bei der Verhaltenssteuerung vorgestellt. Vor diesem Hintergrund werden dann die offenen Fragen zur Rolle von Adenosin-Rezeptoren im NAc bei der Verhaltenssteuerung und zu deren Interaktion mit der dopaminergen Neurotransmission dargelegt, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

4.2 Adenosin

4.2.1 Das Nukleosid Adenosin

Adenosin gehört zu der Stoffgruppe der Nukleoside. Es besteht aus der Purinbase Adenin, die mit einer Ribose verknüpft ist (Abb. 1). Purine werden als Nahrungsbestandteile aufgenommen, vom Körper über einen Syntheseweg neu gebildet oder über die sog. *Salvage Pathways* (spezifische Purinstoffwechsel-Wege) aus den Produkten des Purin-Katabolismus zurück gewonnen (Zöllner *et al.*, 1996). Es handelt sich bei Adenosin um ein Molekül, das ubiquitär anzutreffen ist. Es übt mit geringen Modifikationen unterschiedlichste Funktionen in biologischen Systemen aus. So handelt es sich z.B. bei einer desoxygenierten Form des Adenosins um eines der vier Nukleotide, mit denen die Erbinformation fast aller Lebewesen als Desoxy-Ribo-Nukleinsäure (DNA) kodiert ist. Adenosin-Tri-Phosphat (ATP), ein dreifach phosphoryliertes Adenosin, ist der wichtigste Energieträger im Zellmetabolismus des Organismus. Zyklisches AMP (cAMP) ist als *second messenger* Molekül ein wichtiger Bestandteil von Signaltransduktionsketten in Zellen. Adenin ist außerdem ein Baustein von wichtigen Coenzymen im Tier- und Pflanzenreich.

Adenosin ist als Molekül intra- und extrazellulär nachweisbar. Wenn es im Interstitium vorliegt, kann Adenosin als Signalmolekül über die Bindung an spezifische membranständige Rezeptoren die Aktivität von Zellen modulieren. Diese Rezeptoren bilden die Familie der Purin-Rezeptoren. Sie werden in die 2 Subklassen P₁ und P₂ unterteilt (Abb. 2). Zu der Subklasse P₁ gehören 4 Subtypen, die A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ Rezeptoren, an die Adenosin mit unterschiedlich ausgeprägter Affinität spezifisch bindet (Fredholm *et al.*, 1994), während die P₂ Rezeptoren ATP als endogenen Liganden aufweisen (Ralevic and Burnstock, 1998). Die P₁-Rezeptoren weisen als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sieben Transmembran-Helices auf. Je nach Kopplung übertragen sie Signale über inhibierende oder stimulierende G-Proteine (Tab. 1) zur Initiation unterschiedlicher Transduktionsmechanismen (Dunwiddie and Masino, 2001). Die Modulation von Zellaktivität durch die Stimulierung von Adenosin-Rezeptoren ist im Organismus von Mensch und Tier ein weit verbreiteter Mechanismus. Daher ist es nicht verwunderlich, dass extrazelluläres Adenosin so auf eine Vielzahl biologischer Prozesse einwirkt. Ralevic und Burnstock (1998) fassten Ergebnisse von Studien zusammen, in denen gezeigt werden konnte, dass Adenosin diverse biologische Funktionen ausfüllt. Im Folgenden wird eine Auswahl aufgeführt: Reduktion der Kontraktion der glatten Muskulatur, Verminderung der renalen Sekretion, Reduzierung der Ausschüttung von Mediatoren der Immunantwort, Absenkung des Blutdrucks durch Vasodilatation, Dämpfung der

Herztätigkeit, Beeinflussung der Konstriktion der Atemwege und Modulation der Neurotransmission. Im Mittelpunkt der weiteren Betrachtungen soll die Modulation der Neurotransmission durch Adenosin im Zentralnervensystem stehen.

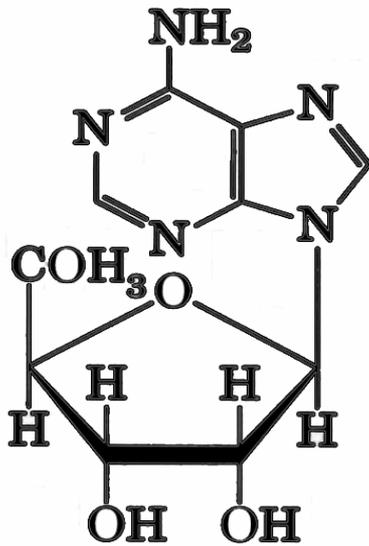


Abb. 1: Strukturformel von Adenosin.

4.2.2 Adenosin-Rezeptoren im Zentralnervensystem

Im ZNS werden mit dem A₁ und dem A_{2A} Rezeptor zwei P₁ Rezeptorsubtypen mit hoher Affinität zu Adenosin (Tab. 1) exprimiert. Ochiishi *et al.* (1999) wiesen den A₁ Rezeptor im gesamten Vorderhirn in sehr hoher Dichte durch eine immunhistologische Analyse mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper nach. Die elektronenmikroskopische Analyse der selektiv markierten A₁ Rezeptoren ergab, dass diese sowohl postsynaptisch als auch präsynaptisch lokalisiert sind (Ochiishi *et al.*, 1999). Eine besonders hohe Dichte von A₁ Rezeptoren konnte in früheren Studien im Hippokampus, Kortex und Zerebellum ermittelt werden (Übersicht in Fredholm *et al.*, 1994).

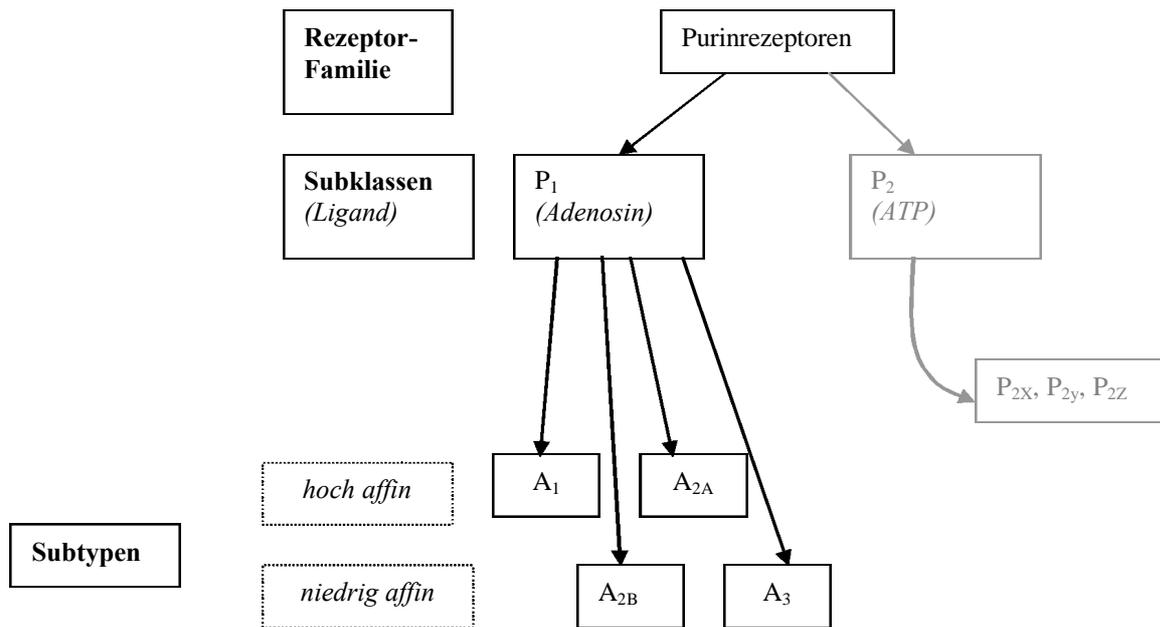


Abb. 2: Die Adenosin-Rezeptoren in der Purinrezeptor-Familie.

Im Gegensatz dazu scheinen A_{2A} Rezeptoren im Wesentlichen auf das dorsale Striatum (Caudatus-Putamen (CPu)) und das ventrale Striatum (NAc, olfaktorischer Tuberkel) beschränkt zu sein (Abb. 3.1 und 3.2) (Ongini and Fredholm, 1996; Rosin *et al.*, 1998). Der Großteil der A_{2A} Rezeptoren wird somatodendritisch exprimiert (Rosin *et al.*, 1998; Svenningsson *et al.*, 1999b). Studien hatten durch *in situ* Hybridisierung gezeigt, dass deren Lokalisation ausschließlich auf einer bestimmten Gruppe von Projektionsneuronen des Striatums (*medium-sized spiny neurons*) nachzuweisen war. Diese Subpopulation striataler Neurone ist durch die Expression des Neuropeptids Enkephalin gekennzeichnet (Schiffmann *et al.*, 1991). Es ist zur Zeit noch umstritten, ob und in welchem Ausmaß Adenosin A_{2A} Rezeptoren auf cholinergen Interneuronen des Striatums exprimiert werden (Richardson *et al.*, 1997; Fredholm and Svenningsson, 1998; Mori and Shindou, 2000; Richardson *et al.*, 2000; Richardson and Kurokawa, 2000).

Adenosin A_{2B} und A_3 Rezeptoren sind in geringer Dichte im ZNS weit verbreitet (Ralevic and Burnstock, 1998). Auch auf Astrozyten nachgewiesene A_2 Adenosin-Rezeptoren sind zum Großteil vom A_{2B} Subtyp (Sebastiao and Ribeiro, 2000). Da keine hochselektive Liganden für die A_{2B} und A_3 Rezeptorsubtypen vorliegen, ist ihre Bedeutung im ZNS heute noch weitgehend unklar (Dunwiddie and Masino, 2001). Die Affinität dieser Rezeptorsubtypen für Adenosin ist sehr gering, so dass ihre Aktivierung durch den niedrigen physiologischen Basalwert (siehe 4.2.7) des extrazellulären Adenosins unwahrscheinlich ist. Es hat sich aber

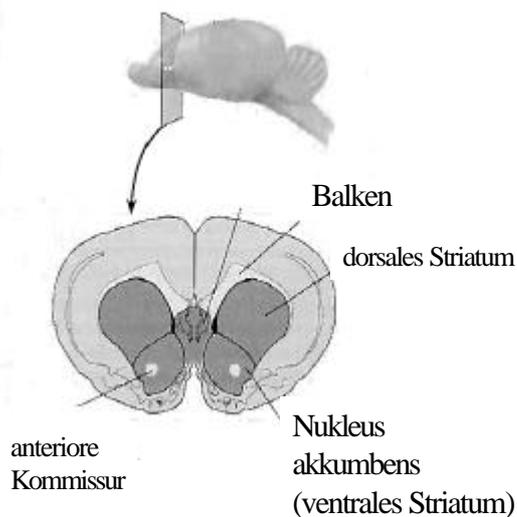


Abb. 3.1: Lokalisation des dorsalen Striatums (CPu) und des NAc im Frontalschnitt eines Rattenhirns; modifiziert nach Carlson (2001).

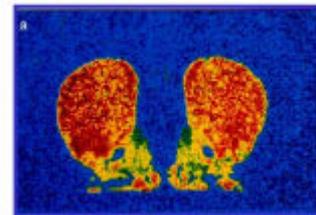


Abb. 3.2: Markierung von hochaffinen Bindungsstellen für den selektiven Adenosin A_{2A} Rezeptor Agonisten CGS21680 im Frontalschnitt eines Rattenhirns. Rotfärbung bedeutet die höchste Dichte A_{2A} Rezeptoren; aus Ongini and Fredholm (1996).

zeigt, dass es unter pathologischen Bedingungen zu einem dramatischen Anstieg des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im ZNS kommt (Deckert and Gleiter, 1994; Melani *et al.*, 1999b). Daher nimmt man an, dass die A_{2B} und A_3 Rezeptoren bei pathophysiologischen Zuständen eine Rolle spielen könnten, wobei ihre Bedeutung im Einzelnen jedoch noch nicht geklärt ist (Rudolphi and Schubert, 1997; von Lubitz, 1999; Cunha, 2001).

4.2.3 Liganden von Adenosin-Rezeptoren

Moleküle, die sich spezifisch an Rezeptoren anlagern und dadurch Reaktionen auslösen, werden als Liganden bezeichnet. Diese Moleküle können endogene Signalstoffe (natürliche Liganden), aber auch dem Organismus zugeführte Stoffe wie Pharmaka sein. Man unterscheidet Liganden, die durch ihre Anlagerung Rezeptoren aktivieren (Agonisten), von denen, die diese blockieren (Antagonisten) (Übersicht in Carlson, 2001). Künstliche Liganden, die selektiv spezifische Rezeptoren blockieren oder aktivieren sind wichtige Werkzeuge zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von Rezeptoren (Fredholm and Lindstrom, 1999). Über die Beeinflussung der Rezeptoraktivität durch Adenosin-Rezeptor-Liganden ergeben sich möglicherweise therapeutische Ansätze für die Behandlung von Krankheiten. So erhofft man sich über die selektive Aktivierung von A_1 Rezeptoren neue

therapeutische Ansätze für die Behandlung von Epilepsie (Berman *et al.*, 2000; Dunwiddie and Masino, 2001) und Schlaganfall (Deckert and Gleiter, 1994; Chen *et al.*, 1999; Melani *et al.*, 1999b) sowie über die Modulation der Aktivität von A_{2A} Rezeptoren für die Behandlung von Morbus Parkinson (Kanda *et al.*, 1998b; Mally and Stone, 1998; Müller *et al.*, 1998; Müller, 2000; Ferre *et al.*, 2001; Hauber *et al.*, 2001; Morelli and Wardas, 2001), Schizophrenie (Ferre *et al.*, 1994; Ferre, 1997; Hauber and Koch, 1997) und weiterer neurologischer Erkrankungen (Sebastiao and Ribeiro, 1996). Ein bekannter, aber sehr unselektiver Antagonist für Adenosin-Rezeptoren ist das Koffein (Fredholm *et al.*, 1998; Nehlig, 1999; Nehlig and Boyet, 2000), dessen psychische Wirkungen durch eine Blockade zentralnervöser Adenosin-Rezeptoren hervorgerufen werden.

Rezeptorsubtyp	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Kopplung	G _i	G _s , G _o	G _s	G _i
Effektoren	cAMP, Ionenkanäle, PLC (?) IP ₃ (?)	cAMP	cAMP	cAMP
Physiologischer Effekt im Gehirn	Inhibiert Transmitterausschüttung; hyperpolarisiert Neurone; moduliert Rezeptor- Eigenschaften	Erhöht Transmitter- ausschüttung; moduliert Rezeptor- Eigenschaften	Unklar	Moduliert Rezeptor- Eigenschaften(?)
Verteilung im Gehirn	Ubiquitär	Konzentriert im Striatum (u. a. NAc)	Weit, in geringer Dichte	Unsicher
Lokalisation bezüglich Dopamin-Rezeptoren (NAc) [#]	Kolokalisation zu D ₁ Typ (G _s gekoppelt)	Kolokalisation zu D ₂ Typ (G _i gekoppelt)	-	-
Affinität zu Adenosin*	3-30 nM	1-20 nM	5-20 nM	>100 nM

Tab. 1: Adenosin-Rezeptoren im ZNS, modifiziert nach Dunwiddie and Masino (2001),

* siehe Fredholm *et al.* (1994), [#] siehe Ferre (1997).

4.2.4 Wirkung von Adenosin auf Rezeptorebene

In diesem Kapitel soll dargestellt werden, welche Auswirkungen die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf zellulärer Ebene im ZNS hat. Extrazelluläres Adenosin entfaltet seine neuromodulatorische Wirkung über die membranständigen Adenosin A_1 und A_{2A} Rezeptoren (Fredholm, 1995). Hier soll verdeutlicht werden, über welche molekularen Mechanismen diese beiden Rezeptortypen die neuronale Aktivität beeinflussen (Tab.1). Dabei ist es wichtig, zwischen grundsätzlich verschiedenen Mechanismen zu unterscheiden, über welche die aktivierten Rezeptoren wirken:

- (1) Einwirkung auf intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden
- (2) Beeinflussung des Membranpotentials
- (3) Modulation von Eigenschaften von Rezeptoren für Transmitter, die mit Adenosin-Rezeptoren kolokalisiert sind.

Die vorliegenden Erkenntnisse über die Mechanismen, die der neuromodulatorischen Wirkung von Adenosin-Rezeptoren zugrunde liegen, wurden in Studien gewonnen, bei denen für den jeweiligen Subtyp der Rezeptoren spezifische Liganden verwendet wurden oder in denen sog. *knock-out* Mäuse eingesetzt wurden, die bestimmte Rezeptoren nicht exprimieren. Die Effekte der Aktivierung von A_1 und A_{2A} Rezeptoren müssen separat betrachtet werden, da sie an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt sind (van Calker *et al.*, 1979). Daraus folgt, dass je nach aktiviertem Rezeptor-Subtyp entgegen gesetzte Wirkungen in den nachgeschalteten Signalsystemen auftreten.

Adenosin A_1 Rezeptor

Der A_1 Rezeptor ist an G_i - oder G_o -Protein gekoppelt und bewirkt bei seiner Aktivierung eine verminderte Adenylatzyklase-Aktivität, wodurch es zu einer Hemmung der Bildung des *second messenger* Moleküls cAMP kommt (Richardson and Kurokawa, 2000). Über diesen Einfluss auf die Signaltransduktion kann es z.B. zu einer reduzierten Gen-Transkription, einer Abnahme der Transmitterausschüttung durch das Neuron und einer Modulation der Wirkung von cAMP-gekoppelten Transmittersystemen kommen (Fredholm, 1995; Ralevic and Burnstock, 1998). Die Aktivierung des Signaltransduktionsweges über Phospholipase C und Inositol-Tri-Phosphat (IP_3) durch den A_1 Rezeptor konnte in Neuronen noch nicht sicher nachgewiesen werden (Ralevic and Burnstock, 1998; Richardson and Kurokawa, 2000), wird jedoch in verschiedenen Modellen postuliert (Sebastiao and Ribeiro, 2000). Eine neue Arbeit lieferte einen ersten Hinweis auf die Mobilisierung von intrazellulär gespeichertem Kalzium über IP_3 -Signaltransduktion durch die Aktivierung von A_1 Rezeptoren. Dieser Effekt wurde in cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns beobachtet (Basheer *et al.*, 2002).

Das Membranpotenzial von Neuronen wird bekanntlich über spezifische Ionenkanäle gesteuert. Durch die Aktivierung des A₁ Rezeptors wurde eine G-Protein gekoppelte Verringerung der Leitfähigkeit von Kalzium-Ionenkanälen in der Membran nachgewiesen, die zu einer reduzierten Transmitterausschüttung führt (Fredholm and Dunwiddie, 1988; Fredholm, 1995). Zusätzlich wurde eine durch das G_i-Protein vermittelte Erhöhung der Leitfähigkeit von Kaliumkanälen in der Membran beobachtet, die eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran herbeiführt und damit die Feuerrate des Neurons reduziert (Fredholm, 1995; Calabresi *et al.*, 1997; Richardson and Kurokawa, 2000; Dunwiddie and Masino, 2001).

Es besteht Einigkeit darüber, dass durch die Aktivierung von A₁ Rezeptoren die Ausschüttung von Neurotransmittern reduziert wird (Fredholm and Dunwiddie, 1988; Fredholm, 1995; Richardson and Kurokawa, 2000). Davon betroffen ist die Ausschüttung von Azetylcholin, Glutamat, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin und GABA in den Extrazellulärraum (Fredholm and Dunwiddie, 1988; Okada *et al.*, 1996). Dieser Effekt wird überwiegend der oben beschriebenen verringerten Kalziumleitfähigkeit zugeschrieben, die durch die Aktivierung von präsynaptisch lokalisierten A₁ Rezeptoren hervorgerufen wird (Fredholm and Dunwiddie, 1988). Jedoch ist der physiologisch entscheidende Mechanismus, der der präsynaptischen Wirkung von A₁ Rezeptoren zugrunde liegt, noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. So gibt es auch Befunde für Beeinflussungen der Transmitterausschüttung, die unabhängig von Kalzium sind, so dass die Existenz zusätzlicher, noch unbekannter Mechanismen nicht auszuschließen ist (Fredholm, 1995; Cunha, 2001; Dunwiddie and Masino, 2001).

Wie bei (Dunwiddie and Masino, 2001) zusammengefasst, scheint die Inhibition der Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter, speziell von Glutamat, besonders prominent zu sein, während eine reduzierte Freisetzung von inhibitorischen Transmittern, wie GABA, nur selten beobachtet wurde. So erklärt sich, dass durch die Aktivierung der A₁ Rezeptoren in nahezu allen Hirnregionen eine Verminderung der neuronalen Erregbarkeit feststellbar ist (Manzoni *et al.*, 1994; Calabresi *et al.*, 1997; Flagmeyer *et al.*, 1997; Narimatsu and Aoki, 2000; Dunwiddie and Masino, 2001).

Wie bei *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt werden konnte, führt die Aktivierung von A₁ Rezeptoren zu einer Veränderung der Bindungs- und Transduktionseigenschaften von Dopamin D₁ Rezeptoren (Ferre *et al.*, 1998; Ferre *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2000; Gines *et al.*, 2000; Salim *et al.*, 2000). Dazu müssen Adenosin- und der jeweilige Dopamin-Rezeptor auf der gleichen Zelle kolokalisiert sein. Direkte Interaktionen zwischen den membranständigen Rezeptoren scheinen den modulatorischen Effekt des A₁ Rezeptors auf die

Rezeptoreigenschaften des D₁ Rezeptors zu bewirken (Fuxe *et al.*, 1998; Ferre *et al.*, 1999; Gines *et al.*, 2000). Zusätzlich zu der direkten Rezeptor-Interaktion ergibt sich auch ein Einfluss der Aktivierung des A₁ Rezeptors auf die Signaltransduktion des D₁ Rezeptors (G_s-Protein gekoppelt), da seine stimulierende Wirkung auf die Bildung von cAMP über die inhibitorische Wirkung des G_i-Proteins vom A₁ Rezeptor auf die Adenylatzyklase reduziert wird (Ferre *et al.*, 1998). Auf diese Wechselwirkung wird unten in einem gesonderten Kapitel speziell eingegangen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Aktivierung von A₁ Rezeptoren auf zellulärer Ebene zu einer Inhibition der neuronalen Aktivität führt (Dunwiddie and Masino, 2001). Nach den Ergebnissen einer Studie mit A₁ *knockout*-Mäusen wird eine essentielle Rolle der A₁ Rezeptoren für Entwicklungsprozesse und für physiologische Funktionen unter Normalbedingungen angezweifelt, während deren große Bedeutung bei der Bewältigung pathophysiologischer Vorgänge unterstrichen wird (Johansson *et al.*, 2001). Diese Interpretation beruht auf der Beobachtung, dass Tiere ohne A₁ Rezeptoren unter Normalbedingungen keine physiologischen Auffälligkeiten aufwiesen, Hypoxie bei diesen aber eine erheblich höhere Mortalitätsrate bewirkte als bei Tieren vom Wildtyp. Andere Autoren sind hingegen der Ansicht, dass die Wirkung der A₁ Rezeptoren auf einen inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus hinweist, über den der Energiebedarf von Gewebe unter pathophysiologischen, aber auch physiologischen Bedingungen reduziert wird, um so das homöostatische Gleichgewicht zu erhalten (Benington and Heller, 1995; Cunha, 2001). In Einklang mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, dass es in Gewebe, das durch Hypoglykämie (Calabresi *et al.*, 1997; Jin and Fredholm, 1997b) oder Hypoxie (Jin and Fredholm, 1997a) gestresst wird, zu einem Anstieg des extrazellulären Adenosins kommt. Über diesen Mechanismus erklärt man sich auch die beobachtete Neuroprotektion durch Adenosin, die zu einer Verringerung einer toxisch wirkenden Dauererregung führt, welche durch eine pathologisch erhöhte Glutamatausschüttung verursacht wird. Passend dazu zeigte sich, dass die Blockade von A₁ Rezeptoren in metabolisch gestresstem Gewebe neurotoxisch wirkte (Deckert and Gleiter, 1994; Rudolphi and Schubert, 1997; von Lubitz, 1999; de Mendonca *et al.*, 2000; Cunha, 2001).

Adenosin A₂ Rezeptoren

Die Aktivierung von A_{2A} Rezeptoren führt intrazellulär zu einem Ansteigen des cAMP-Gehaltes (van Calker *et al.*, 1979; Fredholm *et al.*, 1994) und verändert die Rezeptoreigenschaften von kolokalisierten D₂ Rezeptoren (Ferre *et al.*, 1991; Rimondini *et al.*, 1999). Dieser Rezeptorsubtyp entfaltet also über zwei der oben genannten Mechanismen,

nämlich die Beeinflussung der Signaltransduktion und der Eigenschaften anderer Rezeptorsysteme, seine Wirkung. Es ist allgemein akzeptiert, dass die stimulierende Wirkung des G_s -Proteins, das an den Rezeptor gekoppelt ist, den beschriebenen Anstieg von cAMP verursacht (Ribeiro, 1999).

Der Einfluss von A_{2A} Rezeptoren auf die Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern scheint im Vergleich zu jenem von A_1 Rezeptoren nachrangig zu sein (Fredholm, 1995; Okada *et al.*, 1996; Svenningsson *et al.*, 1999b). Trotzdem kann durch die Aktivierung von A_{2A} Rezeptoren eine Veränderung der Freisetzung von Azetylcholin, Dopamin, Glutamat und auch GABA (inhibitorisch) beobachtet werden, wobei die Ergebnisse allerdings nicht konsistent sind (Latini *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1996; Svenningsson *et al.*, 1999b; Richardson and Kurokawa, 2000). Der Mechanismus scheint, zum einen wie bei präsynaptisch lokalisierten A_1 Rezeptoren direkt über eine Modulation der Kalziumleitfähigkeit von Ionenkanälen und zum anderen indirekt über intrazelluläre Signaltransduktionssysteme zu funktionieren (Ongini and Fredholm, 1996; Sebastiao and Ribeiro, 1996; Ralevic and Burnstock, 1998; Richardson and Kurokawa, 2000). Jedoch ergibt sich aus der Literatur kein klares Bild, sowohl was die Bedeutung, das Vorzeichen als auch den Mechanismus der Transmitterausschüttung durch die Aktivierung von A_{2A} Rezeptoren angeht (Latini *et al.*, 1996; Ralevic and Burnstock, 1998; Svenningsson *et al.*, 1999b; Richardson and Kurokawa, 2000; Cunha, 2001). Am Beispiel der GABA-Freisetzung sollen die bisher bekannten durch den A_2 Rezeptor vermittelten Wirkungen aufgezeigt werden: Sowohl durch *in vivo* (Ferre *et al.*, 1994) als auch *in vitro* (Cunha and Ribeiro, 2000) Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps zu einer verstärkten Ausschüttung von GABA führt. Allerdings ergaben andere *in vitro* Studien Hinweise auf ein Absinken des extrazellulären GABA-Gehaltes nach Applikation des spezifischen Adenosin A_{2A} Rezeptor Agonisten CGS21680 (Svenningsson *et al.*, 1999b). Svenningsson und Kollegen versuchen einen Teil dieser widersprüchlichen Daten damit zu erklären, dass bei den *in vivo* Arbeiten somatodendritisch lokalisierte und bei den *in vitro* Studien präsynaptisch lokalisierte Adenosin A_{2A} Rezeptoren aktiviert werden (Svenningsson *et al.*, 1999b), d.h. methodische Gründe für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich sind.

Weitere Mechanismen, über die A_{2A} Rezeptoren wirken, sind die bereits beschriebenen direkten Rezeptor-Rezeptor-Interaktion (Sebastiao and Ribeiro, 2000). So gibt es Hinweise, dass die Aktivierung von Adenosin A_{2A} Rezeptoren die Eigenschaften von Glutamatrezeptoren beeinflussten (Ribeiro, 1999; Ferre *et al.*, 2002). Auch eine Interaktion zwischen membranständig kolokalisierten Adenosin A_{2A} und Dopamin D_2 Rezeptoren (Ferre

et al., 1991; Fuxe *et al.*, 1998) konnte in verschiedenen Studien von der Rezeptor- bis zur Verhaltensebene gezeigt werden (Übersicht in Hauber, 2002). Ihre physiologische Bedeutung bleibt aber umstritten (Chen *et al.*, 2001b). Auf diese besonders intensiv untersuchte Interaktion soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

4.2.5 Interaktionen zwischen Adenosin- und Dopamin-Rezeptoren auf zellulärer Ebene

Adenosin-Rezeptoren beeinflussen die Affinität und die Signaltransduktionseigenschaften anderer Rezeptoren (Ferre *et al.*, 1997; Ribeiro, 1999; Rimondini *et al.*, 1999). Als funktionell besonders bedeutsam hat sich die Interaktion zwischen Adenosin- und Dopamin-Rezeptor-Subtypen erwiesen, auf die hier näher eingegangen werden soll. Dopamin-Rezeptoren sind wie die Adenosin-Rezeptoren G-Protein gekoppelt und membranständig. Sie werden nach ihren pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften in zwei Rezeptorfamilien mit mehreren Klassen unterteilt. Diese Familien bestehen aus den D₁ Rezeptoren, die stimulierend auf die Bildung von cAMP wirken und aus den D₂ Rezeptoren, die die cAMP-Bildung inhibieren oder nicht beeinflussen (Vallone *et al.*, 2000). Die Affinitäten von Rezeptoren zu Liganden können mit sog. Kompetitionsstudien untersucht werden. So wurden in derartigen Studien in Membranpräparaten mit kolokalisierten Dopamin D₂ Rezeptoren und Adenosin A_{2A} Rezeptoren Änderungen der Affinitäten der Dopamin-Rezeptoren zu Dopamin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Adenosin A_{2A} Rezeptoren die Affinität der D₂ Rezeptoren zu Dopamin signifikant senkt (Ferre *et al.*, 1991) (Abb. 4). Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Studien, bei denen Zelltypen mit koexprimierten A_{2A} und D₂ Rezeptoren verwendet wurden (Rimondini *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2000; Salim *et al.*, 2000). Hier wurde an striatalen Membranpräparationen und ganzen Zellen das Absinken der Affinität der D₂ Rezeptoren zu Dopamin durch die Aktivierung des A_{2A} Rezeptors reproduziert.

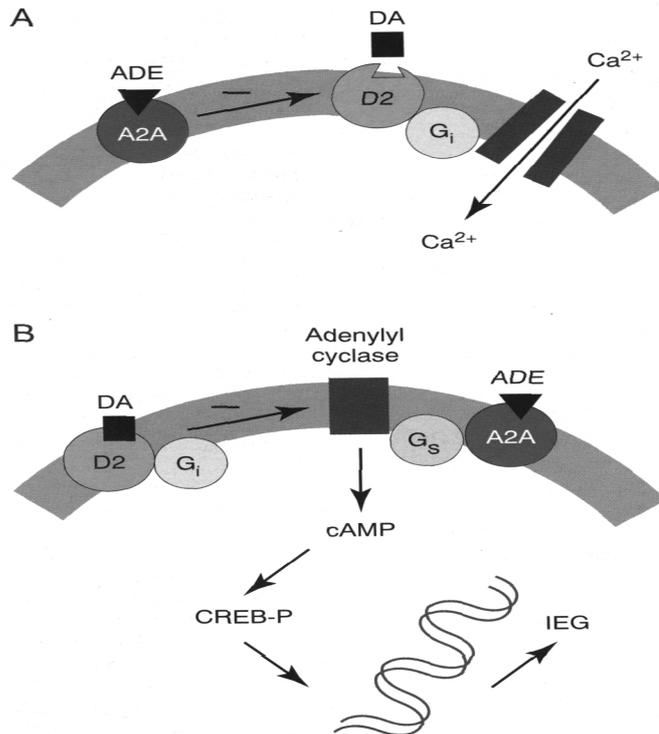


Abb. 4: Mögliche Mechanismen der A_{2A}-D₂ Rezeptor Interaktion auf zellulärer Ebene. (A) Die Aktivierung von A_{2A} Rezeptoren verringert die Affinität von D₂ Rezeptoren zu Agonisten und reduziert so die Modulation von Kalziumkanälen durch D₂ Rezeptoren. (B) Die Aktivierung von A_{2A} Rezeptoren wirkt der Inhibition der Adenylatzyklase durch den D₂ Rezeptor entgegen, wodurch über die Modulation der cAMP-Bildung und der Phosphorylierung des Ca²⁺ responsive element binding protein (CREB) die Expression von *immediate early genes* (IEG) beeinflusst wird. Modifiziert nach Ferre *et al.* (1997).

Eine weitere zellbiologische Arbeit erbrachte den Nachweis, dass es eine ähnliche Interaktion zwischen den Rezeptorsubtypen A₁ und D₁ gibt (Ferre *et al.*, 1998). So reduziert die Aktivierung des A₁ Rezeptors die Affinität des D₁ Rezeptors zu Dopamin.

Weitere, jedoch indirekte Interaktionen zwischen Adenosin- und Dopamin-Rezeptoren finden auf der G-Protein vermittelten Signaltransduktionsebene statt, wenn beide Rezeptortypen auf demselben Neuron exprimiert werden. Dabei wirken die Rezeptoren über ihre intrazellulären Effektormoleküle auf den gemeinsamen Signalverarbeitungsmechanismus, indem sie die Bildung von cAMP stimulieren oder hemmen (Ongini and Fredholm, 1996) (Abb. 4). Auch hier kommt es jeweils zu antagonistischen Wirkungen, die durch die gleichzeitige Stimulierung von A_{2A} und D₂ sowie A₁ und D₁ Rezeptoren induziert werden (Ferre *et al.*, 1997; Ferre *et al.*, 1998; Morelli *et al.*, 2002).

Hinweise auf eine stimulationsabhängige Existenz von Heteroduplex-Strukturen aus kolokalisierten Adenosin A₁ und Dopamin D₁ Rezeptoren in der Membran könnten auf einen

zugrunde liegenden Mechanismus für die beobachteten Wechselwirkungen hindeuten. In einer zellbiologischen Studie (Gines *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, dass Adenosin A₁ Rezeptoren und Dopamin D₁ Rezeptoren über eine nicht näher bekannte Verbindung miteinander assoziiert sind, wenn keine Rezeptoraktivierung durch die jeweiligen Agonisten vorliegt. Diese Komplexe werden als Heteroduplex-Strukturen bezeichnet und sind in einer weiteren Organisationsstufe in *clustern* angeordnet auf der Membran nachgewiesen worden.

Die selektive Aktivierung des A₁ Rezeptors bewirkt eine Zunahme der *cluster*, während die Stimulierung des D₁ Rezeptors zu einer Verringerung der Anzahl der Heteroduplex-Strukturen führte. Bei der gleichzeitigen Stimulierung beider Rezeptoren blieb die Anzahl der Heteroduplex-Strukturen unverändert, es kam aber zu einer Abnahme der *cluster*. Interessanterweise scheinen diese Strukturveränderungen funktionelle Auswirkungen zu haben, da die cAMP Bildung durch eine Aktivierung der D₁ Rezeptoren nach der vorherigen Stimulierung beider Rezeptortypen signifikant reduziert war. Wenn als Vorbehandlung nur jeweils ein Rezeptortyp aktiviert wurde, gab es bei der cAMP Bildung keinen Unterschied zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Daraus wird gefolgert, dass der Dopamin D₁ Rezeptor unter inhibitorischer Kontrolle durch den A₁ Rezeptor stand, wenn beide Rezeptoren gleichzeitig aktiviert wurden und daher die Anzahl der *cluster* reduziert war. Wahrscheinlich kommt es durch die Koaktivierung der Heteroduplex-Struktur über beide Rezeptoren zu einer Entkopplung des G_s-Proteins vom D₁ Rezeptor (Gines *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus stellt eine in der Membran gespeicherte Information zur Modulation der dopaminergen Neurotransmission dar, die durch ein zeitlich bestimmtes Aktivierungsmuster der Rezeptoren hervorgerufen wurde. Es wird spekuliert, ob über die Neuromodulation durch die verschiedenen Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen höhere neurale Funktionen wie Lernen und Gedächtnis etabliert werden könnten (Fuxe *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2000).

Zumindest lassen die Untersuchungen auf zellulärer Ebene den Schluss zu, dass die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren die Wirksamkeit von Dopamin am Dopamin-Rezeptor verringert und zusätzlich eine gegenseitige Abschwächung der Signaltransduktion beider Rezeptortypen vorliegt. Unter welchen physiologischen Bedingungen es jedoch zu einer veränderten Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren durch endogenes Adenosin kommt, wurde bisher noch nicht untersucht und ist eine wesentliche Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

4.2.6 Regulation der extrazellulären Konzentration von Adenosin

Extrazelluläre Signalmoleküle im ZNS unterteilt man in Neuromodulatoren und Neurotransmitter. Ein als Neurotransmitter bezeichnetes Molekül muss per Definition

bestimmte Kriterien erfüllen, wie vesikuläre Ausschüttung, Wirkung über spezifische Rezeptoren und die Existenz eines effektiven Inaktivierungsmechanismus. Da Adenosin nicht vesikulär ausgeschüttet wird, zählt man es zu den Neuromodulatoren und nicht zu den Neurotransmittern.

Die Konzentration von extrazellulärem Adenosin wird über das Zusammenwirken von anabolen und katabolen Mechanismen reguliert (Abb. 5):

- enzymatische Bildung aus Nukleotiden im Extrazellulärraum
- Ausschüttung von intrazellulär gebildetem Adenosin
- enzymatischer Abbau im Extrazellulärraum
- Inaktivierung durch Aufnahme in Glia und Neurone

Die extrazelluläre Bildung von Adenosin ist zu einem Teil abhängig von der Menge des vesikulär ausgeschütteten ATP. Bei ATP handelt es sich um einen Neurotransmitter, der teilweise mit anderen Neurotransmittern (Azetylcholin, Dopamin, Serotonin, Noradrenalin) (Dunwiddie and Masino, 2001) aus gemeinsamen Vesikeln ausgeschüttet wird (Co-Transmission) und P_2 Rezeptoren aktiviert. Über eine Kette von membranständigen Ektoenzymen (Ekto-Nukleotidasen, Ekto-Phosphodiesterasen, Apyrasen) (Zimmermann *et al.*, 1998) werden fast alle extrazellulär vorliegenden Nukleotide (ATP, ADP, AMP, cAMP, Di-Adenosin-Polyphosphate) enzymatisch sehr effizient zu Adenosin umgewandelt (Zimmermann, 1994). So konnte gezeigt werden, dass im Hirngewebeschnitt (*slice*) bereits 50-100 ms nach der iontophoretischen Applikation von ATP die Umwandlung zu Adenosin stattgefunden hat (Dunwiddie *et al.*, 1997). Inhibitorische Effekte, die nach Applikation von ATP beobachtet wurden, konnten zu einem Teil durch die Aktivierung von P_2 Rezeptoren durch ATP und zu einem anderen Teil durch die Aktivierung von P_1 Rezeptoren durch Adenosin erklärt werden. Der zuletzt genannten Wirkung liegt eine Umwandlung des zugeführten ATP zu Adenosin zu Grunde.

An dem extrazellulären Adenosin-Anabolismus sind wahrscheinlich Gliazellen beteiligt, da insbesondere auf ihnen der Nachweis der Ektophosphatasen gelang. Es gibt Hinweise auf einige Mechanismen, die die Bildung von Adenosin im Extrazellulärraum steuern. So wirken hohe Konzentrationen von ATP und ADP inhibitorisch auf die Nukleotidase, die AMP in Adenosin umwandelt. Daher kommt es nach einer hochfrequenten ATP Ausschüttung zunächst zu einer *feed-forward* Inhibition der Ekto-5'-Nukleotidase. Diese bewirkt gemeinsam mit der kontinuierlichen enzymatischen Degradation von ATP und ADP eine Akkumulation von AMP. Wenn durch die Aktivität der Ektoenzyme ein Großteil des ATP über ADP zu AMP umgewandelt worden ist, fällt die Inhibition der Ekto-5'-Nukleotidase

weg, und es kommt zu einer schlagartigen Erhöhung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes (*burst*). Diesem Effekt könnte eine lineare Bildung von Adenosin über eine niedrig-frequente ATP Ausschüttung gegenüberstehen. Es wird spekuliert, dass es, über diese unterschiedliche Arten von Kinetik der Adenosin-Bildung, zur selektiven Aktivierung unterschiedlich stark affiner Adenosin-Rezeptoren kommt, da durch den *burst* lokal und zeitlich begrenzt ungewöhnlich hohe Adenosin-Konzentrationen auftreten, die durch die lineare Bildung von Adenosin nicht erreicht werden (Cunha, 2001; Latini and Pedata, 2001).

Der zweite mögliche Ursprung extrazellulären Adenosins liegt in der Ausschüttung von intrazellulärem Adenosin über einen Nukleosid-Transporter durch erleichterte Diffusion. Dabei wird intrazellulär gebildetes Adenosin dem Konzentrationsgefälle folgend ohne Energieverbrauch über die Pore eines Transportmoleküls durch die Zellmembrane geschleust. Der passive Transport über die Membrane erfolgt in beiden Richtungen (Brundege and Dunwiddie, 1996). Zusätzlich existiert ein aufkonzentrierender Transporter, der unter Nutzung des Natrium-Gradienten über die Zellmembran Adenosin in die Zelle pumpt (Linden, 1994). Dessen Bedeutung bei der Regulation der extrazellulären Adenosin-Spiegel im Gehirn ist noch unklar, da es an selektiven Inhibitoren zur Untersuchung dieses Transporters mangelt. Im Gegensatz dazu besteht die Möglichkeit, den passiven Transporter selektiv zu inhibieren. Dadurch kann man Hinweise über den Ursprung von extrazellulärem Adenosin gewinnen. So kann z. B. ein Anstieg des Adenosin-Gehaltes im Interstitium unter Blockade des Transporters nur über die oben beschriebene Degradation von Nukleotiden im Extrazellulärraum erklärt werden.

Die Menge des über die Membran abgegebenen oder aufgenommenen Adenosins steht in direkter Abhängigkeit zur intrazellulären Adenosin-Konzentration. Dessen Regulation vollzieht sich, soweit bekannt, über folgende Mechanismen: Ein Speicher für Adenosin besteht in S-Adenosylhomocystein (SAH), das reversibel durch (SAH)-Hydrolase zu Adenosin umgewandelt wird (Linden, 1994). Eine weitere Quelle für intrazelluläres Adenosin existiert, ähnlich wie im Extrazellulärraum, aus Nukleotiden, die hier reversibel über die Aktivität zytosolischer Enzyme zu Adenosin degradiert werden. Dabei wird im letzten Schritt durch 5'-Nukleotidase-Aktivität über die Abtrennung der Phosphatgruppe von AMP Adenosin gebildet. Unter basalen Bedingungen ist der intrazelluläre Gehalt an AMP so gering, dass aufgrund des hohen K_m -Wertes des Enzyms nur eine minimale Umsetzung anzunehmen ist (Latini and Pedata, 2001). ATP ist intrazellulär ungefähr um den Faktor 50 höher konzentriert als AMP. Schon eine geringe Umwandlung von ATP zu ADP führt über die Aktivität der Adenylat-Kinase zu einer massiven Bildung von AMP, das dann zu

Adenosin umgewandelt wird (Linden, 1994; Cunha, 2001; Dunwiddie and Masino, 2001). Über den passiven Transport kann dieses Adenosin ausgeschüttet werden und schließlich extrazelluläre Adenosin-Rezeptoren aktivieren.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass einem Anstieg des extrazellulären Adenosin-Gehaltes sowohl die extrazelluläre Bildung des Adenosin aus zuvor ausgeschütteten Nucleotiden als auch die intrazelluläre Bildung mit anschließender passiven Ausschleusung des Adenosins zugrunde liegt.

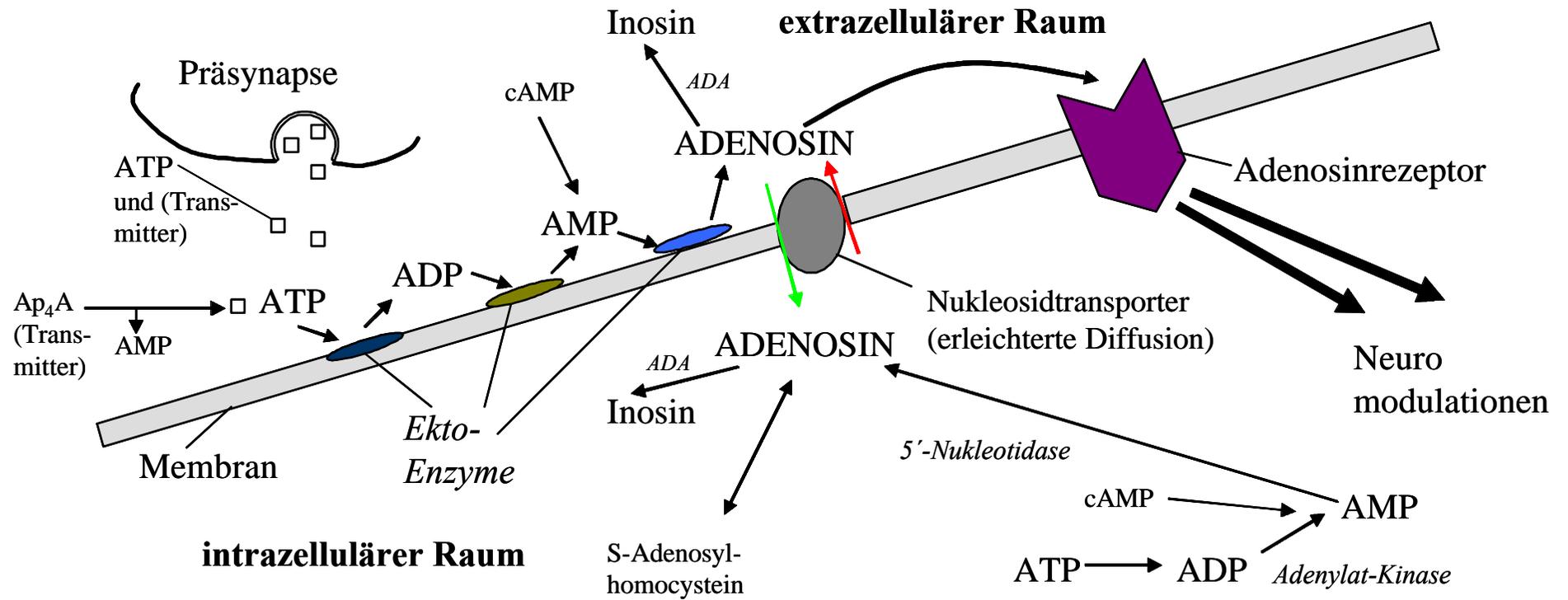


Abb. 5: Adenosin-Metabolismus und-Transport; weitere Erläuterungen im Text.

Der Abbau von Adenosin im Extrazellulärraum erfolgt durch die Umwandlung zu Inosin. Dieser erfolgt über die Aktivität des Enzyms Adenosindeaminase (ADA). Die Existenz von ADA im Zytosol des Gehirns war lange unklar, während es schon umfassende Hinweise für intrazelluläre ADA gab (Latini and Pedata, 2001).

Hauptsächlich erfolgt jedoch die Inaktivierung des extrazellulären Adenosins über die Aufnahme in Neurone und Gliazellen, in denen es durch ADA zu Inosin oder durch Adenosin-Kinase (AK) zu AMP umgewandelt wird (Rathbone, 1999). Die Aufnahme erfolgt über den passiven Nukleosid-Transporter dem Konzentrationsgefälle in das Zellinnere folgend. Die Verteilung von ADA und AK im Gewebe scheinen eine bedeutende Rolle bei der Regulation des extrazellulären Adenosin-Gehaltes unter unterschiedlichen Bedingungen zu spielen (Delaney and Geiger, 1996; Latini and Pedata, 2001). Eine Reihe von Fragen hinsichtlich der Regulation der extrazellulären Adenosin-Konzentration ist noch offen. Beispielsweise ist nicht klar, ob A_1 oder A_{2A} Rezeptoren an der Regulation der Konzentration teilhaben, wie dieses u. a. für das Dopamin-System nachgewiesen worden ist. So führt die Stimulation von D_2 Rezeptoren im Striatum zu einem Absinken der extrazellulären Dopamin-Konzentration (Imperato and Di Chiara, 1988).

Ferner ist unbekannt, ob Hetero-Rezeptoren z. B. mit Dopamin-Rezeptoren an der Regulation der Adenosin-Spiegel beteiligt sind.

4.2.7 Faktoren die zur Veränderung der extrazellulären Gewebekonzentration von Adenosin führen

Adenosin scheint im ZNS extrazellulär in Basalkonzentrationen vorzuliegen (50-200 nM), die nur die hoch-affinen Adenosin-Rezeptoren tonisch aktivieren (Latini and Pedata, 2001). Ein transientes Absinken des extrazellulären Adenosin-Gehaltes durch physiologische Stimuli unter den Basalwert ist bisher nicht beobachtet worden. Lediglich die pharmakologische Inhibition der Natriumkanäle, die zu einem umfassenden Zusammenbrechen der neuronalen Transmission im betroffenen Gewebe führt, reduziert die Adenosin-Konzentration im Interstitium unter die Basalkonzentration (Pazzagli *et al.*, 1993; Dobolyi *et al.*, 2000).

Demgegenüber hat man in pathophysiologischen oder pharmakologischen Studien viele Faktoren identifiziert, die zu massivem Ansteigen der extrazellulären Gewebekonzentration von Adenosin führen (Dunwiddie and Masino, 2001). In ischämischen Gewebebereichen kommt es zu einem Ansteigen der extrazellulären Adenosin-Konzentration bis zu einer Verhundertfachung des Basalwertes (Rudolphi and Schubert, 1997; Rathbone, 1999; von Lubitz, 1999).

In anderen Modellen führte Sauerstoffmangel (Zetterström, 1982; Jin and Fredholm, 1997a; Richter *et al.*, 1999; de Mendonca *et al.*, 2000) oder Glukosemangel (Calabresi *et al.*, 1997; Jin and Fredholm, 1997b) zum Ansteigen der Adenosin-Werte. Neben zerebralen Durchblutungsstörungen und Hirnschlag bewirkt Krampfaktivität im Hippokampus ein hypoxisches Geschehen (Williams, 1998). Auch unter diesen Bedingungen wurde ein Ansteigen der extrazellulären Adenosin-Konzentration hervorgerufen (Berman *et al.*, 2000). Die Ergebnisse aus pharmakologischen Studien belegen einen erhöhten Adenosin-Gehalt im Extrazellulärraum nach:

- Kalium-Depolarisation (Pazzagli *et al.*, 1993; Dobolyi *et al.*, 2000)
- Aktivierung von Glutamatrezeptoren (Craig and White, 1993; Pazzagli *et al.*, 1993; Manzoni *et al.*, 1994; Melani *et al.*, 1999a; Dobolyi *et al.*, 2000)
- Aktivierung von Opiatrezeptoren (Halimi *et al.*, 2000)
- Dauerdepolarisation als Folge einer Blockade der Natrium-Kalium-Pumpe (Dobolyi *et al.*, 2000).

