

Modulation des Klassisch-Instrumentellen Transfers durch die Neurotransmitter Dopamin und Glutamat

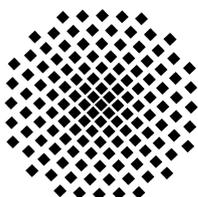
Vorgelegt von Anja Lex geb. Murschall aus Velbert

Von der Fakultät der Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart genehmigte Abhandlung zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Hauptberichter: Prof. Dr. Wolfgang Hauber

Mitberichter: Prof. Dr. Franziska Wollnik

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2010



Biologisches Institut der Universität Stuttgart, 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig bearbeitet. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die Koautoren der zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte sind jeweils genannt.

Stuttgart, den 16.08.2010

Anja Lex

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
4	SUMMARY	6
5	EINLEITUNG	8
5.1	<i>Lernen</i>	8
5.1.1	Klassische Konditionierung	9
5.1.2	Instrumentelle Konditionierung	12
5.1.3	Klassisch-Instrumenteller Transfer	13
5.2	<i>Motivation</i>	17
5.3	<i>Der Motivationsschaltkreis</i>	19
5.3.1	Nucleus Accumbens	20
5.3.2	Amygdala	23
5.3.3	Ventrales tegmentales Areal	26
5.4	<i>Der Neurotransmitter Dopamin</i>	30
5.4.1	Biosynthese, Wiederaufnahme und Abbau von Dopamin	30
5.4.2	Dopaminrezeptoren	32
5.4.3	Freisetzung von Dopamin	34
5.4.4	Funktionen von Dopamin	35
5.5	<i>Neurotransmitter Glutamat</i>	40
5.5.1	Biosynthese, Wiederaufnahme und Abbau von Glutamat	40
5.5.2	Glutamatrezeptoren	41
5.5.3	Ionotrope Glutamatrezeptoren	42
5.5.4	Metabotrope Glutamatrezeptoren	44
5.5.5	Funktionen von Glutamat	44
5.5.6	Langzeitpotenzierung	45
5.6	<i>Fragestellung der vorliegenden Arbeit</i>	48
6	DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE	50
6.1	<i>Experiment 1: Effects of a systemic AMPA/KA and NMDA receptor blockade on pavlovian-instrumental transfer</i>	51
6.2	<i>Experiment 2: Inactivation of the ventral tegmental area abolished the general excitatory influence of Pavlovian cues on instrumental performance</i>	58

6.3	<i>Experiment 3: Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer</i>	62
7	DISKUSSION	71
7.1	<i>Methodische Aspekte</i>	71
7.1.1	Beurteilung des Klassisch-Instrumentellen Transfers	71
7.1.2	Beurteilung der Mikroinfusionsprozedur	75
7.2	<i>Rolle von Glutamat beim Klassisch-Instrumentellen Transfer</i>	77
7.3	<i>Rolle der VTA beim Klassisch-Instrumentellen Transfer</i>	83
7.4	<i>Rolle von Dopamin im Acb beim Klassisch-Instrumentellen Transfer</i>	87
7.5	<i>Zusammenfassende Diskussion</i>	92
8	ANHANG	99
8.1	<i>Programm „Klassische Konditionierung“ mit Ton als CS</i>	99
8.2	<i>Programm „Instrumentelle Konditionierung“</i>	102
8.3	<i>Programm „Reminder“ mit Ton als CS</i>	103
8.4	<i>Programm „Extinktion“</i>	107
8.5	<i>Programm „Klassisch-Instrumenteller Transfer“</i>	107
9	LITERATURVERZEICHNIS	109
10	DANKSAGUNG	127
11	LEBENS LAUF	129

2 Abkürzungsverzeichnis

3-MT	3-Methoxytyramin
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AC	Adenylatcyclase
ACC	Anteriorer Cingulärer Cortex
Acb	Nucleus Accumbens
AcbC	Nucleus Accumbens core
AcbSh	Nucleus Accumbens shell
ADH	Aldehyddehydrogenase
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
BNST	Bed Nucleus of Stria Terminalis
BLA	Basolaterale Amygdala
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CeN	Zentralkern der Amygdala
CNQX	Kompetitiver AMPA/KA-Antagonist
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CR	Konditionierte Reaktion (<i>conditioned reaction</i>)
CRf	<i>Conditioned reinforcement</i>
CRH	Kortikotropin-Releasing Hormon
CS	Konditionierter Reiz (<i>conditioned stimulus</i>)
CSo	Unkonditionierter Reiz
DAG	Diacylglycerin
DAT	Dopamintransporter
DLS	Dorsolaterales Striatum
DMS	Dorsomediales Striatum
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylsäure
EAA	Exzitatorischen Aminosäuren (<i>excitatory amino acid</i>)
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FC	Frontaler Cortex
fMRI	Funktionellen Magnetresonanztomographie
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
GP	Globus pallidus
HVA	Homovanillinsäure
ICSS	Intrakraniale Selbstreizung (<i>intracranial self-stimulation</i>)
iGluR	Ionotroper Glutamatrezeptor
IP ₃	Inositoltriphosphat
ISI	Interstimulus-Interval
KA	Kainat
KO	<i>Knock-out</i>

L-DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
LDP	Langzeitdepression (<i>long-term depression</i>)
LH	Lateraler Hypothalamus
LTP	Langzeitpotenzierung (<i>long-term potentiation</i>)
MAO	Monoaminoxidase
MFB	Mediales Vorderhirnbündel (<i>medial forebrain bundle</i>)
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
MK-801	nicht-kompetitive NMDA-Antagonist (vgl. Dizocilpin)
mPFC	Medialer Präfrontaler Cortex
MSN	<i>medium sized spiny neurons</i>
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
OFC	Orbitofrontaler Cortex
PAG	Zentrales Höhlengrau (Substantia grisea periaqueductalis)
PIT	Klassisch-Instrumenteller Transfer (<i>pavlovian-instrumental transfer</i>)
PFC	Präfrontaler Cortex
RNA	Ribonukleinsäure
RRF	Retrorubrales Feld (<i>retrobulbar field</i>)
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
TH	Tyrosinhydroxylase
UR	Unkonditionierte Reaktion (<i>unconditioned reaction</i>)
US	Unkonditionierter Reiz (<i>unconditioned stimulus</i>)
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VP	Ventrales Pallidum
VTA	Ventrales tegmentales Areal (<i>ventral tegmental area</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5.1	Verschiedene Formen des Lernens	9
Abbildung 5.2	Klassische Konditionierung	10
Abbildung 5.3	Instrumentelle Konditionierung	13
Abbildung 5.4	Klassisch-Instrumenteller Transfer	14
Abbildung 5.5	Übersicht über den generellen und spezifischen PIT	15
Abbildung 5.6	Hydraulisches Modell zur Motivationssteuerung	18
Abbildung 5.7	Motivationsschaltkreis	19
Abbildung 5.8	Accumbales Projektionsneuron	20
Abbildung 5.9	Afferenzen und Efferenzen des Nucleus accumbens	22
Abbildung 5.10	Efferenzen und Afferenzen der Amygdala	24
Abbildung 5.11	Efferenzen und Afferenzen der VTA	28
Abbildung 5.12	Synthese und Abbau von Dopamin	31
Abbildung 5.13	Dopaminrezeptoren	32
Abbildung 5.14	Die „ <i>incentive salience</i> “ Hypothese	36
Abbildung 5.15	Affektive Gesichtsreaktionen	37
Abbildung 5.16	Vorhersagefehler	39
Abbildung 5.17	Synthese und Abbau von Glutamat	41
Abbildung 5.18	NMDA vermittelte Induktion von LTP	46
Abbildung 7.1	Neuronaler Schaltkreis des generellen PIT	81
Tabelle 5.1	Klassifizierung der Dopaminrezeptoren	33
Tabelle 5.2	Klassifizierung der Glutamatrezeptoren	42

4 Summary

The present study investigated neurochemical mechanisms involved in motivating and directing instrumental behavior. It is well known, that pavlovian stimuli previously paired with food can markedly elevate the rate of food-reinforced instrumental responding. This effect, termed Pavlovian-instrumental transfer (PIT), depends both on general activating and specific cueing properties of Pavlovian stimuli. PIT critically depends on the amygdala and nucleus accumbens and recent evidence suggest that the general activating properties of Pavlovian stimuli are mediated by mesoaccumbens dopamine systems; however little is known yet about the neurochemical basis of general PIT.

In experiment 1 we investigated the effects of a systemic blockade of NMDA and AMPA/KA receptors on general PIT and locomotor activity. In this and all subsequent experiments rats were trained to press a single lever for food, and the effect of a single Pavlovian stimulus previously associated with the same food on performance of that lever was measured in extinction. Results reveal that the competitive AMPA/KA receptor antagonist CNQX (1.5mg/kg i.p) did not alter the overall rate of lever pressing and left PIT intact, i.e. presentation of a Pavlovian stimulus significantly enhanced instrumental responding. Furthermore, CNQX did not affect locomotor activity in an open field. The non-competitive NMDA receptor antagonist dizocilpine (0.08 mg/kg i.p.) elevated the overall rate of lever pressing but did not affect PIT. In addition, dizocilpine increased locomotor activity in an open field. As an AMPA/KA and NMDA receptor blockade did not affect PIT, these data indicate that ionotropic glutamate receptors do not mediate the general activating effects of Pavlovian stimuli on instrumental behaviour. One possibility to explain these findings is that the general form of PIT as tested here critically involves the CeN modulating midbrain mesoaccumbens dopamine neurons by GABAergic projections.

In Experiment 2 we examined effects of transient VTA inactivation by direct microinjections of a mixture of the GABA_A and GABA_B receptor agonists, muscimol and baclofen. Results show that PIT was dose-dependently abolished by intra-VTA microinjections of muscimol/baclofen. These results provide the first evidence that the VTA mediates general PIT, probably as a part of a circuit comprising projections from CeN to midbrain dopaminergic neurons.

Experiment 3 examined the role of intra-Acb dopamine receptors in general PIT. Specifically, we investigated the effects of a selective dopamine D₁ and D₂ receptor blockade in the shell and core subregion of the Acb on general PIT. Results reveal that PIT was reduced by

microinjections of a selective dopamine D₁ receptor antagonist and, less pronounced, by microinjections of a selective dopamine D₂ receptor antagonist into the NAC core or shell, respectively. The present data demonstrates that a selective D₁ blockade and, less pronounced, a D₂ receptor blockade both in the AcbC and AcbSh reduced general PIT. These findings provide support to the notion that D₁ and D₂ receptor-mediated signaling in two major subregions of the Acb mediates the excitatory impact of appetitive Pavlovian stimuli on instrumental behavior.

Taken together, our findings suggest that motivating effects of pavlovian cues are mediated by mesoaccumbens dopamine systems including the VTA and both core and shell subregion of the Acb.

5 Einleitung

5.1 Lernen

Unter Lernen versteht man die Fähigkeit eines Organismus das Verhalten aufgrund erworbener Informationen aus der Umwelt so zu verändern, dass es optimal angepasst ist. Lernen ermöglicht somit eine flexible Reaktion auf Umweltreize und –veränderungen (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000). Allgemein unterscheidet man zwei wichtige Formen des Lernens, welche sich durch die Art der abgespeicherten Informationen voneinander unterscheiden (Abb. 5.1). Beim Menschen wird unter deklarativem (explizitem) Lernen das Abspeichern von Informationen über das eigene Leben sowie Sachwissen verstanden. Das Erlernen dieser Gedächtnisinhalte beruht auf bewussten kognitiven Prozessen und umfasst das Lernen von Ereignissen (episodisches Lernen) und Fakten (semantisches Lernen). Es ist zudem sehr flexibel und beinhaltet Assoziationen zwischen einer Vielzahl von Informationen (Kupfermann und Kandel, 1996). Das Abspeichern von nicht-deklarativen (impliziten oder prozeduralen) Gedächtnisinhalten hingegen ist eher reflexiver und automatischer Natur, und sowohl die Bildung als auch der Abruf sind nicht unbedingt an bewusste Aufmerksamkeit oder kognitive Vorgänge gebunden. Diese Form des Lernens erfolgt eher langsam, durch viele Wiederholungen, und äußert sich hauptsächlich durch eine verbesserte Leistung bei verschiedenen Aufgaben. Implizites Lernen umfasst den Erwerb von Fertigkeiten, Gewohnheiten und Konditionierungen und ist starrer und fester an die Bedingungen geknüpft unter welchen es erlernt wurde (Kupfermann und Kandel, 1996). Implizites Lernen kann assoziativ oder nicht-assoziativ erfolgen. Nicht-assoziatives Lernen bewirkt eine Verhaltensänderung als Reaktion auch eine einmaligen oder wiederholte Konfrontation mit einem bestimmten Reiz, welcher weder positive noch negative Konsequenzen hat. Im täglichen Leben sind zwei Formen des nicht-assoziativen Lernens weit verbreitet: die Habituation und die Sensitivierung. Unter Habituation wird eine Abnahme der Reaktionsstärke auf einen wiederholt auftretenden neutralen Reiz verstanden. So wird beispielsweise das Geräusch regelmäßig vorbeifahrender Züge mit der Zeit nicht mehr wahrgenommen. Ein wichtiges Merkmal der Habituation ist, dass sie reizspezifisch ist, und somit keinen Ermüdungsprozess, sondern einen eigenständigen Anpassungsprozeß darstellt. Obwohl regelmäßig vorbeifahrende Züge nicht mehr wahrgenommen werden, würde das laute Zuschlagen einer Tür trotzdem eine Schreckreaktion auslösen. Bei der Sensitivierung handelt es sich um eine Empfindlichkeitssteigerung und eine damit verbundene Verstärkung der

Reaktion auf besonders intensive oder schädliche Reize. So wird beispielsweise durch das wiederholte Einwirken eines Schmerzreizes die ausgelöste Vermeidungsreaktion immer stärker. Nach einer Sensitivierung führt auch ein schwacher Schmerzreiz, welcher zuvor keine Verhaltensänderung hervorgerufen hat, zu einer gesteigerten Reaktion. Darüber hinaus kann ein sensitivierender Reiz den Habituationseffekt aufheben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Dishabituation (Kupfermann und Kandel, 1996; Mazur, 2004). Ein assoziativer Lernvorgang umfasst die Bildung einer neuronalen Verknüpfung (Assoziation) zwischen einem neutralen Reiz und einem zweiten Stimulus, der entweder positive oder negative Auswirkungen auf den Organismus hat. Wenn der Organismus den zeitlichen Zusammenhang der beiden Reize erkannt hat, reagiert er bereits auf den ersten Reiz in der Erwartung des zweiten. Diese so genannte Konditionierung ist eine wichtige Form des assoziativen Lernens (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000), und kann in zwei besonders intensiv untersuchte Formen unterteilt werden: die klassische Konditionierung und die instrumentelle (operante) Konditionierung. In den nun folgenden Abschnitten werden diese beiden Formen des assoziativen Lernens genauer erläutert.

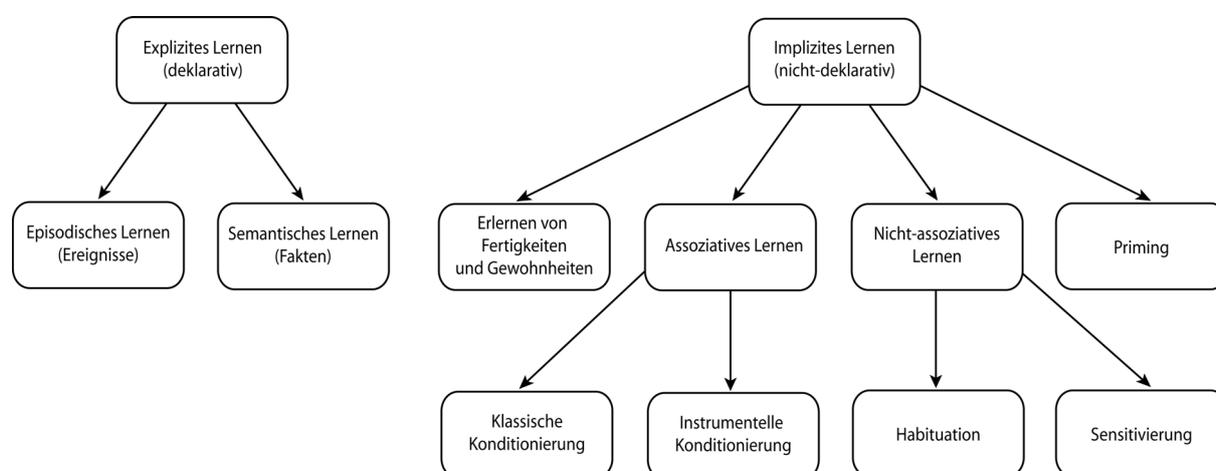


Abbildung 5.1 Verschiedene Formen des Lernens. Modifiziert nach Mazur (2004).

5.1.1 Klassische Konditionierung

Der Begriff der klassischen oder auch Pawlowschen Konditionierung wurde erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts von dem russischen Physiologen Iwan Petrowich Pawlow in die Lernforschung eingeführt. Ausschlaggebend war die Beobachtung, dass Hunde bereits beim Anblick von Nahrung oder des Experimentators mit vermehrtem Speichelfluss reagierten.

Grundsätzlich beruht die klassische Konditionierung auf der Paarung zweier Reize. Einer der beiden Reize, der konditionierte Stimulus (*conditioned stimulus*; CS), ist alleine nicht dazu in der Lage eine Reaktion hervorzurufen (z.B. Licht, Ton). Der zweite Reiz jedoch (z.B. Nahrung), der unkonditionierte Stimulus (*unconditioned stimulus*; US), kann alleine eine starke und zuverlässige Reaktion hervorrufen, die unkonditionierte Reaktion (*unconditioned reaction*; UR) (z.B. Speichelfluss beim Anblick von Nahrung). Wird nun der CS wiederholt zusammen mit dem US präsentiert, kann nach einigen Paarungen der CS alleine die Reaktion hervorrufen, welche normalerweise nur auf den US erfolgen würde. Diese erlernte Reaktion

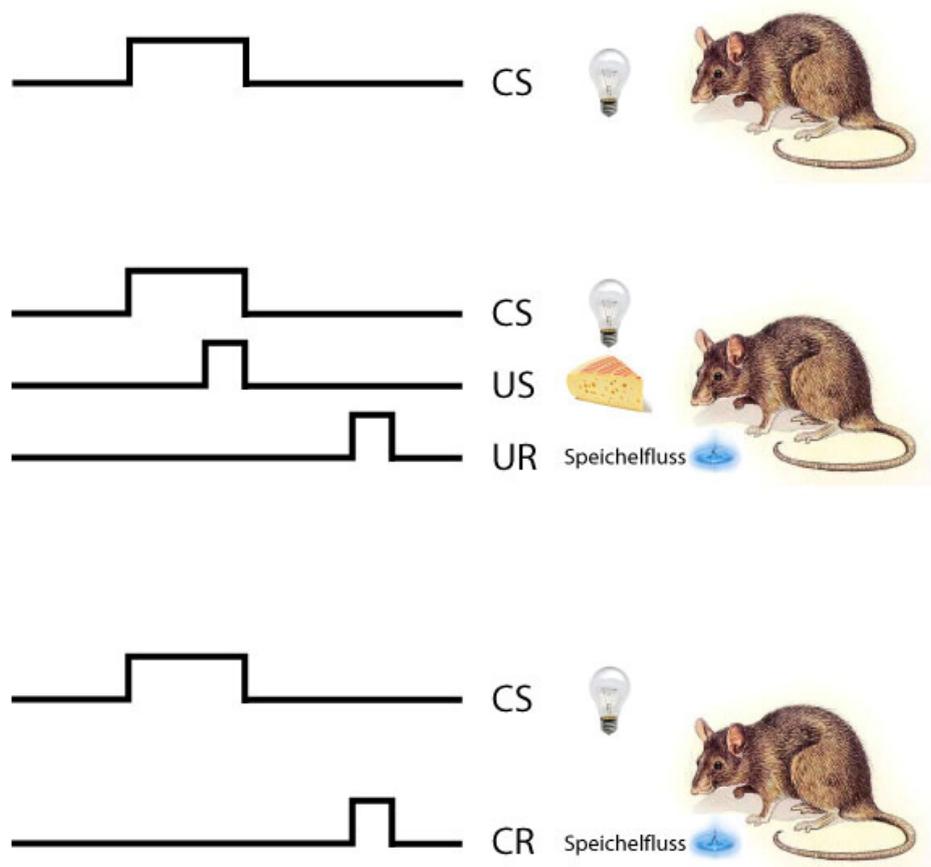


Abbildung 5.2 Klassische Konditionierung. Bei der klassischen Konditionierung wird eine Assoziation zwischen zwei Reizen ausgebildet. Zu Beginn ist der CS (konditionierter Stimulus) noch nicht dazu in der Lage eine Reaktion hervorzurufen. Doch nach mehrmaliger Paarung mit einem US (unkonditionierter Stimulus), welcher alleine eine UR (unkonditionierte Reaktion) bewirkt, kommt es zu einer Assoziation zwischen CS und UR. Dadurch kann nun der CS alleine eine Reaktion hervorrufen, welche nun als CR (konditionierte Reaktion) bezeichnet wird. Modifiziert nach Zigmond et al. 1999.

auf den konditionierten Stimulus wird auch konditionierte Reaktion (*conditioned reaction*; CR) genannt (Abb. 5.2). Durch die klassische Konditionierung wird also eine Assoziation zwischen dem CS und dem US hergestellt (Kupfermann und Kandel, 1996; Kandel et al., 2000; Mazur, 2004). Dadurch wird es neuen Reizen ermöglicht angeborenes Antwortverhalten zu kontrollieren, indem Ereignisse in der Umgebung besser vorhergesagt werden, und so eine optimale Anpassung des Verhaltens an verschiedene Situationen erfolgen kann. Besitzt der US belohnende Eigenschaften (z.B. Nahrung) erfolgt eine appetitive klassische Konditionierung, besitzt der US hingegen negative Eigenschaften (z.B. elektrischer Impuls) spricht man von einer aversiven klassischen Konditionierung. Typischerweise stellt die klassische Konditionierung ein Reiz-Belohnungs Lernen dar (*stimulus-outcome*; S-O), wobei die Assoziation zwischen CS und US unabhängig vom Verhalten des Tieres ist. Während einer klassischen Konditionierung bildet der CS verschiedene weitere assoziative Verknüpfungen aus (Cardinal et al., 2002a). Erstens können durch die CS-US Verknüpfung die für den US typischen Reaktionen hervorgerufen werden. Diese werden in zwei Klassen unterteilt: die vorbereitenden Reaktionen (*preparatory responses*), welche nicht spezifisch für den US sind (z.B. Aufmerksamkeitssteigerung, Orientierung zum Reiz) und die konsumatorischen Reaktionen (*consummatory responses*), welche für jeden US spezifisch sind (z.B. Speichelfluss bei Futtergabe, Lidschluss bei einem Luftstoß). Zweitens kann der CS mit einem emotionalen Zustand (*representation of affect*) assoziiert werden wie Furcht oder die Erwartung einer Belohnung. Drittens geht der CS Assoziationen mit den spezifischen sensorischen Eigenschaften (*specific sensory properties*) des US ein wie z.B. Erscheinungsbild, Geräusche, Geruch und Geschmack des US (Cardinal et al., 2002a; Cardinal et al., 2003a). Eine optimale klassische Konditionierung kann nur dann erfolgen, wenn eine hinreichende Kontiguität und Kontingenz zwischen CS und US gegeben ist. Die Kontiguität beschreibt dabei die optimale zeitliche Nähe zwischen CS und US. Das CS-US Intervall, welches zu einer optimalen Konditionierung führt, liegt meist im Sekundenbereich (200ms – 1000ms). Wird allerdings ein CS mit Übelkeit gepaart, kann der CS dem US auch um mehrere Stunden vorausgehen. Lange wurde die Kontiguität als der wesentliche Parameter der klassischen Konditionierung angesehen. Es zeigte sich allerdings, dass es für eine erfolgreiche Konditionierung auch auf die Kontingenz (Regelmäßigkeit) von CS und US ankommt. Als Kontingenz wird eine „Wenn-Dann“ Beziehung bezeichnet, welche die Wahrscheinlichkeit ausdrückt, mit welcher ein US dem CS folgt. Je sicherer also ein CS das Auftreten des US vorhersagt, desto höher ist die Kontingenz. Zufällig auftretende CS und US Paarungen besitzen nur eine geringe Kontingenz. Somit wird keine Assoziation zwischen

beiden Reizen ausgebildet, auch wenn CS und US dabei zufällig in optimaler zeitlicher Nähe zueinander auftreten, also die Kontiguität gegeben ist (Beggs et al., 1999; Mazur, 2004).

5.1.2 Instrumentelle Konditionierung

Die instrumentelle oder auch operante Konditionierung wurde erstmals 1911 von Edward Lee Thorndike beschrieben. Thorndikes ursprüngliches Interesse galt der Erforschung der tierischen Intelligenz. Für seine Untersuchungen setzte er Katzen in spezielle Käfige (*puzzle boxes*), und beobachtete wie lange die Katzen benötigten den Mechanismus zu aktivieren und sich aus dem Käfig zu befreien. Thorndike glaubte, dass die Katzen nach einigen Versuchsdurchläufen die Aufgaben nicht besser lösten weil sie den Mechanismus verstanden hatten, sondern weil sie nach dem Prinzip des Versuch-und-Irrtums lernten. Auf dieser Basis formulierte er das „Gesetz des Effektes“ (*law of effect*), welches folgendes besagt: folgt in der Gegenwart eines Reizes (z.B. einer bestimmten Situation) einer Reaktion eine positive Konsequenz (Belohnung), wird die Assoziation zwischen dem Reiz und der Reaktion verstärkt. Folgt der Reaktion allerdings eine negative Konsequenz (Bestrafung), wird die Assoziation zwischen Reiz und Reaktion abgeschwächt. Thorndikes „Gesetz des Effektes“ beinhaltet also Reiz-Reaktions (*stimulus-response; S-R*) Lernen, wobei die Konsequenz der Reaktion (Belohnung, Bestrafung) kein Bestandteil der Assoziation darstellt. Sie dient lediglich dazu, die Reiz-Reaktions Verknüpfung zu stärken oder zu schwächen (Mazur, 2004; Domjan, 2010). In diesen Überlegungen von Thorndike wurzelte die Lerntheorie des amerikanischen Psychologen und Verhaltensforschers Burrhus Frederic Skinner, welcher 1930 den Begriff der operanten Konditionierung prägte. Skinner nahm an, dass ein Verhalten umso häufiger ausgeführt wird je konsequenter es verstärkt (belohnt) wird, und dass eine Belohnung am effektivsten wirkt, wenn sie unmittelbar auf das gewünschte Verhalten folgt. Skinner erweiterte damit das Reiz-Reaktions Modell von Thorndike, bei dem lediglich vorausgehende Reize eine bestimmte Reaktion auslösen, und postulierte, dass das Verhalten in Verbindung mit dem ihm nachfolgenden Ereignissen (z.B. Belohnung) steht, also eine Handlungs-Ergebnis Beziehung (*action-outcome; A-O*) gebildet wird (Mazur, 2004; Domjan, 2010) (Abb. 5.3). Die instrumentelle Konditionierung ist deutlich motivationsabhängig, denn ein hungriges Tier ist bereit wesentlich intensiver für eine Futterbelohnung zu arbeiten als ein sattes. Ein solches, durch Motivation gesteuertes, instrumentelles Verhalten wird auch als zielgerichtetes Verhalten bezeichnet, wenn zwei Kriterien erfüllt sind: (1) das Wissen um die instrumentelle Kontingenz zwischen einer Handlung und dem daraus resultierenden Ergebnis (*A-O contingency*) und (2) das Ergebnis muss ein erstrebenswertes Ziel sein (Dickinson und

Balleine, 1994; Cardinal et al., 2002a). Die meisten Handlungen sind „gewollt“ und damit zielgerichtet. Allerdings kann durch ausgedehntes Training ein zielgerichtetes Verhalten in eine durch Reiz-Reaktion gesteuerte Gewohnheit (*S-R habit*) überführt werden. In dieser Assoziation ist das aus der Handlung resultierende Ergebnis nicht mehr repräsentiert. Somit wird auch das Verhalten durch eine veränderte Wertigkeit des Ergebnisses nicht beeinflusst; es ist habituell und unflexibel geworden.

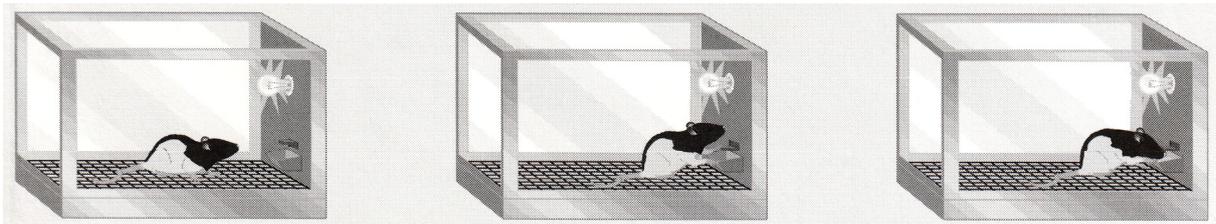


Abbildung 5.3 Instrumentelle Konditionierung. Bei der instrumentellen Konditionierung wird eine Assoziation zwischen einer Handlung und einem Ergebnis gebildet. Nur durch eigenes aktives Verhalten (z.B. Drücken des Hebels) kann ein Ergebnis (z.B. Futterbelohnung) erzielt werden. Daher wird die instrumentelle Konditionierung auch als *action-outcome* Lernen bezeichnet. Modifiziert nach Domjan (2010).

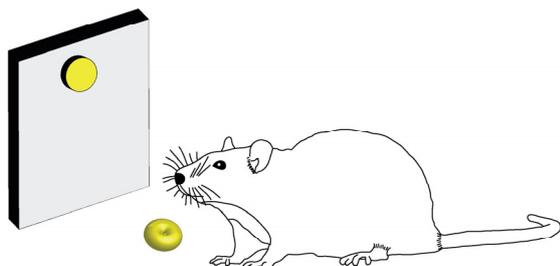
5.1.3 Klassisch-Instrumenteller Transfer

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts glaubte man, dass sowohl die klassische Konditionierung als auch die instrumentelle Konditionierung einem gemeinsamen Lernprinzip unterliegen. Die beiden polnischen Biologen Jerzy Konorski und Stefan Miller postulierten 1928 als erste, dass beiden Lernmodellen auch unterschiedliche assoziative Prozesse zugrunde liegen. Sie glaubten, dass ein instrumentelles Verhalten nicht mit Hilfe einer klassischen Konditionierung erlernt werden kann, dass jedoch klassisch konditionierte Reaktionen instrumentelles Handeln beeinflussen können, und begründeten die „*two-process learning theory*“. Sie griffen damit den amerikanischen Psychologen Orval Hobart Mowrer (1947) und Kenneth Wartinbee Spence (1956) voraus, welche die Theorie vertraten, dass klassisch erlernte Reaktionen einen internen motivationalen Status hervorbringt, welcher wiederum Einfluss auf das instrumentelle Verhalten nehmen kann (aus Rescorla und Solomon, 1967). William Kaye Estes (1948) zeigte als erster, dass ein CS, welcher zuvor mit einer Futtergabe gepaart wurde, eine instrumentelle Handlung verstärkt, welche ebenfalls zuvor mit einer Futtergabe belohnt wurde. Dieser Einfluss von klassisch konditionierten Reizen auf die Intensität von instrumentellem Verhalten wird heute als Klassisch-Instrumenteller Transfer (*pavlovian to*

instrumental transfer; PIT) bezeichnet und beruht vermutlich auf zwei grundlegenden Mechanismen (Cardinal et al., 2002a) (Abb. 5.4). Zum einen geht von einem CS ein genereller motivierender Effekt aus. Wenn also ein CS eine Belohnung voraussagt, welche

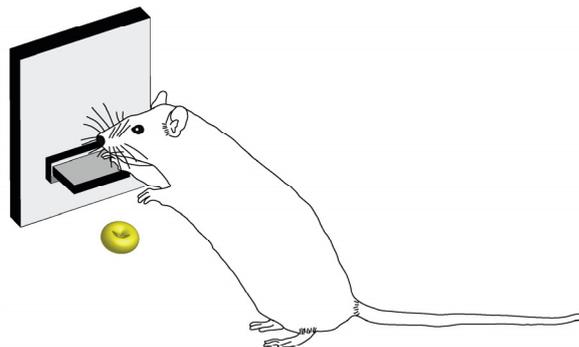
1. Phase

Klassische Konditionierung



2. Phase

Instrumentelle Konditionierung



3. Phase

Klassisch-Instrumenteller Transfer

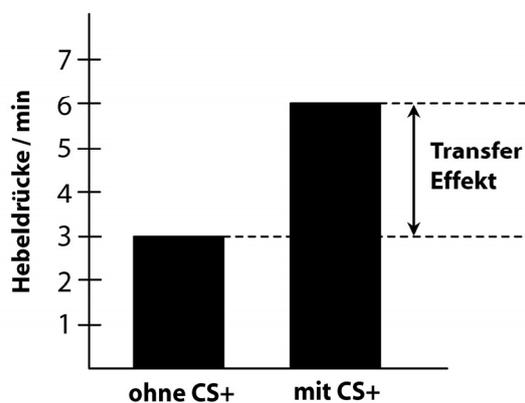
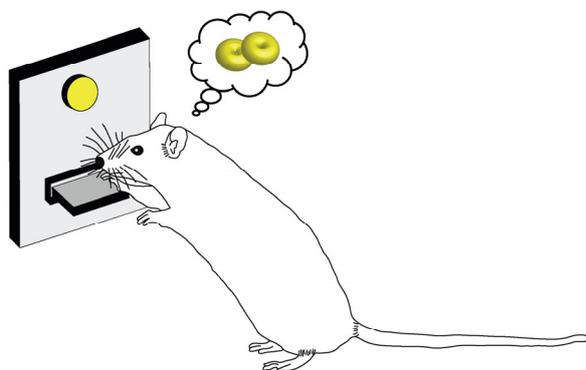


Abbildung 5.4 Klassisch-Instrumenteller Transfer. Der Klassisch-Instrumentelle Transfer wird üblicherweise in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase besteht aus einer klassischen Konditionierung, mittels derer eine Assoziation zwischen einem CS (Licht) und der darauffolgenden Belohnung (Futterpellet) gebildet wird. In der zweiten Phase erfolgt eine instrumentelle Konditionierung und damit die Assoziation zwischen einer Handlung (Hebeldruck) und dem daraus resultierenden Ergebnis (Futterpellet). In der abschließenden dritten Phase (Testphase) wird nun der Einfluss des klassisch konditionierten CS auf die instrumentelle Handlung getestet. In dieser Phase kann nun beobachtet werden, dass die Tiere in Abwesenheit des CS etwa drei Hebeldrücke pro Minute ausführen, wohingegen eine Präsentation des CS die Hebeldruckrate auf sechs Hebeldrücke pro Minute ansteigen lässt. Die Differenz zwischen diesen beiden Werten wird als Transfereffekt bezeichnet, da diese Steigerung alleine auf den motivationssteigernden Einfluss des klassisch konditionierten CS auf die instrumentelle Handlung zurückzuführen ist.

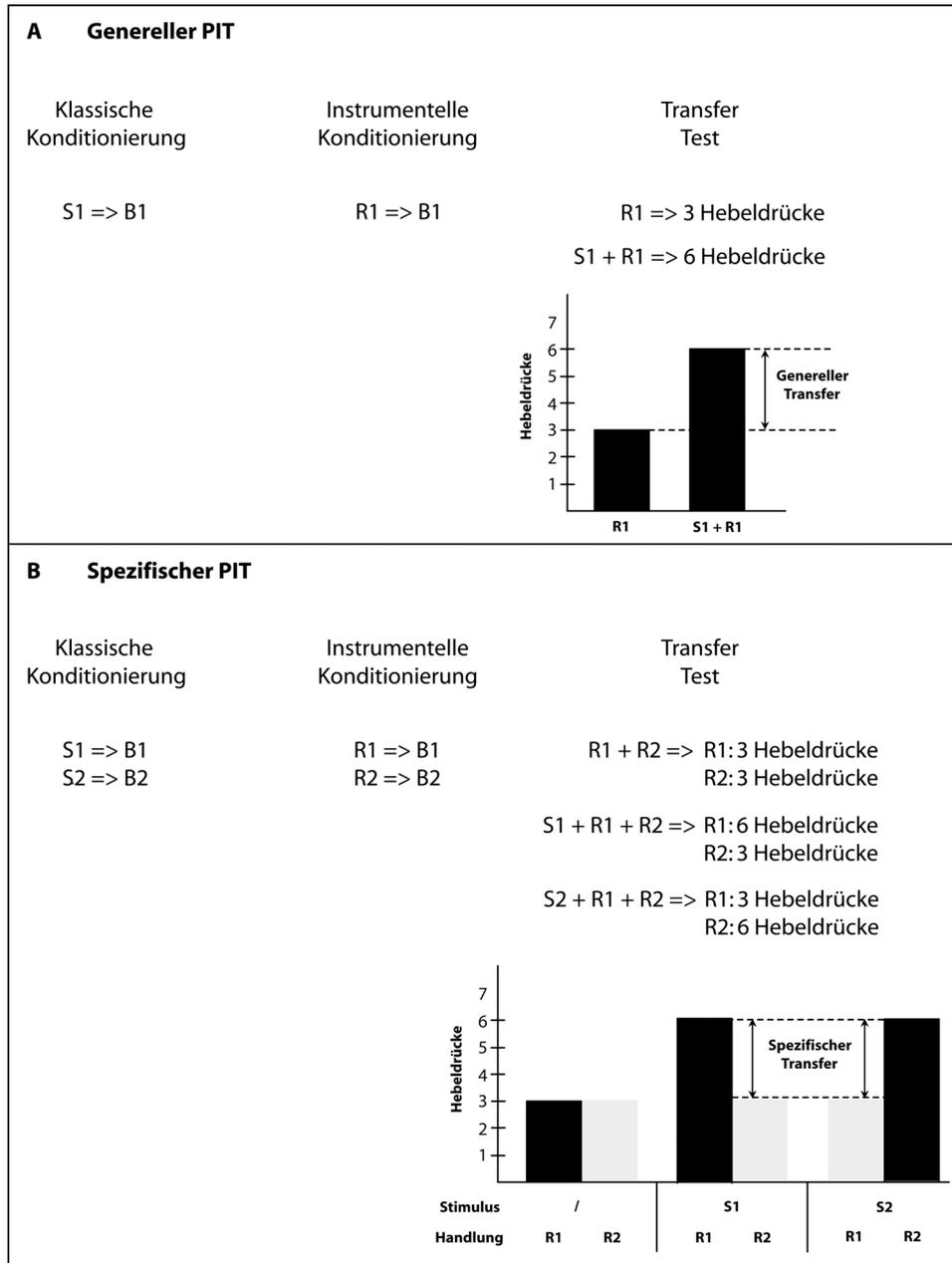


Abbildung 5.5 Übersicht über den generellen und spezifischen PIT. (A) Beim generellen PIT wird während der klassischen Konditionierung die Assoziation zwischen einem Stimulus (S1: Ton) und einer Belohnung (B1: Futterpellet) hergestellt. In der anschließenden instrumentellen Konditionierung wird das Ausführen der instrumentellen Handlung (R1: rechter Hebel) mit derselben Belohnung (B1) belohnt. Im abschließenden Transfer Test kann durch die Präsentation des CS (S1) eine Erhöhung der Hebeldruckrate von 3 auf 6 Hebeldrücke beobachtet werden. **(B)** Der spezifische PIT beruht auf der Verwendung von zwei Stimuli (S1: Ton, S2: Rauschen), zwei Belohnungen (B1: Futterpellet, B2: Zuckerwasser) und zwei instrumentellen Handlungen (R1: rechter Hebel, R2: linker Hebel). Während des Transfer Tests führt die Präsentation von Stimulus S1 zu einer Erhöhung der Hebeldruckrate des rechten Hebels (R1), da beide mit derselben Belohnung (B1) assoziiert sind. Eine stärkere Betätigung des linken Hebels (R2) erfolgt ausschließlich durch die Präsentation von S2, da auch hier eine Assoziation mit derselben Belohnung (B2) vorliegt.

dem Tier in seinem momentanen motivationalen Zustand erstrebenswert erscheint, dann kann das instrumentelle Antwortverhalten erhöht sein, auch wenn das Tier für eine völlig andere Belohnung arbeitet (Balleine, 1994). So kann beispielsweise, bei einem durstigen Tier, ein CS welcher für die Gabe von Zuckerlösung steht einerseits die instrumentelle Handlungsbereitschaft für Zuckerwasser erhöhen, aber auch die Handlungsbereitschaft für Futterpellets (Dickinson und Dawson, 1987). Dieser Effekt wird als konditionierte Motivation (*conditioned motivation*) oder auch als eine generelle Steigerung der Motivation (*general motivational arousal*) bezeichnet (Rescorla und Solomon, 1967; Corbit und Balleine, 2005). Darüber hinaus kann ein CS auch selektiv wirken, indem er die Erinnerungen an die spezifischen sensorischen Eigenschaften (*sensory-specific properties*) der Belohnung aktiviert und so gezielt die instrumentelle Handlung verstärkt, welche für die gleiche Belohnung wie der CS selbst steht. Ein CS, welcher also den Erhalt von Zuckerwasser vorhersagt, steigert das Antwortverhalten für Zuckerwasser deutlich, nicht jedoch das Antwortverhalten für Futterpellets (Cardinal et al., 2002a). Obwohl auch ein spezifischer CS generelle appetitive Wirkungen hat, erhöht er nicht das instrumentelle Antwortverhalten für die jeweils andere Belohnung. Denn bei einem selektiv wirkenden CS sind die spezifischen Informationen, welche durch den CS übermittelt werden, stärker motivierend als die generellen motivierenden Eigenschaften. Manchmal werden sogar andere Antwortverhalten unterdrückt, welche nicht für dieselbe Belohnung stehen. Allerdings ist dieser inhibitorische Einfluss auf das Antwortverhalten noch kaum erforscht.

Basierend auf den allgemein motivierenden und den spezifisch aktivierenden Effekten, welche von einem CS ausgehen können, haben Corbit und Balleine (2005) die Existenz von zwei unterschiedlichen Formen des PIT postuliert. Durch spezielle Trainingsprozeduren kann nun entweder die eine oder die andere Form hervorgebracht werden. Dabei beruht die generelle Form des PIT auf einer generellen Motivationssteigerung durch den appetitiven CS, und wird durch eine Trainingsprozedur hervorgebracht in der nur eine einzige instrumentelle Handlung (z.B. drücken des rechten Hebels) möglich ist. Im Gegensatz dazu beruht die spezifische Form des PIT auf den durch den CS ausgelösten spezifischen sensorischen Eigenschaften der Belohnung, und wird durch eine Trainingsprozedur begünstigt in der mehrere instrumentelle Handlungen (z.B. drücken des rechten oder linken Hebels) möglich sind, also eine Wahlsituation besteht (Abb. 5.5).