Der Einfluss der pharmakologischen Stimulation oder Blockade von Dopamin-Rezeptoren auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt war bislang nicht untersucht worden und war Teil der Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Gemeinsam ist den bisher aufgeführten Faktoren, die zu einem Ansteigen der Adenosin-Konzentration im Extrazellulärraum des Gehirns führen, dass sie zu einer eher starken bis toxischen metabolischen Beanspruchung des betroffenen Gewebes führen. Zusätzlich zu diesen Effekten unter unphysiologischen, zum Teil sehr artifiziellen Bedingungen gibt es Hinweise auf Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen zu eher moderaten Veränderungen des Adenosin-Gehaltes führen (Masino and Dunwiddie, 1999). So konnte ein Anstieg der extrazellulären Adenosin-Konzentration im basalen Vorderhirn unter physiologischen Bedingungen wie zunehmenden Schlafmangel gezeigt werden (Strecker *et al.*, 2000). Das basale Vorderhirn umfasst eine Reihe von Strukturen, die wesentlich an der Steuerung der Aufmerksamkeit und Wachheit beteiligt sind. Am wachen Tier konnte der Nachweis erbracht werden, dass fortgesetzter Schlafentzug in den Kerngebieten des basalen Vorderhirns zu einer Akkumulation von Adenosin im Extrazellulärraum führte (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997; Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000). Mit einsetzendem Schlaf sanken die Werte langsam wieder in den normalen Bereich. Erste Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus und dem extrazellulären Adenosin-Gehalt gab es bereits in früheren Studien, in denen man während der Inaktivitätsphase erhöhte Werte im Hippokampus (Huston *et al.*, 1996) und Kortex (Chagoya de Sanchez *et al.*, 1993)

der Ratte festgestellt hatte. Interessanterweise hat eine *in vitro* Studie ergeben, dass auch die Temperatur Einfluss auf die extrazelluläre Adenosin-Konzentration zu haben scheint (Masino and Dunwiddie, 1999). So ergab eine langsame Temperaturerhöhung des Gewebes von 32,5 auf 38,5°C eine neuronale Depression, die auf eine verstärkte Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren zurückführbar war. Diese Beispiele zeigen, dass der extrazelluläre Adenosin-Gehalt durch physiologische Stimuli beeinflusst werden kann. Bei diesen Stimuli handelt es sich jedoch um Einflüsse, die in Zusammenhang mit vegetativen oder die Homöostase aufrechterhaltende Körperfunktionen gesehen werden können. Hinweise auf Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration, die an höhere Hirnfunktionen wie der Verarbeitung von bedeutenden Umgebungsreizen oder der Steuerung von Bewegungsabläufen gekoppelt sind, lagen bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht vor.

4.2.8 Effekte der Neuromodulation durch Adenosin-Rezeptoren

Während im vorigen Kapitel dargelegt wurde, durch welche Einflüsse eine Veränderung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes hervorgerufen wird, soll der folgende Text eine Übersicht liefern welche Auswirkungen diese Veränderungen haben können. Es wird angeführt, welche Effekte in verschiedenen Systemen des ZNS durch die Aktivierung oder Blockade von Adenosin-Rezeptoren zu beobachten sind. Inwieweit Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentrationen zu diesen Effekten beitragen, ist unbekannt, da bisher keine Daten über eine Kontrolle der Adenosin-Bildung oder -Ausschleusung durch Adenosin-Rezeptoren vorliegen.

Einfluss der Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf Schlaf

Wie oben schon erwähnt, scheint die Schlafsteuerung im Zusammenhang mit dem Adenosin-System zu stehen. Bestätigt werden die dort angegebenen Befunde dadurch, dass die Applikation von Adenosin (Portas *et al.*, 1997; Alam *et al.*, 1999) und Adenosin A_{2A} Rezeptor-Agonisten (Satoh *et al.*, 1999) in das basale Vorderhirn den Wachheitsgrad reduzierten. Auch in anderen Hirnarealen wie z. B. dem NAc führte die Stimulation von A_{2A} Rezeptoren durch den Adenosin-Rezeptor-Agonisten CGS21680 zu einem verringerten Wachheitsgrad (Satoh *et al.*, 1999). Demgegenüber reduzierte die Blockade von A₁ und A_{2A} Rezeptoren durch den unselektiven Adenosin-Rezeptor-Antagonisten Koffein die Schläfrigkeit während Schlafentzuges (Wurts and Edgar, 2000).

Eine neuere Studie lieferte Hinweise auf eine Beeinflussung des zirkadianen Rhythmus durch A_1 Rezeptor Agonisten beim Hamster. Sowohl Schlafdeprivation als auch die Applikation eines A_1 Rezeptor Antagonisten zu einem bestimmten Zeitpunkt der Inaktivitätsphase lieferten eine vergleichbare Verschiebung des zirkadianen Rhythmus (Antle *et al.*, 2001).

Einfluss der Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf die Neuroprotektion

Der Adenosin A_{2A} Rezeptor ist an der Steuerung des zerebralen Blutstroms beteiligt, indem er als Regulator des Tonus der Gefäßmuskulatur die Weitstellung der Blutgefäße beeinflusst (Dunwiddie and Masino, 2001). Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Vasodilatation, während seine Blockade Vasokonstriktion hervorruft. Die Bedeutung dieses Effektes im Zusammenhang mit Ischämie wird als neuroprotektiv betrachtet. Man geht davon aus, dass steigende Adenosin-Spiegel Vasodilatation über den A_{2A} Rezeptor herbeiführten und so die Blutzufuhr in das durch das pathologische Geschehen unterversorgte Gewebe erhöht wurde. Dieses ist ein denkbarer Mechanismus, der zu einer Minderung der neurotoxischen Wirkung von Energiemangel auf Neurone führen könnte. Die neuroprotektive Wirkung des A_{2A} Rezeptors ist jedoch stark umstritten, da andere Studien zeigten, dass durch die Aktivierung des A_{2A} Rezeptors eine Verstärkung der Gewebeschädigung hervorgerufen wird. Die Blockade der A_{2A} Rezeptoren wirkte sich bei Ischämie hingegen neuroprotektiv aus (von Lubitz, 1999; de Mendonca *et al.*, 2000). Bestätigt wurden diese neueren Erkenntnisse durch eine Studie, bei der sich zeigte, dass bei A_{2A} Rezeptor *knock-out* Mäusen die Auswirkungen einer Ischämie geringer ausfallen als bei der Kontrollgruppe (Chen *et al.*, 1999). Es wird noch diskutiert, ob die neurotoxischen Wirkungen einer A_{2A} Rezeptoraktivierung durch die erhöhte neuronale Aktivität oder das durch die Vasodilatation vergrößerte Infarktvolume hervorgerufen wird. Offenbar hat also die Stimulation von A_{2A} Rezeptoren degenerative als auch protektive Wirkungen, deren jeweilige Anteile noch nicht hinreichend geklärt ist (de Mendonca *et al.*, 2000); (Morelli and Wardas, 2001). Es ist hingegen unumstritten, dass die Aktivierung des A_1 Rezeptors bei Ischämie neuroprotektiv wirkt (de Mendonca *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2001). Dieser Effekt wird auf die Eigenschaft des A_1 Rezeptors zurückgeführt, der über seine zellulären Effektorsysteme eine Reduzierung der neuronalen Exzitabilität und damit des Energiebedarfs des gefährdeten Gewebes herbeizuführen vermag (Calabresi *et al.*, 1997; Dunwiddie and Masino, 2001).

Einfluss der Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf Verhaltenssteuerung

Einige Studien liefern den Nachweis, dass zentrale Adenosin-Rezeptoren eine Rolle bei der Steuerung von Verhalten spielen. Über Verhaltenseffekte durch die Blockade von Adenosin-

Rezeptoren im NAc lagen bislang keine Informationen vor, da keine für eine lokale Applikation geeigneten, selektiven Liganden verfügbar waren. Weitere Ausführungen zur Verhaltenswirksamkeit von Adenosin-Rezeptoren folgen in einem späteren Kapitel, nach der Einführung in das neuronale Netzwerk, das der Steuerung von Verhalten zugrunde liegt.

Therapieansätze durch den Einsatz von Adenosin-Rezeptor-Liganden

Die Ergebnisse der Forschung über Adenosin im ZNS geben Hoffnung, dass über den Einsatz von Adenosin-Rezeptor-Liganden pharmakologische Ansatzpunkte für die Behandlung von Demenz (Rudolphi and Schubert, 1997), Depression (Williams, 1998), Schmerz, Alkoholismus, Epilepsie und Ischämie (Guieu *et al.*, 1996; Rathbone *et al.*, 1998; von Lubitz, 1999; de Mendonca *et al.*, 2000) sowie von Morbus Parkinson (Kanda *et al.*, 1998a; Mally and Stone, 1998; Aoyama *et al.*, 2000; Nash and Brotchie, 2000; Ferre *et al.*, 2001; Hauber *et al.*, 2001; Morelli and Wardas, 2001) und Schizophrenie (Ferre *et al.*, 1994; Kafka and Corbett, 1996; Ferre, 1997; Koch and Hauber, 1998) entwickelt werden können.

4.3 Der Nukleus akkumbens - ein Kerngebiet der Basalganglien

Das Striatum wird funktional und anatomisch in seine dorsalen Bereiche (CPU) und seine ventralen Teile (NAc, olfaktorischer Tuberkel) unterteilt. Der NAc ist eine Substruktur des ventralen Striatums. Das Striatum bildet die Eingangsstruktur der Basalganglien. Die Basalganglien sind wesentlich an der Steuerung von motivatorischen, kognitiven und motorischen Aspekten des Verhaltens beteiligt (Heimer *et al.*, 1995). Aus klinischen und tierexperimentellen Studien ging hervor, dass diese Funktionen durch weitgehend parallel angelegte Funktions Schleifen erbracht werden, die durch die Basalganglien, den Thalamus und den zerebralen Kortex gebildet werden. Kortikale Signale gelangen zum Striatum, der Eingangsstruktur der Basalganglien, werden dabei, und in den nachgeschalteten Kernen, über zwei parallel verlaufende Wege prozessiert und erreichen schließlich die Ausgangsstrukturen (Substantia nigra pars reticulata (SNR) und Entopedunkularer Nukleus (EP)) (Abb. 6). Diese projizieren wiederum auf den Thalamus, der auf die kortikale Aktivität Einfluss nimmt (Alexander and Crutcher, 1990). Ein bedeutendes Merkmal der Signalprozessierung in den Basalganglien ist die Neuromodulation durch Dopamin, einem Neurotransmitter, der von Neuronen ausgeschüttet wird, deren Zellkörper in Kernen des Mittelhirns lokalisiert sind (Substantia nigra pars compacta (SNC), ventrales tegmentales Areal (VTA)) (Heimer *et al.*, 1995). Wesentliche Aspekte der Rolle der Basalganglien bei der Steuerung des Verhaltens sind noch ungeklärt (Brown and Marsden, 1998). Pathologische Veränderungen in den Basalganglien führen zu Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington und

scheinen im Zusammenhang mit der Ausprägung von Schizophrenie und Drogensucht zu stehen (Graybiel, 1997; Hornykiewicz, 1998; Robbins and Everitt, 1999a; Calabresi *et al.*, 2000).

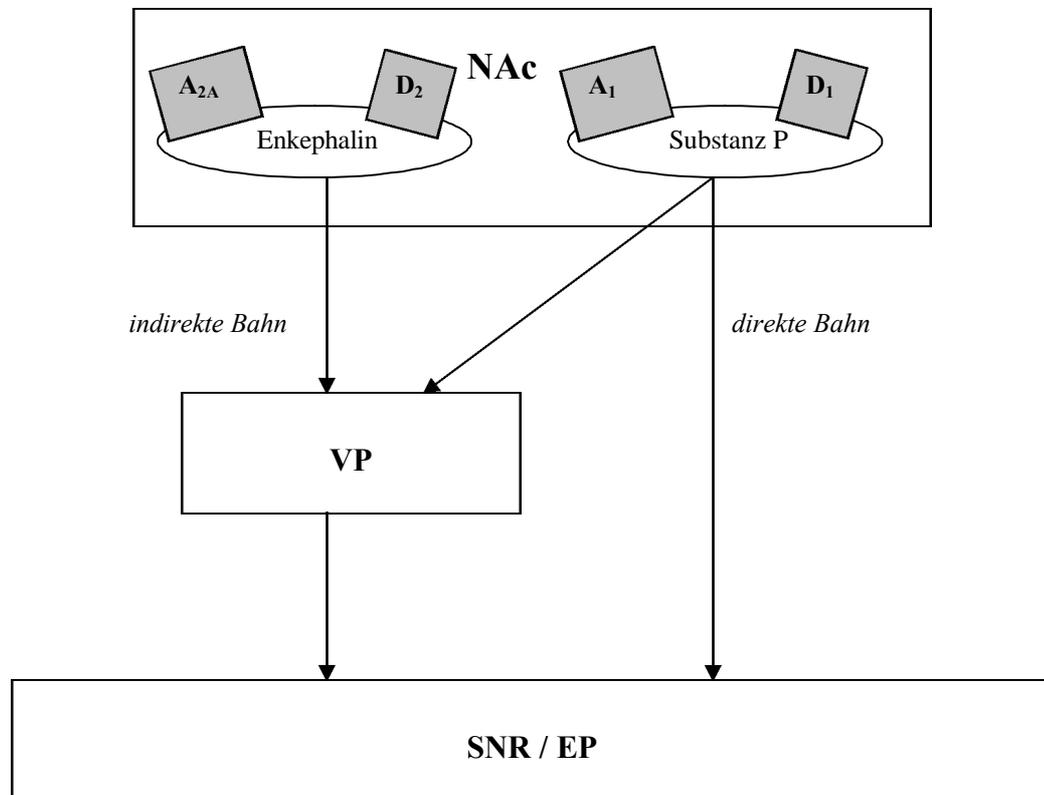


Abb. 6: Stark vereinfachtes Basalganglien-Modell mit den Projektionen des NAc. Die direkte Bahn wird aus Projektionsneuronen gebildet, die vom NAc direkt zur SNr und dem EP verlaufen (Koexpression von A₁ und D₁ Rezeptoren). Die indirekte Bahn besteht hingegen aus Neuronen, die vom NAc auf das VP projizieren und aus Neuronen, die vom VP auf die SNr und den EP projizieren. Auf den Projektionsneuronen der indirekten Bahn auf das Pallidum sind A_{2A} und D₂-Rezeptoren selektiv koexprimiert (Rezeptortypen grau).

4.3.1 Die Substrukturen des Nucleus accumbens

Anatomische und histochemische Analysen ergaben, dass der NAc aus unterschiedlichen Subterritorien mit spezifischen, von einander abweichenden Funktionen und Verknüpfungen besteht. Diese Subterritorien werden als *core*, *shell* und rostraler Pol bezeichnet (Heimer *et al.*, 1991). In neueren Studien wurden speziell die funktionalen Unterschiede zwischen NAc *core* (NAcC) und NAc *shell* (NAcS) und deren spezifische Eigenheiten untersucht (Kelley, 1999). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die NAcS wesentlich in die Kontrolle der Futteraufnahme und der positiven Verstärkung, also der Bewertung von Situationen, eingebunden ist, während der NAcC funktional mit der Steuerung der motivationsgeleiteten

Willkürmotorik in Zusammenhang gebracht wird (Swanson *et al.*, 1997; Di Chiara *et al.*, 1999; Kelley, 1999; Parkinson *et al.*, 1999; Stratford and Kelley, 1999; Boye *et al.*, 2001; Reynolds and Berridge, 2001).

4.3.2 Afferente und efferente Verbindungen des Nucleus accumbens

Der NAc erhält glutamaterge Afferenzen aus dem präfrontalen Kortex (PFC), dem Hippokampus, der Amygdala und dem Thalamus (Abb. 7). Zudem ist er das Ziel einer serotonergen Projektion aus den Raphe Kernen und einer bedeutenden dopaminergen Projektion aus dem VTA (Ikemoto and Panksepp, 1999). Mehr als 90 % seiner Neurone zählen zu einer Neuronenpopulation, die auf Grund ihrer morphologischen Eigenschaften als *medium sized spiny neurons* bezeichnet wird. Diese schütten als Neurotransmitter GABA aus. Sie weisen Projektionen in vier Terminationsgebiete auf (Übersicht in Heimer *et al.*, 1995). Bei diesen handelt es sich in drei Fällen um nachgeschaltete Kerngebiete der Basalganglien, nämlich um das ventrale Pallidum (VP), den EP und die SNR (Ferre, 1997). Die GABAergen Projektionsneurone des NAc sind in zwei Subpopulationen aufteilbar, die sich in ihren Terminationsgebieten, ihrer Rezeptorausstattung und Neuropeptidbildung unterscheiden. Eine Neuronenpopulation projiziert direkt auf die Ausgangsstrukturen der Basalganglien (EP und SNR) und bildet daher die sog. direkte Bahn. Die andere Population der accumbalen Projektionsneurone projiziert auf das VP, das dann wiederum auf die Ausgangsstrukturen projiziert. Gemeinsam bilden sie die indirekte Bahn (Alexander and Crutcher, 1990). Die accumbalen Neurone der indirekten Bahn enthalten das Neuropeptid Enkephalin und exprimieren D₂ und A_{2A} Rezeptoren. Im Gegensatz dazu ist die andere Neuronenpopulation durch das Neuropeptid Substanz P und die Expression von A₁ und D₁ Rezeptoren gekennzeichnet (Schiffmann *et al.*, 1991; Ferre, 1997; Svenningsson *et al.*, 1997a; Fredholm and Svenningsson, 1998; Ferre *et al.*, 1999) (Abb. 6).

Das vierte Terminationsgebiet der Projektionen aus dem NAc liegt außerhalb der Basalganglien im lateralen Hypothalamus. Die GABAergen Projektionsneurone dieser Verknüpfung sind in der NAcS lokalisiert (Heimer *et al.*, 1995).

4.4 Motiviertes Verhalten

Im folgenden Abschnitt der Einleitung wird dargelegt, in welcher Weise Adenosin im NAc auf die Steuerung des motivierten Verhaltens einwirken könnte. Zunächst stellt sich dabei die Frage, wodurch sich motiviertes Verhalten auszeichnet und durch welches neuronale Substrat es generiert wird. Dabei wird besonders auf die Bedeutung des NAc abgehoben, da er eine Schlüsselrolle bei der Verhaltenssteuerung einnimmt und zu den wenigen Kerngebieten des

ZNS zählt, in denen Adenosin A_{2A} Rezeptoren exprimiert werden. Zudem gibt es Hinweise auf eine funktionale Interaktion zwischen Dopamin- und Adenosin-Rezeptoren im NAc (Ferre, 1997; Ferre *et al.*, 1997). Da die Modulation der dopaminergen Transmission unter Umständen einen maßgeblichen Mechanismus darstellt, über den Adenosin die Verhaltenssteuerung beeinflusst, wird auf die Bedeutung des Dopamins im NAc näher eingegangen.

4.4.1 Die Funktion von motiviertem Verhalten

Motiviertes Verhalten ermöglicht die vorteilhafte Anpassung eines Individuums an die bestehenden Umgebungsbedingungen. Über die Bewertung der Situation wird das Verhalten positiv verstärkt, das erfahrungsgemäß unter gleichen Bedingungen die größte Belohnung erbracht hat. Flexibles, an veränderliche innere und äußere Zustände angepasstes Handeln erhöht die Überlebenschance und Fortpflanzungswahrscheinlichkeit des einzelnen Organismus und sichert damit die Erhaltung der Spezies. Diesem Verhalten liegt die Strategie zugrunde, sich möglichst häufig belohnenden Situation auszusetzen, während bestrafende vermieden werden (Kelley, 1999; Redgrave *et al.*, 1999b). Beispiele für natürliche belohnende Stimuli sind die Gegenwart eines Sexualpartners oder einer Futterbelohnung. Motiviertes Verhalten besteht bei Gegenwart von belohnenden Stimuli aus Bewegungsabläufen, die initiiert wurden, um Belohnung zu erlangen (appetitives Verhalten). Das appetitive Verhalten kann beispielsweise die bloße direkte Annäherung an eine bereits erkannte Futterbelohnung sein. Es könnte aber auch der Erkundung eines unbekanntes Raumes, in dem potentiell Futter angetroffen werden könnte, entsprechen (Rebec *et al.*, 1997b). Es ist wichtig festzuhalten, dass es sich bei der Futteraufnahme selbst, also dem Verhalten, dass der Annäherung an die Belohnung folgt, nicht um appetitives, sondern um konsumatorisches Verhalten handelt (Ikemoto and Panksepp, 1999; Robbins and Everitt, 1999b). Dieses wird durch ein anderes neurales System gesteuert, als die appetitive Annäherung an das Futter (Cousins and Salamone, 1994; Phillips *et al.*, 1995).

Ist das Verhalten erfolgreich und wird die Belohnung durch das Individuum als angenehm empfunden, so kommt es zur positiven Verstärkung der Verhaltensweise. Die positive Verstärkung beschreibt einen Lernprozess, der die ausgeführte Verhaltensweise in Zusammenhang mit dem angenehmen Gefühl setzt, das durch die Erlangung der Belohnung hervorgerufen wird. So wird zukünftig bei ähnlichen Situationen bevorzugt das positiv verstärkte (motivierte) Verhalten initiiert. Bleibt die Belohnung anhaltend aus, z.B. weil die Futterquelle erschöpft ist oder folgt sogar Bestrafung (aversiver Stimulus), kommt es zu einer

Auslöschung der positiven Verstärkung der Verhaltensweise in dieser Situation. Durch dieses Umlernen erfolgt eine Verhaltensanpassung an die veränderten Umweltbedingungen, so dass Verhaltensweisen, die nicht zu belohnendem Gefühl führen, vermieden werden (De Bruin *et al.*, 2000; Carlson, 2001).

Aversive Stimuli führen in vielen Fällen zu einer Verhaltensaktivierung, die das Ziel hat, sich der unangenehmen Situation zu entziehen (Ikemoto and Panksepp, 1999; Robbins and Everitt, 1999b). Die Bewertung einer Situation und die sich daraus ergebende Verhaltensantwort ist zusätzlich vom inneren Zustand des Individuums abhängig; so wird z.B. ein hungriges Tier durch eine Futterbelohnung eher aktiviert als ein sattes (Robbins and Everitt, 1999b).

Umfangreiche Forschungstätigkeiten werden unternommen, um umfassende Erkenntnisse über die Funktionen des neuronalen Netzwerks zu erhalten, das der Steuerung von Emotionen und motiviertem Verhalten zugrunde liegt.

4.4.2 Steuerung von motiviertem Verhalten durch die limbische Funktionsschleife

Welche Leistungen muss ein System erbringen, um das oben beschriebene zielgerichtete, situationsangepasste Verhalten zu generieren?

Die sensorischen Eingänge müssen kontrolliert werden, inwieweit eine besondere Situation in der Umgebung vorliegt, die situationsangepasstes Handeln erfordert. In einem derartigen Fall wird die Aufmerksamkeit erhöht und eine Bewertung der Qualität der Situation vorgenommen. Je nachdem, ob eine appetitiver oder ein aversiver Stimulus vorliegt, kommt es zur Initiation der adäquaten motorischen Aktivität. Die Erfahrungen, die bezüglich des Stimulus gesammelt werden, müssen wiederum bewertet werden. Die auf den Stimulus bezogene Information muss dann abrufbar gespeichert werden, damit in zukünftigen, ähnlichen Situationen ein adäquates, zielgerichtetes Verhalten initiiert werden kann.

Die limbische Funktionsschleife

Die Steuerung des motivierten Verhaltens wird von einem komplexen neuronalen Netzwerk hervorgebracht.

In der Literatur finden sich für dieses Netzwerk unterschiedliche Bezeichnungen, die sich entweder eher an funktionalen oder an anatomischen Merkmalen des Systems orientieren. Dazu zählen z.B. Benennungen wie vorbereitendes Annäherungssystem (*preparatory approach seeking system*) (Ikemoto and Panksepp, 1999), meso-akkumbale Funktionsschleife (Ikemoto and Panksepp, 1999), Motivationsschleife (*motive circuit*) (Kalivas and Nakamura, 1999), mesokortikolimbisches dopaminerges System (Kelley and Berridge, 2002), positives

Verstärkersystem (Hauber, 2002) oder limbische kortikostriatale Funktionsschleife (Alexander *et al.*, 1986). Im weiteren Text wird die Bezeichnung limbische Funktionsschleife verwendet.

Anatomisch besteht das System aus miteinander verknüpften Hirnstrukturen des Kortex, des limbischen Systems und der Basalganglien, auf die dopaminerge Projektionen von Neuronen des VTA wirken (Heimer *et al.*, 1995). Wie Kelley und Berridge 2002 zusammenfassten, projizieren dopaminerge Terminale der VTA auf den PFC, den Hippokampus, den NAc und die Amygdala (Abb. 7). Läsionsstudien oder lokale pharmakologische Manipulationen lieferten Ergebnisse über die Bedeutung jeder einzelnen Struktur innerhalb des Systems. Das zielgerichtete Verhalten entsteht danach durch die dynamische Aktivität des gesamten Netzwerkes mit seinen angrenzenden Arealen, die in den Interaktionen der Teilstrukturen noch unverstanden ist (Kelley and Berridge, 2002).

Die limbische Funktionsschleife leistet eine auf den Stimulus bezogene Analyse von sensorischen Signalen, deren Ergebnis über den NAc eine motorische Antwort hervorruft, die dem Stimulus angepasst ist (*stimulus response connection*) (Horvitz, 2000).

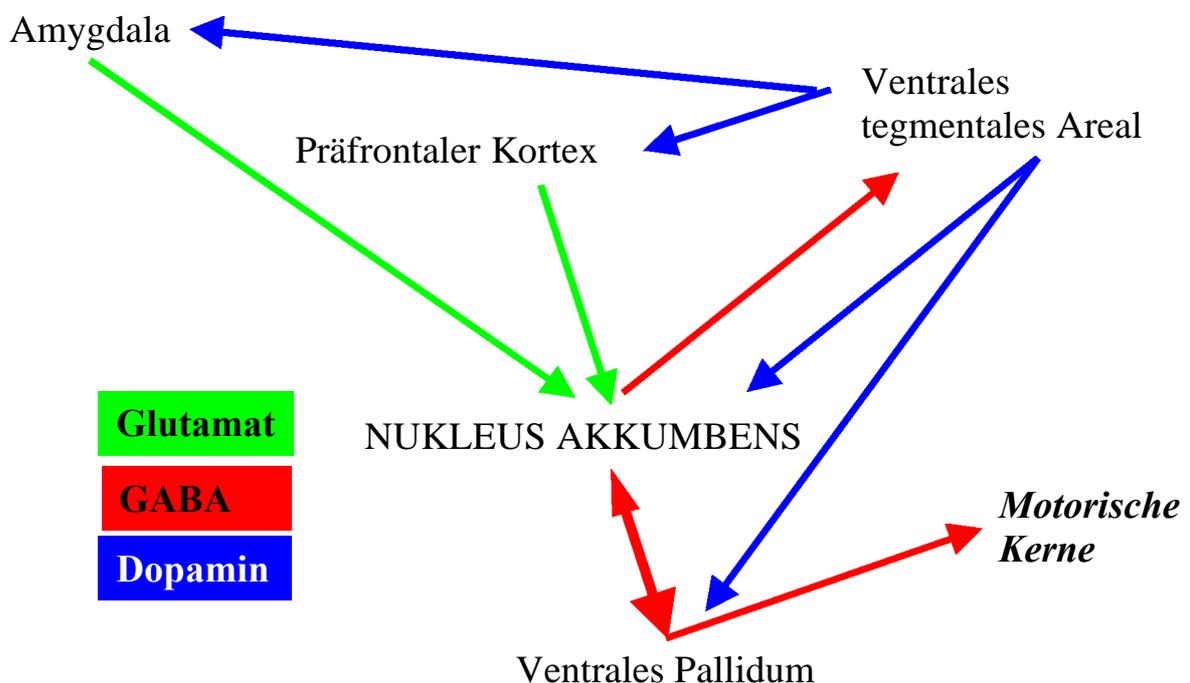


Abb. 7: Afferenzen und Efferenzen des NAc und wichtige dopaminerge Projektionen des VTA in Strukturen der limbischen Funktionsschleife.

Die Ausschüttung von Dopamin in den Strukturen der limbischen Funktionsschleife spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung von motiviertem Verhalten

Es besteht große Einigkeit darin, dass die Ausschüttung von Dopamin im mesokortikolimbischen System einen sehr bedeutenden Einfluss auf die Steuerung von appetitivem Verhalten durch die limbische Funktionsschleife hat (Kelley *et al.*, 1997; Hollerman *et al.*, 1998; Schultz, 1998; Ikemoto and Panksepp, 1999; Robbins and Everitt, 1999b; Spanagel and Weiss, 1999; Horvitz, 2000).

Ursprünglich ging man davon aus, dass die Aktivierung des mesokortikolimbischen Dopamin-Systems, und damit die Aktivierung der Dopamin-Rezeptoren in Strukturen der limbischen Funktionsschleife, das Wohlbefinden generiert, das von belohnenden Stimuli ausgeht (positive Verstärkung). Diese Annahmen resultierte aus der Beobachtung, dass natürliche (z.B. Futter) und künstlich induzierte (Suchtrogen) Belohnungen appetitives Verhalten auslösen und zur gleichzeitigen Ausschüttung von Dopamin in den betreffenden Hirnarealen durch eine Aktivierung der Neurone des VTA führen. Wird ein bestimmtes Verhaltensmuster mehrfach über positive Verstärkung belohnt, setzt ein Lernvorgang ein, der das Verhalten mit der Belohnung assoziiert (Carlson, 2001).

Bei einer Blockade der dopaminergen Neurotransmission kann es trotz voller Bewegungsfähigkeit zu einer Unterdrückung des appetitiven Verhaltens kommen, obwohl appetitive Stimuli präsentiert werden (Übersicht in Robbins and Everitt, 1996; Ikemoto and Panksepp, 1999).

In letzter Zeit ergaben sich verstärkt Befunde, die zu der Annahme berechtigen, dass das mesokortikolimbische System eine umfassendere Bedeutung als nur die Steuerung der zielgerichteten Annäherung an Belohnung hat (Spanagel and Weiss, 1999; Kelley and Berridge, 2002). So konnte gezeigt werden, dass sowohl aversive als auch neutrale oder neue Stimuli zu einer vergleichbaren Dopamin-Ausschüttung führen wie sie von belohnenden Ereignissen bekannt ist (Horvitz, 2000). Vor diesem Hintergrund wird derzeit spekuliert, ob die Verknüpfung des mesokortikolimbischen Dopamins mit appetitiven Verhalten nur einen kleinen Ausschnitt seiner eigentlichen umfassenderen Funktionen darstellt (Kelley and Berridge, 2002). So gibt es beispielsweise Überlegungen, ob die Verstärkung der dopaminergen Neurotransmission zusätzlich zu der bisher bekannten positiven Verstärkung auch im Zusammenhang mit Aufmerksamkeitssteuerung (Horvitz, 2000), dem Generieren einer Belohnungserwartung (Hollerman *et al.*, 1998; Schultz, 1998; Hauber *et al.*, 2000), oder dem Umschalten zwischen konkurrierenden Verhaltensmustern steht (Redgrave *et al.*, 1999b).

Einfluss von homöostatischen Mechanismen auf motiviertes Verhalten

Motiviertes Verhalten wird vom homöostatischen Zustand des Organismus beeinflusst (Robbins and Everitt, 1999b). So ist ein hungriges Tier bereit, zur Erlangung einer Futterbelohnung einen größeren Aufwand zu erbringen, als ein sattes Tier. Der Einfluss des inneren Antriebs (Hunger) über den Hypothalamus scheint jedoch unbedeutender zu sein als der der limbische Funktionsschleifen, da es z. B. möglich ist, durch die Verstärkung der dopaminergen Transmission im NAc die Futterraufnahme auch von hungrigen Tieren zu inhibieren (Bakshi and Kelley, 1991). Ein weiterer Hinweis in diese Richtung ergibt sich daraus, dass Mäuse mit defizientem Dopamin-System in der Lage sind, sich Futter anzunähern und dieses zu konsumieren. Diese Tiere nehmen aber aus eigenem Antrieb zu selten Futter auf, um ihren lebensnotwendigen Bedarf zu decken (Szczyepka *et al.*, 1999).

Die Auswirkung homöostatischer Mechanismen wird eventuell durch einen direkten Einfluss auf die dopaminerge Neurotransmission vermittelt. So hat sich gezeigt, dass bekanntes Futter nur dann konsistent einen Anstieg des Dopamins im NAc induziert, wenn die Tiere futterdepriviert waren (Bassareo and Di Chiara, 1999).

4.5 Einfluss der dopaminergen Neurotransmission im Nucleus accumbens auf die Verhaltenssteuerung

Der NAc wird für die wesentliche Verknüpfung gehalten, die von Strukturen der emotionalen Bewertung zu dem motorischen System Informationen vermittelt. Er würde damit eine Art Schnittstelle zwischen der limbischen Funktionsschleife und Strukturen der Steuerung des motorischen Verhaltens darstellen. Seine Funktion wird auch als Integrator zwischen limbischem und motorischem System bezeichnet (Kelley, 1999). Durch diesen Begriff wird klargestellt, dass es sich bei dem NAc nicht um eine Struktur der reinen Informationsweiterleitung handelt, sondern hier Verrechnungsprozesse über die eingehenden Signale stattfinden. Eine wesentliche Einflussgröße bei dieser Integration ist die Modulation durch Dopamin-Ausschüttungen im NAc durch die dopaminergen Projektionen von dem VTA.

Die genaue Bedeutung der dopaminergen Neurotransmission im NAc für die Verhaltenssteuerung ist Thema einer Debatte der letzten Jahre, die bis heute anhält (Hollerman *et al.*, 1998; Ikemoto and Panksepp, 1999; Kalivas and Nakamura, 1999; Redgrave *et al.*, 1999a, b; Robbins and Everitt, 1999a; Spanagel and Weiss, 1999; Horvitz, 2000; Kelley and Berridge, 2002).

Gemeinsam ist den Hypothesen, dass der Aktivierung der Dopamin-Rezeptoren im NAc eine Funktion als Informationsfilter zugeordnet wird, durch den die Prozessierung des Verhaltensprogrammes gefördert wird, das als der Situation adäquat bewertet wurde.

Kalivas und Nakamura (1999) legen dar, dass die dopaminerge Neurotransmission im NAc zusätzlich eine Art Signalverstärker darstellt, die je nach Stärke des exzitatorischen Eingangs in die Projektionsneurone des NAc Signale verstärken oder dämpfen. So wirkt die Aktivierung von Dopamin D₁ Rezeptoren auf Neurone, die gleichzeitig eine starke exzitatorische Depolarisation erfahren, signalverstärkend, während sie inhibitorisch auf nicht erregte Neurone wirkt. Dadurch würde die dopaminerge Modulation zu einer Verschiebung des Signal-Rausch-Verhältnisses zugunsten der ausgehenden exzitatorischen Signale aus der limbischen Funktionschleife und damit eine Verhaltensverstärkung bewirken (Kalivas and Nakamura, 1999). Wieweit Adenosin als funktionaler Gegenspieler zum Dopamin unter physiologischen Bedingungen als Modulator der dopaminergen Neurotransmission Einfluss auf die Verhaltenssteuerung durch den NAc hat, ist noch weitgehend ungeklärt. In zwei neuen Studien wurden Hinweise geliefert, dass die Aktivierung von A_{2A} Rezeptoren die positive Verstärkung von Verhalten, die durch die Stimulation der dopaminergen Neurotransmission im NAc induziert wurde, abschwächen (Baldo *et al.*, 1999), (Knapp *et al.*, 2001). Dabei konnte aber nicht geklärt werden, ob die Ausprägung der positiven Verstärkung infolge von Psychopharmaka oder Elektrostimulation mit einer Veränderung der Stimulation der Adenosin-Rezeptoren einher geht, da keine Daten über die Dynamik extrazellulärer Adenosin-Spiegel während der positiv verstärkenden Bedingungen aufgenommen wurden.

4.5.1 Verhaltenseffekte durch pharmakologisch veränderte dopaminerge Neurotransmission im Nukleus akkumbens

Studien, die zur Untersuchung des mesoakkumbalen Dopamin-Systems durchgeführt wurden, zeigten, dass die akkumbale Verabreichung von Dopamin-Rezeptor Agonisten den Ablauf verschiedener Verhaltensweisen veränderte. So wurde eine verstärkte motorische Aktivierung beobachtet, die sich u. a. in einer erhöhten Lokomotion äußerte (Phillips *et al.*, 1995; Turgeon *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 1999; Parkinson *et al.*, 1999). Die Futteraufnahme wurde durch eine derartige Behandlung in den meisten Fällen reduziert (Evans and Vaccarino, 1986; Bakshi and Kelley, 1991; Sills *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1997).

Die Verstärkung der dopaminergen Neurotransmission im NAc von futterdeprivierten Ratten reduziert deren Futteraufnahme (Bakshi and Kelley, 1991). Darüber hinaus gibt es noch weitere Hinweise für die Modulation des Fressverhaltens durch akkumbales Dopamin.

Vermittelt wird dieser Effekt wahrscheinlich über die oben bereits erwähnte Projektion von GABAergen Neuronen der NAcS auf den lateralen Hypothalamus (Stratford and Kelley, 1999).

Auch Suchtdrogen, wie z. B. die Psychostimulantien Kokain und Amphetamin, wirken nach akuter Gabe direkt oder indirekt über die verstärkte Ausschüttung von Dopamin aus Neuronen des VTA. Durch diese künstlichen Stimulation der limbischen Funktionsschleife kommt es zu positiver Verstärkung von Verhalten, ohne dass gleichzeitig natürliche belohnende Stimuli vorliegen (Robbins and Everitt, 1999a). Die entscheidende Struktur für diesen Effekt scheint der NAc zu sein, da die Dopamin-Ausschüttung durch Suchtdrogen wie z. B. Kokain oder Amphetamin hier besonders stark erhöht wird. Außerdem hat sich in Experimenten gezeigt, dass die Blockade der dopaminergen Transmission im NAc die positiv verstärkende Wirkung von Kokain effizient inhibiert (Pulvirenti and Diana, 2001).

In der vorliegenden Arbeit ist der akute Effekt im NAc nach der Gabe von Suchtdrogen von Bedeutung. Die akkumbale Gabe von Kokain oder Amphetamin bewirkt ein massives, dosisabhängiges Ansteigen der extrazellulären Dopamin-Spiegel im NAc (Nomikos *et al.*, 1990; Pierce and Kalivas, 1997b). In einer Studie konnte zwar ein Einfluss von A_{2A} Rezeptoren im NAc auf durch Kokain induzierte positive Verstärkung von Verhalten gezeigt werden (Baldo *et al.*, 1999). Inwieweit endogenes Adenosin an der Ausprägung von positiver Verstärkung durch Suchtdrogen teilhat, ist ungeklärt.

4.5.2 Erhöhung der dopaminergen Neurotransmission durch biologisch relevante Stimuli im Nucleus accumbens

Es wurde gezeigt, dass die Darbietung von biologisch relevanten Stimuli, wie z.B. die Präsentation von auf Futter hinweisenden Signalen, häufig zu einer Ausschüttung von Dopamin im NAc führt. Beobachtet wurde dieser Effekt bei der Ratte während der Darbietung von neuen, potenziell belohnenden Stimuli (unbekannter Käfig, unbekanntes Futter), sowie der Darbietung von aversiven Stimuli (Aufnahmen des Tieres) (Bassareo and Di Chiara, 1997; Feenstra *et al.*, 1998; Bassareo and Di Chiara, 1999; Saigusa *et al.*, 1999). Ob die dopaminerge Neurotransmission während der Darbietung dieser Stimuli auch durch die veränderte Aktivität von Adenosin-Rezeptoren, z. B. über die bereits beschriebenen Interaktionen zwischen Adenosin- und Dopamin-Rezeptoren moduliert wird, ist unbekannt. Im Falle einer derartigen Modulation müsste es stimulusabhängig zu phasischen Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im NAc kommen. Bislang lagen keine

Studien vor, in denen die extrazellulären Adenosin-Konzentrationen im NAc während der Darbietung biologisch relevanter Stimuli untersucht worden sind.

4.5.3 Beteiligung der dopaminergen Neurotransmission an der Verarbeitung von Schreckreizen im Nucleus accumbens

Eine große Anzahl von Studien hat gezeigt, dass die dopaminerge Neurotransmission im NAc einen großen Einfluss auf die sensomotorische Integration hat. Die sensomotorische Integration leistet die Verknüpfung zwischen sensorischen Eingängen und motorischen Ausgängen zur Erzeugung von Verhalten. Bei einigen dieser Arbeiten wurden die Reiz-Reaktions-Beziehungen untersucht, die durch akustische Schreckreize ausgelöst werden. Die Reaktion auf den Schreckreiz (*acoustic startle response*, ASR) wird über sensomotorische Filtermechanismen (*sensomotoric gating*) der Situation angepasst. So zeigt zum Beispiel ein Tier unter aversiven Bedingungen eine stärkere ASR nach einem akustischen Schreckreiz als unter neutralen Bedingungen (Koch, 1999). Ein Effekt, der durch diese Filtermechanismen geleistet wird, ist die sog. Präpuls Inhibition (PPI). Dabei handelt es sich um eine Reaktionsunterdrückung, die durch einen Hinweisreiz (Präpuls) ausgelöst wird, der kurz vor dem Schreckreiz. Diese Verhaltensanpassung wird durch den NAc kontrolliert und kann durch die Stimulation der dopaminergen Neurotransmission im NAc massiv inhibiert werden (Swerdlow *et al.*, 1990b; Swerdlow *et al.*, 1990c; Wan and Swerdlow, 1993; Kopsi and Swerdlow, 1997).

Dieses Defizit der sensomotorischen Filtermechanismen, das im Tierexperiment durch die pharmakologische Stimulation der Dopamin-Rezeptoren im NAc induzierbar ist, gehört zu einem der spezifischen Symptome der Schizophrenie beim Menschen (Swerdlow, 1994).

Die Bedeutung des dopaminergen Systems bei der Pathophysiologie der Schizophrenie ist jedoch umstritten. Es gibt eine Anzahl von Befunden, die zur Entwicklung der sog. Dopamin-Hypothese der Schizophrenie geführt haben. Nach dieser Hypothese ist eine pathogen erhöhte und fehlregulierte dopaminerge Neurotransmission die wesentliche Ursache für die Ausbildung der Symptome einer Schizophrenie. Unterstützt wird die Hypothese durch Hinweise darauf, dass antipsychotisch wirksame Medikamente ihre Wirkung unter anderem über die Blockade von Dopamin D₂ Rezeptoren im NAc entfalten (Seeman and Van Tol, 1994; Ferre, 1997). Die Dopamin-Hypothese passt jedoch nur zu einem Teil der Symptome, die mit Schizophrenie einhergehen. Dabei handelt es sich um die sog. positiven Symptome, die psychotischen Charakters sind (Wahnvorstellungen, Panikattacken, Halluzinationen). Die beim Erkrankten aber auch auftretenden sog. negativen Symptome wie affektive Verflachung,

Apathie, Antriebslosigkeit und reduzierte Sprachaktivität sind mit einer verstärkten dopaminergen Neurotransmission nicht ohne weiteres erklärbar. Ein direkter Beweis für eine verstärkte dopaminerge Transmission bei an Schizophrenie Erkrankten konnte bisher nicht geliefert werden (Davis and Kahn, 1995; Nuechterlein and Dawson, 1995; Carlson, 2001).

Vor diesem Hintergrund ist die Untersuchung der Rolle der dopaminergen Neurotransmission im NAc bei der sensomotorischen Integration Teil der Grundlagenforschung zur Schizophrenie. Wegen der Wechselwirkungen zwischen Dopamin und Adenosin im NAc besteht die bereits erwähnte Hoffnung, über die Adenosin-Rezeptoren einen therapeutischen Zugang zur Behandlung von Symptomen der affektiven Erkrankungen zu finden (Ferre *et al.*, 1994; Ferre, 1997). Neue Arbeiten haben gezeigt, dass die Präpuls Inhibition über die Stimulierung von Adenosin-Rezeptoren beeinflussbar ist (Hauber and Koch, 1997; Koch and Hauber, 1998; Sills *et al.*, 2001; Schwienbacher *et al.*, 2002), während Effekte durch die Blockade dieser Rezeptoren noch unbekannt sind. Die Ergebnisse einer Arbeit weisen direkt auf eine Beteiligung der A_{2A} Rezeptoren im NAc bei sensomotorischen Filtermechanismen hin (Hauber and Koch, 1997). Im Gegensatz dazu scheinen A₁ Rezeptoren, die ebenfalls die PPI beeinflussen, nicht im NAc lokalisiert zu sein (Koch and Hauber, 1998; Schwienbacher *et al.*, 2002).

4.6 Einfluss der Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf Verhaltenssteuerung

Bei Arbeiten, die sich mit der Rolle von Adenosin-Rezeptoren bei der Verhaltenssteuerung beschäftigten, sind in den meisten Fällen systemische Infusionen von Adenosin-Rezeptor-Liganden vorgenommen worden. Die dann beobachteten Verhaltenseffekte lassen in einem solchen Fall keine zuverlässige Aussage zu, welches neuronale Substrat diesen zugrunde liegt. Hier werden die Ergebnisse der Arbeiten vorgestellt, bei denen durch die lokale Applikation des Wirkstoffs direkt in den NAc sichergestellt wurde, dass die Wirkung über akkumbale Adenosin-Rezeptoren vermittelt wurde.

So führte die Aktivierung von Adenosin A_{2A} Rezeptoren im NAc, hervorgerufen durch die lokale Gabe des Adenosin A_{2A} Rezeptor Agonisten CGS21680 zu einer Depression der lokomotorischen Aktivität bei Mäusen (Barraco *et al.*, 1994) und Ratten (Hauber and Munkle, 1997). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Blockade von Adenosin A_{2A} Rezeptoren, allerdings hier im dorsalen Striatum, durch den selektiven Antagonisten MSX-2 eine Erhöhung der spontanen Schnüffelaktivität bei Ratten hervorruft (Hauber *et al.*, 1998).

Sämtliche dieser Effekte, die direkte Hinweise auf die Rolle von Adenosin bei der Verhaltenssteuerung liefern, scheinen durch den A_{2A} Rezeptor vermittelt zu sein, genauso wie ein möglicher Einfluss auf die Gedächtnisbildung (Kopf *et al.*, 1999). Eine neuere Arbeit stellt einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren mit der Steuerung von Fressverhalten und der Körpertemperatur von Ratten her (Coupar and Tran, 2002). Diese Daten wurden, wie auch die von Kopf *et al.* (1999), nach einer systemischen Applikation der Liganden der Adenosin-Rezeptoren gewonnen und liefern wegen der möglichen Beteiligung von peripheren Adenosin-Rezeptoren keinen sicheren Nachweis dafür, dass die beobachteten Effekte zentral vermittelt sind. Inzwischen liegen auch Daten für einen Einfluss des A₁ Rezeptors auf Lokomotion vor (Schwienbacher *et al.*, 2002). *Knock-out* Mäuse, die keinen A₁ Rezeptor exprimierten, zeigten in einer Studie erhöhte Schmerzempfindlichkeit und Ängstlichkeit (Johansson *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis kann wegen der systemischen Wirkung auf die Expression des ubiquitär verteilten A₁ Rezeptors nicht auf ein bestimmtes Areal zurückgeführt werden. Ähnlich schwierig ist die Interpretation des Ergebnisses einer Studie mit *knock-out* Mäusen, die keinen A_{2A} Rezeptor exprimierten. Diese Tiere wiesen ein reduziertes Explorationsverhalten, erhöhte Aggressivität und verstärkte Ängstlichkeit auf (Ledent *et al.*, 1997).

Eine große Anzahl von Arbeiten widmet sich Verhaltenseffekten, die durch die Interaktion von Adenosin und Dopamin induziert werden. Es gilt als gesichert, dass Adenosin eine dem Dopamin entgegen gesetzte Funktion bei der im Striatum lokalisierten Steuerung von psychomotorischem Verhalten hat (Morelli *et al.*, 2002). So hoben Adenosin-Rezeptor-Agonisten z. B. die erhöhte motorische Aktivität auf, die durch eine pharmakologische Aktivierung der Dopamin-Rezeptoren im Striatum induziert wurde (Vellucci *et al.*, 1993; Morelli *et al.*, 1994; Turgeon *et al.*, 1996; Ferre *et al.*, 1997; Rimondini *et al.*, 1998). Die Blockade von Dopamin-Rezeptoren oder eine Inhibition der dopaminergen Transmission im Striatum rief eine Hemmung der Bewegungsinitiation hervor. Dieser Effekt wird durch die Blockade von striatalen Adenosin-Rezeptoren aufgehoben. (Kafka and Corbett, 1996; Hauber *et al.*, 1998; Kanda *et al.*, 1998a; Aoyama *et al.*, 2000; Hauber *et al.*, 2001; Morelli and Wardas, 2001; Morelli *et al.*, 2002). Eine Arbeit mit Dopamin D₂ Rezeptor *knock-out* Mäusen erbrachte den Nachweis, dass Adenosin A_{2A} Rezeptoren auch unabhängig von der Interaktion mit D₂ Rezeptoren an der Steuerung von Verhalten beteiligt sind (Aoyama *et al.*, 2000).

Trotzdem ist nach den Erkenntnissen aus den oben angeführten Arbeiten unbestritten, ob es sich bei Adenosin um einen funktionellen Gegenspieler zu Dopamin handelt. Wie diese Interaktion allerdings endogen generiert wird, also ob z. B. eine phasisch veränderte

Stimulation der Adenosin-Rezeptoren die Ausschüttung von Dopamin im NAc oder die Rezeptoreigenschaften der Dopamin-Rezeptoren im NAc moduliert und sich so auf die Verhaltenssteuerung auswirkt, ist ungeklärt. Inwieweit die verschiedenen Subtypen der Adenosin-Rezeptoren im NAc unter physiologischen Bedingungen endogen stimuliert werden, und wie sich ihre Blockade auf die Verhaltenssteuerung auswirkt, ist ebenfalls noch nicht bekannt.

4.7 Zielsetzung der durchgeführten Arbeiten

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, ist der NAc Teil der limbischen Funktionsschleife, eines neuronalen Netzwerkes, das situationsgerechte Verhaltensweisen positiv verstärkt, die durch biologisch signifikante Stimuli (Futter, Stress) ausgelöst werden. Die Steuerung dieses Verhaltens beruht auf der Modulation durch Dopamin, welches durch die Stimulation von Dopamin-Rezeptoren z.B. die Präsenz eines Hinweissignales in der Umgebung für natürliche Belohnungen wie Futter oder künstliche Belohnungen wie Süchtmittel anzeigt. Von zell- und systembiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass Adenosin als weiterer Modulator an der Steuerung von motiviertem Verhalten teilhaben könnte. Adenosin scheint ein funktioneller Gegenspieler zu Dopamin zu sein. Es handelt sich bei Adenosin um einen Neuromodulator, dessen Freisetzung nicht der eines klassischen Transmitters entspricht. Die Regulation der extrazellulären Adenosin-Konzentration und deren Abhängigkeit von der Aktivierung von Dopamin-Rezeptoren sind, wie eingehend dargelegt wurde, weitgehend unbekannt. So existieren auch keine Informationen darüber, ob sich die extrazellulären Adenosin-Spiegel während der Darbietung von biologisch signifikanten Stimuli verändern. Während die Rolle von Adenosin-Rezeptoren bei der Verhaltenssteuerung mit Hilfe systemischer Manipulationen weitgehend untersucht ist, ist über die Bedeutung der Adenosin-Rezeptoren im NAc bei der Steuerung von Verhalten bisher wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt, um Antworten auf folgende Fragen zu erhalten:

1. Ist extrazelluläres Adenosin im NAc über tonisch aktivierte A_{2A} Rezeptoren an der Steuerung von Verhaltensweisen wie lokomotorischer Aktivität (Exploration) und Fressverhalten sowie am *sensomotoric gating* beteiligt?
2. Verändern sich die extrazellulären Adenosin-Spiegel im NAc bei Darbietung biologisch relevanter Stimuli der Umgebung, die nachweislich zu einer Dopamin-Ausschüttung im NAc führen?

3. Verändern sich die extrazellulären Adenosin-Spiegel im NAc bei Darbietung pharmakologischer Stimuli, die nachweislich zu einer Dopamin-Ausschüttung im NAc führen?
4. Sind Dopamin-Rezeptoren vom Subtyp D₁ oder vom Subtyp D₂ an der Regulation der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc beteiligt?

Diese Fragestellungen wurden in 5 verschiedenen Studien bearbeitet.