5.2 Motivation

Unter Motivation (lat. *motivum* = Beweggrund) versteht man das Verlangen ein Verhalten in Gang zu setzen bzw. es aufrecht zu erhalten, die Richtung oder Intensität des Verhaltens zu ändern und das Wählen unter verschiedenen Möglichkeiten zu leiten (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000). Verschiedene Motivationszustände dienen dem Überleben des Individuums. Sie ermöglichen zum einen eine Anpassungen an externe Reize wie beispielsweise eine drohende Gefahr oder ein guter Futterplatz, aber auch an körperinterne Zustände wie Hunger oder Durst (Robbins und Everitt, 1999b; Berridge, 2004). Aber warum entscheiden wir uns zu verschiedenen Zeiten verschiedene Dinge zu tun, oder warum suchen wir bestimmte Dinge zu bestimmten Zeiten auf? Um diese Fragen genauer zu verstehen wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte verschiedene Motivationskonzepte entwickelt. Eines der Ältesten ist das Modell des homöostatischen Antriebs (*homeostatic drive*). Dabei wird, vergleichbar mit einem Zimmerthermostat, der aktuelle physiologische Zustand fortlaufend mit dem erwünschten Sollwert verglichen, und bei Abweichungen ein Korrekturmechanismus aktiviert. Durch diesen Regelkreis wird beispielsweise infolge von Glukosemangel im Blut Hunger ausgelöst, was wiederum die Motivation zu Essen erhöht, und so der Istwert wieder eingestellt wird. Auch das hydraulische Konzept zur Steuerung der Motivation (*hydraulic model of motivational drive*) von Konrad Lorenz reguliert das Verhalten annähernd homöostatisch (Lorenz und Leyhausen, 1973) (Abb. 5.6). Allerdings können diese Modelle die Steuerung von Motivation nicht hinreichend erklären, denn bei Hunden beispielsweise reduzierte die intravenöse Applikation einer hochkalorischen Lösung wieder Erwarten nicht das Fressverhalten, obwohl der homöostatische Antrieb zu Essen dadurch verringert wurde (Turner et al., 1975). Daher wurden alternative Motivationskonzepte entwickelt wie z. B. die reizgesteuerte Motivation (*incentive¹ motivation theorie*). Die Psychologen Robert Bolles, Dalbir Bindra und Frederick Toates entwickelten gemeinsam ein sehr nützliches Motivationskonzept, welches später von Anthony Dickinson und Bernard Balleine aufgenommen und weiterentwickelt wurde. Bolles war der Auffassung dass Motivation nicht durch eine Veränderung des Antriebs bedingt ist, sondern durch eine erlernte und reizgesteuerte Erwartungshaltung (*incentive expectancy*) hervorgerufen wird. Dabei löst ein CS die Erwartung einer bestimmten hedonischen Belohnung (*hedonic² reward*) aus. Bindra erweiterte Bolles Konzept indem er postulierte dass der CS nicht nur die Erwartung einer hedonischen Belohnung auslöst, sondern auch denselben motivationalen Zustand wie die

¹ engl. incentive = Anreiz, aus dem lat. *incentivus* = anregend, reizend

² engl. hedonic = Lust, aus dem griech. *hedone* = Lust, Freude abgeleitet

Belohnung selber hervorruft. Darüber hinaus war Toates der Meinung, dass physiologische Antriebszustände die Motivation hauptsächlich dadurch beeinflussen, indem sie die hedonische Wirkung (*hedonic value*) und den Anreizwert (*incentive value*) der Belohnung und des belohnungsprädiktiven Stimulus modulieren. Durch dieses Zusammenwirken von reizgesteuerten Erwartungen und intrinsischen Antriebszuständen kann zielgerichtetes Verhalten flexibel gesteuert werden (Berridge, 2001, 2004).

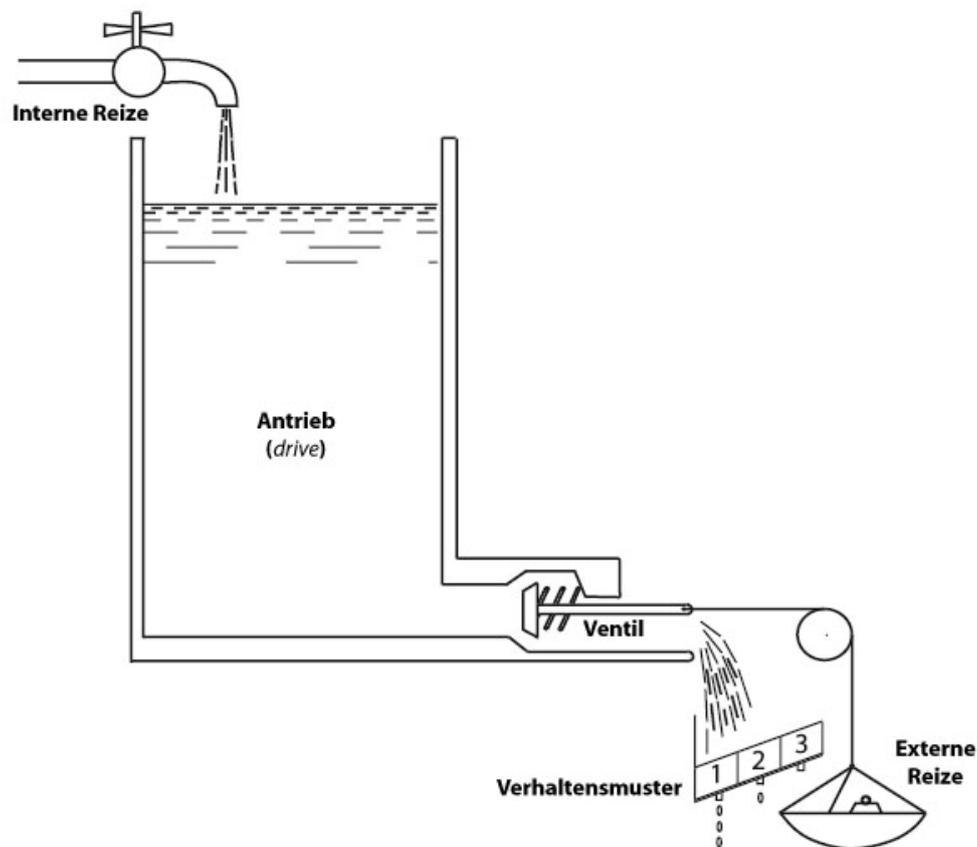


Abbildung 5.6 Hydraulisches Modell zur Motivationssteuerung. Interne physiologische Signale wie die Sekretion von Hormonen, Aktivierung von Rezeptoren oder neuronale Aktivität akkumulieren sich in einem Antriebs-Reservoir. Steigt der interne Antrieb erhöht sich auch der Druck auf das Abflussventil. Wird der interne Druck zu groß öffnet sich das Ventil und der überschüssige Druck wird als ein Verhaltensmuster abgebaut, wobei das Verhaltensmuster 1 als erstes ausgelöst wird. Je größer der Druck, und damit der ausströmende Antrieb, ist desto größer ist die Wahrscheinlichkeit dass die Verhaltensmuster 2 und 3 ebenfalls ausgelöst werden. Zusätzlich könne externe Reize die Öffnung des Ventils beeinflussen. In Lorenz Model interagiert also interne Antriebsstärke mit externen Reizen um motiviertes Verhalten zu erzeugen. Modifiziert nach Lorenz und Leyhausen (1973).

5.3 Der Motivationsschaltkreis

Mitte der 50er beobachteten James Olds und Peter Milner, dass Ratten schnell lernten einen Hebel zu bedienen, wenn jedem Hebeldruck eine elektrische Reizung bestimmter Hirnregionen folgte (Olds und Milner, 1954). Die Tiere waren sogar bereit den Hebel bis zur völligen Erschöpfung zu bedienen, und vernachlässigten dabei andere Bedürfnisse wie Hunger oder Durst. Eine solche intrakraniale Selbstreizung (*intracranial self-stimulation; ICSS*) scheint eine belohnende Wirkung zu haben, ähnlich wie natürlich vorkommende verstärkende Reize in einem bestimmten Antriebszustand (beispielsweise Nahrung in einem hungrigen Zustand). Durch die Zusammenfassung aller Hirnregionen, welche die intrakraniale Selbstreizung vermitteln, wurde erstmals ein neuronales Netzwerk beschrieben, welches der Vermittlung von motiviertem Verhalten dient. In der Literatur werden für dieses Netzwerk

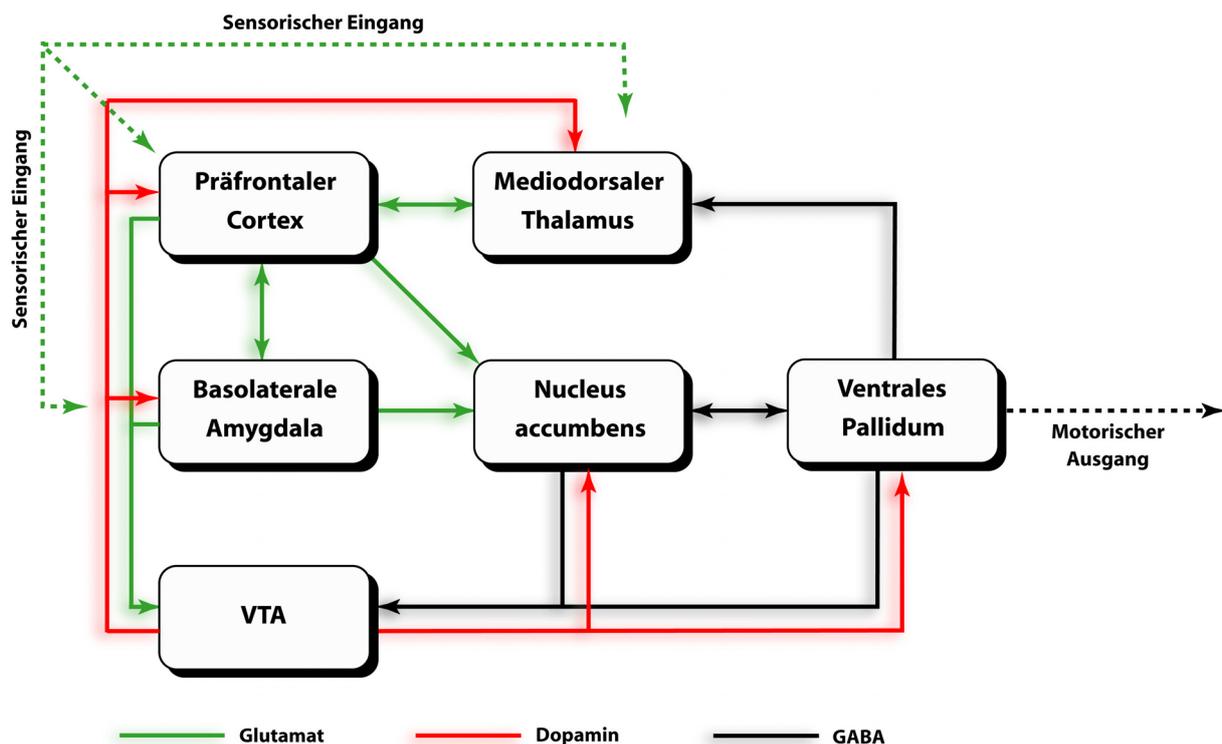


Abbildung 5.7 Motivationsschaltkreis. Der Motivationsschaltkreis ist an der Wahrnehmung von Belohnungen und Initiation adaptiver, zielgerichteter Verhaltensweisen beteiligt. Der Nucleus accumbens erhält sowohl glutamaterge, dopaminerge als auch GABAerge Efferenzen und nimmt daher innerhalb dieses Netzwerkes, als Schnittstelle zwischen limbischen und motorischen Strukturen, eine zentrale Rolle ein. Als Teil der Basalganglien stellt das ventrale Pallidum die primäre Ausgangsstruktur zu motorischen Systemen dar. Modifiziert nach Kalivas und Nakamura (1999).

verschiedenste Bezeichnungen verwendet: limbisch corticostriatale Funktionsschleife (*limbic corticostriatal loop*) (Cardinal et al., 2002a), limbisch striatal-pallidaler Schaltkreis (*limbic striatal-pallidal circuitry*) (Robbins und Everitt, 1996), Belohnungssystem (*reward system*) oder Motivationsschaltkreis (*motive circuit*) (Kalivas und Nakamura, 1999), je nachdem ob funktionelle oder strukturelle Merkmale betont werden sollen. Im folgenden wird der Begriff Motivationsschaltkreis von Kalivas und Kollegen (1999) verwendet, um die funktionellen Merkmale dieses neuronalen Netzwerkes stärker hervorzuheben. Die wichtigsten Strukturen des Motivationsschaltkreises sind der Nucleus accumbens (Acb) und die Amygdala im Vorderhirn, das ventrale tegmentale Areal (VTA) im Mittelhirn, sowie der präfrontale Cortex (PFC), der mediodorsale Thalamus und das ventrale Pallidum (VP) (Abb. 5.7).

5.3.1 Nucleus Accumbens

Der Acb ist Teil des ventralen Striatums welches zu über 95% aus mittelgroßen dornentragenden Projektionsneuronen (*medium sized spiny neurons; MSN*) besteht (Abb. 5.8). Diese können wiederum in zwei Kategorien unterteilt werden: die erste Gruppe enthält den

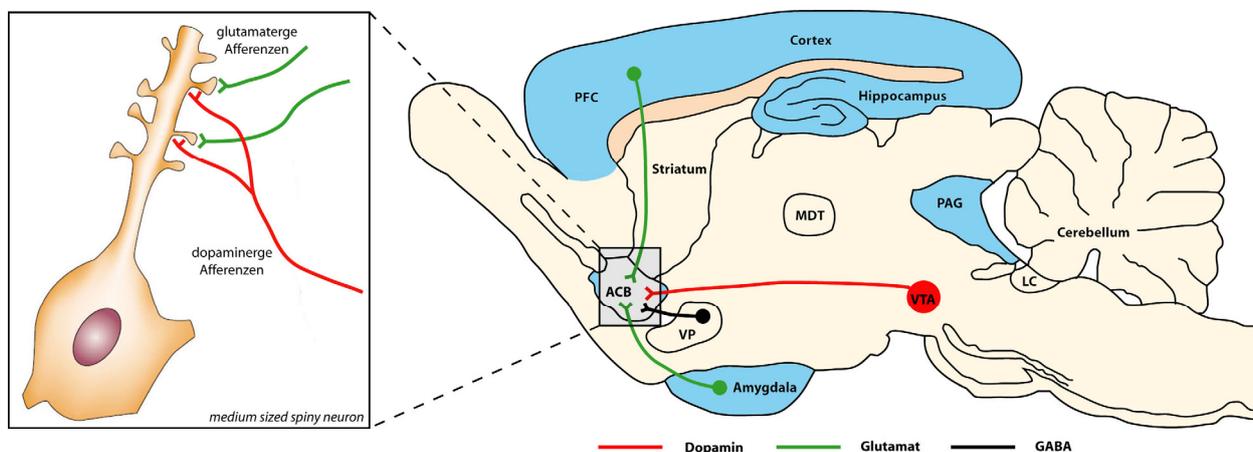


Abbildung 5.8 Accumbales Projektionsneuron. Striatale *medium sized spiny neurons* (MSN) besitzen in alle Richtungen ausgedehnte, weit verzweigte Dendritenbäume. Glutamaterge Afferenzen aus dem PFC bilden Synapsen auf den Köpfchen der dendritischen Dornen (*spines*) aus, wohingegen die dopaminergen Axone aus der VTA vermehrt am Hals der Dornen enden. Durch diese Co-Lokalisation sind die accumbalen Projektionsneurone ein Hauptintegrationsort für den modulatorischen Einfluss von Dopamin auf glutamaterge corticale Afferenzen. Modifiziert nach Hyman und Malenka (2001).

PFC, Präfrontaler Cortex; ACB, Nucleus accumbens; VP, ventrales Pallidum; MDT, Mediodorsaler Thalamus; PAG, Zentrales Höhlengrau; VTA, Ventrales tegmentales Areal; LC, Locus coeruleus.

Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und die Neuropeptide Substanz P und Dynorphin als Cotransmitter, während die zweite Gruppe den Neurotransmitter GABA und Enkephalin als Cotransmitter exprimiert. Die übrigen Neurone des ventralen Striatums bestehen aus cholinergen und einer Reihe von GABAergen Interneuronen. Der glutamaterge Eingang des Acb stammt hauptsächlich aus corticalen Regionen wie dem PFC, dem anterioren Cingulum (ACC) und parahippocampalen Arealen (Subiculum und entorhinaler Cortex), aber auch aus der Amygdala und dem Hippocampus. Inhibitorische GABAerge Afferenzen des Acb haben ihren Ursprung im VP und dopaminerge Signale stammen aus der VTA und der Substantia nigra pars compacta (SNc). Serotonerge Projektionsfasern erreichen den Acb aus dem dorsalen Teil des Raphe Kerns. Die Efferenzen des Acb erreichen das VP, den Globus pallidus (GP), die VTA und die SNc (Heimer et al., 1991; Setlow, 1997; Groenewegen und Trimble, 2007) (Abb. 5.9). Unter allen Hirnarealen, welche an der Verarbeitung von Motivation beteiligt sind, nimmt der Acb eine Sonderstellung ein, da er einerseits starke Afferenzen aus Bereichen des limbischen Systems wie zum Beispiel dem Hippocampus oder der Amygdala erhält. Andererseits sendet er Efferenzen zu motorischen Strukturen wie dem VP oder der Substantia nigra (SN). Damit stellt der Acb eine wichtige neurale Schnittstelle zwischen motivationalen bzw. emotionalen Hirnarealen und motorischen Kerngebieten dar, weshalb er auch als limbisch-motorische Schnittstelle (*limbic-motor interface*) bezeichnet wird (Mogenson et al., 1980; Groenewegen et al., 1996). Aufgrund von anatomischen und histochemischen Gesichtspunkten, sowie der unterschiedlichen Organisation der afferenten und efferenten Verbindungen, kann der Acb zusätzlich in einen inneren Kernbereich (*core; AcbC*) und eine aussenliegende Schale (*shell; AcbSh*) untergliedert werden (Zahm und Brog, 1992; Cardinal et al., 2002a; Groenewegen und Trimble, 2007). Dabei entspricht der AcbC mehr dem dorsalen Striatum, welches hauptsächlich zum VP projiziert. Die AcbSh hingegen innerviert auch subcorticale Areale wie den lateralen Hypothalamus (LH) oder das zentrale Höhlengrau (PAG), und ist somit auch an der Kontrolle von ungelerntem Verhalten beteiligt (Cardinal et al., 2002a).

Der Acb übernimmt eine zentrale Rolle bei der Modulation von ungelernten Verhaltensweisen (z.B. Nahrungsaufnahme, defensives Verhalten und Fortbewegung), erlernten Verhaltensweisen sowie von instrumentellem Verhalten, wobei eine funktionelle Trennung zwischen AcbC und AcbSh vorgenommen werden kann. Ganz generell gilt, dass der AcbC hauptsächlich den Einfluss von konditionierten Reizen auf das Verhalten moduliert, während der AcbSh vermehrt auf unkonditionierte Reize anspricht und ungelerntes Verhalten steuert. Bei der Vermittlung von motivierenden Effekten natürlicher Belohnungen oder auch

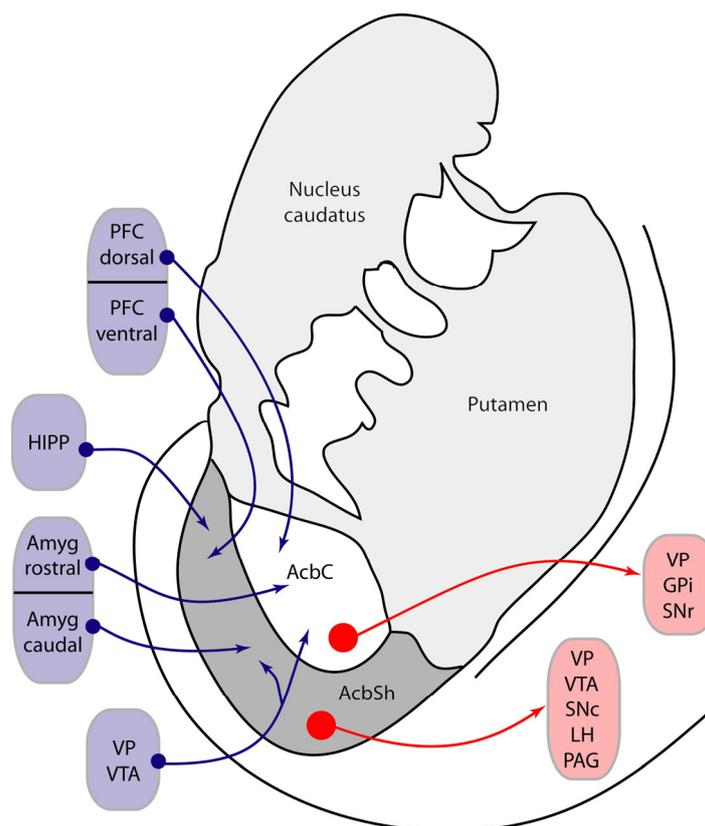


Abbildung 5.9 Efferenzen und Afferenzen des Nucleus accumbens. Schematische Übersichtszeichnung am Beispiel eines menschlichen Striatums. Modifiziert nach Groenewegen und Trimble (2007)
 AcbC, Nucleus accumbens core; AcbSh, Nucleus accumbens shell; Amyg, Amygdala; GPi, Globus Pallidus interna; HIPP, Hippocampus; LH, Lateraler Hypothalamus; PAG, Zentrales Höhlengrau; PFC, Präfrontaler Cortex; SNc, Substantia nigra pars compacta; SNr, Substantia nigra pars reticulata; VP, Ventrales Pallidum; VTA, Ventrales tegmentales Areal.

Suchtmitteln kommt besonders der dopaminergen Innervation des Acb eine entscheidende Rolle zu (Berridge und Robinson, 1998; Cardinal et al., 2002a), weshalb sich die folgenden Ausführungen hauptsächlich auf den dopaminergen Eingang des Acb bezieht.

Der Acb ist im Besonderen daran beteiligt die Fähigkeit von CSs das zielgerichtete Verhalten zu verstärken und zu lenken zu vermitteln. Beispielsweise kann ein CS eine motorische Annäherung an die Quelle des CS (z.B. eine Lampe) auslösen (*autoshaping*). Sowohl bei der Akquisition als auch bei der Expression dieses Verhaltens übernimmt besonders die dopaminerge Innervation des AcbC eine zentrale Rolle (Parkinson et al., 2000c; Cardinal et al., 2002b; Parkinson et al., 2002). Ein appetitiver CS kann aber auch die Bereitschaft, für die Präsentation dieses CS zu arbeiten, auslösen (*conditioned reinforcement; CRf*). Für die Akquisition dieses Verhaltens ist der Acb nicht von Bedeutung, vielmehr ist er für die Modulation dieses Verhaltens verantwortlich, welche jedoch hauptsächlich auf der Integrität

der AcbSh beruht (Taylor und Robbins, 1986; Parkinson et al., 1999). Des Weiteren kann die Präsentation eines CS instrumentelles Handeln verstärken (PIT; siehe 5.1.3 Klassisch-Instrumenteller Transfer). Dieses Phänomen wird ebenfalls durch den Acb vermittelt, wobei die konkrete Beteiligung von AcbC und AcbSh noch nicht hinreichend geklärt ist. Zusätzlich vermittelt der Acb die Fähigkeit eine Verzögerung der Belohnungsgabe (*delayed rewards*) zu tolerieren. Dabei wird wahrscheinlich vor allem im AcbC der Wert einer Belohnung repräsentiert, und dadurch auch die Motivation auf diese Belohnung zu warten, über einen gewissen Zeitraum aufrecht erhalten (Cardinal et al., 2001). Zahlreiche Hinweise legen nahe, dass der Acb nicht an der Steuerung von zielgerichtetem Verhalten beteiligt ist, da eine Läsion des Acb weder die Sensitivität gegenüber einer Veränderung der instrumentelle Kontingenz, noch gegenüber einer Veränderung in der Wertigkeit der Belohnung beeinträchtigt (Balleine und Killcross, 1994; Corbit et al., 2001). Durch eine Applikation von Dopaminrezeptor Antagonisten in den Acb bleibt das zielgerichtete Verhalten ebenfalls unbeeinträchtigt (Dickinson et al., 2000). Der Acb ist vielmehr für die Generierung von motiviertem Verhalten zuständig, da eine Läsion der dopaminergen Neurone des Acb zu einer verminderten Hebeldruckrate führt, welche nicht auf eine generelle motorische Beeinträchtigung zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf einen Verlust des motivationalen Antriebs (Aberman und Salamone, 1999). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten Giertler und Kollegen (2003; 2004) zeigen, dass durch eine direkte Applikation von Amphetamin in den Acb das zielgerichtete Verhalten intakt bleibt, und lediglich die Intensität bzw. Motivation mit welcher dieses Verhalten ausgeführt wird erhöht ist.

5.3.2 Amygdala

Die Amygdala ist eine heterogene Ansammlung von Kerngebieten (Nuclei; aus lat. *nucleus* = Kern) im Schläfenlappen (Temporallappen; aus lat. *tempus* = Schläfe) des Vorderhirns. Diese verschiedenen Nuclei unterscheiden sich aufgrund ihrer zyto- und chemoarchitektonischen Eigenschaften sowie ihrer individuellen Konnektivität (Pitkanen et al., 1997). Ganz allgemein können sie in zwei Gruppen unterteilt werden, die sich bezüglich ihrer internen Schaltkreise unterscheiden: die erste Gruppe gleicht in ihrem Aufbau eher dem Cortex und beinhaltet laterale, basolaterale und basomediale Nuclei, welche gemeinsam auch als basolaterale Amygdala (BLA) bezeichnet werden. Die zweite Gruppe hingegen weist verstärkt striatale Merkmale auf und umfasst den medialen und zentralen Nucleus (Zentralkern der Amygdala; CeN) (Cardinal et al., 2002a; Balleine und Killcross, 2006). Ergebnisse anatomischer

Untersuchungen zeigen, dass der corticale Teil der Amygdala hauptsächlich über glutamaterge Projektionsfasern verfügt, wohingegen der striatale Teil überwiegend GABAerge Fasern aufweist (Swanson und Petrovich, 1998). Studien über die Funktionalität der Amygdala befassen sich jedoch hauptsächlich mit den Kerngebieten der BLA und des CeN, da diese Nuclei in besonderem Maße an der Verarbeitung von Emotion und Motivation beteiligt sind. Die afferenten Verbindungen dieser Nuclei sind komplex und stammen aus verschiedensten Quellen. Die BLA erhält Projektionen vom Thalamus und verschiedenen Cortexarealen wie dem auditorischen, somatosensorischen, visuellen und piriformen Cortex. Des Weiteren besitzt die BLA reziproke Verbindungen mit polysensorischen Arealen wie dem präfrontalen, perirhinalen, entorhinalen und hippocampalen Cortex. Darüber hinaus sendet die BLA starke glutamaterge Efferenzen zum Acb sowie Projektionsfasern zum medialen präfrontalen Cortex (mPFC) (aus Phillips et al., 2003). Die afferenten Verbindungen des CeN hingegen stammen hauptsächlich aus der BLA und anderen corticalen Subregionen der Amygdala. Der CeN erhält aber auch direkten sensorischen Eingang von verschiedenen corticalen Arealen und dem Thalamus. Die Projektionsneurone des CeN sind, im Gegensatz

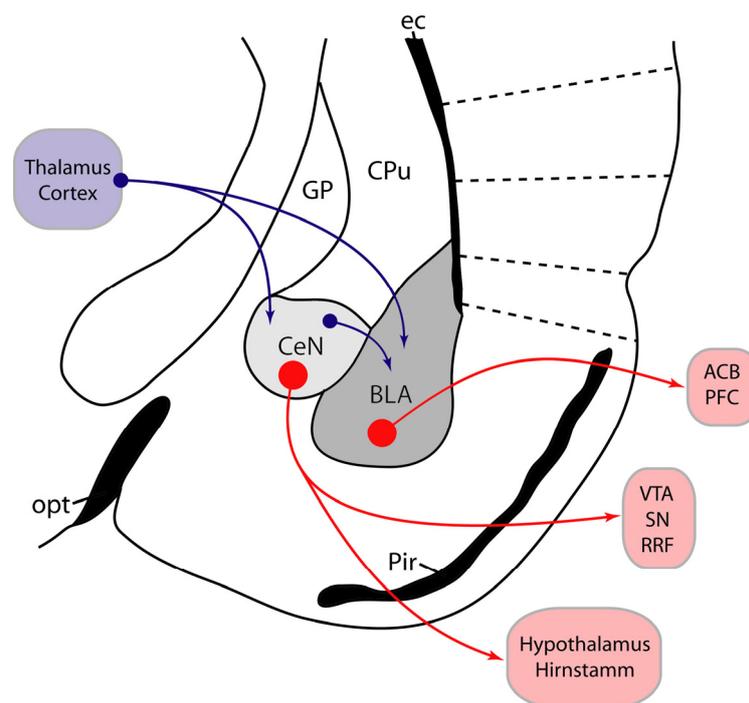


Abbildung 5.10 Efferenzen und Afferenzen der Amygdala. Schematische Übersichtszzeichnung der Amygdala Subregionen CeN und BLA am Beispiel der Ratte. Modifiziert nach Baxter und Murray (2002)

ACB, Nucleus accumbens; BLA, Basolaterale Amygdala; CeN, Zentralkern der Amygdala; CPu, Caudate Putamen; ec, Capsula externa; GP, Globus Pallidus; opt, Optischer Trakt; Pir, Piriformer Cortex; PFC, Präfrontaler Cortex; RRF, Retrorubales Feld; SN, Substantia nigra; VTA, Ventrales tegmentales Areal.

zur BLA, hauptsächlich GABAerg und ziehen in die unmittelbare Nähe dopaminergere Neurone des Mittelhirns wie der VTA, der SN und dem Retrorubralen Feld (RRF). Efferenzen des CeN erreichen auch neuroendokrine und autonome Bereiche des Hypothalamus und Hirnstammes, weshalb er auch als „Kontrollinstanz des Hirnstammes“ („*controller of the brainstem*“) bezeichnet wird (Cardinal et al., 2003a; Phillips et al., 2003) (Abb. 5.10).

Sowohl die BLA als auch der CeN sind phylogenetisch alte Strukturen, jedoch hat sich im Laufe der Evolution vor allem die BLA weiterentwickelt. Aufgrund ihrer Afferenzen und Efferenzen kann die BLA eine zentrale Rolle bei der Bildung von Assoziationen zwischen einem sensorischen Reiz und einem biologisch signifikanten Ereignis, welches sowohl eine emotionale wie auch eine motivationale Bedeutung hat, übernehmen (Bildung von CS-US Assoziationen). Der CeN hingegen übernimmt als „*controller of the brainstem*“ eher einfachere Funktionen, indem er Verhaltensantworten mit autonomen und neuroendokrinen Reaktionen koordiniert (Cardinal et al., 2002a; Everitt et al., 2003). Seit Heinrich Klüver und Paul Bucy 1939 zeigen konnten, dass bei Affen eine beidseitige Läsion der Amygdala zur scheinbaren Furchtlosigkeit dieser Tiere führte (Teil des Klüver-Bucy-Syndroms) ist klar, dass die Amygdala eine Schlüsselposition bei der Verarbeitung von Emotionen einnimmt (Klüver und Bucy, 1939). Beim Menschen führt eine elektrische Stimulation der Amygdala zu Gefühlen von Furcht und unheilvollen Ahnungen, wohingegen es bei einer Läsion zur Beeinträchtigung von emotionalen Lernvorgängen, der Auslösung von Emotionen und des Erinnerungsvermögens an emotionale Ereignisse kommt (Cardinal et al., 2003a). Die genaue Beteiligung und Funktionsweise der einzelnen Kerngebiete der Amygdala, insbesondere der BLA und des CeN, ist jedoch noch unklar. Ergebnisse aus aversiven Lernversuchen, wie der Furchtkonditionierung, weisen darauf hin, dass in der Amygdala Informationen möglicherweise seriell verarbeitet werden (*serial model of BLA/CeN function*), d.h. Informationen fließen von der BLA zum CeN. Demzufolge findet die CS-US Assoziation in der BLA statt, erreicht über den CeN als Ausgangsstruktur Zugang zu tiefergelegenen Hirnarealen (z.B. Hypothalamus und Mittelhirn), und kann ein angemessenes Antwortverhalten generieren (Holland und Gallagher, 1999; Cardinal et al., 2002a; Everitt et al., 2003). Neuere Studien, welche sich mit der Rolle der Amygdala bei appetitiven und motivationalen Prozessen befassen, deuten jedoch auf eine parallele Verschaltung von BLA und CeN hin (*parallel model of BLA/CeN function*), d.h. die BLA und der CeN arbeiten unabhängig voneinander und können das Verhalten durch separate afferente und efferente Verbindungen beeinflussen (Phillips et al., 2003; Balleine und Killcross, 2006). Für das Modell der parallelen Verschaltung spricht, dass die BLA und der CeN in vielen aversiven

und appetitiven Tiermodellen unterschiedliche Funktionen (*double dissociation*) aufweisen. Beispielsweise sind einige Formen der Furchtkonditionierung – z.B. die kontextabhängige Furchtkonditionierung - auch nach einer BLA Läsion noch intakt (Selden et al., 1991). Darüber hinaus führt eine Schädigung der BLA zu einer Beeinträchtigung der instrumentellen Vermeidungsreaktion (*instrumental avoidance*), nicht aber der klassisch konditionierten Unterdrückung (*conditioned suppression*)³. Eine Läsion des CeN hat den gegenteiligen Effekt (Killcross et al., 1997). Aber auch bei appetitiven Lernvorgängen kann eine unterschiedliche Funktion von BLA und CeN beobachtet werden. Einfache erlernte Verhaltensweisen wie beispielsweise die Orientierung in Richtung eines CS (*orienting response*) oder *Autoshaping* beruhen auf der Integrität des CeN und nicht der BLA (Gallagher et al., 1990; Hatfield et al., 1996; Parkinson et al., 2000a). Im Gegensatz dazu werden komplexere Lernvorgänge wie *second-order conditioning*⁴, *conditioned reinforcement*⁵ und *reward devaluation*⁶, bei denen ein CS benutzt wird um den spezifischen Wert des dazugehörigen US abzufragen, durch eine Läsion der BLA stark beeinträchtigt (Cador et al., 1989; Burns et al., 1993; Hatfield et al., 1996).

Zusammengefasst deuten die Fakten sowohl bei appetitiven als auch bei aversiven Lernvorgängen auf eine parallele Verschaltung und eine sehr ähnliche Funktionsweise von BLA und CeN hin. In beiden Fällen scheint die BLA CS-US Assoziationen auszubilden, welche notwendig sind um über den CS den spezifischen Wert des dazugehörigen US abzurufen. Der CeN hingegen formt eher einfache CS-UR Assoziationen, welche nicht von einem bestimmten US abhängig sind, und eher generelle motivationale Assoziationen vermitteln.

5.3.3 *Ventrales tegmentales Areal*

Die VTA liegt dorsal des Nucleus interpeduncularis, ventral des Nucleus ruber und medial der SN im ventralen Mittelhirn (Fields et al., 2007). Die VTA selbst besteht aus einer heterogenen

³ Ratten werden darauf trainiert an zwei Hebeln für Futter zu arbeiten. Einer der Hebel resultiert bei Betätigung in einer intermittierenden Präsentation eines CS, welcher von einem leichten elektrischen Schlag gefolgt wird. Daraufhin entwickeln sich zwei Verhaltensphänomene: (1) der Hebel welcher den CS und den elektrischen Schlag zur Folge hat wird nicht mehr so häufig betätigt (*instrumental avoidance*; instrumentelle Vermeidungsreaktion) und (2) während der CS Präsentation wird das Antwortverhalten unterdrückt (*conditioned suppression*; konditionierte Unterdrückung).

⁴ Form der klassischen Konditionierung. Zunächst wird die Assoziation zwischen einem Stimulus (z.B. Ton) und einem Ereignis (z.B. Futter) erlernt. Anschließend wird ein neuer Stimulus (z.B. Licht) mit dem ersten Stimulus verknüpft. Durch diese Konditionierung erhält auch der zweite Stimulus eine Bedeutung, da er indirekt mit dem Ereignis verbunden wird.

⁵ Gleichbedeutend mit der instrumentellen Konditionierung.

⁶ Anschließend an eine instrumentelle Konditionierung wird die Futterbelohnung entwertet. Dies kann durch eine induzierte Übelkeit (Lithiumchlorid) oder Sättigung durch übermäßige Futtergabe geschehen.

Ansammlung von Zellkörpern und ist in einen dorsalen Teil, den Nucleus parabrachialis pigmentosus, und einen ventralen Teil, den Nucleus paranigralis, aufgeteilt (Phillipson, 1979; Oades und Halliday, 1987). Darüberhinaus können in der VTA zwei verschiedene Typen von Neuronen unterschieden werden: dopaminerge und nicht-dopaminerge Neurone (Johnson und North, 1992). Etwa 70 – 80% aller VTA Neurone enthalten den Neurotransmitter Dopamin und gehören zur A10 Gruppe der dopaminergen Zellen (Dahlstroem und Fuxe, 1964). Neben der VTA besteht die A10 Gruppe noch aus dem Nucleus interfascicularis und dem rostralen sowie caudalen Teil des Nucleus linearis. Die restlichen 20 – 30% der VTA Neurone sind vermutlich GABAerg (Kalivas, 1993; Olson und Nestler, 2007), obwohl es Hinweise darauf gibt, dass auch ein kleiner Prozentsatz dieser VTA Neurone Glutamat enthalten (Chuhma et al., 2004; Lavin et al., 2005). Ein Teil der GABAergen Neurone der VTA bildet lokale tonisch inhibitorische Verbindungen zu benachbarten dopaminergen Neuronen aus. Durch eine Blockade der GABAergen Interneurone kann jedoch der inhibitorische Tonus auf die dopaminergen Neurone aufgehoben, und somit der dopaminerge Signalweg aktiviert werden (Waszczak und Walters, 1980; Grace und Bunney, 1985; Laviolette und van der Kooy, 2001). Die Projektionsbahnen der dopaminergen Neurone des ventralen Mittelhirns sind weitestgehend topographisch organisiert, wobei die medialen Zellen der VTA bevorzugt limbische und corticale Areale innervieren und die lateral gelegene Zellen der SN (Gruppe der A9 dopaminergen Zellen) hauptsächlich zum Striatum projizieren (Fallon und Moore, 1978; Beckstead et al., 1979; Swanson, 1982). Aufgrund dieser topographischen Organisation werden die Projektionsbahnen in das mesocorticolimbische System (ausgehend von der A10 Zellgruppe) und das nigrostriatale System (ausgehend von der A9 Zellgruppe) unterteilt. Die primäre Projektionsbahn des mesocorticolimbischen Systems, das mediale Vorderhirnbündel (*medial forebrain bundle*; MFB), erreicht sowohl *core* als auch *shell* des Acb. Weitere limbische Areale, welche bedeutende Efferenzen der VTA erhalten, sind der PFC, der LH und die Amygdala (Fields et al., 2007). Weniger ausgeprägt ist die Innervation des Hippocampus und Entorhinalcortex (Beckstead et al., 1979; Swanson, 1982). Darüberhinaus ist ein gewisser Prozentsatz der VTA Efferenzen zu Acb und PFC GABAerg (Van Bockstaele und Pickel, 1995; Carr und Sesack, 2000). Elektrophysiologische Studien weisen darauf hin, dass einige dopaminerge Projektionsfasern der VTA, welche zum Acb und PFC ziehen, Glutamat als Cotransmitter besitzen (Lavin et al., 2005). Die Afferenzen der VTA sind verschiedensten Ursprungs und beinhalten unterschiedlichste Neurotransmitter. Glutamaterge Afferenzen stammen aus dem PFC, dem LH, dem *bed nucleus of stria terminalis* (BNST) und dem Colliculus superior (Phillipson, 1979; Georges und Aston-Jones, 2002; Geisler und Zahm,

2005). Die VTA erhält ebenfalls Signale aus zwei Kerngebieten des pontinen Tegmentums: dem Nucleus tegmentalis pedunculopontinus und dem Nucleus tegmentalis laterodorsalis. Beide Kerngebiete besitzen sowohl glutamaterge, cholinerge als auch GABAerge Efferenzen zur VTA (Cornwall et al., 1990; Semba und Fibiger, 1992). Weitere, wahrscheinlich GABAerge, Afferenzen stammen aus dem VP und dem Acb (Conrad und Pfaff, 1976; Geisler und Zahm, 2005). Striatale Projektionen erreichen die VTA aus den MSN welche das Neuropeptide Substanz P und Dynorphin als Cotransmitter exprimieren (Lu et al., 1998). Desweiteren erhält die VTA Projektionsfasern aus dem noradrenergen Locus coeruleus, dem serotonergen dorsalen Raphe Kern und der Amygdala (Wallace et al., 1992; Geisler und Zahm, 2005) (Abb. 5.11). Die dopaminergen Neurone der VTA sind entscheidend daran beteiligt kognitive Prozesse wie Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Belohnung und Motivation zu

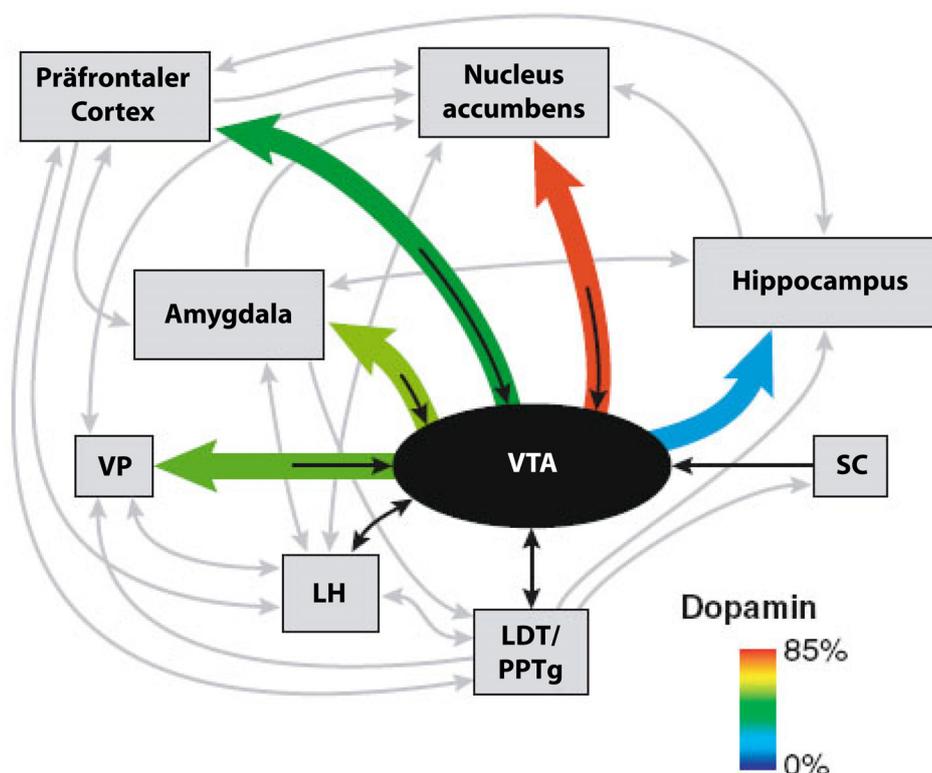


Abbildung 5.11 Efferenzen und Afferenzen der VTA. Direkte Projektionen von und zur VTA sind durch farbige oder schwarze Pfeile dargestellt. Graue Pfeile zeigen die übrigen Projektionsbahnen an. Modifiziert nach Fields et al. (2007). LDT, Nucleus tegmentalis laterodorsalis; LH, lateraler Hypothalamus; PPTg, Nucleus tegmentalis pedunculopontinus; SC, Colliculus superior; VP, ventrales Pallidum; VTA, ventrales tegmentales Areal.

vermitteln (Chudasama und Robbins, 2004; Wise, 2004; Nicola et al., 2005). Eine Läsion der VTA, und die daraus resultierende Schädigung der dopaminergen Neurone des Mittelhirns, führt beispielsweise zu Defiziten im explorativen Verhalten, lokomotorischer Aktivität und einer Reihe von kognitiven Funktionen (Simon et al., 1980; Kalivas und Duffy, 1993; Steffensen et al., 1998). Zudem zeigen elektrophysiologische Daten, dass die VTA Neurone auf generell neue Reize (*novelty*) reagieren, aber auch auf direkte Belohnungen (*primary rewards*) sowie auf belohnungsprädiktive Reize (Schultz, 1997, 1998; Hyland et al., 2002). Dabei codiert die Aktivität der dopaminergen VTA Neurone die Größe der erhaltenen Belohnung und wie unerwartet bzw. erwartet sie war (Fields et al., 2007). Wird eine Belohnung durch einen Stimulus zuverlässig vorhergesagt zeigen die Neurone keinerlei Aktivität. Wird eine angekündigte Belohnung jedoch zurückgehalten, reagieren die Neurone mit einer Aktivitätsminderung. Trifft die vorhergesagte Belohnung früher oder später als erwartet ein, kann eine leichte Aktivitätssteigerung der Neurone beim Erhalt der Belohnung beobachtet werden. Die dopaminergen Neurone der VTA codieren somit einen Vorhersagefehler (*prediction error*; siehe 5.4 Neurotransmitter Dopamin) welcher sich aus der Differenz zwischen der erwarteten und der tatsächlich erhaltenen Belohnung zusammensetzt (Hollerman und Schultz, 1998; Tobler et al., 2005). Appetitive Verhaltensmuster, welche durch einen belohnungsprädiktiven Stimulus ausgelöst werden, können zudem durch direkte Gabe von Dopamin-Antagonisten bzw. eine reversible Inaktivierung der VTA beeinträchtigt werden (Yun et al., 2004a; Yun et al., 2004b). Dieser Befund verdeutlicht die Beteiligung dopaminergere VTA Neurone an der Expression von erlernten adaptiven Verhaltensmustern aufgrund von Umgebungsreizen. Darüber hinaus spielen die dopaminergen Zellen der VTA eine entscheidende Rolle bei psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie und Sucht. Hier übernehmen vor allem die Efferenzen zu Acb und PFC eine zentrale Rolle (Robinson und Berridge, 1993; Yang et al., 1999; Robinson und Berridge, 2000). Alle suchterzeugenden Substanzen können das Verhalten beeinflussen, indem sie den Dopaminspiegel sowohl im Acb als auch im PFC erhöhen. Dadurch erfolgt eine überhöhte Wertigkeit des Suchtmittels gegenüber allen anderen Zielen (Hyman et al., 2006). Die Schizophrenie ist durch eine Hyperaktivität des mesocorticolimbischen Systems gekennzeichnet. Die Erkrankung verläuft üblicherweise in Schüben und jeder Schub wird von einer Hyperaktivität des mesocorticolimbischen Systems begleitet. Schubfreie Phasen hingegen weisen keinerlei veränderte Aktivität auf (Laruelle und Abi-Dargham, 1999; Laruelle et al., 1999).

5.4 Der Neurotransmitter Dopamin

5.4.1 Biosynthese, Wiederaufnahme und Abbau von Dopamin

Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin) ist ein biogenes Amin und gehört, neben Adrenalin und Noradrenalin, zur Gruppe der Catecholamine. Dopamin wird in zwei Schritten aus der Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert. Das erste und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopamin Biosynthese ist die Tyrosinhydroxylase (TH), welche L-Tyrosin in L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin) umwandelt. Im zweiten Schritt wird nun das gerade gebildete L-DOPA fast augenblicklich durch die aromatische L-Aminosäuredecarboxylase zu Dopamin decarboxyliert. In dopaminergen Neuronen endet die Transmittersynthese an dieser Stelle. Die Dopamin-Biosynthese kann durch eine Veränderung der TH Aktivität beeinflusst werden: (1) Aktivierung der TH durch Phosphorylierung, denn nur im phosphorylierten Zustand kann die TH L-Tyrosin in L-DOPA umwandeln, (2) Endproduktinhibition der TH durch Dopamin, welches mit dem benötigten Cofaktor Biopterin konkurriert und (3) Erhöhung bzw. Erniedrigung der TH Gentranskription. Das cytosolisch synthetisierte Dopamin wird anschließend durch einen vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in synaptischen Vesikeln akkumuliert. Durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in der Axonterminale verschmelzen diese Vesikel mit der präsynaptischen Membran, und geben ihren Inhalt in den synaptischen Spalt frei (Exocytose). Die Dopaminfreisetzung kann jedoch auch somatodendritisch erfolgen, höchstwahrscheinlich durch eine Umkehr des Dopamintransporters (DAT). Diese Art der Dopaminsekretion dient einerseits der autokrinen Selbstinhibition, aber auch der Kommunikation mit benachbarten Neuronen (Bergquist und Ludwig, 2008). Im zentralen Nervensystem (ZNS) erfolgt die Inaktivierung des freigesetzten Dopamins hauptsächlich durch Diffusion oder Wiederaufnahme (*reuptake*) in die Präsynapse und benachbarte Gliazellen. Die Wiederaufnahme erfolgt mittels des membranständigen DAT, welcher primär im extrasynaptischen Bereich der Axonterminalen zu finden ist. Der Wiederaufnahmeprozess besitzt eine hohe Substrataffinität und beruht auf einem Na^+ -Cotransport entlang des Na^+ Gradienten. Ein Teil des aufgenommenen Dopamins wird wieder durch VMAT in Vesikeln gespeichert, der andere Teil wird katabolisiert. Die primären Metaboliten des Dopamins sind DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylethylsäure), Homovanillinsäure (HVA) und ein geringer Anteil 3-Methoxytyramin (3-MT). Anhand der beteiligten Enzyme können zwei Abbauewege unterschieden werden. Die Monoaminoxidase (MAO) kommt in zwei Formen vor (MAO_A , MAO_B), welche beide in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, und sich nur durch ihre Substratspezifität voneinander unterscheiden. MAO bildet durch die

Desaminierung von Dopamin das unstable 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd, welches wiederum durch das Enzym Aldehyddehydrogenase (ADH) zu DOPAC katabolisiert wird. Der zweite Abbauweg beinhaltet die Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT), welche ebenfalls in zwei Isoformen vorkommt. MB-COMT ist membrangebunden, wohingegen S-COMT frei beweglich ist. COMT *o*-methyliert Dopamin zu 3-MT, welches wiederum von MAO zu HVA abgebaut wird (Deutch und Roth, 1999; Schwartz, 2000; Cooper et al., 2003) (Abb. 5.12).

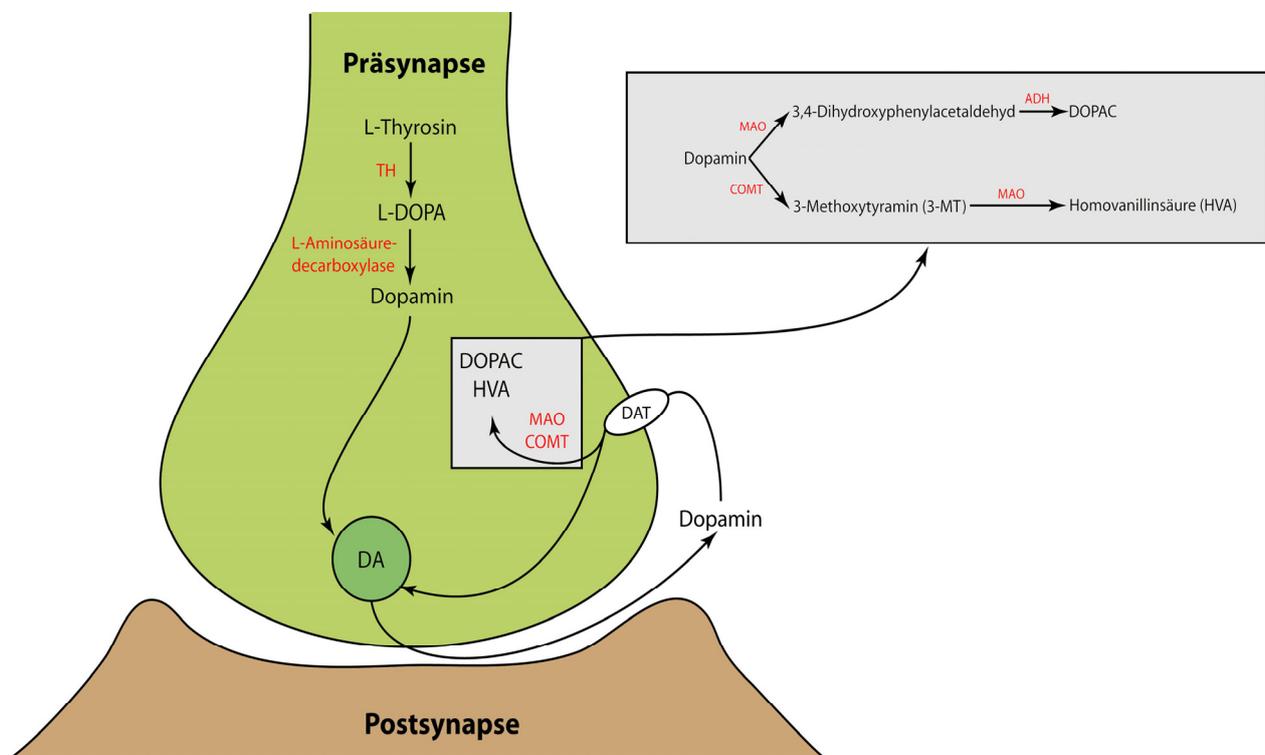


Abbildung 5.12 Synthese und Abbau von Dopamin. Die schematische Übersicht einer dopaminergen Nervenendigung verdeutlicht die Synthese, Speicherung, Freisetzung und Abbau von Dopamin. Modifiziert nach Cooper et al. (2003). ADH, Alkoholdehydrogenase; COMT, Catechol-*O*-Methyltransferase; DA, Dopamin; DAT, Dopamintransporter; DOPAC, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure; HVA, Homovanillinsäure; MAO, Monoaminoxidase; TH, Thyrosinhydroxylase.

5.4.2 Dopaminrezeptoren

Dopaminrezeptoren sind metabotrope (G-Protein gekoppelte) Rezeptoren, und werden sowohl prä- als auch postsynaptisch exprimiert. Aufgrund ihrer Biochemie, Physiologie und Pharmakologie werden sie in die Familie der D₁- und D₂-Rezeptoren unterteilt (Tab. 5.1). Zur Familie der D₁-Rezeptoren gehören die D₁- und D₅-Rezeptoren, welche eine Stimulation der Adenylatcyclase (AC) bewirken. Zu einer Hemmung der AC kommt es durch die Familie der D₂-Rezeptoren, welche die D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren umfasst (Abb. 5.13). Darüberhinaus

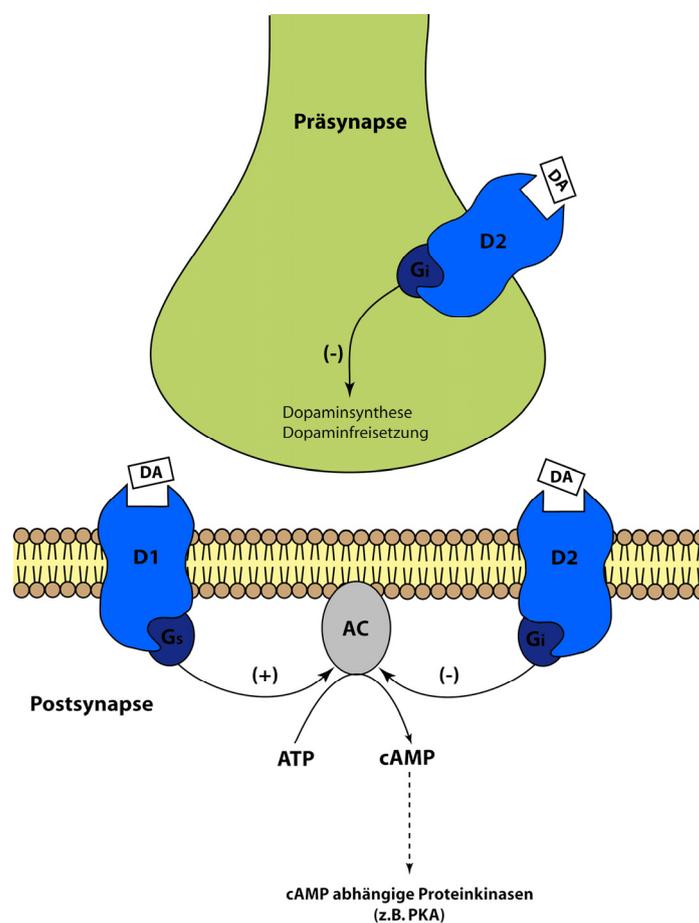


Abbildung 5.13 Dopaminrezeptoren. Übersicht über die Anordnung der dopaminergen D₁- und D₂-Rezeptoren und die nachgeschalteten Signalkaskaden. Die Familie der D₁-Rezeptoren aktiviert die AC, während die Familie der D₂-Rezeptoren eine Hemmung der AC bewirkt. Die Präsynaptischen Autorezeptoren inhibieren die Synthese und Freisetzung von Dopamin vermutlich über die Aktivierung des *second messenger* IP₃ (Inositoltriphosphat). Modifiziert nach Kandel et al. (2000) und Cooper et al. (2003). AC, Adenylatcyclase; ATP, Adenosintriphosphat; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; DA, Dopamin; Gi, inhibitorisches G-Protein; Gs, stimulierendes G-Protein; PKA, Proteinkinase A.

besitzt die D₁ Familie eine höhere Affinität gegenüber Dopamin als die Familie der D₂-Rezeptoren (Seeman und Van Tol, 1994). Dopamin kann durch unterschiedliche Signalkaskaden die Aktivität von Neuronen beeinflussen. Bindet Dopamin am D₁-Rezeptor kommt es über die Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins zu einer erhöhten Aktivität der AC. Bindet Dopamin jedoch am D₂-Rezeptor kommt es über die Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins zu einer Hemmung der AC. Die AC reguliert die Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches wiederum die Aktivität von cAMP abhängigen Proteinkinasen (z.B. Proteinkinase A) reguliert. Proteinkinase A nimmt nun als Teil der nachgeschalteten Signalkaskade Einfluss auf verschiedenste physiologische Prozesse der Nervenzelle. Durch diese Signalkaskade kommt es bei der Familie der D₁-Rezeptoren zu einer Exzitation der Nervenzelle und bei der Familie der D₂-Rezeptoren zu einer Inhibition. Zusätzlich können Dopaminrezeptoren die Zellfunktion noch durch einen direkten Einfluss auf Na⁺ und Ca²⁺ Kanäle, sowie durch die Bildung des *second messenger* Inositoltriphosphat

Tabelle 5.1 Klassifizierung der Dopaminrezeptoren.

Modifiziert nach Cooper et al. (2003)

	D ₁ - Rezeptoren		D ₂ - Rezeptoren		
Rezeptortypen	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
K_i Dopamin (nM)	0.9	<0.9	~7	~4	~30
K_i Racloprid (nM)	18000		1.8	3.5	2400
K_i SCH-23390 (nM)	0.2	0.3	1100	800	3000
Wirkung	cAMP ↑ Exzitatorisch Inhibition des Ca ²⁺ Einstroms Erhöhung der K ⁺ Leitfähigkeit Modulation von IP ₃		cAMP ↓ Inhibitorisch Modulation von IP ₃		

(IP₃) modulieren. Autorezeptoren werden zur Familie der D₂-Rezeptoren gezählt, und können auf Soma, Dendriten und Axonterminalen dopaminerger Neurone gefunden werden. Autorezeptoren besitzen eine sehr hohe Affinität gegenüber Dopamin, und ihre Stimulation führt über ein inhibitorisches G-Protein zur Hemmung der Dopaminsynthese und –freisetzung (Cooper et al., 2003).

5.4.3 Freisetzung von Dopamin

In vivo elektrophysiologische Messungen an dopaminergen Neuronen zeigen drei verschiedene Aktivitätszustände auf: (1) inaktiver, hyperpolarisierter Zustand, (2) langsame (2-10 Hz) tonische Aktivität (*single-spike firing*) und (3) kurze (< 200 ms) phasische Aktivität (*burst firing*). Das phasische Dopaminsignal beruht hauptsächlich auf der Aktivierung der afferenten Eingängen und wird daher als das informationsübertragende Signal für die Wahrnehmung von Belohnungen, und die Modulation von zielgerichtetem Verhalten angesehen (Grace, 1991; Berridge und Robinson, 1998; Schultz, 1998). Als eine Reaktion auf externe Reize wird Dopamin von der Axonterminale in den synaptischen Spalt freigegeben. Dabei erreicht die Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt kurzfristig den µM Bereich (May et al., 1988), was eine ausreichende Menge darstellt um eine verhaltensrelevante Antwort an der Postsynapse hervorzurufen. Aufgrund des effektiven *reuptake* Mechanismus wird aber der extrasynaptische Dopaminspiegel nur kurzfristig erhöht (Grace, 1995). Aber auch der extrasynaptische (tonische) Dopaminspiegel ist stimulusabhängig und unterliegt einer strengen Regulation. Die tonische Aktivität wird durch einen internen Schrittmacher angetrieben, ähnlich dem des Herzens, hängt aber nicht mit der Aktivierung durch afferente Signale zusammen (Grace et al., 2007). Im Gegensatz zum synaptischen Spalt liegt die Dopaminkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit im Bereich von nur 10 – 50 nM (Sharp et al., 1986; Church et al., 1987). Diese Konzentration ist nicht ausreichend um die postsynaptischen Rezeptoren zu aktivieren, aber es erfolgt eine Stimulation der präsynaptisch liegenden sensitiven Autorezeptoren. Durch die Stimulation der Autorezeptoren wird die Dopaminsynthese und –freisetzung erheblich verringert. Auf diese Weise kann eine tonische Stimulation der präsynaptischen Autorezeptoren die Amplitude der phasischen Dopaminfreisetzung verringern (Palij et al., 1990; Grace, 1991, 1995, 2000). Ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass dopaminerge und glutamaterge Synapsen häufig an einem gemeinsamen dendritischen Dorn enden (Pickel et al., 1981; Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984; Totterdell und Smith, 1989). Präsynaptisch ausgeschüttetes Glutamat

kann nun an der dopaminergen Präsynapse über eine Aktivierung präsynaptischer Glutamatrezeptoren eine tonische Dopaminausschüttung bewirken. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung der präsynaptischen D₂-Autorezeptoren, und damit zu einer Modulation des phasischen Dopaminsignals. Diesen Mechanismus findet man zum Beispiel im Acb (Grace, 1991, 1995, 2000). Obwohl das phasische Dopaminsignal verhaltensrelevante Vorgänge zu vermitteln scheint, ist es aufgrund seiner geringen räumlichen und zeitlichen Auflösung nicht geeignet um langanhaltende homöostatische Änderungen hervorzurufen. Diese Aufgabe wird vielmehr durch die langsame und diffuse tonischen Dopaminfreisetzung vermittelt (Grace, 1995).

5.4.4 Funktionen von Dopamin

Verschiedenste Reize wie Nahrung, Fortpflanzungspartner, Suchtmittel und elektrische Stimulation bestimmter Hirnregionen sind dazu in der Lage das dopaminerge System zu aktivieren. Die meisten Hinweise auf eine Beteiligung des dopaminergen Systems an der Vermittlung belohnender Reizen stammen aus Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass belohnungsorientiertes instrumentelles Verhalten durch pharmakologische Blockade der Dopaminrezeptoren oder durch vollständige Zerstörung der dopaminergen Neurone mittels des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) beeinträchtigt ist (Berridge und Robinson, 1998). Sowohl die mesocorticolimbische als auch die nigrostriatale dopaminerge Projektionsbahn sind entscheidend an der Vermittlung belohnender Reizen beteiligt. Allerdings ist noch umstritten welche psychologischen Komponenten der Belohnung durch das Dopaminsignal codiert werden. Aus diesem Grund haben sich mehrere Hypothesen zur Bedeutung von Dopamin bei belohnenden Ereignissen entwickelt. Einer der ersten Erklärungsansätze war die Hypothese der Anhedonie (*anhedonia hypothesis*) von Wise et al. (1978; 1982), welche postulierte, dass Dopamin die Freude bzw. Euphorie (*pleasure*) einer Belohnung vermittelt. Demzufolge ist der Dopaminspiegel maximal erhöht wenn maximale Freude durch den Genuss eine Belohnung erlebt wird. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass eine Erhöhung des Dopaminspiegels nur schwach mit dem Empfinden von subjektiver Freude zu korrelieren scheint. Beispielsweise führen die Suchtmittel Kokain, Morphin und Nikotin zu einer konstanten Selbstverabreichung, obwohl es subjektiv zu einer fortschreitend geringeren Suchtmittelwirkung kommt (Wise, 2004). Darüberhinaus konnten neurochemische Studien zeigen, dass das dopaminerge System oft aktiv ist bevor eine angenehme Belohnung tatsächlich erhalten wird (Schultz, 1997; Datla et al., 2002), was ebenfalls gegen die Hypothese der Anhedonie spricht. Aus diesen Gründen gilt es heute als unwahrscheinlich,

dass das Dopaminsignal die durch eine Belohnung hervorgerufene Freude codiert. Eine weitere Hypothese, die *incentive salience hypothesis*, stammt von K. C. Berridge und T. E. Robinson und basiert auf dem Motivationskonzept der *incentive motivation theorie* von Robert Bolles, Dalbir Bindra und Frederick Toates (Abb. 5.14). Dabei wird angenommen, dass der Vorgang der Belohnung in zwei unterschiedliche psychologische Komponenten (,wanting' und ,liking') aufgeteilt werden kann, welche auch von verschiedenen neuronalen Systemen verarbeitet werden. ,Liking' repräsentiert dabei die hedonischen Eigenschaften einer Belohnung und kann in zwei Formen auftreten. Unkonditioniertes ,liking' wird durch den direkten sensorischen Genuss einer angenehmen Belohnung hervorgerufen, wohingegen konditioniertes ,liking' auch durch die Präsentation eines appetitiven CS ausgelöst werden

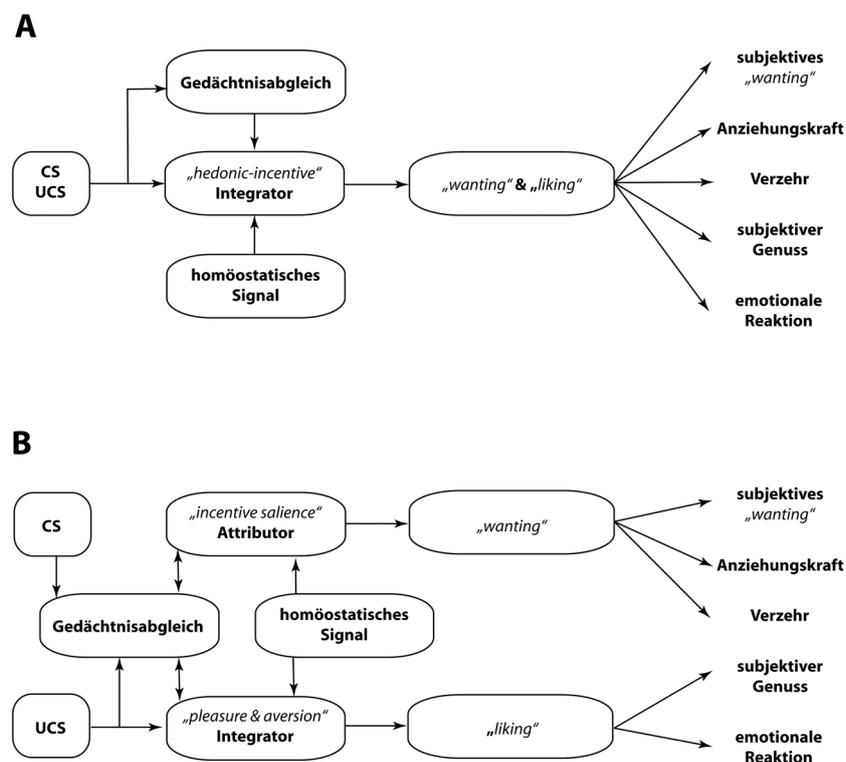


Abbildung 5.14 Die ,incentive salience' Hypothese. (A) Im Bindra-Toates Modell der konditionierten anreizgesteuerten Motivation von 1986 sind ,wanting' und ,liking' noch identisch. (B) Im modifizierten Bindra-Toates Modell von Berridge stellen ,wanting' und ,liking' separate Prozesse dar. Durch die Präsentation eines prädiktiven CS wird sowohl die dazugehörige *incentive salience*, also auch der hedonische Wert der darauf folgenden Belohnung abgerufen. Durch diesen Vorgang kann ein CS sowohl ,wanting' als auch ,liking' hervorrufen, welche jedoch von unterschiedlichen neuronalen Netzwerken vermittelt werden. Nach Berridge (2001). CS, konditionierter Stimulus; UCS, unkonditionierter Stimulus.

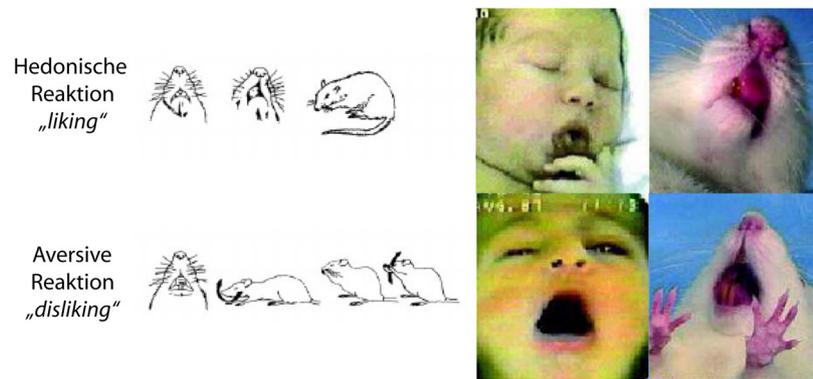


Abbildung 5.15 Affektive Gesichtsreaktionen. Sowohl Ratten als auch Babys reagieren auf den süßen Geschmack einer Zuckerlösung mit einer positiven, hedonischen Reaktion (z.B. rhythmische Zungenbewegungen), wohingegen bitter schmeckende Substanzen aversive Verhaltensweisen auslösen (z.B. weites Öffnen des Mundes). Diese affektiven Gesichtsreaktionen sind sensitiv gegenüber eine Veränderung in der hedonischen Wertigkeit einer Belohnung, beispielsweise durch unterschiedliche Antriebszustände (Hunger, Durst, Sättigkeit) oder, bei Labortieren, durch eine gezielte Manipulationen des zentralen Nervensystems. Nach Berridge (2001; 2007).

kann. ‚*Liking*‘ alleine ist jedoch nicht ausreichend um zielgerichtetes Verhalten zu initiieren. Bei Säuglingen, Affen und Ratten kann ‚*liking*‘ bzw. ‚*disliking*‘ anhand des Gesichtsausdruckes (*affektive facial expression*) bestimmt werden (Abb. 5.15). Je nachdem ob eine süße oder eine bitter schmeckende Lösung verabreicht wird, können unterschiedliche Gesichtsausdrücke beobachtet werden. Die zweite Komponente dieser Theorie, das ‚*wanting*‘, wird als die von einer Belohnung ausgehende Salienz⁷ (*incentive salience*) verstanden, welche durch Modulation der Motivation eine Annäherung und den Verzehr dieser Belohnung begünstigt, d.h. zielgerichtetes Verhalten ermöglicht. Dabei kann ‚*wanting*‘ sowohl von der Belohnung selber, als auch von einem belohnungsprädiktiven Stimulus ausgelöst werden (Berridge und Robinson, 1998; Berridge, 2000, 2001, 2004, 2007; Berridge et al., 2009). Unter natürlichen Bedingungen kommen ‚*liking*‘ und ‚*wanting*‘ immer gemeinsam vor, doch durch Manipulation am mesocorticolimbischen oder nigrostriatalen System können sie experimentell voneinander dissoziiert werden. Basierend auf solchen Untersuchungen postuliert die *incentive salience hypothesis*, dass Dopamin ausschließlich ‚*wanting*‘, aber nicht ‚*liking*‘ vermittelt. Beispielsweise führt eine Läsion des mesocorticolimbischen Systems, oder eine Blockade der Dopaminrezeptoren zu einem reduzierten ‚*wanting*‘, d.h. einer generell verringerten Motivation schmackhafte Nahrung zu sich zu nehmen, sich

⁷ engl. salience = hervorspringen

In der Psychologie bedeutet Salienz, dass ein Reiz aus seinem Kontext hervorgehoben wird und damit dem Bewusstsein leichter zugänglich ist.

fortzupflanzen oder Suchtmittel einzunehmen. Gleichzeitig aber bleibt der Gesichtsausdruck für ‚*liking*‘ durch eine solche Läsion unbeeinträchtigt (Pecina et al., 1997; Berridge und Robinson, 1998; Berridge, 2004). Umgekehrt kann auch ‚*wanting*‘ ohne ‚*liking*‘ hervorgerufen werden. Eine elektrische Stimulation des LH führt, vermutlich über eine Aktivierung absteigender dopaminerger Projektionsbahnen, zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme (Berridge und Robinson, 1998; Berridge, 2004). Ursprünglich wurde angenommen, dass dadurch der hedonische Wert der Nahrung (also ‚*liking*‘) gesteigert wird. Berridge und Valenstein (1991) konnten jedoch zeigen, dass eine elektrische Stimulation des LH keine Veränderung der affektiven hedonischen Reaktion bewirkt, obwohl die Tiere eine gesteigerte Nahrungsaufnahme zeigten. Vielmehr konnten sie sogar bei anhaltender Stimulation eine zunehmend aversive Reaktion feststellen. Die Hypothese, dass Dopamin belohnungsbezogenes Lernen vermittelt, ist eigentlich eine Ansammlung von verschiedenen, aber dennoch eng verwandten Hypothesen. Die einfachste postuliert, dass Dopamin an der Festigung (*stamping-in*) von Assoziationen zwischen einem Stimulus und einer Handlung (S-R; *Stimulus-Response*) und zwischen zwei Stimuli (S-S; *Stimulus-Stimulus*) beteiligt ist. Dopamin wirkt dabei als eine Art Verstärkungssignal welches, sobald ein US auftritt, die vorangegangenen S-R oder S-S Assoziation stärkt. Gestützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass eine Manipulation des dopaminergen Systems direkt vor einer Lerneinheit die Akquisition verhindert (Wolterink et al., 1993; Robbins und Everitt, 1996), wohingegen eine Manipulation anschließend an eine Lerneinheit die Konsolidierung beeinträchtigt (Dalley et al., 2005; Everitt und Robbins, 2005; Hernandez et al., 2005). Des Weiteren potenziert die Applikation eines Dopaminrezeptor-Agonisten die Wirkung von bereits erlernten klassisch konditionierten Stimuli (Robbins und Everitt, 1996; Everitt und Robbins, 2005). Eng verwandt mit der *stamping-in* Hypothese ist die *habit-learning* Theorie. Ein Automatismus (*habit*) ist dadurch charakterisiert, dass Verhaltensweisen ausgeführt werden, auch wenn ein Ziel nicht mehr erreicht wird, oder es keinen Wert mehr besitzt (z.B. das Aufsuchen vormals belohnter Orte). Die Hypothese postuliert, dass Dopamin an der Ausbildung neuer S-R Automatismen (*habits*) beteiligt ist und die Stärke bestehender Automatismen moduliert. Beispielsweise kann eine Blockade der dopaminergen Neurotransmission die Ausbildung von Automatismen oder die Ausführung von bereits erworbenen Automatismen verhindern (Faure et al., 2005; Vanderschuren et al., 2005). Eine besondere Bedeutung erhält die *habit-learning* Theorie dadurch, dass es bei Suchtmitteln, die zu einer Dopaminfreisetzung führen, wahrscheinlich zu einer ungewöhnlich starken Ausbildung von Automatismen kommt (Robbins und Everitt, 1999a; Berke, 2003), wodurch es zu einer unflexiblen und zwanghaften

Einnahme des Suchtmittels kommt, unabhängig der möglichen negativen Konsequenzen.

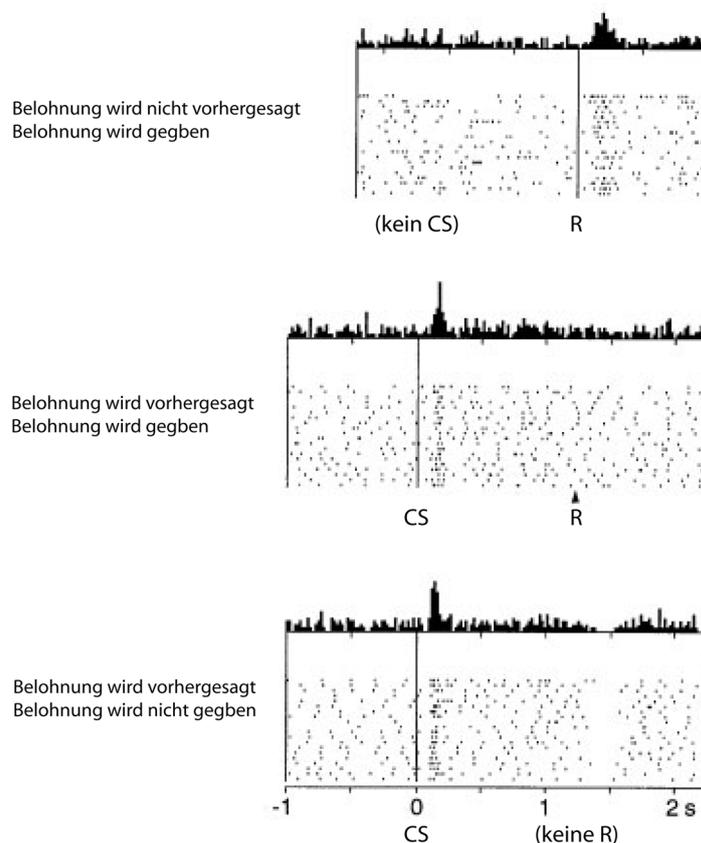


Abbildung 5.16 Vorhersagefehler. Wird eine Belohnung (R) gegeben ohne dass sie vorhergesagt wurde, reagieren die dopaminergen Neurone auf diesen positiven Vorhersagefehler mit einer Aktivitätssteigerung bei Erhalt von R. Sagt ein prädiktiver Stimulus (CS) R jedoch zuverlässig vorher, zeigen die Neurone bei Erhalt von R keine Aktivitätsänderung; allerdings reagieren sie nun auf die Präsentation des CS mit einer erhöhten Aktivität. Wird eine vorhergesagte Belohnung nicht verabreicht, tritt eine Minderung der Aktivität zum Zeitpunkt der Belohnungsgabe auf; die Reaktion auf den CS bleibt jedoch unverändert. Nach Schultz (1998).

Die Hypothese des Vorhersagefehlers (*prediction error*) ist eine der komplexesten; sie besagt, dass belohnungsbezogenes Lernen durch Dopamin vermittelt wird (Abb. 5.16). Ungefähr 75% der dopaminergen Neurone des Mittelhirns reagieren mit phasischer Aktivität auf eine unerwartete Futterbelohnung. Wird eine solche Belohnung aber durch einen Stimulus zuverlässig vorhergesagt, beginnen die Zellen auf den prädiktiven Stimulus mit einer phasischen Aktivität zu reagieren, und nicht mehr auf den tatsächlichen Erhalt der Belohnung. Fällt die Belohnung jedoch größer aus, als es durch den Stimulus vorhergesagt wurde, reagieren die Neurone mit einer Aktivitätssteigerung. Fällt die Belohnung geringer aus als

vorhergesagt oder wird sie erst gar nicht erhalten, ist eine Minderung der Aktivität die Folge. Wird die Belohnungsgabe verzögert, tritt ebenfalls eine Depression der neuronalen Aktivität zum eigentlichen Zeitpunkt der Belohnungsgabe auf. Bei Erhalt der verzögerten Belohnung findet eine erneute Aktivität der dopaminergen Neuron statt. Der Vorhersagefehler funktioniert also als ein Lernsignal und codiert dabei sowohl eine zeitliche Komponente als auch die Differenz zwischen der Erwarteten und der tatsächlich erhaltenen Belohnung (Schultz, 1997, 1998, 2000; Schultz et al., 2000; Schultz, 2002, 2007a, b). Obwohl es viele Hypothesen zur möglichen Funktion von Dopamin gibt, kann keine der hier vorgestellten Annahmen die bis heute vorliegenden Daten hinreichend erklären. Angesichts der vielfältigen Funktionsweise von Dopamin in den unterschiedlichsten neuronalen Schaltkreisen des zentralen Nervensystems, ist es wahrscheinlich, dass sich diese Hypothesen gegenseitig ergänzen und zu unterschiedlichen Funktionen dieses Neurotransmitters Aussagen treffen.

5.5 Neurotransmitter Glutamat

5.5.1 Biosynthese, Wiederaufnahme und Abbau von Glutamat

Glutamat ist das Salz der Glutaminsäure, einer nicht essentiellen α -Aminosäure, und liegt unter physiologischen Bedingungen ausschließlich als L-Isoform vor (L-Glutamat). Glutamat kann die Bluthirnschranke nicht passieren, und wird direkt in den Axonterminalen der glutamatergen Neurone synthetisiert. Eine Quelle ist α -Ketoglutarat, ein Intermediärprodukt des Citratzyklus, welches durch das mitochondriale Enzym Glutamatdehydrogenase zu Glutamat synthetisiert wird. Eine weitere Quelle ist das in den Gliazellen synthetisierte Glutamin, welches nach dem Transport in die Nervendigungen dort lokal durch eine Glutaminase zu Glutamat konvertiert wird. Anschließend wird das Glutamat durch einen vesikulären Transporter in synaptischen Vesikeln gespeichert, und in Folge einer Depolarisation durch den kalziumabhängigen Prozess der Exozytose in den synaptischen Spalt entleert. Die Inaktivierung des freigesetzten Glutamats erfolgt durch Diffusion oder einen hochaffinen Na^+ -abhängigen *Reuptake*-Mechanismus. Dabei wird Glutamat durch einen membrandurchspannenden Transporter entweder wieder in die Präsynapse oder in die umliegenden Gliazellen aufgenommen. Diese schnelle Wiederaufnahme ist zum einen wichtig um das Glutamatsignal zu terminieren, aber auch um die extrazelluläre Glutamatkonzentration niedrig zu halten, und dadurch eine toxische Übererregung der Glutamat-sensitiven Nervenzellen (Glutamat-Exzitotoxizität) zu verhindern. In den Gliazellen konvertiert die Glutaminsynthetase Glutamat zu Glutamin, welches wiederum mittels eines niedrigaffinen

Prozesses in die benachbarte Nervenendigung transportiert wird. In Astrozyten wird Glutamin mit Hilfe des Citratzyklus zu α -Ketoglutarat oxidiert, welches durch den aktiven Transport in glutamaterge Axonterminalen den Verlust an α -Ketoglutarat während der Glutamatsynthese ausgleicht (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000; Cooper et al., 2003) (Abb. 5.17).

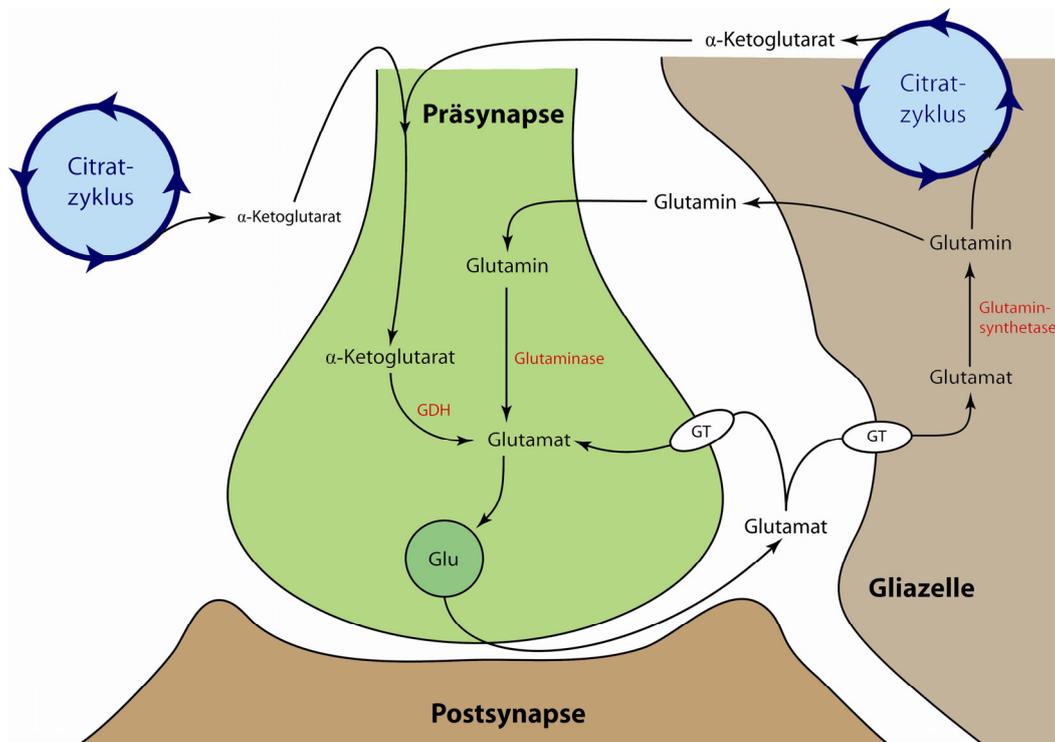


Abbildung 5.17 Synthese und Abbau von Glutamat. Die schematische Übersicht einer glutamatergen Nervenendigung verdeutlicht die Synthese, Speicherung, Freisetzung und Abbau von Glutamat. Modifiziert nach Cooper et al. (2003)
GDH, Glutamatdehydrogenase; Glu, Glutamat; GT, Glutamattransporter

5.5.2 Glutamatrezeptoren

Mitte der 80er Jahre wurden die Rezeptoren der exzitatorischen Aminosäuren (EAA; engl. *excitatory amino acid*) lediglich in die NMDA- und die non-NMDA-Rezeptoren unterteilt. Doch die Entwicklung von immer weiteren selektiven Agonisten und Antagonisten führte dazu, dass die Rezeptoren der EAA heute in zwei Haupt- und mehrere Untertypen unterschieden werden: (1) die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR), welche nun die Gruppe der NMDA- und der non-NMDA- Rezeptoren zusammenfassen, und (2) die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR), welche aus drei weiteren Subgruppen bestehen (Tab. 5.2).

5.5.3 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind membranständige ligandengesteuerte Kationenkanäle, welche durch die Bindung von Glutamat in einen geöffneten Zustand übergehen. Dadurch wird die Leitfähigkeit der Zellmembran verändert und es kommt zu einer Depolarisation. Ionotrope Glutamatrezeptoren bewirken primär eine rasche Veränderung von Ionenströmen und damit des Membranpotentials. Dadurch sind sie optimal für eine schnelle synaptische Übertragung geeignet, da ihre Reaktionszeit im Millisekundenbereich liegt. Pharmakologisch können verschiedene ionotropen Glutamatrezeptoren durch die Bindung von spezifischen Agonisten und Antagonisten unterschieden werden. NMDA-Rezeptoren werden von dem Aminosäureanalogon NMDA (N-methyl-D-Aspartat) aktiviert, während die non-NMDA-Rezeptoren entweder von AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) oder durch Kainat (KA) und Quisqualat aktiviert werden. AMPA-Rezeptoren sind tetramere Ionenkanäle, welche aus verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten

Tabelle 5.2 Klassifizierung der Glutamatrezeptoren.

Modifiziert nach Cooper et al. (2003)

Rezeptortyp	Agonisten	Antagonisten	Untereinheiten/ Subtypen	Wirkung
NMDA	Glutamat NMDA	AP-5 MK-801 (Dizocilpin) Phencyclidin (PCP)	NR1 NR2A - D NR3	Ionenkanal Na ⁺ , K ⁺ und Ca ²⁺ Permeabilität
AMPA	Glutamat AMPA Quisqualat	CNQX DNQX NBQX GYKI 52466	GluR1 - 4	Ionenkanal Na ⁺ und K ⁺ Permeabilität geringe Ca ²⁺ Permeabilität
Kainat	Glutamat Kainat	CNQX DNQX	GluR5 - 7 KA1 KA2	Ionenkanal Na ⁺ und K ⁺ Permeabilität geringe Ca ²⁺ Permeabilität
Metabotrope Rezeptoren	Glutamat L-AP ₄ ACPD L-CCG-I	MCPG MPEP	mGluR1 - 8	G-Protein gekoppelt IP ₃ und DAG Stimulation Inhibition der Adenylatcyclase

ACPD, 1-aminocyclopentan-1,3-dicarboxylsäure;
AMPA, α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP-5, 2-amino-5-phosphonopentansäure
CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion
DNQX, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dion
L-AP₄, L-2-amino-4-phosphonobutansäure

L-CCG-I, (2S,3S,4S)- α -(carboxycyclopropyl)glycin
NBQX, 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxalin
NMDA, N-methyl-D-Aspartat
MCPG, α -methyl-4-carboxyphenylglycin
MPEP, 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridin

GluR1 bis GluR4 zusammengesetzt sind. KA-Rezeptoren hingegen sind pentamere Ionenkanäle und bestehen aus Kombinationen von GluR5 bis GluR7, KA1 und KA2 Untereinheiten. Die Ionenspezifität eines Rezeptors hängt von der Kombination der Untereinheiten ab. Im Allgemeinen sind die non-NMDA-Rezeptoren jedoch für Na^+ und K^+ permeabel, und besitzen keine oder nur eine sehr geringe Permeabilität für Ca^{2+} . Da die non-NMDA-Rezeptoren, im Gegensatz zu den NMDA-Rezeptoren, nicht spannungsabhängig sind und sich durch die Bindung von Glutamat sofort öffnen, sind sie für die frühe Komponente des EPSPs (exzitatorisches postsynaptisches Potential) verantwortlich.