5 Kurzbeschreibung der verwendeten Methoden

5.1 Intrazerebrale Mikroinfusion

In der vorgestellten Studie wurde der selektive Adenosin A_{2A} Rezeptor Antagonist MSX-3 durch bilaterale intrazerebrale Mikroinfusionen direkt in den NAc eingebracht. Durch diese lokale Verabreichung des Wirkstoffes konnten die beobachteten Verhaltenseffekte direkt dem Einfluss auf die Neurotransmission im NAc zugeordnet werden. Im Unterschied zu Untersuchungen mit systemischen Applikationen, konnten dadurch störende Nebenwirkungen über Rezeptoren außerhalb des ZNS oder durch Rezeptoren in anderen Hirnarealen ausgeschlossen werden.

Zur Vorbereitung der Mikroinfusionen war es erforderlich, eine stereotaktische Operation an tief narkotisierten Ratten durchzuführen, um auf den NAc ausgerichtete Führungskanülen zu implantieren (Abb. 8). Bei der Mikroinfusion wurde einige Tage nach der OP am wachen Tier durch die Führungskanüle eine verschlauchte Injektionskanüle geschoben, deren Spitze durch die Orientierung der Führungskanüle im NAc platziert wurde (Abb. 9). Mit Hilfe von μ l-Spritzen wurde dann durch die Schläuche über einen Zeitraum von 3 min jeweils 1 μ l Wirkstoff-Lösung oder Saline appliziert. Diese Prozedur war schmerzfrei, da das Gehirn selbst keine Schmerzrezeptoren aufweist, und konnte deshalb am wachen Tier vorgenommen werden.

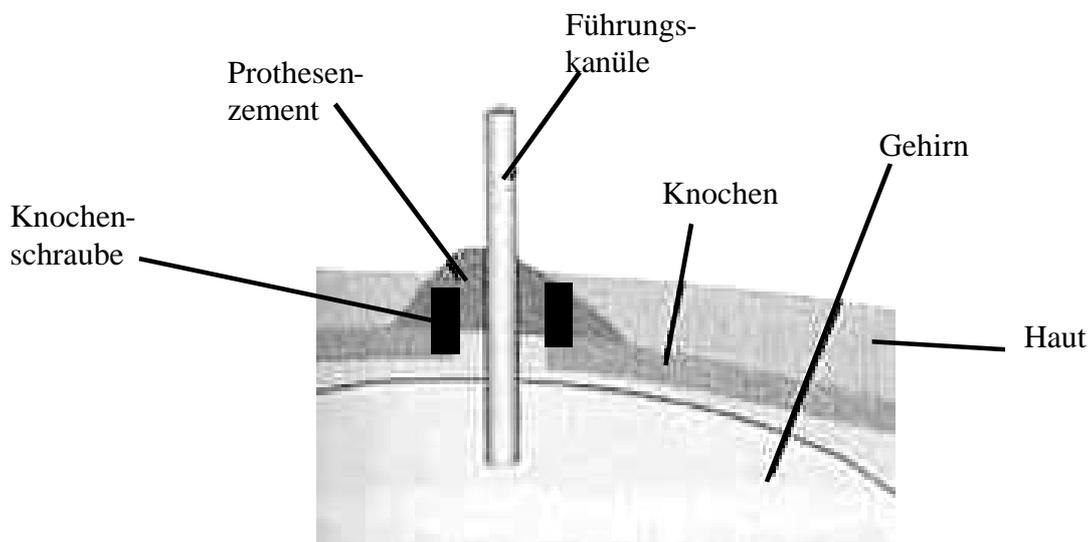


Abb. 8: Aufbau einer implantierten Führungskanüle zur Mikroinfusion;

Abbildung modifiziert nach Carlson (2001).

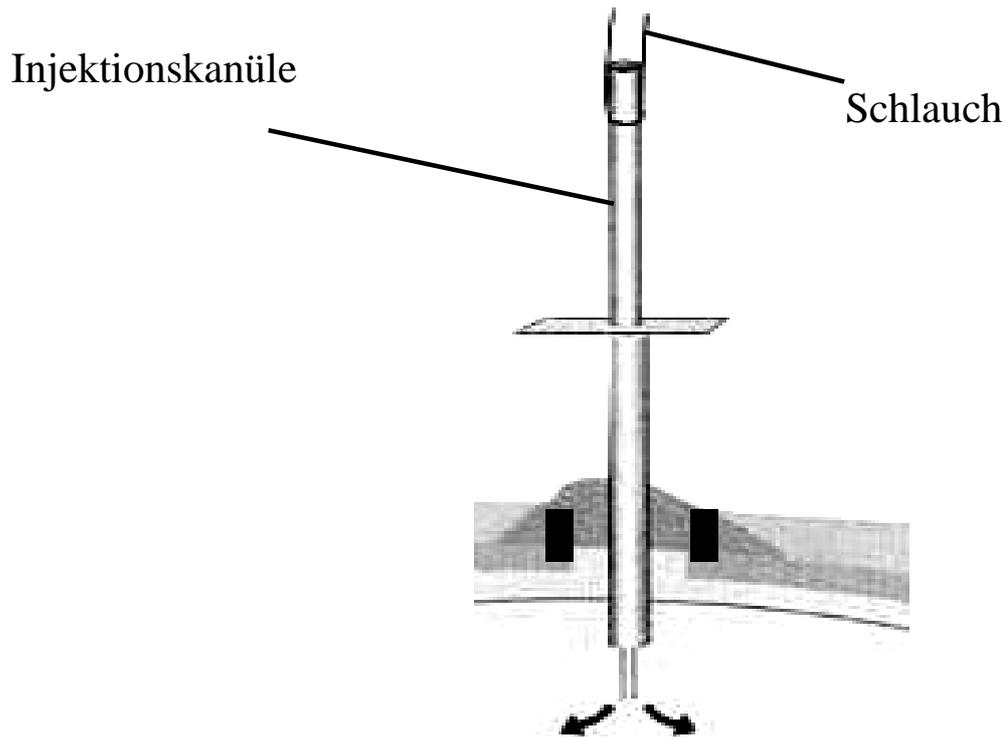


Abb. 9: Schematisierte Darstellung einer Mikroinfusion durch eine verschlauchte Infusionskanüle die mithilfe der Führungskanüle auf den Injektionsbereich ausgerichtet wurde; Abbildung modifiziert nach Carlson (2001).

Zum Abschluss des Experimentes musste der korrekte Injektionsort lokalisiert werden. Dazu wurden die fixierten Gehirne tief gefroren, der Bereich des NAc mit einem Kryostat geschnitten, gefärbt und eingebettet. Aus den 40 bis 60 μM starken Frontalschnitten (Abb. 10) ließen sich über eine mikroskopische Auswertung unter Verwendung von stereotaktischen Atlanten des Rattenhirns (Pellegrino *et al.*, 1981; Paxinos and Watson, 1986) die Injektionsorte überprüfen (Abb. 11). Analog wurde bei der Verifizierung der Lokalisation von Mikrodialyse-Sonden nach der Mikrodialyse vorgegangen.

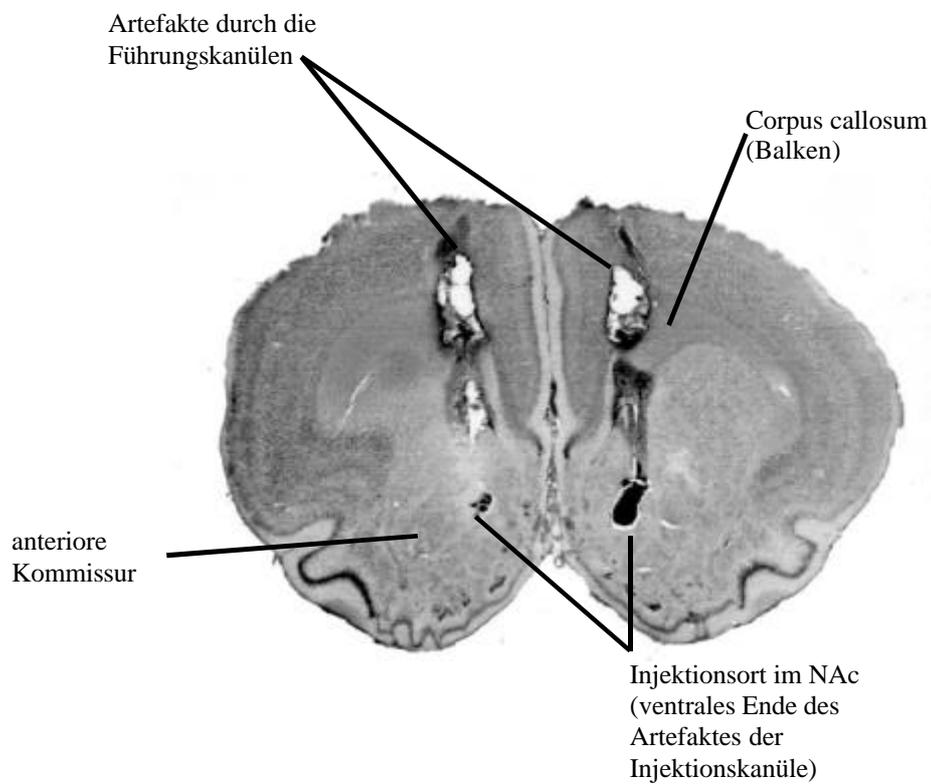


Abb. 10: Schwarz-Weiß Abbildung eines Frontalschnittes durch das Rattenhirn in der Ebene des NAc mit Artefakten durch die bilaterale Mikroinfusion, gefärbt nach Nissl.

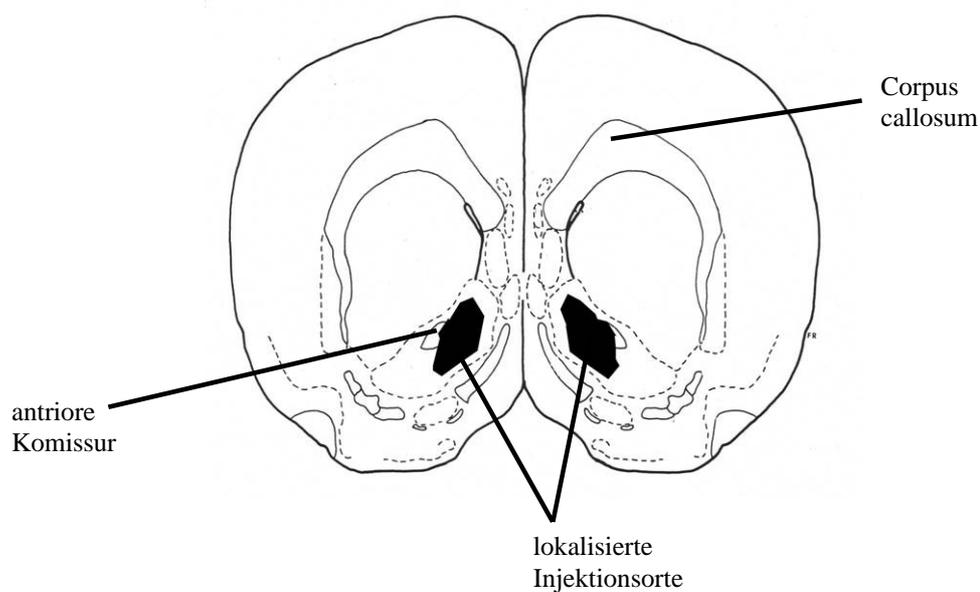


Abb. 11: Schematisierte Darstellung eines Frontalschnittes durch das Rattenhirn 3,2 mm vor Bregma (Pellegrino et al., 1981) mit markierten Injektionsorten von mehreren Tieren.

5.2 Verhaltenstests nach Mikroinfusionen in den Nucleus accumbens

Unmittelbar nach der Mikroinfusion von MSX-3 oder Saline in den NAc wurden Verhaltenstests durchgeführt. Aus früheren Experimenten war bekannt, dass die Wirkung der Substanz ohne Zeitverzug einsetzt (Hauber *et al.*, 1998). Jedes Tier wurde nur jeweils einem Test unterzogen. Insgesamt wurden drei Verhaltensexperimente vorgenommen (Untersuchung der Spontanaktivität (Lokomotion im *open-field*), des Fressverhaltens, der Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion der Ratte), die nachfolgend im Einzelnen beschrieben sind.

5.2.1 Untersuchung der Spontanaktivität (*open-field* Experiment)

Der *open-field* Test kann herangezogen werden, um die spontane Lokomotion des Versuchstieres zu messen. Dazu wird das Tier in eine von Licht und Schall abgeschirmte Box gesetzt auf deren Boden ein Gitternetz aufgezeichnet ist (Abb. 12). Die Beobachtung des rot beleuchteten Versuchsraumes erfolgt über eine Infrarotkamera mit angeschlossenem Videorekorder. Die ermittelte Messgröße ist die Anzahl der kompletten Linienübertritte des Tieres auf dem abgebildeten Gitternetz.

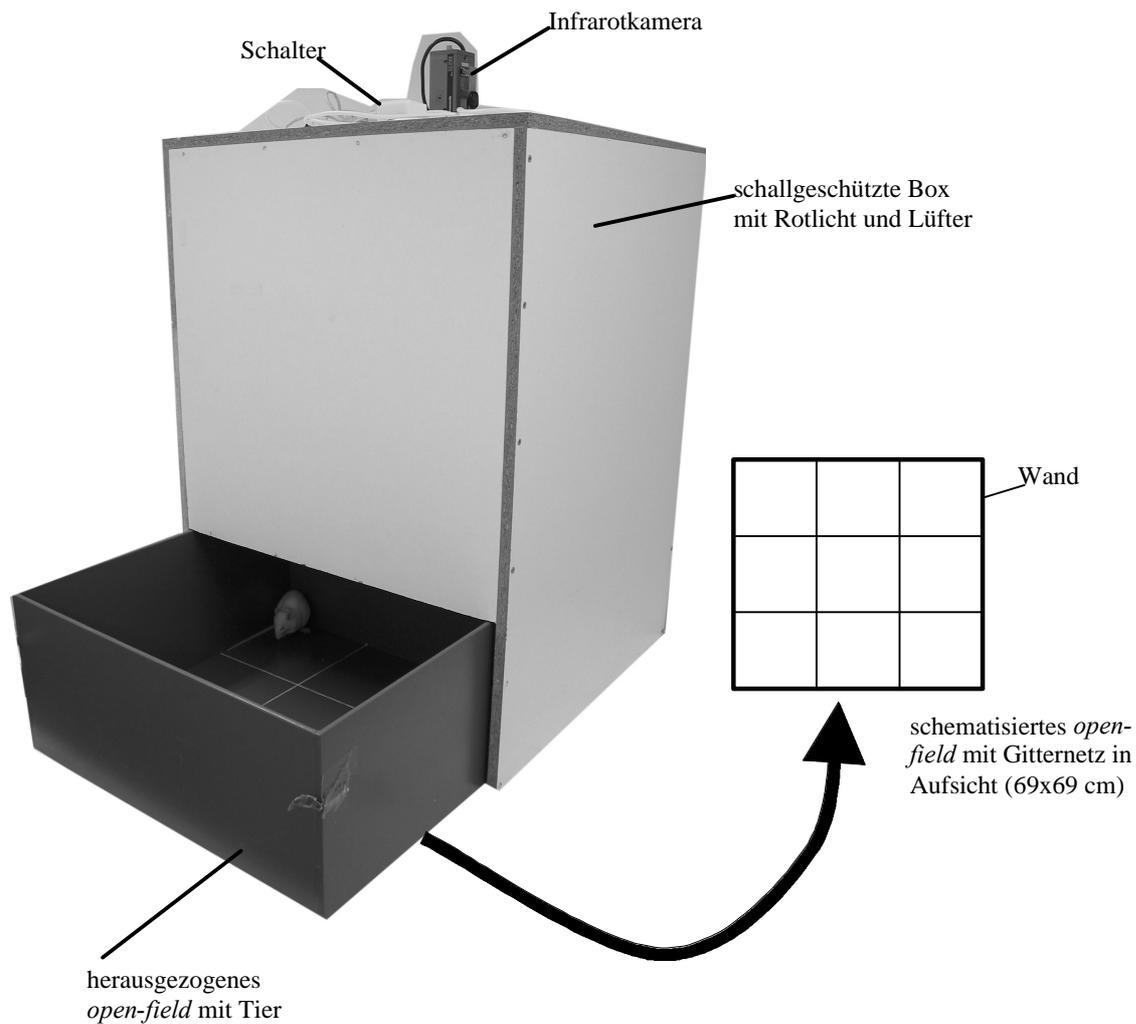


Abb. 12: Apparatur zur Messung der Spontanaktivität (*open field*).

5.2.2 Untersuchung des Fressverhaltens

An den Versuchsaufbau habituierte Tiere werden einzeln für 30 min in Macrolon® Typ III Käfige (37 x 21 x 30 cm) mit Drahtgeflechtboden gesetzt. Während der Versuchszeit steht jeder Ratte eine abgemessene Futtermenge zur Verfügung. Unter dem Drahtgeflechtboden befindet sich ein Papier auf dem verteilte Futterreste zu liegen kommen, so dass diese nach Versuchende gesammelt und gewogen werden können (Bakshi and Kelley, 1991). Die Aktivität der Tiere wird mit einer Videokamera aufgezeichnet. Nach Ablauf der Versuchszeit wird das übrige Futter gewogen. Messgrößen sind in diesem Experiment die aufgenommene Futtermenge, die Latenzzeit bis zum ersten Futterkontakt und die Latenzzeit bis zur ersten Futteraufnahme.

5.2.3 Untersuchung der Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion der Ratte

Das Versuchstier wird in eine Testkammer gesetzt, die sich in einem schallgedämpften, mit Lautsprechern ausgestatteten Schrank befindet. Der Boden der Testkammer ist mit druckempfindlichen Piezo-Elementen bestückt, so dass Erschütterungen und damit rasche Körperbewegungen des Versuchstieres detektierbar sind. Mithilfe dieses Aufbaus kann über eine Verstärkung der elektrischen Signale des Piezo-Elementes die motorische Antwort eines Versuchstieres z. B. nach Darbietung eines akustischen Reizes mit hohem Schalldruckpegel (SPL) gemessen werden (Abb. 13). Die Kontraktionen der Skelettmuskulatur, die durch einen lauten akustischen Stimulus (Schreckreiz) unwillkürlich hervorgerufen werden, bezeichnet man als akustisch ausgelöste Schreckreaktion (ASR) (Übersicht in Koch, 1998, 1999).

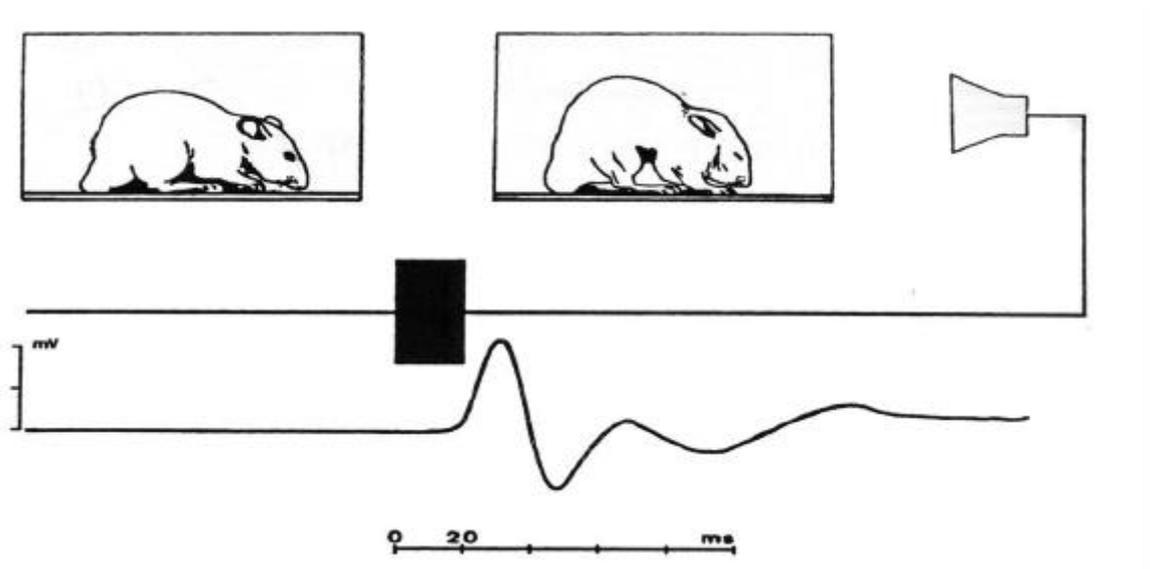


Abb. 13: ASR der Ratte, hervorgerufen durch einen akustischen Stimulus mit hohem Schalldruckpegel und das verstärkte elektrische Signal der Piezo-Elemente, modifiziert nach Koch (1999).

Die Präpulsinhibition ist ein Phänomen, das bei Mensch und Tier zu beobachten ist. Dabei zeigt es sich, dass ein 30-500 ms vor dem Schreckreiz gegebener akustischer Stimulus (Präpuls), der alleine zu keiner ASR führt, eine deutliche Reduzierung der ASR Amplitude durch den Schreckreiz bewirkt (Abb. 14). Dieser Effekt wird als Präpulsinhibition (PPI) bezeichnet. Messgröße in diesem Experiment ist die Stärke der durch die PPI bewirkten Hemmung der ASR, ausgedrückt in Prozent.

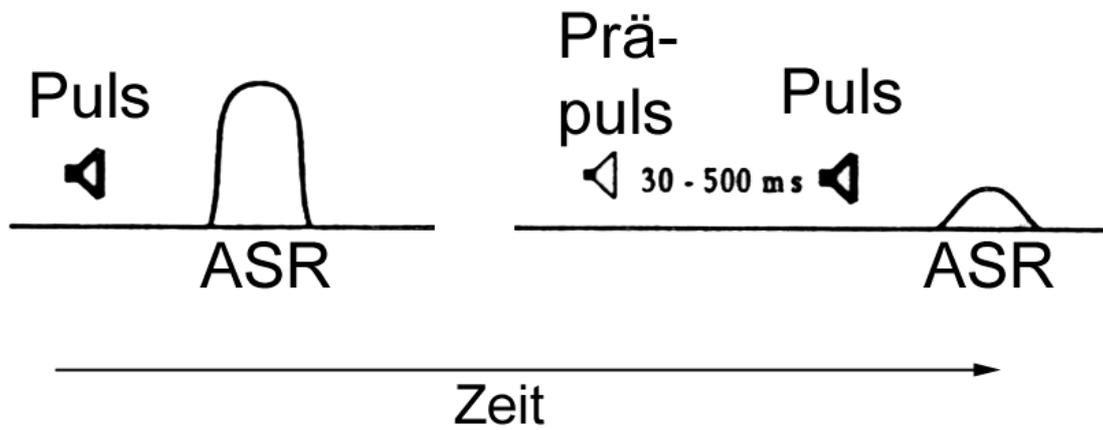


Abb. 14: Schema zur Stärke der ASR nach Darbietung eines Schreckstimulus (Puls) ohne und mit Präpuls, modifiziert nach Koch (1999).

5.3 Prinzip der Mikrodialyse

Die Mikrodialysetechnik liefert eine leistungsfähige Methode mit der Proben zur Analyse des Gehaltes von niedermolekularen Stoffen in Gewebeflüssigkeit gewonnen werden (Ungerstedt, 1986). Dabei handelt es sich um ein miniaturisiertes Dialysesystem, bei dem über eine semipermeable Membran selektiver Stoffaustausch zwischen zwei Flüssigkeiten erfolgt. Für Moleküle, die die Membran passieren können, kommt es zu einem stetigen Angleich der Konzentration bis zum Gleichgewicht. Die treibende Kraft ist Diffusion, die in einem geschlossenen System schließlich einen Konzentrationsgradienten aufheben würde.

Im Falle der Mikrodialysetechnik, einem offenen System, wird eine definierte Salzlösung (Perfusat) mit konstantem, geringem Fluss an der Membran vorbeigeführt, über die der Austausch mit der extrazellulären Gewebeflüssigkeit, hier Zerebrospinalflüssigkeit (CSF), stattfindet (Abb. 15). Das Perfusat ist frei von dem zu analysierenden Stoff, so dass dann der Stoffgehalt in der Probe ein Abbild der extrazellulären Konzentration dieses Stoffes darstellt.

Die Porengröße der verwendeten Membrane verhindert den Durchtritt von Molekülen ab einer bestimmten Masse (hier 20.000 Da). Damit wird ausgeschlossen, dass native Proteine aus dem Gewebe in die gesammelte Probe (Dialysat) gelangen und so das Ergebnis durch ihre metabolische Aktivität verfälschen. Das Dialysat wird kontinuierlich in Probengefäße gesammelt, die in festen zeitlichen Abständen gewechselt werden. So ist eine zeitliche Zuordnung von Proben zu bestimmten Behandlungen möglich. Die eigentliche Analyse des Stoffgehaltes der Proben erfolgt z. B. über Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Durch die Mikrodialysetechnik in Verbindung mit HPLC-Analyse ist eine kontinuierliche Analyse der Veränderungen eines Stoffgehaltes im Extrazellulärraum in einem abgegrenzten Gewebe möglich. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Mikrodialysetechnik besteht in der sog. reversen Mikrodialyse die im folgenden Kapitel vorgestellt wird.

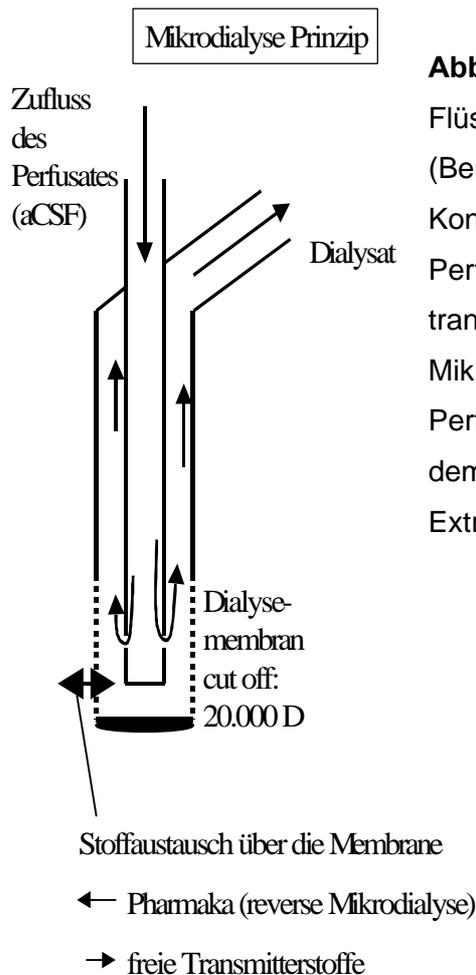


Abb. 15: Schematische Darstellung der Stoff- und Flüssigkeitsströme in einer Mikrodialyse-sonde, nach (Benveniste, 1989). Die Transmitterstoffe folgen dem Konzentrationsgefälle über die Membran in das Perfusat, werden im Dialysat aus der Sonde transportiert und gesammelt. Bei der reversen Mikrodialyse sind z.B. Pharmaka im zugeführten Perfusat gelöst und werden über die Dialysemembran dem Konzentrationsgefälle folgend in den Extrazellulärraum des Gewebes eingetragen.

5.3.1 Applikation von Pharmaka in den Nukleus akkumbens mittels reverser Mikrodialyse

Die Permeabilität der Dialysemembran besteht in beide Richtungen. Daher besteht die Möglichkeit geeignete Pharmaka, die dem Perfusat zugesetzt wurden, gezielt ins Zielgewebe lokal einzutragen. Gleichzeitig kann über das gesammelte Dialysat auf den Einfluss der applizierten Substanzen auf den Stoffgehalt der CSF geschlossen werden. Dieses Verfahren wird reverse Mikrodialyse genannt (Westerink, 1995; Westerink and De Vries, 2001). In der Praxis wird für dieses Verfahren ein Schalter benötigt, um blasenfrei zwischen zwei Perfusionsflüssigkeiten (mit/ohne Pharmakon) umschalten zu können. Dieser ist mit in der Abbildung des Gesamtaufbaus dargestellt (Abb. 18)

5.3.2 Messung der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc mithilfe der Mikrodialyse-Technik

Bei Mikrodialyse im Gehirn besteht das Perfusat aus künstlicher Hirn-Rückenmark-Flüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid (aCSF)*). Um die Handhabung der Mikrodialysetechnik zu erleichtern, wurde in dieser Arbeit eine Modifikation eines standardisierten, kommerziellen Systems verwendet (CMA, Stockholm, Schweden). Dabei ist die Dialysemembran in eine Sonde (CMA/12, CMA, Stockholm, Schweden)(Abb. 16) mit Zu- und Ableitungssystem eingebunden. Zur Anwendung wird die verschlauchte Sonde in eine Führungskanüle eingeführt, die einige Tage zuvor am Schädel des Versuchstiers in einer stereotaktischen Operation implantiert worden ist. Durch die Ausrichtung der Führungskanüle kommt die Dialysemembran im Nucleus accumbens zu liegen (Abb. 17). Durch das Einsetzen der Mikrodialyse-Sonde wird eine akute Gewebeschädigung hervorgerufen, die zu einem massiven, zeitlich begrenzten Ansteigen der extrazellulären Adenosin-Spiegel führt. Durch diesen Effekt kann das Messergebnis verfälscht werden (Ballarin, 1991). Daher ist der zeitliche Abstand zwischen Messungsbeginn und dem Einsetzen der Sonde in das Gewebe bei der Analyse von extrazellulären Adenosin-Konzentrationen besonders zu beachten. Durch die Dauer, die zwischen der vorbereitenden Operation und der Mikrodialyse liegt, kann der Einfluss der Gewebeschädigung auf die Messung reduziert werden. Vorversuche haben gezeigt, dass zwischen dem Einsetzen der Sonde und dem Messbeginn ein zeitlicher Abstand von mindestens 8h einzuhalten ist. Erst dann erreicht der extrazelluläre Adenosin-Gehalt stabile Werte (Ballarin, 1991; Nagel and Hauber, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde grundsätzlich ein zeitlicher Abstand von mindestens 12 h zwischen dem Einsetzen der Sonde und Messbeginn eingehalten

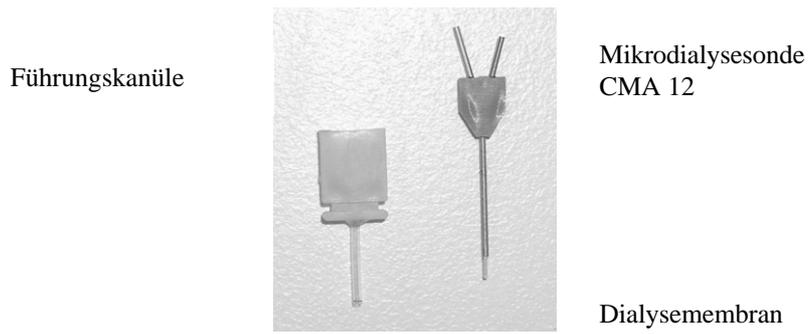


Abb. 16: Mikrodialysetsonde und Führungskanüle (CMA12).

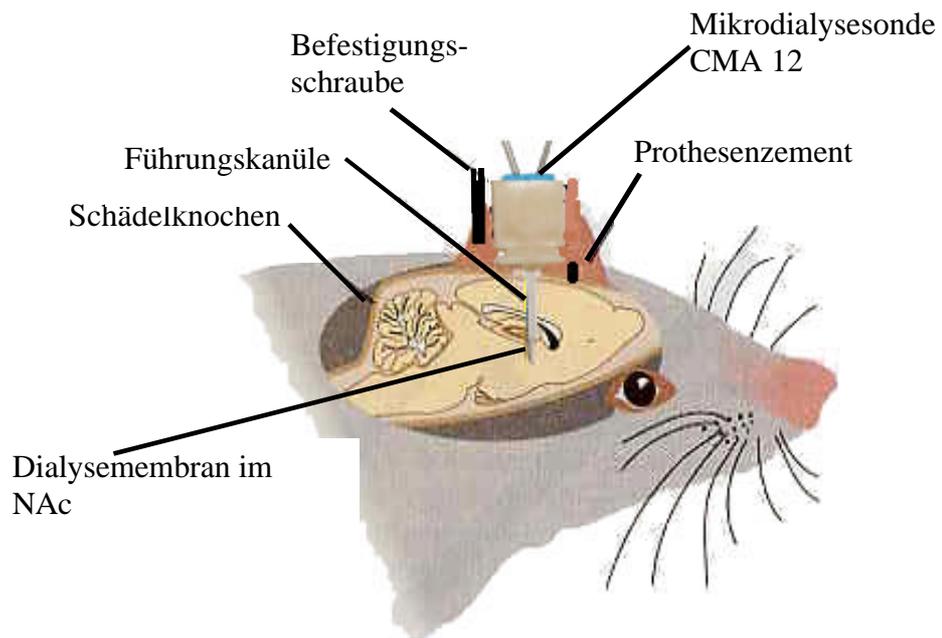


Abb. 17: Schematische Darstellung der Mikrodialysetsonde *in situ*; in Anlehnung an Carlsson (2001).

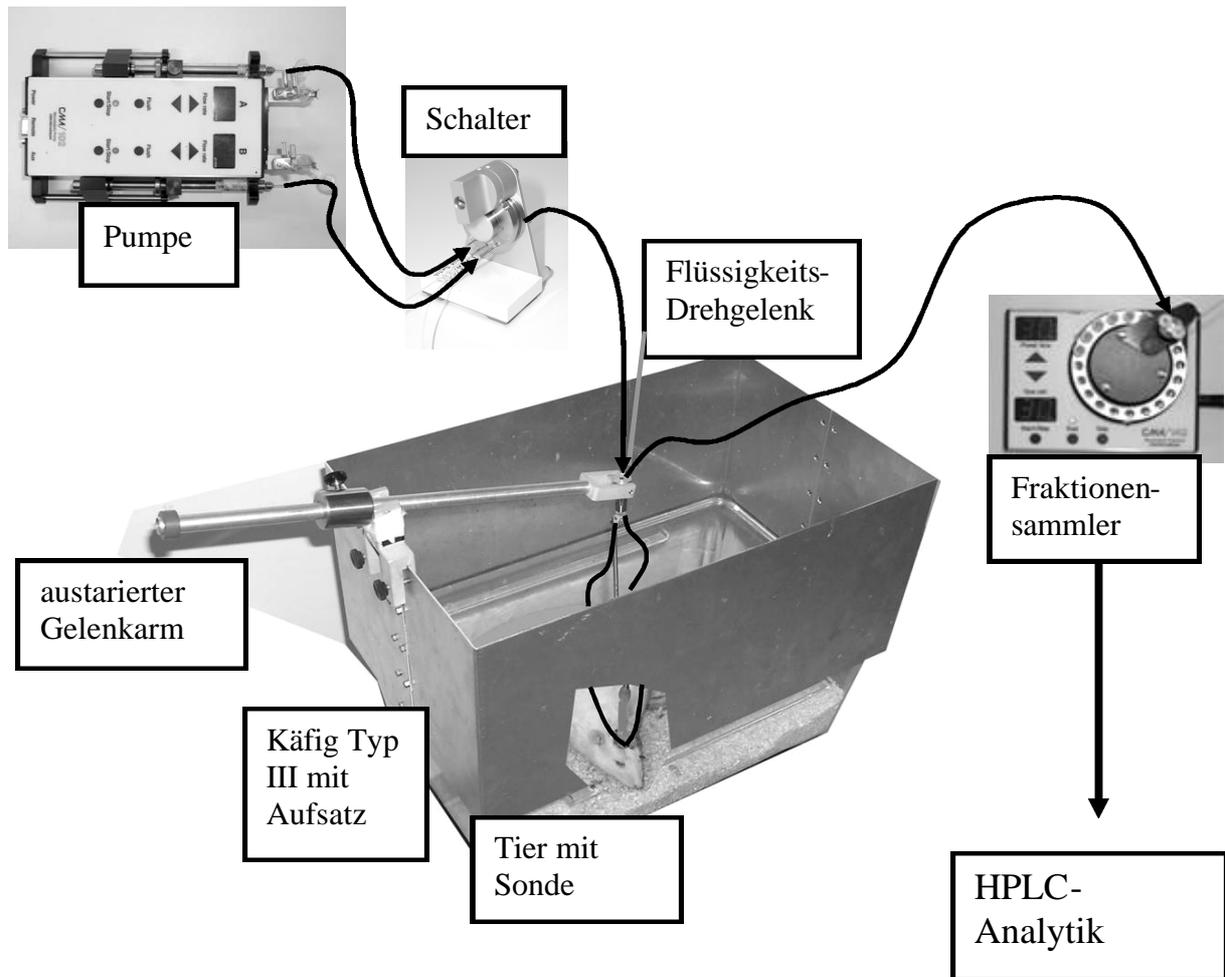


Abb. 18: Versuchsaufbau zur Mikrodialyse. Die Verschlauchung ist durch schwarze Linien vergrößert dargestellt. Die Flussrichtung geht von der Pumpe, über den Schalter, das Flüssigkeits-Drehgelenk am beweglichen Arm durch die Sonde im Tier zurück über das Flüssigkeits-Drehgelenk zum Fraktionensammler.

5.4 Analyse von extrazellulärem Adenosin durch Mikrodialyse mit anschließender Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion

Die Analyse von Adenosin durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion erfolgt über den Nachweis des fluoreszierenden Adenosin-Derivates 1-N6-Ethenoadenosin. Dieses entsteht durch die Derivatisierung von Adenosin mit Chloracetaldehyd. Durch die Erwärmung des Derivatisierungsansatzes auf 90°C ist es möglich, auch mit stark verdünnter Lösung (4,5%) des hochgiftigen Chloracetaldehyds eine verlässliche, quantitative Umsetzung zu 1-N6-Ethenoadenosin nach 45 min zu erreichen (Abb. 19). Durch den Vergleich mit bekannten Standards wurde das Signal von 1-N6-Ethenoadenosin in den Chromatogrammen der Proben identifiziert und quantifiziert (Abb. 20). Eine zusätzliche Verifizierung des Signals wurde durch den Verdau von Adenosin vor der Derivatisierung in Kontrollproben durchgeführt. Dazu wird das selektiv Adenosin abbauende Enzym ADA der Probe zugefügt. Über das anschließende Verschwinden eines Signals kann dessen Spezifität für 1-N6-Ethenoadenosin nachgewiesen werden (Wojcik and Neff, 1982). Die Analyse erfolgte mit einem Standard-HPLC-System.

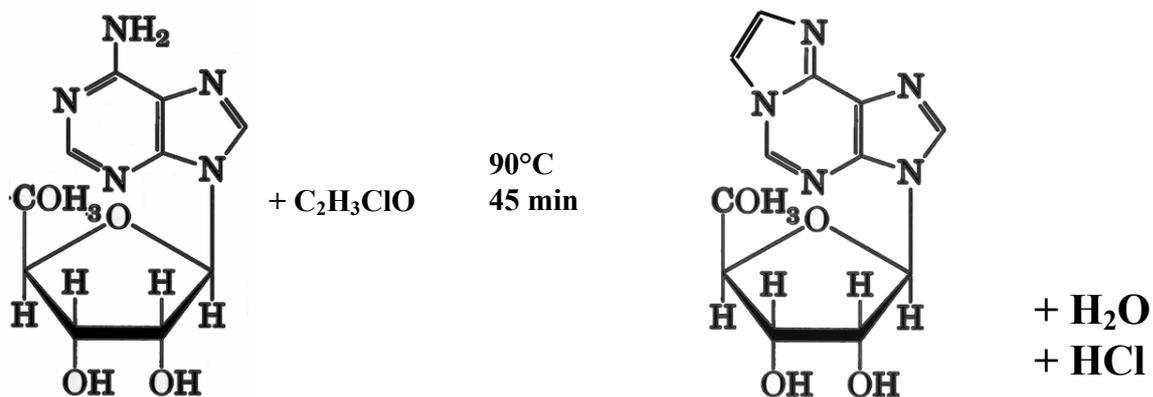


Abb. 19: Derivatisierung von Adenosin und Chloracetaldehyd zu fluoreszierendem 1-N6-Ethenoadenosin.

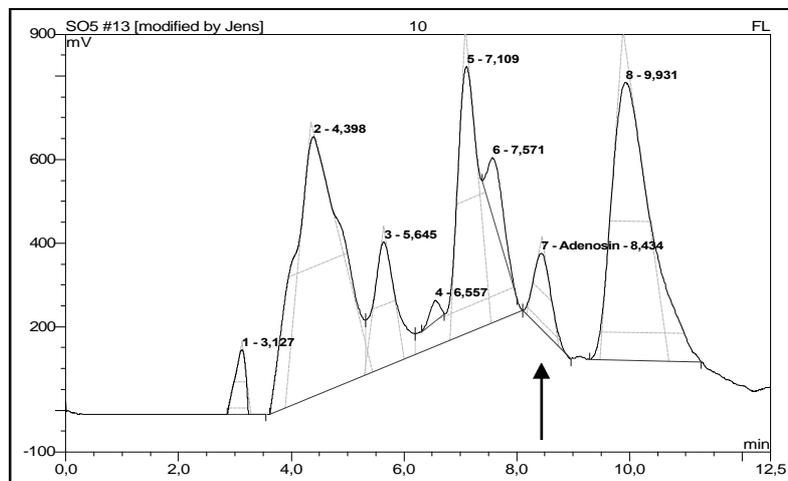


Abb. 20: Beispiel-Chromatogramm zur Analyse des Adenosin-Gehaltes einer Mikrodialyseprobe. Der Pfeil markiert das Signal, das durch 1-N6 Ethenoadenosin hervorgerufen wurde.

6 Durchgeführte Arbeiten

Sämtliche Tierexperimente dieser Arbeit erfolgten nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Stuttgart (AZ 37-9185.81/79; AZ 35-9185.81/135) und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes.

6.1 Übersicht

- **Effects of an Adenosine A_{2A} Receptor Blockade in the Nucleus Accumbens on Locomotion, Feeding, and Prepulse Inhibition in Rats**
(zur Publikation akzeptiert durch Synapse, Wiley-Liss, Inc.)
- **Effects of Salient Environmental Stimuli on Extracellular Adenosine Levels in the Rat Nucleus Accumbens Measured by In Vivo Microdialysis**
(veröffentlicht in Behavioural Brain Research 134:485-492 (Nagel and Hauber, 2002))
- **Reverse Microdialysis of Dopamine D₁ and D₂ Receptor Antagonists Alters Extracellular Adenosine Levels in the Rat Nucleus Accumbens**
(in Begutachtung bei Neurochemistry International)
- **Effekte von biologisch relevanten Stimuli auf den extrazellulären Gehalt von Adenosin und Dopamin im Nucleus accumbens der Ratte**
- **Die lokale Applikation von Amphetamin und Kokain hat keinen signifikanten Einfluss auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt im Nucleus accumbens der Ratte**

**6.2 *Effects of an Adenosine A_{2A} Receptor Blockade in the Nucleus
Accumbens on Locomotion, Feeding, and Prepulse Inhibition in Rats***

Jens Nagel*, Henning Schladebach*, Michael Koch[#],
Isabel Schwienbacher[§], Christa E. Müller^X and Wolfgang Hauber^{*CA}

* Department of Animal Physiology, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart, Germany

Department of Neuropharmacology, University of Bremen, Postfach 33 04 40, D-28334 Bremen, Germany

§ Department of Animal Physiology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, D-72076 Tübingen, Germany

^X Pharmaceutical Institute, University of Bonn, Kreuzbergweg 26, D-53115 Bonn, Germany

^{CA} Corresponding Author: email: Wolfgang.Hauber@po.uni-stuttgart.de; Fax: +49-711-6855090

Running title: Striatal adenosine A_{2A} receptors and behaviour

Keywords: Sensorimotor gating, food intake, locomotor activity, MSX-3, rat

accepted for publication in Synapse, Wiley-Liss, Inc; Copyright © 2003, Wiley-Liss, Inc.

ABSTRACT

The nucleus accumbens (NAc) subserves behaviours governed by natural rewards, i.e. feeding or exploration and has been implicated in control of prepulse inhibition (PPI), a measure of sensorimotor gating. The present study sought to determine whether a tonic stimulation of adenosine A_{2A} receptors in the rat NAc is involved in control of spontaneous locomotor activity, feeding behaviour and PPI. To this end bilateral microinfusions of a prodrug (MSX-3) (3 µg and 5µg in 1 µl per side) of the selective A_{2A} receptor antagonist MSX-2 or vehicle (1 µl per side) were administered into the NAc. Results show that blockade of intra-NAc adenosine A_{2A} receptors by a high (5 µg), not by a low (3 µg), dose of MSX-3 increased locomotor activity in an open field, reduced food intake and delayed intake onset in food deprived rats examined in a test cage with standard laboratory chow. Furthermore PPI was significantly disrupted after intra-NAc infusion of 5 µg, but not of 3 µg, MSX-3. These findings suggest that locomotor activity as well as intact PPI and feeding behaviour rely on tonic activation of intra-NAc A_{2A} receptors. The data add further support to the view that adenosine is a tonically active modulator of striatal function through actions on A_{2A} receptors.

INTRODUCTION

The nucleus accumbens (NAc), a subregion of the ventral striatum, is thought to play a critical role in the selection and execution of adaptive behaviours (Swanson *et al.*, 1997; Kelley, 1999). In particular, the NAc is thought to subserve behaviours governed by natural rewards, i.e. feeding, drinking, sexual behaviour, exploration and instrumental learning (Robbins and Everitt, 1996). Furthermore, the NAc has been implicated in control of prepulse inhibition (PPI), an index of sensorimotor gating measured by the reduction in startle reflex that occurs when a startling stimulus is preceded by a weak prepulse (Koch, 1999). There is consistent evidence that meso-accumbal dopamine is involved in control of locomotion (Phillips *et al.*, 1995; Turgeon *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 1999; Parkinson *et al.*, 1999), feeding (Evans and Vaccarino, 1986; Bakshi and Kelley, 1991; Sills *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1997), and PPI (Swerdlow *et al.*, 1990b; Swerdlow *et al.*, 1990c; Wan and Swerdlow, 1993). In addition, a considerable amount of data shows that the neuromodulator adenosine plays a role opposite to dopamine in the NAc in control of behaviour. Accordingly, dopamine antagonists and adenosine agonists produce similar effects in a number of behavioural tests (Ferre, 1997), e.g. on spontaneous motor activity (Hauber and Munkle, 1997). Adenosine acts on distinct cell-surface receptors coupled to G-proteins which are termed as A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors (Fredholm *et al.*, 1994). In the NAc, A_{2A} receptors are expressed with a high density (Ongini and Fredholm, 1996; Rosin *et al.*, 1998; Ochiishi *et al.*, 1999) and play a critical role in behavioural control (Ferré, 1997). Most information on behavioural effects mediated by A_{2A} receptors in the NAc relies on studies with intracranial infusion of selective agonists. Thus, stimulation of A_{2A} receptors in the NAc inhibits locomotor activity (Barraco *et al.*, 1994; Turgeon *et al.*, 1996; Hauber and Munkle, 1997) and reversed the reduced PPI induced by systemic apomorphine (Hauber and Koch, 1997). The role of intra-NAc A_{2A} receptors in feeding behaviour has not been investigated thus far.

The present study sought to characterize the role of intra-NAc A_{2A} receptors on locomotor activity, PPI and feeding behaviour in more detail. In particular, we wondered whether a tonic stimulation of A_{2A} receptors in the NAc is involved in control of these behaviours. This question has not been addressed in detail because water-soluble and selective A_{2A} receptor antagonists with low affinity to A_{2B} receptors have not been available. Using the novel compound MSX-3, a prodrug of the A_{2A} receptor antagonist MSX-2 (Müller *et al.*, 1998) suitable for intracranial microinfusion, (Hauber *et al.*, 1998; Hauber *et al.*, 2001) we tested the effects of an intra-NAc blockade of A_{2A} receptors on spontaneous locomotion, feeding

behaviour and PPI. MSX-3 is hydrolysed by phosphatases to MSX-2, which shows a 100-fold higher affinity to A_{2A} receptors than for A_1 receptors and is almost inactive at A_{2B} and A_3 receptors (Müller *et al.*, 1998). The initial study described here addressed the role of A_{2A} receptors in the entire NAc and was not intended to discriminate their role in the core and shell subregion of the NAc (Heimer *et al.*, 1991). Therefore, microinfusions were given into the central NAc.

MATERIALS AND METHODS

All animal experiments were conducted according to the current version of the German Law on the Protection of Animals and approved by the proper authorities in Stuttgart, Germany.

Subjects

Male Sprague-Dawley rats (220-280 g; Charles-River, Sulzfeld, Germany, n=63) were housed in a temperature (20 ± 2 °C) and humidity (50 ± 10 %) controlled animal unit. A 12-h light : 12-h dark cycle was maintained with lights on at 06.00 h. Rats used in experiment 1 (n = 15) and 2 (n = 32) were housed in standard Macrolon[®] type IV cages (55 x 35 x 10 cm; Ebeco, Castrup-Rauxel, Germany) in groups up to five. Standard maintenance chow (Altromin, Lage, Germany) was restricted to 15 g per animal and day. Rats used in experiment 3 (n = 20) were housed until surgery in standard Macrolon[®] type IV cages (55 x 35 x 10 cm; Ebeco, Castrup-Rauxel, Germany) in groups up to five. After stereotaxic surgery they were individually housed in Macrolon[®] type III cages (37x21x30 cm, Ebeco, Castrup-Rauxel, Germany). Standard maintenance chow (Altromin, Lage, Germany) was available ad libitum. All animals had free access to water.

Surgery

Rats were anaesthetised with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.) (Sigma, Deisenhofen, Germany) 15 min after pretreatment with atropine sulfate (0.5 mg/kg i.p.) (Research Biochemicals Inc., Natick, USA). Stainless steel guide cannulae (outer diameter: 0.8 mm) aiming at the NAc (AP +3.4 mm, L +/- 1.5 mm relative to bregma and 6.5 mm below dura) were bilaterally implanted according to the atlas of (Pellegrino *et al.*, 1981)). Each animal had at least five days for postoperative recovery.

Drugs and infusion

The phosphate prodrug MSX-3 (disodium salt) of the selective A_{2A} adenosine receptor antagonist MSX-2 (3-(3-hydroxypropyl)-7-methyl-8-(*m*-methoxystyryl)-1-propargylxanthine, (Sauer *et al.* 2000) was dissolved in 0.9% saline. MSX-3 at a dose of 3 µg or 5 µg in 1 µl per side was administered bilaterally into the NAc. Doses were selected according to previous (Hauber *et al.*, 1998, 2001) and pilot studies showing optimal efficacy of MSX-3 with 5 µg in

1 μ l and low efficacy with 3 μ g in 1 μ l after intrastriatal infusion. Infusion cannulae (outer diameter: 0.45 mm) connected via polyethylene tubing to 1 μ l syringes (SGE, Victoria, Australia) were lowered to the final site of infusion. The infusions were made at a rate of 0.5 μ l/min. Infusion cannulae were left in position for an additional minute to allow diffusion of the drug. Thereafter the infusion cannulae were removed, and the animal was placed immediately into the testing apparatus. Controls received bilateral vehicle infusion (1 μ l saline per side) into the NAc.

Experimental Procedures

Three experiments were performed with separate groups of rats. Each animal received only one microinfusion.

Experiment 1. Effects of intra-NAc infusion of the adenosine A_{2A} receptor antagonist MSX-3, 0 μ g (saline)(n=9), 3 μ g (n=11) and 5 μ g (n=8), on locomotor activity was tested in an open field (69 x 69 cm) divided by lines into nine squares. The testing area was illuminated by red light and surrounded by a cubicle providing optical and acoustical isolation. Locomotor activity was monitored by a video recording system and analysed off-line. The day before testing each animal was placed individually into the open field for habituation (10 min). On the test day, the number of line-crossings in a 30-min session was analysed. Analysis was started 6 min after an animal was introduced into the open field. The video records were evaluated by an observer blind to the treatment.

Experiment 2. The effects of intra-NAc infusion of the A_{2A} receptor antagonist MSX-3, 0 μ g (saline)(n=9), 3 μ g (n=5) and 5 μ g (n=6), on feeding behaviour were investigated. At the beginning of experimental testing animals were food deprived for 19 h (Bakshi and Kelley, 1991). Tests were performed in Macrolon® type III cages prepared with a grid floor above a sheet of paper to collect spilled food. The day before the experiment each animal was placed individually for a 2-h habituation session into the test cage. On the test day, the test cage was supplied with a defined amount (9 g) of standard lab chow (Altromin, Lage, Germany) in a food well. The amount of food ingested in 30 min was measured and corrected for spilled food. Each test was video-taped to measure the latency to the first chow contact of the animals' snout as well as latency to the first food intake, i.e. the animal takes a first bite in the food.

Experiment 3. The effects of intra-NAc administration of MSX-3, 0 μg (saline)(n=6), 3 μg (n=4) and 5 μg (n=5), on PPI of the acoustic startle response (ASR) were investigated. The ASR was measured after placing the rat in a wire mesh cage (20 x 10 x 12 cm) mounted on a piezoelectric accelerometer inside a sound attenuated chamber. The voltage output of the accelerometer caused by the rat's motion was amplified and transmitted via a A/D converter to a computer for further analysis. Acoustic stimuli were computer-generated using a function synthesizer (Hortmann, Neckarenzlingen, Germany) and delivered through a loudspeaker mounted at a distance of 40 cm from the test cage. All intensity measurements were done with a 0.5 inch condenser microphone and a measuring amplifier (Brüel & Kjaer, Copenhagen, Denmark) after band pass filtering (frequency range: 0.25-80 kHz). The whole body ASR amplitude was calculated from the difference between the maximum voltage output of the accelerometer during 80 ms after and during 80 ms before the onset of the acoustic startle stimulus. The test session included an initial startle stimulus followed by four different trials given in a pseudo-random order: 1. Pulse alone (100 dB SPL broad band noise bursts, 20 ms duration), 2. Prepulse (75 dB SPL 10 kHz tone pulse, 20 ms duration including 0.4 ms rise/fall times) followed by a pulse 100 ms after prepulse onset, 3. prepulse alone, and, 4. no stimulus. Background noise intensity was 55 dB SPL. A total of 5 presentations of each trial type was given with an interstimulus interval of 30 s. PPI was calculated as the difference between the pulse alone trials and the prepulse-trials and expressed as percent PPI [$100 \times (\text{mean ASR amplitude on pulse alone trials} - \text{mean ASR amplitude on prepulse trials} / \text{mean ASR amplitude on pulse alone trials})$]. The responses to the single pulse at the beginning of the test session were discarded.

Histological analysis

After completion of testing, animals were killed by an overdose of pentobarbital (150 mg/kg). The brains were removed and placed in 10 % formalin for 2.5 hours and immersed in 30% (w/v) sucrose for at least two days. Brains were frozen and cryosections through the injection site were taken with cryostat (Reichert and Jung, Heidelberg, Germany). The location of the infusion side was verified in frontal sections (60 μm) stained by Cresyl Violet (Fig.1).

Data analysis

Results are expressed as means + standard error of the mean (SEM). Data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors' correction. Normally distributed data were analysed using a parametric one way analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison procedure (Tukey-Test). Data not normally distributed were analysed using a Kruskal-Wallis ANOVA on ranks followed by a multiple comparison procedure after Dunn's method for unequal sample sizes if appropriate. The alpha level of statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were carried out using the SigmaStat software package (Vers 2.0, Jandel, Erkrath, Germany).

RESULTS

Experiment 1: Effect of intra-NAc A_{2A} receptor blockade on locomotion

Infusions of MSX-3 into the NAc resulted in an increase in locomotion (Kruskal-Wallis ANOVA: $H=7.008$; d.f.=2; $N=28$; $p<0.05$) (Fig.2A) induced within 30 min. This effect was significant with 5 μg MSX-3 (multiple comparisons MSX-3 vs. saline; Dunn's method: diff. of ranks=9.229, $Q=2.406$, $p<0.05$), but not with 3 μg MSX-3 (diff. of ranks=7.712, $Q=2.174$, $p>0.05$). Time course of locomotor activity of all treatment groups is depicted in Fig. 2B.

Experiment 2: Effects of intra-NAc A_{2A} receptor blockade on feeding behaviour

Infusions of MSX-3 into the NAc significantly decreased food intake (ANOVA; $F_{(2,17)} = 4.946$; $p < 0.05$) (Fig.3). Post hoc analysis revealed that the amount of food consumed was significantly reduced after 5 μg MSX-3 (multiple pair-wise comparisons; Tukey test: MSX-3 vs. saline: diff. of means=2.035; $q=4.20$; $p<0.05$), but not after 3 μg MSX-3 (Tukey test: MSX-3 vs. saline: diff. of means=1.510; $q=2.944$; $p>0.05$).

The latency to the first food ingestion was increased significantly after infusion of 5 μg MSX-3 (Kruskal-Wallis ANOVA; $H=7,680$; d.f.=2; $p<0.05$)(Fig. 4) (multiple pair-wise comparisons; Dunn's method: MSX-3 vs. saline: diff. of ranks=8.444; $Q=2.712$; $p<0.05$), but not of 3 μg (Dunn's method MSX-3 vs. saline: diff. of ranks=1.644; $Q=0.499$; $p>0.05$). In contrast, the latency to the first snout contact with food was not altered by infusion of MSX-3 into the NAc (ANOVA; $F_{(2,17)} = 0.817$; $p>0.05$)(Fig.5).

Experiment 3: Effects of intra-NAc A_{2A} receptor blockade on PPI

As shown in Fig.6 MSX-3 infusion into the NAc affected the PPI (ANOVA; $F_{(2,12)} = 5.294$; $p<0.05$). Post hoc analysis (Tukey test; multiple pair-wise comparisons) revealed that PPI was significantly reduced after 5 μg MSX-3 (MSX-3 vs. saline: difference of means=64.737; $q=3.844$ $p<0.05$; MSX-3 5 μg vs. MSX-3 3 μg : difference of means=76.401; $q=4.095$; $p<0.05$), while 3 μg MSX-3 had no effect (MSX-3 vs. saline: difference of means=11.664; $q=0.650$; $p>0.05$). The mean ASR amplitude was not significantly altered by MSX-3 in either dose (Tab. I)

DISCUSSION

Using infusions of the water-soluble phosphate prodrug MSX-3 of the selective A_{2A} adenosine receptor antagonist MSX-2, the present study provides evidence that locomotor activity as well as intact sensorimotor gating and feeding behaviour relies on tonic activation of intra-NAc A_{2A} receptors.

Locomotor activity

Previous studies consistently demonstrated locomotor stimulation after systemic blockade of A_{2A} receptors in rats (Svenningsson *et al.*, 1997a; Halldner *et al.*, 2000) and mice (Ferre *et al.*, 2001). In addition, intra-NAc stimulation of A_{2A} receptors inhibited locomotor activity (Barraco *et al.*, 1994; Turgeon *et al.*, 1996; Hauber and Munkle, 1997). While these investigations strongly implicate an involvement of A_{2A} receptors in locomotor control, evidence for a role of tonic stimulation of A_{2A} receptors in locomotor control was lacking since selective antagonists suitable for intracerebral infusion were not available. The present data reveal that intra-NAc blockade of A_{2A} receptors by the higher dose of MSX-2 enhanced locomotion in an open field. The locomotor effects induced by the lower dose were not significant probably due to considerable inter-individual variability. Inspection of the magnitude and time course of locomotor effects revealed that MSX-2 did not elicit a massive and persistent stimulation as elicited by intra-NAc amphetamine (van den Boss *et al.*, 1988; Essman *et al.*, 1993). Rather, there was a moderate MSX-2-induced increase of locomotor activity which declined due to habituation and/or decreasing efficacy of the drug. In contrast, vehicle controls displayed low levels of locomotor activity during the complete observation period which is probably due to pre-test habituation. Moderate behavioural effects have been also observed after blockade of A_{2A} receptors in the caudate-putamen of rats: infusion of higher doses of MSX-3 (9 μg) as used here did not induce stereotyped sniffing as seen after intrastriatal infusion of dopamine agonists (Kelley and Delfs, 1994), but a modest, albeit significant enhancement of sniffing activity (Hauber *et al.*, 1998). Extracellular concentrations of adenosine in the NAc are presumably high enough (Nagel and Hauber, 2002) to stimulate a significant proportion of A_{2A} receptors (Daly and Fredholm, 1998). Hence, the moderate locomotor effects might be explained by a partial A_{2A} receptor blockade produced by MSX-2. Alternatively, blockade of intra-NAc A_{2A} receptors might be complete, but failed to induce pronounced hyperlocomotion. In line with this later notion, massive locomotor stimulation was observed only after a simultaneous blockade of A_{2A} and A_1 receptors (Jacobson *et al.*, 1993). By virtue of its connectivity and histochemical profile the

NAc has been subdivided into at least two major subcomponents, core and shell (Heimer *et al.*, 1991) which might subservise distinct behavioural functions (Kelley, 1999). Both subregions have been implicated in locomotor control as excitotoxic lesions of core or shell both produced changes in locomotor activity and open field behaviour (Maldonado-Irizarry and Kelley, 1995). The present study was not intended to differentiate the role of A_{2A} receptors in core and shell subregions of the NAc. Thus it is difficult to delineate whether locomotor effects measured here were brought about by the NAc core or shell (or both) as infusions were directed into the more central part of the NAc.

Feeding behaviour

Blockade of intra-NAc A_{2A} receptors had dose-dependent and prominent effects on feeding behaviour, i.e. food intake was decreased and onset of feeding was delayed. It is unlikely that these effects are simply due to motor inhibition, because (1) the latency to the first food contact was unchanged after intra-NAc MSX-2, and, (2) results from experiment 1 showed that locomotor activity was enhanced by MSX-2. The shell subregion of the NAc has been suggested to be a central integrator of feeding (Kelley, 1999) as inhibition of striatal GABAergic projection neurons by muscimol or DNQX in the shell activated feeding involving disinhibition of neurons in the lateral hypothalamus (Stratford *et al.*, 1997, 1999). Thus, one possibility is that MSX-2 might inhibit feeding behaviour per se by drug actions within the shell. Alternatively, the MSX-2-induced inhibition of feeding behaviour might be due to other behavioural effects induced by its intra-NAc actions. Among these, an increased switching as observed after intra-NAc amphetamine is unlikely to account for the pattern of behavioural changes induced by MSX-2. In a detailed analysis of the effects of intra-NAc amphetamine on feeding, food intake was decreased but feeding onset time was unchanged (Bakshi and Kelley, 1991) and not reduced as observed here. Yet, the observation that the latency to the first food contact was unchanged suggests that intra-NAc A_{2A} receptor blockade left food approach behaviour intact. However, feeding onset time in experiment 2 corresponds with the time locomotor activity started markedly to decline in experiment 1. This tentatively suggests that by blocking the actions of adenosine on intra-NAc A_{2A} receptors, MSX-2 might stimulate locomotor activity and inhibit consumatory behaviour, i.e. feeding behaviour. Thus, the decrease in food intake most probably reflects behavioural competition, i.e. as long as MSX-2 induced locomotor stimulation, animals were less capable of focusing on stationary feeding behaviour. Indirect support for this notion is provided by studies showing that systemic and intra-NAc administration of the selective A_{2A} receptor agonist CGS21680

inhibited locomotor activity (Barraco *et al.*, 1994; Turgeon *et al.*, 1996; Hauber and Munkle, 1997), while systemic administration of CGS21680 enhanced feeding (Coupar and Tran, 2002).

Prepulse inhibition

Previous studies suggest an involvement of intra-NAc A_{2A} receptors in control of PPI because infusion of the selective agonist CGS21680 counteracted reduced PPI after systemic treatment with apomorphine (Hauber and Koch, 1997). In keeping with this data, experiment 3 demonstrates that intra-NAc blockade of A_{2A} receptors by a high, not low, dose of MSX-3 abolished PPI. The effects of MSX-2 might be brought about by actions within the core and/or shell of the NAc as both subregions have been implicated in regulation of PPI (Kodsi and Swerdlow, 1997). The interpretation of PPI data is limited, firstly because for unknown reasons PPI in controls was low compared to other studies. However, baseline levels of PPI show strain differences and within-strain differences depending on the animal supplier (Kinney *et al.*, 1999; Swerdlow *et al.*, 2000). Furthermore, Swerdlow *et al.* (2000) demonstrated that PPI-disruptive effects of apomorphine occurred regardless of the level of the baseline. Thus, PPI though having low basal levels in our study are likely to be sensitive to effects of MSX-2. Secondly, the high dose of MSX-2 produced strong reduction of PPI resulting in a negative PPI per cent value. Thus the inhibition of pulse-induced startle responding mediated by the prepulse was completely abolished and the prepulse even facilitated pulse-induced startle responding. Facilitative effects of the prepulse on pulse-induced startle responding have been observed occasionally, e.g. after NMDA infusion into the hippocampus (Klarner *et al.*, 1998). However, the mechanism underlying this phenomenon is unknown at present. A prominent increase of vigilance known to be induced by unselective adenosine receptor antagonists such as caffeine (Nehlig *et al.*, 1992) is one potential effect of MSX-2 which could explain in part facilitative effects of the prepulse on pulse-induced startle responding. Regardless of these limitations, the present data indicate a role of intra-NAc A_{2A} receptor in control of PPI.

Implications for the role of intra-NAc A_{2A} receptors in control of behaviour

A_{2A} receptors have been detected in the NAc shell and core by recombinant monoclonal antibodies with a similar intensity of labelling in both subregions (Rosin *et al.*, 1998). Furthermore, studies with systemic administration of A_{2A} receptor selective ligands and intra-

NAC infusion of A_{2A} receptor agonists suggest that A_{2A} receptors in the NAc are involved in behavioural control (Hauber and Koch, 1997; Svenningsson *et al.*, 1997b; Koch and Hauber, 1998; Rimondini *et al.*, 1998). Using a water-soluble and selective A_{2A} receptor antagonist, the present data provide evidence that locomotor activity as well as intact PPI and feeding behaviour rely on tonic activation of intra-NAc A_{2A} receptors on core and/or shell neurones in the NAc. The data add further support to the general notion that adenosine is a tonically active modulator of striatal function through actions on A_{2A} receptors (Svenningsson *et al.*, 1999).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha2340/1-4).

6.2.1 REFERENCES

Bakshi, VP, Kelley AE. 1991. Dopaminergic regulation of feeding behavior: II. Differential effects of amphetamine microinfusions into three striatal subregions. *Psychobiology* 19: 233-242

Barraco RA, Martens KA, Parizon M, Normile HJ. 1994. Role of adenosine A_{2A} receptors in the nucleus accumbens. *Prog Neuropsychopharm Biol Psychiatr* 18:545-553.

Coupar IM, Tran BL. 2002. Effects of adenosine agonists on consumptive behaviour and body temperature. *J Pharm Pharmacol* 54:289-294.

Daly JW, Fredholm BB. 1998. Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend* 51:199-206.

Essman WD, McGonigle P, Lucki I. 1993. Anatomical differentiation within the nucleus accumbens of the locomotor stimulatory actions of selective dopamine agonists and d-amphetamine. *Psychopharmacology* 112:233-241.

Evans KR, Vaccarino FJ. 1986. Intra-Nucleus Accumbens Amphetamine: Dose-Dependent Effects on Food Intake. *Pharmacol Biochem Behav* 25:1149-1151.

Ferre S. 1997. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 133:107-120.

Ferre S, Popoli P, Gimenez-Llort L, Rimondini R, Müller CE, Strömberg I, Ögren SO, Fuxe K. 2001. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord* 7:235-241.

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-156.

Gong W, Neill DB, Lynn M, Justice JB Jr. 1999. Dopamine D₁/D₂ agonists injected into nucleus accumbens and ventral pallidum differentially affect locomotor activity depending on site. *Neuroscience* 93:1349-1358.

Halldner L, Lozza G, Lindstrom K, Fredholm BB. 2000. Lack of tolerance to motor stimulant effects of a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 406:345-354.

Hauber W, Koch M. 1997. Adenosine A_{2A} receptors in the nucleus accumbens modulate prepulse inhibition of the startle response. *Neuroreport* 8:1515-1518.

Hauber W, Munkle M. 1997. Motor depressant effects mediated by dopamine D₂ and adenosine A_{2A} receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen. *Eur J Pharmacol* 323:127-131.

Hauber W, Nagel J, Sauer R, Müller CE. 1998. Motor effects induced by a blockade of adenosine A_{2A} receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport* 9:1803-1806.

Hauber W, Neuscheler P, Nagel J, Müller CE. 2001. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D₁ and D₂ receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A_{2A} receptors in the caudate-putamen of rats. *Eur J Neurosci* 14:1287-1293.

Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. 1991. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89-125

Jacobson KA, Nikodijevic O, Padgett WL, Gallo-Rodriguez C, Maillard M, Daly JW. 1993. 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A₂-adenosine antagonist in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 323:141-144.

Kelley AE. 1999. Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology* 27:198-213.

Kelley AE, Delfs JM. 1994. Excitatory amino acid receptors mediate the orofacial stereotypy elicited by dopaminergic stimulation of the ventrolateral striatum. *Neuroscience* 60:85-95.

Kinney GG, Wilkinson LO, Saywell KL, Tricklebank MD. 1999. Rat strain differences in the ability to disrupt sensorimotor gating are limited to the dopaminergic system, specific to prepulse inhibition, and unrelated to changes in startle amplitude or nucleus accumbens dopamine receptor sensitivity. *J Neurosci* 19:5644-5653.

Klarner A, Koch M, Schnitzler H-U. 1998. Induction of fos-protein in the forebrain and disruption of sensorimotoric gating following n-methyl-d-aspartate infusion into the ventral hippocampus of the rat. *Neuroscience* 84:443-452.

Koch M. 1999. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59:107-128.

Koch M, Hauber W. 1998. Regulation of sensorimotor gating by interactions of dopamine and adenosine in the rat. *Behav Pharmacol* 9:23-29.

Kodsi MH, Swerdlow NR. 1997. Reduced prepulse inhibition after electrolytic lesions of nucleus accumbens subregions in the rat. *Brain Res* 773:45-52.

Maldonado-Irizarry CS, Kelley AE. 1995. Excitotoxic lesions of the core and shell subregions of the nucleus accumbens differentially disrupt body weight regulation and motor activity in rat. *Brain Res Bull* 38:551-559.

Müller CE, Sauer R, Maurinsh Y, Fülle F, Nagel J, Hauber W. 1998. Water-soluble prodrug of potent A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *Drug Dev Res*:190-197.

Nagel J, Hauber W. 2002. Effects of salient environmental stimuli on extracellular adenosine levels in the rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis. *Behav Brain Res* 134(1-2):485-492

Nehlig A, Daval J-L, Debry G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 17: 139-170.

Ongini E, Fredholm BB. 1996. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. *Trends Pharmacol Sci* 17:364-372.

Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ. 1999. Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J Neurosci* 19:2401-2411.

Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. 1981. A stereotaxic atlas of the rat brain. — Plenum Press, New York, London.

Popoli P, Reggio R, Pezzola A, Fuxe K, Ferre S. 1998. Adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. *Neurosci Lett* 251:201-204

Phillips GD, Howes SR, Whitelaw RB, Robbins TW, Everitt BJ. 1995. Analysis of the effects of intra-accumbens SKF-38393 and LY-171555 upon the behavioural satiety sequence. *Psychopharmacology (Berl)* 117:82-90.

Rimondini R, Ferre S, Gimenez-Llort L, Ogren SO, Fuxe K. 1998. Differential effects of selective adenosine A₁ and A_{2A} receptor agonists on dopamine receptor agonist-induced behavioural responses in rats. *Eur J Pharmacol* 347:153-158.

Robbins TW, Everitt BJ. 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6:228-36.

Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J. 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 401:163-186.

Sauer R, Maurinsh J, Reith U, Fülle F, Klotz K-N, Müller CE. 2000. Water-soluble phosphate prodrugs of 1-propargyl-8-styrylxanthine derivatives, A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, 43:440-448.

Sills TL, Baird JP, Vaccarino FJ. 1993. Individual differences in the feeding effects of amphetamine: role of nucleus accumbens dopamine and circadian factors. *Psychopharmacology* 112:211-218.

Stratford TR, Kelley AE. 1997. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 17: 4434-4440.

Stratford TR, Kelley AE. 1999. Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci* 19:11040-11048.

Svenningsson P, Le Moine C, Kull B, Sunahara R, Bloch, B, Fredholm BB. (1997a). Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. *Neuroscience* 80:1171-1185.

Svenningsson P, Nomikos GG, Ongini E, Fredholm BB. 1997b. Antagonism of adenosine A_{2A} receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience* 79:753-764.

Swanson CJ, Heath S, Stratford TR, Kelley AE. 1997. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 58:933-945.

Swerdlow NR, Braff DL, Masten VL, Geyer MA. 1990a. Schizophrenic-like sensorimotor gating abnormalities in rats following dopamine infusion into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 101:414-420.

Swerdlow NR, Mansbach RS, Geyer MA, Pulvirenti L, Koob GF, Braff DL. 1990b. Amphetamine disruption of prepulse inhibition of acoustic startle is reversed by depletion of mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology* 100:413-416.

Swerdlow NR, Martinez ZA, Hanlon FM, Platten A, Farid M, Auerbach P, Braff DL, Geyer MA. 2000. Toward understanding the biology of a complex phenotype: rat strain and substrain differences in the sensorimotor gating-disruptive effects of dopamine agonists. *J Neurosci* 20:4325-4336.

Turgeon SM, Pollack AE, Schusheim L, Fink JS. 1996. Effects of selective adenosine A₁ and A_{2A} agonists on amphetamine-induced locomotion and c-Fos in striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 707:75-80.

van den Boss R, Cools A R, Ogren SO. 1988. Differential effects of the selective D₂-antagonist raclopride in the nucleus accumbens of the rat on spontaneous and d-amphetamine-induced activity. *Psychopharmacology* 95:447-451.

Wan FJ, Swerdlow NR 1993. Intra-accumbens infusion of quinpirole impairs sensorimotor gating of acoustic startle in rats. *Psychopharmacology* 113:103-109.

Tab. I. Effects of MSX-3 on startle amplitude

Treatment	mean ASR amplitude + SEM	
	Pulse alone	prepulse plus pulse
MSX-3 0 μg (vehicle)	161.27 + 37.03	146.1 + 103.64
MSX-3 3 μg	89.5 + 18.67	50.95 + 12.35
MSX-3 5 μg	127.12 + 20.20	189 + 48.64

Fig.1 Location of injection sites in the NAc. The schematics depict the location of injection cannulae tips in the NAc for all rats used for data analysis. Plates are adaptations from the atlas of Pellegrino *et al.* (1981). Numbers beside each plate correspond to millimeters anterior to bregma.

Fig. 2. Effects of intra-NAc administration of 0 (saline) (n=9), 3 (n=11) or 5 μ g (n=8) MSX-3 on locomotion in an open-field determined by the number of line-crossings in 30-min test session. **A:** Number of line crossing within 30 min. Values are means + SEM, *p<0.05, significant difference from vehicle (Kruskal-Wallis ANOVA followed by a Dunn`s post hoc test). **B:** Number of line crossing in 5-min intervals. Values are means of treatment groups.

Fig. 3. Effects of intra-NAc administration infusion of 0 (saline) (n=9), 3 (n=5) or 5 μ g (n=6) MSX-3 on the amount of ingested food. Values are means + SEM, *p<0.05 (one-way ANOVA followed by a Tukey`s post hoc test).

Fig. 4. Effects of intra-NAc administration of infusion of 0 (saline) (n=9), 3 (n=5) or 5 μ g (n=6) MSX-3 on the latency until the first intake of food by the animals. Values are means + SEM, *p<0.05, significant difference from vehicle (Kruskal-Wallis ANOVA followed by a Dunn`s post hoc test).

Fig. 5. Effects of intra-NAc administration of infusion of 0 (saline) (n=9), 3 (n= 5) or 5 μ g (n=6) MSX-3 on the latency until the first snout contact to the presented food pellets. Values are means + SEM.

Fig. 6. Effects of intra NAc administration of infusion of 0 (saline) (n=6), 3 (n=4) or 5 μ g (n=5) MSX-3 on PPI of the ASR. Values are means + SEM, *p<0.05, significant difference from vehicle and 3 μ g MSX-3 (one-way ANOVA followed by a Tukey`s post hoc test).

Fig. 1

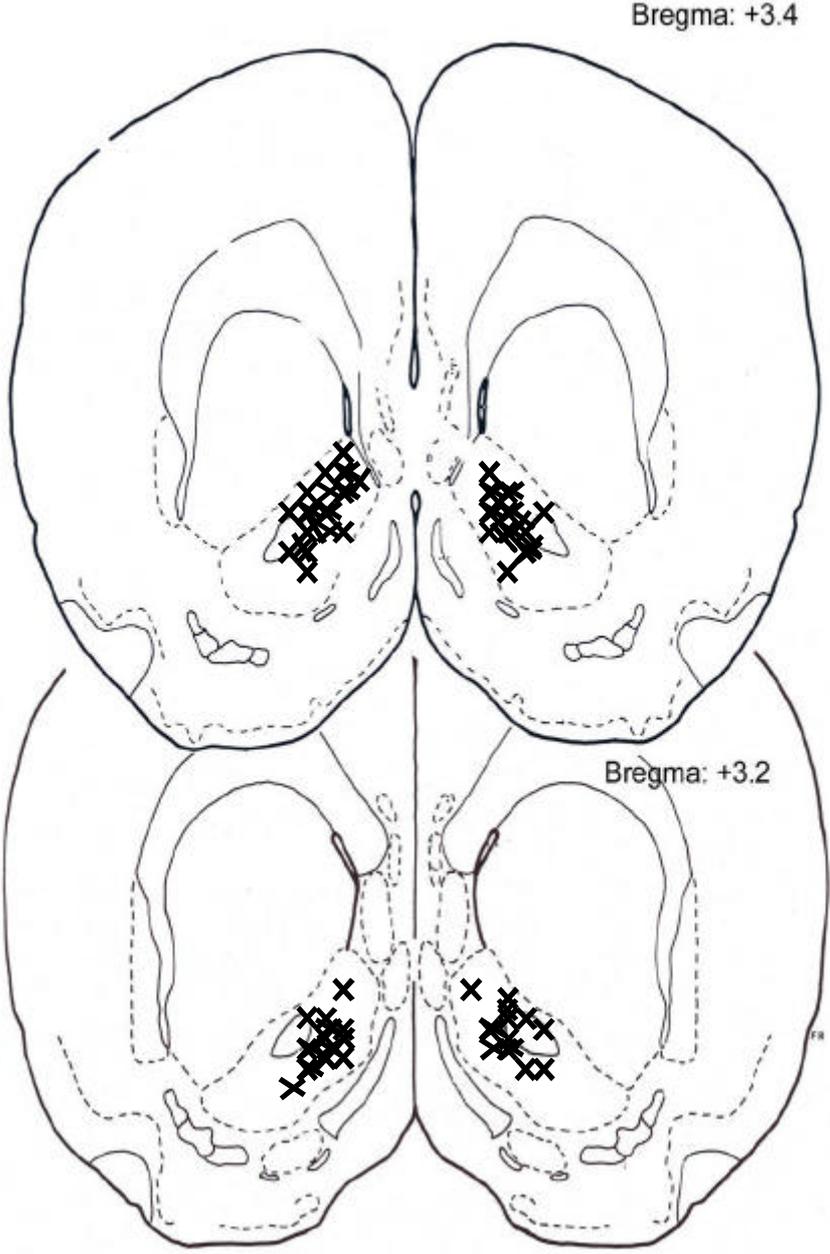


Fig. 2A

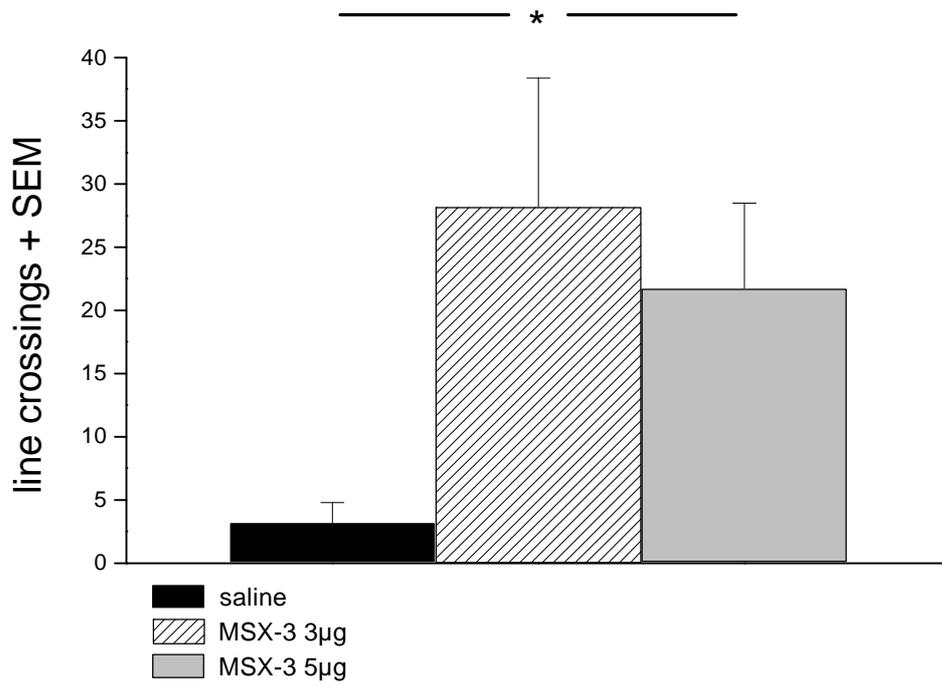


Fig.2B

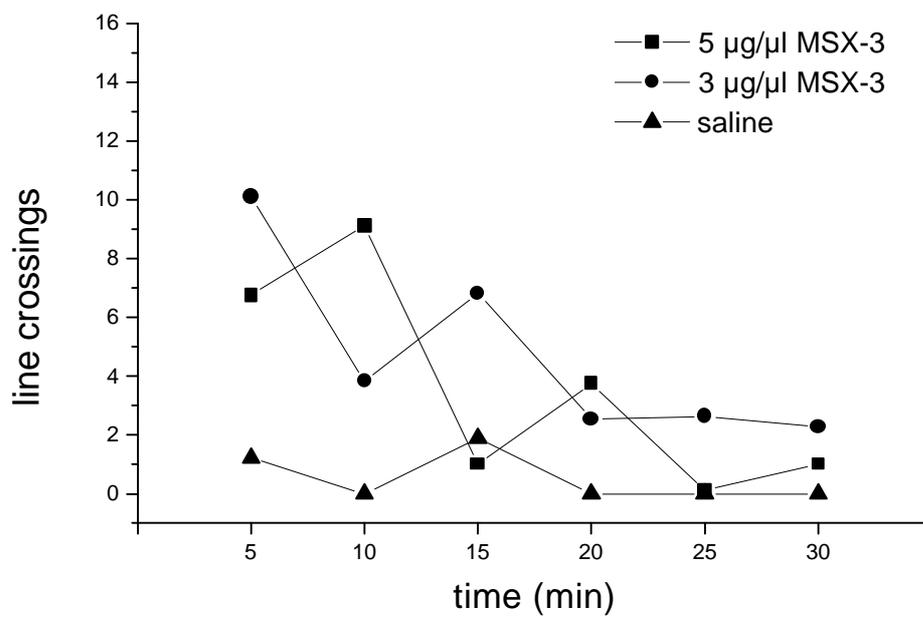


Fig. 3

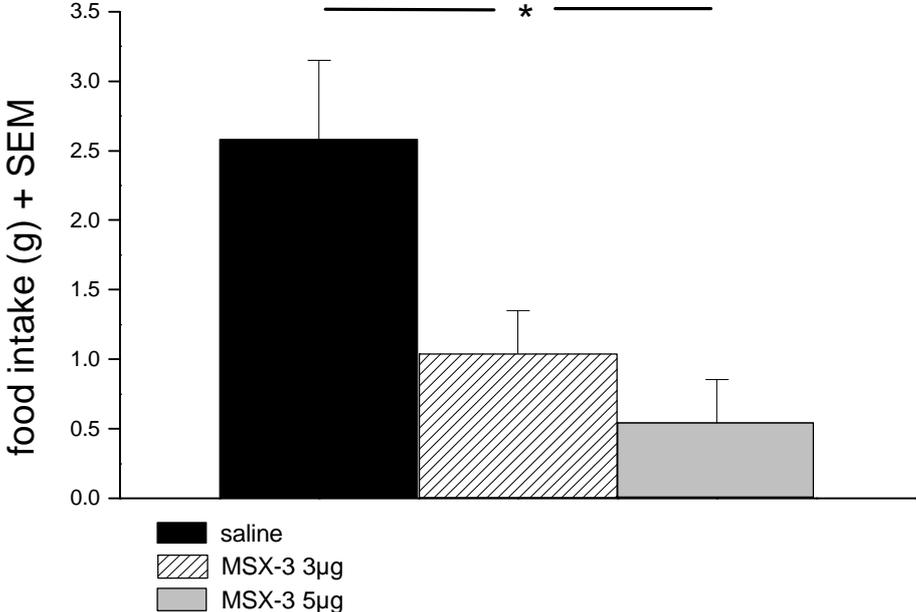


Fig.4:

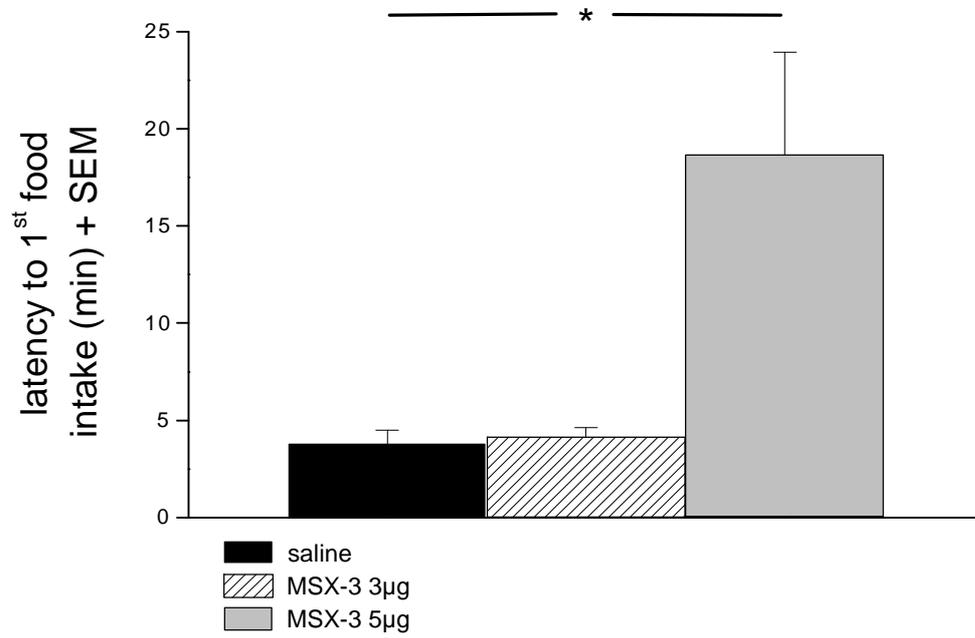


Fig. 5

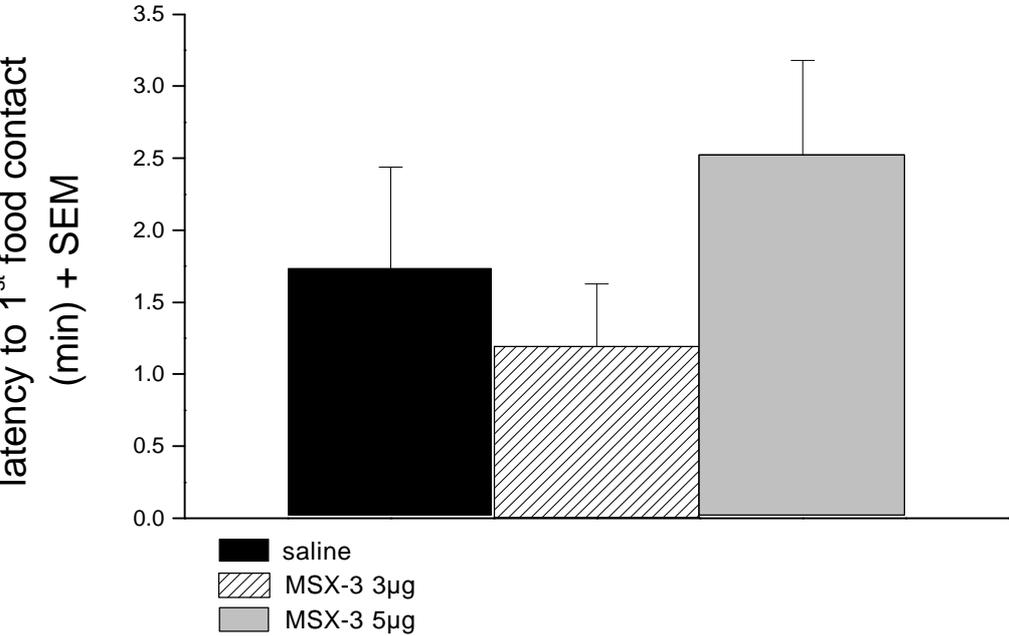
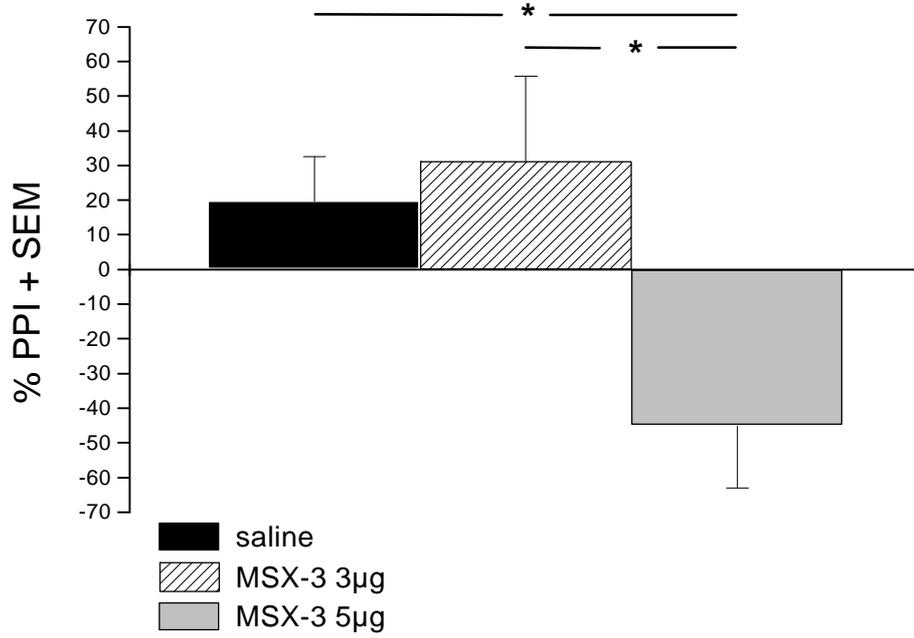


Fig.6:



6.3 Effects of Salient Environmental Stimuli on Extracellular Adenosine Levels in the Rat Nucleus Accumbens Measured by In Vivo Microdialysis



Behavioural Brain Research 134 (2002) 485–492

**BEHAVIOURAL
BRAIN
RESEARCH**

www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Effects of salient environmental stimuli on extracellular adenosine levels in the rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis

J. Nagel, W. Hauber *

Department of Animal Physiology, Institute of Biology, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart, Germany

Received 22 November 2001; received in revised form 19 March 2002; accepted 19 March 2002

Abstract

In the nucleus accumbens (NAc), the neuromodulator adenosine plays a major role in control of behaviour. The NAc subserves behaviour governed by salient stimuli in the environment, however, it is unknown whether such stimuli and the behavioural effects elicited are associated with changes in NAc extracellular adenosine levels. In order to further characterise the neuromodulatory actions of adenosine, the present study investigated for the first time the effects of four prototypical stimuli known to involve NAc processing on extracellular levels of adenosine in the NAc. Using in vivo microdialysis, the following stimuli were examined: (1) an appetitive, unfamiliar stimulus (palatable food), (2) an appetitive, familiar stimulus (standard laboratory food), (3) an aversive stimulus (handling) and (4) a novelty stimulus (cage change). Results revealed that neither of these stimuli significantly changed extracellular adenosine levels in the NAc. These findings demonstrate that NAc extracellular adenosine is not responsive to a number of prototypical salient stimuli in the environment. Thus the data provide no clues to suggest that transient changes of extracellular adenosine in the NAc modulate behavioural responses governed by these stimuli. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Neuromodulation; Novelty; Feeding; Handling; Adenosine–dopamine interactions

1. Introduction

The nucleoside adenosine plays an important role as modulator of neuronal activity through actions on distinct cell-surface receptors coupled to G-proteins which are termed as A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors [28]. In the basal ganglia, a group of interconnected forebrain nuclei, neuromodulation by adenosine plays a crucial role in motor control, cognition and reward [27]. The striatum, a major component of the basal ganglia, shows the highest density of A_{2A} receptors in the brain [46] and intermediate densities of A₁ receptors [45,52]. Adenosine regulates the release of several neurotransmitters by acting on striatal A₁ receptors [27,28]. Furthermore, it modulates dopamine transmission through interactions of adenosine A₁/dopamine D₁ receptors and adenosine A_{2A} receptors /dopamine D₂ receptors [29]. In addition, adenosine A_{2A} receptor

activation might mediate physiological and behavioural effects through dopamine receptor-independent mechanisms [3,59].

In functional terms, adenosine plays a role opposite to dopamine as demonstrated in studies on the cellular, network and behavioural level [27,30,35]. In the nucleus accumbens (NAc), a subregion of the ventral striatum, these antagonistic adenosine–dopamine interactions play a prominent role in control of behaviour [26,32,33]. The NAc subserves behaviour governed by motivationally significant stimuli in the environment [31] and most of these stimuli produced significant increases in NAc dopamine efflux [12,36,38]. However, it is largely unknown whether salient environmental stimuli and behavioural effects induced by these stimuli are also associated with changes in NAc extracellular adenosine levels. It has been suggested that neuromodulation by adenosine through intra-membrane A_{2A}/D₂ and A₁/D₁ receptor–receptor interactions could substantially increase the computational potential of neuronal networks [29]. If so, co-incident changes in the extracellular concentrations of adenosine and dopamine

* Corresponding author. Tel.: +49-711-685-5003; fax: +49-711-685-5090

E-mail address: wolfgang.hauber@po.uni-stuttgart.de (W. Hauber).

might represent a particularly effective way to use this neuromodulatory potential. For a deeper understanding of the neuromodulatory actions of adenosine, it is important to know whether prototypical stimuli known to elevate mesolimbic dopamine also produce changes of extracellular adenosine in the NAc. To this end we tested in the present study the effects of an appetitive, unfamiliar stimulus (palatable food), an appetitive, familiar stimulus (standard laboratory food), an aversive stimulus (handling) and a novelty stimulus (cage change) on extracellular adenosine levels using *in vivo* microdialysis in freely moving rats. All these stimuli have been shown to stimulate dopamine efflux in the NAc [7,23,24,41,54,60].

2. Materials and methods

Experiments were performed according to the current version of the German Law on Animal Protection and were approved by the proper authorities in Stuttgart, Germany. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.1. Subjects

Thirteen male Sprague–Dawley rats (220–280 g; Charles-River, Sulzfeld, Germany) were housed in standard Macrolon[®] type IV cages (55 × 35 × 10 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) in groups up to five animals until stereotaxic surgery. After surgery they were housed individually in Macrolon[®] type III cages (37 × 21 × 30 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) with raised solid walled lids. In the animal house temperature (20 ± 2 °C) and humidity (50 ± 10%) were kept constant and a 12-h light:12-h dark schedule was used with lights on between 06:00 and 18:00 h. All rats were given *ad libitum* access to water and standard laboratory maintenance chow (Altromin, Lage, Germany).

2.2. Surgery

The rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg *i.p.*) (Sigma, Deisenhofen Germany) after atropine sulfate pretreatment (0.5 mg/kg *i.p.*) (Research Biochemicals Inc., Natick, USA) and placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, USA) with the incisor bar set 5 mm above the interaural line. Siliconized guide cannula (CMA/12; outer diameter: 0.9 mm) (CMA, Stockholm, Sweden) were aimed at the NAc and implanted unilaterally using standard stereotaxic procedures. The co-ordinates were AP: +3.4 mm, L: ± 1.5 mm relative to bregma according to the atlas of Pellegrino et al. [48]. Each rat was given at least 5 days

to recover from surgery before starting microdialysis experiments.

2.3. Microdialysis

Before the onset of the experiments an animal was transferred from the animal house to the behavioural laboratory. The lid of the home cage was replaced by an open top (height: 20 cm). The microdialysis probes (CMA/12, 2 mm exposed membrane length, 0.5 mm membrane o.d.) (CMA, Stockholm, Sweden) were inserted into the NAc through the guide cannula (ventral position of the probe tip with reference to the skull: –8.0 mm) at 17:00 h, *i.e.* 1 h before the lights were turned off. The probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) at a flow rate of 2 µl/min (CMA 102; CMA, Stockholm, Sweden). The composition of the aCSF was 147 mM Na⁺, 3 mM K⁺, 1.2 mM Ca²⁺, 1.0 mM Mg²⁺ (pH 6.6). The recovery of the microdialysis probes for adenosine was between 7 and 17%. Twenty minutes samples (40 µl) were collected (CMA/142; CMA, Stockholm, Sweden). Animals were mounted with a head block tether system (Instech, Plymouth Meeting, USA) to a two-channel swivel (Instech, Plymouth Meeting, USA). All inlet and outlet tubing was made of FEP tubing (*i.d.* 0.12 mm) and tubing adapters (CMA, Stockholm, Sweden). Sample collection started 14 h after the insertion of the probe.

2.4. Chemical assays

Adenosine was quantified by HPLC with fluorometric detection as a fluorescent derivative (1,N6-ethenoadenosine) after derivatisation with chloroacetaldehyd [56]. Zinc acetate (5.3 µl; 0.01 mM) and 7.5 µl chloroacetaldehyd (4.5%) were added to the microdialysis sample (40 µl). This solution was kept for incubation at 90 °C for 45 min.

Analysis was performed by using a reversed-phase ion-pair HPLC. An isocratic HPLC system (Kontron 520 pump and Kontron 565 autosampler, Biotek Kontron, Neufahrn, Germany) with Nucleosil 100-5-C18 column (5 µm particles, length × *i.d.* 125 × 3 mm, Bischoff, Leonberg, Germany) with a column heater (Echotherm C030, Torrey Pines Sci., Santa Florencia, USA) set at 36 °C was employed. The mobile phase consisting of a 30 mM acetate buffer with 11% methanol and 1 mM octanesulfonic acid (Sigma, Deisenhofen, Germany) was adjusted to pH 3.6. The flow rate was 0.3 ml/min. Fluorescence was determined with a detector (RF-10 AXL, Shimadzu, Kyoto, Japan) with fixed excitation (270 nm) and emission (394 nm) wavelengths [42]. Ethenoadenosine peaks were identified and quantified by comparison with known standards which underwent the identical preparation procedure as samples. Furthermore, adenosine was identified by its

disappearance induced by addition of adenosine deaminase to the sample before derivatisation (incubation for 2 min at room temperature). The detection limit at a signal-to-noise ratio of 3:1 was lower than 20 fmol (5.3 pg).

2.5. Behavioural experiments

At the beginning of the behavioural experiments (7:00 h) rats were food-deprived for 20 h. At that time microdialysis probes were in position for 14 h and baseline adenosine levels in the NAc were stable. Pilot experiments revealed that there were high dialysate adenosine values of about 330 nM (90 pg/ μ l) ($N=3$) immediately after probe insertion which decreased within 8–10 h reaching a stable baseline confirming previous data [6,49]. The effects of four physiological stimuli known to activate the dopamine release in the NAc were studied: (1) unfamiliar, highly palatable food (2.5 g; Fonzie[®], kindly provided by KP Snack Food, Donauwoerth, Germany) [8] given for 20 min in the home cage; (2) familiar standard laboratory chow (2.5 g; Altromin, Lage, Germany) given for 20 min in the home cage [60]; (3) handling, i.e. the rat was picked up from the home cage, handled gently for 20 min and put back again in the home cage [23,24]; (4) exposure to novelty, i.e. the rat was picked up from its home cage, placed into an identical, but novel and clean, cage without food and water and was put back into the home cage 20 min later [23,24]. The order of the stimuli was pseudo-randomised for each rat according to the following rule: the unfamiliar food stimulus always preceded the familiar food stimulus and both stimuli were separated by at least one other non-food stimulus. All stimuli were presented 2 h apart from each other.

2.6. Histology

The animals were killed after the experiment by an overdose of sodium pentobarbital. The brains were removed from the skull, fixed for 2.5 h in 10% (v/v) formaldehyde and kept in 30% (w/v) sucrose for at least 2 days. The probe location was verified in frontal sections (40 μ m) stained by cresyl violet (Fig. 5).

2.7. Data analysis

Neurochemical data were transformed into percent changes from 100% baseline, where 100% represented the average concentration of three samples preceding stimulus presentation. Normally distributed data were analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements followed by a Dunnett's test for multiple comparisons with the last baseline sample before presentation of a stimulus serving as respective baseline value. Data not normally distributed

were analysed using a nonparametric one-way Friedman ANOVA for repeated measurements with the last baseline sample before presentation of a stimulus serving as respective baseline value. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$. All results are presented as means \pm standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analysis was performed using SIGMASTAT Version 2.0 (Jandel, Erkrath, Germany).

3. Results

3.1. Basal dialysate adenosine

Basal dialysate values of adenosine at the beginning of the behavioural experiments before presentation of the first stimulus was 10.51 ± 2.61 nM (2.81 ± 0.7 pg/ μ l) (last baseline sample). The baseline value before presentation of the following stimuli were 10.17 ± 1.72 nM (2.72 ± 0.46 pg/ μ l) (stimulus 2), 10.92 ± 1.94 nM (2.92 ± 0.52 pg/ μ l) (stimulus 3), 8.68 ± 2.02 nM (2.32 ± 0.54 pg/ μ l) (stimulus 4) (last baseline sample, respectively). The baseline value measured before termination of the experiment was 10.17 ± 1.74 nM (2.72 ± 0.48 pg/ μ l). There were no significant differences between respective pre-stimulus basal dialysate values and the final basal dialysate value ($F_{4/128} = 0.39$, $P = 0.81$).

3.2. Effects of unfamiliar food

Presentation of the unfamiliar, palatable food (Fonzies) to food-deprived rats induced arousal followed by food consumption. Fonzies feeding produced a transient and mild increase in dialysate adenosine to 120% (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 5.26$; $P = 0.39$; $N = 10$) (Fig. 1). There was some within-group variability as several animals exhibited an immediate, moderate increase of

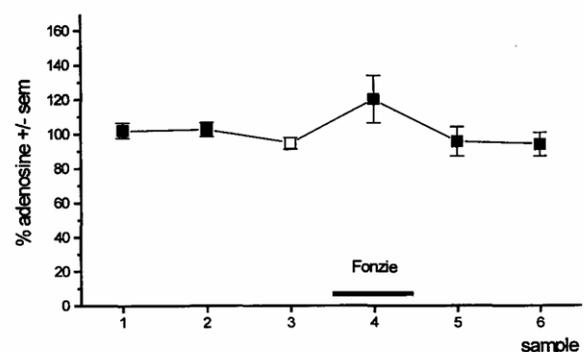


Fig. 1. The effects of Fonzies feeding for one sample period (20 min) on extracellular adenosine in the NAc. Results are mean \pm S.E.M. ($N = 10$) (Friedman ANOVA: $P > 0.05$). The last baseline value is indicated with an open symbol.

dialysate adenosine to 140% of baseline, while others showed a delayed, minimal increase to 110% of baseline.