Der NMDA-Rezeptor unterscheidet sich durch eine Reihe von Eigenschaften von den non-NMDA-Rezeptoren. Zum einen ist er ein pentamerer Ionenkanal, welcher sich aus den Untereinheiten NR1, NR2A-D und NR3A zusammensetzt. Dabei besteht jeder Kanal aus mindestens einer NR1 Untereinheit, denn die übrigen Untereinheiten alleine sind nicht in der Lage einen funktionstüchtigen Ionenkanal auszubilden. Des Weiteren ist der Kanal sowohl spannungs- als auch ligandengesteuert. Unter physiologischen Bedingungen, bei einem Ruhepotential von etwa -65mV , ist die Kanalpore durch ein Magnesiumion blockiert. Dieser Mg^{2+} -Block verhindert einen Stromfluss durch den Kanal, selbst wenn Glutamat an den Rezeptor gebunden ist. Durch eine Depolarisation der Membran wird jedoch der Mg^{2+} -Block aus der Kanalpore ausgetrieben und Ca^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Ionen können passieren. Aufgrund dieser spannungsgesteuerten Eigenschaft tragen die NMDA-Rezeptoren ausschließlich zur späten Phase des EPSPs bei, wenn die Membran durch die non-NMDA-Rezeptoren schon vordepolarisiert wurde. Ein NMDA-induzierter Stromfluss wird jedoch hauptsächlich durch Ca^{2+} -Ionen getragen, da die Permeabilität für Ca^{2+} deutlich höher ist als für Na^+ - und K^+ -Ionen. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert Ca^{2+} abhängige Enzyme und Second-Messenger-Kaskaden, was zu lang anhaltenden Veränderungen in der Postsynapse führt. Dadurch übernehmen die NMDA-Rezeptoren eine zentrale Rolle bei plastischen Vorgängen wie der Langzeitpotenzierung (LTP) und der Langzeitdepression (LDP). Die Aktivität der NMDA-Kanäle wird präzise moduliert um eine fehlerfreie neuronale Aktivität zu gewährleisten. Daher besitzt der NMDA-Rezeptor zahlreiche modulatorische Bindungsstellen. Eine Aktivierung des Kanal setzt nicht nur die Bindung des Agonisten Glutamat und eine depolarisierte Membran voraus, sondern auch die gleichzeitige Bindung des Coagonisten Glycin an der Glycinbindungsstelle. Darüber hinaus besitzen die NMDA-Rezeptoren eine Bindungsstelle für Polyamine, welche den Stromfluss potenzieren, indem sie die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöhen. Durch eine Aktivierung der Zn^{2+} -Bindungsstelle wird der Kanal blockiert, ebenso wie durch die im Inneren des Kanals

liegenden Bindungsstellen für Phencyclidin, MK-801 und Ketamin (Hollmann und Heinemann, 1994; Conn und Pin, 1997; Coyle et al., 2002; Cooper et al., 2003).

5.5.4 Metabotrope Glutamatrezeptoren

Im Gegensatz zu den Ionenkanal-bildenden ionotropen Glutamatrezeptoren ist der metabotropen Glutamatrezeptoren über G-Proteine an *Second-Messenger* Systeme gekoppelt, weshalb er auch ein Rezeptor der langsamen synaptischen Übertragung ist. Mindestens acht verschiedene Subtypen sind bis heute bekannt (mGluR₁ bis mGluR₈), welche aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften, physiologischen Effekten und Sequenzhomologien in drei Gruppen zusammengefasst werden. Die erste Gruppe besteht aus mGluR₁ und mGluR₅, welche über eine Stimulation der Phosphoinositid-Second-Messenger IP₃ und Diacylglycerin (DAG) die Phospholipase C aktivieren. Die zweite Gruppe beinhaltet mGluR₂ und mGluR₃, welche eine Inhibition der AC bewirken. Die dritte Gruppe ist ebenfalls negativ mit der AC gekoppelt, und besteht aus mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ und mGluR₈. Metabotrope Glutamatrezeptoren werden im gesamten Nervensystem exprimiert, jedoch ist Gruppe I überwiegend postsynaptisch lokalisiert, während Gruppe II und III präsynaptisch als Autorezeptoren vorkommen und die Neurotransmission negativ regulieren (Kandel und Siegelbaum, 2000; Coyle et al., 2002; Cooper et al., 2003).

5.5.5 Funktionen von Glutamat

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS, und bisherige Forschungsergebnisse zeigen, dass die Funktion von Glutamat weitaus umfangreicher und komplexer ist als lediglich EPSPs zu generieren. Neben einer Schlüsselrolle in der Gehirnentwicklung ist Glutamat im adulten Nervensystem hauptsächlich an der Vermittlung neuronaler Plastizität beteiligt (Coyle et al., 2002). Damit wird die Veränderbarkeit neuronaler Verbindungen bezeichnet, welche aufgrund funktioneller Ereignisse z.B. nach Lernvorgängen (funktionelle Plastizität) oder aufgrund von strukturellen Geschehnissen wie z.B. nach dem Verlust von Nervenzellen oder Axonen (strukturelle Plastizität) auftritt. Strukturelle Plastizität ist durch langanhaltende, anatomisch fassbare, Veränderungen gekennzeichnet, wie die Bildung neuer Synapsen (terminale Aussprossung), neuer Axone (kollaterale Aussprossung) oder auch strukturelle Veränderungen dendritischer Dornen. Funktionelle Plastizität hingegen bedeutet eine eher kurz andauernde Veränderung der Effizienz synaptischer Übertragung ohne eine anatomische Veränderung. Dazu gehören

präsynaptische Mechanismen, wie eine vermehrte Transmitterausschüttung der Präsynapse, aber auch postsynaptische Mechanismen, wie eine Veränderung in der Rezeptordichte der Postsynapse. Für Lernvorgänge ist die funktionelle Plastizität von besonderer Bedeutung, denn nach der Hebb'schen Regel ist die synaptische Übertragung am Effizientesten, wenn die betreffende Synapse aktiv und die Postsynapse gleichzeitig depolarisiert ist. Dies geschieht durch den Prozess des LTP, welcher sowohl von den non-NMDA-Rezeptoren, als auch von den NMDA-Rezeptoren getragen wird. Doch beide Formen der neuronalen Plastizität sind nicht unabhängig voneinander, denn auch ein typischer funktioneller Vorgang wie LTP hat strukturelle Folgen (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000). Auch der Prozess der glutamatvermittelten Exzitotoxizität wird primär von Glutamatrezeptoren vermittelt. Dabei bewirkt eine exzessive Stimulation glutamaterger Neurone eine massive Glutamatausschüttung, was wiederum zu einer Überstimulation der Glutamatrezeptoren führt. Die Folge einer solchen Überstimulation ist ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, welche über eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden die Nervenzelle letztendlich in den programmierten Zelltod (Apoptose) führt. Die Exzitotoxizität ist vermutlich entscheidend an Zellschädigungen bei Schlaganfällen und neurodegenerativen Krankheiten wie amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimer und Chorea Huntington beteiligt (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000; Westbrook, 2000; Coyle et al., 2002).

5.5.6 Langzeitpotenzierung

LTP ist eine gut charakterisierte Form der synaptischen Plastizität, und stellt das neuronale Korrelat für Lernen und das Speichern von Gedächtnisinhalten dar. Dabei bewirkt die gleichzeitige Aktivierung der Prä- und Postsynapse eine Verstärkung der synaptischen Transmission für Stunden, Wochen oder auch Monate (Cooke und Bliss, 2006). 1973 konnten Timothy Bliss und Terje Lomo (Bliss und Lomo, 1973) an einem narkotisierten Kaninchen zum ersten Mal LTP an einer glutamatergen Synapse zwischen den Fasern der perforanten Bahn (Tractus perforans) und den Körnerzellen des Gyrus dentatus im Hippocampus nachweisen. Das Phänomen LTP ist jedoch nicht nur auf den Hippocampus beschränkt. Mittlerweile konnte LTP an unterschiedlichsten Synapsen im gesamten ZNS gemessen werden (Bennett, 2000). Ein nach wie vor dominierendes Modell zur Untersuchung der synaptischen Plastizität sind die Schaffer-Kollateralen im Hippocampus, welche von den CA3 Pyramidenzellen stammen und zu den CA1 Pyramidenzellen ziehen (Beggs et al., 1999; Kandel, 2000). Allgemein kann LTP in drei Phasen untergliedert werden: (1) Induktion

(*induction*), (2) Expression (*expression*) und (3) Konservierung (*maintenance*) (Bliss und Collingridge, 1993; Beggs et al., 1999).

An der Präsynapse bewirkt ein eingehendes Aktionspotential die Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Die anschließende Bindung von Glutamat an AMPA-Rezeptoren bewirkt eine Depolarisation und damit ein EPSP der Postsynapse. Eine wichtige Voraussetzung für die Induktion von LTP ist jedoch eine hochfrequente und wiederholte

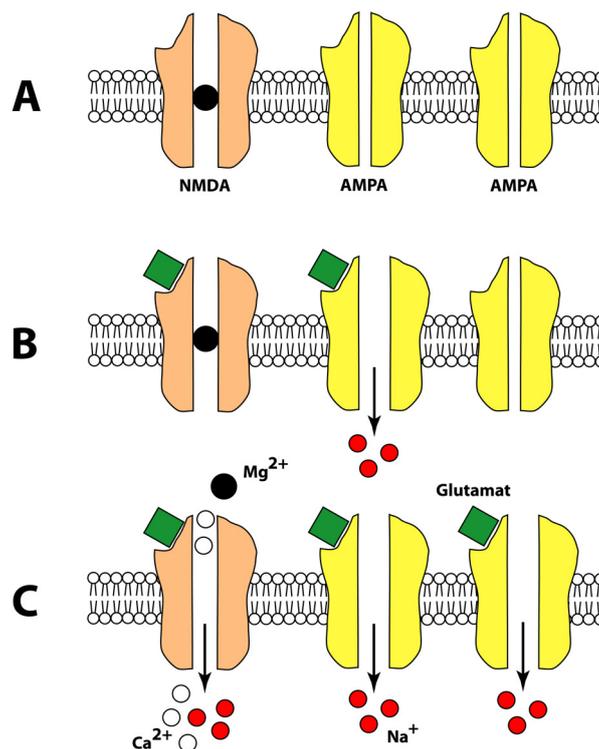


Abbildung 5.18 NMDA vermittelte Induktion von LTP. Schematische Darstellung einer glutamatergen postsynaptischen Membran, welche sowohl NMDA- als auch AMPA-Rezeptoren enthält. **(A)** Nahe des Ruhepotentials ist der Kanal des NMDA-Rezeptors durch ein positiv geladenes Magnesium-Ion blockiert. **(B)** Präsynaptisch ausgeschüttetes Glutamat bindet sowohl an NMDA- als auch an AMPA-Rezeptoren. Bei den AMPA-Rezeptoren führt dies zu einer Öffnung der Kanalpore und zu einem einwärtsgerichteten Stromfluss, welcher hauptsächlich von positiv geladenen Natrium-Ionen getragen wird. Die daraus resultierende Depolarisation der postsynaptischen Membran ist jedoch nicht ausreichend, um den Magnesium-Block aus den NMDA-Rezeptoren auszutreiben. **(C)** Erst eine hohe Glutamat-Konzentration hat eine so starke Depolarisation der Postsynapse zur Folge, dass der Magnesium-Block der NMDA-Rezeptoren ausgetrieben wird. Der anschließende Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen durch den NMDA-Rezeptor bewirkt durch eine nachgeschaltete Kaskade unterschiedlicher biochemischer Reaktionen die Induktion von LTP. Aus Cook und Bliss (2006).

Depolarisation der Postsynapse, was zumeist durch die Aktivierung mehrerer afferenter Axone erreicht wird. Durch die anhaltende Depolarisation wird der Mg^{2+} -Block der NMDA-Rezeptoren ausgetrieben und Ca^{2+} kann in die Zelle einströmen. Es löst dabei eine Kaskade unterschiedlicher biochemischer Reaktionen aus, indem es Ca^{2+} -abhängige Kinasen wie z.B. die Calcium-Calmodulin-Kinase II, Proteinkinase C und eine Tyrosinkinase aktiviert. Ein durch NMDA-Rezeptoren vermitteltes LTP hat üblicherweise drei Eigenschaften: (1) die gleichzeitige Aktivierung mehrere afferenter Axone (*cooperativity*), (2) die gleichzeitige Aktivierung der Prä- und Postsynapse (*assoziativität*) und (3) ein einmal induzierte LTP breitet sich nicht auf andere Synapsen aus (*input specificity*) (Bliss und Collingridge, 1993; Beggs et al., 1999; Cooke und Bliss, 2006) (Abb. 5.18).

Während der Expression von LTP kann eine erhöhte postsynaptische Reaktion an potenzierten Synapsen beobachtet werden, was sowohl auf präsynaptische als auch auf postsynaptische Mechanismen zurückzuführen ist. Zum einen bewirken präsynaptische Modifikationen, wie beispielsweise eine Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase oder retrograde Botenstoffe, eine erhöhte Transmitterausschüttung pro Aktionspotential. Des Weiteren kommt es an der Postsynapse zu einer erhöhten Rezeptordichte bzw. veränderten Funktion durch Phosphorylierung der AMPA-Rezeptoren. Aber auch extrasynaptische Veränderungen wie eine verminderte Aufnahme von Glutamat durch umliegende Gliazellen, was zu einer erhöhten Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt führt, sind an der Expression von LTP beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen tritt wahrscheinlich eine Kombination dieser verschiedenen Möglichkeiten auf, eventuell mit unterschiedlichen Zeitverläufen (Bliss und Collingridge, 1993; Beggs et al., 1999; Malenka und Bear, 2004).

Die Aufgabe der LTP Konservierung ist es, die vorliegenden synaptischen Veränderungen über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten. Dieser Vorgang wird in zwei Phasen unterschieden: (1) eine etwa zwei Stunden andauernde frühe Phase (*early LTP*), welche nicht durch die Synthese neuer Proteinen gekennzeichnet ist, und (2) einer späten Phase (*late LTP*) welche zumeist 24 Stunden anhält und durch eine veränderte Genexpression die Neusynthese von Ribonukleinsäure (RNA) und Proteinen beinhaltet. Zusätzlich kommt es auch zu morphologischen Veränderungen, wie das Wachstum neuer dendritischer Dornen oder die Vergrößerung von bereits existierenden Dornen (Beggs et al., 1999; Kandel, 2000; Malenka und Bear, 2004). Durch den Vorgang der Konservierung ist es möglich das Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis zu überführen, und Gedächtnisinhalte dauerhaft zu speichern.

5.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Intensität mit der eine instrumentelle Handlung ausgeführt wird, kann durch appetitive klassisch konditionierte Reize beeinflusst werden. Dieser als Klassisch-Instrumenteller Transfer (PIT) bezeichnete Vorgang verdeutlicht die Verschränkung klassischer und instrumenteller Lernvorgänge. Darüber hinaus ist er ein grundlegendes Merkmal der Interaktion eines Tieres mit seiner Umwelt, und erfüllt wichtige biologische Funktionen. Grundsätzlich beruht der verstärkende Effekt klassisch konditionierter Reize auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen geht von klassisch konditionierten Reizen ein generell motivierender Effekt aus. Zum anderen können auch die spezifischen sensorischen Eigenschaften der Belohnung, welche mit dem präsentierten CS assoziiert sind, zu einer Intensivierung der instrumentellen Handlung beitragen (Cardinal et al., 2002a; Cardinal et al., 2003a). Aufgrund dieser beiden verstärkenden Mechanismen existieren auch zwei unterschiedliche Formen des PIT (genereller und spezifischer PIT), welche durch spezielle Trainingsprotokolle hervorgebracht werden können (Corbit und Balleine, 2005). Es wird angenommen, dass die Aufrechterhaltung einer Sucht, und vor allem der Rückfall in süchtiges Verhalten, zumindest teilweise, auf dem Mechanismus des PIT beruht (Tiffany und Drobos, 1990; Gawin, 1991; O'Brien et al., 1998). Daher ist es wichtig, das dazugehörige neuronale Netzwerk zu identifizieren. Erste Studien legen eine Schlüsselrolle des Acb und der Amygdala nahe (Blundell et al., 2001; Hall et al., 2001; de Borchgrave et al., 2002; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005). Ferner scheint der Neurotransmitter Dopamin an der Steuerung des PIT beteiligt zu sein, da die systemische Applikation eines Dopaminrezeptor-Antagonisten den PIT hemmt (Dickinson et al., 2000). Dieser Effekt wird vermutlich durch die Dopamintransmission des Acb vermittelt, da eine direkte Applikation eines Dopaminrezeptor-Agonisten in den Acb den PIT verstärkt (Wyvell und Berridge, 2000). Darüber hinaus existieren jedoch nur wenige Untersuchungen zur Steuerung des PIT, und ob beide Formen des PIT auf denselben neuronalen Netzwerken beruhen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in drei aufeinander folgenden Experimenten die neuronalen Grundlängen des generellen PIT genauer zu charakterisieren. Beispielsweise zeigen neuroanatomische Studien, dass die BLA starke glutamaterge Efferenzen zum Acb entsendet (Kelley et al., 1982; Brog et al., 1993; Wright et al., 1996), einer zentralen Struktur im neuronalen Netzwerk des PIT. Darüber hinaus beruht die generelle Steuerung von motiviertem und belohnungsbezogenem Verhalten zumindest teilweise auf einer glutamatergen Beteiligung (Burns et al., 1994; Maldonado-Irizarry et al., 1995), und eine Aktivierung der glutamatergen NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren im Acb hat die

Beschleunigung instrumenteller Handlungsabläufe zur Folge (Giertler et al., 2003), ein Effekt der möglicherweise auf einer verstärkten Wirkung von klassisch konditionierten Stimuli beruht. Durch die systemische Applikation von sowohl NMDA- als auch AMPA/KA-Antagonisten wurde daher in Experiment 1 zunächst überprüft, ob der Neurotransmitter Glutamat an der Vermittlung des generellen PIT beteiligt ist.

Über die Rolle der VTA in Bezug auf PIT ist ebenfalls nur wenig bekannt. Es existieren jedoch einige Anhaltspunkte, die indirekt auf eine Beteiligung der VTA hindeuten. Beispielsweise reduziert eine Läsion des CeN, welche den generellen Transfereffekt vermittelt, den PIT (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003). Der dem generellen PIT zugrunde liegende neuronale Schaltkreis beinhaltet daher möglicherweise eine Regulation der Dopaminfreisetzung im Acb durch die Efferenzen des CeN zur VTA des Mittelhirns (Hall et al., 2001). Aus diesem Grund wurde in Experiment 2 der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer reversiblen VTA Inaktivierung auf den generellen Transfer untersucht.

Obwohl bekannt ist, dass die mesoaccumbale Dopamintransmission entscheidend an der Steuerung des PIT beteiligt ist (Dickinson et al., 2000; Wyvell und Berridge, 2000), ist bisher wenig über die genauen neurochemischen Mechanismen innerhalb des Acb bekannt. Um einen besseren Einblick in die genauen Prozesse der mesoaccumbalen Dopamintransmission beim generellen PIT zu erhalten, wurden abschließend in Experiment 3 überprüft, ob die D₁- und die D₂-Rezeptoren in sowohl AcbC als auch AcbSh an der Vermittlung des generellen PIT beteiligt sind.

6 Durchgeführte Experimente

6.1 Experiment 1: Effects of a systemic AMPA/KA and NMDA receptor blockade on pavlovian-instrumental transfer

Psychopharmacology (Berl) 182: 290 – 296

Seiten: 51 - 57

6.2 Experiment 2: Inactivation of the ventral tegmental area abolished the general excitatory influence of Pavlovian cues on instrumental performance

Learn Mem 13: 123 – 126

Seiten: 58 - 61

6.3 Experiment 3: Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer

Learn Mem 15: 483 – 491

Seiten: 62 - 70

Anja Murschall · Wolfgang Hauber

Effects of a systemic AMPA/KA and NMDA receptor blockade on pavlovian–instrumental transfer

Received: 1 April 2005 / Accepted: 10 May 2005 / Published online: 2 July 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract *Rationale:* Pavlovian stimuli can markedly elevate instrumental responding directed toward a common reward, an effect known as pavlovian–instrumental transfer (PIT). PIT critically depends on the amygdala and nucleus accumbens (ACB); however, little is known yet about its neurochemical basis. *Objective:* Here we examined the role of ionotropic glutamate receptors in PIT. *Methods:* The effects of a systemic blockade of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate/kainate (AMPA/KA) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors on PIT and locomotor activity were investigated in rats. *Results:* The competitive AMPA/KA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (CNQX) (1.5 mg/kg i.p.) did not alter the overall rate of lever pressing and left PIT intact, i.e. presentation of a pavlovian stimulus significantly enhanced instrumental responding. Furthermore, CNQX did not affect horizontal and vertical activity in an open field. The non-competitive NMDA receptor antagonist (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo [*a,d*]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (dizocilpine) (0.08 mg/kg i.p.) elevated the overall rate of lever pressing but did not affect PIT. In addition, dizocilpine increased horizontal and decreased vertical activity in an open field. *Conclusions:* Previous studies imply that the training protocol used here induced a general, not outcome-specific, form of PIT which is mediated by the central nucleus of the amygdala (CeN) through modulation of mesoaccumbens dopamine transmission. Thus, we suggest that an AMPA/KA and NMDA receptor blockade did not affect PIT here because the general motivational influence of pavlovian stimuli to induce PIT is conveyed by GABAergic projections from the CeN to midbrain dopaminergic neurons.

Keywords Instrumental conditioning · Pavlovian conditioning · Glutamate · AMPA/KA · NMDA · Rat

Introduction

Appetitive pavlovian stimuli can markedly elevate instrumental responding directed toward a common reward, a phenomenon termed pavlovian–instrumental transfer (PIT) (Estes 1948; Lovibond 1983; for review, see Dickinson and Balleine 1994). PIT probably reflects excitatory effects of pavlovian stimuli on instrumental responding, which rely on their general motivational as well as sensory-specific influences (Balleine 1994; Colwill and Motzkin 1994; Dickinson and Dawson 1987). Therefore, general and outcome-specific forms of PIT can be separated experimentally (e.g. Corbit and Balleine 2005).

The amygdala and nucleus accumbens (ACB) are key structures in mediating PIT (Blundell et al. 2001; Corbit and Balleine 2005; Hall et al. 2001; Holland and Gallagher 2003); however, little is known yet about its neurochemical basis. There is consistent evidence for a dopaminergic involvement as systemic administration of dopamine receptor antagonists eliminated (Dickinson et al. 2000), whereas intra-ACB infusion of amphetamine enhanced PIT (Wyvell and Berridge 2000). By contrast, a role of glutamate signalling in PIT has been largely neglected, although likely, for several reasons. For instance, anatomical studies demonstrate massive glutamatergic projections from the basolateral amygdala (BLA) to ACB and midbrain (Wright et al. 1996), i.e. major components of a circuit implicated in conveying pavlovian influences on instrumental responding (Hall et al. 2001). In addition, behavioural studies revealed that *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate/kainate (AMPA/KA) receptors in the ACB play a critical role in speeding instrumental action probably by mediating the invigorating impact of pavlovian stimuli (e.g. Gierler et al. 2003). Therefore, we examined here the effects of a systemic blockade of AMPA/KA and NMDA receptors on PIT.

A. Murschall · W. Hauber (✉)
Abteilung Tierphysiologie, Biologisches Institut,
Universität Stuttgart,
Pfaffenwaldring 57,
70550 Stuttgart, Germany
e-mail: hauber@bio.uni-stuttgart.de
Tel.: +49-711-6855003
Fax: +49-711-6855090

Materials and methods

Subjects

Subjects were 35 naive male Lister hooded rats (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Germany) weighing 155–200 g on arrival. Rats were housed in groups of five animals in a temperature-controlled room at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12:12-h light–dark cycle (lights on at 7.00 A.M.) with free access to water and standard laboratory maintenance chow (Altromin, Lage, Germany). Before the onset of behavioural training, food was restricted to 15 g per animal per day to maintain ~85% of the animals free-feeding weight. All animal experiments were conducted according to the German law on animal protection and approved by the proper authorities.

Apparatus

Conditioning and testing took place in three identical operant chambers ($24 \times 21 \times 30$ cm) (Med Associates, St. Albans, VT, USA) housed within sound-attenuating cubicles. Each operant chamber was equipped with a food receptacle, a food dispenser which delivered one pellet (45 mg pellets, Bioserve, Frenchtown, NJ, USA) when activated and a retractable lever on the left side of the food receptacle. Illumination was provided by a 24 V/3 W houselight mounted on the top-centre of the wall opposite the food receptacle. The speaker, which delivered the auditory-conditioned stimuli, was mounted on the wall opposite the lever and the food receptacle. A computer system (MedPC-Software; Med Associates) controlled the equipment and recorded the data.

Locomotor activity was examined in an open field (70×70 cm) divided into nine squares of equal size. The testing area was illuminated by two red light bulbs (20 W), ventilated by a computer fan and surrounded by a cubicle providing optical and acoustical isolation. Horizontal and vertical motor activity was monitored by a video recording system and analysed off-line.

Behavioural procedure

Pavlovian–instrumental transfer

This experiment comprised three main stages: pavlovian training, instrumental training and transfer testing; in this latter stage, the effect of the pavlovian stimuli on instrumental behaviour was analysed in extinction. The behavioural procedure was similar to a protocol by Dickinson et al. (2000). Each session started with the illumination of the houselight and insertion of the lever where appropriate and ended with the retraction of the lever and turning off of the houselight.

Magazine training First, all subjects ($N=35$) received one session of magazine training to habituate the animals to the operant chambers. During magazine training, food pellets (45 mg pellets, Bioserve) were delivered on a random time (RT) 30-s schedule with no lever available.

Pavlovian training Twelve sessions of pavlovian training were given with the lever retracted. Two 80-dB auditory stimuli (3-kHz tone and white noise) served as CS+ and CS– in a counterbalanced fashion. Each session contained six 2-min presentations of the CS+, followed by an inter-stimulus interval (ISI) of 2–4 min. Reward was delivered only during the presentation of the CS+ on an RT-30-s schedule. For approximately half of the animals the CS+ was the tone, and for the other half the CS+ was the white noise. As a measure of pavlovian conditioning, the total time the animal spend in the food receptacle during CS+ and ISI was recorded via a photobeam in the food receptacle.

Instrumental training Following pavlovian training, all animals received nine instrumental training sessions with the lever inserted. Responding on the lever was reinforced on a random interval (RI) schedule starting with RI-2 s during the first session. For the next two sessions, the schedule was increased to RI-15 and RI-30 s, and, for the remaining six sessions, to RI-60 s. The total numbers of lever presses were recorded and the session ended after 30 min.

Reminder and instrumental extinction Subsequent to instrumental training, one pavlovian reminder was given to habituate unconditioned responses to the CS–. This session was similar to pavlovian training sessions except that two additional, not reinforced, 2-min presentations of the alternative neutral stimuli (CS–) and additional ISI were given preceding the fifth and following the sixth presentation of the CS+. In addition, the animals received a single 30-min instrumental extinction session with the lever available, but not reinforced.

Transfer test The effects of pavlovian stimuli on instrumental behaviour was tested in extinction, whereas the lever was inserted into the operant chamber. Each stimulus (CS+ and CS–) was 2 min in duration and preceded by a 2-min ISI period. The session always started with the presentation of the CS+ and ended after four presentations of each stimulus type (CS+ and CS–). The total numbers of lever presses during the transfer test were recorded separately for CS+, CS– and ISI. Subjects were assigned to three different groups receiving either 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (CNQX) ($n=10$), (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5, 10-imine hydrogen maleate (dizocilpine) ($n=10$) or saline ($n=15$) before the transfer test.

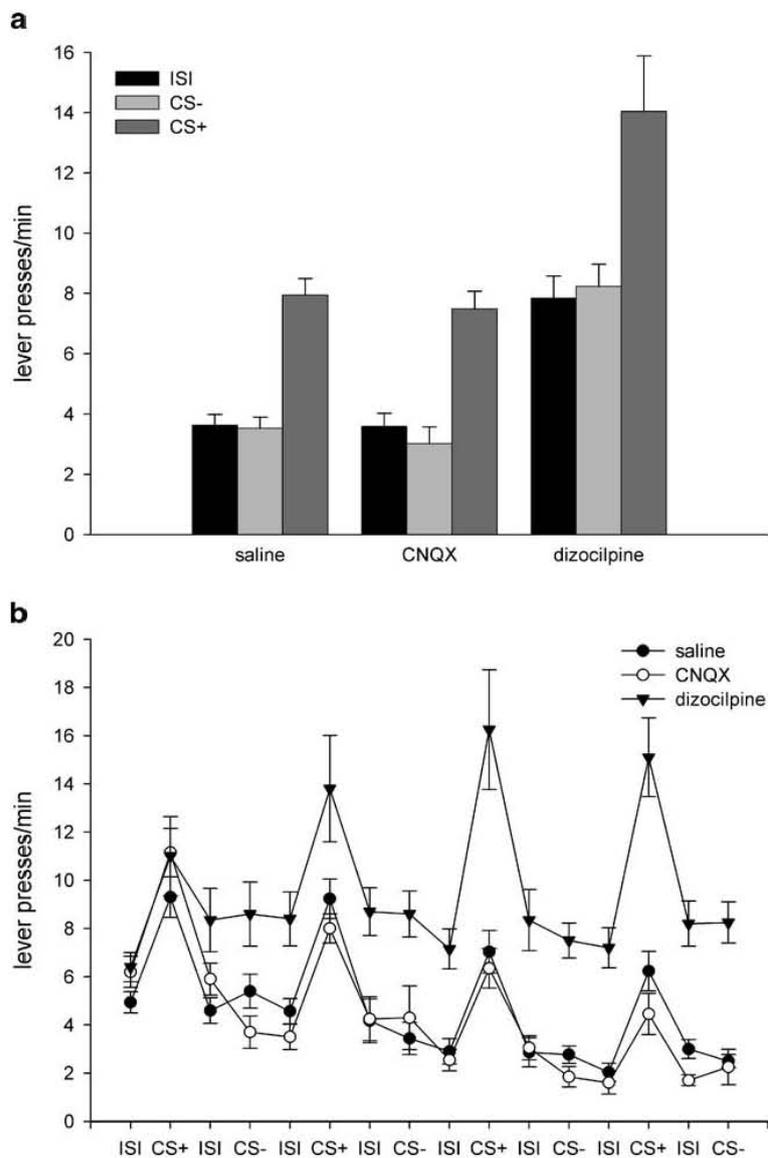
Open field

Subsequent to pavlovian-instrumental transfer testing, effects of CNQX and dizocilpine on locomotor activity were assessed in a subgroup of rats. Subjects received either injections of dizocilpine ($n=14$), CNQX ($n=8$) or saline ($n=6$) and were placed into the open field for 30 min. The number of line crossings (horizontal activity) and rearings (vertical activity) in six 5-min intervals was counted.

Drugs

CNQX (Sigma, Steinheim, Germany) and dizocilpine (RBI, Natick, MA, USA) were dissolved in physiological saline (0.9%). CNQX (1.5 mg/kg i.p.) and dizocilpine (0.08 mg/kg i.p.) were administered 20 min before the onset of the transfer test and open-field experiment, respectively, in a volume of 1 ml/kg; control subjects received saline (1 ml/kg i.p.) in both experiments.

Fig. 1 Pavlovian-instrumental transfer. Systemic administration of CNQX (1.5 mg/kg i.p.) or dizocilpine (0.08 mg/kg i.p.) did not affect pavlovian-instrumental transfer. **a** Overall mean lever presses during the transfer test session. **b** Mean lever presses as a function of the temporal order of stimulus presentation during the transfer test session; CS+, conditioned stimulus; CS-, neutral stimulus; ISI, interstimulus interval (2 min in duration, respectively). The CS+ significantly elevated instrumental responding relative to CS- and ISI in all treatment groups. In dizocilpine-, but not in CNQX-treated subjects, the level of instrumental responding was significantly increased relative to saline-treated subjects



Statistical analysis

Data are presented as means with standard errors of the mean (\pm SEM). Lever-press rates from pavlovian-instrumental transfer were subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, with drug as between-subjects factor and stimulus as within-subjects factor. Significant main effects were investigated post hoc using the Tukey HSD test. Locomotor activity counts were analysed by an ANOVA for repeated measures, with drug as between-subjects factor and time as within-subjects factor. Significant main effects were investigated post hoc using the Tukey HSD test; significant interactions were

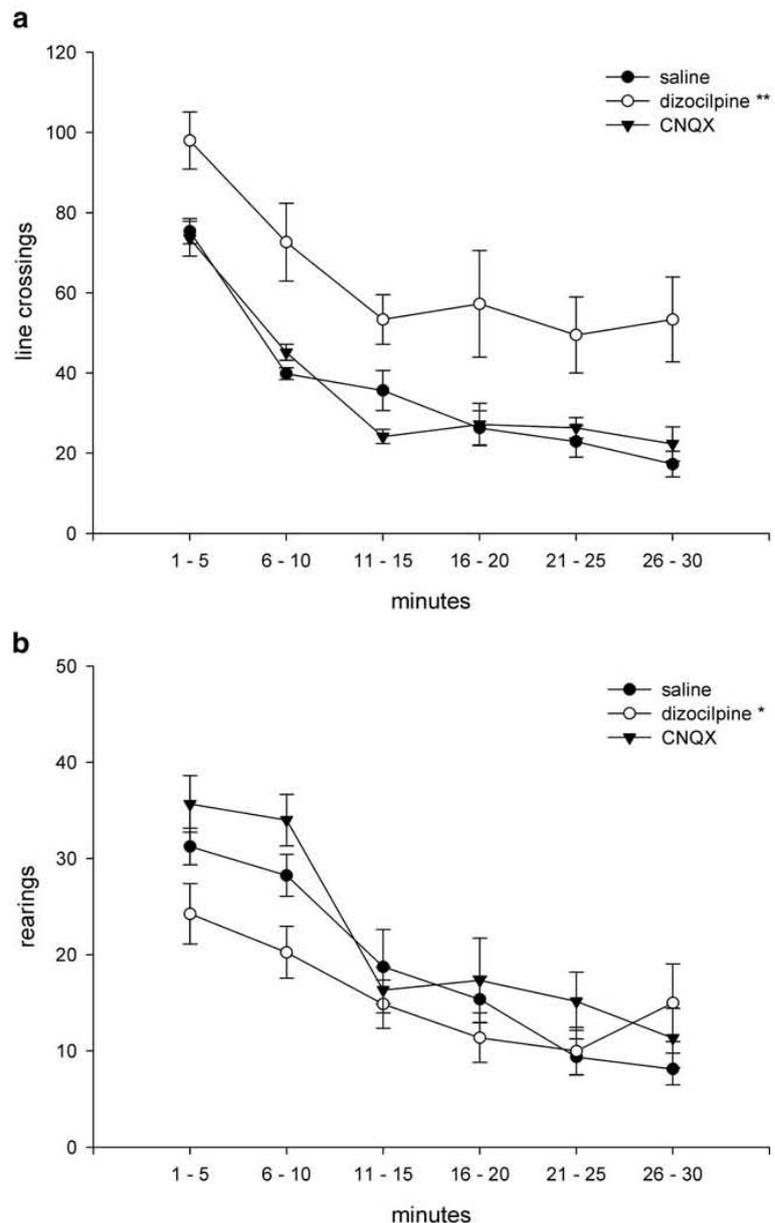
further analysed by a test for simple main effects. The level of statistical significance was $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out using STATISTICA Version 6.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Results

Pavlovian-instrumental transfer

Pavlovian training Stimulus-directed behaviour during pavlovian training over 12 days was measured by calculating the approach ratio, i.e. the percentage of time spent

Fig. 2 Effects of systemic administration of CNQX (1.5 mg/kg i.p.), dizocilpine (0.08 mg/kg i.p.) or saline (1 ml/kg i.p.) on locomotor activity in an open field. **a** Horizontal activity measured by the number of line crossing in 5-min intervals (** $p < 0.001$, main effect of drug compared to saline treatment). **b** Vertical activity measured by the number of rearings in 5-min intervals (* $p < 0.01$, Drug \times Time interaction compared to saline treatment). Dizocilpine produced a general increase in horizontal activity and an initial decrease in horizontal activity



in the food receptacle during CS+ and the percentage of time spent in the food receptacle during ISI as follows: approach ratio=(% CS)/(% CS+% ISI) (e.g. Cardinal et al. 2003). The mean approach ratio from all subjects ($N=35$) was $62\pm 2\%$ on day 1 and $65\pm 2\%$ on day 12.

Instrumental training All animals acquired instrumental responding over 9 days. The number of responses increased from 3.29 ± 0.20 lever presses/min on day 1 to 10.46 ± 0.38 on day 9. In the subsequent extinction session, instrumental responses decreased to 6.30 ± 0.21 lever presses/min.

Transfer test Presentation of the pavlovian stimulus (CS+) increased instrumental behaviour relative to the non-reinforced stimulus (CS-) and ISI, and this effect was evident in all treatment groups (Fig. 1a). The elevation of lever pressing during CS+ compared to CS- and ISI was similar regardless of CS+ identity (tone or white noise) which was used in a counterbalanced way across all treatment groups. A one-way ANOVA indicated that the transfer effect induced by tone vs white noise did not differ significantly [$F_{(1,33)}=0.028$; $p=0.96$]; therefore, respective data were collapsed. A two-way ANOVA, with drug as between-group factor (three levels: saline, CNQX and dizocilpine) and stimulus as within-subject factor (three levels: CS+, CS- and ISI), revealed a significant main effect of drug [$F_{(2,32)}=22.79$; $p<0.001$] and a significant main effect of stimulus [$F_{(2,64)}=86.08$; $p<0.001$], but no drug \times stimulus interaction [$F_{(4,64)}=1.32$; $p=0.271$]. Post hoc analysis on significant main effects indicated that lever presses were significantly higher during presentation of the CS+ as compared with CS- or ISI ($p<0.001$; Tukey HSD test) in all treatment groups. Furthermore, lever presses were significantly higher after dizocilpine ($p<0.001$; Tukey HSD test), but not after CNQX, relative to saline.

In addition, a detailed analysis of the time course of effects showed that presentation of the CS+ increased instrumental behaviour throughout the session regardless of the time of presentation and drug treatment (Fig. 1b). A two-way ANOVA, with drug as between-group factor (three levels: saline, CNQX and dizocilpine) and stimulus/time-block as within-subject factor, revealed a significant main effect of drug [$F_{(2,32)}=23.56$; $p<0.001$], a significant main effect of stimulus/time-block [$F_{(15,480)}=31.18$; $p<0.001$] and a significant drug \times stimulus/time-block interaction [$F_{(30,480)}=3.93$; $p<0.001$] (Fig. 1b). Post hoc comparison on significant main effects indicated that lever presses were significantly higher during CS+ relative to CS- and ISI ($p<0.001$; Tukey HSD test). In addition, lever presses were significantly higher after dizocilpine ($p<0.001$; Tukey HSD test), but not after CNQX, compared with saline.

Open field

Horizontal activity ANOVA revealed significant main effects of drug [$F_{(2,25)}=15.03$; $p<0.001$] and time [$F_{(5,125)}=76.25$; $p<0.001$], but no significant drug \times time interaction

[$F_{(10,125)}=1.31$; n.s.]. Post hoc comparisons on drug effects using the Tukey HSD test further demonstrated a significant effect of dizocilpine, but not of CNQX, compared to saline (Fig. 2a).

Vertical activity ANOVA indicated no significant main effect of drug [$F_{(2,25)}=2.83$; $p=0.078$], but of time [$F_{(5,125)}=40.76$; $p<0.001$]. In addition, there was a significant drug \times time interaction [$F_{(10,125)}=2.68$; $p<0.01$]. Further analysis of simple main effects revealed a significant dose \times time interaction between dizocilpine and saline [$F_{(5,100)}=4.07$; $p<0.01$], but not between CNQX and saline [$F_{(5,90)}=0.99$; n.s.]. Figure 2b shows that the vertical activity was considerably less during the first 10 min in dizocilpine-treated rats compared to saline-treated animals.

Discussion

The results of these experiments demonstrate that a systemic blockade of AMPA/KA and NMDA receptors did not impair PIT, a transfer effect which probably reflects the excitatory impact of pavlovian stimuli on instrumental responding.

Dizocilpine is a selective non-competitive NMDA receptor antagonist which induces prominent motor stimulant effects, e.g. hyperlocomotion and stereotypies (Clineschmidt et al. 1982b; Kloog 1988). The dose used here was shown to produce motor stimulation, but not, as higher doses are used, muscle relaxation and ataxia (e.g. Danysz et al. 1994), which could compromise instrumental action. In keeping with previous findings (Clineschmidt et al. 1982a; Danysz et al. 1994; Loscher and Honack 1992), our present data reveal that systemic administration of dizocilpine at a dose of 0.08 mg/kg i.p. significantly increased horizontal locomotor activity in the open field but had only moderate effects on vertical activity. Thus, the general increase in lever pressing seen here after dizocilpine administration might also rely on motor stimulant actions of a systemic NMDA receptor blockade. By contrast, the competitive AMPA/KA receptor antagonist CNQX (Sheardown 1993) altered neither horizontal and vertical activity in the open field nor the general rate of lever pressing. The lack of motor effects is unlikely to reflect inappropriate dosing. In general, systemic administration of CNQX, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX) and other AMPA/KA receptor antagonists did not affect spontaneous motor behaviour (Danysz et al. 1994; Hauber and Andersen 1993; Klockgether et al. 1991) but, for instance, increased motor stimulant effects of L-DOPA (Klockgether et al. 1991). As with dizocilpine, the dose of CNQX used here was shown to induce behavioural effects, but not, as higher doses are used, muscle relaxation, which could interfere with instrumental responding (Backstrom and Hyttia 2003). For instance, systemic administration of CNQX given at the same dose (1.5 mg/kg) and to the same conditions (i.p. administration 20 min before behavioural testing) as here did not alter locomotor activity but attenuated ethanol-seeking behaviour elicited

by ethanol-associated stimuli (Backstrom and Hyytia 2004) and reinstatement of cocaine seeking under a second order schedule (Backstrom and Hyytia 2003). Although reinstatement of cocaine seeking was also attenuated by a higher dose (3 mg/kg), this effect was attributed in part to CNQX-induced motor impairments (Backstrom and Hyytia 2003), an observation which prompted us to use a lower dose (1.5 mg/kg). Given these results, CNQX treatment should be effective in our experiment, although the general rate of lever pressing during PIT and locomotor activity in the open field was not altered.

Notably, CNQX and dizocilpine did not interfere with PIT, suggesting that ionotropic glutamate receptors may not be involved in mediating this transfer effect. Furthermore, these results imply that neither drug produced sensorimotor impairments as the magnitude of PIT was similar across all treatment groups. The finding of intact PIT after ionotropic glutamate receptor blockade was surprising in view of the neural circuits implicated in PIT, which comprise prominent glutamatergic projections. For instance, lesion studies suggest that PIT critically depends on the ACB (de Borchgrave et al. 2002; Hall et al. 2001), a structure with strong glutamatergic input from cortex and BLA (Wright et al. 1996). In addition, lesions of the central nucleus of the amygdala (CeN) reduced PIT, whereas lesions of the BLA had no effect (Hall et al. 2001; Holland and Gallagher 2003). In contrast to these findings, Blundell et al. (2001) reported that BLA, but not CeN lesions, abolished PIT. These apparently discrepant results are likely to be due to different training protocols and forms of PIT used in these experiments. A recent study by Corbit and Balleine (2005) addressing this issue revealed that both BLA and CeN contribute to PIT, but their involvement depends on the form of PIT, i.e. the BLA conveys the outcome-specific form of PIT, whereas the CeN serves the general form of PIT. The general form of PIT is thought to rely on the general motivating effects of an appetitive pavlovian stimulus, i.e. instrumental responding may be enhanced during presentation of an appetitive CS+ as a result of non-specific motivational arousal. The outcome-specific form of PIT refers to another mechanism through which pavlovian CS probably modulates instrumental responding, i.e. an appetitive CS+ may also act selectively to energize an instrumental action—in the presence of other response options—with which it shares the same outcome. In the present as in various other studies (Hall et al. 2001; Holland and Gallagher 2003), a PIT procedure was employed in which rats were trained on a single lever, and the effect of a single pavlovian stimulus on performance of that lever was measured. This protocol generates a form of PIT which relies on the general motivational influence of the pavlovian stimulus and is mediated by the CeN (Corbit and Balleine 2005). Thus, although not explicitly examined, the transfer test used here might involve the general form of PIT mediated by the CeN.

As stimulation of mesoaccumbens dopamine neurotransmission increased PIT (Wyvell and Berridge 2000), the CeN has been suggested to control PIT by modulating the activity of mesoaccumbens dopamine projections (Hall et al.

2001) through efferents to the vicinity of midbrain dopamine neurons (Wallace et al. 1992). Importantly, CeN projections to the midbrain use γ -amino-butyric acid (GABA) as a neurotransmitter (Swanson and Petrovich 1998). Furthermore, the input from the CeN to midbrain dopamine neurons might not be direct but probably involves projections to non-dopamine neurons (Wallace et al. 1992), which in part express GABA receptors (Suaud-Chagny et al. 1992). Accordingly, inactivation of the CeN was associated with decreased basal levels of dopamine efflux in the ACB (Ahn and Phillips 2002). In view of this connectivity, we suggest that an AMPA/KA and NMDA receptor blockade did not affect PIT here, because the general motivational influence of pavlovian stimuli to induce PIT is conveyed by GABAergic projections from the CeN to midbrain dopaminergic neurons. However, a recent study with knock-out mice indicates an involvement of AMPA GluR2 subunits in PIT (Mead and Stephens 2003). However, mutants with a GluR2 deletion show an increased calcium influx, through AMPA receptor-gated ion channels and a facilitated AMPA-dependent long-term potentiation (Jia et al. 1996) and the behavioural effects of these functional AMPA receptor changes are therefore difficult to relate to those of a competitive AMPA receptor blockade used here.