3.3. Effects of familiar food

Presentation of familiar standard laboratory chow in rats pre-exposed at that time to Fonzie's, resulted in an immediate feeding response in all animals. Feeding of standard laboratory chow failed to change dialysate adenosine (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 4.71$; $P = 0.45$; $N = 8$) as depicted in Fig. 2.

3.4. Effects of handling

Behavioural responses to handling were variable and ranged from intense activity to sleeping. The applied procedure comprised gentle handling using manual restraint only if animals tried to jump off. Handling did not change dialysate adenosine in the NAc (ANOVA: $F_{5,25} = 0.27$; $P = 0.91$; $N = 6$) (Fig. 3).

3.5. Effects of cage change

Placing animals into a novel cage produced arousal followed by explorative locomotor activity for about 10 min in all rats. As shown in Fig. 4, cage change induced a transient and insignificant increase in dialysate adenosine following cage change (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 3.06$; $P = 0.69$; $N = 5$). The increased variance in the sample during stimulus presentation was due to one animal with a three-fold increase of dialysate adenosine.

3.6. Effects of stimulus order

The different behavioural stimuli were presented in a pseudo-randomised order to each rat during the course of the experiment. To check for habituation stimulus effects on dialysate adenosine were analysed addition-

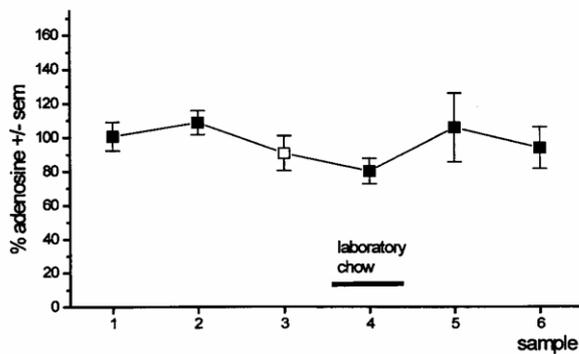


Fig. 2. The effects of feeding with familiar standard lab chow for one sample period (20 min) on extracellular adenosine in the NAc. Results are mean \pm S.E.M. ($N = 8$) (Friedman ANOVA: $P > 0.05$). The last baseline value is indicated with an open symbol.

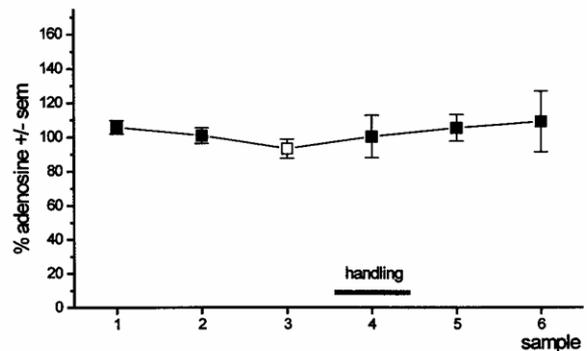


Fig. 3. The effects of handling for one sample period (20 min) on extracellular adenosine in the NAc. Results are mean \pm S.E.M. ($N = 6$) (ANOVA: $P > 0.05$). The last baseline value is indicated with an open symbol.

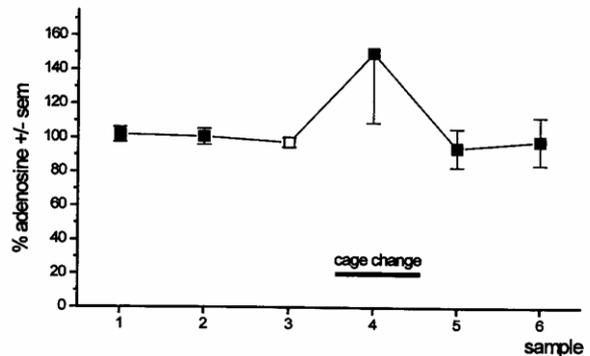


Fig. 4. The effects of exposure to novelty (cage change) for one sample period (20 min) on extracellular adenosine in the NAc. Results are the mean \pm S.E.M. ($N = 5$) (Friedman ANOVA: $P > 0.05$). The last baseline value is indicated with an open symbol.

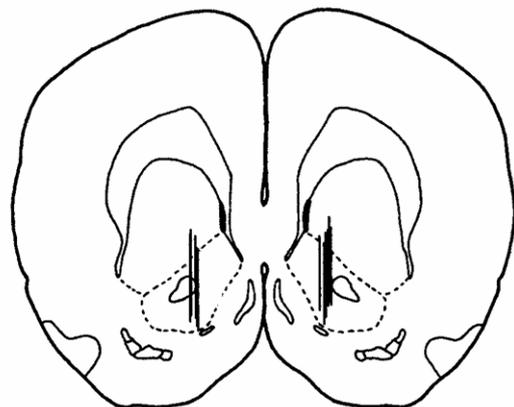


Fig. 5. Location of the microdialysis probes in the NAc. Vertical lines represent the 2 mm dialysing length of the probes. Drawing of the coronal section was adapted from the atlas of Pellegrino (1981). The given section is 3.4 mm anterior bregma.

ally by grouping stimuli according to their order and not according to their character (as described above). Results (data not shown) reveal that the first stimulus, respectively, given to rats did not increase dialysate adenosine (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 4.05$; $P = 0.54$; $N = 9$). Likewise, the second (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 4.64$; $P = 0.46$; $N = 8$), third (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 5.64$; $P = 0.34$; $N = 8$) and last stimulus (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 8.38$; $P = 0.14$; $N = 7$), respectively, given to rats did not change dialysate adenosine in the NAc.

4. Discussion

The present study demonstrates that an unfamiliar appetitive stimulus (palatable food), familiar appetitive stimulus (laboratory food), aversive (handling) or behaviourally arousing stimuli (exposure to novelty) did not significantly change extracellular adenosine levels in the NAc.

4.1. Baseline adenosine levels

The dialysate concentrations of adenosine in baseline samples were between 8.7 and 10.6 nM starting 14 h after probe insertion. These values correspond well with those of other studies in un-anaesthetised rats which reported dialysate adenosine concentrations of 12 [5] and 13 nM [42] in the striatum, but considerably higher levels in the cortex (25–100 nM) [10]; see [39] for review. Based on pilot experiments we used a delay of 14 h between probe insertion and onset of the behavioural experiments to allow for baseline stabilisation. Thereafter, the four pre-stimulus baseline values (2 h apart from one another) and the final baseline value before completion of the experiment did not differ significantly. This indicates that the time window used for experiments provided reliable baseline stability. Parameters as time-of-day which might produce baseline shifts are thus unlikely to infer with our results. These findings are in keeping with recent data showing that adenosine levels in cats declined within 6–9 h after probe insertion into the thalamus and basal forebrain, and remained thereafter constant for 4 days [49]. Also, in rats, extrastriatal adenosine levels were constant, although at a higher level, already 3 h after probe insertion into the hippocampus [11].

4.2. Origin of extracellular adenosine

The sources of extracellular adenosine measured by *in vivo* microdialysis and the factors that regulate its levels are not well understood [39,58]. Biochemical and electrophysiological studies have established that one potential source of extracellular adenosine is its rapid

and quantitative formation in the extracellular space from adenine nucleotides through the action of ectoenzymes [14,18,20,51,53,63]. Thus, adenosine gains access to the extracellular space in part by degradation of vesicularly released ATP [50]. In line with this notion, *in vivo* microdialysis studies demonstrated that extracellular adenosine levels in the striatum were partly sensitive to TTX [47]. In addition, the intracellular adenosine concentration is regulated by a number of enzymes and an increased intracellular adenosine concentration results in a transport of adenosine to the extracellular space via equilibrative nucleoside transporters [49].

4.3. Effects of physiological stimuli

Little is yet known on the role of adenosine in modulating behavioural responses to motivationally significant stimuli. Our results revealed that prolonged handling which represents an aversive stimulus [36] did not alter extracellular adenosine in the NAc. Restraint stress provoked in rats large increases in striatal glucose [25] and lactate [19] indicating enhanced excitatory neuronal activity. In addition, handling of rats with a similar procedure as used here elicited a dopamine release in the NAc [23,24]. As striatal glutamate levels were increased after handling stress [43] and reverse microdialysis of NMDA and kainate stimulated striatal adenosine [39] one might expect an increase of extracellular adenosine in our experiment. One explanation for the lack of effect could be the mild handling procedure used here which might not result in massive increases of extrastriatal glutamate. Our findings suggest that an aversive stimulus as handling known to induce changes of the neuronal activity in the NAc does not necessarily induce alterations in extracellular adenosine. Moreover, we found that exposure to novelty by placing the animals into a novel cage induced behavioural arousal and locomotor exploration without altering extracellular adenosine levels in the NAc significantly. There is converging evidence that the NAc plays a key role in novelty exploration [13] and novelty-induced behavioural activation [36].

Electrophysiological recordings further demonstrated that the activity of NAc neurons is sensitive to novel stimuli [40] and correlated with behavioural arousal [15]. In addition, exposure to novelty using similar cage change procedures as used here provoked an increase in NAc extracellular dopamine [23,41,54]. These data indicate that a stimulus as novelty exposure which is known to be represented by NAc neurones and to elevate NAc dopamine did not induce corresponding changes in NAc extracellular adenosine. In line with previous studies [37] this finding implicates that motor activation per se is not associated with alterations of NAc adenosine. Furthermore, the NAc is an important neural substrate mediating feeding behaviour [16,57]

and microdialysis studies in behaving rats revealed significant increases in NAc extracellular dopamine during feeding [36,38,60], in particular during unpredicted consumption of unfamiliar, palatable food as Fonzie's [1,7–9,61]. Our data revealed feeding of unfamiliar, palatable food and familiar food produced no significant changes of NAc extracellular adenosine.

Taken together, the present findings demonstrate that NAc extracellular adenosine is not responsive to a number of salient stimuli in the environment. This effect is not due habituation to repeated exposure to different salient stimuli, as dialysate adenosine levels did not change as a function of the order of stimulus presentation. Therefore, the data suggest that behavioural responses governed by these stimuli might not be modulated by transient changes in NAc extracellular adenosine. There is consistent evidence that the NAc receives converging input from prefrontal cortex, hippocampus, amygdala and midbrain which together transmit information on motivationally significant stimuli in the environment [22,55,62]. These afferent signals are coded by glutamate and dopamine and synapse on NAc projection neurons [2]. Our data give no clues for a role of adenosine neuromodulation in these processes. As microdialysis has significantly contributed to unravel major physiological and pathophysiological roles of adenosine [21], the time resolution of this technique is unlikely to account for these negative results. Also, an insufficient sensitivity of our system may be ruled out as we were able to measure changes after probe implantation in the present study as well as more subtle effects after pharmacological stimulation [44]. Recent studies revealed that A_{2A} receptor blockade had no effects on the rewarding effects of electrical brain stimulation in otherwise intact animals indicating that the neural substrate mediating the rewarding effects of this procedure is not controlled by endogenous adenosine acting on A_{2A} receptor subtype [4]. The failure of rewarding stimuli to produce a transient change in NAc extracellular adenosine as measured here also point to this notion. However, there is evidence that a tonic stimulation of adenosine receptors is involved in regulation of striatal glutamate [17] and striatally mediated behaviour [34]. Thus one can not exclude that a tonic stimulation of striatal adenosine receptors is a prerequisite for the rewarding and other stimuli tested here to become effective. This latter possibility could be only tested by intra-NAc blockade of adenosine receptor subtypes.

Another implication of the present data refers to theoretical models on the physiological significance of adenosine–dopamine interactions. If adenosine modulates dopamine neurotransmission through antagonistic intra-membrane receptor–receptor interactions on a short time scale [29] one might expect that at least some of the stimuli tested should alter extracellular

adenosine in the NAc as they have been consistently shown to stimulate mesolimbic dopamine. Our negative results do not support the notion of an interactive modulation of NAc neuronal responses [29] by transient and co-incident changes of dopamine and adenosine, at least with regard to the categories of salient events tested. However, this hypothesis should be regarded as preliminary awaiting results of our current experiments analysing stimulus effects both on dopamine and adenosine levels in core and shell subregions of the NAc.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha2340/1-4).

References

- [1] Ahn S, Phillips AG. Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *J Neurosci* 1999;19:RC29.
- [2] Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989;12:366–75.
- [3] Aoyama S, Kase H, Borrelli E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A_{2A} receptor antagonist. *J Neurosci* 2000;20:5848–52.
- [4] Baldo BA, Koob GF, Markou A. Role of adenosine A₂ receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J Neurosci* 1999;19:11017–26.
- [5] Ballarin M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 1991;142:97–103.
- [6] Ballarin M, Herrera-Marschitz M, Casas M, Ungerstedt U. Striatal adenosine levels measured 'in vivo' by microdialysis in rats with unilateral dopamine denervation. *Neurosci Lett* 1987;83:338–44.
- [7] Bassareo V, Di Chiara G. Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience* 1999;89:637–41.
- [8] Bassareo V, Di Chiara G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 1999;11:4389–97.
- [9] Bassareo V, Di Chiara G. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 1997;17:851–61.
- [10] Bennett HJ, White TD, Semba K. Activation of metabotropic glutamate receptors increases extracellular adenosine in vivo. *Neuroreport* 2000;11:3489–92.
- [11] Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res* 2000;872:44–53.
- [12] Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience. *Brain Res Rev* 1998;28:309–69.
- [13] Burns LH, Annett L, Kelley AE, Everitt BJ, Robbins TW. Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty:

- implication for limbic–striatal interactions. *Behav Neurosci* 1996;110:60–73.
- [14] Burnstock G. The changing face of autonomic neurotransmission. *Acta Physiol Scand* 1986;126:67–91.
- [15] Callaway CW, Henriksen SJ. Neuronal firing in the nucleus accumbens is associated with the level of cortical arousal. *Neuroscience* 1992;51:547–53.
- [16] Carelli RM, Ijames SG, Crumling AJ. Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus natural (water and food) reward. *J Neurosci* 2000;20:4255–66.
- [17] Corsi C, Melani A, Bianchi L, Pedata F. Striatal A2A adenosine receptor antagonism differentially modifies striatal glutamate outflow in vivo in young and aged rats. *Neuroreport* 2000;11:2591–5.
- [18] Craig CG, White TD. NMDA-evoked adenosine release from rat cortex does not require the intermediate formation of nitric oxide. *Neurosci Lett* 1993;158:167–9.
- [19] De Bruin LA, Schasfoort EM, Steffens AB, Korf J. Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate. *Am J Physiol* 1990;259:R773–9.
- [20] Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;17:7673–82.
- [21] Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 2001;24:31–55.
- [22] Everitt BJ, Cador M, Robbins TW. Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus–reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. *Neuroscience* 1989;30:63–75.
- [23] Feenstra MG, Botterblom MH, Mastenbroek S. Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience* 2000;100:741–8.
- [24] Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF. Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in the nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex: comparison with inhibition of ionotropic receptors. *J Neurochem* 1998;70:1104–13.
- [25] Fellows LK, Boutelle MG. Rapid changes in extracellular glucose levels and blood flow in the striatum of the freely moving rat. *Brain Res* 1993;604:225–31.
- [26] Ferre S. Adenosine–dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 1997;133:107–20.
- [27] Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1997;20:482–7.
- [28] Fredholm BB. Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol* 1995;76:228–39.
- [29] Fuxe K, Ferre S, Zoli M, Agnati LF. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A(2A) dopamine D-2 and adenosine A(1) dopamine D-1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Rev* 1998;26:258–73.
- [30] Hauber W. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress Neurobiol* 1998;56:507–40.
- [31] Hauber W, Bohn I, Gierler C. NMDA, but not dopamine D2, receptors in the rat nucleus accumbens are involved in guidance of instrumental behavior by stimuli predicting reward magnitude. *J Neurosci* 2000;20:6282–8.
- [32] Hauber W, Koch M. Adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens modulate prepulse inhibition of the startle response. *Neuroreport* 1997;8:1515–8.
- [33] Hauber W, Munkle M. Motor depressant effects mediated by dopamine D2 and adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens and the caudate–putamen. *Eur J Pharm* 1997;323:127–31.
- [34] Hauber W, Nagel J, Sauer R, Müller CE. Motor effects induced by a blockade of adenosine A2A receptors in the caudate–putamen. *Neuroreport* 1998;9:1803–6.
- [35] Hauber W, Neuscheler P, Nagel J, Müller CE. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A2A receptors in the caudate–putamen of rats. *Eur J Neurosci* 2001;14:1287–93.
- [36] Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 2000;96:651–6.
- [37] Huston JP, Haas HL, Boix F, Pfister M, Decking U, Schrader J, Schwarting RKW. Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats. *Neuroscience* 1996;73:1999.
- [38] Ikemoto S, Panksepp J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Rev* 1999;31:6–41.
- [39] Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 2001;79:463–84.
- [40] Lee RS, Koob GF, Henriksen SJ. Electrophysiological responses of nucleus accumbens neurons to novelty stimuli and exploratory behavior in the awake, unrestrained rat. *Brain Res* 1998;799:317–22.
- [41] Legault M, Wise RA. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 2001;13:819–28.
- [42] Melani A, Pantoni L, Corsi C, Bianchi L, Monopoli A, Bertorelli R, Pepeu G, Pedata F. Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke* 1999;30:2448–54.
- [43] Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex—comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 1993;60:1650.
- [44] Nagel J, Hauber W. Changes in extracellular adenosine levels in the nucleus accumbens of the rat by physiological and pharmacological stimuli. In: O'Connor W, Lowry JP, O'Connor J, O'Neill RD, editors. *Monitoring Molecules in Neuroscience*. Dublin: University College Dublin, 2001:305.
- [45] Ochiishi T, Chen L, Yukawa A, Saitoh Y, Sekino Y, Arai T, Nakata H, Miyamoto H. Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. *J Comp Neurol* 1999;411:301–16.
- [46] Ongini E, Fredholm BB. Pharmacology of adenosine A2a receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:364–72.
- [47] Pazzagli M, Pedata F, Pepeu G. Effect of K⁺ depolarization, tetrodotoxin, and NMDA receptor inhibition on extracellular adenosine levels in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 1993;234:61–5.
- [48] Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. *A stereotaxic atlas of the rat brain*. New York, London: Plenum Press, 1981.
- [49] Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, McCarley RW. Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 2000;99:507–17.
- [50] Ribeiro JA. Adenosine A2A receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur J Pharmacol* 1999;375:101–13.
- [51] Richardson PJ, Brown SJ. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 1987;48:622–30.

- [52] Rivkees SA, Price SL, Zhou FC. Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* 1995;677:193–203.
- [53] Rosenberg PA, Knowles R, Knowles KP, Li Y. Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J Neurosci* 1994;14:2953–65.
- [54] Saigusa T, Tuinstra T, Koshikawa N, Cools AR. High and low responders to novelty: effects of a catecholamine synthesis inhibitor on novelty-induced changes in behaviour and release of accumbal dopamine. *Neuroscience* 1999;88:1153–63.
- [55] Schoenbaum G, Chiba AA, Gallagher M. Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. *Nature Neurosci* 1998;1:155–9.
- [56] Secrist JA, Barrio JR, Leonard NJ, Weber G. Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes. Biological activities and spectroscopic properties. *Biochemistry* 1972;11:3499–506.
- [57] Stratford TR, Kelley AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 1997;17:4434–40.
- [58] Strecker RE, Morairty S, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Basheer R, Dauphin LJ, Rainnie DG, Portas CM, Greene RW, McCarley RW. Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res* 2000;115:183–204.
- [59] Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 1999;59:355–96.
- [60] Westerink BHC. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav Brain Res* 1995;70:103–24.
- [61] Wilson C, Nomikos GG, Collu M, Fibiger HC. Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive. *J Neurosci* 1995;15:5169–78.
- [62] Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 1987;94:469–92.
- [63] Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 1992;285:345–65.

6.4 *Reverse Microdialysis of Dopamine D₁ and D₂ Receptor Antagonists Alters Extracellular Adenosine Levels in the Rat Nucleus Accumbens*

J. Nagel and W. Hauber

Institute of Biology, Department of Animal Physiology

University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart; Germany

Keywords: Microdialysis, raclopride, SCH23390

Running title: Dopamine receptors and striatal adenosine

Corresponding author:

Dr. Wolfgang Hauber

Dept. Animal Physiology, Institute of Biology

University of Stuttgart

Pfaffenwaldring 57, D-70550 Stuttgart

Germany

Phone: +49-711-685-5003

Fax: +49-711-685-5090

E-Mail: wolfgang.hauber@po.uni-stuttgart.de

Abstract

Recent evidence suggests that modulation of dopaminergic transmission alters striatal levels of extracellular adenosine. The present study used reverse microdialysis of the selective dopamine receptor antagonists raclopride and SCH23390 to investigate whether a blockade of dopamine D₁ or D₂ receptors modifies extracellular adenosine concentrations in the nucleus accumbens. Results reveal that perfusion of raclopride produced an increase of dialysate adenosine which was significant with a high (10 mM) and intermediate (1 mM) drug concentration, but not with lower drug concentrations (10 μM, 100 μM). Perfusion of SCH23390 (10 μM, 100 μM, 1mM) did not significantly elevate dialysate adenosine concentrations in the nucleus accumbens, only the highest concentration (10 mM) produced a massive increase. The main finding of the present study is that a selective blockade of dopamine D₂ receptors in the NAC produced a pronounced increase of extracellular adenosine. The cellular mechanisms underlying this effect are yet unknown. It is suggested that the increase of extracellular adenosine might be related to a homeostatic modulatory mechanism proposed to be a key function of adenosine in response to neuronal metabolic challenges.

Introduction

The purine nucleoside adenosine is an important modulator of neuronal activity through actions on four distinct G-protein coupled cell-surface receptors termed as A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors (Fredholm *et al.*, 1994; Ralevic and Burnstock, 1998). Neuromodulation by adenosine plays a crucial role in the nucleus accumbens (NAC), a subregion of the ventral striatum involved in motivation and reward (Robbins and Everitt, 1996; Kelley, 1999). In the NAC, A_{2A} receptors are expressed with high density (Ongini and Fredholm, 1996; Rosin *et al.*, 1998) and have been implicated in selection and execution of adaptive behaviour (Ferre, 1997). For instance, stimulation of A_{2A} receptors in the NAC inhibited locomotor activity in rats (Barraco *et al.*, 1994; Turgeon *et al.*, 1996; Hauber and Munkle, 1997) and reversed reduced prepulse inhibition induced by apomorphine (Hauber and Koch, 1997). In turn, intra-NAC blockade of A_{2A} receptors enhanced locomotor activity and inhibited feeding behaviour (Nagel *et al.*, unpublished observations). A_{2A} receptors have a high affinity for adenosine (Fredholm, 1995) and intra-NAC stimulation of A_{2A} receptors with low doses of selective agonists induced prominent behavioural effects (e.g. (Hauber and Munkle, 1997). Thus, a precise regulation of extracellular levels of adenosine in the NAC is probably essential. Extracellular adenosine originates from degradation of vesicularly released purine nucleotides and from intracellular adenosine released by a transmembrane transport out of the cell (Dunwiddie and Masino, 2001; Latini and Pedata, 2001). A number of pharmacological stimuli have been identified which enhance extracellular adenosine, e.g. NMDA or AMPA receptor activation (Craig and White, 1993; Delaney and Geiger, 1998), (Chen *et al.*, 1992; Manzoni *et al.*, 1994). However, it is still unknown whether dopamine receptors of the D₁ or D₂ subtypes are involved in regulation of extracellular adenosine levels. Adenosine plays a role opposite to dopamine in the NAC in control of behaviour as D₂ receptor antagonists and A_{2A} receptor agonists elicit similar behavioural effects (Ferré, 1997), e.g. on locomotor activity (Hauber and Munkle, 1997). Recent evidence suggests that manipulation of dopaminergic neurotransmission alters actions of A_{2A} receptor ligands (Fenu and Morelli, 1998; Fenu *et al.*, 2000) which might be due to changed levels of extracellular adenosine. Furthermore, a recent microdialysis study revealed that dopamine denervation by 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle changed striatal levels of extracellular adenosine (Pinna *et al.*, 2002). Taken together, these data suggest that changes of dopaminergic transmission might alter extracellular adenosine levels. Using reverse microdialysis of the selective dopamine receptor antagonists SCH23390 and raclopride, the present study sought to determine whether an acute blockade of D₁ or D₂ receptor modifies

extracellular adenosine concentrations in the NAC.

Material and Methods

All animal experiments were conducted according to the current version of the German Law on the Protection of Animals and approved by the proper authorities in Stuttgart, Germany.

Subjects

Subjects were thirty male Sprague-Dawley rats (220-280 g, Charles River, Sulzfeld, Germany). Up to five animals were housed in groups until surgery in standard Macrolon® type IV cages (55 x 35 x 10 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) in a temperature- and humidity- controlled animal room (20±2°C, 50±10%). After surgery animals were housed individually in Macrolon® type III cages (37 x 21 x 30 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Germany) with raised solid walled lids. A 12:12-h light-dark schedule was used with lights on between 6.00-18.00 h. Water and standard laboratory maintenance chow (Altromin, Lage, Germany) was available ad libitum.

Surgery

Using standard stereotaxic procedures, siliconized guide cannula (CMA/12; outer diameter: 0.9 mm) (CMA, Stockholm, Sweden) were implanted unilaterally in anaesthetized animals (50 mg/kg pentobarbital, i.p.; Sigma, Deisenhofen, Germany after pre-treatment with 0.5 mg/kg atropine sulfate i.p.; Research Biochemicals Inc., Natick, USA) aiming the NAC (AP: + 3,4 mm, L + or - 1,5 mm relative to bregma) with the incisor bar set 5 mm above the interaural line according to the atlas of (Pellegrino *et al.*, 1981). Each rat was given at least 4 d to recover from surgery before starting microdialysis experiments.

Microdialysis

Microdialysis experiments were performed in the home cage of an animal with the lid replaced by a metal frame bearing a counter-balanced arm with the swivel assembly. A microdialysis probe (CMA/12, 2 mm exposed membrane length, 0.5 mm membrane o.d.; CMA, Stockholm, Sweden) was lowered through the guide cannula to the NAC (ventral position of probe tip with reference to the skull: -8.0 mm) at 17.00 h the day before the experiment. Six hours before the insertion of the microdialysis probes food pellets were removed, water was available throughout the experiment. The probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) at a flow rate of 2 µl / min using a CMA 102 perfusion pump (CMA, Stockholm, Sweden). The composition of the aCSF was 147 mM Na⁺, 3 mM K⁺, 1.2 mM Ca²⁺, 1.0 mM Mg²⁺ (pH 6.6). Fourteen hours after probe insertion (7:00 h)

three 20-minutes fractions were taken to obtain baseline values. Thereafter a drug was applied via reverse microdialysis into the NAC for 30 min followed by 60 min with perfusion fluid alone. The samples (40 µl) were collected automatically with a fraction collector (CMA/142; CMA, Stockholm, Sweden) and stored deeply frozen (-70°C) until analysis. The animals were connected by a head block tether system (Instech, Plymouth Meeting, USA) to a dual channel liquid swivel (Tsumura TCS2-23; Pronexus, Skärholmen, Sweden). FEP tubing (i.d. 0.12 mm; Microbiotech/se, Stockholm, Sweden) and tubing adapters (CMA, Stockholm, Sweden) were used.

Drugs

SCH23390 [45-tetrahydro-1H-3-benzazepin hydrochloride] (Research Biochemicals Int., Köln, Germany) and Raclopride [S(-)3,5-dichloro-N-(1-ethyl-2-pyrrolidinylmethyl)-2-hydroxy-6-methoxy-benz-amid(+) tartrate] (Astra Arcus, Soedertaelje, Sweden) were dissolved in 4 concentrations (10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM) in aCSF for application via reverse microdialysis into the NAC. An animal received one concentration of one drug.

Chemical assays

All chemicals were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany) except differently stated. Adenosine was quantified by HPLC with fluorometric detection as a fluorescent agent 1,N6-ethenoadenosine after derivatisation with chloroacetaldehyde (Secrist *et al.*, 1972). Zinc acetate (5.3 µl; 0.01 mM) and chloroacetaldehyde (7.5 µl; 4.5 %) were added to the microdialysis sample (40 µl). This solution was kept for incubation at 90° C for 45 min.

Analysis was performed by using a reversed-phase ion-pair HPLC. An isocratic HPLC system (Kontron 520 pump, Kontron 565 autosampler, Biotek Kontron, Neufahrn, Germany) with Nucleosil 100-5-C18 column (5 µm particles, length x i.d. 125 x 3 mm, Bischoff, Leonberg, Germany) with a column heater (Echotherm C030, Torrey Pines Sci., Santa Florencia, USA) set at 36° C was employed. The mobile phase consisting of a 30 mM acetate buffer with 11% methanol and 1 mM octanesulfonic acid was adjusted to pH 3.6. The flow rate was 0.3 ml / min. Fluorescence was determined with a detector (RF-10 AXL, Shimadzu, Kyoto, Japan) with fixed excitation (270 nm) and emission (394 nm) wavelengths (Melani *et al.*, 1999b). Ethenoadenosine peaks were identified and quantified by comparison with known adenosine standards which underwent the identical preparation procedure as samples. Furthermore, adenosine was identified by its disappearance induced by addition of adenosine deaminase to the sample before derivatisation (incubation for 2 min at room temperature)

(Wojcik and Neff, 1982). The detection limit of adenosine in a derivated sample was 12.7 fmol (3.4 pg).

Histology

After microdialysis, animals were killed by an overdose of pentobarbital. Then brains were removed from the skull, fixed for 2.5 hours in 10 % (v/v) formaldehyde and kept in 30 % (w/v) sucrose for at least two days. The probe location was verified in frontal sections (60 μ m) stained by Cresyl Violet. The locations of microdialysis probes are shown in Fig. 1.

Data analysis

Data were expressed as percent changes from 100 % baseline, in which 100 % represented the average concentration of three samples preceding stimulus presentation. All results are presented as means \pm standard deviation (S.D.). Data were not normally distributed and analysed using a nonparametric one-way Friedman ANOVA for repeated measurements followed by Dunnett's test for multiple comparisons with the last baseline sample before presentation of a stimulus serving as control value. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using SigmaStat Vers. 2.0 (Jandel, Erkrath, Germany).

Results

Basal adenosine levels

The mean basal dialysate concentration (\pm SEM) of adenosine of the three samples before the onset of reverse dialysis of drugs were 1.363 ± 0.244 pg/ μ l (5.09 ± 0.911 nM) (N=29). Data of animals (N=6) with basal-values below the detection limit were excluded from further analysis. The data were not corrected for in vitro-recovery.

Reverse microdialysis of raclopride

Intra-NAc administration of raclopride by reverse microdialysis (10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM) produced a dose-dependent increase of dialysate adenosine (Fig. 2). The increase of adenosine induced by perfusion of 10 μ M raclopride (ANOVA: $\chi^2 = 6.857$, $p > 0.05$, N = 5) and 100 μ M raclopride (ANOVA: $\chi^2 = 4.929$, $p > 0.05$, N = 4) was not significant. In

contrast, perfusion of 1 mM raclopride (ANOVA: $\chi^2 = 12.714$, $p < 0.05$, $N = 3$) and 10 mM raclopride (ANOVA: $\chi^2 = 16.571$, $p < 0.05$, $N = 3$) resulted in a significant increase of adenosine levels in the NAC.

Reverse microdialysis of SCH23390

As shown in Fig. 3 perfusion of 10 μM (ANOVA: $\chi^2 = 6.536$, $p > 0.05$, $N = 4$) and 100 μM (ANOVA: $\chi^2 = 9.750$, $p > 0.05$, $N = 4$) SCH23390 had moderate and insignificant effects on extracellular adenosine levels. Perfusion of SCH23390 in an intermediate concentration (1 mM) produced a pronounced, albeit insignificant increase of dialysate adenosine levels (ANOVA: $\chi^2 = 0.334$, $p > 0.05$, $N = 3$). In contrast, perfusion of 10 mM SCH23390 produced a pronounced and significant increase of dialysate adenosine in the NAc (ANOVA: $\chi^2 = 15.143$, $p < 0.05$, $N = 3$).

Discussion

The present study demonstrates that perfusion of high concentrations of the selective dopamine receptor antagonists raclopride or SCH23390 produced a significant increase of dialysate adenosine levels in the NAC.

Reverse microdialysis of raclopride

Reverse microdialysis of the selective dopamine D₂ receptor antagonist raclopride (Hall *et al.*, 1988; Seeman and Ulpian, 1988) dose-dependently elevated extracellular adenosine in the NAC. Perfusion of lower concentrations of raclopride (10, 100 μM) known to alter the release of glutamate (Saulskaya and Mikhailova, 2002) or dopamine (Rahman and McBride, 2000) in the NAC induced an insignificant, up to 2-fold increase of dialysate adenosine. The intermediate concentration of raclopride (1 mM) resulted in a significant, about 7-fold increase, the highest concentration (10 mM) in a massive, about 450-fold increase of dialysate adenosine. The peak dialysate adenosine concentrations after perfusion of 10 mM raclopride were about 2.5 μM . Although it is generally difficult to estimate extracellular concentrations of neuroactive compounds from sampled dialysate concentrations (Westerink, 1995), Morrison *et al.*, 1991), it is likely that these maximum adenosine dialysate levels measured

here correspond to extracellular adenosine concentrations observed under pathological conditions. For instance, during ischemia rapid increases of adenosine concentrations to about 100 times and more above resting levels have been determined (Rudolphi and Schubert, 1997; Melani *et al.*, 1999b; von Lubitz, 1999) probably involving stimulation of A_{2B} and A_3 receptors with their low dissociation constants in the μM range (Dunwiddie and Masino, 2001). These studies indicate that the strong increase of dialysate adenosine levels induced by the highest dose of raclopride (10 mM) might involve unphysiological mechanisms. Lower doses of raclopride produced two- to seven-fold increases of extracellular adenosine levels which has been also measured in response to a number of pharmacological and other stimuli, e.g. glutamate receptor ligands, in various *in vitro*- and *in vivo*-preparations (Latini and Pedata, 2001). Raclopride is highly selective to dopamine D_2 receptors and nearly devoid of affinity for other receptors, e.g. 5-HT_1 -, 5-HT_2 -, α_1 -, α_2 -, β - and muscarinic receptors, including D_1 -receptors (Hall *et al.*, 1988). Therefore, the significant increase of dialysate adenosine levels induced by 1 mM raclopride and the less pronounced increases after perfusion of lower concentrations of raclopride might be brought about by a selective blockade of D_2 receptors.

A number of physiological and pharmacological stimuli have been identified which enhance adenosine release, however, the underlying cellular mechanisms are often not well understood (e.g. Dunwiddie and Masino, 2001). Likewise, there are no data pointing to an involvement of dopamine receptors in one or more of the multiple mechanisms contributing to the regulation of extracellular adenosine (Strecker *et al.*, 2000; Dunwiddie and Masino, 2001; Latini and Pedata, 2001). One of several potential D_2 -receptor related mechanism which might account for the observed increase of extracellular adenosine levels in the NAC refers to the suggested homeostatic modulatory role of adenosine and its enhanced extracellular formation upon neuronal metabolic challenges (Cunha, 2001). There is consistent evidence that reduced activation of D_2 receptors leads to an enhanced activity of striatal neurons containing D_2 receptors (e.g. LeMoine *et al.*, 1997; Svenningsson *et al.*, 1999a; Gerfen, 2000; West and Grace, 2002). Furthermore, it is hypothesized that experimental manipulations which augment cellular energy requirements result in increased extracellular adenosine levels (Cunha, 2001, Dunwiddie and Masino, 2001). Thus, it is conceivable that an intra-NAC D_2 receptor blockade might cause increased activity and energy demand of D_2 receptor containing neurons resulting in elevated levels of extracellular adenosine.

Enhanced extracellular glutamate levels provide another mechanism through which the extracellular adenosine concentration in the NAC could be augmented. It has been shown that

reverse microdialysis of raclopride increased extracellular glutamate in the NAC (Saulskaya and Mikhailova, 2002) and that stimulation of striatal NMDA receptors is a powerful stimulus to rise extracellular adenosine (Manzoni *et al.*, 1994; Jin and Fredholm, 1997b; Delaney *et al.*, 1998; Melani *et al.*, 1999a) probably involving an enhanced metabolic demand. In addition, previous data suggest that reverse dialysis of raclopride into the NAC facilitated dopamine release (Imperato and Di Chiara, 1988; Ferre *et al.*, 1994; Freeman and Tallarida, 1994; Theros *et al.*, 1996). If extracellular levels of dopamine are enhanced in our experiment, it is unlikely that dopamine competes effectively with raclopride at postsynaptic D₂ receptors as the high concentrations of raclopride used here should produce a near total receptor blockade. Rather, raclopride-induced dopamine release might stimulate D₁ receptor containing striatal neurons (e.g. Gerfen, 2000; Le Moine *et al.*, 1997, Svenningsson *et al.*, 1999, West *et al.*, 2002) thereby promoting their energy demand and, in turn, increasing extracellular adenosine levels. Taken together so far, one possible mechanism to explain raclopride-induced stimulation of extracellular adenosine in the NAC might be an enhanced energy demand of accumbal neurons mediated in part by dopamine and glutamate-dependent processes.

Reverse microdialysis of SCH23390

The present study further revealed that reverse microdialysis of the selective dopamine D₁ receptor antagonist SCH23390 (Seeman and Van Tol, 1994) increased extracellular adenosine in the NAc. Perfusion of lower concentrations of SCH23390 (10, 100 µM) known to stimulate glutamate (Saulskaya and Mikhailova, 2002) or dopamine (Rahman and McBride, 2000) release in the NAC induced an insignificant, up to 3-fold increase of dialysate adenosine. The intermediate concentration of SCH23390 (1 mM) resulted in an insignificant, about 10-fold increase, the highest concentration (10 mM) in a significant, about 600-fold increase of dialysate adenosine. Thus, the relative magnitude of increases of dialysate adenosine concentrations induced by different concentrations of SCH23390 and raclopride were roughly comparable. As already discussed with reference to the effects of the highest dose of raclopride, the pronounced rise and the peak adenosine dialysate level induced by the highest dose of SCH23390 (10 mM) might point to an involvement of unphysiological mechanisms (Melani *et al.*, 1999b; von Lubitz, 1999). As the low and intermediate concentrations of SCH23390 (10 µM, 100 µM, 1 mM) did not alter dialysate adenosine levels significantly, the present data do not provide evidence for a role of intra-NAC D₁ receptors in regulation of extracellular adenosine. However, the data do not exclude such a role as the lower

concentrations appear to stimulate dialysate adenosine, but with considerable inter-individual variability. The cellular mechanisms mediating the SCH23390-induced stimulation of extracellular adenosine are unknown. Possible mechanisms involve SCH23390-induced release of glutamate in the NAC (Saulskaya and Mikhailova, 2002) which - through activation of ionotropic glutamate receptors - might increase extracellular adenosine levels (Jin and Fredholm, 1997b; Melani *et al.*, 1999a), Manzoni *et al.*, 1994, Chen *et al.* 1992, (Craig and White, 1993; Lloyd *et al.*, 1993; Delaney and Geiger, 1998; Delaney *et al.*, 1998).

Possible functional implications

Taken together, the present study demonstrates for the first time that a selective intra-NAC blockade of dopamine D₂ receptors produced a significant increase of extracellular adenosine through yet unknown cellular mechanisms. It is suggested that the increase of extracellular adenosine which was significant only with higher doses of raclopride might represent a homeostatic modulatory mechanism proposed to be a main function of adenosine in response to neuronal metabolic challenges (e.g. Cunha, 2001, Dunwiddie and Masino, 2001). The enhanced metabolic challenges to accumbal neurons could be imposed by dopamine and glutamate-dependent mechanisms.

There is compelling evidence that dopamine plays a role opposite to adenosine in the NAC in control of behaviour and that these antagonistic effects are in part mediated by intra-membrane adenosine-dopamine receptor-receptor interactions (Ferre *et al.*, 1997; Fuxe *et al.*, 1998; Zahniser *et al.*, 2000). Our data imply that behavioural or immunohistochemical effects induced by dopamine D₂ receptor antagonists administered either systemically or locally (e.g. (Chartoff *et al.*, 1999; Hauber *et al.*, 2001; Ougazzal *et al.*, 1995; Oegren and Fuxe, 1998; Oezer *et al.*, 1997) involve, at least in higher doses, a secondary increase in extracellular adenosine in the NAC stimulating accumbal A₁ and A₂ receptors. Thus, it is conceivable that motor inhibition produced by raclopride after systemic or intra-NAC administration (e.g. Oezer *et al.*, 1997) might also involve a stimulation of accumbal A_{2A} receptors which are known to cause locomotor inhibition (Barraco *et al.*, 1994; Hauber and Munkle, 1997). In addition, increased extracellular adenosine levels induced by D₂ receptors antagonists would explain why A_{2A} receptor antagonists have low motor stimulant effects by its own (Svenningsson and Fredholm, 1997; Hauber *et al.*, 1998; Marston *et al.*, 1998; Popoli *et al.*, 1998), but produce prominent motor stimulant effects when co-administered with D₂ receptor antagonists (Kanda *et al.*, 1994; Kafka and Corbett, 1996; Hauber *et al.*, 1998; Ward and

Dorsa, 1999; Hauber *et al.*, 2001). Therefore, the present data point to the possibility that behavioural effects induced by D₂ receptor antagonists in the NAC are in part mediated by a secondary increase of extracellular adenosine.

Acknowledgements

The generous gift of raclopride by Astra Arcus, Soedertaelje, Sweden is gratefully acknowledged. This research was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha2340/1-4).

References

- Barraco, R. A., Martens, K. A., Parizon, M., Normile, H. J., 1994. Role of adenosine A_{2a} receptors in the nucleus accumbens. *Prog Neuropsychopharm Biol Psychiatr.*
- Chartoff, E. H., Ward, R. P., Dorsa, D. M., 1999. Role of adenosine and N-methyl-D-aspartate receptors in mediating haloperidol-induced gene expression and catalepsy. *J Pharmacol Exp Ther.* 291, 531-537.
- Chen, Y., Graham, D. I., Stone, T. W., 1992. Release of endogenous adenosine and its metabolites by the activation of NMDA receptors in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol.* 106, 632-638.
- Craig, C. G., White, T. D., 1993. N-Methyl-D-Aspartate- and Non-N-Methyl-D-Aspartate evoked adenosine release from cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem.* 60, 1073-1080.
- Cunha, R. A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int.* 38, 107-125.
- Delaney, S. M., Geiger, J. D., 1998. Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 285, 568-572.
- Delaney, S. M., Shepel, P. N., Geiger, J. D., 1998. Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. *J Pharmacol Exp Ther.* 285, 561-567.
- Dunwiddie, T. V., Masino, S. A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24, 31-55.
- Fenu, S., Cauli, O., Morelli, M., 2000. Cross-sensitization between the motor activating effects of bromocriptine and caffeine: role of adenosine A_{2A} receptors. *Behav Brain Res.* 114, 97-105.
- Fenu, S., Morelli, M., 1998. Motor stimulant effects of caffeine in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are dependent on previous stimulation of dopamine receptors: a different role of D₁ and D₂ receptors.
- Ferre, S., 1997. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology.* 133, 107-120.

- Ferre, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P., Fuxe, K., 1997. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 20, 482-487.
- Ferre, S., O'Connor, W. T., Snaprud, P., Ungerstedt, U., Fuxe, K., 1994. Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience.* 63, 765-773.
- Fredholm, B. B., 1995. Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacology and Toxicology.* 76, 228-239.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P., Williams, M., 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev.* 46, 143-156.
- Freeman, K. A., Tallarida, R. J., 1994. A quantitative study of dopamine control in the rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther.* 268, 629-638.
- Fuxe, K., Ferre, S., Zoli, M., Agnati, L. F., 1998. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev.* 26, 258-273.
- Gerfen, C. R., 2000. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23, S64-70.
- Hall, H., Kohler, C., Gawell, L., Farde, L., Sedvall, G., 1988. Raclopride, a new selective ligand for the dopamine-D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 12, 559-568.
- Hauber, W., Koch, M., 1997. Adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens modulate prepulse inhibition of the startle response. *Neuroreport.* 8, 1515-1518.
- Hauber, W., Munkle, M., 1997. Motor depressant effects mediated by dopamine D2 and adenosine A2A receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen. *Eur J Pharmacol.* 323, 127-131.
- Hauber, W., Nagel, J., Sauer, R., Muller, C. E., 1998. Motor effects induced by a blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport.* 9, 1803-1806.
- Hauber, W., Neuscheler, P., Nagel, J., Muller, C. E., 2001. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A(2A) receptors in the caudate-putamen of rats. *Eur J Neurosci.* 14, 1287-1293.
- Imperato, A., Di Chiara, G., 1988. Effects of locally applied D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists studied with brain dialysis. *Eur J Pharmacol.* 156, 385-393.
- Jin, S., Fredholm, B. B., 1997. Glucose deprivation increases basal and electrically evoked transmitter release from rat striatal slices. Role of NMDA and adenosine A1 receptors. *Eur J Pharmacol.* 340, 169-175.
- Kafka, S. H., Corbett, R., 1996. Selective adenosine A2A receptor/dopamine D2 receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Eur J Pharmacol.* 295, 147-154.
- Kanda T., Shiozaki S., Shimada J., Suzuki F., Nakamura J., 1994. KF17837: a novel selective adenosine A(2A) receptor antagonist with anticataleptic activity. *Eur J Pharmacol.* 256,(3), 263.

- Kelley, A. E., 1999. Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology*. 27, 198-213.
- Latini, S., Pedata, F., 2001. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem*. 79, 463-484.
- LeMoine, C., Svenningsson, P., Fredholm, B.B., Bloch, B., 1997. Dopamine-Adenosine Interactions in the Striatum and the Globus Pallidus: Inhibition of Striatopallidal Neurons through Either D2 or A2A Receptors Enhances D1 Receptor-Mediated Effects. *J Neurosci*. 17, 8038-8048.
- Lloyd, H. G., Lindstrom, K., Fredholm, B. B., 1993. Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. *Neurochem Int*. 23, 173-185.
- Manzoni, O. J., Manabe, T., Nicoll, R. A., 1994. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science*. 265, 2098-2101.
- Marston, H. M., Finlayson, K., Maemoto, T., Olverman, H. J., Akahane, A., Sharkey, J., Butcher, S. P., 1998. Pharmacological characterization of a simple behavioral response mediated selectively by central adenosine A1 receptors, using in vivo and in vitro techniques. *J Pharmacol Exp Ther*. 285, 1023-1030.
- Melani, A., Corsi, C., Gimenez-Llort, L., Martinez, E., Ogren, S. O., Pedata, F., Ferre, S., 1999a. Effect of N-methyl-D-aspartate on motor activity and in vivo adenosine striatal outflow in the rat. *Eur J Pharmacol*. 385, 15-19.
- Melani, A., Pantoni, L., Corsi, C., Bianchi, L., Monopoli, A., Bertorelli, R., Pepeu, G., Pedata, F., 1999b. Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke*. 30, 2448-2454; discussion 2455.
- Morrison, P. F., Bungay, P. M., Hsiao, J. K., Mefford, I. N., Dykstra, K. H., Dedrick R. L., 1991. Quantitative microdialysis, in *Microdialysis in the Neurosciences* (Huston J. P., ed.), pp 47-59. Elsevier, Amsterdam.
- Ögren S. O., Fuxe K., 1988. D1- and D2-receptor antagonists induce catalepsy via different efferent striatal pathways. *Neurosci. Lett*. 85, 333-338.
- Ongini, E., Fredholm, B. B., 1996. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 17, 364-372.
- Ouagazzal, A., Amalric M., 1995. Competitive NMDA receptor antagonists do not produce locomotor hyperactivity by a dopamine-dependent mechanism. *Eur. J. Pharm*. 294, 137.
- Ozer H., Ekinci A.C., Starr M. S., 1997. Dopamine D-1- and D-2-dependent catalepsy in the rat requires functional NMDA receptors in the corpus striatum, nucleus accumbens and substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 777, 51-59.
- Pellegrino, L. J., Pellegrino, A. S., Cushman, A. J., 1981. A stereotaxic atlas of the rat brain. Plenum Press, New York, London.
- Pinna, A., Corsi, C., Carta, A. R., Valentini, V., Pedata, F., Morelli, M., 2002. Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur J Pharmacol*. 446, 75-82.
- Popoli, P., Reggio, R., Pezzola, A., Fuxe, K., Ferre, S., 1998. Adenosine A1 and A2A receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. *Neurosci Lett*. 251, 201-204.

- Rahman, S., McBride, W. J., 2000. Feedback control of mesolimbic somatodendritic dopamine release in rat brain. *J Neurochem.* 74, 684-692.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50, 413-492.
- Robbins, T. W., Everitt, B. J., 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol.* 6, 228-236.
- Rosin, D. L., Robeva, A., Woodard, R. L., Guyenet, P. G., Linden, J., 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 401, 163-186.
- Rudolphi, K. A., Schubert, P., 1997. Modulation of neuronal and glial cell function by adenosine and neuroprotection in vascular dementia. *Behav Brain Res.* 83, 123-128.
- Saulskaya, N. B., Mikhailova, M. O., 2002. Feeding-induced decrease in extracellular glutamate level in the rat nucleus accumbens: dependence on glutamate uptake. *Neuroscience.* 112, 791-801.
- Secrist, J. A., 3rd, Barrio, J. R., Leonard, N. J., Weber, G., 1972. Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes. Biological activities and spectroscopic properties. *Biochemistry.* 11, 3499-3506.
- Seeman, P., Ulpian, C., 1988. Dopamine D1 and D2 receptor selectivities of agonists and antagonists. *Adv Exp Med Biol.* 235, 55-63.
- Seeman, P., van Tol, H. H., 1994. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 15, 264-270.
- Strecker, R. E., Morairty, S., Thakkar, M. M., Porkka-Heiskanen, T., Basheer, R., Dauphin, L. J., Rainnie, D. G., Portas, C. M., Greene, R. W., McCarley, R. W., 2000. Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res.* 115, 183-204.
- Svenningsson, P., Fredholm, B. B., 1997. Caffeine mimics the effect of a dopamine D2/3 receptor agonist on the expression of immediate early genes in globus pallidus. *Neuropharmacology.* 36, 1309-1317.
- Svenningsson, P., Nomikos, G. G., Fredholm, B. B., 1999. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J Neurosci.* 19, 4011-4022.
- Thermos, K., Radke, J., Kastellakis, A., Anagnostakis, Y., Spyraiki, C., 1996. Dopamine-somatostatin interactions in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Synapse.* 22, 209-216.
- Turgeon, S. M., Pollack, A. E., Schusheim, L., Fink, J. S., 1996. Effects of selective adenosine A1 and A2a agonists on amphetamine-induced locomotion and c-Fos in striatum and nucleus accumbens. *Brain Res.* 707, 75-80.
- von Lubitz, D. K., 1999. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? [corrected and republished article originally printed in *Eur J Pharmacol.* 1999 Jan 15;365(1):9-25]. *Eur J Pharmacol.* 371, 85-102.
- Ward, R. P., Dorsa, D. M., 1999. Molecular and behavioral effects mediated by Gs-coupled adenosine A2a, but not serotonin 5-Ht4 or 5-Ht6 receptors following antipsychotic administration. *Neuroscience.* 89, 927-938.

- West, A. R., Grace, A. A., 2002. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci.* 22, 294-304.
- Westerink, B. H., 1995. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav Brain Res.* 70, 103-124.
- Wojcik, W. J., Neff, N. H., 1982. Adenosine measurement by a rapid HPLC-fluorometric method: induced changes of adenosine content in regions of rat brain. *J Neurochem.* 39, 280-282.
- Zahniser, N. R., Simosky, J. K., Mayfield, R. D., Negri, C. A., Hanania, T., Larson, G. A., Kelly, M. A., Grandy, D. K., Rubinstein, M., Low, M. J., Fredholm, B. B., 2000. Functional uncoupling of adenosine A(2A) receptors and reduced response to caffeine in mice lacking dopamine D2 receptors. *J Neurosci.* 20, 5949-5957.