Taken together, our present results demonstrate that a systemic blockade of AMPA/KA and NMDA receptors did not affect PIT. One possibility to explain these findings is that we tested a general form of PIT which critically involves the CeN modulating midbrain mesoaccumbens dopamine neurons by GABAergic projections.

Acknowledgements We thank Prof. A. Dickinson for helpful comments on PIT.

This research was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Ha2340/6-1).

References

- Ahn S, Phillips AG (2002) Modulation by central and basolateral amygdalar nuclei of dopaminergic correlates of feeding to satiety in the rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 22:10958–10965
- Backstrom P, Hyytia P (2003) Attenuation of cocaine-seeking behaviour by the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 166:69–76
- Backstrom P, Hyytia P (2004) Ionotropic glutamate receptor antagonists modulate cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. *Alcohol Clin Exp Res* 28:558–565
- Balleine B (1994) Asymmetrical interactions between thirst and hunger in pavlovian instrumental transfer. *Q J Exp Psychol B* 47:211–231
- Blundell P, Hall G, Killcross S (2001) Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *J Neurosci* 21:9018–9026
- Cardinal RN, Parkinson JA, Marbini HD, Toner AJ, Bussey TJ, Robbins TW, Everitt BJ (2003) Role of the anterior cingulate cortex in the control over behavior by pavlovian conditioned stimuli in rats. *Behav Neurosci* 117:566–587
- Clineschmidt BV, Martin GE, Bunting PR, Papp NL (1982a) Central sympathomimetic activity of MK-801, a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties. *Drug Dev Res* 2:135

- Clineschmidt BV, Martin GE, Bunting PR (1982b) Anticonvulsant activity of (1)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a, d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic, and apparent anxiolytic properties. *Drug Dev Res* 2:123-134
- Colwill RM, Motzkin DK (1994) Encoding of the unconditioned stimulus in pavlovian conditioning. *Anim Learn Behav* 22:384-394
- Corbit LH, Balleine B (2005) Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general outcome-specific forms of pavlovian instrumental transfer. *J Neurosci* 25:962-970
- Danysz W, Essmann U, Bresink I, Wilke R (1994) Glutamate antagonists have different effects on spontaneous locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48:111-118
- de Borchgrave R, Rawlins JN, Dickinson A, Balleine BW (2002) Effects of cytotoxic nucleus accumbens lesions on instrumental conditioning in rats. *Exp Brain Res* 144:50-68
- Dickinson A, Balleine B (1994) Motivational control of goal-directed action. *Anim Learn Behav* 22:1-18
- Dickinson A, Dawson GR (1987) Pavlovian processes in the motivational control of instrumental performance. *Q J Exp Psychol* 39:201-213
- Dickinson A, Smith J, Mirenowicz J (2000) Dissociation of pavlovian and instrumental incentive learning under dopamine antagonists. *Behav Neurosci* 114:468-483
- Estes W (1948) Discriminative conditioning. II. Effects of a pavlovian conditioned stimulus upon a subsequently established operant response. *J Exp Psychol* 38:173-177
- Gierler C, Bohn I, Hauber W (2003) The rat nucleus accumbens is involved in guiding of instrumental responses by stimuli predicting reward magnitude. *Eur J Neurosci* 18:1993-1996
- Hall J, Parkinson JA, Connor TM, Dickinson A, Everitt BJ (2001) Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating pavlovian influences on instrumental behaviour. *Eur J Neurosci* 13:1984-1992
- Hauber W, Andersen R (1993) The non-NMDA glutamate receptor antagonist GYKI 52466 counteracts locomotor stimulation and anticataleptic activity induced by the NMDA antagonist dizocilpine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348:486-490
- Holland PC, Gallagher M (2003) Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and pavlovian instrumental transfer. *Eur J Neurosci* 17:1680-1694
- Jia Z, Agopyan N, Miu P, Xiong Z, Henderson J, Gerlai R, Taverna FA, Velumian A, MacDonald J, Carlen P, Abramow-Newerly W, Roder J (1996) Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17:945-956
- Klockgether T, Turski L, Honore T, Zhang ZM, Gash DM, Kurlan R, Greenamyre JT (1991) The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 30:717-723
- Kloog Y (1988) Mode of binding of [³H]dibenzocycloalkenimine (MK-801) to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and its therapeutic implications. *FEBS* 230:167-170
- Loscher W, Honack D (1992) The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol* 215:199-208
- Lovibond PF (1983) Facilitation of instrumental behavior by a pavlovian appetitive conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 9:225-247
- Mead AN, Stephens DN (2003) Involvement of AMPA receptor GluR2 subunits in stimulus-reward learning: evidence from glutamate receptor *gria2* knock-out mice. *J Neurosci* 23:9500-9507
- Sheardown MJ (1993) The pharmacology of AMPA receptors and their antagonists. *Stroke* 24:1146-1147 (discussion 1153-1154)
- Suaud-Chagny MF, Chergui K, Chouvet G, Gonon F (1992) Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 49:63-72
- Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331
- Wallace DM, Magnuson DJ, Gray TS (1992) Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. *Brain Res Bull* 28:447-454
- Wright CI, Beijer AV, Groenewegen HJ (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci* 16:1877-1893
- Wyvell CL, Berridge KC (2000) Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *J Neurosci* 20:8122-8130

Brief Communication

Inactivation of the ventral tegmental area abolished the general excitatory influence of Pavlovian cues on instrumental performance

Anja Murschall and Wolfgang Hauber¹

Abteilung Tierphysiologie, Biologisches Institut Universität Stuttgart, D-70550 Stuttgart, Germany

Pavlovian stimuli can markedly elevate instrumental responding, an effect known as Pavlovian-instrumental transfer (PIT). As the role of the ventral tegmental area (VTA) in PIT is yet unknown, we examined the effects of transient VTA inactivation by direct microinjections of a mixture of the GABA_A and GABA_B receptor agonists, muscimol and baclofen. Results reveal that PIT, i.e., the increase in instrumental responding during presentation of a Pavlovian stimulus, was abolished by intra-VTA microinjections of muscimol/baclofen. These data provide the first evidence that the VTA mediates Pavlovian influences on instrumental behavior.

Appetitive Pavlovian stimuli can markedly elevate instrumental responding, a phenomenon termed Pavlovian-instrumental transfer (Estes 1948; Lovibond 1983; for review, see Dickinson and Balleine 1994). Pavlovian-instrumental transfer (PIT) probably reflects the excitatory effects of Pavlovian stimuli on instrumental responding and can be mediated by both the general motivational and the sensory-specific influences of the Pavlovian CS (for review, see Dickinson and Balleine 2002). Hence, general and outcome-specific forms of PIT can be separated experimentally (e.g., Corbit and Balleine 2005). The amygdala and nucleus accumbens are key structures in mediating PIT (Blundell et al. 2001; Hall et al. 2001; Holland and Gallagher 2003; Corbit and Balleine 2005). However, little is known about the neurochemical basis of PIT. There is consistent evidence for a dopaminergic involvement as systemic administration of dopamine receptor antagonists eliminated (Dickinson et al. 2000), whereas intra-accumbens microinjection of amphetamine enhanced PIT (Wyvell and Berridge 2000). Therefore, PIT may depend upon the regulation of the dopaminergic innervation of the nucleus accumbens by projections from the amygdala to the ventral tegmental area (VTA) (Hall et al. 2001). However, the role of the VTA in PIT is yet unknown. Here, we examined the effects of VTA inactivation on PIT by direct microinjections of a mixture of the GABA_A and GABA_B agonists, muscimol, and baclofen.

First, 12 sessions of Pavlovian training were given. Stimulus-directed behavior during Pavlovian training was measured by calculating the approach ratio, i.e., the percentage of time spent in the food receptacle during CS+ and the percentage of time spent in the food receptacle during ISI as follows: Approach ratio = (%CS)/(%CS + %ISI). The mean approach ratio from all subjects ($n = 32$) during Pavlovian training significantly increased as displayed in Figure 1A. A one-way ANOVA conducted on the training data revealed a significant effect of training day ($F_{(11,341)} = 13.1$, $P < 0.0001$).

Then, animals received nine instrumental training sessions. The number of lever presses per minute across days of instrumental training is displayed in Figure 1B. A one-way ANOVA revealed a significant effect of training day ($F_{(8,248)} = 42.5$, $P < 0.0001$). The transfer test revealed that presentation of the Pavlovian

stimulus (CS+) enhanced lever pressing relative to the non-reinforced stimulus (CS0) and ISI, but this effect differed across treatment groups as shown in Figure 1C. A one-way ANOVA indicated that lever press rates during presentation of CS+ and CS0 did not depend on CS identity (tone, white noise; counterbalanced). Therefore, tone and white noise were equally effective as CSs and respective data were collapsed. In rats with intra-VTA saline injections the CS+ markedly elevated responding relative to the CS0 and ISI, while in rats with intra-VTA baclofen/muscimol injections, this transfer effect was impaired. The statistical analysis confirmed this description. A two-way ANOVA with treatment as between-subject factor (four levels: 0/0, 0.03/0.003, 0.06/0.006, 0.08/0.008 nmol baclofen/muscimol) and stimulus as within-subject factor (three levels: ISI, CS0, and CS+) revealed a significant main effect of treatment ($F_{(3,28)} = 3.220$; $P = 0.038$), a significant main effect of stimulus ($F_{(2,56)} = 21.405$; $P < 0.0001$), and a treatment \times stimulus interaction ($F_{(6,56)} = 4.741$; $P < 0.0001$). Simple effects analysis revealed an effect of treatment during CS+ ($F_{(3,28)} = 5.30$; $P < 0.01$), but not during CS0 ($F_{(3,28)} = 0.98$; $P = 0.42$) or ISI ($F_{(3,28)} = 1.31$; $P = 0.29$), indicating that drugs did not affect baseline responding. Simple effects analysis further revealed a significant effect of stimulus type in groups treated with saline ($F_{(2,20)} = 11.84$; $P < 0.001$), 0.03/0.003 nmol baclofen/muscimol ($F_{(2,10)} = 7.91$; $P < 0.01$), and 0.06/0.006 nmol baclofen/muscimol ($F_{(2,10)} = 5.42$; $P < 0.05$), but not in the group treated with 0.08/0.008 nmol baclofen/muscimol ($F_{(2,16)} = 0.094$; $P = 0.91$). Post hoc comparisons using the Tukey HSD test revealed higher responding during CS+ relative to ISI and CS0 in the saline (ISI: $P < 0.01$, CS0: $P < 0.01$) and 0.03/0.003 nmol baclofen/muscimol (ISI: $P < 0.05$, CS0: $P < 0.05$) group, thus indicating a transfer effect. In the 0.06/0.006 nmol baclofen/muscimol group, the elevation of responding during CS+ versus ISI and CS0 (ISI: $P = 0.05$, CS0: $P = 0.036$) was close to the significance criterion indicating a lower transfer effect. The location of the injection cannulae tips within the VTA is shown in Figure 2.

The present study demonstrates that VTA inactivation by a mixture of the GABA_A and GABA_B receptor agonists, muscimol, and baclofen, abolished PIT. These data provide the first evidence that conveying Pavlovian influences on instrumental behavior requires neural activity in the VTA.

The effects of baclofen and muscimol on PIT are not attributable to nonspecific drug effects on response capacity. First, during presentation of the nonreinforced stimulus (CS0) and during ISI, lever-press rates in subjects with intra-VTA microinjection of

¹Corresponding author.

E-mail hauber@bio.uni-stuttgart.de; fax 49-711-685-5090.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.127106>.

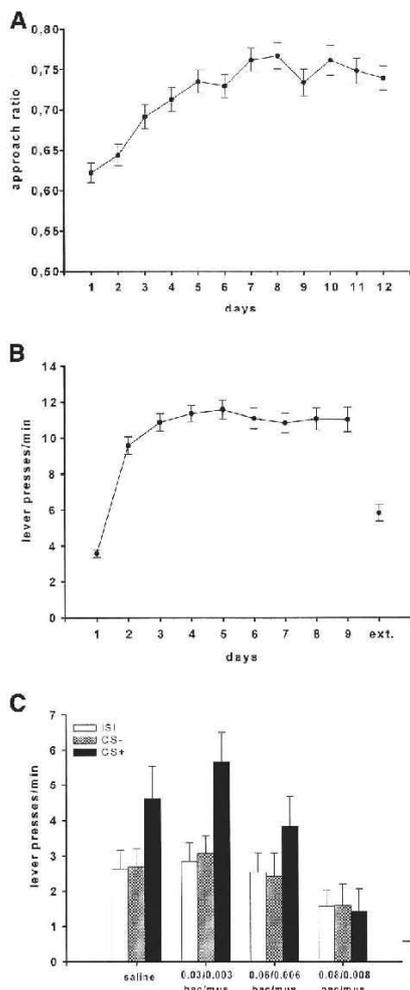


Figure 1. Pavlovian-instrumental transfer. (A) Pavlovian training. Mean approach ratio (\pm SEM), i.e., the ratio of time spent in the food receptacle during CS+ and time spent in the food receptacle during ISI, across 12 d of training ($n = 32$). (B) Instrumental training. Mean lever presses (\pm SEM) across 9 d of training and during a subsequent extinction session without reinforcement ($n = 32$). (C) Transfer test. Effect of intra-VTA injection of saline ($n = 11$), 0.03/0.003 nmol ($n = 6$), 0.06/0.006 nmol ($n = 6$), or 0.08/0.008 nmol baclofen/muscimol ($n = 9$) on mean lever presses (\pm SEM) during presentation of CS+ and CS- as well as during ISI. The CS+ significantly elevated responding relative to CS- and ISI after saline (ISI: $P < 0.01$, CS-: $P < 0.01$), 0.03/0.003 nmol baclofen/muscimol (ISI: $P < 0.05$, CS-: $P < 0.05$), and 0.06/0.006 nmol baclofen/muscimol (ISI: $P = 0.05$, CS-: $P = 0.036$), but not after 0.08/0.008 nmol baclofen/muscimol ($n.s.$; ANOVA followed by a post hoc Tukey HSD test); (ext) extinction session; (CS+) conditioned stimulus; (CS-) unconditioned stimulus; (ISI) interstimulus interval (2 min in duration, respectively).

vehicle and baclofen/muscimol were largely similar; only the high dose (0.08/0.008 nmol baclofen/muscimol) did not significantly reduce lever-press rates. Second, in the PIT test used here, intra-VTA microinjections of doses of 0.1/0.01 nmol baclofen/muscimol and above are necessary to induce a motor impairment associated with a considerable reduction in lever pressing (A. Murschall, unpubl.). Third, in a number of other instrumental tasks, baclofen/muscimol-induced VTA inactivation using the same doses as here did not impair response capacity (McFarland

and Kalivas 2001; Di Ciano and Everitt 2004; McFarland et al. 2004). Moreover, behavioral effects after microinjection of baclofen/muscimol into the VTA compared to the substantia nigra are distinct (McFarland and Kalivas 2001), suggesting that drug diffusion to adjacent brain areas might not account for the present results.

PIT critically depends upon the integrity of the nucleus accumbens and the amygdala. For instance, lesions of the nucleus accumbens and the central nucleus of the amygdala (CeN) reduced PIT, while lesions of the basolateral amygdala (BLA) had no effect (Hall et al. 2001; Holland and Gallagher 2003). In contrast to these findings, Blundell et al. (2001) reported that BLA, but not CeN lesions, abolished PIT. These apparently discrepant results are likely to be brought about by different training protocols and forms of PIT used in these experiments. A recent study by Corbit and Balleine (2005) addressing this issue revealed that both BLA and CeN contribute to PIT, but their involvement depends on the form of PIT, i.e., the BLA conveys the outcome-specific form of PIT, while the CeN serves the general form of PIT. The general form of PIT is thought to rely on the general motivating effects of an appetitive Pavlovian stimulus, i.e., instrumental responding may be enhanced during presentation of an appetitive CS+ as a result of nonspecific motivational arousal. The outcome-specific form of PIT refers to another mechanism through which Pavlovian CSs probably modulate instrumental responding, i.e., an appetitive CS+ may also act to energize a specific instrumental action—in the presence of other response options—with which it shares the same outcome.

The present as well as various other studies (Hall et al. 2001; Holland and Gallagher 2003) used a PIT procedure in which rats were trained on a single lever, and the effect of a single Pavlovian stimulus on performance of that lever was measured. This protocol generates a form of PIT that relies on the general motivational influence of the Pavlovian stimulus and is mediated by the CeN (Corbit and Balleine 2005). Thus, though not explicitly examined, the transfer test used here might involve the general

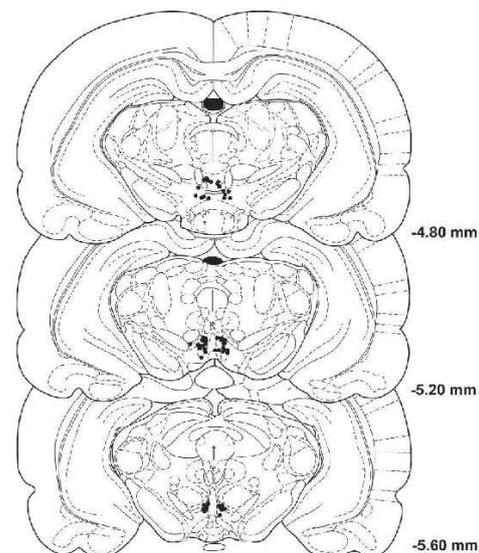


Figure 2. Cannulae placement in the VTA. The schematics depict the location of the injection cannulae tips (\bullet) in the VTA for all rats ($n = 32$). Plates are adaptations from Paxinos and Watson (1986), with permission from Elsevier \copyright 1986. Numbers beside each plate correspond to millimetres anterior to bregma.

form of PIT mediated by the CeN. As stimulation of mesoaccumbens dopamine neurotransmission increased PIT (Wyvell and Berridge 2000), the CeN has been suggested to control PIT by modulating the activity of mesoaccumbens dopamine projections (Hall et al. 2001) through efferents to the vicinity of midbrain dopamine neurons (Wallace et al. 1992). Notably, CeN projections to the midbrain utilize γ -amino-butyric acid (GABA) as neurotransmitter (Swanson and Petrovich 1998). Furthermore, the input from the CeN to midbrain dopamine neurons might not be direct, but probably involves projections to nondopamine neurons (Wallace et al. 1992), which partially express GABA receptors (Suaud-Chagny et al. 1992). Accordingly, inactivation of the CeN was associated with decreased basal levels of dopamine efflux in the ACB (Ahn and Phillips 2002). Our findings correspond to this account and demonstrate directly a VTA involvement in mediating the general form of PIT, probably as a key component of a circuit from the CeN to the nucleus accumbens.

Drug-associated cues play an important role in relapse to drug use in humans and animals (Hyman 2005). For instance, contingent presentation of previously cocaine-related cues can reinstate cocaine-seeking behavior in rats (Everitt and Wolf 2002). PIT—which involves noncontingent stimulus presentation—probably plays a major role in CS-induced reinstatement of drug seeking as well (Ludwig et al. 1974; Tiffany and Drobes 1990; Gawin 1991; O'Brien et al. 1998); however, its contribution to these processes has been rarely investigated. Weiss et al. (2000, 2001) reported that noncontingent presentation of a previously cocaine-paired cue massively elevated cocaine seeking and increased intra-accumbens dopamine release. These effects might reflect an impact of PIT on relapse, and our present results suggest that they could be mediated, at least in part, by the VTA conveying the general motivational impact of cocaine-associated cues on instrumental responding. Furthermore, our findings raise the possibility that a VTA inactivation thereby blocking the general motivating influence of cocaine-related cues on instrumental behavior contributes to the decreased propensity to cue-induced cocaine seeking and reinstatement observed after systemic administration of GABA_B receptor agonists (O'Brien et al. 1998; Di Ciano and Everitt 2003). However, this view requires direct experimental support, e.g., by investigating whether a pharmacological manipulation of VTA GABA_B receptors interferes with the general motivational influence of cocaine-associated cues on instrumental behavior.

Taken together, our present results suggest that the VTA mediates the general motivational impact of Pavlovian stimuli on instrumental responding, probably as part of a circuit comprising projections from the CeN to midbrain dopaminergic neurons.

Materials and Methods

All animal experiments were conducted according to the German Law on Animal Protection and approved by the proper authorities.

Subjects were 32 male Lister hooded rats (Harlan-Winkelmann) weighing 240–359 g at the time of surgery. Rats were housed in groups at 20 ± 2°C on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with ad-libitum access to water and standard laboratory chow (Altromin). Prior to the onset of behavioral training, food was restricted to 15 g per animal/day.

For stereotaxic surgery, animals were anaesthetized with ketamine HCL (120 mg/kg; Bela-Pharm) and xylazine HCL (4 mg/kg Rompun; Bayer) and secured in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). Bilateral guide cannulae (0.8 mm outer diameter; TSK) aimed at the VTA were implanted using standard stereotaxic procedures. The coordinates were: 5.2 anterior bregma, ±1.2 to ±2.0 lateral to midline and 8.0 ventral from the skull (Paxinos and Watson 1986) with the guide cannulae positioned in an

angle of about 8° from the midline. Each rat was given at least 5 d to recover from surgery before the onset of behavioral training.

Animals received bilateral microinjections of a combination of the GABA_B receptor agonist (R)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)butanoic acid (baclofen [bac]; Biotrend GmbH) and the GABA_A receptor agonist 5-aminomethyl-3-hydroxyisoxazole (muscimol [mus]; Biotrend GmbH). Drugs were dissolved in physiological saline (0.9%) and injected at doses of 0.08/0.008 bac/mus (0.08 nmol baclofen and 0.008 nmol muscimol), 0.06/0.006 bac/mus (0.06 nmol baclofen and 0.006 nmol muscimol), and 0.03/0.003 bac/mus (0.03 nmol baclofen and 0.003 nmol muscimol); control subjects received bilateral vehicle injections of 0.3 μ L of saline.

All injections were delivered through injection cannulae (0.45 mm outer diameter; Braun) in a volume of 0.3 μ L over a 1-min interval; injection cannulae were left in position for a further minute to allow for diffusion. After injection, each animal remained in its home cage for an additional 10 min before being placed in the test chamber.

To adapt animals to the microinjection procedure, they received four sham injections including handling, insertion of injection cannulae dummies, and operation of the injection pump (without running an injection) prior to behavioral training on days 7–9 of instrumental training as well as the reminder session. On the day before the transfer test, i.e., the instrumental extinction session, all animals received a single intra-VTA injection of vehicle (0.3 μ L saline).

The behavioral procedures were performed in identical operant chambers (24 × 21 × 30 cm) (Med Associates) equipped with a food receptacle, a food dispenser, and a retractable lever on the left side of the food receptacle. Illumination was provided by a 24 V/3 W house light mounted on the top center of the wall opposite the food receptacle. The speaker that delivered the auditory conditioned stimuli was mounted on the wall opposite to the lever and the food receptacle.

The behavioral procedure (see Murschall and Hauber 2005 for details) was based on a protocol by Dickinson et al. (2000). First, all subjects received one session of magazine training; food pellets (45 mg pellets, Bioserve) were delivered on a random time (RT) 30-sec schedule with no lever available. Thereafter, 12 sessions of Pavlovian training were given. Two 80-dB auditory stimuli (3-kHz tone and white noise) served as CS+ and CS- in a counterbalanced fashion. Each session contained six 2-min presentations of the CS+, followed by an interstimulus interval (ISI) of 2–4 min. Reward was delivered only during the presentation of the CS+ on a RT 30-sec schedule. Then, animals received nine instrumental training sessions with the lever inserted. Responding on the lever was reinforced on a random interval (RI) schedule starting with RI 2-sec during the first session. For the next two sessions, the schedule was increased to RI 15-sec and RI 30-sec, and, for the remaining six sessions to RI 60-sec; a session ended after 30 min. Subsequently, one Pavlovian reminder was given. This session was similar to Pavlovian training sessions, except that two additional, nonreinforced 2-min presentations of the alternative neutral stimuli (CS-) and additional ISI were given preceding the fifth and following the sixth presentation of the CS+. In addition, the animals received a single 30-min instrumental extinction session with the lever available, but not reinforced.

The transfer effect was tested in extinction, while the lever was inserted into the operant chamber. Each stimulus (CS+ and CS-) was 2 min in duration and preceded by a 2-min ISI period. The session always started with the presentation of the white noise, thus counterbalancing the order of presentation of CS+ and CS- within each group, and ended after four presentations of each stimulus type (CS+ and CS-). Subjects were assigned to four different groups receiving either 0.08/0.008 baclofen/muscimol ($n = 9$), 0.06/0.006 baclofen/muscimol ($n = 6$), 0.03/0.003 baclofen/muscimol ($n = 6$), or saline ($n = 11$) prior to the transfer test.

After completion of the experiment, rats were killed with an overdose of sodium pentobarbital (150 mg/kg) (Sigma-Aldrich) to control for correct cannulae placements. Brains were removed,

fixed in 10% formalin for 24 h, and stored in 30% glucose. Coronal brain sections (40 μm) were collected, mounted on coated slides, and stained with cresyl violet. Cannulae placements were verified with reference to the atlas of Paxinos and Watson (1986).

Data from Pavlovian and instrumental training were subjected to an analysis of variances (ANOVA) for repeated measures with training day as factor. Pavlovian-instrumental transfer data were subjected to an ANOVA for repeated measures with treatment as between-subject factor and stimulus as within-subject factor. Significant interactions were further investigated by an analysis of simple effects. The level of statistical significance was $P < 0.05$.

Acknowledgments

This research was supported by the Deutsche DFG (Ha2340/6-1).

References

- Ahn, S. and Phillips, A.G. 2002. Modulation by central and basolateral amygdalar nuclei of dopaminergic correlates of feeding to satiety in the rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **22**: 10958–10965.
- Blundell, P., Hall, G., and Killcross, S. 2001. Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *J. Neurosci.* **21**: 9018–9026.
- Corbit, L.H. and Balleine, B. 2005. Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer. *J. Neurosci.* **25**: 962–970.
- Di Ciano, P. and Everitt, B.J. 2003. The GABA_B receptor agonist baclofen attenuates cocaine- and heroin-seeking behavior by rats. *Neuropsychopharmacology* **28**: 510–518.
- . 2004. Contribution of the ventral tegmental area to cocaine-seeking maintained by a drug-paired conditioned stimulus in rats. *Eur. J. Neurosci.* **19**: 1661–1667.
- Dickinson, A. and Balleine, B. 1994. Motivational control of goal-directed action. *Anim. Learn. Behav.* **22**: 1–18.
- . 2002. The role of learning in the operation of motivational systems. In: *Stevens' handbook of experimental psychology, learning, motivation and emotion*, Vol. 3, 3rd ed. (ed. R. Gallistel), pp. 497–533. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Dickinson, A., Smith, J., and Mirenovic, J. 2000. Dissociation of Pavlovian and instrumental incentive learning under dopamine antagonists. *Behav. Neurosci.* **114**: 468–483.
- Estes, W. 1948. Discriminative conditioning. II. Effects of a Pavlovian conditioned stimulus upon a subsequently established operant response. *J. Exp. Psychol.* **38**: 173–177.
- Everitt, B.J. and Wolf, M.E. 2002. Psychomotor stimulant addiction: A neural systems perspective. *J. Neurosci.* **22**: 3312–3320.
- Gawin, F.H. 1991. Cocaine addiction: Psychology and neurophysiology. *Science* **251**: 1580–1586.
- Hall, J., Parkinson, J.A., Connor, T.M., Dickinson, A., and Everitt, B.J. 2001. Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *Eur. J. Neurosci.* **13**: 1984–1992.
- Holland, P.C. and Gallagher, M. 2003. Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and Pavlovian-instrumental transfer. *Eur. J. Neurosci.* **17**: 1680–1694.
- Hyman, S.E. 2005. Addiction: A disease of learning and memory. *Am. J. Psychiatry* **162**: 1414–1422.
- Lovibond, P.F. 1983. Facilitation of instrumental behavior by a Pavlovian appetitive conditioned stimulus. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* **9**: 225–247.
- Ludwig, A.M., Wikler, A., and Stark, L.H. 1974. The first drink: Psychobiological aspects of craving. *Arch. Gen. Psychiatry* **30**: 539–547.
- McFarland, K. and Kalivas, P.W. 2001. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J. Neurosci.* **21**: 8655–8663.
- McFarland, K., Davidge, S.B., Lapish, C.C., and Kalivas, P.W. 2004. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J. Neurosci.* **24**: 1551–1560.
- Murschall, A. and Hauber, W. 2005. Effects of a systemic AMPA/KA and NMDA receptor blockade on Pavlovian-instrumental transfer. *Psychopharmacology* **182**: 1–7.
- O'Brien, C.P., Childress, A.R., Ehrman, R., and Robbins, S.J. 1998. Conditioning factors in drug abuse: Can they explain compulsion? *J. Psychopharmacol.* **12**: 15–22.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- Snaud-Chagny, M.F., Chergui, K., Chouvet, G., and Gonon, F. 1992. Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area. *Neuroscience* **49**: 63–72.
- Swanson, L.W. and Petrovich, G.D. 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* **21**: 323–331.
- Tiffany, S.T. and Drobes, D.J. 1990. Imagery and smoking urges: The manipulation of affective content. *Addict. Behav.* **15**: 531–539.
- Wallace, D.M., Magnuson, D.J., and Gray, T.S. 1992. Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. *Brain Res. Bull.* **28**: 447–454.
- Weiss, F., Maldonado-Vlaar, C.S., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Smith, D.L., and Ben-Shahar, O. 2000. Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: Effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 4321–4326.
- Weiss, F., Martin-Fardon, R., Ciccocioppo, R., Kerr, T.M., Smith, D.L., and Ben-Shahar, O. 2001. Enduring resistance to extinction of cocaine-seeking behavior induced by drug-related cues. *Neuropsychopharmacology* **25**: 361–372.
- Wyvell, C.L. and Berridge, K.C. 2000. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: Enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *J. Neurosci.* **20**: 8122–8130.

Received November 24, 2005; accepted in revised form January 2, 2006.

Research

Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer

Anja Lex and Wolfgang Hauber¹

Abteilung Tierphysiologie, Biologisches Institut Universität Stuttgart, D-70550 Stuttgart, Germany

Pavlovian stimuli previously paired with food can markedly elevate the rate of food-reinforced instrumental responding. This effect, termed Pavlovian-instrumental transfer (PIT), depends both on general activating and specific cueing properties of Pavlovian stimuli. Recent evidence suggests that the general activating properties of Pavlovian stimuli are mediated by mesoaccumbens dopamine systems; however, the role of NAC dopamine D1 and D2 receptors is still unknown. Here we examined the effects of a selective dopamine D1 and D2 receptor blockade in the shell and core subregion of the NAC on general PIT. Rats were trained to press a single lever for food, and the effect of a single Pavlovian stimulus previously associated with the same food on performance of that lever was measured in extinction. Results reveal that PIT, that is, the increase in instrumental responding during presentation of the Pavlovian stimulus, was reduced by microinjections of the dopamine D1 receptor antagonist SCH-23390 and, less pronounced, by microinjections of the dopamine D2 receptor antagonist raclopride into the NAC core or shell, respectively. Our data suggest that dopamine D1 and D2 receptors in the NAC core and shell mediate the general activating effects of Pavlovian stimuli on instrumental behavior.

Pavlovian stimuli predictive of reward can exert a powerful influence on the selection and initiation of instrumental behavior. For instance, presentation of stimuli previously associated with food reward can invigorate instrumental responding, an effect termed Pavlovian-instrumental transfer (PIT) (Estes 1943; Lovibond 1983; Colwill and Rescorla 1988). Pavlovian-instrumental transfer is governed by complex interactions of associative processes that are not completely understood at present (for review, see Dickinson and Balleine 2002; Ostlund and Balleine 2007). One mechanism by which Pavlovian stimuli might influence the vigor of an action is to create a general appetitive arousal that elevates instrumental responding (e.g., Rescorla and Solomon 1967). Furthermore, Pavlovian stimuli can act to selectively potentiate those actions with which they share an outcome, that is, sucrose-predictive stimuli increase responses associated with sucrose reward more than responses that earn different rewards (e.g., Rescorla and Solomon 1967; Trapold and Overmier 1972; Kruse et al. 1983; Corbit et al. 2001, 2007). Thus, Pavlovian stimuli also activate the memory of the sensory-specific properties of the associated outcome and selectively elevate instrumental behavior that leads to the same outcome.

The influence of general activating and specific cueing properties of Pavlovian stimuli can be dissociated by different experimental protocols and may be mediated in part by separate neural circuits. The amygdala is one key structure that has long been implicated in mediating the general and outcome-specific PIT (Blundell et al. 2001; Holland and Gallagher 2003; Corbit and Balleine 2005). Specifically, lesion studies indicated that the central nucleus of the amygdala is involved in controlling the general form of PIT, the basolateral part of the amygdala, in controlling the outcome-specific form (Corbit and Balleine 2005). The nucleus accumbens (NAC) is another key structure that plays a

critical role in PIT (Corbit et al. 2001; Hall et al. 2001; de Borchgrave et al. 2002). Notably, lesion of the core subregion of NAC impaired the general motivational effects of reward-predictive stimuli in PIT, whereas lesion of the shell subregion of the NAC abolished their selective cueing effects (Corbit et al. 2001; Hall et al. 2001). Furthermore, recent studies implicated the ventral tegmental area (VTA) to support both the general and the outcome-specific PIT (Murschall and Hauber 2006; Corbit et al. 2007).

While it is well established that general PIT depends crucially on the integrity of the basolateral amygdala, NAC core, and VTA, little is known yet about its neurochemical basis. Recent studies suggest a role for dopamine (DA) as a systemic blockade of DA receptors (Dickinson et al. 2000) as well as transient inactivation (Murschall and Hauber 2006; Corbit et al. 2007) or DA depletion (El-Amamy and Holland 2007) of the VTA abolished, while stimulation of mesoaccumbens DA neurotransmission increased general PIT (Wyvell and Berridge 2000). These studies point to an important role for mesoaccumbens DA transmission in general PIT; however, it is unknown whether D1 and D2 receptor-mediated signaling in the NAC core, NAC shell, or both is required.

Here we examined the effects of a selective blockade of D1 and D2 receptors in the NAC shell and core on the general form of PIT. Rats were food deprived and trained to press a single lever for food, and the effect of a single Pavlovian stimulus previously associated with the same food on performance of that lever was measured in extinction. Prior to testing, animals received microinjections of the D1 receptor antagonist SCH23390 or of the D2 receptor antagonist raclopride into the NAC core or shell, respectively.

Results

Histology

The location of the injection cannulae tips within the NAC core and NAC shell is shown in Figure 1. All animals were included in the behavioral analysis.

¹Corresponding author.

E-mail hauber@bio.uni-stuttgart.de; fax 49-711-685-65090.

Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.978708>.

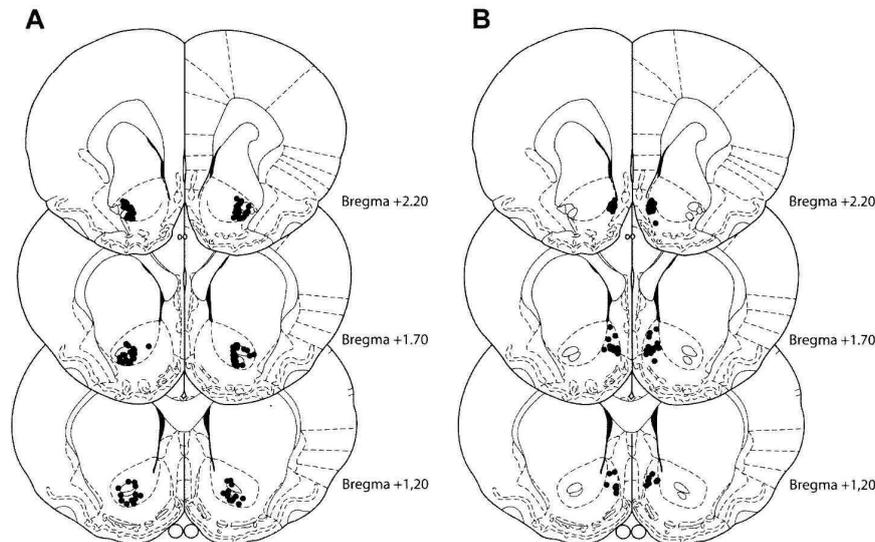


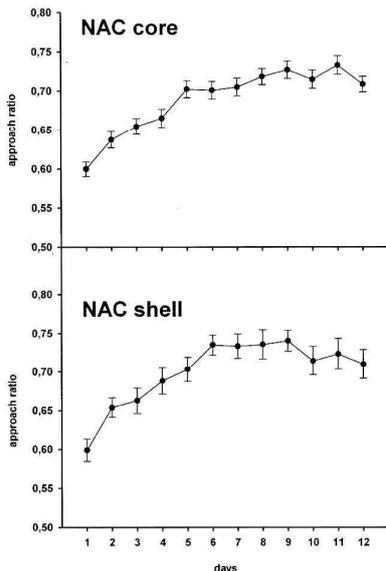
Figure 1. Cannulae placement in the NAC core and shell. The schematics depict the location of the injection cannulae tips (●) in the NAC core (A) and shell (B) for all rats. Plates are adaptations from the atlas of Paxinos and Watson (1997) with permission from Elsevier © 2008. The number beside each plate corresponds to millimeters anterior to bregma.

Pavlovian training

Stimulus-directed behavior during Pavlovian training was measured by calculating the approach ratio, that is, the percentage of time spent in the food receptacle during CS+ versus the percentage of time spent in the food receptacle during ISI as follows (e.g., Cardinal et al. 2003): approach ratio = (% CS+)/(% CS+ + % ISI).

During Pavlovian training, the mean approach ratio from all subjects with cannulae placement in the NAC core ($n = 57$) and NAC shell ($n = 35$) significantly increased as shown in Figure 2A; that is, the time spent in the food receptacle during CS+ presentation relative to ISI became increasingly higher. One-way ANOVAs conducted on the training data revealed a significant effect of training day for animals with cannulae placement in the NAC core ($F_{(11,616)} = 19.12$; $P < 0.001$) and in the NAC shell ($F_{(11,374)} = 8.02$; $P < 0.001$).

A Pavlovian Training



B Instrumental Training

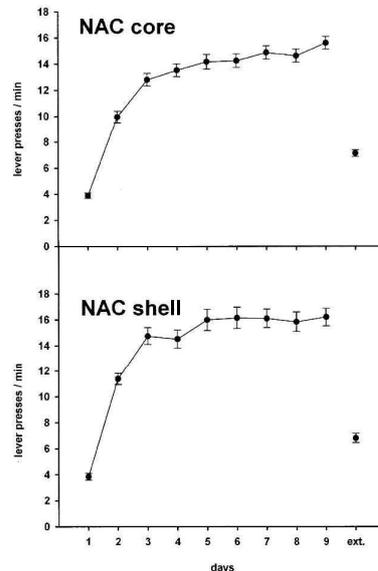


Figure 2. Pavlovian and instrumental training of animals with cannulae placement in the NAC core ($n = 57$) and shell ($n = 35$). (A) Pavlovian training. Mean approach ratio (\pm SEM), that is, the ratio of time spent in the food receptacle during CS+ and time spent in the food receptacle during ISI, across 12 d of training. (B) Instrumental training. Mean lever presses (\pm SEM) across 9 d of training and during a subsequent extinction session without reinforcement (ext).

Instrumental training

The number of lever presses per minute for all subjects with cannulae placement in the NAC core and NAC shell across days of training is displayed in Figure 2B. All animals acquired instrumental responding over 9 d. One-way ANOVAs conducted on the training data revealed a significant effect of training day for animals with cannulae placement in the NAC core ($F_{(8,904)} = 331.22$; $P < 0.001$) and in the NAC shell ($F_{(8,376)} = 146.03$; $P < 0.001$). Responding in the NAC core/shell group increased from $3.88 \pm 0.20/3.84 \pm 0.26$ lever presses per minute on day 1 to $15.66 \pm 0.48/16.20 \pm 0.68$ on day 9, and in the subsequent extinction session instrumental responses decreased to $7.17 \pm 0.26/6.81 \pm 0.36$ lever presses/min.

Transfer test: D1 and D2 receptor blockade in the NAC core

Infusion of SCH-23390

In rats with intra-NAC core infusion of saline, the CS+ enhanced lever pressing

relative to the nonreinforced stimulus (CS₀) and ISI, while in rats with intra-NAC core infusion of SCH-23390, this transfer effect was abolished and the baseline rate of lever responding was reduced (Fig. 3A).

A three-way ANOVA with treatment (saline, 0.5 µg of SCH-23390 and 0.75 µg of SCH-23390) and CS identity (tone and white noise) as between-subject factors and stimulus (ISI, CS₀, and CS+) as within-subjects factor revealed a main effect of treatment ($F_{(2,29)} = 10.39$; $P < 0.001$), stimulus ($F_{(2,58)} = 14.09$; $P < 0.001$), a stimulus × CS identity interaction (greater enhancement with the white noise; $F_{(2,58)} = 6.23$; $P < 0.01$) and stimulus × treatment interaction ($F_{(4,58)} = 4.27$; $P < 0.01$). Simple effects analyses revealed a significant effect of stimulus type in animals treated with saline ($F_{(2,24)} = 22.23$; $P < 0.001$), and subsequent post hoc comparisons yielded higher responding during CS+ relative to ISI and CS₀ (ISI: $P < 0.001$; CS₀: $P < 0.001$). In contrast, no effect of stimulus type was observed with 0.5 µg of SCH-23390 ($F_{(2,20)} = 3.01$; $P = 0.072$) and 0.75 µg of SCH-23390

($F_{(2,20)} = 0.57$; $P = 0.576$), indicating that both doses of SCH-23390 completely abolished the transfer effect. Furthermore, simple effect analyses revealed an effect of treatment during ISI ($F_{(2,32)} = 8.31$; $P < 0.01$), CS₀ ($F_{(2,32)} = 9.01$; $P < 0.001$), and CS+ ($F_{(2,32)} = 9.76$; $P < 0.001$), indicating that baseline responding during ISI and CS₀ was reduced by drug application.

An inspection of the time course of stimulus effects showed that in saline-treated animals, presentation of the CS+ increased instrumental behavior relative to the preceding ISI throughout the test session. In contrast, in animals that received the high dose of SCH23390, the transfer effect was completely abolished, whereas in animals that received the low dose of SCH23390, there was a partial reduction of the transfer effect (Fig. 3B).

Infusion of raclopride

In rats with intra-NAC core infusion of saline, the CS+ enhanced lever pressing relative to CS₀ and ISI, while in rats with intra-NAC core infusion of raclopride, this transfer effect was impaired, and the baseline rate of lever responding was reduced (Fig. 4A).

An ANOVA with treatment (saline, 0.5 µg of raclopride, and 1.0 µg of raclopride), CS identity (tone and white noise) as between-subject factors and stimulus (ISI, CS₀, and CS+) as within-subject factor revealed an effect of treatment ($F_{(2,29)} = 3.64$; $P < 0.05$), stimulus ($F_{(2,58)} = 23.44$; $P < 0.001$), and stimulus × CS identity interaction (greater enhancement with the white noise; $F_{(2,58)} = 8.05$; $P < 0.001$). Simple effects analyses revealed a significant effect of stimulus type in saline ($F_{(2,24)} = 22.23$; $P < 0.001$) and 0.5 µg of raclopride ($F_{(2,20)} = 4.87$; $P < 0.05$) treated animals. Subsequent post hoc comparisons indicated increased responding during CS+ relative to ISI and CS₀ (ISI: $P < 0.001$; CS₀: $P < 0.001$) in saline-treated animals, increased responding during CS+ relative to ISI ($P < 0.05$) but not to CS₀ ($P = 0.073$) in 0.5 µg of raclopride-treated animals, thus indicating a reduced transfer effect in this latter group. No effect of stimulus type, and hence no transfer effect, could be observed in the 1.0 µg of raclopride-treated animals ($F_{(2,20)} = 3.02$; $P = 0.072$). In addition, simple effects analyses revealed that raclopride caused a significant decrease of responding during ISI ($F_{(2,32)} = 6.89$; $P < 0.01$), but not during CS₀ ($F_{(2,32)} = 2.87$; $P = 0.071$) or CS+ ($F_{(2,32)} = 1.77$; $P = 0.187$).

In animals that received the low dose of raclopride, significant transfer effects were observed throughout the test session. In animals treated with the high dose of raclopride, transfer effects were also seen; however, they were only in part statistically significant (Fig. 4B).

Transfer test: D1 and D2 receptor blockade in the NAC shell

Infusion of SCH-23390

In rats with intra-NAC shell infusion of saline, lever pressing during CS+ was enhanced relative to the CS₀ and ISI, while infusion of low and high doses of SCH-23390 impaired this transfer effect (Fig. 5A).

The overall ANOVA with treatment (saline, 0.5 µg of SCH-23390 and 0.75 µg of SCH-23390), CS identity (tone and white noise), and stimulus (ISI, CS₀, and CS+) revealed an effect of treatment ($F_{(2,15)} = 4.89$; $P < 0.05$), stimulus ($F_{(2,30)} = 10.36$; $P < 0.001$), stimulus × CS identity interaction (greater enhancement with the white noise; $F_{(2,30)} = 4.72$; $P < 0.05$), and a stimulus × treatment interaction ($F_{(4,30)} = 3.95$; $P < 0.05$). Subsequent analyses of the simple effects revealed a significant effect of stimulus type in the saline-treated group ($F_{(2,14)} = 16.86$; $P < 0.001$), and post hoc comparisons yielded higher responding during CS+ relative to ISI and CS₀ (ISI: $P < 0.001$; CS₀: $P < 0.001$). In contrast, no effect of stimulus type was observed with 0.5 µg of SCH-23390 ($F_{(2,12)} = 1.22$; $P = 0.330$) and 0.75 µg of SCH-23390 ($F_{(2,10)} = 0.14$; $P = 0.871$), indicating that both doses of

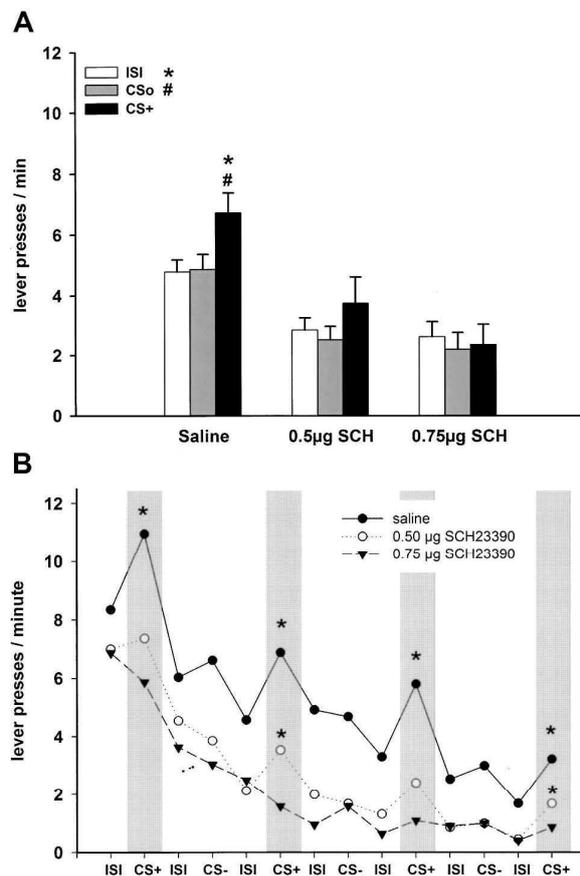


Figure 3. Pavlovian-instrumental transfer following infusion of D1 receptor antagonists into the NAC core. (A) Effect of intra-NAC core infusion of saline ($n = 13$), 0.5 µg of SCH-23390 ($n = 11$), and 0.75 µg SCH-23390 ($n = 11$) on mean lever presses (\pm SEM) during presentation of CS+, CS₀, and ISI. The CS+ significantly elevated responding relative to CS₀ and ISI after saline ($P < 0.001$), but not after 0.5 µg and 0.75 µg of SCH-23390 ($P > 0.05$, ANOVA followed by a post hoc Tukey HSD test). (B) Mean lever presses as a function of the temporal order of stimulus presentation during the test session. (*) $P < 0.05$ CS+ versus preceding ISI (planned contrast analysis). (CS+) Conditioned stimulus; (CS₀) neutral stimulus; (ISI) intertrial interval (2 min in duration, respectively).

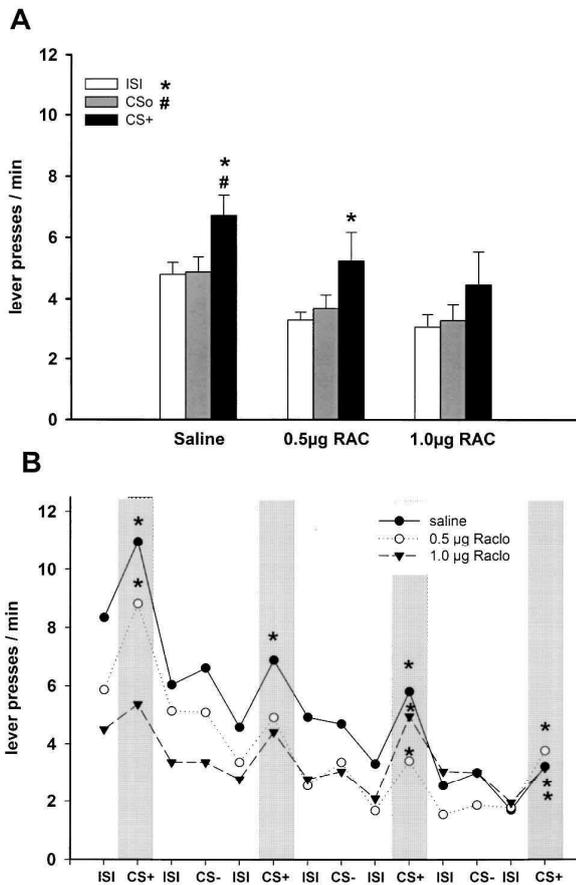


Figure 4. Pavlovian-instrumental transfer following infusion of D2 receptor antagonists into the NAC core. (A) Effect of intra-NAC core infusion of saline ($n = 13$), 0.5 μg of raclopride ($n = 11$), and 1.0 μg of raclopride ($n = 11$) on mean lever presses (\pm SEM) during presentation of CS+, CS0, and ISI. The CS+ significantly elevated responding relative to CS0 and ISI after saline infusion ($P < 0.001$). After 0.5 μg of raclopride injection responding during CS+ was significantly increased relative to ISI ($P < 0.05$) but not to CS0. Following infusion of 1.0 μg of raclopride, responding during CS+ was not increased relative to CS0 and ISI ($P > 0.05$, ANOVA followed by a post hoc Tukey HSD test). (#) $P < 0.05$ CS+ versus CS0; (*) $P < 0.05$ CS+ versus ISI. (B) Mean lever presses as a function of the temporal order of stimulus presentation during the test session. (*) $P < 0.05$ CS+ versus preceding ISI (planned contrast analysis). (CS+) Conditioned stimulus; (CS0) neutral stimulus; (ISI) intertrial interval (2 min in duration, respectively).

SCH-23390 abolished the transfer effect. Furthermore, analyses of the simple effects revealed no effect of treatment on responding during ISI ($F_{(2,28)} = 3.07$; $P = 0.071$) and CS0 ($F_{(2,28)} = 1.86$; $P = 0.185$) but during CS+ ($F_{(2,18)} = 7.071$; $P < 0.01$), indicating that SCH-23390 did not significantly affect baseline responding.

An inspection of the time course of stimulus effects showed that in saline-treated animals, presentation of the CS+ increased instrumental behavior throughout the test session. In contrast, in animals that received the high dose of SCH23390, transfer effects were completely abolished throughout the session, whereas in animals that received the low dose of SCH23390, transfer effects can be seen, which, however, reached no statistical significance (Fig. 5B).

Infusion of raclopride

In rats subjected to intra-NAC shell infusion of saline, lever pressing was enhanced during CS+ relative to CS0 and ISI, while this transfer effect was impaired in rats treated with low and high doses of raclopride (Fig. 6B).

An ANOVA with treatment (saline, 0.5 μg of raclopride, and 1.0 μg of raclopride) and CS identity (tone and white noise) and stimulus (ISI, CS0, and CS+) revealed an effect of stimulus ($F_{(2,32)} = 16.17$; $P < 0.001$) and a stimulus \times treatment interaction ($F_{(4,32)} = 3.16$; $P < 0.05$). Simple effects analyses revealed a significant effect of stimulus type during application of saline ($F_{(2,14)} = 16.86$; $P < 0.001$), and post hoc comparisons indicated that responding during CS+ was increased relative to ISI ($P < 0.001$) and CS0 ($P < 0.001$). In contrast, no effect of stimulus type was observed with 0.5 μg of raclopride ($F_{(2,12)} = 1.38$; $P = 0.288$). Surprisingly, simple effects analyses revealed a significant effect of stimulus type after infusion of 1.0 μg of raclopride

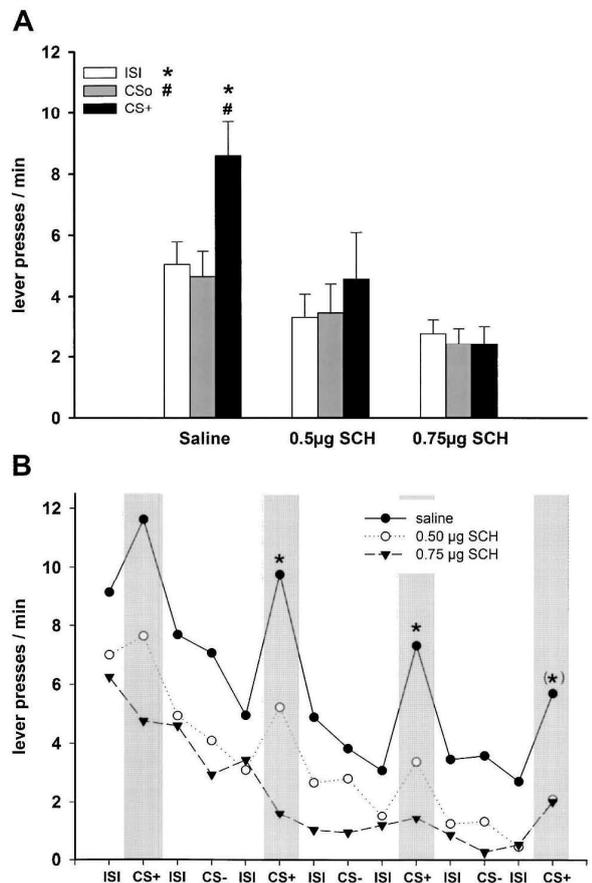


Figure 5. Pavlovian-instrumental transfer following infusion of D1 receptor antagonists into the NAC shell. (A) Effect of intra-NAC shell infusion of saline ($n = 8$), 0.5 μg of SCH-23390 ($n = 7$) and 0.75 μg of SCH-23390 ($n = 6$) on mean lever presses (\pm SEM) during presentation of CS+, CS0, and ISI. The CS+ significantly elevated responding relative to CS0 and ISI after saline ($P < 0.001$), but not after 0.5 μg and 0.75 μg of SCH-23390 ($P > 0.05$, ANOVA followed by a post hoc Tukey HSD test). (B) Mean lever presses as a function of the temporal order of stimulus presentation during the test session. * $P < 0.05$; (*) $P = 0.57$ CS+ versus preceding ISI (planned contrast analysis). (CS+) Conditioned stimulus; (CS0) neutral stimulus; (ISI) intertrial interval (2 min in duration, respectively).

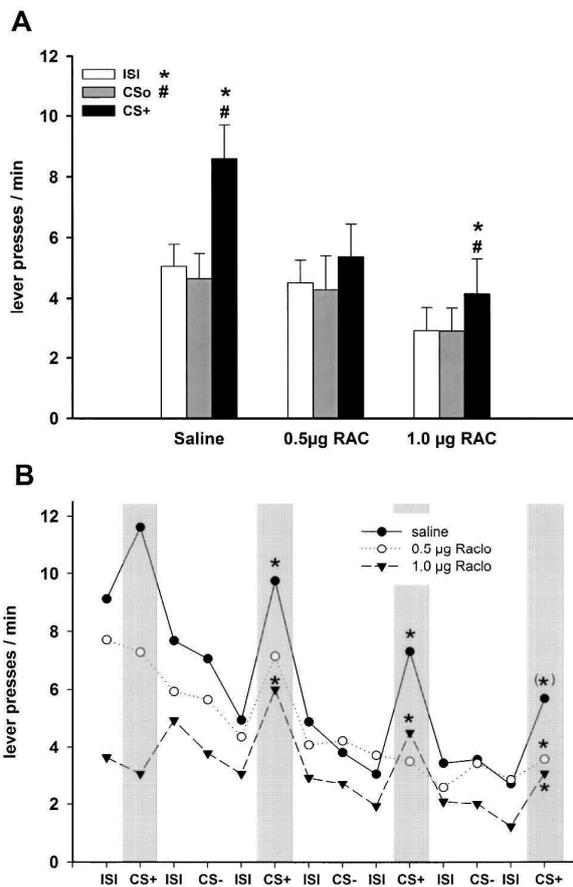


Figure 6. Pavlovian-instrumental transfer following infusion of D2 receptor antagonists into the NAC shell. (A) Effect of intra-NAC shell infusion of saline ($n = 8$), 0.5 µg of raclopride ($n = 7$), and 1.0 µg of raclopride ($n = 7$) on mean lever presses (\pm SEM) during presentation of CS+, CS0, and ISI. The CS+ significantly elevated responding relative to CS0 and ISI after saline ($P < 0.001$) and 1.0 µg of raclopride ($P < 0.05$), but not after 0.5 µg of raclopride ($P > 0.05$, ANOVA followed by a post hoc Tukey HSD test). (B) Mean lever presses as a function of the temporal order of stimulus presentation during the test session. * $P < 0.05$; (*) $P = 0.057$ CS+ versus preceding ISI (planned contrast analysis). (CS+) Conditioned stimulus; (CS0) neutral stimulus; (ISI) intertrial interval (2 min in duration, respectively).

($F_{(2,12)} = 5.10$; $P < 0.05$), and post hoc comparisons indicated that responding during CS+ was increased relative to ISI ($P < 0.05$) and CS0 ($P < 0.05$). This significant effect was largely due to one outlier in the treatment group that, for unknown reasons, had a pronounced transfer effect (+4.06 lever presses/min relative to CS0) not observed in any other animal that received the high dose of raclopride ($n = 6$; transfer effect of -0.50 to $+1.94$ lever presses/min relative to CS0). Further analyses of the simple effects revealed an effect of raclopride on responding during CS+ ($F_{(2,19)} = 4.35$; $P < 0.05$) presentation, but not during ISI ($F_{(2,19)} = 2.19$; $P = 0.139$) and CS0 ($F_{(2,19)} = 1.01$; $P = 0.381$), indicating that baseline responding was not significantly affected.

An analysis of the time course of CS+ effects revealed that in animals that received the high dose of raclopride, significant transfer effects were observed during the test session. In animals treated with the low dose of raclopride, significant trans-

fer effects were only observed during one out of four CS+ presentations (Fig. 6B).

Discussion

The present study demonstrates that a selective D1 blockade and, less pronounced, a D2 receptor blockade both in the NAC core and shell reduced general PIT. These findings provide support to the notion that D1 and D2 receptor-mediated signaling in two major subregions of the NAC mediates the excitatory impact of appetitive Pavlovian stimuli on instrumental behavior.

The possibility that drug diffusion into adjacent subregions contributes to drug effects on PIT cannot be discounted. However, quantitative autoradiography revealed a low rate of diffusion of SCH23390 from the site of an intracerebral injection suggesting a local action, at least in the first 30 min after microinjection (Caine et al. 1995). Furthermore, intra-NAC core and shell infusions of SCH23390 and raclopride at even higher doses and volumes as used here produced dissociable behavioral effects (Baldo et al. 2002; Anderson et al. 2003; Bari and Pierce 2005), indicating that the spread of drugs was relatively limited. Thus, SCH23390- and raclopride-induced effects on PIT observed here may reflect drug actions largely limited to the NAC core and shell, respectively.

Drug infusion into the NAC core significantly reduced lever press rates during ISI, while drug infusion into the NAC shell had less pronounced effects. Reduced lever press rates could indicate an impaired response capacity that accounts for attenuated PIT. Yet, as measured in extinction, lever press rates in PIT are generally low and may thus not challenge response capacity excessively. Furthermore, in animals that received intra-NAC core infusions, the absolute rates of lever presses during ISI were not abnormally low but correspond to those observed in animals that received intra-NAC shell infusions or to those reported in previous studies in intact and treated animals (e.g., Murschall and Hauber 2006; El-Amamy and Holland 2007). Most importantly, an inspection of the time course of CS+ effects in animals with drug infusions showed that PIT can be absent already during early CS+ presentations when basal response rates were high. In contrast, significant PIT was observed during late CS+ presentations when basal response rates were lower. Thus, it appears that PIT is a robust phenomenon that can be elicited even if basal response rates are relatively low. Disruption of PIT, therefore, may not result from a floor effect caused by SCH23390- or raclopride-induced nonspecific impairments of instrumental responding.

NAC core and Pavlovian-instrumental transfer

In this study, we used a protocol adopted from previous studies (e.g., Hall et al. 2001) that generates a general form of PIT as rats were trained on a single lever, and the effect of a single Pavlovian stimulus on performance of that lever was measured. Instrumental training, in particular under interval schedules of reinforcement as used here, can generate habitual responding (Dickinson et al. 1983). Yet, in the instrumental extinction session subsequent to instrumental training, we observed a significant decrease of lever press rates, indicating that animals were still sensitive to the outcome, that is, did not respond in a habitual manner. In our previous studies using the same protocol (Murschall and Hauber 2005, 2006), lever press rates during instrumental training and transfer testing were moderately lower. Rat sample differences might account for this variability. Furthermore, unlike in our previous studies (Murschall and Hauber 2005, 2006), the white noise CS+ was somewhat more effective than the tone CS+. However, the tone CS+ per se always produced reliable PIT; therefore, CS+ identity effects might be largely neglected.

Intra-NAC core infusion of SCH23390 abolished PIT, sug-

gesting a critical role of D1 receptor-mediated signaling in the NAC core to mediate the general excitatory effects of a Pavlovian stimulus on instrumental responding. Intra-NAC core blockade of D2 receptors also abolished PIT during early CS+ presentations, but, relative to SCH23390, the effects of raclopride were less pronounced. This finding tentatively points to a less prominent role of D2 receptor in the NAC core in controlling the general PIT. Further dose-response studies may be warranted to address the relative contribution of D1 and D2 receptors in PIT. Yet, our pilot experiments indicate that markedly higher doses of intra-NAC raclopride or SCH23390 as used here produce pronounced effects on response initiation.

Our findings are in accordance with lesion studies that have implicated the NAC core in the general form of PIT (Hall et al. 2001) and add to recent data suggesting a role for DA in PIT. For instance, systemic blockade of DA receptors (Dickinson et al. 2000) as well as transient inactivation (Murschall and Hauber 2006; Corbit et al. 2007) or DA depletion (El-Amamy and Holland 2007) of the VTA abolished, while stimulation of mesoaccumbens DA neurotransmission increased general PIT (Wyvell and Berridge 2000). Furthermore, a large body of evidence has implicated DA in the NAC core in processing of food CS in a variety of other paradigms that involve actions of Pavlovian stimuli (Di Chiara and Bassareo 2007; Nicola 2007). For instance, microdialysis studies demonstrated that presentation of an appetitive food CS increased DA transmission in the NAC core (Bassareo and Di Chiara 1997; Cheng et al. 2003). Thus, a CS-induced DA release acting on NAC core D1 and D2 receptors may represent a neurochemical substrate of the invigorating effects of an appetitive CS on instrumental behavior observed here. In line with this account, D1 and D2 receptor activity in the NAC core regulates the rate (Yun et al. 2004) and initiation (Calaminus and Hauber 2007) of instrumental responses to appetitive discriminative cues that may serve in part as Pavlovian stimuli (Colwill and Rescorla 1988). Our findings are also consistent with a proposed neural circuitry for general PIT involving NAC DA release that is regulated by projections from the central nucleus of the amygdala (CeA) to midbrain DA neurons (Parkinson et al. 2000; Hall et al. 2001; Cardinal et al. 2002). However, this circuit model may be too simplistic as recent studies provide evidence for additional structures to be involved in the regulation of general PIT. For instance, in rats there is little evidence for strong monosynaptic projections from the CeA to the VTA (Zahm et al. 1999); thus, polysynaptic pathways linking the CeA and the VTA, for example, through the lateral hypothalamus or frontal cortex (Zahm 2006), may regulate PIT as well. In addition, the finding that lesions that disconnected the CeA from the VTA facilitated PIT relative to unilateral VTA lesions (El-Amamy and Holland 2007) is at variance with the notion that PIT requires direct interactions between both structures. Furthermore, El-Amamy and Holland (2007) showed that lesions of the substantia nigra pars compacta had debilitating effects on PIT, indicating that the nigral DA innervation of the NAC or other target areas of nigrostriatal DA fibers such as the dorsal striatum may be important to PIT. In line with this notion, Corbit and Janak (2007) recently reported that the dorsolateral striatum seems to play a prominent role in allowing excitatory stimuli to invigorate response output. At present, it is not clear how this observation can be reconciled with the CeA-VTA-NAC circuit model of general PIT. However, this finding points to the possibility that the DA innervation of other structures involved in stimulus-guided responding, for example, the dorsal striatum, is critical for PIT.

NAC shell and Pavlovian-instrumental transfer

Our data further show that PIT was largely absent in animals that received intra-NAC shell infusions of SCH23390. Thus D1 recep-

tors in the NAC shell may play a critical role in mediating general PIT. Results obtained with intra-NAC shell infusion of raclopride were less clear-cut. The low dose of raclopride abolished PIT during most CS+ presentations, while the high dose was effective only during the initial CS+ presentation. These findings indicate a complex dose-response profile of NAC shell D2 receptor activity in PIT. As already pointed out, studies using other doses of raclopride may be warranted, yet our preliminary findings suggest that higher doses of intra-NAC raclopride markedly interfere with response initiation.

In line with our observations, stimulation of DA transmission in the NAC shell enhanced general PIT (Wyvell and Berridge 2000; Pecina et al. 2006). Notably, using the same PIT protocol as in this study, Hall et al. (2001) revealed that cell body lesions of the NAC shell had only moderate effects. Although reduced by NAC shell lesions, general PIT showed a trend toward significance (Hall et al. 2001), while in the present study, the debilitating effects of NAC shell manipulations on general PIT were, for unknown reasons, more pronounced. A large number of studies showed that presentation of drug-predictive CS stimulate DA efflux in the NAC shell (Di Chiara and Bassareo 2007; but see Ito et al. 2000), whereas food-predictive CS had more variable effects. Cheng et al. (2003) and Datla et al. (2002) demonstrated that a CS signaling food pellets increased DA efflux both in the NAC shell and core, while Bassareo et al. (2002) observed an enhanced DA transmission in the NAC core only. However, unlike Bassareo et al. (2002), Cheng et al. (2003) used a restricted feeding regimen that can facilitate DA release to food-predictive CS (Wilson et al. 1995). In view of these findings, the experimental protocol used here is likely to stimulate DA transmission in the NAC shell as our animals were maintained on a restricted feeding regimen. Furthermore, our PIT procedure used a discrete unimodal CS predictive of food pellets in a Skinner box, a protocol shown to readily facilitate DA release in the NAC shell (Cheng et al. 2003). Recent data further indicate a role for the NAC shell in mediating the motivational effects of food CS on behavior. Pecina et al. (2006) revealed that corticotrophin-releasing factor (CRF) infusion into the NAC shell enhanced PIT, suggesting that CRF systems could magnify the appetitive motivational arousal associated with CS. Thus, other neurochemical signals than DA converging on the NAC shell could serve to enhance the appetitive motivational arousal of CS, for example, either directly or, possibly, via modulation of D1 and D2 receptor-mediated signaling. Finally, it is important to note that PIT depends both on general activating and specific cueing properties of Pavlovian stimuli. In a general PIT procedure as used here, the Pavlovian stimulus was associated with the same outcome as the instrumental response. Thus, we cannot rule out that a certain amount of outcome-specific transfer was induced. The NAC shell plays an important role in mediating the outcome-specific PIT (Corbit et al. 2001); therefore, the reduced PIT after NAC shell DA antagonism seen here could not only be due to a reduced general excitatory arousal, but to some extent to an impaired retrieval of the specific sensory properties of the outcome as well. In future studies, it will be important to try to separate possible general and outcome-specific transfer effects mediated by the NAC shell DA, for example, by using paradigms that allow for a simultaneous examination of selective and general transfer mechanisms (e.g., Corbit and Balleine 2005).

To summarize, the available evidence suggests that the CeA (Holland and Gallagher 2003; Corbit and Balleine 2005), VTA (Murschall and Hauber 2006; Corbit, et al. 2007), NAC core/shell, and mesoaccumbens DA systems (Wyvell and Berridge 2000; Hall et al. 2001) are major components of a neural circuitry mediating the general form of PIT. However, their interactions are more complex than previously suggested by the simple serial CeA-VTA-NAC

circuit model and may involve additional structures such as the dorsolateral striatum (Corbit and Janak 2007) and substantia nigra pars compacta (El-Amamy and Holland 2007). Likewise, the neural circuit mediating the outcome-specific PIT appears to be more complex as it not only includes the basolateral amygdala (Blundell et al. 2001; Corbit and Balleine 2005) and NAC shell (Corbit et al. 2001), but, as recently shown, also involves additional structures such as VTA (Corbit et al. 2007) and dorsomedial striatum (Corbit and Janak 2007). Therefore, rather than being strictly segregated, the neural substrates mediating the general and outcome-specific PIT seem to be partially overlapping as, for instance, DA neurons originating in the VTA subserve both forms of PIT (Murschall and Hauber 2006; Corbit et al. 2007; El-Amamy and Holland 2007).

Conclusions

Taken together, our results suggest that DA, by acting on D1 and D2 receptors both in the shell and core subregion of the NAC, mediates the general motivational impact of Pavlovian stimuli on instrumental responding. These findings provide further support to the notion that one important mechanism through which the NAC influences instrumental behavior is to allow Pavlovian stimuli to energize or activate responding (Cardinal et al. 2002). In addition, they are consistent with the view that mesoaccumbens dopamine activation enhances the conditioned incentive impact of reward cues (Dickinson et al. 2000; Wyvell and Berridge 2000) and demonstrate for the first time that D1 and D2 receptors in the core and shell subregion of the NAC mediate the invigorating effects of Pavlovian stimuli predictive of natural reward.

Materials and Methods

Subjects

Subjects were 92 male Lister hooded rats (Harlan Winkelmann) weighing 220–290 g at the time of surgery. Rats were housed in groups of five animals at $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ on a 12:12-h light–dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with ad libitum access to water and standard laboratory chow (Altromin). Prior to the onset of behavioral training, food was restricted to 15 g per animal and day to maintain ~85% of the animals' free-feeding weight. All animal experiments were conducted according to the German Law on Animal Protection and approved by the proper authorities.

Surgery

For stereotaxic surgery, animals were anaesthetized with ketamine hydrochloride (120 mg/kg; Bela-Pharm) and xylazine hydrochloride (4 mg/kg Rompun; Bayer) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). Bilateral 14-mm stainless steel guide cannulae (0.7 mm outer diameter; Braun Melsung) aimed at either the nucleus accumbens core (NAC core) or shell (NAC shell) were implanted using standard stereotaxic procedures. The coordinates with reference to the atlas of Pellegrino et al. (1981) were: 3.2 anterior bregma, ± 1.9 lateral to midline and 7.1 ventral from the dura for the NAC core ($n = 57$) and 3.1 anterior bregma, ± 0.9 lateral to midline and 7.1 ventral from the skull for the NAC shell ($n = 35$) with the toothbar set at +5.0 mm above the interaural line. The guide cannulae were occluded by 14-mm stainless steel stylets (0.4 mm outer diameter; Braun). Each rat was given at least 5 d to recover from surgery before the onset of behavioral training.

Drug injection

Animals received intra-NAC core or shell microinjections of either the selective D1 dopamine receptor antagonist R(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride [R(+)-SCH-23390 hydrochloride; Sigma-Aldrich] or the selective dopamine D2 receptor antagonist 3,5-dichloro-*N*-(1-ethylpyrrolidin-2-ylmethyl)-2-hydroxy-6-

methoxybenzamide tartrate salt [S(-)-raclopride (+)-tartrate salt; Sigma-Aldrich]. Drugs were dissolved in physiological saline (0.9%) and injected at doses of 0.5 μg of SCH-23390, 0.75 μg of SCH-23390, 0.5 μg of raclopride, and 1.0 μg of raclopride in 0.3 μL , respectively; control subjects received microinjections of 0.3 μL of saline. The drug doses were based on previous studies in the literature (e.g., Yun et al. 2004; Calaminus and Hauber 2006) and on pilot studies.

For microinjections, stainless steel stylets were removed, and bilateral injection cannulae (0.4 mm outer diameter; Braun) were lowered at the final site of infusion and attached via polyvinylchloride tubing to microliter syringes controlled by a syringe pump (Med Associates). Injection cannulae (length: 18 mm) protruded 4 mm beyond the guide cannulae. All injections were delivered bilaterally over a 1-min interval, and injection cannulae were left in position for a further minute to allow for diffusion. After microinjection, each animal remained in its home cage for an additional 10 min before being placed in the test chamber.

To adapt animals to the microinjection procedure, they received four sham injections including handling, insertion of injection cannulae dummies, and operation of the injection pump (without running an injection) prior to behavioral training on days 3, 5, 7, and 9 of instrumental training. On the day before the transfer test, that is, the instrumental extinction session, all animals received a single injection of vehicle (0.3 μL of saline).

Apparatus

The behavioral procedures were performed in identical operant chambers (24 \times 21 \times 30 cm; Med Associates) encased in sound attenuating cubicles. Each operant chamber was equipped with a food receptacle, a food dispenser that delivered one pellet (45-mg pellets; Bioserve) when activated, and a retractable lever on the left side of the food receptacle. Illumination was provided by a 24 V/3 W house light mounted on the top-center of the wall opposite the food receptacle. The speaker that delivered the auditory conditioned stimuli was mounted on the wall opposite to the lever and the food receptacle. A computer system (MedPC-Software; Med Associates) controlled the equipment and recorded the data.

Behavioral procedure

This experiment comprised three main stages: Pavlovian training, instrumental training, and transfer testing; in this latter stage, the effects of the Pavlovian stimuli on instrumental behavior were analyzed in extinction. Each session started with the illumination of the houselight and insertion of the lever where appropriate and ended with the retraction of the lever and turning-off of the houselight.

Magazine training

First, all subjects ($n = 92$) received one session of magazine training to habituate the animals to the operant chambers. During magazine training, food pellets (45-mg pellets; Bioserve) were delivered on a random time (RT) 30-sec schedule with no lever available.

Pavlovian training

Twelve sessions of Pavlovian training were given with the lever retracted. Two 80-dB auditory stimuli (3-kHz tone and white noise) served as CS+ and CS- in a counterbalanced fashion. Each session contained six 2-min presentations of the CS+ followed by an interstimulus interval (ISI) of 2–4 min. Reward was delivered only during the presentation of the CS+ on a RT-30-sec schedule. For approximately half of the animals, the CS+ was the tone, and for the other half, the CS+ was the white noise. As a measure of Pavlovian conditioning, the total time the animal spent in the food receptacle during CS+ versus ISI was recorded via a photobeam in the food receptacle.

Instrumental training

Following Pavlovian training, all animals received nine instrumental training sessions with the lever inserted. Responding on the lever was reinforced on a random interval (RI) schedule starting with RI-2-sec during the first session. For the next two sessions, the schedule was increased to RI-15-sec and RI-30-sec, and for the remaining six sessions to RI-60-sec. The total numbers of lever presses were recorded, and the session ended after 30 min.

Reminder and instrumental extinction

Subsequent to instrumental training, one Pavlovian reminder was given to habituate unconditioned responses to the CS₀. This session was similar to Pavlovian training sessions except that two additional, not reinforced, 2-min presentations of the alternative neutral stimuli (CS₀) and additional ISI were given preceding the fifth and following the sixth presentation of the CS₊. In addition, the animals received a single 30-min instrumental extinction session with the lever available, but not reinforced.

Transfer test

The effect of Pavlovian stimuli on instrumental behavior was tested in extinction, while the lever was inserted into the operant chamber. Each stimulus (CS₊ and CS₀) was 2 min in duration and preceded by a 2-min ISI period. The session always started with the presentation of the white noise, thus counterbalancing the order of presentation of CS₊ and CS₀ within each group, and ended after four presentations of each stimulus type (CS₊ and CS₀). The total numbers of lever presses during the transfer test were recorded separately for CS₊, CS₀, and ISI. Subjects were assigned to five placement/drug/dose groups receiving either 0.5 µg of SCH-23390 (NAC core, *n* = 11; NAC shell, *n* = 7), 0.75 µg of SCH-23390 (NAC core, *n* = 11; NAC shell, *n* = 6), 0.5 µg of raclopride (NAC core, *n* = 11; NAC shell, *n* = 7), 1.0 µg of raclopride (NAC core, *n* = 11; NAC shell, *n* = 7), or saline (NAC core, *n* = 13; NAC shell, *n* = 8) prior to the transfer test.

Histology

After completion of the experiment, all rats were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (150 mg/kg; Sigma-Aldrich) to control for correct cannulae placements. Brains were removed, fixed in 10% formalin for 24 h, and stored in 30% glucose. Coronal brain sections (40 µm) were collected, mounted on coated slides, and stained with cresyl violet. Cannulae placements were verified with reference to the atlas of Paxinos and Watson (1997).

Statistical analysis

Data from Pavlovian and instrumental training were subjected to an analysis of variances (ANOVA) for repeated measures with training day as factor. Pavlovian-instrumental transfer data were subjected to an ANOVA for repeated measures with treatment and CS identity as between-subject factor and stimulus as within-subject factor. Significant main effects and interactions were further investigated post hoc using the Tukey HSD test. Data were given as mean overall lever presses (\pm SEM) during CS₊, CS₀, and ISI. For a detailed description of the data, the time course of stimulus effects in the transfer test, that is, lever presses during subsequent CS₊ (4 \times), ISI (8 \times), and CS₀ (4 \times) presentations was also given. As the sequence of stimulus presentations in the transfer test was matched, i.e., one-half of rats received CS₊/ISI/CS₀/ISI . . . ISI/CS₀, the other CS₀/ISI/CS₊/ISI . . . ISI/CS₊, the data were collapsed such that the final ISI/CS₀ subsequence in one group and the initial CS₀/ISI subsequence in the other were omitted. Increases of lever pressing during distinct CS₊ presentations relative to the preceding ISI were analyzed using planned contrasts. The level of statistical significance was *P* < 0.05. All statistical analyses were carried out using STATISTICA Vers 7.1 (StatSoft).

Acknowledgments

This research was funded by a DFG grant Ha2340/6-3 (W.H.).

References

- Anderson, S.M., Bari, A.A., and Pierce, R.C. 2003. Administration of the D1-like dopamine receptor antagonist SCH-23390 into the medial nucleus accumbens shell attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* **168**: 132–138.
- Baldo, B.A., Sadeghian, K., Basso, A.M., and Kelley, A.E. 2002. Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav. Brain Res.* **137**: 165–177.
- Bari, A.A. and Pierce, R.C. 2005. D1-like and D2 dopamine receptor antagonists administered into the shell subregion of the rat nucleus accumbens decrease cocaine, but not food, reinforcement. *Neuroscience* **135**: 959–968.
- Bassareo, V. and 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., De Luca, M.A., and Di Chiara, G. 2002. Differential expression of motivational stimulus properties by dopamine in nucleus accumbens shell versus core and prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **22**: 4709–4719.
- Blundell, P., Hall, G., and Killcross, S. 2001. Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *J. Neurosci.* **21**: 9018–9026.
- Caine, S.B., Heinrichs, S.C., Coffin, V.L., and Koob, G.F. 1995. Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Res.* **692**: 47–56.
- Calaminus, C. and Hauber, W. 2006. Intact discrimination reversal learning but slowed responding to reward-predictive cues after dopamine D1 and D2 receptor blockade in the nucleus accumbens of rats. *Psychopharmacology* **191**: 551–566.
- Cardinal, R.N., Parkinson, J.A., Hall, J., and Everitt, B.J. 2002. Emotion and motivation: The role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **26**: 321–352.
- Cardinal, R.N., Parkinson, J.A., Marbini, H.D., Toner, A.J., Bussey, T.J., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. 2003. Role of the anterior cingulate cortex in the control over behavior by Pavlovian conditioned stimuli in rats. *Behav. Neurosci.* **117**: 566–587.
- Cheng, J.J., de Bruin, J.P., and Feenstra, M.G. 2003. Dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core in response to appetitive classical conditioning. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 1306–1314.
- Colwill, R.M. and Rescorla, R.A. 1988. Associations between the discriminative stimulus and the reinforcer in instrumental learning. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* **14**: 155–164.
- Corbit, L.H. and Balleine, B.W. 2005. Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer. *J. Neurosci.* **25**: 962–970.
- Corbit, L.H. and Janak, P.H. 2007. Inactivation of the lateral bit not medial dorsal striatum eliminates the excitatory impact of Pavlovian stimuli on instrumental responding. *J. Neurosci.* **27**: 13977–13981.
- Corbit, L.H., Muir, J.L., and Balleine, B.W. 2001. The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J. Neurosci.* **21**: 3251–3260.
- Corbit, L.H., Janak, P.H., and Balleine, B.W. 2007. General and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer: The effect of shifts in motivational state and inactivation of the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* **26**: 3141–3149.
- Datla, K.P., Ahier, R.G., Young, A.M., Gray, J.A., and Joseph, M.H. 2002. Conditioned appetitive stimulus increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat. *Eur. J. Neurosci.* **16**: 1987–1993.
- de Borchgrave, R., Rawlins, J.N., Dickinson, A., and Balleine, B.W. 2002. Effects of cytotoxic nucleus accumbens lesions on instrumental conditioning in rats. *Exp. Brain Res.* **144**: 50–68.
- Di Chiara, G. and Bassareo, V. 2007. Reward system and addiction: What dopamine does and doesn't do. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**: 69–76.
- Dickinson, A. and Balleine, B. 2002. The role of learning in the operation of motivational systems. In *Stevens's Handbook of experimental psychology* (eds. H. Pashler and R. Gallistel), pp. 497–533. Wiley, New York.
- Dickinson, A., Nicholas, D.J., and Adams, C.D. 1983. The effect of the instrumental training contingency on susceptibility to reinforcer devaluation. *Q. J. Exp. Psychol. B* **35**: 35–51.
- Dickinson, A., Smith, J., and Mirenowicz, J. 2000. Dissociation of Pavlovian and instrumental incentive learning under dopamine antagonists. *Behav. Neurosci.* **114**: 468–483.
- El-Amamy, H. and Holland, P.C. 2007. Dissociable effects of disconnecting amygdala central nucleus from the ventral tegmental

- area or substantia nigra on learned orienting and incentive motivation. *Eur. J. Neurosci.* **25**: 1557–1567.
- Estes, W.K. 1943. Discriminative conditioning. I. A discriminative property of conditioned anticipation. *J. Exp. Psychol.* **32**: 150–155.
- Hall, J., Parkinson, J.A., Connor, T.M., Dickinson, A., and Everitt, B.J. 2001. Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *Eur. J. Neurosci.* **13**: 1984–1992.
- Holland, P.C. and Gallagher, M. 2003. Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and Pavlovian-instrumental transfer. *Eur. J. Neurosci.* **17**: 1680–1694.
- Ito, R., Dalley, J.W., Howes, S.R., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. 2000. Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J. Neurosci.* **20**: 7489–7495.
- Kruse, J.M., Overmier, J.B., Konz, W.A., and Rokke, E. 1983. Pavlovian conditioned stimulus effects upon instrumental choice behaviour are reinforcer specific. *Learn. Motiv.* **14**: 165–181.
- Lovibond, P.F. 1983. Facilitation of instrumental behavior by a Pavlovian appetitive conditioned stimulus. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* **9**: 225–247.
- Murschall, A. and Hauber, W. 2005. Effects of a systemic AMPA/KA and NMDA receptor blockade on Pavlovian-instrumental transfer. *Psychopharmacology* **182**: 290–296.
- Murschall, A. and Hauber, W. 2006. Inactivation of the ventral tegmental area abolished the general excitatory influence of Pavlovian cues on instrumental performance. *Learn. Mem.* **13**: 123–126.
- Nicola, S.M. 2007. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology* **191**: 521–550.
- Ostlund, S.B. and Balleine, B.W. 2007. The contribution of orbitofrontal cortex to action selection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1121**: 174–192.
- Parkinson, J.A., Cardinal, R.N., and Everitt, B.J. 2000. Limbic cortical-ventral striatal systems underlying appetitive conditioning. *Prog. Brain Res.* **126**: 263–285.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, New York.
- Pecina, S., Schulkin, J., and Berridge, K.C. 2006. Nucleus accumbens corticotropin-releasing factor increases cue-triggered motivation for sucrose reward: Paradoxical positive incentive effects in stress? *BMC Biol.* **4**: 8. doi: 10.1186/1741-7007-4-8.
- Pellegrino, L.J., Pellegrino, A.S., and Cushman, A.J. 1981. *A stereotaxic atlas of the rat brain*. Plenum Press, New York, London.
- Rescorla, R.A. and Solomon, R.L. 1967. Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychol. Rev.* **74**: 151–182.
- Trapold, M.A. and Overmier, J.B. 1972. The second learning process in instrumental learning. In *Classical conditioning. II: Current research and theory* (eds. A.A. Black and W.F. Prokasy), pp. 427–452. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Wilson, C., Nomikos, G.G., Collu, M., and Fibiger, H.C. 1995. Dopaminergic correlates of motivated behavior: Importance of drive. *J. Neurosci.* **15**: 5169–5178.
- Wyvell, C.L. and Berridge, K.C. 2000. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: Enhancement of reward “Wanting” without enhanced “Liking” or response reinforcement. *J. Neurosci.* **20**: 8122–8130.
- Yun, I.A., Nicola, S.M., and Fields, H.L. 2004. Contrasting effects of dopamine and glutamate receptor antagonist injection in the nucleus accumbens suggest a neural mechanism underlying cue-evoked goal-directed behavior. *Eur. J. Neurosci.* **20**: 249–263.
- Zahm, D.S. 2006. The evolving theory of basal forebrain functional-anatomical ‘macrosystems.’ *Neurosci. Biobehav. Rev.* **30**: 148–172.
- Zahm, D.S., Jensen, S.L., Williams, E.S., and Martin, J.R. 1999. Direct comparison of projections from the central amygdaloid region and nucleus accumbens shell. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 1119–1126.

Received February 25, 2008; accepted in revised form April 24, 2008.

7 Diskussion

Der Einfluss von klassisch konditionierten, appetitiven Reizen auf die Intensität von instrumentellem Verhalten wird als Klassisch-Instrumenteller Transfer (PIT) bezeichnet (Estes, 1948; Rescorla und Solomon, 1967; Lovibond, 1983; Colwill und Rescorla, 1988; Übersicht in Dickinson und Balleine, 1994). Der Nucleus accumbens und die Amygdala sind Schlüsselstrukturen in der Vermittlung des PIT (Blundell et al., 2001; Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005). Allerdings ist bisher wenig über die Neurotransmitter bekannt, welche an der Steuerung des PIT beteiligt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neurochemische Mechanismen des PIT näher zu charakterisieren, und darüberhinaus weitere Strukturen zu identifizieren, welche an der Vermittlung des PIT beteiligt sind. Nachfolgend soll jedoch zunächst auf die methodischen Aspekte der vorliegenden Arbeit eingegangen werden.

7.1 Methodische Aspekte

7.1.1 Beurteilung des Klassisch-Instrumentellen Transfers

Klassisch konditionierte Reize, welche mit appetitiven Ereignissen assoziiert sind, können über ihre allgemeine motivierende Wirkung instrumentelles Verhalten verstärken. Dieser Effekt kann mit Hilfe des allgemeinen oder generellen PIT-Tests gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür ein speziell modifiziertes Trainingsprotokoll verwendet, welches ursprünglich von Balleine et al. (1994) erarbeitet, und später von Dickinson et al. (2000) weiterentwickelt wurde. Daneben können klassisch konditionierte Reize auch, über den Abruf der spezifischen sensorischen Eigenschaften der assoziierten Belohnung, die Wahl zwischen verschiedenen instrumentellen Handlungen beeinflussen. Solche selektiven Wirkungen können durch den spezifischen PIT-Test ermittelt werden. Der spezifische PIT-Test wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht eingesetzt, und wird daher nicht weiter diskutiert.