Fig. 1. Location of probes in the NAC reconstructed on the basis of coronal sections according to the atlas of Pellegrino et. al. (1981). Only the dialyzing part of the probe is shown in representative planes. The distance from bregma is labelled in each section.

Fig. 2. Effects of perfusion of raclopride (10 mM, 1mM, 100 μ M, 10 μ M; black bar) on dialysate adenosine levels in the NAc. Significant differences ($p < 0.05$) compared to the basal values (T=0 min) are indicated for the doses of 10 mM (*) and 1mM (#) raclopride. (ANOVA followed by Dunnett's test with T=0 min as reference).

Fig. 3. Effects of perfusion of SCH23390 (10 mM, 1mM, 100 μ M, 10 μ M) on dialysate adenosine levels in the NAc. (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) compared to the basal values (T=0 min) (ANOVA followed by Dunnett's test with T=0 min as reference).

Fig. 1

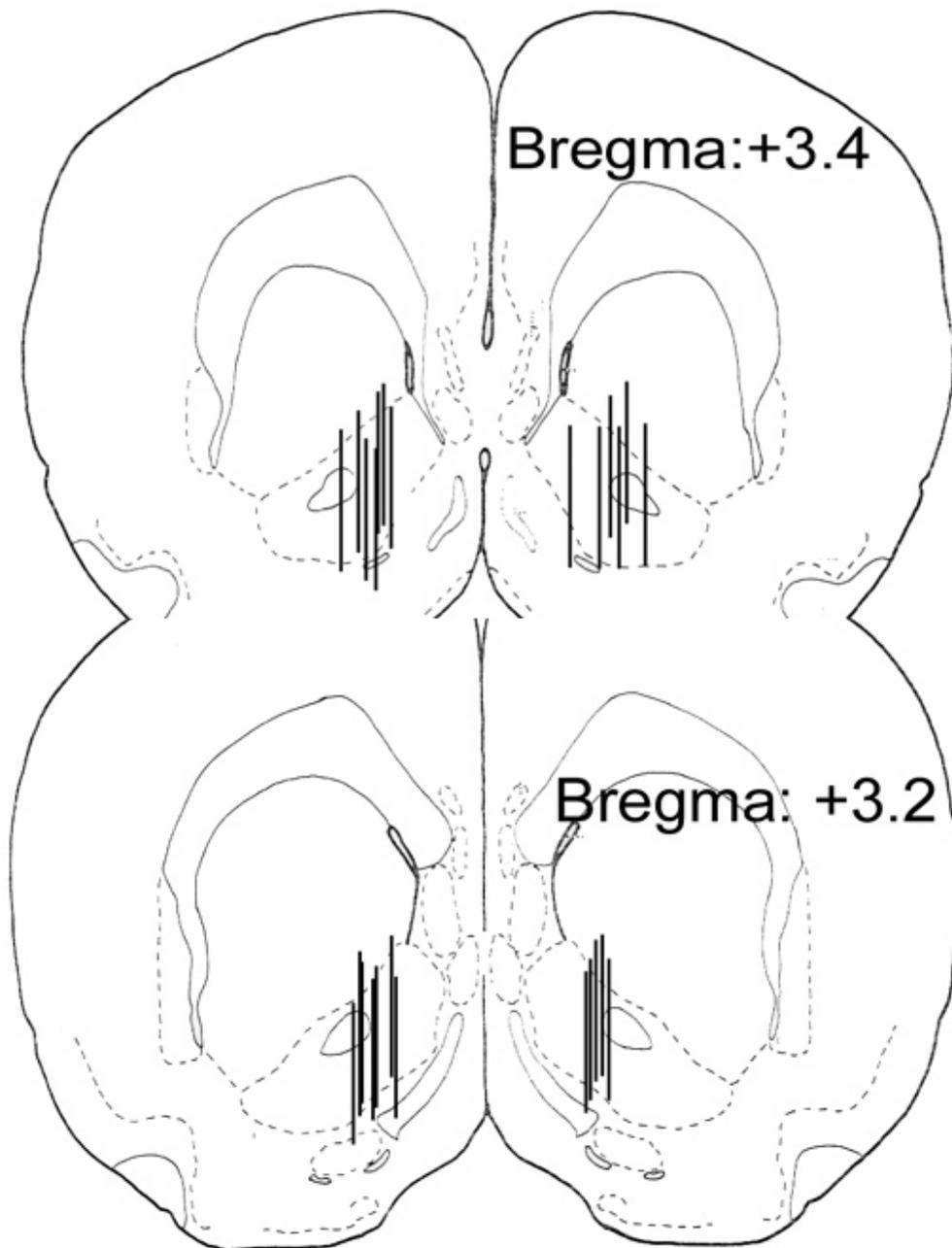


Fig. 2

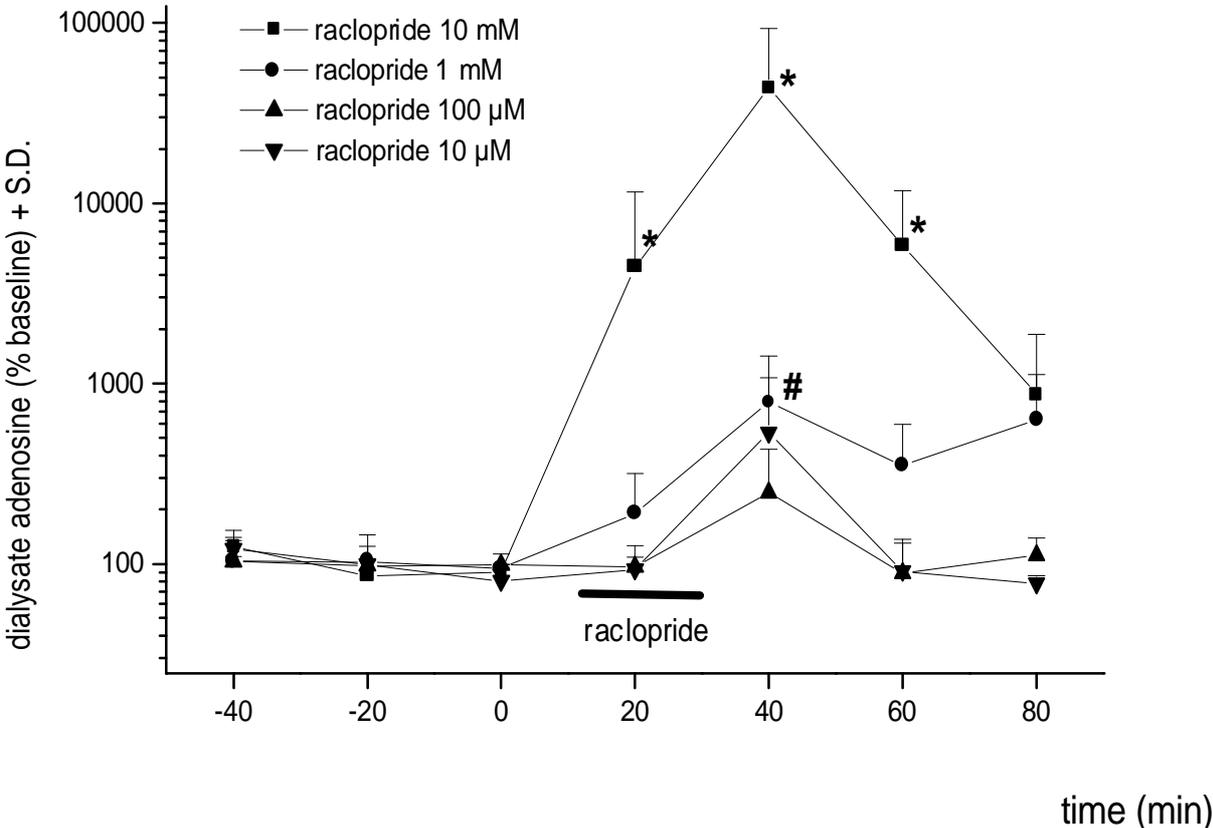
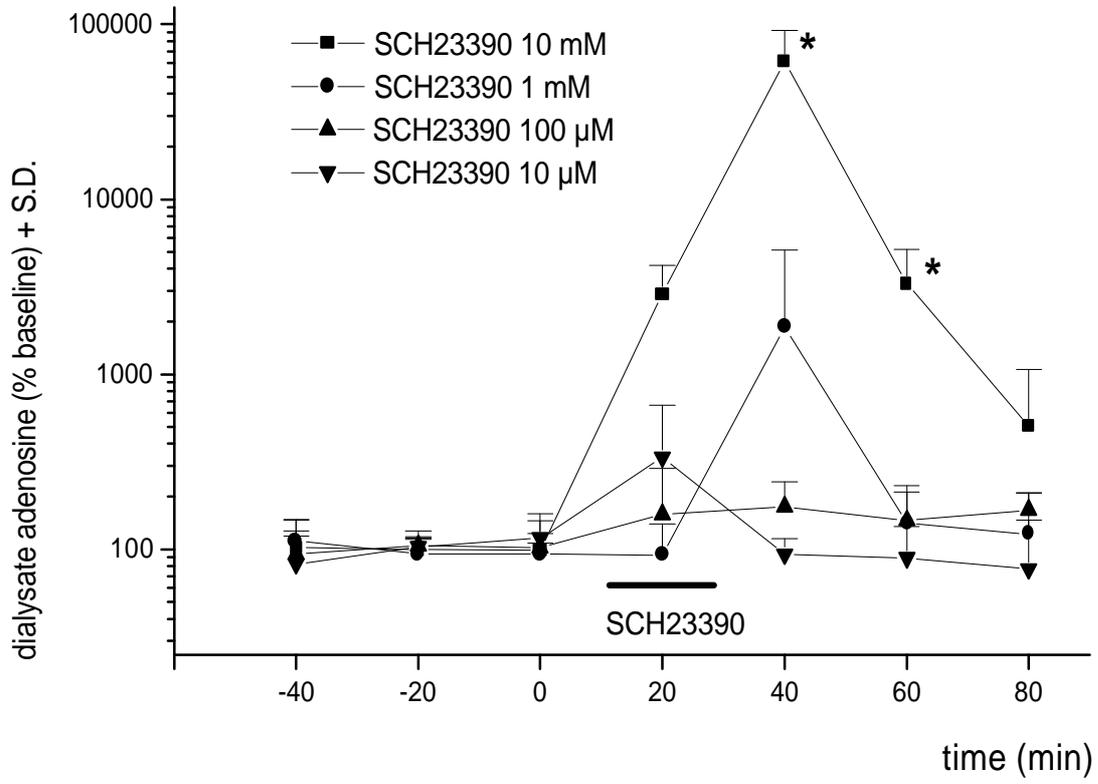


Fig. 3



6.5 Effekte biologisch relevanter Stimuli auf den extrazellulären Gehalt von Adenosin und Dopamin im Nukleus akkumbens der Ratte

Einleitung

Das Nukleosid Adenosin moduliert die Aktivität von Neuronen über spezifische membranständige Rezeptoren, die als A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ Rezeptoren bezeichnet werden (Fredholm *et al.*, 1994). Diese Neuromodulation spielt in den Basalganglien, einer Gruppe intensiv miteinander vernetzter subkortikaler Hirnkerne, bei der Steuerung von Bewegungsinitiation, Belohnungserwartung und Kognition eine wichtige Rolle (Ferre, 1997; Hauber, 2002; Morelli *et al.*, 2002). Der A₁ Rezeptor ist mit inhibitorischem G-Protein gekoppelt, während der A_{2A} Rezeptor über stimulierendes G-Protein bei einer Aktivierung den Gehalt von cAMP in der Zelle erhöht (van Calker *et al.*, 1979; Dunwiddie, 1996). Die A₁ und A_{2A} Rezeptoren weisen sehr hohe Affinitäten zu Adenosin auf (Fredholm *et al.*, 1994), so dass sie durch extrazelluläre Adenosin-Konzentrationen im nanomolaren Bereich aktiviert werden (Übersicht in Dunwiddie and Masino, 2001). Sie unterliegen einer tonischen Aktivierung (Hauber *et al.*, 1998b; Svenningsson *et al.*, 1999b) durch die basale extrazelluläre Adenosin-Konzentration (Ballarin *et al.*, 1991; Berman *et al.*, 2000; Latini and Pedata, 2001; Nagel and Hauber, 2002), während die niedrig affinen A_{2B} und A₃ Rezeptoren nur durch pathogen erhöhte Adenosin-Spiegel aktiviert werden (Latini and Pedata, 2001). Der A_{2A} Rezeptor wird nahezu ausschließlich im Striatum, der Eingangsstruktur der Basalganglien exprimiert (Ongini and Fredholm, 1996; Rosin *et al.*, 1998). Der A₁ Rezeptor ist hingegen im gesamten Gehirn nachweisbar (Ochiishi *et al.*, 1999). Adenosin reduziert die synaptische Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern über die Aktivierung von präsynaptischen Adenosin-Rezeptoren (Fredholm and Dunwiddie, 1988; Calabresi *et al.*, 1997; Cunha, 2001). Postsynaptisch exprimierte A₁ Rezeptoren modulieren die dopaminerge Neurotransmission im Wesentlichen über direkte Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen (Ferre *et al.*, 1997; Ferre *et al.*, 1998; Fuxe *et al.*, 1998; Ferre *et al.*, 1999; Mayfield *et al.*, 1999; Gines *et al.*, 2000). Zudem wird die dopaminerge Neurotransmission durch die Interaktion von kolokalisierten A_{2A} und D₂ Rezeptoren (Schiffmann *et al.*, 1991) beeinflusst (Ferré *et al.*, 1992; Ferre *et al.*, 1994; Ferre, 1997; Ferre *et al.*, 1997; Ribeiro, 1999; Svenningsson *et al.*, 1999b). Funktionell betrachtet handelt es sich bei Adenosin und Dopamin um Gegenspieler, die in antagonistischer Interaktion zueinander stehen. Aus dieser Erkenntnis entwickelten

Fuxe und Mitarbeiter ein theoretisches Modell für eine mögliche physiologische Bedeutung dieser Interaktionen (Fuxe *et al.*, 1998). In diesem Ansatz wurde dargestellt, dass antagonistische Adenosin-Dopamin-Interaktionen eine zusätzliche Integrationsebene für neuronale Netzwerke bilden könnten. Neuere Studien lieferten allerdings eine große Anzahl von Hinweisen für physiologisch relevante Verhaltenseffekte, die vom Dopamin-System unabhängig durch Adenosin-Rezeptoren vermittelt wurden (Svenningsson *et al.*, 1999b; Aoyama *et al.*, 2000).

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass im Nucleus accumbens, einer Teilstruktur des ventralen Striatums, die Verhaltenssteuerung über Adenosin-Rezeptoren, zum Teil über Interaktion mit Dopamin-Rezeptoren, moduliert wird (Ferre *et al.*, 1994; Ferre, 1997; Hauber and Koch, 1997; Hauber and Munkle, 1997; Baldo *et al.*, 1999; Schwienbacher *et al.*, 2002; Nagel *et al.*, in submission). Der Nucleus accumbens ist Bestandteil der limbischen Funktionsschleife, einer Gruppe verknüpfter Hirnareale, die für das wesentliche Substrat zur Initiation von situationsangepasstem motivierten Verhalten angesehen wird (Kalivas and Nakamura, 1999; Kelley, 1999; Kelley and Berridge, 2002). In Mikrodialysestudien wurde gezeigt, dass es mit Auftreten von biologisch relevanten Stimuli in viele Fällen zu einer mit dem Ereignis gekoppelten Ausschüttung von Dopamin im NAc kommt (Feenstra *et al.*, 1998; Saigusa *et al.*, 1999) (Übersicht in Ikemoto and Panksepp, 1999; Horvitz, 2000). Es wäre vorstellbar, dass während dieser Ereignisse die dopaminerge Neurotransmission über eine Dopamin-Adenosin-Interaktion moduliert wird (Ferre *et al.*, 1997; Fuxe *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2000). So würde eine zu dem Anstieg des Dopamins im NAc koinzident verlaufende Veränderung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes zu erwarten sein.

In einer früheren Studie konnten wir zeigen, dass Stimuli wie unbekanntes Futter, Handhabungsstress (*handling*), Käfigwechsel und Gabe von bekanntem Laborfutter zu keinen signifikanten Veränderungen von extrazellulärem Adenosin im NAc von Ratten führt (Nagel and Hauber, 2002). Bei jener Arbeit, die den Einfluss von Umgebungsreizen auf akkumbales Adenosin untersuchte, wurden Koordinaten im zentralen Bereich des NAc für die Sondenplatzierung gewählt. In der vorliegenden Studie wurde der funktionalen Heterogenität der verschiedenen Substrukturen des NAc Rechnung getragen. Wie sich in funktionellen und anatomischen Studien herausstellte, ist der NAc in die drei Substrukturen *core*, *shell* und *rostral pole* unterteilbar (Heimer *et al.*, 1991; Kelley, 1999). Die *shell* des NAc scheint, insbesondere bei der Steuerung von Fressverhalten, unconditioniertem Verhalten und bei der Verarbeitung von Neuigkeitswerten eine wichtige Rolle zu spielen (Stratford and Kelley, 1997; Swanson *et al.*, 1997; Kelley and Berridge, 2002), während der *core* in diesen

Zusammenhängen unbedeutend, jedoch bei der Steuerung von konditioniertem Verhalten essentiell zu sein scheint (Rebec et al., 1997b; Parkinson et al., 1999). Daher wählten wir in dieser Mikrodialyse-Studie die Koordinaten der *shell* für die Platzierung der Sonde zur Analyse von Adenosin. Um sicher nachzuweisen, dass die von uns gewählten Stimuli die dopaminerge Neurotransmission im NAc beeinflussen, wurden die gewonnenen Proben geteilt. So war es möglich parallel die Veränderungen des Adenosin- und des Dopamin-Gehaltes der Proben, bezogen auf die dargebotenen Stimuli, zu analysieren. Falls eine phasische und koinzidente Modulation der dopaminergen Transmission durch Adenosin vorliegen sollte, erwarteten wir bei einer Veränderung des akkumbalen Dopamins durch Umweltreize eine korrespondierende, transiente Veränderung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes.

Material und Methoden

Sämtliche tierexperimentelle Arbeiten sind durch das zuständige Regierungspräsidium Stuttgart genehmigt worden und stehen im Einklang mit dem derzeit gültigen Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland.

Tiere

16 männliche Sprague Dawley Ratten (220-280 g; Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) wurden in Standard-Macrolon® Typ IV Käfigen (55 x 35 x 10 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland) bis zur Operation in Gruppen bis zu fünf Tieren gehalten. Nach der Operation wurde die Haltung auf Einzelhaltung in Macrolon® Typ III Käfigen (37 x 21 x 30 cm; Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland) mit erhöhten Deckeln umgestellt. Die Käfige befanden sich dann in belüfteten Isolierschränken, um störende Einflüsse durch Routinetätigkeiten in der Tierhaltung abzuschirmen. Die Raumtemperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) und Luftfeuchtigkeit ($50 \pm 10\%$) wurden konstant gehalten. Das Lichtregime bestand aus einem 12:12-h Hell-Dunkel-Rhythmus bei dem das Licht zwischen 6:00 und 18:00 MEZ eingeschaltet war. Der Zugang zu Wasser und Laborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) war unbeschränkt.

Stereotaktische Operation

Die Ratten wurden nach einer Prä-Medikation mit Atropin-Sulfat (0,5 mg/kg i.p.) (Research Biochemicals Inc., Natick, USA) mit Natrium-Pentobarbital (50 mg/kg i.p.) (Sigma, Deisenhofen Deutschland) in tiefe Narkose versetzt und anschließend in einem Stereotakten (Kopf Instruments, Tujunga, USA) fixiert. Aus Silikon gefertigte Führungskanülen (CMA/12; Außendurchmesser: 0,9mm) (CMA, Stockholm, Schweden) wurden auf die NAcS ausgerichtet und unilateral implantiert. Die Koordinaten wurden mit AP: + 2,0 mm, L: $\pm 1,2$

mm und V:-6,0 mm bezogen auf Bregma (Schädeloberfläche) entsprechend der Angaben des Atlases nach Paxinos und Watson (1986) gewählt. Jedes Tier hatte vor dem Beginn des Mikrodialyse-Experimentes mindestens 5 Tage Zeit, um sich von der Operation zu erholen.

Mikrodialyse

Am Tag vor Beginn des Experiments wurden die Tiere vom Tierstall in das Verhaltenslabor gebracht. Der Käfigdeckel wurde durch ein oben offenes Gehäuse (Eigenbau Universität Stuttgart) ersetzt (Höhe: 20 cm). Die Mikrodialyse-Sonde (CMA/12, 2 mm freie Membranlänge; 0,5 mm Außendurchmesser der Membrane) (CMA, Stockholm, Schweden) wurde durch die Führungskanüle (Ventralposition der Sondenspitze in Bezug auf die Schädelknochenoberfläche: -8,0 mm) in die NAcS geschoben. Die Tiere waren über ein Schädelbefestigungssystem (Instech, Plymouth Meeting, USA) an ein 2-Kanal Flüssigkeitsdrehgelenk Tsumura TCS2-23 (Pronexus, Skärholmen, Schweden), das an einen ausbalancierten Arm (Eigenbau Universität Stuttgart) montiert war, befestigt. Die gesamte zu- und abführende Verschlauchung bestand aus FEP Schlauchmaterial (i.d. 0.12 mm) Schlauch-Verbindungsstücke (CMA, Stockholm, Schweden). Ab 17:00 Uhr (eine Stunde vor Abschalten des Lichtes) wurde die Perfusion der Sonde mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) mit einer Flussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (CMA 102; CMA, Stockholm, Schweden) begonnen. Die aCSF hatte folgende Zusammensetzung: 147 mM Na^+ , 3 mM K^+ , 1.2 mM Ca^{2+} , 1.0 mM Mg^{2+} , der pH-Wert betrug 6,6. Das Volumen für eine Probe wurde über 20 Minuten gesammelt (40 μl) (CMA/142; CMA, Stockholm, Schweden). Am Folgetag wurde kurz nach Einschalten des Lichtes das Futter aus dem Käfig entfernt. Die Probensammlung wurde 14 Stunden nach Einsetzen der Sonde begonnen.

Chemische Analyse

Adenosin wurde nach einer Derivatisierung mit Chloracetaldehyd durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion als fluoreszierendes Derivat (1,N6-Ethenoadenosine) (Secrist *et al.*, 1972) quantifiziert. Die Mikrodialyse-Probe (40 μl) wurde mit Zink Azetat (5,3 μl ; 0,01 mM) und 7,5 μl Chloracetaldehyd (4,5 %) versetzt (Wojcik and Neff, 1982). Der Ansatz wurde für 45 min bei 90°C inkubiert.

Die Analyse wurde mit einer Umkehrphasen, sog. *reversed-phase* (RP), Ionenpaar-HPLC durchgeführt. Ein isokratisches HPLC-System (Kontron 520 Pumpe und Kontron 565 Probensammler, Biotek Kontron, Neufahrn, Deutschland) mit Nucleosil 100-5-C18 Säule (5 μm Partikel, Länge x Innendurchmesser: 125 x 3 mm, Bischoff, Leonberg, Deutschland)

und Säulenofen (Echotherm C030, Torrey Pines Sci., Santa Florencia, USA), eingestellt auf 36° C, wurde verwendet. Die mobile Phase, bestehend aus 30 mM Azetat Puffer mit 11% Methanol und 1 mM Oktansulfon-Säure (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), wurde auf pH 3,6 eingestellt. Die Flussrate lag bei 0,3 ml / min. Fluoreszenz wurde durch einen Detektor (RF-10 AXL, Shimadzu, Kyoto, Japan) mit fest eingestellten Wellenlängen, Exzitation (270 nm) und Emission (394 nm) (Melani *et al.*, 1999b), ermittelt. Ethenoadenosin-Signale wurden identifiziert und quantifiziert durch den Vergleich mit bekannten Standardkonzentrationen, die die gleiche Behandlung wie die Proben erfahren haben. Zusätzlich wurde Adenosin über sein Verschwinden durch den Verdau mit Adenosindeaminase, zugesetzt vor der Derivatisierung (Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur) (Wojcik and Neff, 1982), nachgewiesen. Das Detektionslimit für Adenosin in einer derivatisierten Probe betrug 12.7 fmol (3,4 pg) bei einem maximalen Injektionsvolumen von 20 µl. Die Analyse von Adenosin wurde wie früher an anderer Stelle von Fuchs beschrieben durchgeführt (Fuchs, 2002). Auf Grund messtechnischer Probleme konnten nicht für alle Tiere Parallelmessungen durchgeführt werden (Tab.1; Tab.2).

Versuchdurchführung

Zu Beginn der Verhaltensexperimente war die Mikrodialyse sonde bereits für 14 h im Gewebe, so dass stabile *Baseline*-Werte für Adenosin vorlagen (Nagel and Hauber, 2002).

Die Effekte von zwei Stimuli, bei denen in früheren Studien gezeigt wurde, dass sie erhöhte Dopamin-Spiegel im NAc hervorrufen können, wurden untersucht: (1) ungewohntes, wohlschmeckendes Futter (4 g; Fonzie®, heute Xoxies®) gespendet von UB Snack Food (heute LU Snack Food, Donauwörth, Deutschland) (Bassareo and Di Chiara, 1997, 1999) stand dem Tier für 20 min im Käfig zur Verfügung. Die aufgenommene Futtermenge wurde ermittelt. (2) Handhabung (*handling*), d.h., das Tier wurde aus dem Käfig genommen, für 20 min vorsichtig in einem Handtuch fixiert und anschließend zurückgesetzt (Feenstra *et al.*, 1998; Feenstra *et al.*, 2000). Jedes Tier wurde nur einem physiologischen Stimulus ausgesetzt und anschließend einer gesonderten pharmakologischen Studie zugeführt.

Histologische Verifizierung der Sondenplatzierung

Nach Abschluss der Experimente wurden die Tiere mit einer Überdosis Natrium-Pentobarbital eingeschläfert.

Die Gehirne wurden aus dem Schädelknochen präpariert und für 2,5 h in 10 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie für mindestens zwei Tage in 30 % (w/v) Glukoselösung überführt. Zur Bestimmung der Sondenplatzierung wurden Frontalschnitte (60 μm) der gefrorenen Gehirne im Bereich des NAc mit einem Kryostat (Reichert and Jung, Heidelberg, Deutschland) genommen. Die aufgezogenen Schnitte wurden mit einer Standardfärbemethode (Kresyl-Echt-Violett) eingefärbt, eingebettet und schließlich bezüglich der Sondenplatzierung ausgewertet (Abb. 1).

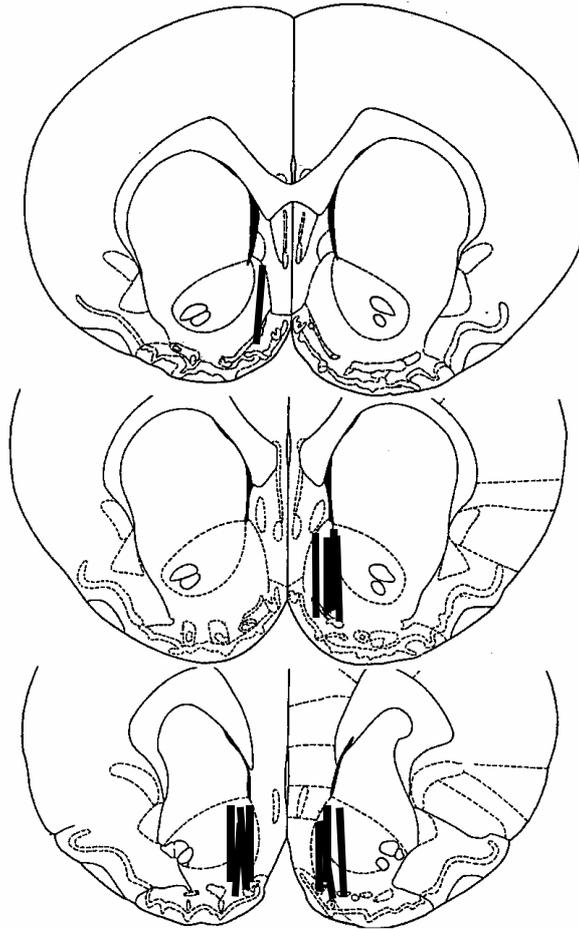


Abb. 1: Darstellung der Sondenplatzierung in Frontalschnitten.

Auswertung der Daten

Die neurochemischen Daten wurden in Prozentwerte überführt, bezogen auf einen 100% Basiswert. Dieser Basiswert wird aus dem Durchschnitt der Konzentration der 3 Proben berechnet die dem Stimulus gesammelt wurden.

Nach der Prüfung der Normalverteilung wurden die Daten mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) für Wiederholungsmessungen analysiert. Im Fall von signifikanten Unterschieden

wurde ein *post hoc* Test nach Dunnett für multiple Vergleiche durchgeführt, um die Werte mit signifikanten Unterschieden zu bestimmen. Dabei wurde die letzte Probe vor dem Stimulus als Kontrollwert herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Alle Ergebnisse stellen den Mittelwert der Stichprobe \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SigmaStat Vers. 2.0 (Jandel, Erkrath, Deutschland).

Ergebnisse

Bei 3 von 16 Tieren kam es während der Mikrodialyse zu methodischen Problemen, so dass nur 10 (Dopamin) bis 13 (Adenosin) komplette Probensätze für die HPLC-Analyse zur Verfügung standen. Die Lokalisation der Sonden im NAc der Tiere, die in die Auswertung einbezogen wurden, sind in Abb. 1 dargestellt.

Basale Adenosin-Konzentration

Mindestens eine der basalen Adenosin-Konzentrationen der ersten 3 Proben lag bei 6 von 13 Tieren unter dem Detektionslimit (Tab.1; Tab.2). Die Ergebnisse dieser Tiere wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Vor der Präsentation des ersten Stimulus lag die durchschnittliche Adenosin-Konzentration bei $2,48 \text{ pg}/\mu\text{l} + 1,01$ (Fonzie) und $1,05 \text{ pg}/\mu\text{l} + 0,61$ (*handling*)

Basale Dopamin-Konzentration

Die durchschnittliche Dopamin-Konzentration im Dialysat der letzten Probe vor dem Stimulus war $0,779 \text{ pg}/20\mu\text{l} + 0,1$ (Fonzie) und $3,2 \text{ pg}/20\mu\text{l} + 0,7$ (*handling*). Die Ergebnisse von 2 von 10 Tieren waren wegen messtechnischer Einschränkungen nicht analysierbar (Tab.1; Tab.2).

Effekte durch unbekanntes Futter

Die Präsentation von unbekanntem, wohlschmeckendem Futter (Fonzie) löste bei 6 von 7 Tieren spontane Futteraufnahme aus. Die aufgenommene Futtermenge lag nach 20 min bei einem Mittelwert von $1,043 \text{ g} + 0,285$. Die Fütterung von Fonzies bewirkte ein leichtes, nicht signifikantes Absinken des Adenosin-Gehaltes im Dialysat (ANOVA: $F(6,48)=1,345$; $P=0,263$, $N=7$) (Abb. 2). Der Dopamin-Gehalt im Dialysat stieg leicht an (ANOVA: $F(3,27)=1,584$; $P=0,209$; $N=4$) (Abb. 3)

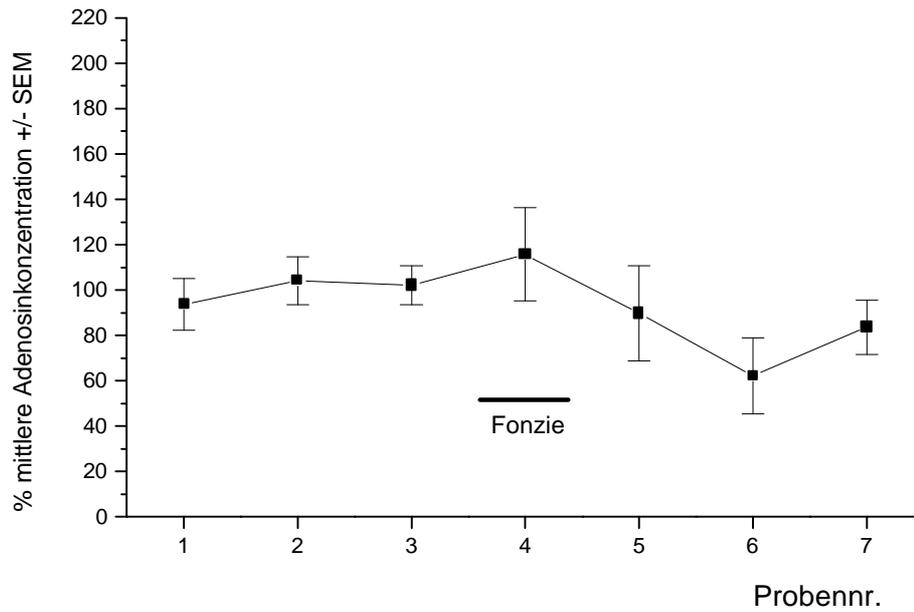


Abb. 2: Effekt von *Fonzie* während der Probensammlung über jeweils 20 min auf den Gehalt von extrazellulärem Adenosin im NAC

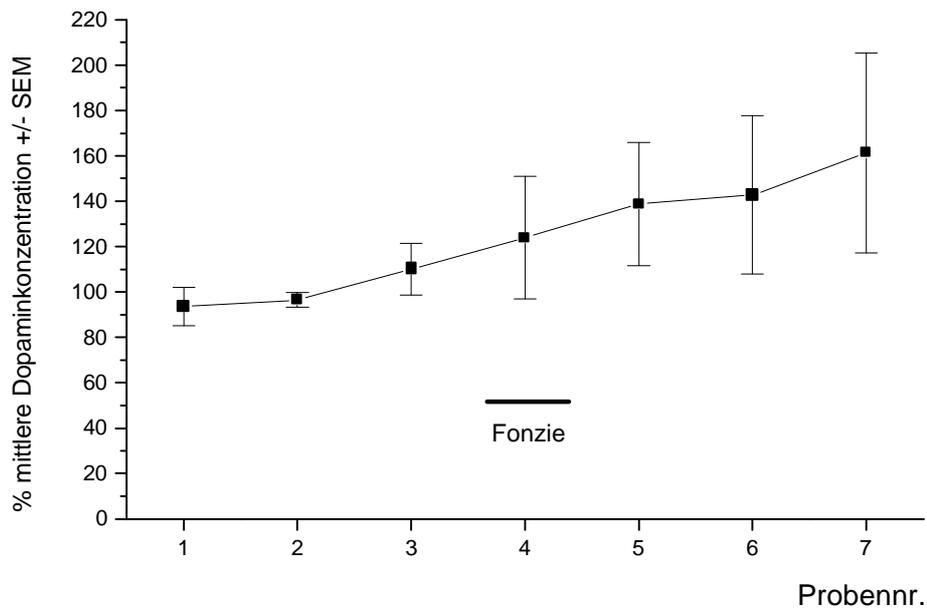


Abb. 3: Effekt von *Fonzie* während der Probensammlung über jeweils 20 min auf den Gehalt von extrazellulärem Dopamin im NAC

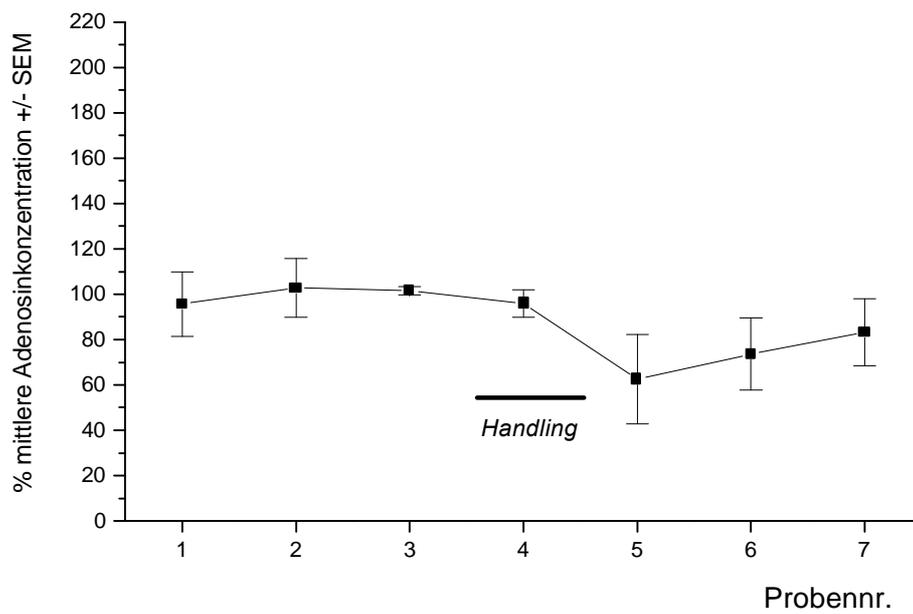


Abb. 4: Effekt von *handling* während der Probensammlung über jeweils 20 min auf den Gehalt von extrazellulärem Adenosin im NAc

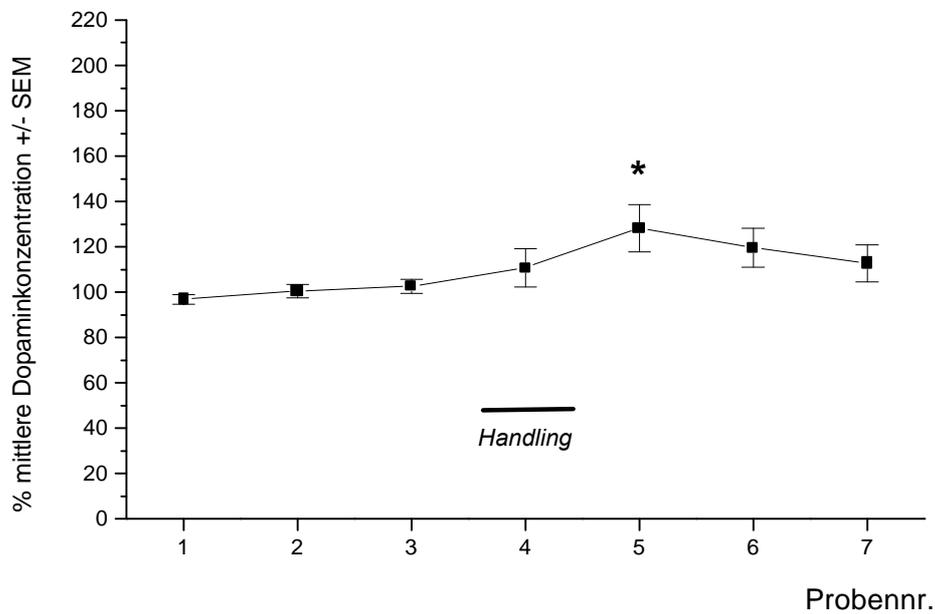


Abb. 5: Effekt von *handling* während der Probensammlung über jeweils 20 min auf den Gehalt von extrazellulärem Dopamin im NAc; * $p < 0,05$.

Unbekanntes Futter (Fonzie)	
Adenosin	Dopamin
Tierbezeichnung	Tierbezeichnung
OT2	OT2
OT3	OT3
OT4	-
OT6	OT6
OT7	OT7
OT16	-
OT18	-

Tab. 1: Zuordnung der Tierbezeichnung zu den durchgeführten Analysen (Versuchsteil Fonzie)

Effekte durch handling

Die Verhaltensantwort der Tiere auf das *handling* reichte von starker Aktivität bis zu Schlafen. Der Adenosin-Gehalt der Proben veränderte sich nicht signifikant durch den Stimulus (ANOVA: $F(2,20)=1,605$; $P=0,228$; $N=3$) (Abb. 4), während es zu einem transienten, signifikanten Ansteigen des Dopamin-Gehaltes im Dialysat (ANOVA: $F(3,27)=4,070$; $P=0,009$; $N=4$) (Abb. 5) kam. Die *post hoc* Analyse der Dopamin-Werte ergab einen signifikanten Unterschied der Probe nach der Behandlung in Bezug auf die Probe vor der Behandlung ($P<0,05$).

Handling	
Adenosin	Dopamin
Tierbezeichnung	Tierbezeichnung
OT9	OT9
-	OT10
-	OT11
-	OT13
OT14	-
OT15	-

Tab. 2: Zuordnung der Tierbezeichnung zu den durchgeführten Analysen (Versuchsteil *handling*)

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu keiner signifikanten Veränderung des extrazellulären Adenosin-Spiegels in der NAcS durch die Gabe von unbekanntem Futter oder Stress durch Handhabung kam. Dieses steht im Einklang mit den Ergebnissen unserer kürzlich veröffentlichten Arbeit, die keine Hinweise für veränderte Adenosin-Spiegel im zentralen NAc durch die Präsentation von appetitiven oder aversiven Stimuli lieferte (Nagel and Hauber, 2002). Die Basalwerte für Dopamin und Adenosin lagen in Bereichen, die im NAc zu erwarten waren (Dunwiddie and Masino, 2001; Latini and Pedata, 2001). Die geteilten Probenvolumina bedeuteten auch geteilte Stoffmengen, die für die HPLC-Analysen jeweils zur Verfügung standen. Auch wenn für die Dopamin- und Adenosin-Analyse hoch empfindliche Anlagen verwendet wurden, musste auf Grund der geringen Stoffmengen in den Dialysaten häufig knapp oberhalb des Detektionslimits gearbeitet werden. So kam es durch die Teilung der Proben zu Ausfällen durch Unterschreitung des Detektionslimits bei den Basalwerten. Da die Adenosin-Analyse durch die Derivatisierung offline gehandhabt werden muss, konnten Messungen nicht wiederholt werden bis gesicherte Basalwerte erreicht wurden. Zusätzlich problematisch war das Absinken der Adenosin-Werte, welches unter Umständen durch die Behandlung hervorgerufen wurde. Für weitere Studien in dieser Art empfiehlt es sich daher, mit 50 % Ausfall bei der Stichprobengröße zu kalkulieren, so dass genügend Daten für eine robuste statistische Analyse zur Verfügung stehen.

Die vorliegenden Ergebnisse sind aufgrund des geringen Stichprobenumfanges als vorläufig zu betrachten. Die auf ihnen fußenden Schlussfolgerungen müssen von daher in Teilen als spekulativ betrachtet werden.

Unsere Daten lassen keine Rückschlüsse auf eine neuronale Aktivierung im NAc durch die Gabe von unbekanntem, wohlschmeckenden Futter (Fonzie) zu, da Ergebnisse früherer Studien, in denen eine Verstärkung der Dopamin-Ausschüttung im NAc nach Präsentation des Futters gezeigt wurde, nicht reproduziert werden konnten (Bassareo and Di Chiara, 1997, 1999). In jenen Arbeiten wurde der Nachweis geführt, dass auch bei nicht futterdeprivierten Tieren die Gabe von Fonzies und anderem unbekanntem Futter zu Dopamin-Ausschüttungen im NAc führt. Allerdings waren diese Ergebnisse nicht konsistent reproduzierbar (Bassareo, persönliche Kommunikation, 2001.) Da in unserer Studie keine signifikante Veränderung des extrazellulären Dopamin-Gehaltes im NAc durch die Präsentation von unbekanntem Futter zu beobachten war, wäre auch bei Zutreffen der Hypothese über die physiologische Bedeutung der Adenosin-Dopamin Interaktion im NAc keine koinzidente Veränderung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes zu erwarten gewesen. Das Teilergebnis der Dopamin-Messung aus diesem Versuchsteils lässt also keine weitere Interpretation der Daten zu, zumal auch keine vom Dopamin-Gehalt unabhängige Veränderung der extrazellulären Adenosin-Konzentration nach der Stimuluspräsentation zu beobachten war.

Es gibt Hinweise, dass der Stress durch *handling* zu einer neuronalen Aktivierung im Striatum führt. Dieser Effekt ist gekennzeichnet durch ansteigende Lactatwerte (De Bruin *et al.*, 1990), eine erhöhte Glukosemobilisierung (Fellows and Boutelle, 1993) und einer Aktivierung des mesolimbischen Dopamin-Systems. Die in anderen Arbeiten nachgewiesene Dopamin-Ausschüttung im NAc auf Grund von *handling* (Feenstra *et al.*, 1998; Feenstra *et al.*, 2000) konnte hier reproduziert werden. Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass durch den gewählten Stimulus eine Aktivierung des dopaminergen Systems stattfand, aber damit keine veränderte Neuromodulation über signifikant veränderte Adenosin-Spiegel einherging. Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass nur für drei Tiere auswertbare Ergebnisse der Adenosin-Analyse beim Telexperiment *handling* zur Verfügung standen (Tab.2). Es zeigt jedoch, dass es parallel zu dem signifikanten Anstieg des Dopamin-Gehaltes eine Probe nach dem *handling* ein transientes, nicht signifikantes Absinken des Adenosin-Gehaltes zu beobachten ist. Hier gilt es mit einem größeren Stichprobenumfang zu überprüfen, ob der beobachtete Trend dann ein signifikantes Ergebnis liefert. In diesem Fall würden sich 4 wichtige, neue Implikationen ergeben. (1) Der extrazelluläre Adenosin-Gehalt reagiert auf physiologische Stimuli. Damit würde zum ersten Mal gezeigt werden, dass

transiente Änderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc bei der Verhaltenssteuerung eine Rolle spielen könnte. (2) In der NAcS würden Stimuli, die eine Ausschüttung von Dopamin bewirken, zu einem Absinken des extrazellulären Adenosin-Gehaltes führen. Aufgrund der bekannten negativen Interaktion zwischen Dopamin und Adenosin-Rezeptoren würde es dadurch zu einer Verstärkung des Dopamin-Signals kommen (Ferre *et al.*, 1991; Ferre *et al.*, 1994; Ferre, 1997). (3) Die Modulation der dopaminergen Neurotransmission durch Adenosin könnte damit Bestandteil eines physiologischen Systems zur Steuerung von Verhalten sein, wie in theoretischen Modellen postuliert wurde (Ferre *et al.*, 1997; Fuxe *et al.*, 1998). (4) Bei unserer Arbeit im zentralen NAc, bei der die Sonde mehr im *core* als in der *shell* platziert war, war bei einem erheblich größerem Stichprobenumfang kein Trend für Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes erkennbar (Nagel and Hauber, 2002). Damit würden die Hinweise auf funktionelle Unterschiede zwischen *core* und *shell* des NAc untermauert (Heimer *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1997; Kelley, 1999; Parkinson *et al.*, 1999).

Letztendlich bleibt, unter Berücksichtigung der Einschränkungen durch die schmale Datenbasis, festzuhalten, dass die Präsentation von biologisch relevanten Stimuli auch unter Aktivierung des mesolimbischen Dopamin-Systems nicht zu einer phasischen, signifikanten Veränderung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes in der NAcS geführt hat. Dieser negative Befund liefert keine Hinweise zur Unterstützung der Hypothese (Fuxe *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2000) über eine Interaktion zwischen phasisch aktivierten Dopamin- und Adenosin-Rezeptoren im NAc bei der Steuerung der Verhaltensantwort auf die präsentierten Stimuli. Eine Modulation der dopaminergen Neurotransmission im NAc durch tonisch aktivierte Adenosin-Rezeptoren stellt eine mögliche, andere Form der Interaktion zwischen den beiden Systemen dar, die jedoch noch einer zukünftigen Untersuchung vorbehalten ist.

Referenzen

- Aoyama S, Kase H, Borrelli E (2000) Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J Neurosci* 20:5848-5852.
- Baldo BA, Koob GF, Markou A (1999) Role of adenosine A2 receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J Neurosci* 19:11017-11026.
- Ballarin M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N (1991) Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 142:97-103.
- Bassareo V, Di Chiara G (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17:851-861.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11:4389-4397.
- Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT (2000) Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res* 872:44-53.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Bernardi G (1997) Endogenous adenosine mediates the presynaptic inhibition induced by aglycemia at corticostriatal synapses. *J Neurosci* 17:4509-4516.
- Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107-125.
- De Bruin LA, Schasfoort EM, Steffens AB, Korf J (1990) Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate. *Am J Physiol* 259:R773-779.
- Dunwiddie (1996) Purinoceptors in the Central Nervous System. *Drug development Research* 39:361-370.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF (1998) Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in the nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex: comparison with inhibition of ionotropic receptors. *J Neurochem* 70:1104-1113.
- Feenstra MG, Botterblom MH, Mastenbroek S (2000) Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience* 100:741-748.

- Fellows LK, Boutelle MG (1993) Rapid changes in extracellular glucose levels and blood flow in the striatum of the freely moving rat. *Brain Res* 604:225-231.
- Ferre S (1997) Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 133:107-120.
- Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7238-7241.
- Ferre S, O'Connor WT, Snopce P, Ungerstedt U, Fuxe K (1994) Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 63:765-773.
- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-487.
- Ferre S, Torvinen M, Antoniou K, Irenius E, Civelli O, Arenas E, Fredholm BB, Fuxe K (1998) Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J Biol Chem* 273:4718-4724.
- Ferre S, Rimondini R, Popoli P, Reggio R, Pezzola A, Hansson AC, Andersson A, Fuxe K (1999) Stimulation of adenosine A1 receptors attenuates dopamine D1 receptor-mediated increase of NGFI-A, c-fos and jun-B mRNA levels in the dopamine-denervated striatum and dopamine D1 receptor-mediated turning behaviour. *Eur J Neurosci* 11:3884-3892.
- Ferré S, Fuxe K, Von Euler G, Johansson B, Fredholm BB (1992) Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* 51:501-512.
- Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluís C, Fuxe K (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23:S50-59.
- Fredholm BB, Dunwiddie TV (1988) How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* 9:130-134.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-156.
- Fuchs H (2002) Immunohistochemische und neurochemische Untersuchungen zur Rolle von Dopamin im Globus pallidus der Ratte. Stuttgart.
- Fuxe K, Ferre S, Zoli M, Agnati LF (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev* 26:258-273.

- Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferre S, Fuxe K, Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8606-8611.
- Hauber W (2002) Adenosin: ein Purinnukleosid mit neuromodulatorischer Wirkung. *Neuroforum* 3:228-234.
- Hauber W, Koch M (1997) Adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens modulate prepulse inhibition of the startle response. *Neuroreport* 8:1515-1518.
- Hauber W, Munkle M (1997) Motor depressant effects mediated by dopamine D2 and adenosine A2A receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen. *Eur J Pharmacol* 323:127-131.
- Hauber W, Nagel J, Sauer R, Müller CE (1998) Motor effects induced by a blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport* 9:1803-1806.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41: 89-125
- Horvitz JC (2000) Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96:651-656.
- Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Rev* 31:6-41
- Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* 9:223-227.
- Kelley AE (1999) Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology* 27:198-213.
- Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22:3306-3311.
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463-484.
- Mayfield RD, Jones BA, Miller HA, Simosky JK, Larson GA, Zahniser NR (1999) Modulation of endogenous GABA release by an antagonistic adenosine A1/dopamine D1 receptor interaction in rat brain limbic regions but not basal ganglia. *Synapse* 33:274-281.
- Melani A, Pantoni L, Corsi C, Bianchi L, Monopoli A, Bertorelli R, Pepeu G, Pedata F (1999) Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke* 30:2448-2454; discussion 2455.