Das verwendete Trainingsprotokoll umfasst drei Phasen: (1) die klassische Konditionierung, (2) die instrumentelle Konditionierung und (3) den Transfer-Test. Die Trainingsprozedur der vorliegenden Arbeit beinhaltet einen CS, eine Belohnung und eine instrumentelle Handlung. Im abschließenden Transfer-Test wird die durch die Präsentation des CS hervorgerufene Verstärkung des instrumentellen Verhaltens gemessen. Der verstärkende Effekt ist dabei ein Maß für die allgemeine motivierende Wirkung des CS, und wird daher zur Messung der

generellen Form des PIT eingesetzt (Dickinson und Dawson, 1987; Balleine, 1994; Dickinson et al., 2000; Hall et al., 2001; Cardinal et al., 2003b; Holland und Gallagher, 2003).

In jeder dieser Phasen wurden optimale Trainingsbedingungen ermittelt, um einen möglichst stabilen generellen Transfer zu ermöglichen. Es ist wichtig die klassische Konditionierung vor der instrumentellen Konditionierung durchzuführen. Denn so kann eine stabile Assoziation zwischen dem CS und der Belohnung erzielt werden (Colwill und Motzkin, 1994). Bei der klassischen Konditionierung wurde ein relativ langer CS von zwei Minuten verwendet. Durch diesen langandauernden Stimulus können im späteren Transfer-Test die durch den Stimulus ausgelösten Verhaltensweisen über einen langen Zeitraum gemessen werden (Homayoun und Moghaddam, 2009). Während der CS Präsentation wurden Belohnungen nach dem Belohnungsschema *random time 30s* (RT-30s) gegeben, d.h. im Mittel erfolgte alle 30 Sekunden eine Belohnungsgabe. Aufgrund dieses wahrscheinlichkeitsbasierten Schemas ist eine genaue Vorhersage der antizipierten Belohnungsgabe unmöglich. Dadurch wird das konditionierte Antwortverhalten über die gesamte Länge des CS aufrechterhalten, und findet nicht nur zu Zeiten der Belohnungsgabe statt (Holland, 1980; Corbit und Janak, 2007b; Delamater und Oakeshott, 2007). Die Wahl dieses Belohnungsschemas ist für die spätere Messung des PIT besonders wichtig, da auf diese Weise die verstärkende Wirkung des Stimulus über die gesamte Dauer des CS anhält.

Um bei einer instrumentellen Konditionierung das gewünschte instrumentelle Verhalten zu verstärken, stehen verschiedene Verstärkungspläne zur Verfügung. Bei Quotenplänen (*ratio schedules*) erfolgt die Verstärkung entweder genau nach jeder *n*-ten Reaktion (fester Quotenplan; *fixed ratio*), oder im Durchschnitt nach jeder *n*-ten Reaktion (variabler Quotenplan; *variable ratio*). Eine Sonderform des variablen Quotenplans stellte die Zufallsquote (*random ratio*) dar. Dabei besitzt jede Reaktion die gleiche Verstärkungswahrscheinlichkeit, unabhängig davon wie viele Reaktionen seit dem letzten Verstärker aufgetreten sind. Allgemein gilt für Quotenpläne, dass auch wenn der Zeitpunkt der nächsten Verstärkung nicht genau vorhersagbar ist, mehr Verstärker erhalten werden, je öfter das Verhalten auftritt. Durch diese lineare Handlungs-Belohnungsbeziehung führen Quotenpläne zu konstant hohen und stabilen Verhaltensraten, und führen seltener zur Ausbildung einer Gewohnheit (*habit*) (Dickinson, 1983, 1985). Bei Intervallplänen (*interval schedules*) hingegen hängt die Präsentation des Verstärkers sowohl vom Verhalten, als auch von der verstrichenen Zeit ab. Zumeist wird die erste Reaktion, die nach einer bestimmten Zeitspanne auftritt, verstärkt. Diese Zeitspanne kann entweder immer gleich sein (fester Intervallplan; *fixed interval*), oder von Verstärker zu Verstärker unvorhersagbar variieren

(variabler Intervallplan; *variable interval*). Dadurch stellen Intervallpläne nur bei einem geringen instrumentellen Antwortverhalten eine starke Handlungs-Belohnungs Beziehung her. Denn auch wenn die Anzahl der ausgeführten instrumentellen Handlungen zunimmt, bleibt, aufgrund der festgelegten Zeitspanne, die Anzahl der erhaltenen Belohnungen weitgehend unbeeinflusst. Somit wird die Handlungs-Belohnungs Beziehung immer schwächer, je öfter die instrumentelle Handlung ausgeführt wird. Dadurch bewirken Intervallpläne üblicherweise eine stetige, mittlere Reaktionsstärke. Diese mittlere Reaktionsstärke ermöglicht eine optimale Messung der motivationalen Komponente des PIT (Pecina et al., 2006), da keine *ceiling*-Effekte auftreten und somit die Präsentation des klassisch konditionierten Stimulus zu einer deutlich messbaren Steigerung des instrumentellen Verhaltens führen kann. Zudem begünstigen längere und variabelere Handlungs-Belohnungs Intervalle die Expression von PIT (Holland und Gallagher, 2003), da die Tiere es gewohnt sind nicht sofort im Anschluss an die instrumentelle Handlung eine Belohnung zu erhalten. Somit stellen sie im abschließenden PIT-Test, welcher unter Extinktionsbedingungen stattfindet, nicht sofort ihr Antwortverhalten ein, auch wenn sie keine Belohnung mehr dafür erhalten. Aufgrund dieser gerade erläuterten Vorteile wurde für die instrumentelle Konditionierung der vorliegenden Arbeit ein Intervallplan als Verstärkerplan gewählt. Im Gegensatz zu Quotenplänen begünstigen Intervallpläne jedoch die Ausbildung einer Gewohnheit (Dickinson, 1983, 1985). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings durch eine anschließende Extinktions-Sitzung gezeigt werden, dass auch nach einer instrumentellen Konditionierung mit einem Intervallplan das instrumentelle Verhalten weiterhin zielgerichtet ist. Denn nach dem Ausbleiben der Belohnungsgabe wurde die instrumentelle Performanz deutlich reduziert (Murschall und Hauber, 2005, 2006; Lex und Hauber, 2008).

Die anschließende Erinnerungs-Sitzung dient, zusammen mit der Extinktions-Sitzung, zur optimalen Vorbereitung auf den abschließenden Transfer-Test. In dieser Erinnerungs-Sitzung wird der CS wiederholt dargeboten und von einer Belohnung gefolgt, so dass die Erinnerung an den CS wieder aufgefrischt wird. Darüberhinaus wird in der Erinnerungs-Sitzung der CS₀ (unkonditionierter Stimulus) erstmalig dargeboten. Diese Darbietung des CS₀ ist überaus wichtig, da bei der erstmaligen Präsentation eines CS₀ eventuell unkonditionierte Reaktionen auftreten können (Dickinson et al., 2000; Cardinal et al., 2003b). Durch die Präsentation des CS₀ in der Erinnerungs-Sitzung habituiert diese unkonditionierten Reaktionen rasch und unterbleiben so im Transfer-Test. Die Extinktions-Sitzung dient der Vorbereitung auf den direkt daran anschließenden Transfer-Test, und ist aus mehreren Gründen wichtig: (1) um

neue Lernvorgänge zu vermeiden, welche stets durch Futtergabe ausgelöst werden, wird der Transfer-Test unter Extinktionsbedingungen durchgeführt. Durch die Extinktions-Sitzung erfolgt eine Habituation an diese Bedingungen (Pecina et al., 2006); (2) durch die Extinktion wird die Intensität des Antwortverhaltens reduziert und somit eine mittlere instrumentelle Performanz erreicht. Dadurch wird die Sensitivität des instrumentellen Verhaltens bei einer Präsentation des CS erhöht (Dickinson et al., 2000; Hall et al., 2001; Cardinal et al., 2003b; Delamater und Oakeshott, 2007) und behandlungsbedingte Erhöhungen oder Reduktionen des PIT können ebenfalls erfasst werden. Zusätzlich können falsch negative Befunden, welche auf *floor*- oder *ceiling*-Effekten beruhen, vermieden werden (Dickinson et al., 2000; Van Den Bos et al., 2004); (3) durch die Extinktionsbedingungen kann eindeutig überprüft werden, ob das Verhalten noch zielgerichtet ausgeführt wird, oder ob es bereits habituell geworden ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch zahlreiche Modifikationen des Protokolls von Dickinson et al. (2000) und unter Verwendung der eben erläuterten Trainingsprozedur und Trainingsparameter ein robuster genereller PIT hervorgebracht werden. Um die Vergleichbarkeit der Daten aus der vorliegenden Arbeit zu anderen Studien zu prüfen, wurden im Folgenden die Mittelwerte der Kennwerte, welche in Experiment 1, 2 und 3 von den Kontrolltiere gewonnen wurden, gebildet. Während der klassischen Konditionierung liegt die durchschnittliche *Approach Ratio* (Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Futterspender während des CS) beispielsweise bei durchschnittlich 60% am ersten Tag und 70% am letzten Tag. Dieser Zuwachs verdeutlicht den Lernfortschritt, der vermutlich auf der Ausbildung und Festigung einer Assoziation zwischen CS und Futterbelohnung im Verlauf der klassischen Konditionierung beruht. Während der instrumentellen Konditionierung bewegte sich die durchschnittliche Anzahl der Hebeldrücke pro Minute zwischen 4 am ersten und 16 am letzten Tag. Die anschließende Extinktion reduzierte die Hebeldruckrate um fast die Hälfte auf etwa 7 Hebeldrücke/min, d.h. die Tiere handelten noch nicht habituell, sondern weiterhin zielgerichtet. Im abschließenden Transfer Test unter Kontrollbedingungen wurde während des ISI (Interstimulus-Interval) und der Präsentation des CSo eine vergleichbare Hebeldruckrate von durchschnittlich 5 Hebeldrücken/min gemessen, wohingegen die Präsentation des CS beinahe eine Verdopplung der Hebeldruckrate auf etwa 8 Hebeldrücke/min zur Folge hatte. Im Mittel beträgt die Größe des Klassisch-Instrumentellen Transfers damit also 3 Hebeldrücke/min (CS minus CSo). Betrachtet man bei Kontrolltieren den zeitlichen Verlauf des PIT aus Experiment 3, wird die verstärkende Wirkung der CS Präsentation besonders deutlich. Da der Transfer-Test unter Extinktionsbedingungen durchgeführt wurde, nimmt die Intensität der instrumentellen Handlung im Laufe des Tests ab. Dennoch löst jede einzelne der

vier CS Präsentationen eine zuverlässige und deutliche Steigerung der Hebeldruckrate aus. (siehe 6.1 Experiment 1, Fig. 1b; 6.3 Experiment 3, Fig. 3B, 4B, 5B und 6B)

In der vorliegenden Arbeit sind sowohl die Ergebnisse der klassischen und instrumentellen Konditionierung, als auch des abschließenden Transfer-Tests unter Kontrollbedingungen durchaus vergleichbar mit Studien aus anderen Arbeitsgruppen. Beispielsweise berichten Cardinal et al. (Cardinal et al., 2003b), dass Kontrolltiere am letzten Tag der klassischen Konditionierung eine durchschnittlichen *Approach Ratio* von 65% zeigten, und ihre Hebeldruckrate am letzten Tag der instrumentellen Konditionierung bei durchschnittlich 15 Hebeldrücken/min lag. Während der anschließenden Extinktion fiel die Hebeldruckrate auf 7 Hebeldrücke/min ab. Auch die Daten während des Transfer-Test sind mit den hier gewonnenen Ergebnissen vergleichbar. Während ISI und CSo betätigten die Tiere etwa 3,5 Mal den Hebel, und die Präsentation des CS ließ die Hebeldruckrate auf durchschnittlich 7 Hebeldrücke/min ansteigen. Der hier gemessene PIT-Effekt entspricht also weitestgehend jenem, der in führenden Laboren in PIT-Experimenten erzielt wird, und spricht somit für die Qualität und Belastbarkeit der Daten aus den durchgeführten Experimenten.

7.1.2 Beurteilung der Mikroinfusionsprozedur

Der Ablauf der Mikroinfusionsprozedur orientierte sich weitestgehend an den gewonnenen Erfahrungen aus vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Hauber et al., 2000; Hauber et al., 2001; Bohn et al., 2003; Giertler et al., 2003, 2004, 2005; Schweimer et al., 2005). Um jedoch eine deutliche Verminderung der Stressreaktion auf die Mikroinfusion herbeizuführen, und damit den äußerst sensiblen und stressanfälligen PIT zuverlässig messen zu können, wurden die Tiere einer aufwändigen Habituationsprozedur unterzogen (Bohn et al., 2003). Vor der eigentlichen Substanzinjektion am Tag des Transfer-Tests fanden insgesamt vier Scheininfusionen und eine Salineinfusion mit jeweils einem Tag Pause dazwischen statt. Aufgrund dieser Vorgehensweise war es trotz Mikroinfusion möglich einen Transfereffekt zu messen, welcher mit Daten aus Läsionsstudien vergleichbar ist (Hall et al., 2001; Cardinal et al., 2003b; Corbit und Balleine, 2003a, b; Holland und Gallagher, 2003; El-Amamy und Holland, 2007; Ostlund und Balleine, 2007).

Das Injektionsvolumen der Mikroinfusion in den Experimenten 2 und 3 betrug 0,3µl und wurde über einen Zeitraum von einer Minute appliziert. Dieses vergleichsweise geringe Volumen wurde gewählt, um den Diffusionsradius der injizierten Substanzen möglichst gering zu halten und eine Beeinflussung der neuronalen Aktivität benachbarter Hirnregionen

zu verhindern. Eine besonders geeignete Methode den Diffusionsradius und die Beeinflussung der neuronalen Aktivität im umliegenden Gewebe nach einer Mikroinfusion zu bestimmen, ist der Nachweis des induzierbaren Transkriptionsfaktors *c-Fos*. Denn häufig bewirken applizierte Substanzen eine Aktivierung von Nervenzellen, die mit einer erhöhten *c-Fos* Expression einhergeht. Die Grenzen der *c-Fos* Aktivierung geben deshalb auch die Grenzen der Beeinflussung der neuronalen Aktivität durch die applizierte Substanz an, auch wenn der tatsächliche Diffusionsradius größer ist (Smith und Berridge, 2005; Pecina et al., 2006; Mahler et al., 2007). In solchen Studien zeigte sich, dass bei einem Injektionsvolumen von 0,5µl der Bereich, in dem die *c-Fos* Expression anstieg, einen Durchmesser von etwa 0,49mm bis 0,73mm hatte (Smith und Berridge, 2005; Mahler et al., 2007). Bei einem geringeren Injektionsvolumen (0,2µl bzw. 0,25µl) hingegen verkleinert sich auch der Radius des durch *c-Fos* Expression markierten Bereichs der neuronalen Aktivierung, und liegt in etwa zwischen 0,36mm und 0,45mm (Pecina und Berridge, 2000; Pecina et al., 2006). Auch Caine et al. (1995) wies in einer autoradiographischen Studie nach, dass bei einem Injektionsvolumen von 0,33µl der Diffusionsradius der applizierten Substanz nach einer Stunde etwa 0,63mm beträgt. Weitere Hinweise auf eine lokal begrenzte Wirkung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen liefern auch die Daten von McFarland und Kalivas (2001). Analog zu Experiment 2 applizierten sie eine Mischung der GABA-Agonisten Baclofen und Muscimol in die VTA und beobachteten daraufhin eine Verhaltensänderung. Die Injektion der Substanz in eine unmittelbar benachbarte Region bewirkte jedoch keine solche Verhaltensänderung. Daraus geht hervor, dass die applizierte Substanz zwar durch Diffusion in benachbarte Bereiche gelangen kann, die Konzentration dort aber zu gering ist, um einen Verhaltenseffekt auszulösen. Auch andere Studien sprechen für eine solche lokal begrenzte Wirkung. So können die in Experiment 3 verwendeten selektiven D₁-bzw. D₂-Antagonisten SCH23390 und Raclopride dissoziierbare Verhaltenseffekte hervorrufen, je nachdem ob sie in den AcbC oder AcbSh appliziert werden (Baldo et al., 2002; Anderson et al., 2003; Bari und Pierce, 2005).

Die Vergleichbarkeit des Diffusionsverhaltens der Wirkstoffe der vorgestellten Studien mit der vorliegenden Arbeit ist nur mit Einschränkungen möglich, da jeweils unterschiedliche Wirkstoffe mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften (z.B. Größe, Gewicht und Lipophilität) verwendet wurden, aufgrund dessen die Diffusionsgeschwindigkeiten unterschiedlich sein dürfte. Dennoch kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Verhaltenseffekte sehr wahrscheinlich durch Substanzwirkungen näherungsweise im Zielgebiet hervorgerufen werden.

7.2 Rolle von Glutamat beim Klassisch-Instrumentellen Transfer

Die Amygdala und der Acb sind Schlüsselstrukturen, welche an der Verarbeitung des PIT beteiligt sind (Blundell et al., 2001; Hall et al., 2001; de Borchgrave et al., 2002; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005). Darüberhinaus legen einige Studien eine Beteiligung Dopamin-vermittelter Signale nahe, insbesondere im Acb. Beispielsweise verhindert die systemische Gabe eines Dopaminrezeptor-Antagonisten die Expression von PIT (Dickinson et al., 2000), wohingegen eine direkte Applikation des Dopaminrezeptor-Agonisten Amphetamin in den Acb den PIT verstärkt (Wyvell und Berridge, 2000).

Einige Evidenzen sprechen auch für eine Beteiligung des exzitatorischen Transmitters Glutamat bei der Vermittlung des PIT. Zum einen belegen neuroanatomische Studien, dass die BLA starke glutamaterge Efferenzen zum Acb entsendet (Kelley et al., 1982; Brog et al., 1993; Wright et al., 1996), einer zentralen Struktur im neuralen Netzwerk des PIT. Darüberhinaus beruht motiviertes und belohnungsbezogenes Verhalten zumindest teilweise auf Glutamat-vermittelten Signalen (Burns et al., 1994; Maldonado-Irizarry et al., 1995), insbesondere im mesocorticolimbischen System (Horvitz, 2002; McFarland et al., 2003; Kalivas, 2004). Möglicherweise werden belohnungsbezogene Stimuli über glutamaterge Bahnen, welche von der Amygdala, dem Hippocampus oder dem PFC stammen, zum Acb übermittelt (Brog et al., 1993; Meredith und Totterdell, 1999). Einige Studien belegen, dass solche motivationsbezogenen, Glutamat-vermittelten Signale durch den Neurotransmitter Dopamin moduliert werden können. Die dendritischen Dornen des Acb beispielsweise tragen sowohl dopaminerge als auch glutamaterge Synapsen (Johnson et al., 1994), wodurch Dopamin modulierend auf Glutamat-induzierte EPSPs im Acb einwirken kann. Des Weiteren haben Studien der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptor-vermittelte Signale im Acb instrumentelle Handlungsabläufe beschleunigen können (Giertler et al., 2003), ein Effekt der möglicherweise auf einer verstärkten Wirkung von klassisch konditionierten Stimuli beruht. Da PIT den Einfluss von klassisch konditionierten Stimuli auf instrumentelles Verhalten widerspiegelt, könnte eine Manipulation des glutamatergen Systems ebenfalls Auswirkungen auf den Transfereffekt haben. Trotz dieser Hinweise wurde die Beteiligung von Glutamat bei der Vermittlung des PIT bisher nicht näher charakterisiert.

Daher wurde in Experiment 1 der vorliegenden Arbeit erstmals der Einfluss einer systemischen Blockade der NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren auf PIT untersucht. Dafür wurde der nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist Dizocilpin (MK-801) und der

kompetitive AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonist CNQX intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Ergebnisse aus Experiment 1 zeigen, dass eine systemische Blockade sowohl der NMDA-Rezeptoren mit Dizocilpin, als auch der AMPA/KA-Rezeptoren mit CNQX den Transfereffekt des PIT nicht beeinträchtigen (Murschall und Hauber, 2005).

Es ist unwahrscheinlich, dass dieser Negativbefund auf der Auswahl einer zu geringen Dosis beruht. Dizocilpin überwindet die Blut-Hirn-Schranke problemlos und wirkt somit auch bei einer systemischen Applikation im ZNS (Clineschmidt et al., 1982a; Clineschmidt et al., 1982b; Ford et al., 1989). Generell ist Dizocilpin für seine stimulierende Wirkung auf die Motorik bekannt, wodurch es zu Hyperaktivität, Stereotypien und, bei sehr hohen Dosen, zu Ataxien kommt (Clineschmidt et al., 1982b; Kloog, 1988; Ford et al., 1989; Loscher und Honack, 1992). In Experiment 1 bewirkte die systemische Gabe von 0.08mg/kg Dizocilpin eine signifikante Erhöhung der horizontalen Aktivität im *Open-Field*. Diese Veränderungen der motorischen Aktivität sind typisch für NMDA-Antagonisten, und stimmen mit Befunden aus anderen Studien überein, in denen vergleichbare Dosierungen appliziert wurden (Ford et al., 1989; Danysz et al., 1994). Da in Experiment 1 lediglich eine Stimulation der Motorik zu beobachten war, aber keine Stereotypien, ist davon auszugehen, dass die gewählte Dosierung von Dizocilpin nicht zu hoch gewählt war. Die generelle Erhöhung der Hebeldruckrate im abschließenden Transfertest ist daher wahrscheinlich auf eine allgemeine motorische Stimulation durch eine Blockade der NMDA-Rezeptoren zurückzuführen.

Im Gegensatz zu Dizocilpin hatte die systemische Applikation von CNQX keine Wirkung auf die motorische Aktivität im *Open-Field*, und es konnte ebenfalls kein genereller Effekt auf die Hebeldruckrate in der Skinner-Box beobachtet werden. Im allgemeinen beeinflusst der AMPA/KA-Antagonist CNQX jedoch sowohl die horizontale als auch die vertikale motorische Aktivität im *Open-Field* nur geringfügig (Klockgether et al., 1991; Danysz et al., 1994; Mead und Stephens, 1999; Backstrom und Hyytia, 2004). Einige Arbeitsgruppen vertreten deshalb die Ansicht, dass CNQX die Blut-Hirn-Schranke nur schwer, oder sogar gar nicht passieren kann (Fink-Jensen et al., 1992; Yoshiyama et al., 1995; Moghaddam et al., 1997; Nisim et al., 1999; Hollon et al., 2002). In starkem Kontrast dazu stehen einige Studien, welche eindeutig eine durch die systemische Applikation von CNQX induzierte Verhaltensänderung belegen. Beispielsweise veränderte eine vergleichbare Dosis (1,5mg/kg) zwar die motorische Aktivität nicht, schwächte jedoch den Rückfall in das Suchverhalten nach Kokain ab (Backstrom und Hyytia, 2003), und minderte das durch Alkohol-assoziierte Stimuli ausgelöste Suchverhalten nach Alkohol (Backstrom und Hyytia, 2004). Auch die Expression einer mit Amphetamin konditionierten Platzpräferenz konnte durch eine

systemische Gabe von CNQX verhindert werden, ohne dass gleichzeitig Änderungen der motorischen Aktivität auftraten (Mead und Stephens, 1999). Obwohl in Experiment 1 durch CNQX weder die motorische Aktivität beeinflusst wurde, noch eine generelle Veränderung der Hebeldruckrate zu beobachten war, scheint die applizierte Dosis von 1,5mg/kg CNQX ausreichend um Verhaltensänderungen auszulösen (Backstrom und Hyytia, 2003, 2004). Die fehlenden Wirkungen von MK-801 und CNQX auf PIT sind demnach nicht auch eine fehlerhafte Dosierung zurückzuführen. Vielmehr legen die Daten nahe, dass weder NMDA-, noch AMPA/KA-Rezeptor-vermittelte Signale an der Steuerung des PIT beteiligt sind.

Läsionsstudien konnten zeigen, dass der Acb die zentrale Struktur des PIT Netzwerkes darstellt (Hall et al., 2001; de Borchgrave et al., 2002). Der Acb erhält hauptsächlich glutamaterge Eingänge von corticalen und limbischen Strukturen (Wright et al., 1996; Setlow, 1997; Groenewegen und Trimble, 2007). Daher ist der Befund, dass eine Blockade der ionotropen Glutamatrezeptoren den Transfereffekt nicht beeinflusst, äußerst überraschend. Allerdings gibt es im Hinblick auf die Strukturen des Netzwerkes, welches den PIT steuert, einige Widersprüche. So existieren bezüglich der Rolle beider Subregionen des Acb, AcbC und AcbSh, bei der Vermittlung es PIT unterschiedliche Befunde. Einerseits konnten Corbit und Mitarbeiter (2001) zeigen, dass eine Läsion des AcbSh, nicht aber des AcbC, den PIT beeinträchtigt. Andererseits berichten Hall und Kollegen (2001), dass der Transfereffekt durch eine Läsion des AcbC verhindert wird. Eine ähnliche Datenlage existiert bezüglich der unterschiedlichen Beteiligung von BLA und CeN an der Vermittlung es PIT. So reduziert eine Läsion des CeN beispielsweise den Transfereffekt, wohingegen eine Läsion der BLA ohne Auswirkungen auf den PIT blieb (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003). Im Gegensatz dazu berichten Blundell und Kollegen (2001), dass eine Läsion der BLA, nicht aber des CeN, PIT unterbindet. Corbit und Balleine (2005) waren die ersten, welche diese diskrepanten Ergebnisse möglicherweise auf die unterschiedlichen Trainingsprotokolle der einzelnen Studien zurückführten. Demzufolge existieren zwei unterschiedliche Formen des PIT, der generelle PIT und der spezifische PIT, welche durch unterschiedliche Trainingsprozeduren hervorgerufen werden können (siehe 7.1.1 Beurteilung des Klassisch-Instrumentellen Transfers). Nach den Befunden von Corbit und Balleine (2005) ist sowohl die BLA als auch der CeN an der Vermittlung des PIT beteiligt, wobei die BLA den spezifischen und der CeN den generellen PIT vermittelt. Die generelle Form des PIT beruht dabei auf einer allgemeinen Steigerung der Motivation, ausgelöst durch die Assoziation zwischen einem klassisch konditionierten Stimulus und der generellen motivierenden Eigenschaft der damit verknüpften Belohnung. Durch diese allgemeine Motivationssteigerung bewirkt der klassisch

konditionierte Stimulus letztendlich im abschließenden Transfertest eine unspezifisch erhöhte Handlungsbereitschaft für die jeweils verfügbaren instrumentellen Handlungen (Rescorla und Solomon, 1967; Dickinson und Dawson, 1987; Corbit und Balleine, 2005). Die spezifische Form des PIT hingegen macht sich die selektiven Eigenschaften von Stimulus und Belohnung zunutze. Ein klassisch konditionierter Stimulus kann gezielt die spezifischen sensorischen Eigenschaften der mit ihm assoziierten Belohnung abrufen, und anschließend nur jene instrumentelle Handlung verstärken, welche dieselbe Belohnung erwarten lässt, wie der Stimulus selbst (Abb. 5.5). Obwohl auch ein spezifischer Stimulus über generelle appetitive Eigenschaften verfügt, wird nur die instrumentelle Handlung, welche mit der spezifischen Belohnung assoziiert ist, verstärkt. Dabei wirken die spezifischen Eigenschaften des Stimulus stärker als die generell motivationssteigernden Eigenschaften. Manchmal werden sogar andere instrumentelle Handlungen, welche nicht mit derselben Belohnung assoziiert sind, unterdrückt (Colwill und Motzkin, 1994; Cardinal et al., 2002a; Corbit und Balleine, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich ein Protokoll zur Generierung des generellen PIT verwendet (siehe 7.1.1 Beurteilung des Klassisch-Instrumentellen Transfers), welcher vermutlich auf einer Beteiligung des CeN beruht (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005). Da der PIT auch von einer Aktivierung der dopaminergen Neurone des Acb abhängig ist, wurde vermutet, dass der CeN über seine hauptsächlich GABAergen Projektionsfasern zum Mittelhirn (Wallace et al., 1992; Swanson und Petrovich, 1998; Cardinal et al., 2003a; Phillips et al., 2003) modulierend auf die dopaminergen Neurone des Acb einwirkt (Abb. 7.1). In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnten Ahn und Phillips (2002) zeigen, dass eine Inaktivierung des CeN die basale Dopaminfreisetzung im Acb erniedrigte. Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass GABAerge Projektionsbahnen zu dopaminergen Neuronen des Mittelhirns, welche letztendlich die Dopamintransmission im Acb beeinflussen, den generellen PIT steuern. Dieses Netzwerk des generellen PIT erfordert keine Beteiligung glutamaterger Neurone. Dies würde erklären, warum eine Blockade der NMDA- und AMPA/KA-Rezeptoren ohne Auswirkungen auf den Transfereffekt blieb.

Vielmehr ist anzunehmen, dass der spezifische PIT, welcher vermutlich auf einer BLA Beteiligung beruht (Corbit und Balleine, 2005), durch eine Blockade der ionotropen Glutamaterezeptoren beeinflusst werden kann. Denn die BLA sendet direkte glutamaterge Efferenzen zum Acb (Brog et al., 1993; Wright et al., 1996; Swanson und Petrovich, 1998; Phillips et al., 2003). Für diese Annahme spricht außerdem, dass eine Zellkörperläsion des orbitofrontalen Cortex (OFC) den spezifischen PIT blockiert (Ostlund und Balleine, 2007).

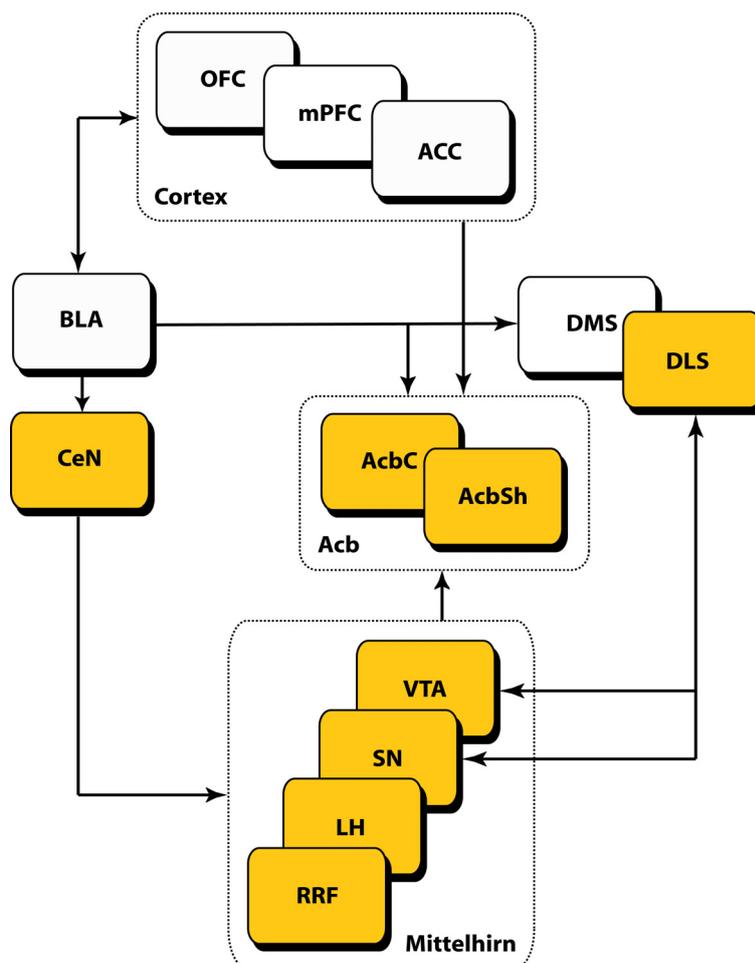


Abbildung 7.1 Neuronaler Schaltkreis des generellen PIT. Die farblich hinterlegten Bereiche markieren die für den generellen PIT wichtigen Hirnareale. Der generelle Transfer beruht auf der Integrität des CeN (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005), welcher über GABAerge Efferenzen zu dopaminergen Neuronen des Mittelhirns die Dopamintransmission im Acb moduliert (Parkinson et al., 2000b; Hall et al., 2001; Cardinal et al., 2002a). Dabei ist die Verbindung zwischen CeN und Acb eher polysynaptischer Natur. Mögliche zwischengeschaltete Strukturen, welche ebenfalls an der Regulation des generellen PIT beteiligt sein könnten, stellen dabei die SN, das RRF und der LH dar (Zahm, 2000; Zahm et al., 2001; Fadel und Deutch, 2002; Zahm, 2005; El-Amamy und Holland, 2007). In beiden Subregionen des Acb (AcbC und AcbSh) beruht der generell motivierende Effekt klassisch konditionierter Stimuli auf D_1 - und D_2 -Rezeptor-vermittelten Prozessen (Lex und Hauber, 2008). Desweiteren stellt die VTA ebenfalls eine Schlüsselstruktur im neuronalen Schaltkreis des generellen PIT dar (Murschall und Hauber, 2006), und auch das DLS ist an der Vermittlung exzitatorischer Einflüsse klassisch konditionierter Stimuli auf instrumentelles Verhalten beteiligt (Corbit und Janak, 2007a).

Acb, Nucleus accumbens; AcbC, Nucleus accumbens core; AcbSh, Nucleus accumbens shell; ACC, anteriorer cingulärer Cortex; BLA, basolaterale Amygdala; CeN, Zentralkern der Amygdala; DLS, dorsolaterales Striatum; DMS, dorsomediales Striatum; LH, lateraler Hypothalamus; mPFC, medialer präfrontaler Cortex; OFC, orbitofrontaler Cortex; RRF, Retrorubales Feld; SN, Substantia nigra; VTA, ventrales tegmentales Areal

Der OFC projiziert glutamaterg zum Acb (Heimer et al., 1991; Groenewegen et al., 1996; Groenewegen und Trimble, 2007) und besitzt starke reziproke glutamaterge Verbindungen zur BLA (McDonald, 1991; McDonald und Mascagni, 1996). Dies spricht für eine wichtige Funktion Glutamat-vermittelter Signale bei der Steuerung des spezifischen PIT.

Aus neuere Studien an *Knock-out* (KO) Mäusen geht hervor, dass eine Deletion der GluR1 Untereinheit des AMPA-Rezeptors den generellen PIT nicht beeinträchtigt (Mead und Stephens, 2003b). Durch immunhistochemische Nachweismethoden ist bekannt, dass in der BLA hauptsächlich die GluR1 Untereinheit des AMPA-Rezeptors exprimiert wird (McDonald, 1996). Eine Deletion der GluR1 Untereinheit ist deshalb mit einer Läsion der BLA vergleichbar, welche ebenfalls zu keiner Veränderungen der Transferrate im generellen PIT führt (Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005).

Im Gegensatz zu einer Deletion der GluR1 Untereinheit führt die Mutation der beiden intrazellulären Phosphorylierungsstellen der GluR1 Untereinheit zur Blockade des generellen PIT (Crombag et al., 2008). Diese Mutanten weisen jedoch leichte Defizite in der instrumentellen Trainingsphase auf, und erreichen erst zum Ende des instrumentellen Trainings das Niveau der Wildtyp Mäuse. Daher könnte der reduzierte Transfereffekt möglicherweise auch auf eine mangelnde Akquisition des instrumentellen Verhaltens zurückzuführen sein.

Eine Deletion der GluR2 Untereinheit des AMPA-Rezeptors hat ebenfalls eine Blockade des generellen PIT zur Folge (Mead und Stephens, 2003a). Da GluR2 Untereinheiten vermehrt in den AMPA-Rezeptoren der CeN exprimiert werden (Crombag et al., 2008), ist die Deletion dieser Untereinheit mit einer Läsion des CeN zu vergleichen. Die Studie von Mead und Stephens (2003a) widerspricht damit den Ergebnissen aus Experiment 1 der vorliegenden Arbeit, und gibt Hinweise auf eine glutamaterge Beteiligung beim generellen PIT. Allerdings weisen KO Mäuse mit dieser Mutation massive motorische Beeinträchtigungen auf, welche sich in Koordinationsproblemen und einer erhöhten Passivität äußern (Jia et al., 1996; Gerlai et al., 1998). Darüberhinaus kommt es bei GluR2 KO Mäusen zu einer erhöhten Ca^{2+} Permeabilität, was eine erleichterte Langzeitpotenzierung zur Folge hat (Jia et al., 1996). Daher weisen GluR2 KO Mäuse vielfältige physiologische Veränderungen auf, die mit den Wirkungen einer selektiven pharmakologischen AMPA/KA-Rezeptor Blockade, wie sie in Experiment 2 vorgenommen wurden, kaum vergleichbar ist. Es ist daher fraglich, ob mithilfe so manipulierter Tiere Aussagen zur Steuerung des PIT getroffen werden können.

Zusammengefasst zeigen die gewonnenen Daten aus Experiment 1, dass eine Blockade der ionotropen NMDA- und AMPA/KA-Rezeptoren den PIT nicht beeinflussen. Dies liegt

möglicherweise daran, dass der generelle PIT, welcher hier gemessen wurde, durch ein neuronales Netzwerk gesteuert wird, welches auf einer Modulation der Dopamintransmission im Acb durch GABAergen Projektionsfasern vom CeN zu dopaminergen Neuronen des Mittelhirns beruht. Eine Beteiligung des Neurotransmitters Glutamat ist daher nicht gegeben.

7.3 Rolle der VTA beim Klassisch-Instrumentellen Transfer

Die Amygdala und der Acb sind Schlüsselstrukturen bei der Verarbeitung des PIT (Blundell et al., 2001; Hall et al., 2001; de Borchgrave et al., 2002; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005) (Abb. 7.1). Desweiteren legen einige Studien eine Beteiligung des Neurotransmitters Dopamin nahe. Beispielsweise verhindert die systemische Gabe eines Dopaminrezeptor-Antagonisten die Expression von PIT (Dickinson et al., 2000), wohingegen eine direkte Applikation des Dopaminrezeptor-Agonisten Amphetamin in den Acb den PIT verstärkt (Wyvell und Berridge, 2000). Auch zwei Subregionen der Amygdala, BLA und CeN, sind an der Steuerung des PIT beteiligt. Unter Verwendung unterschiedlicher Trainingsprotokolle können zwei verschiedene Formen des PIT untersucht werden, wobei der spezifische PIT durch die BLA (Blundell et al., 2001; Corbit und Balleine, 2005) und der generelle PIT durch den CeN vermittelt wird (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005). Da der CeN GABAerg zur VTA projiziert (Wallace et al., 1992; Swanson und Petrovich, 1998; Cardinal et al., 2003a; Phillips et al., 2003), liegt die Vermutung nahe, dass der CeN die Aktivität der dopaminergen Neurone des Mittelhirns reguliert, und auf diese Weise den generellen PIT steuert (Hall et al., 2001). Allerdings liegen bisher keine Daten darüber vor, ob die VTA an der Vermittlung des Einflusses klassisch konditionierter Stimuli auf instrumentelles Verhalten beteiligt ist.

Aus diesem Grund wurde in Experiment 2 der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer reversiblen Inaktivierung der VTA auf den generellen PIT untersucht. Dazu wurde mittels einer Mikroinfusionsprozedur eine Mischung des GABA_A-Agonisten Muscimol und des GABA_B-Agonisten direkt in die VTA appliziert. Dieser Eingriff bewirkte eine dosisabhängige Reduktion des PIT (Murschall und Hauber, 2006). Somit konnte durch die Ergebnisse in Experiment 2 der vorliegenden Arbeit erstmals belegt werden, dass der motivationale Einfluss von klassisch konditionierten Stimuli auf das instrumentelle Verhalten von einer neuronalen Aktivität der VTA abhängig ist.

Die Inaktivierung der VTA mithilfe der GABA-Agonisten Baclofen und Muscimol wurde aus mehreren Gründen gewählt. Zum einen kommt es, im Gegensatz zu anderen

Inaktivierungstechniken, hierbei nicht zu einer ungewollten Beeinflussung vorbeiziehender Faserbündel (McFarland und Kalivas, 2001). Zum anderen erfolgt eine reversible Inaktivierung nahezu aller Neuronen der VTA. Etwa 70–80% aller VTA Neurone exprimieren den Neurotransmitter Dopamin, während die restlichen 20–30% vermutlich GABAerge Interneurone darstellen (Bayer und Pickel, 1991; Kalivas, 1993; Van Bockstaele und Pickel, 1995; Carr und Sesack, 2000). Des Weiteren sind sowohl ionotrope GABA_A-Rezeptoren, als auch metabotrope GABA_B-Rezeptoren in der VTA zu finden (Suaud-Chagny et al., 1992; Kalivas, 1993; Westerink et al., 1996; Westerink et al., 1998). Beide Rezeptorklassen können anatomisch und funktionell dissoziiert werden (Sugita et al., 1992; Xi und Stein, 1998; Margeta-Mitrovic et al., 1999). So hat eine Applikation des GABA_A-Agonisten Muscimol eine Aktivierung des mesolimbischen dopaminergen Systems zur Folge, wahrscheinlich durch die Inhibition der GABAergen Interneurone und der damit verbundenen Disinhibition der dopaminergen Neuronen (Kalivas et al., 1990). Im Gegensatz dazu führt die Gabe von GABA_B-Agonisten zu einer verringerten Aktivität des mesolimbischen dopaminergen Systems, vermutlich durch eine direkte Inhibition der dopaminergen VTA Neurone (Olpe et al., 1977; Westerink et al., 1998). GABA_A-Rezeptoren sind demnach hauptsächlich auf nicht-dopaminergen Neuronen zu finden (Churchill et al., 1992; Klitenick et al., 1992; Kalivas, 1993), während GABA_B-Rezeptoren primär auf dopaminergen Zellen der VTA exprimiert werden (Xi und Stein, 1998; Margeta-Mitrovic et al., 1999). Durch die Wahl einer GABA_{A/B}-vermittelten Inaktivierung der VTA in Experiment 2 können folglich sowohl die dopaminergen als auch die nicht-dopaminergen Neurone der VTA reversibel inaktiviert werden.

Es ist unwahrscheinlich, dass die dosisabhängige Blockade des PIT auf einer unspezifischen Beeinträchtigung der Motorik beruht. Zum einen bleibt die Hebeldruckrate während des ISI und des CSo bei einer niedrigen und mittleren Dosierung weitestgehend konstant. Im Gegensatz dazu führt jedoch schon die mittlere Dosis der GABA_{A/B}-Agonisten zu einer Reduktion des PIT. Ausschließlich die höchste Dosierung hat eine leichte Reduktion der basalen Hebeldruckrate zur Folge, was eventuell auf ein motorisches Defizit hinweisen könnte. Allerdings haben eigene Beobachtungen ergeben, dass beim generellen PIT eine höhere Dosis als die verwendeten nötig ist, um eine massiven Beeinträchtigung der motorischen Aktivität und damit auch der basalen Hebeldruckrate zu bewirken. Des Weiteren konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass eine Baclofen/Muscimol vermittelte transiente Inaktivierung der VTA in vergleichbaren Dosierungen sowohl einem Kokain induzierten Rückfall in süchtiges Verhalten vorbeugt (McFarland und Kalivas, 2001), als

auch einen Rückfall in das Suchverhalten nach Kokain verhindert bzw. abschwächt (Di Ciano und Everitt, 2004; McFarland et al., 2004). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus Experiment 2, traten auch in diesen Studien keine durch Baclofen/Muscimol induzierten motorisches Defizit auf. Die von uns in Experiment 2 verwendete Dosierung von Baclofen und Muscimol wurde inzwischen von zwei neueren Studien übernommen (Corbit et al., 2007; Takahashi et al., 2009). Auch dabei wurden keine Beeinträchtigungen der motorischen Aktivität beobachtet.

Die Daten aus Experiment 2 zeigen erstmalig, dass die VTA einen wichtigen Beitrag bei der Vermittlung des generellen PIT leistet. Eine später veröffentlichte Arbeit von Corbit et al. (2007) bestätigt diesen Befund. In Anlehnung an unser Experiment wurde in dieser Studie ebenfalls eine reversible Inaktivierung der VTA durchgeführt, und anschließend eine Beeinträchtigung des generellen PIT beobachtet. Somit stellt die VTA, neben dem Acb und dem CeN (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005), eine weitere bedeutende Struktur im neuronalen Schaltkreis des generellen PIT dar.