- Morelli M, Acquas E, Ongini E (2002) Dopamine - Adenosine Interactions. In: Handbook of experimental pharmacology - Dopamine in the CNS II (Di Chiara G, ed), pp 135-150. Berlin: Springer.
- Nagel J, Hauber W (2002) Effects of salient environmental stimuli on extracellular adenosine levels in the rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis. *Behav Brain Res* 134:485-492.
- Nagel J, Schladebach H, Schwienbacher I, Koch M, Müller CE, Hauber W (in submission) Effects of Adenosine A2A Receptor Blockade in the Nucleus Accumbens on Locomotion, Feeding, and Prepulse Inhibition in Rats. *Synapse*.
- Ochiishi T, Chen L, Yukawa A, Saitoh Y, Sekino Y, Arai T, Nakata H, Miyamoto H (1999) Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. *J Comp Neurol* 411:301-316.
- Ongini E, Fredholm BB (1996) Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci* 17:364-372.
- Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ (1999) Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J Neurosci* 19:2401-2411.
- Rebec GV, Grabner CP, Johnson M, Pierce RC, Bardo MT (1997) Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience* 76:707-714.
- Ribeiro JA (1999) Adenosine A2A receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur J Pharmacol* 375:101-113.
- Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J (1998) Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 401:163-186.
- Saigusa T, Tuinstra T, Koshikawa N, Cools AR (1999) High and low responders to novelty: effects of a catecholamine synthesis inhibitor on novelty-induced changes in behaviour and release of accumbal dopamine. *Neuroscience* 88:1153-1163.
- Schiffmann SN, Jacobs O, Vanderhaeghen JJ (1991) The striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in-situ hybridization histochemistry study. *J Neurochemistry*:1062-1067.
- Schwienbacher I, Fendt M, Hauber W, Koch M (2002) Dopamine D(1) receptors and adenosine A(1) receptors in the rat nucleus accumbens regulate motor activity but not prepulse inhibition. *Eur J Pharmacol* 444:161-169.
- Secrist JA, 3rd, Barrio JR, Leonard NJ, Weber G (1972) Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes. Biological activities and spectroscopic properties. *Biochemistry* 11:3499-3506.

- Stratford TR, Kelley AE (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 17:4434-4440.
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 59:355-396.
- Swanson CJ, Heath S, Stratford TR, Kelley AE (1997) Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 58:933-945.
- van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33:999-1005.
- Wojcik WJ, Neff NH (1982) Adenosine measurement by a rapid HPLC-fluorometric method: induced changes of adenosine content in regions of rat brain. *J Neurochem* 39:280-282.

6.6 Die lokale Applikation von Amphetamin und Kokain hat keinen signifikanten Einfluss auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt im Nucleus accumbens der Ratte

Einleitung

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Amphetamin und Kokain eine massive Ausschüttung von Dopamin im NAc und anderen Strukturen der mesolimbischen Funktionsschleife hervorruft (Nomikos *et al.*, 1990; Pontieri *et al.*, 1995; Pierce and Kalivas, 1997b; Darracq *et al.*, 1998; Carboni *et al.*, 2000; Westerink and De Vries, 2001). Diese pharmakologisch induzierte Intensivierung der dopaminergen Neurotransmission führt im Tierexperiment zu massiven Verhaltenswirkungen. Darüber hinaus gilt die Verstärkung der dopaminergen Neurotransmission als wesentliches Kennzeichen für Sucht auslösende Drogen (Di Chiara, 1990; Pierce and Kalivas, 1997a; Robbins and Everitt, 1999a; Robinson and Berridge, 2000; Everitt and Wolf, 2002; Kelley and Berridge, 2002).

Wie bereits in der allgemeinen Einleitung ausführlich beschrieben, wird der mesolimbischen Funktionsschleife eine wesentliche Rolle bei der positiven Verstärkung von natürlichem, belohnungsgerichtetem Verhalten zugeschrieben. Über dieses System wird das Streben nach Zugang zu natürlicher Belohnung, wie z.B. Futter oder Sexualpartner und die Vermeidung von aversiven Bedingungen ausgelöst. Diese Funktion ist für das Überleben des Individuums und der Art essentiell (Robbins and Everitt, 1996; Kelley and Berridge, 2002).

Die Adenosin A_{2A} Rezeptoren im NAc (Schiffmann *et al.*, 1991; Ongini *et al.*, 1996; Rosin *et al.*, 1998) sind an der Modulation der neuronalen Aktivität der Neurone der mesolimbischen Funktionsschleife beteiligt (Mori and Shindou, 2000). Ferner hat die Aktivierung von Adenosin A_{2A} Rezeptoren Einfluss auf das belohnende Gefühl durch Selbstinfusion von Kokain oder durch chronische Selbstapplikation von elektrischen Reizen. In beiden Modellen kommt es zu einer positiven Verstärkung der Selbststimulation, die offensichtlich als belohnend empfunden wird (Baldo *et al.*, 1999; Knapp *et al.*, 2001). Beide Arbeitsgruppen stellten fest, dass eine elektrische oder pharmakologische Selbststimulation durch die Aktivierung von A_{2A} Rezeptoren reduziert wurde, also eine Modulation der positiven Verstärkung durch diesen Rezeptorsubtyp erfolgen könnte.

Weitergehende Erkenntnisse über die Bedeutung der adenosinergen Neuromodulation im NAc bei pharmakologisch induzierter positiver Verstärkung liegen bislang nicht vor.

Lediglich nach Abbruch einer chronischen Kokain-Behandlung konnte im Tierexperiment eine anhaltende Erhöhung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im VTA nachgewiesen werden (Dunwiddie and Masino, 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu überprüfen, ob pharmakologische Stimuli, die bekanntlich zu einer massiven Ausschüttung von Dopamin im NAc führen, auch Veränderungen der extrazellulären Konzentration von Adenosin im NAc hervorrufen.

Material und Methoden

Die vorliegende pharmakologische Studie folgte dem oben beschriebenen Experiment „Effekte durch herausragende Umgebungsreize auf den extrazellulären Gehalt von Adenosin und Dopamin im Nucleus accumbens der Ratte“. Dieselben Tiere und der Versuchsaufbau wurden unverändert übernommen. Zwischen der Aufnahme der Basiswerte für das pharmakologische Experiment und dem physiologischen Stimulus wurden zwei Stunden abgewartet, so dass der pharmakologische Stimulus drei Stunden nach dem physiologischen gesetzt wurde. Abweichungen zu den oben beschriebenen Angaben in „Material und Methoden“ ergaben sich wie folgt:

Substanzen: Stammlösungen der verwendeten Substanzen D-Amphetamin Sulfat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und Kokain Hydrochlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in einer Konzentration von 10 mM in aCSF gelöst und bei -70°C , in Aliquots aufgeteilt und eingefroren.

Mikrodialyse-Experiment: D-Amphetamin und Kokain wurden nach einem Vorlauf von 3 Proben zur Ermittlung der Basalwerte mittels reverser Mikrodialyse in den NAc verabreicht. Es wurde ein kumulatives Dosierungsschema verwendet, d. h. steigende Konzentrationen (0,1; 1; 10; 100 μM) der jeweiligen Substanz wurden für jeweils 60 min der Perfusionsflüssigkeit zugesetzt. Anschließend wurde für 60 min aCSF ohne Zusatz perfundiert. Jedes Tier erhielt entweder Amphetamin oder Kokain. Die Proben wurden geteilt, um neben dem Adenosin- auch den Dopamin-Gehalt bestimmen zu können.

Statistik: Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft. Da sich die Verteilung als nicht normal erwiesen hat, wurde die Analyse mit einem nicht-parametrischen Verfahren fortgesetzt. Mit der Varianzanalyse nach Friedman für Wiederholungsmessungen wurden die Daten auf signifikante Unterschiede untersucht.

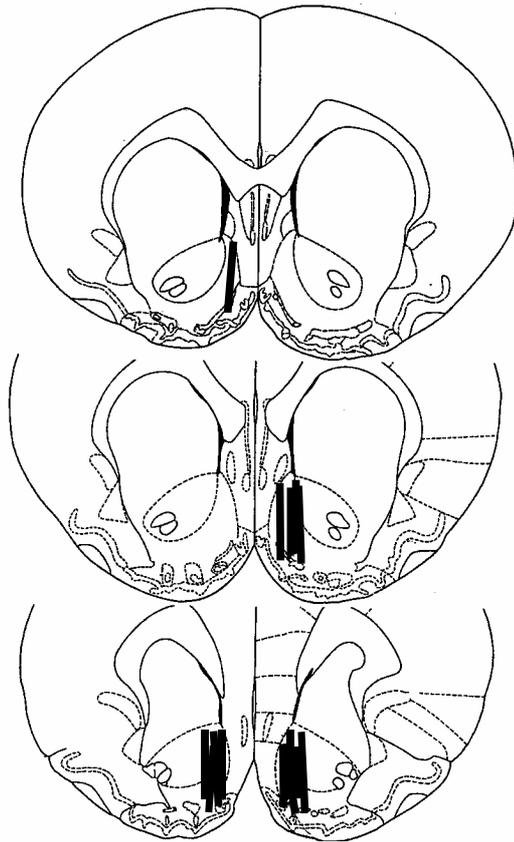


Abb. 1: Lokalisation der Mikro dialysesonden der Tiere, deren Ergebnisse in die Auswertung einbezogen worden sind

Ergebnisse

Die Auswertung der Histologie ergab bei einem Tier eine stark lateral abweichende Sondenplatzierung, weshalb dessen Ergebnisse von einer weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Die übrigen Sondenlokalisationen sind in Abb. 1 dargestellt.

Basale Adenosin-Konzentration

Bei vier Tieren lagen die basalen Adenosin-Werte unter dem Detektionslimit, so dass deren Daten von einer weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Bei einem weiteren Tier unterschritten während der Kokainbehandlung die Adenosin-Signale zeitweise das Detektionslimit der HPLC-Analytik. Die Ergebnisse dieses Tieres wurden ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die durchschnittliche, extrazelluläre Adenosin-Konzentration der letzten Probe vor dem pharmakologischen Stimulus betrug $1,60 \text{ pg}/\mu\text{l} + 0,533$ und unterschied sich damit nicht signifikant von der durchschnittlichen Adenosin-Konzentration vor der physiologischen Stimulierung im vorhergehenden Experiment.

Effekte durch lokal appliziertes d-Amphetamin auf extrazelluläres Adenosin im NAc

Die Perfusion von kumulativ ansteigenden Konzentrationen D-Amphetamins bewirkten keine signifikanten Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im NAc ($\chi^2 = 14.375$; d.f. = 17; $P = 0.640$; $N=5$).

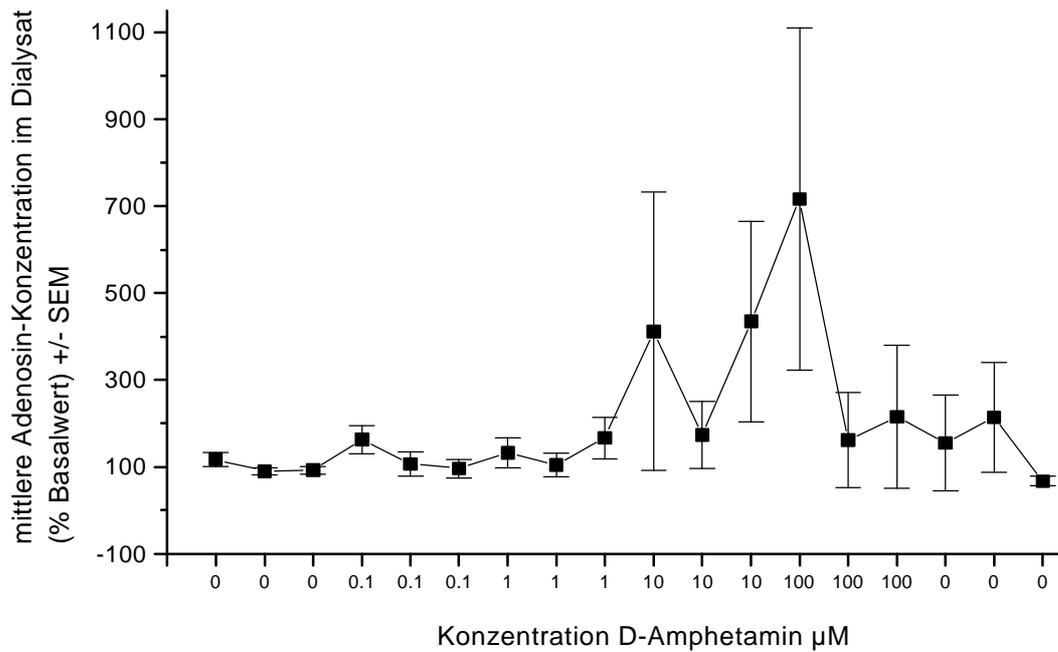


Abb. 2: Effekt der Perfusion von D-Amphetamin auf den Gehalt von extrazellulärem Adenosin im NAc

Amphetamin (μM)	OT2	OT3	OT4	OT11	OT18
0	102,19	81,49	109,01	176,23	118,5
0	96,54	104,76	87,73	61,2	100,44
0	101,26	113,75	103,26	62,57	81,05
0,1	95,28	143,18	102,52	207,69	265,19
0,1	93,98	89,02	110,42	34,35	207,69
0,1	69,89	87,79	99,08	50,12	174,58
1	131,01	82,1	91,76	90,65	267,93
1	88,85	68,24	80,73	73,71	212,59
1	59,09	79,75	149,9	319,4	225,91
10	125,11	114,87	98,86	33,77	1688,46
10	113,84	88,57	81,69	99,51	483,27
10	842,02	64,43	34,23	100,68	1133,17
100	71,20	54,59	97,39	1722,01	1639,51
100	57,54	34,52	120,7	2,89	592,83
100	48,80	44,19	105,24	7,44	870,21
0	60,64	41,29	64,29	12,59	594,98
0	174,22	132,7	42,6	14,11	705,01
0	63,52	94,95	68,44	41,9	606

Tab. 1: Individueller Adenosin-Gehalt der Proben (% Basalwerte) nach Behandlung mit D-Amphetamin von allen eingesetzten Tieren (Tierbezeichnung OT2, OT4, OT4, OT11, OT18)

Effekte durch lokal appliziertes Kokain auf extrazelluläres Adenosin im NAc

Die Perfusion von kumulativ ansteigenden Konzentrationen Kokains bewirkten keine signifikanten Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im NAc ($\chi^2 = 16,637$; d.f. = 17; $P = 0,479$; $N=3$).

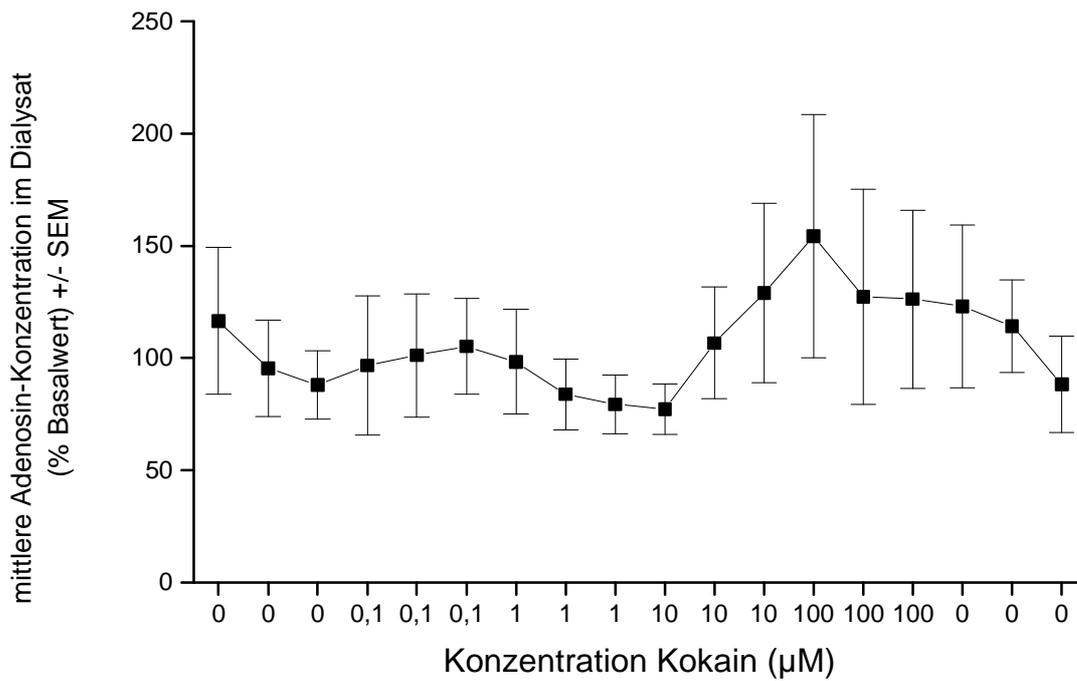


Abb. 3: Effekt der Perfusion von Kokain auf den Gehalt von extrazellulärem Adenosin im NAc

Kokain (μM)	OT6	OT7	OT9
0	93,86	74,53	181,2
0	124,3	108,39	53,63
0	81,84	117,08	65,16
0,1	145,62	105,13	39,4
0,1	105,61	146,29	51,7
0,1	95,33	146,04	74,32
1	91,99	141,44	61,46
1	112,93	80,07	58,68
1	81,13	101,23	55,91
10	95,33	79,55	56,7
10	120,1	141,47	58,35
10	189,9	143,56	53,72
100	108,69	262,13	92,14
100	99,9	220,7	61,33
100	145,45	183,33	49,85
0	128,04	183,24	58,04
0	116,5	148,74	77,48
0	104,96	114,23	45,72

Tab. 2: Individueller Adenosin-Gehalt der Proben (% Basalwerte) nach Behandlung mit D-Amphetamin von allen eingesetzten Tieren (Tierbezeichnung OT6, OT7, OT9)

Diskussion

Aus den Ergebnissen des vorliegenden Experimentes geht hervor, dass die Verabreichung von Amphetamin und Kokain in Konzentrationen, die zu einer starken Erhöhung der Dopamin-Ausschüttung im NAc führen, keine gleichzeitige, signifikante Veränderung der extrazellulären Adenosin-Spiegel im NAc bewirken. Wegen des geringen Stichprobenumfangs müssen die vorliegenden Ergebnisse als vorläufig angesehen werden.

Bei einer genaueren Durchsicht fallen bei Betrachtung der Einzelergebnisse Schwankungen des Adenosin-Gehaltes durch die Perfusion mit D-Amphetamin auf (Tab. 1), die höher als die Variabilität der *Baseline* sind. Eine Tendenz zu steigenden Adenosin-Werten parallel zur ansteigenden Dosis des perfundierten D-Amphetamins ist erkennbar. Jedoch treten diese Veränderungen nicht bei allen Tieren und nicht in gleicher Ausprägung auf. Damit ist diese Beobachtung für die Gesamtgruppe, mit denen für die vorliegende Studie allgemein anerkannten statistischen Analysen, nicht erfassbar. Im Falle der Perfusion mit Kokain weisen bereits die Basiswerte eine hohe Variabilität auf, so dass die Aussagekraft dieses Ergebnisses noch als zusätzlich eingeschränkt gelten muss. Allenfalls ist ein geringer Trend erkennbar (Tab.2)(Abb. 3).

Zwei neuere Studien konnten zeigen, dass durch die Stimulierung von Adenosin A_2 Rezeptoren offenbar eine Verminderung des belohnenden Gefühls durch Kokain herbeigeführt werden konnte (Baldo *et al.*, 1999; Knapp *et al.*, 2001). Damit liegen Hinweise vor, dass über die pharmakologische Manipulation an Adenosin-Rezeptoren die Verhaltenswirkung von Suchtmitteln beeinflusst werden kann. Nach diesen Befunden wäre davon auszugehen, dass erhöhte extrazelluläre Adenosin-Spiegel zu einer Abnahme der positiven Verstärkung durch Suchtdrogen führen könnten.

Unsere Daten liefern jedoch keinen Anhaltspunkt, dass veränderte extrazelluläre Adenosin-Konzentrationen an der akuten Wirkung von Kokain oder Amphetamin im NAc beteiligt sind. Durch eine parallel durchgeführte Analyse des Dopamin-Gehaltes der hier untersuchten Proben (Fuchs, 2002; Fuchs *et al.*, in submission) konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Perfusion von D-Amphetamin und Kokain zu einer dosisabhängigen signifikanten Erhöhung der Dopamin-Ausschüttung geführt hat.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Einschränkungen würde das vorliegende Ergebnis zumindest Hinweise liefern, dass eine pharmakologisch induzierte Ausschüttung von Dopamin im NAc keinen akuten Einfluss auf die extrazelluläre Konzentration von Adenosin im NAc hat.

Referenzen

- Baldo, B. A., Koob, G. F. and Markou, A., 1999. Role of adenosine A2 receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J Neurosci.* 19, 11017-11026.
- Carboni, E., Silvagni, A., Rolando, M. T. and Di Chiara, G., 2000. Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. *J Neurosci.* 20, RC102.
- Darracq, L., Blanc, G., Glowinski, J. and Tassin, J. P., 1998. Importance of the noradrenaline-dopamine coupling in the locomotor activating effects of D-amphetamine. *J Neurosci.* 18, 2729-2739.
- Di Chiara, G., 1990. In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharm Sci.* 11, 116.
- Dunwiddie, T. V. and Masino, S. A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24, 31-55.
- Everitt, B. J. and Wolf, M. E., 2002. Psychomotor stimulant addiction: A neural systems perspective. *J Neurosci.* 22, 3312-3320.
- Fuchs, H., 2002. Immunohistochemische und neurochemische Untersuchungen zur Rolle von Dopamin im Globus pallidus der Ratte. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Fuchs, H., Nagel, J. and Hauber, W., in submission. Effect of Physiological and Pharmacological Stimuli on Dopamine Release in the Rat Globus Pallidus.
- Kelley, A. E. and Berridge, K. C., 2002. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci.* 22, 3306-3311.
- Knapp, C. M., Foye, M. M., Cottam, N., Ciraulo, D. A. and Kornetsky, C., 2001. Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 68, 797-803.
- Mori, A. and Shindou, T., 2000. Physiology of Adenosine Receptors in the Striatum. In: Kase, H. *et al.* (Eds.), *Adenosine Receptors and Parkinson's Disease*. Academic Press, San Diego, pp. 107-127.
- Nomikos, G. G., Damsma, G., Wenkstern, D. and Fibiger, H. C., 1990. In vivo characterization of locally applied dopamine uptake inhibitors by striatal microdialysis. *Synapse.* 6, 106-112.
- Ongini, E., Dionisotti, S., Morelli, M., Ferré, S., Svenningsson, P., Fuxe, K. and Fredholm, B., 1996. Neuropharmacology of the adenosine A2A receptors. *Drug Development Research.* 39, 450-460.
- Pierce, R. C. and Kalivas, P. W., 1997a. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev.* 25, 192-216.
- Pierce, R. C. and Kalivas, P. W., 1997b. Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J Neurosci.* 17, 3254-3261.

- Pontieri, F. E., Tanda, G. and Di Chiara, G., 1995. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 12304-12308.
- Robbins, T. W. and Everitt, B. J., 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol.* 6, 228-236.
- Robbins, T. W. and Everitt, B. J., 1999. Drug addiction: bad habits add up [news]. *Nature.* 398, 567-570.
- Robinson, T. E. and Berridge, K. C., 2000. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction.* 95 Suppl 2, S91-117.
- Rosin, D. L., Robeva, A., Woodard, R. L., Guyenet, P. G. and Linden, J., 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 401, 163-186.
- Schiffmann, S. N., Jacobs, O. and Vanderhaeghen, J. J., 1991. The striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in-situ hybridization histochemistry study. *J Neurochemistry,* 1062-1067.
- Westerink, B. H. and De Vries, J. B., 2001. A method to evaluate the diffusion rate of drugs from a microdialysis probe through brain tissue. *J Neurosci Methods.* 109, 53-58.

7 Zusammenfassende Diskussion

Der NAc ist Teil eines neuronalen Netzwerkes, welches eine rasche Auswahl, Anpassung und Umsetzung von Verhaltensweisen in Reaktion auf biologisch relevante Hinweisstimuli in der Umwelt gewährleistet. In der vorliegenden Arbeit wurden fünf verschiedene Studien durchgeführt, um die Rolle des Neuromodulators Adenosin im NAc der Ratte direkt zu erfassen.

Zu einer vertieften Analyse der Bedeutung von Adenosin im NAc bei der Verhaltenssteuerung wurden zwei unterschiedliche methodische Vorgehensweisen gewählt.

1. Es wurde untersucht, wie sich die Blockade von Adenosin A_{2A} Rezeptoren des NAc auf Verhaltensweisen auswirkt, die bekanntermaßen durch den NAc gesteuert werden. Für eine wichtige Rolle von A_{2A} Rezeptoren im NAc sprechen Ergebnisse neuroanatomischer Arbeiten, wonach die A_{2A} Rezeptor Konzentration im NAc zu den höchsten in allen untersuchten Hirnarealen zählt (Übersicht in Svenningsson *et al.*, 1999b). Bislang gibt keine Daten darüber, wie sich eine Blockade der A_{2A} Rezeptoren auf die Steuerung von Verhalten auswirkt. So wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Applikation von einem selektiven Rezeptorantagonisten untersucht, inwieweit sich die Blockade der Adenosin A_{2A} Rezeptoren im NAc auf die Ausprägung verschiedener Verhaltensweisen auswirkt.
2. Allgemein stellte sich die Frage, ob die Darbietung von biologisch signifikanten Stimuli und das durch sie in Gang gesetzte Verhalten von Änderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc begleitet werden. Daher wurde die Auswirkung von physiologischen und pharmakologischen Stimuli auf extrazelluläre Adenosin-Spiegel im NAc am wachen Tier mithilfe der Mikrodialysetechnik analysiert. Neuere pharmakologische Untersuchungen legen eine mögliche Kontrolle der extrazellulären Adenosin-Konzentration durch Dopamin-Rezeptoren nahe (Fenu and Morelli, 1998; Pinna *et al.*, 2002). Dieser Aspekt stand im Mittelpunkt der pharmakologischen Untersuchungen bei denen Dopamin-Rezeptor-Antagonisten durch reverse Mikrodialyse in den NAc perfundiert wurden.

In den folgenden Teilen dieses Kapitels werden die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten einzeln diskutiert. Abschließend werden Schlussfolgerungen der Studien dieser Arbeit für die Rolle des Adenosins im NAc vorgestellt und mögliche Implikationen diskutiert.

7.1 Beteiligung der Adenosin A_{2A} Rezeptoren im NAc an der Kontrolle von Fressverhalten, Spontanaktivität und sensomotorischen Filtermechanismen

Es wurde der Frage nachgegangen, ob A_{2A} Rezeptoren im NAc an der Steuerung von Verhaltenweisen beteiligt sind, von denen durch pharmakologische Studien und Läsionsstudien bekannt ist, dass sie maßgeblich durch den NAc gesteuert werden. Dazu wurden über bilaterale, intraakkumbale Mikroinfusionen von MSX-3 die A_{2A} Rezeptoren im NAc blockiert. Aus der Untersuchung ging hervor, dass die Blockade von A_{2A} Rezeptoren die Spontanaktivität erhöhte. Ferner war die Menge des aufgenommenen Futters verringert und der Beginn der Futteraufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert. Außerdem wurde ein starker Einfluss auf sensomotorische Filtermechanismen festgestellt, da Hinweisreize (Präpulse), die die akustische Schreckreaktion normalerweise hemmen, in ihrer Wirkung stark verändert waren. Die große Bedeutung des NAc bei der Steuerung von Fressverhalten, Spontanaktivität und sensomotorischen Filtermechanismen ist durch zahlreiche Studien belegt (Swerdlow *et al.*, 1990a; Bakshi and Kelley, 1991; Swanson *et al.*, 1997; Clifton, 2000). Arbeiten, in denen systemische Applikationen von selektiven Adenosin A_{2A} Rezeptor-Liganden oder intraakkumbale Infusionen von selektiven Adenosins A_{2A} Rezeptor-Agonisten vorgenommen wurden, lieferten Hinweise auf eine mögliche Rolle der A_{2A} Rezeptoren im NAc bei der Steuerung von Lokomotion (Barraco *et al.*, 1994; Hauber and Munkle, 1997; Svenningsson *et al.*, 1997a), Fressverhalten (Coupar and Tran, 2002) und sensomotorischen Filtermechanismen (Hauber and Koch, 1997). Im Unterschied zu diesen Arbeiten wurde in der vorliegenden Studie ein Adenosin A_{2A} Rezeptor Antagonist verwendet, der aufgrund seiner Wasserlöslichkeit direkt in den NAc appliziert werden konnte. Durch den Einsatz eines spezifischen Antagonisten kann der Nachweis geführt werden, ob Rezeptoren endogen stimuliert werden oder nicht. Antagonisten weisen grundsätzlich nur dann eine Wirkung auf, wenn der betreffende Rezeptor durch einen Agonisten oder endogenen Liganden zeitgleich stimuliert wird. Die Daten der vorliegenden Arbeit liefern durch die lokale Infusion eines selektiv wirksamen A_{2A} Rezeptor Antagonisten erstmalig direkte Hinweise, dass endogen aktivierte Adenosin A_{2A} Rezeptoren im NAc an der Kontrolle von Verhalten beteiligt sind. Während die Befunde eher für eine direkte Beteiligung der A_{2A} Rezeptoren bei der Steuerung der Lokomotion und der sensomotorischen Filtermechanismen sprechen, ist eine klare Beurteilung der Effekte im Hinblick auf das Fressverhalten nur schwer möglich. Es hat den Anschein, dass die beobachtete Reduktion der Futteraufnahme nicht primär auf einer Beeinflussung des Fressverhaltens, sondern auf der konkurrierenden Verstärkung der

motorischen Spontanaktivität beruhte. Adenosin A_{2A} Rezeptoren scheinen daher nur einen indirekten Einfluss auf die Steuerung des Fressverhaltens auszuüben. Aufgrund der eingesetzten Technik der Rezeptorblockade lässt sich nicht unterscheiden, ob die Verhaltenswirkungen, die durch den A_{2A} Rezeptor vermittelt waren, auf tonische oder phasische Effekte durch Adenosin beruhten.

7.2 Biologisch bedeutsame Stimuli bewirken keine phasischen Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc

In zwei Studien dieser Arbeit (6.2 und 6.4) wurde untersucht, ob biologisch relevante Stimuli zu einer Veränderung der extrazellulären Adenosin-Spiegel führen. Dazu wurden appetitive und aversive Stimuli gewählt, von denen bekannt ist, dass sie maßgeblich durch den NAc prozessiert oder im NAc repräsentiert sind, da sie erhebliche elektrophysiologische oder neurochemische Effekte in diesem Hirnkern hervorrufen, (z.B. Rebec *et al.*, 1997b; Swanson *et al.*, 1997; Feenstra *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Bassareo and Di Chiara, 1999; Feenstra *et al.*, 2000). Die Wirkung der eingesetzten Stimuli auf die Ausschüttung von Dopamin ist gut dokumentiert. Alle Stimuli induzierten eine signifikante Freisetzung von Dopamin im NAc (Hooks and Kalivas, 1995; Rebec *et al.*, 1997a; Feenstra *et al.*, 1998; Bassareo and Di Chiara, 1999; Saigusa *et al.*, 1999; Feenstra *et al.*, 2000). Darauf aufbauend wurde mit Hilfe von Mikrodialyse in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch die Darbietung der vier folgenden Stimuli auch eine Veränderung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im NAc ausgelöst wird: (1) appetitiver, unbekannter Stimulus (wohlschmeckendes Futter), (2) appetitiver, bekannter Stimulus (Laborfutter), (3) aversiver Stimulus (Handhabung, *handling*), (4) Stimulus mit Neuigkeitswert (Käfigwechsel).

In der ersten Studie zu dieser Fragestellung war die Mikrodialysesonde zentral im NAc platziert. Es wurde festgestellt, dass keiner der dargebotenen Stimuli den Adenosin-Gehalt im Extrazellulärraum im zentralen Bereich des NAc veränderte. Aus diesen Daten ergeben sich keine Hinweise auf phasische Veränderungen der Stimulation der Adenosin-Rezeptoren im NAc bei der Steuerung von Verhalten, welches durch appetitive oder aversive Stimuli ausgelöst wurde. Es stellt sich die Frage, ob die mangelnde Sensitivität der Untersuchungsmethode Ursache für das negative Ergebnis war. Da jedoch mit der Mikrodialysetechnik Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen festgestellt werden konnten

(Pazzagli *et al.*, 1994; Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997; Melani *et al.*, 1999a; Melani *et al.*, 1999b; Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000; Dunwiddie and Masino, 2001; Pinna *et al.*, 2002), ist es unwahrscheinlich, dass die angewendete Methodik beispielsweise wegen ihrer geringen Zeitauflösung ungeeignet war. Nicht auszuschließen ist, dass ein möglicher Effekt wegen der gewählten Sondenplatzierung und der nachgewiesenen Heterogenität des NAc nicht gemessen werden konnte.

In einer zweiten Studie zu dieser Fragestellung wurde nochmals der Effekt von einem appetitiven, unbekanntem Stimulus (wohlschmeckendes Futter) und von einem aversiven Stimulus (Handhabung, *handling*) auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt, allerdings diesmal in der Teilstruktur NAcS, untersucht. Die NAcS ist jener Teil des NAc dem man eine große Bedeutung bei der Initiation von zielgerichtetem Verhalten zurechnet, z. B. (Rebec *et al.*, 1997a; Kelley, 1999). Parallel zur Adenosin-Analyse wurde zusätzlich der Dopamin-Gehalt der Proben gemessen, um sicher nachweisen zu können, dass die dargebotenen Stimuli neurochemische Veränderungen im NAc ausgelöst haben. Die Daten aus dieser Studie müssen als vorläufig betrachtet werden, da aufgrund methodischer Probleme die Ergebnisse nur einer sehr geringen Stichprobe für die Analyse zur Verfügung stand. Der aversive Stimulus *handling* induzierte eine transiente und signifikante Dopamin-Ausschüttung in der NAcS, während kein signifikanter Effekt auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt nachweisbar war. Parallel zum Anstieg des Dopamin-Gehaltes ließ sich allerdings nach dem Ende des aversiven Stimulus *handling* tendenziell ein Absinken der extrazellulären Adenosin-Konzentration erkennen. Ein derartiger Trend ließ sich in der vorherigen Studie nicht ablesen. Zu dessen sicherer Abklärung müsste man eine weitere Studie mit größerem Stichprobenumfang durchführen. So könnte überprüft werden, ob eventuell eine mit biologisch relevanten Stimuli gekoppelte Veränderung der extrazellulären Adenosin-Konzentration auftritt, die auf die NAcS beschränkt ist und in der ersten Studie durch die Platzierung der Sonde im zentralen NAc nicht erkennbar war.

Der appetitive Stimulus zeigte keinen signifikanten Effekt auf den Adenosin-Gehalt in der NAcS. Abweichend zu den Arbeiten von Bassareo *et al.* (1997, 1999) verursachte die Darbietung von unbekanntem, wohlschmeckenden Futter auch keine signifikante Veränderung des Dopamin-Gehaltes in den Proben. Es ist wegen der unveränderten Dopamin-Ausschüttung unklar, ob die Art der Präsentation des Stimulus Ursache für den ausbleibenden Effekt war, und ob es unter diesen Bedingungen überhaupt zu signifikanten Aktivitätsänderungen im NAc gekommen ist. Eine weitere Interpretation dieser Daten ist aus diesem Grund nicht möglich.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit nahe, dass die Darbietung biologisch relevanter Stimuli, die nachweislich zu neuronalen und neurochemischen Veränderungen im NAc führen, keine Änderung der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc hervorrufen.

Dieser Befund liefert Implikationen über die Bedeutung der Dopamin-Adenosin-Interaktion bei der Steuerung von Verhalten zumindest unter physiologischen Bedingungen. In zahlreichen Studien wurde festgestellt, dass es sich bei Adenosin um einen funktionalen Gegenspieler von Dopamin handelt, u. a. (Ferre *et al.*, 2001). Adenosin moduliert die dopaminerge Neurotransmission über Interaktionen zwischen Adenosin A₁ und Dopamin D₁ Rezeptoren, bzw. zwischen Adenosin A_{2A} und Dopamin D₂ Rezeptoren. Im NAc ist die Steuerung von Verhalten über diese antagonistischen Interaktionen zwischen Adenosin und Dopamin beeinflussbar (Ferre, 1997). Die Modulation der dopaminergen Neurotransmission durch die gleichzeitige Stimulierung von Adenosin-Rezeptoren wurde als wichtiger Mechanismus der Informationsverarbeitung im NAc vorgeschlagen (Ferre *et al.*, 1997; Fuxe *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2000). Eine derartige neuromodulatorische Rolle des Adenosins lässt eine koinzidente Veränderung der Stimulation der Adenosin- und der Dopamin-Rezeptoren bei der Steuerung von Verhalten erwarten. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Stimuli, die die Dopamin-Freisetzung im NAc erhöhen (Hooks and Kalivas, 1995; Bassareo and Di Chiara, 1997; Rebec *et al.*, 1997a; Feenstra *et al.*, 1998; Bassareo and Di Chiara, 1999; Saigusa *et al.*, 1999; Feenstra *et al.*, 2000), dort gleichzeitig eine Veränderung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes hervorrufen. Durch keinen der Stimuli wurde eine nachweisbare, transiente Veränderung der extrazellulären Adenosin-Konzentrationen hervorgerufen. Eine koinzidente, phasische Veränderung der extrazellulären Konzentrationen von Adenosin und Dopamin wurde also nicht gezeigt. Dieses Ergebnis liefert daher auch keine Unterstützung für theoretische Modelle, die eine physiologische Bedeutung der Adenosin-Dopamin Interaktion bei der Steuerung von Verhalten postulieren (Ferre *et al.*, 1997; Fuxe *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2000). Möglicherweise erfolgt die Modulation der dopaminergen Neurotransmission statt über phasische über tonische Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes, die durch einzelne Umweltstimuli nicht unmittelbar beeinflusst werden.

7.3 Blockade der Dopamin D₂ Rezeptoren im NAc führt zu einem signifikanten Ansteigen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes

Mechanismen, die unabhängig von Schlafdeprivation und zell-metabolischen Prozessen zu einem phasischen Anstieg des extrazellulären Adenosin-Gehaltes führen, sind bislang unbekannt. Eine neue Studie hat unter Anwendung der Mikrodialyse-Technik Hinweise geliefert, dass die Läsion des dopaminergen Systems zu einer anhaltenden Veränderung der Adenosin-Konzentration im Extrazellulärraum des Striatums führt (Pinna *et al.*, 2002). Außerdem wurde in einer weiteren Läsionsstudie gezeigt, dass sich die Wirkung des Adenosin-Rezeptor-Antagonisten Koffein auf motorisches Verhalten änderte, wenn 3 Tage zuvor Apomorphin (D₁/D₂-Rezeptor-Agonist) verabreicht wurde (Fenu and Morelli, 1998). Dieser Befund wäre u. a. durch eine nachhaltige Veränderung des Adenosin-Spiegels erklärbar. Dieser könnte durch die Läsion der dopaminergen Neurone selbst und durch die pharmakologische Stimulierung der Dopamin-Rezeptoren nach der Läsion induziert worden sein. Daraus ergab sich für zwei Studien der vorliegenden Arbeit die Frage, ob die extrazelluläre Adenosin-Konzentration im NAc durch Dopamin-Rezeptoren reguliert wird. Im Ergebnis der Mikrodialyse-Studien zeigte sich, dass die Perfusion höherer Dosen des Dopamin D₂ Rezeptor Antagonisten Racloprid und der höchsten Dosierung des Dopamin D₁ Rezeptor Antagonisten SCH23390 in den NAc zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Adenosin-Konzentrationen führte. Die Perfusion von kumulativ ansteigenden Dosierungen von Kokain und Amphetamin (indirekte Dopamin-Rezeptor-Agonisten) bewirkte den erwarteten Anstieg der Dopamin-Konzentration im NAc, hatte aber keine signifikante Veränderung der Adenosin-Konzentration in diesem Areal zu Folge. Das Ausbleiben eines Effektes durch die Perfusion von Amphetamin, Kokain und niedrigerer Dosierungen Dopamin-Rezeptor-Antagonisten auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt im NAc spricht gegen die Hypothese, dass die extrazelluläre Adenosin-Konzentration unter Kontrolle der Dopamin-Rezeptoren steht.

Die Perfusion von sehr hohen Dosierungen der Dopamin-Rezeptor-Antagonisten führte im NAc zu einer massiven Erhöhung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes in mikromolare Konzentrationen. Da derartige Konzentrationen unter pathologischen Bedingungen zu beobachten sind (Rudolphi and Schubert, 1997; Melani *et al.*, 1999b; von Lubitz, 1999), liegen diesem Effekt wahrscheinlich unphysiologische Mechanismen zugrunde. Ein transienter Effekt durch mehrere Konzentrationen ließ sich lediglich durch die Perfusion mit dem Dopamin D₂ Rezeptor Antagonisten Racloprid nachweisen. Auch die Perfusion der niedrigen Konzentrationen dieser Substanz führte zu einem, wenn auch nicht signifikanten,

Ansteigen der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc. Racloprid blockiert selektiv Dopamin-D₂-Rezeptoren (Hall *et al.*, 1988; Seeman and Ulpian, 1988) und bewirkt über den Wegfall der inhibitorischen Wirkung des Dopamin-D₂-Rezeptors eine Verstärkung der neuronalen Aktivität im betroffenen Areal, (z.B. West and Grace, 2002). Insoweit fügt sich dieser Befund in die Beobachtung, dass eine pharmakologisch induzierte Verstärkung der neuronalen Aktivität den extrazellulären Adenosin-Gehalt erhöht (Cunha, 2001; Dunwiddie and Masino, 2001; Latini and Pedata, 2001). Zahlreiche pathogene (z.B. Ischämie, Hypoxie, Hypoglykämie) und pharmakologische (z.B. Kalium-Depolarisation, Dauerdepolarisation über Inhibition der Kalium-Natrium-Pumpe, Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren) Faktoren, bewirken in Neuronen eine starke Erhöhung des Zellmetabolismus. Durch diese Faktoren wird ein starker Anstieg der Adenosin-Konzentration im Extrazellularraum hervorgerufen (Übersicht siehe Kapitel 4.2.7.). Dieser erhöhte extrazelluläre Adenosin-Gehalt bewirkt über inhibitorische A₁ Rezeptoren eine Reduktion der neuronalen Erregbarkeit, die zur Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung des homöostatischen Gleichgewichtes im metabolisch beanspruchten Gewebe beiträgt. Über diesen Effekt wird im Wesentlichen die Bedeutung des extrazellulären Adenosins als Neuroprotektivum erklärt. (Deckert and Gleiter, 1994; Benington and Heller, 1995; von Lubitz, 1999; de Mendonca *et al.*, 2000; Cunha, 2001; Dunwiddie and Masino, 2001).

Durch den in dieser Arbeit gezeigten Effekt erhält die Hypothese über die Bedeutung des Adenosins als Faktor zur Aufrechterhaltung des metabolischen Gleichgewichtes und damit als Neuroprotektivums weitere Unterstützung. Danach schütten Neurone, die einer hohen metabolischen Anforderung ausgesetzt sind, vermehrt Adenosin aus und senken über die inhibitorisch wirksamen Adenosin A₁ Rezeptoren, die Exzitabilität des Gewebes. Dieser Effekt ist sowohl autokrin (durch die ausschüttenden Zellen selbst) als auch parakrin (durch benachbarte Zellen) vermittelt und reduziert den Energiebedarf der Zellen in dem gesamten betroffenen Areal (Benington and Heller, 1995; Cunha, 2001).

7.4 Schlussfolgerungen für die Bedeutung von Adenosin im NAc

In dieser Arbeit wurden mit der intraakkumbalen Mikroinfusion von Wirkstoffen und der Mikrodialyse-Technik Methoden eingesetzt, die direkte Erkenntnisse über die Bedeutung von Adenosin im NAc bei der Steuerung von Verhalten der wachen Ratte lieferten. Im Gegensatz dazu ist der Großteil der bisherigen Studien am intakten Tier zur Rolle von Adenosin im ZNS mit systemischen Applikationen von Adenosin-Rezeptor-Liganden durchgeführt worden. So

sind beispielsweise nach der systemischen Applikation von Adenosin-Rezeptor-Liganden Veränderungen im Lernverhalten (Kopf *et al.*, 1999), der Lokomotion (Jacobson *et al.*, 1993; Svenningsson *et al.*, 1995; Fredholm *et al.*, 1997; Svenningsson *et al.*, 1997a; Marston *et al.*, 1998) und der Futteraufnahme (Coupar and Tran, 2002) festgestellt worden. Unklar bleibt bei diesen Studien, durch welches Hirnareal die beobachteten Effekte vermittelt wurden. Außerdem befinden sich Adenosin-Rezeptoren nicht ausschließlich im ZNS sondern auch in verschiedenen Organen des Körpers wie z. B. der Niere. Daher müssen bei der Diskussion von Effekten, die nach der systemischen Applikation von Adenosin-Rezeptor-Liganden wie beispielsweise Koffein auftreten, Wirkungen über Adenosin-Rezeptoren außerhalb des ZNS berücksichtigt werden. Zudem muss für systemisch applizierte Substanzen überprüft werden, ob sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, (z.B. Marston *et al.*; 1998).

Unklarheit über das Substrat, das den beobachteten Effekten zugrunde liegt, ergibt sich auch bei den bisherigen Arbeiten mit *knock-out* Tieren, bei denen die Expression von Adenosin-Rezeptoren uneingeschränkt blockiert ist (Ledent *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Nyce, 1999; Chen *et al.*, 2000; El Yacoubi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001b; Chen *et al.*, 2001a; d'Alcantara *et al.*, 2001; Dasselte *et al.*, 2001; El Yacoubi *et al.*, 2001; Herve *et al.*, 2001; Johansson *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Fredduzzi *et al.*, 2002), da bei diesen der gesamte Organismus von den Manipulationen betroffen ist.

Durch die lokale Mikroinfusion eines Adenosin A_{2A} Rezeptor-Antagonisten in den NAc konnte in der ersten Studie dieser Arbeit gezeigt werden, dass Verhaltenseffekte durch Adenosin A_{2A} Rezeptoren im NAc vermittelt werden.

Die Präsentation biologischer Stimuli, die bekanntermaßen die neuronale Aktivität im NAc erhöhen, ergab keinen Hinweis auf verhaltenskorrelierte Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration. Der unveränderte extrazelluläre Adenosin-Gehalt im NAc bezüglich der verwendeten Stimuli legt den Schluss nahe, dass eine phasisch veränderte Stimulierung der Adenosin-Rezeptoren im NAc nicht an der Verarbeitung der dargebotenen Stimuli, bzw. an der Steuerung des durch sie ausgelösten Verhaltens beteiligt sind. Es wurde in diesem Zusammenhang kein Hinweis auf eine Beteiligung des Adenosin-Systems bei der Informationsverarbeitung gefunden. Diese Tatsache ist verwunderlich, da der NAc als Struktur der limbischen Funktionsschleife in die Steuerung des motivierten Verhaltens eingebunden ist und zu den wenigen Hirnarealen zählt, in denen in großer Dichte die hoch-affinen A_{2A} Rezeptoren lokalisiert sind. Zudem konnte über die Blockade dieser Rezeptoren, wie oben beschrieben, die Steuerung von Verhalten beeinflusst werden. Unter Umständen kommt es im NAc durch Stimuli, die hier nicht untersucht wurden, zu einer phasischen

Veränderung der extrazellulären Adenosin-Spiegel. So ergaben sich in einer neuen Studie Hinweise, dass phasisch erhöhte Adenosin-Spiegel im ZNS die Ursache für die zeitlich begrenzte Ausprägung des Zustandes der erlernten Hilflosigkeit (*learned helplessness*) sein könnte (Minor *et al.*, 2001). Mit dem Paradigma der *learned helplessness* versucht man, Erkenntnisse über Grundlagen von affektiven Erkrankungen zu erlangen. Die Studie, bei der Hinweise auf eine erhöhte Stimulierung der Adenosin-Rezeptoren bei dem Phänomen der *learned helplessness* gefunden wurden liefert jedoch keine Hinweise auf das Hirnareal durch das die beobachteten Effekte generiert wurden. Mit der Inhibition der *learned helplessness* durch intra-zerebro-ventrikuläre Injektionen von Koffein konnte lediglich nachgewiesen werden, dass der Effekt durch eine Struktur des ZNS vermittelt wurde. Eine Beteiligung einer phasisch veränderten Adenosin-Konzentration im NAc bei Ausprägung der *learned helplessness* ließe sich mithilfe der Mikrodialyse-Technik untersuchen.

Die Perfusion der Psychostimulantien Amphetamin und Kokain, wie sie hier durchgeführt wurde, führte zu einer massiven Dopamin-Ausschüttung im NAc (Fuchs, 2002; Fuchs *et al.*, in submission). Eine gleichzeitige Beeinflussung des extrazellulären Adenosin-Gehaltes konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die verstärkte Ausschüttung von Dopamin und anderen Neurotransmittern wie z. B. Glutamat im NAc durch Suchtdrogen wie Amphetamin und Kokain ist ein bekannter Effekt über dessen Rolle bei der Ausprägung von Sucht diskutiert wird (z.B. Di Chiara, 1998; Robbins and Everitt, 1999a; Robinson and Berridge, 2000; Pulvirenti and Diana, 2001; Everitt and Wolf, 2002). Auch Adenosin wurde als möglicher Signalstoff vorgeschlagen, der bei Sucht eine Rolle spielen könnte (Übersicht in Dunwiddie and Masino, 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern keine Hinweise darauf, dass phasische Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration an der Ausprägung von Sucht durch die akute Gabe von Psychostimulantien beteiligt sind.

Dieses Ergebnis und das einer weiteren Studie zeigen, dass sich die Annahme einer Regulation der extrazellulären Adenosin-Konzentration durch Dopamin-Rezeptoren nicht bestätigte. Eine Erhöhung der extrazellulären Adenosin-Konzentration stellte sich nur nach der massiven Blockade von Dopamin-Rezeptoren ein. Dieser Effekt zeigte sich ausgeprägt nach der lokalen Perfusion des Dopamin D₂ Rezeptor Antagonisten Racloprid. Hier führt wahrscheinlich die Blockade des tonisch aktivierten, inhibitorischen Rezeptors (Hall *et al.*, 1988; Seeman and Ulpian, 1988) zu verstärkter neuronaler Aktivität (z.B. West and Grace, 2002) und in der Folge zu einem Ansteigen der extrazellulären Adenosin-Konzentration (Chen *et al.*, 1992; Lloyd *et al.*, 1993). Dieser Befund bestätigt die Rolle des Adenosins als potentiell neuroprotektiver Neuromodulator der unter metabolischem Stress vermehrt gebildet

und ausgeschüttet wird (Cunha, 2001; Dunwiddie and Masino, 2001; Latini and Pedata, 2001).

Cunha (2001) schlug vor, dass extrazelluläres Adenosin im ZNS zwei Funktionen parallel ausüben könnte, nämlich die Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichts und die Neuromodulation. Er stellte die Hypothese auf, dass über den Adenosin-Transporter ausgeschleustes Adenosin homöostatische Wirkung hat, während vesikulär ausgeschüttetes ATP nach seiner Umwandlung in Adenosin neuromodulatorisch wirkt. Damit wäre die Wirkung des neuromodulatorisch wirksamen Adenosins auf die Synapse beschränkt. Wenn diese Hypothese zutrifft, könnten sich methodische Beschränkungen der Mikrodialysetechnik stark auf die Ergebnisse der vorliegenden Studien ausgewirkt haben. Mit dieser Technik ist man nicht in der Lage den Stoffgehalt innerhalb des synaptischen Spaltes zu analysieren, sondern es besteht lediglich die Möglichkeit, auf die Konzentrationsschwankungen von Stoffen im extrasynaptischen Extrazellularraum in einem relativ breiten Zeitfenster zurück zu schließen.

Die Bildung von Adenosin aus vesikulär ausgeschüttetem ATP wurde als *burst* beschrieben und findet wahrscheinlich im synaptischen Spalt statt (Cunha, 2001). Bei einer starken ATP-Ausschüttung ist das Austreten des gebildeten Adenosins aus dem synaptischen Spalt durch den *burst* wahrscheinlich und damit erscheint ein Zugang zu diesem Signal mit Mikrodialysetechnik sinnvoll. Wenn jedoch die Hypothese von Cunha (2001) über die parallelen Funktionen des Adenosins zutreffen sollte, besteht die Gefahr, dass das neuromodulatorische Signal des Adenosins durch das Signal des homöostatisch wirksamen Adenosins überlagert wird. Eine neuromodulatorisch wirksame Stimulierung der Adenosin-Rezeptoren im synaptischen Spalt, verursacht durch erhöhte Adenosin-Spiegel nach der Darbietung der Stimuli, wäre dann durch die angewandte Methode unter Umständen nicht nachweisbar gewesen. Diese Hypothese von Cunha ist allerdings umstritten, da bislang keine sicheren Erkenntnisse über den Anteil des über Transporter ausgeschütteten Adenosins und des extrazellulär aus ATP gebildeten Adenosins an dem Adenosin-Gehalt im Interstitium vorliegen. Über die relativen Anteile dieser Mechanismen zur Bildung von extrazellulärem Adenosin wird immer noch spekuliert (Dunwiddie and Masino, 2001; Latini and Pedata, 2001).

Die Analyse des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im NAc ergab, dass dieser unter Bedingungen, die wahrscheinlich zu einer metabolischen Beanspruchung der Neurone führen, ansteigt. Damit wird die Theorie unterstützt, dass Adenosin in einen neuroprotektiven Mechanismus eingebunden ist, der bei starker neuronaler Aktivität inhibitorisch wirkt.

Darüber hinaus wurden keine Hinweise auf eine endogene Veränderung der Stimulation der Adenosin-Rezeptoren im NAc in dieser Arbeit gefunden. An einer stimulierkorrelierten Übertragung von Information im NAc scheint Adenosin nach den Ergebnissen der Mikrodialyse-Studien nicht beteiligt zu sein. Durch die verwendete Untersuchungsmethode kann dieser Befund spezifisch auf die Situation im NAc beschränkt werden. Die Wichtigkeit, bei der Untersuchung des Adenosin-Systems lokal spezifisch zu arbeiten, unterstrichen Porkka-Heiskanen *et al.* durch die Ergebnisse ihrer kürzlich veröffentlichten Arbeit (Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000). Es ergab sich, dass der schon früher nachgewiesene Effekt (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997) eines Anstieges des extrazellulären Adenosins im basalen Vorderhirns von Katzen durch Schlafentzug in anderen Hirnregionen nicht zu beobachten war. Während also unter den gegebenen Messbedingungen keine Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Gehaltes im NAc in Reaktion auf die dargebotenen Stimuli feststellbar waren, besteht durchaus die Möglichkeit, dass man in anderen Hirnarealen, z.B. dem CPU zu anderen Ergebnissen kommen kann.

Da in der ersten Studie der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass über die Blockade von akkumbalen Adenosin A_{2A} Rezeptoren die Steuerung von Verhalten beeinflusst werden kann, erscheint es unwahrscheinlich, dass die hochsensitiven Adenosin-Rezeptoren im NAc lediglich in die Aufrechterhaltung des metabolischen Gleichgewichts eingebunden sind. Ferner legt die hohe Konzentration von Adenosin A_{2A} Rezeptoren im NAc und ihre selektive Lokalisation im ZNS weitere Funktionen von Adenosin in dieser Struktur nahe. Unter Umständen verändern sich die extrazellulären Adenosin-Spiegel im NAc eher über längere Zeiträume, so dass es zu einer Veränderung der tonischen Stimulation der Rezeptoren kommt, die dann die Steuerung von Verhalten modulieren könnte. So wäre erklärbar, dass pharmakologische Manipulationen der Adenosin-Rezeptoren im NAc verhaltenswirksam sind, die Steuerung von Verhalten aber nicht mit phasischen Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Konzentration im NAc einhergeht.

8 Literaturverzeichnis der Kapitel 4, 5 und 7

- Alam MN, Szymusiak R, Gong H, King J, McGinty D (1999) Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *J Physiol (Lond)* 521 Pt 3:679-690.
- Alexander GE, Crutcher DM (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann Rev Neurosci* 9:357-381.
- Antle MC, Steen NM, Mistlberger RE (2001) Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster. *Neuroreport* 12:2901-2905.
- Aoyama S, Kase H, Borrelli E (2000) Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J Neurosci* 20:5848-5852.
- Bakshi VP, Kelley AE (1991) Dopaminergic regulation of feeding behavior: II. Differential effects of amphetamine microinfusions into three striatal subregions. *Psychobiology* 19:233-242.
- Baldo BA, Koob GF, Markou A (1999) Role of adenosine A2 receptors in brain stimulation reward under baseline conditions and during cocaine withdrawal in rats. *J Neurosci* 19:11017-11026.
- Ballarin F, Ambrosio, Mahy (1991) Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand*:97-103.
- Ballarin M, Fredholm BB, Ambrosio S, Mahy N (1991) Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 142:97-103.
- Barraco RA, Martens KA, Parizon M, Normile HJ (1994) Role of adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens. *Prog Neuropsychopharm Biol Psychiatr*.
- Basheer R, Arrigoni E, Thatte HS, Greene RW, Ambudkar IS, McCarley RW (2002) Adenosine induces inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated mobilization of intracellular calcium stores in basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci* 22:7680-7686.

- Bassareo V, Di Chiara G (1997) Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17:851-861.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999) Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci* 11:4389-4397.
- Benington JH, Heller HC (1995) Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 45:347-360.
- Benveniste H (1989) Brain microdialysis. *J Neurochem* 52:1667-1679.
- Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT (2000) Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res* 872:44-53.
- Boye SM, Grant RJ, Clarke PB (2001) Disruption of dopaminergic neurotransmission in nucleus accumbens core inhibits the locomotor stimulant effects of nicotine and D-amphetamine in rats. *Neuropharmacology* 40:792-805.
- Brown, Marsden (1998) What do the basal ganglia do? *Lancet* 351:1801-1804.
- Brundege JM, Dunwiddie TV (1996) Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 16:5603-5612.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Bernardi G (1997) Endogenous adenosine mediates the presynaptic inhibition induced by aglycemia at corticostriatal synapses. *J Neurosci* 17:4509-4516.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Marfia GA, Pisani A, Sancesario G, Bernardi G (2000) Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 61:231-265.
- Carboni E, Silvagni A, Rolando MT, Di Chiara G (2000) Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. *J Neurosci* 20:RC102.
- Carlson NR (2001) *Physiology and behavior*, 7 Edition. Needham Heights, MA, USA: Allyn and Bacon.
- Chagoya de Sanchez V, Hernandez Munoz R, Suarez J, Vidrio S, Yanez L, Diaz Munoz M (1993) Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat--possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle. *Brain Res* 612:115-121.

- Chartoff EH, Ward RP, Dorsa DM (1999) Role of adenosine and N-methyl-D-aspartate receptors in mediating haloperidol-induced gene expression and catalepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 291:531-537.
- Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert D, Moskowitz MA, Fink JS, Schwarzschild MA (1999) A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci* 19:9192-9200.
- Chen JF, Beilstein M, Xu YH, Turner TJ, Moratalla R, Standaert DG, Aloyo VJ, Fink JS, Schwarzschild MA (2000) Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience* 97:195-204.
- Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, Sonsalla PK, Castagnoli K, Castagnoli N, Jr., Schwarzschild MA (2001a) Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:RC143.
- Chen JF, Steyn S, Staal R, Petzer JP, Xu K, Van Der Schyf CJ, Castagnoli K, Sonsalla PK, Castagnoli N, Jr., Schwarzschild MA (2002) 8-(3-Chlorostyryl)caffeine may attenuate MPTP neurotoxicity through dual actions of monoamine oxidase inhibition and A2A receptor antagonism. *J Biol Chem* 277:36040-36044.
- Chen JF, Moratalla R, Impagnatiello F, Grandy DK, Cuellar B, Rubinstein M, Beilstein MA, Hackett E, Fink JS, Low MJ, Ongini E, Schwarzschild MA (2001b) The role of the D2 dopamine receptor (D2R) in A2A adenosine receptor (A2AR)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A2A and D2 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1970-1975.
- Chen Y, Graham DI, Stone TW (1992) Release of endogenous adenosine and its metabolites by the activation of NMDA receptors in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* 106:632-638.
- Clifton PG (2000) Meal patterning in rodents: psychopharmacological and neuroanatomical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 24:213-222.
- Coupar IM, Tran BL (2002) Effects of adenosine agonists on consumptive behaviour and body temperature. *J Pharm Pharmacol* 54:289-294.
- Cousins MS, Salamone JD (1994) Nucleus accumbens dopamine depletions in rats affect relative response allocation in a novel cost/benefit procedure. *Pharmacol Biochem Behav* 49:85-91.

- Craig CG, White TD (1993) N-Methyl-D-Aspartate- and Non-N-Methyl-D-Aspartate evoked adenosine release from cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem* 60:1073-1080.
- Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107-125.
- Cunha RA, Ribeiro JA (2000) Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology* 39:1156-1167.
- d'Alcantara P, Ledent C, Swillens S, Schiffmann SN (2001) Inactivation of adenosine A2A receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience* 107:455-464.
- Daly JW, Fredholm BB (1998) Caffeine--an atypical drug of dependence. *Drug Alcohol Depend* 51:199-206.
- Darracq L, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP (1998) Importance of the noradrenaline-dopamine coupling in the locomotor activating effects of D-amphetamine. *J Neurosci* 18:2729-2739.
- Dassesse D, Massie A, Ferrari R, Ledent C, Parmentier M, Arckens L, Zoli M, Schiffmann SN (2001) Functional striatal hypodopaminergic activity in mice lacking adenosine A(2A) receptors. *J Neurochem* 78:183-198.
- Davis KL, Kahn RS (1995) New Developments in Dopamine and Schizophrenia. In: *Psychopharmacology-The Fourth Generation of Progress* (Bloom FE, Kupfer DJ, eds). New York: Raven Press.
- De Bruin JP, Feenstra MG, Broersen LM, Van Leeuwen M, Arens C, De Vries S, Joosten RN (2000) Role of the prefrontal cortex of the rat in learning and decision making: effects of transient inactivation [In Process Citation]. *Prog Brain Res* 126:103-113.
- De Bruin LA, Schasfoort EM, Steffens AB, Korf J (1990) Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate. *Am J Physiol* 259:R773-779.
- de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2000) Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev* 33:258-274.
- Deckert J, Gleiter CH (1994) Adenosine--an endogenous neuroprotective metabolite and neuromodulator.
- Delaney SM, Geiger JD (1996) Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation. *J Neurosci Methods* 64:151-156.

- Delaney SM, Geiger JD (1998) Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 285:568-572.
- Delaney SM, Shepel PN, Geiger JD (1998) Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. *J Pharmacol Exp Ther* 285:561-567.
- Di Chiara G (1990) In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharm Sci* 11:116.
- Di Chiara G (1998) A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol* 12:54-67.
- Di Chiara G, Loddo P, Tanda G (1999) Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biol Psychiatry* 46:1624-1633.
- Dobolyi A, Reichart A, Szikra T, Nyitrai G, Kekesi KA, Juhasz G (2000) Sustained depolarisation induces changes in the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides in the rat thalamus. *Neurochem Int* 37:71-79.
- Dunwiddie (1996) Purinoceptors in the Central Nervous System. *Drug Development Research* 39:361-370.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7673-7682.
- El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois J (2000) SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional 'atypical' adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol* 401:63-77.
- El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Bertorelli R, Ongini E, Costentin J, Vaugeois JM (2001) Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 134:68-77.
- Essman WD, McGonigle P, Lucki I (1993) Anatomical differentiation within the nucleus accumbens of the locomotor stimulatory actions of selective dopamine agonists and d-amphetamine. *Psychopharmacology* 112:233-241.
- Evans KR, Vaccarino FJ (1986) Intra-Nucleus Accumbens Amphetamine: Dose-Dependent Effects on Food Intake. *Pharmacol Biochem Behav* 25:1149-1151.

- Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: A neural systems perspective. *J Neurosci* 22:3312-3320.
- Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF (1998) Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in the nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex: comparison with inhibition of ionotropic receptors. *J Neurochem* 70:1104-1113.
- Feenstra MG, Botterblom MH, Mastebroek S (2000) Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens [In Process Citation]. *Neuroscience* 100:741-748.
- Fellows LK, Boutelle MG (1993) Rapid changes in extracellular glucose levels and blood flow in the striatum of the freely moving rat. *Brain Res* 604:225-231.
- Fenu S, Morelli M (1998) Motor stimulant effects of caffeine in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are dependent on previous stimulation of dopamine receptors: a different role of D1 and D2 receptors.
- Fenu S, Cauli O, Morelli M (2000) Cross-sensitization between the motor activating effects of bromocriptine and caffeine: role of adenosine A(2A) receptors. *Behav Brain Res* 114:97-105.
- Ferre S (1997) Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 133:107-120.
- Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7238-7241.
- Ferre S, O'Connor WT, Snaprud P, Ungerstedt U, Fuxe K (1994) Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 63:765-773.
- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-487.
- Ferre S, Torvinen M, Antoniou K, Irenius E, Civelli O, Arenas E, Fredholm BB, Fuxe K (1998) Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J Biol Chem* 273:4718-4724.

- Ferre S, Rimondini R, Popoli P, Reggio R, Pezzola A, Hansson AC, Andersson A, Fuxe K (1999) Stimulation of adenosine A1 receptors attenuates dopamine D1 receptor-mediated increase of NGFI-A, c-fos and jun-B mRNA levels in the dopamine-denervated striatum and dopamine D1 receptor-mediated turning behaviour. *Eur J Neurosci* 11:3884-3892.
- Ferre S, Popoli P, Gimenez-Llort L, Rimondini R, E. MC, Strömberg I, Ögren S, Fuxe K (2001) Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 7:235-241.
- Ferre S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueno J, Gutierrez MA, Casado V, Fuxe K, Goldberg SR, Lluís C, Franco R, Ciruela F (2002) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11940-11945.
- Ferré S, Fuxe K, Von Euler G, Johansson B, Fredholm BB (1992) Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* 51:501-512.
- Flagmeyer I, Haas HL, Stevens DR (1997) Adenosine A1 receptor-mediated depression of corticostriatal and thalamostriatal glutamatergic synaptic potentials in vitro. *Brain Res* 778:178-185.
- Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluís C, Fuxe K (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23:S50-59.
- Fredduzzi S, Moratalla R, Monopoli A, Cuellar B, Xu K, Ongini E, Impagnatiello F, Schwarzschild MA, Chen JF (2002) Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A2A adenosine receptors. *J Neurosci* 22:1054-1062.
- Fredholm BB (1995) Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacology and Toxicology* 76:228-239.
- Fredholm BB, Dunwiddie TV (1988) How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* 9:130-134.
- Fredholm BB, Svenningsson P (1998) Striatal adenosine A2A receptors--where are they? What do they do? [letter; comment]. *Trends Pharmacol Sci* 19:46-48.
- Fredholm BB, Lindstrom K (1999) Autoradiographic comparison of the potency of several structurally unrelated adenosine receptor antagonists at adenosine A1 and A(2A) receptors. *Eur J Pharmacol* 380:197-202.
- Fredholm BB, Arslan G, Kull B, Svenningsson P (1998) Locating the Neuronal Targets for Caffeine. *Drug Development Research* 45:324-328.

- Fredholm BB, Arslan G, Johansson B, Kull B, Svenningsson P (1997) Adenosine A2A receptors and the actions of caffeine. In: *The Role of Adenosine in the nervous system* (Okada Y, ed), pp 51-72: Elsevier science.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46:143-156.
- Freeman KA, Tallarida RJ (1994) A quantitative study of dopamine control in the rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 268:629-638.
- Fuchs H (2002) *Immunohistochemische und neurochemische Untersuchungen zur Rolle von Dopamin im Globus pallidus der Ratte*. Stuttgart: Universität Stuttgart.
- Fuchs H, Nagel J, Hauber W (in submission) Effect of Physiological and Pharmacological Stimuli on Dopamine Release in the Rat Globus Pallidus.
- Fuxe K, Ferre S, Zoli M, Agnati LF (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev* 26:258-273.
- Gerfen CR (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci* 23:S64-70.
- Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferre S, Fuxe K, Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8606-8611.
- Gong W, Neill DB, Lynn M, Justice JB, Jr. (1999) Dopamine D1/D2 agonists injected into nucleus accumbens and ventral pallidum differentially affect locomotor activity depending on site. *Neuroscience* 93:1349-1358.
- Graybiel AM (1997) The basal ganglia and cognitive pattern generators [see comments]. *Schizophr Bull* 23:459-469.
- Guieu R, Couraud F, Pouget J, Sampieri F, Bechis G, Rochat H (1996) Adenosine and the nervous system: clinical implications. *Clin Neuropharmacol* 19:459-474.
- Halimi G, Devaux C, Clot-Faybesse O, Sampol J, Legof L, Rochat H, Guieu R (2000) Modulation of adenosine concentration by opioid receptor agonists in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 398:217-224.
- Hall H, Kohler C, Gawell L, Farde L, Sedvall G (1988) Raclopride, a new selective ligand for the dopamine-D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12:559-568.

- Halldner L, Lozza G, Lindstrom K, Fredholm BB (2000) Lack of tolerance to motor stimulant effects of a selective adenosine A(2A) receptor antagonist [In Process Citation]. *Eur J Pharmacol* 406:345-354.
- Hauber W (2002) Adenosin: ein Purinnukleosid mit neuromodulatorischer Wirkung. *Neuroforum* 3:228-234.
- Hauber W, Koch M (1997) Adenosine A2a receptors in the nucleus accumbens modulate prepulse inhibition of the startle response. *Neuroreport* 8:1515-1518.
- Hauber W, Munkle M (1997) Motor depressant effects mediated by dopamine D2 and adenosine A2A receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen. *Eur J Pharmacol* 323:127-131.
- Hauber W, Bohn I, Giertler C (2000) NMDA, but not dopamine D2, receptors in the rat nucleus accumbens are involved in guidance of instrumental behavior by stimuli predicting reward magnitude. *J Neurosci* 20:6282-6288.
- Hauber W, Nagel J, Sauer R, Muller CE (1998) Motor effects induced by a blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport* 9:1803-1806.
- Hauber W, Neuscheler P, Nagel J, Muller CE (2001) Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A(2A) receptors in the caudate-putamen of rats. *Eur J Neurosci* 14:1287-1293.
- Heimer L, Zahm DS, Alheid GF (1995) Basal Ganglia. In: *The Rat Nervous System*, 2 Edition (Paxinos G, ed), pp 579-627: Academic Press.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89-125.
- Herve D, Le Moine C, Corvol JC, Belluscio L, Ledent C, Fienberg AA, Jaber M, Studler JM, Girault JA (2001) Galpha(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J Neurosci* 21:4390-4399.
- Hollerman JR, Tremblay L, Schultz W (1998) Influence of reward expectation on behavior-related neuronal activity in primate striatum. *J Neurophysiol* 80:947-963.
- Hooks MS, Kalivas PW (1995) The role of mesoaccumbens--pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation. *Neuroscience* 64:587-597.
- Hornykiewicz (1998) Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51:2-9.
- Horvitz JC (2000) Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96:651-656.

- Huston JP, Haas HL, Boix F, Pfister M, Decking U, Schrader J, Schwarting RK (1996) Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats. *Neuroscience* 73:99-107.
- Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Rev* 31:6-41
- Imperato A, Di Chiara G (1988) Effects of locally applied D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists studied with brain dialysis. *Eur J Pharmacol* 156:385-393.
- Jacobson KA, Nikodijevic O, Padgett WL, Gallo-Rodriguez C, Maillard M, Daly JW (1993) 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A2-adenosine antagonist in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 323:141-144.
- Jin S, Fredholm BB (1997a) Adenosine A1 receptors mediate hypoxia-induced inhibition of electrically evoked transmitter release from rat striatal slices. *Eur J Pharmacol* 329:107-113.
- Jin S, Fredholm BB (1997b) Glucose deprivation increases basal and electrically evoked transmitter release from rat striatal slices. Role of NMDA and adenosine A1 receptors. *Eur J Pharmacol* 340:169-175.
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9407-9412.
- Kafka SH, Corbett R (1996) Selective adenosine A2A receptor/dopamine D2 receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Eur J Pharmacol* 295:147-154.
- Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* 9:223-227.
- Kanda T, Tashiro T, Kuwana Y, Jenner P (1998a) Adenosine A2A receptors modify motor function in MPTP-treated common marmosets. *Neuroreport* 9:2857-2860.
- Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y, Jenner P (1998b) Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol* 43:507-513.
- Kelley AE (1999) Neural integrative activities of nucleus accumbens subregions in relation to learning and motivation. *Psychobiology* 27:198-213.

- Kelley AE, Delfs JM (1994) Excitatory amino acid receptors mediate the orofacial stereotypy elicited by dopaminergic stimulation of the ventrolateral striatum. *Neuroscience* 60:85-95.
- Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22:3306-3311.
- Kelley AE, Smith-Roe SL, Holahan MR (1997) Response-reinforcement learning is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation in the nucleus accumbens core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12174-12179.
- Kinney GG, Wilkinson LO, Saywell KL, Tricklebank MD (1999) Rat strain differences in the ability to disrupt sensorimotor gating are limited to the dopaminergic system, specific to prepulse inhibition, and unrelated to changes in startle amplitude or nucleus accumbens dopamine receptor sensitivity. *J Neurosci* 19:5644-5653.
- Klarner A, Koch M, Schnitzler H-U (1998) Induction of fos-protein in the forebrain and disruption of sensorimotoric gating following n-methyl-d-aspartate infusion into the ventral hippocampus of the rat. *Neuroscience* 84:443-452.
- Knapp CM, Foye MM, Cottam N, Ciraulo DA, Kornetsky C (2001) Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 68:797-803.
- Koch M (1998) Mechanismen sensomotorischer Integration bei Säugetieren: Die Schreckreaktion der Ratte als Modell. *Neuroforum* 4:260-266.
- Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59:107-128.
- Koch M, Hauber W (1998) Regulation of sensorimotor gating by interactions of dopamine and adenosine in the rat. *Behav Pharmacol* 9:23-29.
- Kodsi MH, Swerdlow NR (1997) Reduced prepulse inhibition after electrolytic lesions of nucleus accumbens subregions in the rat. *Brain Res* 773:45-52.
- Kopf SR, Melani A, Pedata F, Pepeu G (1999) Adenosine and memory storage: effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 146:214-219.
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463-484.
- Latini S, Pazzagli M, Pepeu G, Pedata F (1996) A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. *Gen Pharmacol* 27:925-933.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M (1997) Aggressiveness, hypoalgesia

- and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388:674-678.
- Lee RS, Koob GF, Henriksen SJ (1998) Electrophysiological responses of nucleus accumbens neurons to novelty stimuli and exploratory behavior in the awake, unrestrained rat. *Brain Res* 799:317-322.
- LeMoine, Svenningsson, Fredholm, Bloch (1997) Dopamine-Adenosine Interactions in the Striatum and the Globus Pallidus: Inhibition of Striatopallidal Neurons through Either D2 or A2A Receptors Enhances D1 Receptor-Mediated Effects. *J Neurosci* 17:8038-8048.
- Linden J (1994) Purinergic Systems. In: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects.*, 5 Edition (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds), p 401. New York: Raven Press.
- Lloyd HG, Lindstrom K, Fredholm BB (1993) Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. *Neurochem Int* 23:173-185.
- Maldonado-Irizarry CS, Kelley AE (1995) Excitotoxic lesions of the core and shell subregions of the nucleus accumbens differentially disrupt body weight regulation and motor activity in rat. *Brain Res Bull* 38:551-559.
- Mally, Stone (1998) Potential of Adenosine A2A Receptor Antagonists in the Treatment of Movement Disorders. *CNS Drugs* 10:311-320.
- Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA (1994) Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265:2098-2101.
- Marston HM, Finlayson K, Maemoto T, Olverman HJ, Akahane A, Sharkey J, Butcher SP (1998) Pharmacological characterization of a simple behavioral response mediated selectively by central adenosine A1 receptors, using in vivo and in vitro techniques. *J Pharmacol Exp Ther* 285:1023-1030.
- Masino SA, Dunwiddie TV (1999) Temperature-dependent modulation of excitatory transmission in hippocampal slices is mediated by extracellular adenosine. *J Neurosci* 19:1932-1939.
- Mayfield RD, Jones BA, Miller HA, Simosky JK, Larson GA, Zahniser NR (1999) Modulation of endogenous GABA release by an antagonistic adenosine A1/dopamineD1 receptor interaction in rat brain limbic regions but not basal ganglia. *Synapse* 33:274-281.

- Melani A, Corsi C, Gimenez-Llort L, Martinez E, Ogren SO, Pedata F, Ferre S (1999a) Effect of N-methyl-D-aspartate on motor activity and in vivo adenosine striatal outflow in the rat. *Eur J Pharmacol* 385:15-19.
- Melani A, Pantoni L, Corsi C, Bianchi L, Monopoli A, Bertorelli R, Pepeu G, Pedata F (1999b) Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma- aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke* 30:2448-2454; discussion 2455.
- Minor TR, Rowe MK, Soames Job RF, Ferguson EC (2001) Escape deficits induced by inescapable shock and metabolic stress are reversed by adenosine receptor antagonists. *Behav Brain Res* 120:203-212.
- Morelli M, Wardas J (2001) Adenosine A2A Receptor Antagonists: Potential Therapeutic and Neuroprotective Effects in Parkinson`s Disease. *Neurotoxicity Research* 3:545-556.
- Morelli M, Aquas E, Ongini E (2002) Dopamine - Adenosine Interactions. In: *Handbook of experimental pharmacology - Dopamine in the CNS II* (Di Chiara G, ed), pp 135-150. Berlin: Springer.
- Morelli M, Fenu S, Pinna A, Di Chiara G (1994) Adenosine A2 receptors interact negatively with dopamine D1 and D2 receptors in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 251:21-25.
- Mori A, Shindou T (2000) Physiology of Adenosine Receptors in the Striatum. In: *Adenosine Receptors and Parkinson´s Disease* (Kase H, Richardson PJ, Jenner P, eds), pp 107-127. San Diego: Academic Press.
- Müller CE (2000) A2A adenosine receptor antagonists - future drugs for Parkinson´s disease? *Drugs of the future* 25:1043-1052.
- Müller CE, Sauer R, Maurinsh Y, Fülle F, Nagel J, Hauber W (1998) Water-soluble prodrug of potent A2A-selective adenosine receptor antagonists. *Drug Development Research* 45:190-197.
- Nagel J, Hauber W (2002) Effects of salient environmental stimuli on extracellular adenosine levels in the rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis. *Behav Brain Res* 134:485-492.
- Nagel J, Schladebach H, Schwienbacher I, Koch M, Müller CE, Hauber W (in submission) Effects of Adenosine A2A Receptor Blockade in the Nucleus Accumbens on Locomotion, Feeding, and Prepulse Inhibition in Rats. *Synapse*.

- Narimatsu E, Aoki M (2000) Transient depression of excitatory synaptic transmission induced by adenosine uptake inhibition in rat hippocampal slices. *Brain Res* 862:284-287.
- Nash JE, Brotchie JM (2000) A common signaling pathway for striatal NMDA and adenosine A2a receptors: implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosci* 20:7782-7789.
- Nehlig A (1999) Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev* 23:563-576.
- Nehlig A, Boyet S (2000) Dose-response study of caffeine effects on cerebral functional activity with a specific focus on dependence. *Brain Res* 858:71-77.
- Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1990) In vivo characterization of locally applied dopamine uptake inhibitors by striatal microdialysis. *Synapse* 6:106-112.
- Nuechterlein KH, Dawson ME (1995) Neurophysiological and psychological approaches to Schizophrenia and its pathogenesis. In: *Psychopharmacology-The Fourth Generation of Progress* (Bloom FE, Kupfer DJ, eds). New York: Raven Press.
- Nyce JW (1999) Insight into adenosine receptor function using antisense and gene- knockout approaches. *Trends Pharmacol Sci* 20:79-83.
- Ochiishi T, Chen L, Yukawa A, Saitoh Y, Sekino Y, Arai T, Nakata H, Miyamoto H (1999) Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. *J Comp Neurol* 411:301-316.
- Okada M, Mizuno K, Kaneko S (1996) Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci Lett* 212:53-56.
- Ongini E, Fredholm BB (1996) Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci* 17:364-372.
- Ongini E, Dionisotti S, Morelli M, Ferré S, Svenningsson P, Fuxe K, Fredholm B (1996) Neuropharmacology of the adenosine A2A receptors. *Drug Development Research* 39:450-460.
- Parkinson JA, Olmstead MC, Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ (1999) Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J Neurosci* 19:2401-2411.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, New York: Academic Press.

- Pazzagli M, Pedata F, Pepeu G (1993) Effect of K⁺ depolarization, tetrodotoxin, and NMDA receptor inhibition on extracellular adenosine levels in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 234:61-65.
- Pazzagli M, Corsi C, Latini S, Pedata F, Pepeu G (1994) In vivo regulation of extracellular adenosine levels in the cerebral cortex by NMDA and muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* 254:277-282.
- Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ (1981) A stereotaxic atlas of the rat brain. New York, London: Plenum Press.
- Phillips GD, Howes SR, Whitelaw RB, Robbins TW, Everitt BJ (1995) Analysis of the effects of intra-accumbens SKF-38393 and LY-171555 upon the behavioural satiety sequence. *Psychopharmacology (Berl)* 117:82-90.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997a) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25:192-216.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997b) Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J Neurosci* 17:3254-3261.
- Pinna A, Corsi C, Carta AR, Valentini V, Pedata F, Morelli M (2002) Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur J Pharmacol* 446:75-82.
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12304-12308.
- Popoli P, Reggio R, Pezzola A, Fuxe K, Ferre S (1998) Adenosine A1 and A2A receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. *Neurosci Lett* 251:201-204.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, McCarley RW (2000) Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study [In Process Citation]. *Neuroscience* 99:507-517.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-including effects of prolonged wakefulness. *Science* 276:1265-1268.

- Portas CM, Thakkar M, Rainnie DG, Greene RW, McCarley RW (1997) Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat. *Neuroscience* 79:225-235.
- Pulvirenti L, Diana M (2001) Drug dependence as a disorder of neural plasticity: focus on dopamine and glutamate. *Rev Neurosci* 12:141-158.
- Rahman S, McBride WJ (2000) Feedback control of mesolimbic somatodendritic dopamine release in rat brain. *J Neurochem* 74:684-692.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Rathbone (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *progress in neurobiology* 59:663-690.
- Rathbone MP, Middlemiss P, Andrew C, Caciagli F, Ciccarelli R, Di Iorio P, Huang R (1998) The trophic effects of purines and purinergic signaling in pathologic reactions of astrocytes. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12:S36-45.
- Rebec GV, Christensen JR, Guerra C, Bardo MT (1997a) Regional and temporal differences in real-time dopamine efflux in the nucleus accumbens during free-choice novelty. *Brain Res* 776:61-67.
- Rebec GV, Grabner CP, Johnson M, Pierce RC, Bardo MT (1997b) Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience* 76:707-714.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999a) Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error? *Trends Neurosci* 22:146-151.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999b) The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89:1009-1023.
- Reynolds SM, Berridge KC (2001) Fear and feeding in the nucleus accumbens shell: rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. *J Neurosci* 21:3261-3270.
- Ribeiro JA (1999) Adenosine A2A receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur J Pharmacol* 375:101-113.
- Richardson PJ, Kurokawa M (2000) Regulation of Neurotransmitter Release in Basal Ganglia by Adenosine Receptor Agonists and Antagonists *in vitro* and *in vivo*. In: *Adenosine Receptors and Parkinson's Disease* (Kase H, Richardson PJ, Jenner P, eds), pp 130-148. San Diego: Academic Press.

- Richardson PJ, Kase H, Jenner PG (1997) Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease [see comments]. *Trends Pharmacol Sci* 18:338-344.
- Richardson PJ, Dixon AK, Lee K, Bell MI, Cox PJ, Williams R, Pinnock RD, Freeman TC (2000) Correlating physiology with gene expression in striatal cholinergic neurones. *J Neurochem* 74:839-846.
- Richter DW, Schmidt-Garcon P, Pierrefiche O, Bischoff AM, Lalley PM (1999) Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats [see comments]. *J Physiol (Lond)* 514:567-578.
- Rimondini R, Fuxe K, Ferre S (1999) Multiple intramembrane receptor-receptor interactions in the regulation of striatal dopamine D2 receptors. *Neuroreport* 10:2051-2054.
- Rimondini R, Ferre S, Gimenez-Llort L, Ogren SO, Fuxe K (1998) Differential effects of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on dopamine receptor agonist-induced behavioural responses in rats. *Eur J Pharmacol* 347:153-158.
- Robbins TW, Everitt BJ (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6:228-236.
- Robbins TW, Everitt BJ (1999a) Drug addiction: bad habits add up [news]. *Nature* 398:567-570.
- Robbins TW, Everitt B, J. (1999b) Motivation and reward. *Fundamental Neuroscience* 48:1245-1260.
- Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95 Suppl 2:S91-117.
- Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J (1998) Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 401:163-186.
- Rudolphi KA, Schubert P (1997) Modulation of neuronal and glial cell function by adenosine and neuroprotection in vascular dementia. *Behav Brain Res* 83:123-128.
- Saigusa T, Tuinstra T, Koshikawa N, Cools AR (1999) High and low responders to novelty: effects of a catecholamine synthesis inhibitor on novelty-induced changes in behaviour and release of accumbal dopamine. *Neuroscience* 88:1153-1163.
- Salim H, Ferre S, Dalal A, Peterfreund RA, Fuxe K, Vincent JD, Lledo PM (2000) Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 74:432-439.

- Satoh S, Matsumura H, Koike N, Tokunaga Y, Maeda T, Hayaishi O (1999) Region-dependent difference in the sleep-promoting potency of an adenosine A_{2A} receptor agonist. *Eur J Neurosci* 11:1587-1597.
- Saulskaya NB, Mikhailova MO (2002) Feeding-induced decrease in extracellular glutamate level in the rat nucleus accumbens: dependence on glutamate uptake. *Neuroscience* 112:791-801.
- Schiffmann SN, Jacobs O, Vanderhaeghen JJ (1991) The striatal restricted adenosine A₂ receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in-situ hybridization histochemistry study. *J Neurochemistry*:1062-1067.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.
- Schwienbacher I, Fendt M, Hauber W, Koch M (2002) Dopamine D(1) receptors and adenosine A(1) receptors in the rat nucleus accumbens regulate motor activity but not prepulse inhibition. *Eur J Pharmacol* 444:161-169.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (1996) Adenosine A₂ receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol* 48:167-189.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci* 21:341-346.
- Secrist JA, 3rd, Barrio JR, Leonard NJ, Weber G (1972) Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes. Biological activities and spectroscopic properties. *Biochemistry* 11:3499-3506.
- Seeman P, Ulpian C (1988) Dopamine D₁ and D₂ receptor selectivities of agonists and antagonists. *Adv Exp Med Biol* 235:55-63.
- Seeman P, Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15:264-270.
- Sills TL, Baird JP, Vaccarino FJ (1993) Individual differences in the feeding effects of amphetamine: role of nucleus accumbens dopamine and circadian factors. *Psychopharmacology* 112:211-218.
- Sills TL, Azampanah A, Fletcher PJ (2001) The adenosine A_{2A} agonist CGS 21680 reverses the reduction in prepulse inhibition of the acoustic startle response induced by phencyclidine, but not by apomorphine and amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 156:187-193.
- Spanagel R, Weiss F (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22:521-527.

- Stratford TR, Kelley AE (1997) GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci* 17:4434-4440.
- Stratford TR, Kelley AE (1999) Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci* 19:11040-11048.
- Strecker RE, Morairty S, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Basheer R, Dauphin LJ, Rainnie DG, Portas CM, Greene RW, McCarley RW (2000) Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res* 115:183-204.
- Svenningsson P, Fredholm BB (1997) Caffeine mimics the effect of a dopamine D2/3 receptor agonist on the expression of immediate early genes in globus pallidus. *Neuropharmacology* 36:1309-1317.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB (1995) Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB (1999a) The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J Neurosci* 19:4011-4022.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Ongini E, Fredholm BB (1997a) Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience* 79:753-764.
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB (1999b) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 59:355-396.
- Svenningsson P, Le Moine C, Kull B, Sunahara R, Bloch B, Fredholm BB (1997b) Cellular expression of adenosine A2A receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. *Neuroscience* 80:1171-1185.
- Swanson CJ, Heath S, Stratford TR, Kelley AE (1997) Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 58:933-945.
- Swerdlow B, Taaid, Geyer (1994) Assessing the Validity of an Animal Model of Deficient Sensorimotor Gating in Schizophrenic Patients. *Arch Gen Psychiatry* 51:139-154.

- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (1990a) GABAergic projection from nucleus accumbens to ventral pallidum mediates dopamine-induced sensorimotor gating deficits of acoustic startle in rats. *Brain Res* 532:146-150.
- Swerdlow NR, Braff DL, Masten VL, Geyer MA (1990b) Schizophrenic-like sensorimotor gating abnormalities in rats following dopamine infusion into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 101:414-420.
- Swerdlow NR, Mansbach RS, Geyer MA, Pulvirenti L, Koob GF, Braff DL (1990c) Amphetamine disruption of prepulse inhibition of acoustic startle is reversed by depletion of mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology* 100:413-416.
- Swerdlow NR, Martinez ZA, Hanlon FM, Platten A, Farid M, Auerbach P, Braff DL, Geyer MA (2000) Toward understanding the biology of a complex phenotype: rat strain and substrain differences in the sensorimotor gating-disruptive effects of dopamine agonists. *J Neurosci* 20:4325-4336.
- Szczycka MS, Rainey MA, Kim DS, Alaynick WA, Marck BT, Matsumoto AM, Palmiter RD (1999) Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12138-12143.
- Thermos K, Radke J, Kastellakis A, Anagnostakis Y, Spyraiki C (1996) Dopamine-somatostatin interactions in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Synapse* 22:209-216.
- Turgeon SM, Pollack AE, Schusheim L, Fink JS (1996) Effects of selective adenosine A1 and A2a agonists on amphetamine-induced locomotion and c-Fos in striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 707:75-80.
- Ungerstedt U (1986) Microdialysis - a new bioanalytical sampling technique. *Curr Separations* 7:43.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:125-132.
- van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33:999-1005.
- van den Boss R, Cools AR, Ogren SO (1988) Differential effects of the selective D2-antagonist raclopride in the nucleus accumbens of the rat on spontaneous and d-amphetamine-induced activity. *Psychopharmacology* 95:447-451.
- Vellucci SV, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ (1993) Adenosine A2 receptor regulation of apomorphine-induced turning in rats with unilateral striatal dopamine denervation.

- von Lubitz DK (1999) Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? [corrected and republished article originally printed in *Eur J Pharmacol* 1999 Jan 15;365(1):9-25]. *Eur J Pharmacol* 371:85-102.
- Wan FJ, Swerdlow NR (1993) Intra-accumbens infusion of quinpirole impairs sensorimotor gating of acoustic startle in rats. *Psychopharmacology* 113:103-109.
- Ward RP, Dorsa DM (1999) Molecular and behavioral effects mediated by Gs-coupled adenosine A2a, but not serotonin 5-Ht4 or 5-Ht6 receptors following antipsychotic administration. *Neuroscience* 89:927-938.
- West AR, Grace AA (2002) Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci* 22:294-304.
- Westerink BH (1995) Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav Brain Res* 70:103-124.
- Westerink BH, De Vries JB (2001) A method to evaluate the diffusion rate of drugs from a microdialysis probe through brain tissue. *J Neurosci Methods* 109:53-58.
- Williams M (1998) Purinoceptors in Central Nervous System Function. In: *Neuropsychopharmacology*, 4. Edition (Davis KL, Charney D, T. CJ, C. N, eds). New York: Raven Press.
- Wojcik WJ, Neff NH (1982) Adenosine measurement by a rapid HPLC-fluorometric method: induced changes of adenosine content in regions of rat brain. *J Neurochem* 39:280-282.
- Wurts SW, Edgar DM (2000) Caffeine during sleep deprivation: sleep tendency and dynamics of recovery sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 65:155-162.
- Zahniser NR, Simosky JK, Mayfield RD, Negri CA, Hanania T, Larson GA, Kelly MA, Grandy DK, Rubinstein M, Low MJ, Fredholm BB (2000) Functional uncoupling of adenosine A(2A) receptors and reduced response to caffeine in mice lacking dopamine D2 receptors. *J Neurosci* 20:5949-5957.
- Zetterström V, Ungerstedt, Tossman, Jonzon, Fredholm (1982) purine levels in the intact rat brain, studies with an implanted hollow fibre. *Neuroscience Letters*:111-115.
- Zimmermann H (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci* 17:420.
- Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P (1998) New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int* 32:421-425.

Zöllner N, Gröbner W, Gresser U (1996) Physiologie des Purinstoffwechsels. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7 Edition (Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, eds), p 545. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

9 Dankesworte

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargelegt, spielt bei zielgerichtetem Handeln die Motivation eine wesentliche Rolle. Diese wird stark durch externe Stimuli beeinflusst. So möchte ich im abschließenden Kapitel der Dissertation denjenigen danken, die mich durch positiv verstärkende Stimuli, also mit Förderung, Anregungen und Zuspruch in den letzten Jahren bei meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Wolfgang Hauber hat mir im Rahmen eines Projektes die Möglichkeit gegeben, mit modernsten Methoden in einem anspruchsvollen und hochinteressanten Themengebiet zu forschen. Für die sehr gute Zusammenarbeit und die aufgeschlossene, freundliche Begleitung meiner Arbeit möchte ich ihm als meinen Doktorvater herzlich danken.

Den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Tierphysiologie des Biologischen Institutes der Universität Stuttgart gilt mein Dank für die kollegiale Zusammenarbeit. Hier möchte ich besonders die Leistung von Angeline Votteler herausheben, die als umsichtige „Laborchefin“ dafür gesorgt hat, dass der Betrieb im zentralen Labor immer reibungslos ablief und keine Substanzengpässe oder Stimmungstiefs auftraten.

Stefan Nitschke danke ich für seine schier grenzenlose Hilfsbereitschaft und die professionelle Unterstützung in der Versuchsdurchführung.

Bei methodischen Problemen in der Neurochemie konnte ich davon profitieren, dass ich mit Dr. Holger Fuchs einen ausgewiesenen Experten für die Mikrodialyse als Gesprächspartner an meiner Seite hatte. Holger und ich arbeiteten in inhaltlich getrennten Projekten parallel im gleichen Büro, in den gleichen Experimentallabors und teilweise mit der gleichen technischen Ausstattung. Diese gemeinsame Nutzung von Ressourcen klappte reibungslos und hat sich meiner Meinung nach sogar als Vorteil für die Projektumsetzung erwiesen. Mit Dr. Andreas Kalkowski bildeten Holger und ich eine zeitlang ein Team von Spät- bzw. Nachtarbeitern. Dieser Arbeitsrhythmus ergab sich zunächst aus den verwendeten Methoden, deren Störungsanfälligkeit durch gegenseitige manuelle Unterstützung erheblich reduziert werden konnte. Die Synchronisation wurde aber auch durch soziale Einflüsse, wie gemeinsames Abendessen oder spontane Diskussionen zur Erarbeitung von Problemlösungen, verstärkt. Vielen Dank Freunde, für die gute Zeit.

Prof. Dr. Franziska Wollnik danke ich für die Begutachtung der Arbeit und dafür, dass sie mir Räumlichkeiten, Mittel und Material ihrer Abteilung zur Durchführung der Arbeit und zur Präsentation der Ergebnisse auf internationalen Tagungen zur Verfügung gestellt hat. In diesem Zusammenhang danke ich auch den Hochschulförderungen des Landes Baden-

Württemberg und der Bundesrepublik Deutschland, die das Forschen in diesem Umfeld ermöglichten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung meiner Stelle als wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Stuttgart und für die zusätzliche finanzielle Unterstützung des Projektes.

Beate Rehkopf und Dagmar Mvondo danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, wenn Unterstützung aus der Abteilung Biophysik erforderlich war. Hennig Schladebach danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Durchführung seiner Studienarbeit.

Dr. Ursula Delabar, Universität Tübingen, danke ich für ihre Hilfe bei der Etablierung der HPLC-Analyse von Adenosin. Dieser Dank gilt auch den Firmen Shimadzu und Merck-Hitachi, die mir während der Methoden-Etablierung Fluoreszenz-Detektoren zur Erprobung kostenlos zur Verfügung gestellt haben.

Der Firma Axel Semrau danke ich für die Unterstützung der Mikrodialysesymposien in Tübingen und Magdeburg, da durch derartige Veranstaltungen eine wertvolle Plattform zum Austausch zwischen den Mikrodialyseanwendern in Deutschland geboten wird.

Prof. Dr. Michael Koch (Universität Bremen), Dr. Markus Fendt und Dipl.-Biol. Isabel Schwienbacher (beide Universität Tübingen) danke ich für die gute Zusammenarbeit und für ihre Unterstützung bei der Messung der PPI. Für die Überlassung des neu entwickelten Adenosin A_{2A} Rezeptor Antagonisten MSX-3 und die Kooperation danke ich Prof. Dr. Christa E. Müller (Universität Bonn). Dr. Matthijs Feenstra (Netherlands Institute for Brain Research) danke ich für die informativen Gespräche und hilfreichen Anregungen zur Versuchsdurchführung.

Allen, die die Dissertation Korrektur gelesen haben, sei gedankt.

Meine Eltern Gisela Nagel und Dr. Gert Nagel haben großen Anteil daran, dass diese Arbeit entstehen konnte. Euer Vertrauen und euere nie fordernde Förderung wusste ich in meiner gesamten wissenschaftlichen Ausbildung stets hinter mir. Mit eurem Rückhalt konnte ich mir den Wunsch erfüllen, als Biologe zu forschen und zur Promotion zu gelangen. Meiner Frau Katja Raschke möchte ich für die Geduld danken, mit der sie mich durch den Alltag eines Wissenschaftlers begleitet hat, Laborfeierabend ist leider häufig schwer planbar. Danke für deine Unterstützung auf unserem gemeinsamen Weg.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jens Nagel
Akademischer Grad	Diplom-Biologe, technisch orientiert
Nationalität	deutsch
Geburtstag und -ort	20.11.1968 in Hamburg
Eltern	Gisela Nagel, Dr. Gert Nagel
Familienstand	verheiratet
Anschrift	Gemeindegarten 9, 55442 Daxweiler

Schulbildung

1975-1979	Grundschule
1979-1988	Copernicus-Gymnasium Norderstedt
1988	Abitur

Wehrdienst

1988-1990	Heer, Soldat auf Zeit, Leutnant der Reserve (1991)
-----------	--

Hochschulstudium

1990-1993	Studium der Verfahrenstechnik, TU Hamburg-Harburg
1993-1998	Studium der Technischen Biologie, Universität Stuttgart
1998	Diplomarbeit mit dem Thema: „Neurochemische und verhaltensphysiologische Analyse der Adenosin-Dopamin-Interaktion im Gehirn der Ratte“
seit WS 2001	Promotionsstudent, Universität Stuttgart

Berufstätigkeit

1999-2001	Wissenschaftlicher Angestellter am Biologischen Institut der Universität Stuttgart im Rahmen eines Projektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
-----------	---

Diese Arbeit wurde von mir selbstständig verfasst. Es wurden keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Alle Co-Autoren der zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte sind aufgeführt.

Stuttgart, den 23. April 2003

Jens Nagel

Zusammenfassung

Das Nukleosid Adenosin ist ein wichtiger Neuromodulator des ZNS. Es wirkt über vier membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptortypen, die als Adenosin A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ Rezeptoren bezeichnet werden. Extrazelluläres Adenosin wird aus vesikulär freigesetzten Nukleotiden gebildet oder stammt aus ausgeschüttetem, intrazellulärem Adenosin. Die Neuromodulation durch Adenosin spielt insbesondere im Nucleus accumbens (NAc), einer Schlüsselstruktur der Basalganglien, eine wichtige Rolle. Der NAc ist u.a. bei der situationsgerechten Auswahl und Ausführung von belohnungsgerichtetem Verhalten von großer Bedeutung. A_{2A} Rezeptoren sind im NAc in hoher Dichte exprimiert, ihre Rolle bei der Verhaltenssteuerung durch den NAc ist allerdings weitgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde an Ratten die Bedeutung von extrazellulärem Adenosin im NAc bei der Verhaltenssteuerung in drei Experimenten untersucht.

Im ersten Experiment wurde geprüft, ob tonisch aktivierte A_{2A} Rezeptoren im NAc an der Steuerung der spontanen, lokomotorischen Aktivität, des Fressverhaltens und der Präpuls Inhibition (PPI) beteiligt sind. Dazu wurden bilaterale Mikroinfusionen von MSX-3, einer Vorläufersubstanz des selektiven A_{2A} Rezeptor Antagonisten MSX-2 oder Vehikel in den NAc vorgenommen. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Blockade der A_{2A} Rezeptoren im NAc die untersuchten Verhaltensweisen signifikant veränderte. Diese Daten erlauben den Schluss, dass die A_{2A} Rezeptoren im NAc tonisch aktiviert sind und appetitives und konsumatorisches Verhalten wie Lokomotion und Fressverhalten sowie sensomotorische Integrationsprozesse steuern. Diese Befunde stehen in Einklang mit Annahme, dass tonisch aktivierte A_{2A} Rezeptoren in den Basalganglien zur Verhaltenssteuerung beitragen.

Der NAc steuert Verhalten, das durch biologisch relevante Reize oder Ereignisse (Stress- oder Nahrungsreize), ausgelöst wird. Im zweiten Experiment wurde untersucht, ob die Darbietung derartiger Stimuli zu Veränderungen der extrazellulären Adenosin-Spiegel im NAc führt.

Mithilfe von *in vivo* Mikrodialyse wurde der Effekt von vier prototypischen Stimuli, die bekanntlich durch den NAc prozessiert werden, auf den extrazellulären Adenosin-Gehalt im NAc untersucht. Keiner der Stimuli führte zu einer signifikanten Veränderung der Adenosin-Konzentration. Die Verarbeitung der untersuchten Reize und die durch sie ausgelösten Verhaltensweisen gehen demnach nicht mit transienten Veränderungen des extrazellulären Adenosin-Spiegels im NAc einher, d.h. mögliche neuromodulatorische Wirkungen von Adenosin im NAc werden nicht durch phasische, mit Hilfe der Mikrodialyse messbare Signale vermittelt.

Die Regulation der extrazellulären Adenosin-Spiegel im NAc ist weitgehend unbekannt. Es gibt neuere Hinweise, dass die extrazelluläre Adenosin-Konzentration möglicherweise durch Dopamin-Rezeptoren gesteuert wird. Daher wurde in einem dritten Experiment untersucht, ob die lokale Blockade von Dopamin D₁ oder Dopamin D₂ Rezeptoren zu einer Veränderung der Adenosin-Spiegel im NAc führt. Dazu wurden durch reverse Mikrodialyse die selektiven Dopamin Rezeptor Antagonisten SCH23390 (D₁) und Racloprid (D₂) in den NAc infundiert. Nur nach massiver Blockade des D₂ Rezeptors kam es zu einem extrem starken Anstieg des extrazellulären Adenosin-Gehaltes. Die Blockade der Dopamin-Rezeptoren mit niedrig dosierten Dopamin Rezeptor Antagonisten führte zu keiner signifikanten Veränderung des extrazellulären Adenosin-Spiegels. Eine Regulation des extrazellulären Adenosin-Gehaltes durch D₂ Rezeptoren ist daher unwahrscheinlich. Die massive Zunahme der Adenosin-Spiegel durch sehr hohe Konzentrationen des D₂ Rezeptor Antagonisten beruht möglicherweise auf unphysiologische Mechanismen, die zu einer Zunahme der neuronalen Aktivität im NAc führen. Es gibt zahlreiche Hinweise auf einen Anstieg des extrazellulären Adenosin-Gehaltes nach verstärkter neuronale Aktivität und in Folge eines erhöhten Energiebedarfs des Gewebes. Der beobachtete Anstieg des Adenosin-Spiegels könnte in Zusammenhang mit den länger bekannten, neuroprotektiven und homöostatischen Funktionen von Adenosin stehen.