Der generelle Transfereffekt wird also möglicherweise über Efferenzen des CeN zur VTA gesteuert, wodurch wiederum die Aktivität der dopaminergen Neurone moduliert werden kann (Hall et al., 2001). Die Projektionsneurone des CeN sind hauptsächlich GABAerg und ziehen in die unmittelbare Nähe dopaminergen Neurone des Mittelhirns wie der VTA, der SN und dem RRF (Krettek und Price, 1978; Wallace et al., 1992; Swanson und Petrovich, 1998; Fudge und Haber, 2000; Cardinal et al., 2003a; Phillips et al., 2003). Einige Studien unterstützen die hier vertretene Annahme, dass der CeN einen regulatorischen Einfluss auf die dopaminergen Neurone des Mittelhirns ausübt. So beeinflusst eine Läsion des CeN, oder die Applikation eines Dopaminrezeptor-Antagonisten in die Amygdala den extrazellulären Dopaminspiegel im Acb (Louilot et al., 1985; Simon et al., 1988; McGregor und Roberts, 1993; Caine et al., 1995; Hurd et al., 1997). Allerdings liegen bislang keine genaueren Untersuchungen dazu vor, ob die Efferenzen des CeN einen direkten Einfluss auf die dopaminergen Neurone der VTA nehmen, oder ob dieser Einfluss indirekt über die nicht-dopaminerge Interneurone der VTA erfolgt (Wallace et al., 1992). Ein Indiz für eine indirekte Beeinflussung wäre, dass die Inaktivierung des CeN zu einer Erniedrigung des basalen Dopaminspiegels im Acb führt (Ahn und Phillips, 2002, 2003). Diese Wirkung beruht möglicherweise auf einer Hemmung der GABAergen Interneurone der VTA durch GABAergen Afferenzen vom CeN. Folglich führt eine Inaktivierung des CeN zu einer Disinhibition der GABAergen VTA Neurone, und damit zu einer verminderten Aktivität der mesoaccumbalen dopaminergen Neuronen. Dies wiederum hat einen erniedrigten basalen

Dopaminspiegel im Acb zur Folge (Ahn und Phillips, 2002; Howland et al., 2002; Phillips et al., 2003). Eine neuere Studie von El-Amamy und Holland (2007) liefert jedoch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich einer direkten Verbindung zwischen CeN und VTA. Da die Projektionen zwischen CeN und VTA hauptsächlich ipsilateral verlaufen (Swanson, 1982), untersuchten sie die Auswirkungen einer funktionellen Diskonnektion⁸ von CeN und VTA auf den generellen PIT. Überraschenderweise konnten sie zeigen, dass eine unilaterale Läsion der VTA zu einer Reduktion des PIT führt, die Diskonnektion von CeN und VTA hingegen den Transfereffekt nicht beeinträchtigte. Eine unilaterale Läsion der VTA hat die Blockade der dopaminergen Innervation des ipsilateralen Acb zur Folge. Diese unilaterale Dopamindepletion könnte eine Erklärung für den verminderten, jedoch nicht völlig fehlenden, Transfereffekt sein. Aufgrund der Diskonnektionsläsion kommt es im Acb zu einer bilateralen Dopamindepletion, welche eine vollständige Blockade des PIT zur Folge haben müsste. Da die Läsion jedoch in etwa 40 Tage vor dem abschließenden Transfertest durchgeführt wurde, konnten möglicherweise alternative Projektionsbahnen aktiviert werden, welches letztendlich zu dem durch El-Amamy und Holland (2007) beobachteten intakten PIT führte. Da die Inaktivierung der VTA in Experiment 2 jedoch unmittelbar vor dem Transfertest durchgeführt wurde, und somit keine Reorganisation der neuronalen Projektionswege stattfinden konnte, können die Ergebnisse von El-Amamy und Holland (2007) nicht ohne weiteres mit den gewonnenen Daten aus Experiment 2 verglichen werden.

Möglicherweise ist der neuronale Schaltkreis des generellen PIT jedoch wesentlich komplexer, als die zunächst angenommene einfache CeN-VTA-Acb Verschaltung. Auch anatomische Daten stützen den Zweifel an die Existenz einer robusten monosynaptischen Projektion vom CeN zur VTA (Zahm, 2005). Beispielsweise konnten Price und Amaral (1981) nach der Injektion eines anterograden Tracers in den CeN nur eine schwache Markierung der VTA erkennen, dafür aber eine ausgeprägte Projektion in die SN und das RRF. Weitere anatomische Daten weisen ebenfalls auf eine eher polysynaptische Verschaltung von CeN und VTA hin, möglicherweise über die SN, das RRF oder den LH (Zahm, 2000; Zahm et al., 2001; Fadel und Deutch, 2002). Daraus geht hervor, dass der CeN die VTA sowohl auf direkte als auch indirekte Weise über Mittlerstrukturen des Mittelhirns modulieren kann.

⁸ Da die Verbindung zwischen CeN und VTA primär ipsilateral verlaufen (Swanson 1982), verhindert eine Überkreuzläsion (Läsion des CeN in der einen, und Läsion der VTA in der anderen Hemisphäre) die direkte Kommunikation zwischen beiden Arealen. Eine solche Diskonnektionsläsion beeinträchtigt jedoch ausschließlich Funktionen, für welche die Verbindung zwischen beiden Arealen benötigt wird.

Zusammengefasst zeigen die Daten aus Experiment 2 der vorliegenden Arbeit, dass die Vermittlung des generellen PIT auf der Integrität der VTA beruht. Dabei ist anzunehmen, dass die Regulation der mesoaccumbalen dopaminergen Neurone durch den CeN über einen komplexen neuronalen Schaltkreis verläuft. Dieser Schaltkreis beinhaltet neben der VTA auch weitere, den Acb innervierende Areale, wie beispielsweise die SN, das RRF oder den LH.

7.4 Rolle von Dopamin im Acb beim Klassisch-Instrumentellen Transfer

Der generelle motivierende Einfluss von klassisch konditionierten Stimuli auf instrumentelles Verhalten beruht sowohl auf der Integrität der Amygdala (insbesondere des CeN) als auch des Acb (Blundell et al., 2001; Hall et al., 2001; de Borchgrave et al., 2002; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005). Die Beteiligung des Acb an der Verarbeitung des generellen PIT kann, analog zur Amygdala, auf der Ebene der beiden Subregionen des Acb dissoziiert werden. So blockiert beispielsweise eine Läsion des AcbC die motivationssteigernde Wirkung von appetitiven klassisch konditionierten Stimuli während des PIT (Hall et al., 2001). Eine Läsion des AcbSh hingegen beeinträchtigt den selektiven Einfluss belohnungsbezogener Stimuli auf instrumentelles Verhalten (Corbit et al., 2001). Des Weiteren belegen neuere Studien und die Daten aus Experiment 2, dass die VTA ebenfalls eine Schlüsselstruktur des generellen PIT darstellt (Murschall und Hauber, 2006; Corbit et al., 2007; El-Amamy und Holland, 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass der Neurotransmitter Dopamin eine zentrale Rolle bei der Vermittlung des PIT einnimmt. So verhindert beispielsweise die systemische Gabe eines Dopaminrezeptor-Antagonisten die Expression des PIT (Dickinson et al., 2000), wohingegen eine direkte Applikation des Dopaminrezeptor-Agonisten Amphetamin in den Acb den PIT verstärkt (Wyvell und Berridge, 2000). Obwohl diese Befunde auf eine wichtige Funktion der mesoaccumbalen Dopamintransmission hindeuten, ist bisher wenig darüber bekannt, in welchen Subregionen des Acb Dopamin-vermittelte Signale bei der Vermittlung des PIT eine Rolle spielen, und welche Dopaminrezeptoren daran beteiligt sind.

Aus diesem Grund wurde in Experiment 3 die Auswirkung einer Blockade der D₁- sowie der D₂- Rezeptoren in AcbC und AcbSh auf den generellen PIT untersucht. Dazu wurden unmittelbar vor dem abschließenden Transfertest der D₁-Rezeptor-Antagonist SCH23390 und der D₂-Rezeptor-Antagonist Racloprid direkt in den AcbC, beziehungsweise den AcbSh injiziert. Die Applikation von SCH23390 und Racloprid in den AcbC blockierte ebenso den PIT, wie eine lokale Injektion von SCH23390 und Racloprid in den AcbSh (Lex und Hauber,

2008). Die Ergebnisse aus Experiment 3 weisen somit erstmals nach, dass sowohl D₁- als auch D₂-Rezeptor-vermittelte Prozesse in beiden Subregionen des Acb an der Steuerung des generellen PIT beteiligt sind.

Es ist unwahrscheinlich, dass die beobachtete Blockade des generellen PIT durch eine unspezifische Beeinträchtigung der Motorik zu erklären ist. Die Gabe von Dopaminrezeptor-Antagonisten kann allerdings zu motorischen Defiziten führen (Smith-Roe und Kelley, 2000). Vor allem instrumentelle Verhaltensweisen sind sensitiv gegenüber den motorisch hemmenden Wirkungen von Dopamin-Antagonisten (Fibiger et al., 1976). So berichten Nowend et al. (2001) von einer reduzierten Hebeldruckrate nach der Injektion von sowohl SCH23390 als auch Racloprid in AcbC und AcbSh. Gleichzeitig konnten jedoch keine Veränderungen in der Dauer der Hebeldrücke beobachtet werden. Eine detailliertere Analyse der motorischen Aktivität nach einer Blockade der D₁- und D₂-Rezeptoren in den Subregionen des Acb wurde von Baldo et al. (2002) durchgeführt. So reduziert die Applikation von SCH23390 und Racloprid schon in einer frühen Testphase die Lokomotion auf ein Niveau, welches Kontrolltiere erst am Ende der 30-minütigen Testphase erreichten. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Blockade der D₁- und D₂-Rezeptoren kein generelles motorisches Defizit hervorruft, sondern lediglich die motorische Aktivierung unterbindet, welche von einer neuen und ungewohnten Umgebung ausgeht (Nicola, 2007). Die in Experiment 3 durchgeführte Applikation von SCH23390 oder Racloprid führte im AcbC zu einer signifikanten Reduktion der basalen Hebeldruckrate während ISI und CSo, wohingegen eine Infusion beider Substanzen in den AcbSh sich geringer auf die basale Hebeldruckrate auswirkte. Eine eingehende Analyse der vorliegenden Daten zeigt jedoch, dass die gemessene Reduktion des PIT vermutlich nicht auf unspezifischen motorischen Wirkungen der applizierten Substanzen zurückzuführen ist. Zum einen wird der PIT unter Extinktionsbedingungen gemessen, was eine geringe basale Hebeldruckrate zur Folge hat. Durch diese eher geringen Ansprüche an die instrumentelle Performanz wird jedoch auch die maximale Kapazität des instrumentellen Verhaltens nicht stark beansprucht. Somit würden auch kleinere, Substanz-induzierte motorische Defizite nicht zwingend zu einer messbaren Reduktion der Hebeldruckrate führen. Zum anderen bewirkt die Infusion von SCH23390 und Racloprid in den AcbC zwar eine Verringerung der Hebeldruckrate im ISI, allerdings fällt diese Reduktion eher gering aus, und ist durchaus mit den basalen Hebeldruckraten im AcbSh während ISI zu vergleichen. Auch andere Studien belegen eine vergleichbar niedrige Hebeldruckrate, sowohl bei Kontrolltieren als auch behandelten Tieren (Murschall und Hauber, 2006; El-Amamy und Holland, 2007). Den wichtigsten Hinweis, dass unspezifische

Substanz-induzierte Wirkungen nicht zu der beobachteten Reduktion des PIT führten, liefert die zeitliche Aufschlüsselung der Hebeldruckraten über den gesamten Verlauf des abschließenden Transfertests. Diese macht deutlich, dass auch bei einer Stimulus-Präsentation zu Beginn der Sitzung, wenn die basale Hebeldruckrate noch relativ hoch ist, der Transfereffekt ausbleiben kann. Im Gegensatz dazu kann jedoch auch eine Stimulus-Präsentation am Ende der Sitzung zu einer Erhöhung des instrumentellen Antwortverhaltens führen, obwohl zu diesem Zeitpunkt die basale Hebeldruckrate bereits geringer ist als zu Beginn des Transfertests. Dieser Befund verdeutlicht, dass PIT auch bei einer reduzierten basalen Hebeldruckrate ausgelöst werden kann, und somit aufgrund der Applikation von SCH23390 und Racloprid keinem *floor*-Effekt unterliegt. Insgesamt sprechen diese Befunde dafür, dass Substanz-induzierte motorische Beeinträchtigungen durch die Injektion von SCH23390 und Racloprid die hier beobachtete Blockade des PIT kaum erklären können.

Die Daten aus Experiment 3 bestätigen und erweitern frühere Annahmen zur Rolle von Dopamin im Acb bei der Steuerung des PIT. Beispielsweise führt eine systemische Blockade der Dopaminrezeptoren (Dickinson et al., 2000), sowie die transiente Inaktivierung der VTA (Murschall und Hauber, 2006; Corbit et al., 2007) zu einer Reduktion des Transfereffektes. Eine Aktivierung der accumbalen Dopamin-Neurone hingegen bewirkt eine Erhöhung des PIT (Wyvell und Berridge, 2000). Eine Reihe von weiteren Studien belegen, dass die Dopaminfreisetzung im Acb in direktem Zusammenhang mit der Verarbeitung von klassisch konditionierten, Belohnungs-assoziierten Stimuli steht. So bewirkt die Präsentation solcher Reize eine Erhöhung der Dopamintransmission im Acb (McCullough und Salamone, 1992; Bassareo und Di Chiara, 1999; Weiss et al., 2000). Des Weiteren ist die Häufigkeit von instrumentellem Verhalten infolge der Präsentation von diskriminativen Stimuli, welche ebenfalls als klassisch konditionierte Reize wirken können (Colwill und Rescorla, 1988), von einer Aktivität an Dopaminrezeptoren im Acb abhängig (Yun et al., 2004a). Auch die Inaktivierung der VTA, dem wichtigsten Ursprungsgebiet der accumbalen Dopamin-Afferenzen, führt bei einer Präsentation diskriminativer Stimuli zu einer vergleichbaren Reduktion des instrumentellen Verhaltens (Yun et al., 2004b). Ebenso ist die Initiation von instrumentellem Verhalten als Reaktion auf diskriminative Stimuli von der Aktivität an Dopaminrezeptoren im Acb abhängig (Calaminus und Hauber, 2007). Des Weiteren kommt es, in Übereinstimmung mit den Daten aus Experiment 3, nach einer Zellkörperläsion des AcbC ebenfalls zu einer Beeinträchtigung des generellen Transfers (Hall et al., 2001). Mikrodialyse-Studien belegen zudem, dass vor allem nahrungs-assoziierte,

klassisch konditionierte Stimuli die Dopamintransmission im AcbC erhöhen (Bassareo und Di Chiara, 1997, 1999; Bassareo et al., 2002; Cheng et al., 2003). Aufgrund dieser Evidenzen ist anzunehmen, dass die Dopamintransmission im AcbC instrumentelles Verhalten, welches durch die Präsentation von Belohnungs-assoziierten Reizen ausgelöst wird, moduliert. Insgesamt sprechen diese Daten also dafür, dass sowohl D₁- als auch D₂-Rezeptor-vermittelte Prozesse im AcbC an der Steuerung des generellen PIT beteiligt sind.

Zusätzlich zu diesem Einfluss des AcbC, scheinen auch Dopamin-vermittelte Signale im AcbSh an der Vermittlung des generellen PIT beteiligt zu sein. Die gewonnenen Daten aus Experiment 3 legen nahe, dass sowohl die D₁- als auch die D₂-Rezeptoren im AcbSh eine wichtige Funktion bei der Vermittlung des generellen PIT übernehmen. So blockierte die Applikation eines D₁-Rezeptor-Antagonisten in den AcbSh den Einfluss generell motivierender Stimuli auf instrumentelles Verhalten. Im Gegensatz dazu fallen die Effekte einer Blockade der D₂-Rezeptoren im AcbSh geringer aus. Hier konnte nur bei einer niedrigen Dosierung eine Blockade des generellen PIT beobachtet werden. Eine höhere Dosis hingegen hatte zwar eine leichte Reduktion der basalen Hebeldruckrate zur Folge, dennoch blieb der Transfereffekt weitestgehend erhalten. Dies weist auf ein komplexes Dosis-Wirkungs Profil von D₂-Rezeptor-Antagonisten im AcbSh beim generellen PIT hin. Anhand der gewonnenen Daten aus Experiment 3 ist es jedoch nicht möglich diese Dosis-Wirkungs Profil genauer zu charakterisieren. Dazu müssen weitere Dosierungen des D₂-Rezeptor-Antagonisten im AcbSh beim generellen PIT getestet werden. Im Gegensatz zu den hier gewonnenen Daten wiesen Hall et al. (2001) nach, dass eine Läsion des AcbSh nicht zu einer Blockade des generellen PIT führt, was gegen eine Beteiligung des AcbSh beim generellen PIT spräche. Allerdings konnte in dieser Studie eine leichte Reduktion des Transfereffektes beobachtet werden, welche nur knapp das statistische Signifikanzniveau von $p < 0.5$ verfehlte. Dies könnte ebenfalls auf eine Beteiligung des AcbSh bei der Steuerung des generellen PIT hindeuten, wengleich der gemessene Effekt weniger stark war als in Experiment 3. Neuere Daten von Pecina et al. (2006) belegen außerdem, dass die Mikroinfusion des Kortikotropin-Releasing Hormon (CRF) in den AcbSh eine Verstärkung des generellen PIT bewirkte, welche in ihrer Intensität mit der Applikation von Amphetamin in den AcbSh vergleichbar ist (Wyvell und Berridge, 2000, 2001). CRF vermittelt sowohl psychische als auch körperliche Stressreaktionen (Koob und Bloom, 1985; Dunn und Berridge, 1990; Nemeroff, 1992; Herman et al., 2003; Bale und Vale, 2004), und wirkt im Acb, ähnlich wie Dopamin, direkt auf die accumbalen Neurone, oder erhöht indirekt die Dopamin-Freisetzung im Acb. Auf diese Weise führt eine Erhöhung der CRF-Transmission zu einer Verstärkung der von einer

Belohnung ausgehenden Salienz (Koob et al., 1984; Swerdlow und Koob, 1985; Dickinson et al., 2000; Wyvell und Berridge, 2000, 2001). Durch diesen Mechanismus könnte CRF im AcbSh die generell motivierende Wirkung klassisch konditionierter Stimuli bei PIT potenzieren. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung des AcbSh bei PIT und stehen in Einklang mit den Schlussfolgerungen aus Experiment 3.

Abschließend ist es jedoch wichtig zu erwähnen, dass PIT auf einer generellen motivationalen Aktivierung beruht, möglicherweise also auch auf den spezifischen Belohnungs-assoziierten Eigenschaften des klassisch konditionierten Stimulus. Obwohl in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der generelle PIT getestet wurde, welcher hauptsächlich durch eine generellen Aktivierung durch den klassisch konditionierten Stimulus bedingt ist, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass Belohnungs-spezifische Eigenschaften des Stimulus ebenfalls das instrumentelle Verhalten verstärken. In dem hier verwendeten Modell des generellen PIT wurde der klassisch konditionierte Stimulus mit derselben Belohnung assoziiert wie die instrumentelle Handlung selber. Es ist daher möglich, dass der CS, neben einer generellen Motivationssteigerung, auch die spezifischen Qualitäten der damit verbundenen Belohnung abruf, und die instrumentelle Handlung auch durch solche Wirkungen zumindest geringfügig verstärkt. Es ist daher denkbar, dass die Reduktion des Transfereffektes nach der Applikation von Dopamin-Antagonisten in den Acb zumindest teilweise auf einem beeinträchtigten Abruf der Belohnungs-spezifischen Eigenschaften zurückzuführen ist. Allerdings ist bisher nicht bekannt, inwieweit die hier verwendete Form des PIT tatsächlich auf dem Abruf Belohnungs-spezifischer Eigenschaften beruht. Um die Wirkung von Dopamin-Antagonisten auf die generellen und spezifischen Effekte des klassisch konditionierten Stimulus besser voneinander trennen zu können, müsste daher ein Trainingsprotokoll verwendet werden, welches beide Formen des PIT gleichzeitig untersucht (z.B. Corbit und Balleine, 2005; Corbit et al., 2007).

Zusammengefasst zeigen die Daten aus Experiment 3 erstmalig, dass die generell motivierenden Effekte, welche von klassisch konditionierten Stimuli ausgehen, durch D₁- und D₂-Rezeptoren in sowohl AcbC als auch AcbSh vermittelt wird. Dass sowohl AcbC als auch AcbSh wichtige Funktionen bei der Vermittlung des generellen Transfers übernehmen, stimmt mit dem vorgestellten Modell des neuronalen Netzwerkes überein, welches dem generellen PIT zugrunde liegt (Abb. 7.1). Dieser Befund steht ebenfalls in Übereinstimmung mit der bisherigen Annahme, dass eine gesteigerte Aktivität des mesoaccumbalen dopaminergen Systems eine erhöhte Wirksamkeit von konditionierten Reizen zur Folge hat (Dickinson et al., 2000; Wyvell und Berridge, 2000).

7.5 Zusammenfassende Diskussion

Die Ergebnisse aus Experiment 1 belegen, dass eine Blockade der ionotropen Glutamatrezeptoren den generellen Transfereffekt nicht beeinflusst. Dies erscheint zunächst überraschend, da der Acb als eine zentrale Struktur des generellen PIT (Corbit et al., 2001; Hall et al., 2001; de Borchgrave et al., 2002) überwiegend glutamaterge Afferenzen aus corticalen und limbischen Strukturen erhält (Wright et al., 1996; Setlow, 1997; Groenewegen und Trimble, 2007). Allerdings stammen die limbischen Afferenzen des Acb aus der BLA, einer Struktur, welche bekanntermaßen nicht an der Steuerung des generellen PIT beteiligt ist (Blundell et al., 2001; Corbit und Balleine, 2005). Diese anatomischen Befunde legen ebenfalls nahe, dass glutamaterge Projektionen bei der Vermittlung des generellen PIT keine wichtige Rolle einnehmen. Der generelle Transfer beruht jedoch auf der Integrität des CeN (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005), welcher vermutlich über GABAerge Efferenzen zu dopaminergen Neuronen des Mittelhirns die Dopamintransmission im Acb moduliert (Parkinson et al., 2000b; Hall et al., 2001; Cardinal et al., 2002a). Die Befunde aus Experiment 1 stehen in Einklang mit diesen Erkenntnissen und zeigen, dass ionotrope Glutamatrezeptoren an der Steuerung des generellen PIT nicht beteiligt sind. Nicht ausgeschlossen werden kann allerdings, dass Glutamat-vermittelte Signale an metabotropen Glutamatrezeptoren involviert sind. Auch ist anzunehmen, dass der spezifische PIT durch eine Blockade der Glutamatrezeptoren beeinflusst werden kann, da hierbei die BLA, und deren glutamaterge Projektionen, eine zentrale Rolle einnehmen (Blundell et al., 2001; Corbit und Balleine, 2005). Für eine selektive Beteiligung glutamaterger Mechanismen beim spezifischen PIT spricht auch die Beobachtung, dass eine Läsion des OFC den spezifischen PIT blockiert (Ostlund und Balleine, 2007) und eine Läsion des ACC den generellen Transfer nicht beeinflusst (Cardinal et al., 2003b). Beide Strukturen projizieren glutamaterg zum Acb (Heimer et al., 1991; Groenewegen et al., 1996; Cardinal et al., 2003b; Groenewegen und Trimble, 2007) und besitzen starke reziproke Verbindungen zur BLA (McDonald, 1991; McDonald und Mascagni, 1996; Cardinal et al., 2003b).

Durch Experiment 2 konnte nachgewiesen werden, dass auch die VTA eine Schlüsselstruktur im neuronalen Schaltkreis des generellen PIT darstellt (Murschall und Hauber, 2006), was inzwischen auch neuere Studien bestätigen (Corbit et al., 2007; El-Amamy und Holland, 2007). Es wurde angenommen, dass die Dopaminfreisetzung im Acb über Projektionsfasern des CeN zu dopaminergen Neuronen des Mittelhirns moduliert wird (Parkinson et al., 2000b; Hall et al., 2001; Cardinal et al., 2002a). Möglicherweise beeinflussen die GABAergen Efferenzen des CeN (Krettek und Price, 1978; Wallace et al., 1992; Swanson und Petrovich,

1998; Fudge und Haber, 2000; Cardinal et al., 2003a; Phillips et al., 2003) GABAerge Interneurone der VTA, und modulieren auf diese Weise die Aktivität der dopaminergen VTA Neurone (Wallace et al., 1992). Neuerer Erkenntnisse stellen dieses Modell einer einfachen seriellen Verbindung zwischen CeN und Acb jedoch in Frage. Beispielsweise existieren keine eindeutigen Hinweise auf eine robuste Projektion des CeN zur VTA (Price und Amaral, 1981; Zahm et al., 1999; Zahm, 2005). Anatomische Daten weisen eher auf eine polysynaptische Verschaltung beider Strukturen hin. Auch die Ergebnisse der Diskonnektion von CeN und VTA legen eine komplexere Verschaltung beider Strukturen nahe (El-Amamy und Holland, 2007). El-Amamy und Holland (2007) berichten, dass eine Läsion der SNc ebenfalls zu einer Beeinträchtigung des PIT führt. Auch das DLS scheint an der Vermittlung verstärkender Einflüsse klassisch konditionierter Stimuli auf instrumentelles Verhalten beteiligt zu sein (Corbit und Janak, 2007a). Aufgrund der vorgestellten Befunde ist davon auszugehen, dass die Verbindung zwischen CeN und Acb nicht nur polysynaptischer Natur ist, sondern weitere Strukturen involviert sind. Dazu zählen die SN, das RRF, der LH und das DLS (Zahm, 2000; Zahm et al., 2001; Fadel und Deutch, 2002; Zahm, 2005; Corbit und Janak, 2007a; El-Amamy und Holland, 2007).

Die gewonnenen Daten aus Experiment 3 belegen dass der generelle PIT von D₁- und D₂-Rezeptoren sowohl im AcbC als auch im AcbSh vermittelt wird. Diese Befunde stimmen mit bisherigen Annahmen überein, dass eine gesteigerte Aktivität des mesoaccumbalen dopaminergen Systems eine erhöhte Wirksamkeit von konditionierten Belohnungs-assozierten Reizen zur Folge hat (Dickinson et al., 2000; Wyvell und Berridge, 2000). Generell besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Dopamintransmission im Acb und der Verarbeitung von klassisch konditionierten Reizen. So hat beispielsweise die Präsentation eines appetitiven klassisch konditionierten Reizes eine Erhöhung der accumbalen Dopamintransmission zur Folge (McCullough und Salamone, 1992; Bassareo und Di Chiara, 1999; Weiss et al., 2000). Vor allem Nahrungs-assozierte Reize, welche in dem hier verwendeten PIT-Modell eingesetzt wurden, induzieren eine erhöhte Dopaminfreisetzung, speziell in der AcbC Subregion des Acb (Bassareo und Di Chiara, 1997, 1999; Bassareo et al., 2002; Cheng et al., 2003).

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Arbeit stimmen nur teilweise mit den bisherigen Modellvorstellungen des neuronalen Schaltkreises, welcher dem generellen PIT zugrunde liegt, überein. Indem sie aufzeigen, dass neben der VTA auch D₁- und D₂-Rezeptor-vermittelte Prozesse sowohl im AcbC als auch im AcbSh eine zentrale Rolle übernehmen, erweitern die gewonnenen Daten das Verständnis für die dem generellen

Transfer zugrunde liegenden neuronalen Mechanismen. Somit beinhaltet der zugrunde liegende neuronale Schaltkreis des generellen PIT neben dem CeN (Hall et al., 2001; Holland und Gallagher, 2003; Corbit und Balleine, 2005) auch die VTA (Murschall und Hauber, 2006; Corbit et al., 2007), beide Subregionen des Acb (Lex und Hauber, 2008) und vermutlich weitere Areale wie das DLS (Corbit und Janak, 2007a) oder die SNc (El-Amamy und Holland, 2007) (Abb. 7.1).

Der Klassisch-Instrumentelle Transfer ist kein Phänomen, welches ausschließlich unter kontrollierten Laborbedingungen beobachtet werden kann. Sowohl bei Menschen als auch bei Tieren ist der modulatorische Einfluss klassisch konditionierter Reize ein Bestandteil des alltäglichen Lebens. Über eine Manipulation des internen motivationalen Status wird dabei die Auswahl und Initiation bestimmter, zuvor erlernter Verhaltensweisen gesteuert. Damit spiegelt PIT einen wichtigen Mechanismus wieder, welcher den Prozess der Entscheidungsfindung beeinflusst. Auch der Mensch unterliegt solchen, meist unbewussten, Einflüssen klassisch konditionierter Reize. Beispielsweise wird die Entscheidung, ein bestimmtes Produkt zu kaufen, zumindest teilweise durch Werbung beeinflusst. Der Anblick eines zuvor im Fernsehen oder auf Plakaten beworbenen Produktes wirkt dabei als konditionierter Reiz, und kann die Kaufentscheidung für dieses Produkt günstig beeinflussen. Das eigentliche Kaufen der Ware kann dabei als instrumentelle Handlung angesehen werden. Unter normalen, stressfreien Bedingungen erfolgt die Auswahl und Initiation einer Handlung sehr spezifisch, und ist stark vom jeweils wahrgenommenen konditionierten Reiz abhängig. Unter Einfluss von Stress scheint der spezifische Einfluss klassisch konditionierter Reize auf instrumentelles Handeln jedoch verloren zu gehen. Dies konnte im Tiermodell durch die Applikation eines Glucocorticoid-Agonisten belegt werden. Glucocorticoide werden auch als Stresshormone bezeichnet, da sie unter körperlichen und seelischen Belastungssituationen vermehrt produziert und ausgeschüttet werden (Lexikon der Neurowissenschaft, 2000). Eine Aktivierung der Glucocorticoid-Rezeptoren entspricht daher, zumindest in einigen Aspekten, einer Stresssituation. Im Tiermodell konnten Zorawski und Killcross (2003) nun nachweisen, dass unter dem Einfluss von Glucocorticoid-Agonisten ausschließlich der spezifische PIT blockiert wird. Glucocorticoide führen auch zu einer gesteigerten Expression von CRF (Makino et al., 1994; Makino et al., 1995), welches sowohl psychische als auch körperliche Stressreaktionen vermittelt (Koob und Bloom, 1985; Dunn und Berridge, 1990; Nemeroff, 1992; Herman et al., 2003; Bale und Vale, 2004). In Übereinstimmung mit den Daten von Zorawski und Killcross (2003) führt die Applikation von CRF in den AcbSh sogar zu einer Steigerung des generellen PIT (Pecina et al., 2006). Eine Stresssituation bewirkt also eine

Blockade der Stimulus-spezifischen Eigenschaften zugunsten einer ungerichteten generellen motivationalen Aktivierung. In einer potentiell gefährlichen Situation wird demnach das Differenzierungsvermögen reduziert, so dass alle auftretenden Stimuli eine generelle Aktivierung zu Handeln auslösen. Durch diese erhöhte Handlungsbereitschaft ist der gesamte Organismus auf Kampf-oder-Flucht (*fight-or-flight*) eingestellt, und kann optimal auf drohende Gefahren reagieren.

Der Einfluss klassisch konditionierter Stimuli auf instrumentelles Verhalten kann jedoch auch krankhafte Formen annehmen, wie beispielsweise periodisch auftretende Heißhungeranfälle (*binge eating*) oder Suchtverhalten, beziehungsweise der Rückfall in süchtiges Verhalten. Zahlreiche Evidenzen belegen, dass die belohnenden und verstärkenden Effekte von natürlichen Belohnungen, aber auch von Suchtmitteln, von Strukturen des ZNS vermittelt werden, welche ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Verarbeitung des PIT einnehmen. Über die von der VTA ausgehenden mesocorticolimbischen Projektionsbahnen zum Acb, dem dorsalen Striatum und weiteren Strukturen des Vorderhirns (z.B. Amygdala und PFC) nehmen sowohl natürliche Belohnungen als auch Suchtmittel Einfluss auf das Verhalten (Wise und Bozarth, 1987; Robbins und Everitt, 1996; Wise, 1998; Di Chiara und Bassareo, 2007; Koob und Volkow, 2009). Da Suchtmittel im Vergleich zu natürlichen Belohnungen sogar eine verstärkte Aktivierung des mesocorticolimbischen Dopamin Systems bewirken, üben auch Sucht-assoziierte Reize einen besonders starken Einfluss auf das Verhalten aus (Hyman und Malenka, 2001). In den letzten Jahrzehnten hat sich die Forschung hauptsächlich auf die akute pharmakologische Wirkung von Suchtmitteln und die neuronalen Substrate konzentriert. Eines der größten Probleme der Suchttherapie besteht jedoch darin, dass auch nach Monaten oder Jahren der Abstinenz ein erhöhtes Risiko für einen Rückfall in die Sucht besteht (Dackis und O'Brien, 2001; Wagner und Anthony, 2002; Feltenstein und See, 2008). In Tiermodellen und auch beim Menschen kann der Rückfall in süchtiges Verhalten sowohl durch Stress (Shaham et al., 2000; Marinelli und Piazza, 2002; Ambroggi et al., 2009) als auch durch Sucht-assoziierte Reize (Wikler und Pescor, 1967; Tiffany, 1990; O'Brien et al., 1998; Hyman, 2005; Hyman et al., 2006) ausgelöst werden. Beim Menschen wirken zum Beispiel externe sensorische Stimuli als konditionierte, Sucht-assoziierte Reize (z.B. Personen, Suchtmittelzubehör oder Orte, an denen Suchtmittel konsumiert wurden). Bisher wurde in den meisten Tierstudien, welche die Auswirkungen von Suchtmittel-prädiktiven Reizen auf das Suchtverhalten untersuchen, ein Versuchsdesign verwendet, welches auf einer Verhaltens-kontingenten Präsentation des konditionierten Stimulus beruht (z.B. Everitt und Wolf, 2002; Nie und Janak, 2003; Di Ciano und Everitt, 2005). In einem solchen

Versuchsaufbau führt erst das Ausführen einer instrumentellen Handlung (z.B. Hebelbetätigung) zu einer Präsentation des Sucht-assoziierten Reizes. Die Initiation dieser instrumentellen Verhaltens muss also durch einen anderen, möglicherweise Sucht unabhängigen, Mechanismus stattgefunden haben. Im Gegensatz dazu beruht süchtiges Verhalten jedoch auf der Wirkung Sucht-assoziiertes Reize, bevor die Beschaffung oder Einnahme des Suchtmittels erfolgt. Da PIT ebenfalls auf einer Verhaltens-unabhängigen (nicht-kontingenten) Präsentation des klassisch konditionierten Stimulus beruht, stellt er möglicherweise ein besseres Modell dar, die Auswirkungen von Suchtmittel-assoziiertes Stimuli auf den Rückfall in süchtiges Verhalten zu untersuchen (Ludwig et al., 1974; Tiffany und Drobos, 1990; Gawin, 1991; O'Brien et al., 1998; Corbit und Janak, 2007b). Allerdings wurde die Rolle von Lernvorgängen, welche PIT zugrundeliegen, beim Rückfall in süchtiges Verhalten bisher kaum untersucht. Weiss et al. (2000; 2001) berichten jedoch, dass die nicht-kontingente Präsentation eines Kokain-prädiktiven Stimulus zu einer Erhöhung des Suchverhaltens nach Kokain führt und gleichzeitig eine verstärkte Dopamintransmission im Acb zur Folge hat. Dies könnte auf eine zentrale Rolle des PIT beim Rückfall in Suchtverhalten hindeuten. Neuere Studien, welche die Auswirkungen von Alkohol auf PIT im Tiermodell untersuchen, konnten verdeutlichen, dass Alkohol-assoziierte Reize einen generellen Einfluss auf das instrumentelle Verhalten ausüben. Nicht nur die Handlung, welche mit der Gabe von Alkohol verknüpft ist, wird verstärkt, sondern auch alternative Handlungen, welche den Erhalt einer anderen Belohnung zur Folge haben (Glasner et al., 2005; Corbit und Janak, 2007b). Insgesamt sprechen diese Befunde dafür, dass die am PIT beteiligten Lernvorgänge auch bei einigen Aspekten des Rückfalls in Suchtverhalten des Menschen eine entscheidende Rolle einnehmen. Neurochemischen Mechanismen und Strukturen, welche tierexperimentellen Studien zufolge bei PIT wichtig sind, könnten daher auch beim Menschen relevant sein. Dafür sprechen beispielsweise auch an alkoholabhängigen Patienten durchgeführte fMRI (funktionellen Magnetresonanztomographie) Studien. Bei ihnen bewirkte die Präsentation von Alkohol-assoziierten Stimuli eine erhöhte neurale Aktivität sowohl im Acb als auch der VTA (Myrick et al., 2004).

Bisher wurden die Auswirkungen klassisch konditionierter Reize im ZNS und ihre Wirkung auf das Verhalten weitestgehend anhand von Tiermodellen untersucht. Seit kurzem aber gibt es Bestrebungen, in Anlehnung an das bereits existierende Tiermodell des PIT, die neuronalen Grundlagen des PIT auch am Menschen zu untersuchen. Dabei durchlaufen die Probanden zunächst eine klassische Konditionierung mit auditorischen oder visuellen Stimuli als CS, und Geldgewinnen oder wohlschmeckender Nahrung als Belohnung. In der anschließenden

instrumentellen Konditionierungsphase erfolgt eine Belohnung nach einer bestimmten Handlung (z.B. Knopfdruck oder Handgriff drücken) in Form von Geldgewinnen oder wohlschmeckender Nahrung. Während des abschließenden Transfertests wird die neuronale Aktivität der Probanden indirekt gemessen, indem Durchblutungsänderungen des Gehirns (BOLD-Signal; *blood oxygenation level*) mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomographie sichtbar gemacht werden. Solche fMRI Studien belegen, dass auch beim Menschen sowohl die Amygdala als auch der Acb an der Vermittlung von PIT beteiligt sind (Bray et al., 2008; Talmi et al., 2008). Diese Daten bestätigen die in den Tiermodellen gewonnenen Daten, und legen nahe, dass PIT bei Menschen und Tieren vermutlich auf denselben neuronalen Schaltkreisen beruht. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen zum Beispiel eine zentrale Rolle der VTA bei der Vermittlung der generell motivierenden Effekte klassisch konditionierter Stimuli. Dieser Befund spricht für die Möglichkeit, dass auch der Stimulus-induzierte Rückfall beim Menschen, zumindest teilweise, durch VTA-vermittelte Signale ausgelöst wird. Eine Reihe neuerer Untersuchungen im Tiermodell lassen vermuten, dass Agonisten des GABA_B-Rezeptors eine geeignete Behandlungsmöglichkeit bei Suchterkrankungen darstellen (O'Brien et al., 1998; Di Ciano und Everitt, 2003). Dabei scheinen GABA-Agonisten die belohnenden Eigenschaften von Stimuli, welche mit Kokain, Heroin, Nikotin sowie Alkohol assoziiert sind, abzuschwächen. Auch einige wenige klinische Studien deuten darauf hin, dass eine Behandlung mit dem GABA_B-Agonisten Baclofen eine geeignete Therapiemöglichkeit für Alkohol- und Kokainsüchtige darstellen könnte (Roberts, 2005; Addolorato et al., 2006). Nach meinen Studien könnte die VTA ein neurales Korrelat für diese GABA-vermittelten Effekte darstellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass PIT nicht nur unter Laborbedingungen beobachtet werden kann, sondern sowohl beim Tier im Freiland, als auch beim Menschen im alltäglichen Leben den Prozess der Entscheidungsfindung unterstützt. Ein krankhafter Einfluss klassisch konditionierter Stimuli auf instrumentelles Verhalten kann jedoch die Aufrechterhaltung eines Suchtverhaltens begünstigen. Da vor allem der Rückfall in süchtiges Verhalten durch klassisch konditionierte, Sucht-assoziierte Reize ausgelöst werden kann, stellt PIT ein besonders gut geeignetes Tiermodell dar, um die neuronalen Mechanismen des Rückfalls experimentell zu untersuchen. Die gewonnenen Daten dieser Arbeit belegen, dass die VTA und Dopamin in beiden Subregionen des Acb eine Schlüsselposition bei der Verarbeitung klassisch konditionierter Reize einnehmen, und ihre Wirkung auf die Handlungsbereitschaft steuern. Der Neurotransmitter Glutamat scheint jedoch eine

untergeordnete Rolle zu spielen. Damit leisten sie einen wesentlichen Beitrag, zum besseren Verständnis der neuronalen Grundlagen des generellen PIT und bieten darüberhinaus mögliche Ansatzpunkte für eine pharmakologische Suchttherapie.

8 Anhang

8.1 Programm „Klassische Konditionierung“ mit Ton als CS

Das Programm der Klassischen Konditionierung mit „Rauschen“ als CS entspricht weitestgehend dem Programm der Klassischen Konditionierung mit „Ton“ als CS. Um Rauschen zu generieren wird die Frequenz auf $L=0$ und die Amplitude auf $M=75$ eingestellt. Aufgrund der integrierten MED-PC IV® Software wird dadurch ein Rauschen mit einer Lautstärke von 75dB erzeugt. Aufgrund der Intensität des Rauschens wird aber tatsächlich ein Rauschen mit 80dB wahrgenommen (gemessen mit USB Sound Pressure Level Measurement Package von Med Associates Inc., St. Albans, Vermont, USA).

```

\Programm_Pavlovian_Training_„Ton“
\6 x 2min CS (Ton: 3kHz, 80dB)mit RT-30-s Schedule
\ISI 2-4min

\A= Zeit im Feeder während CS
\B= Zeit im Feeder während ISI
\C= Feeder Entries während CS
\D= Feeder Entries während ISI
\E= Belohnungen im CS
\F= Dauer des ISI

\G= Zeit im Feeder während CS
\H= Zeit im Feeder während ISI
\I= Feeder Entries während CS
\J= Feeder Entries während ISI
\K= Belohnungen im CS+

\L= Frequenz
\M= Amplitude
\N= Flankenanstieg
\O= RT-30s schedule
\P= Dauer des ISI
\Q= Zufallszahl aus O (RT-30s Schedule)
\R= Zufallszahl aus P (bestimmt die Dauer des ISI)

\W= Hilfszahl für Z (Fortlaufende Zeitzählung)
\X= Anzahl der CS-Blöcke
\Y= Anzahl der ISI-Blöcke
\Z= Fortlaufende Zeitzählung

\SHOW 1: Zeit im Feeder während CS
\SHOW 2: Zeit im Feeder während ISI
\SHOW 3: Anzahl der Pellets während CS
\SHOW 4: CS Block

^Hauslicht=7           \Hauslicht; Output
^Feeder=3              \Futterspender; Output
^Sensor=3              \Lichtschranke; Input
^Schalter=4            \Türschalter; Input

```

\Dauer des ISI von 2-4min im 5 sec. Schritten

LIST

P=120,125,130,135,140,145,150,155,160,165,170,175,180,185,190,195,200,205,210,215,220,225,230,235,240

\Random Time 30-s Schedule

LIST

O=1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30

DIM A=10 **\Zeit im Feeder CS+; A(X)=G**
 DIM B=10 **\Zeit im Feeder ISI; B(Y)=H**
 DIM C=10 **\Feeder Entries CS+; C(X)=I**
 DIM D=10 **\Feeder Entries ISI; D(Y)=J**
 DIM E=10 **\Belohnung CS+; E(X)=K**
 DIM F=10 **\Dauer ISI; F(Y)=R**

S.S.1,

S1,

```
#R^Schalter: SET L=3000;                   \Frequenz 3kHz
               SET M=80;                   \Amplitude 80dB
               SET N=10;                   \Flankendauer 10ms
               ~InitANL926;~;               \ANL-926 initialisieren
               ~SetFreq(MG,BOX,L);~;       \Frequenz initialisieren
               ~SetAmp(MG,BOX,M);~;       \Amplitude initialisieren
               ~SetRF(MG,BOX,N);~;         \Flankendauer initialisieren
               --->S2
```

S2,

```
1":ON^Hauslicht;
   ~ToneOn(MG,BOX);~;ADD X; SHOW 4, CS+ Block,X; Z1;Z2;Z5;Z6--->S3
```

S3,

```
0.01":if Z=120 [@true,@false]
         @true:~ToneOff(MG,BOX);~--->S4
         @false:--->S3
```

S4,

```
0.01":if X=6 [@true,@false]
         @true: RANDI R=P; ADD Y; SET F(Y)=R; Z3;Z7 --->S6
         @false:RANDI R=P; ADD Y; SET F(Y)=R; Z3;Z7--->S5
```

S5,

```
0.01":if Z=120+R [@true,@false]
         @true:~ToneOn(MG,BOX);~; SET W=Z; SET Z=0; Z1;Z2;Z6; ADD X;
           SHOW 4, CS+ Block,X--->S3
         @false:--->S5
```

S6,

```
0.01":if Z=120+R [@true,@false]
         @true: SET B(Y)=H; SET D(Y)=J--->S7
         @false:--->S6
```

S7,

```
5":OFF^Hauslicht --->STOPABORTFLUSH
```

S.S.2, \Z1-Puls und Steuerung der Belohnung während CS

S1,

```
#Z1: SET K=0; RANDI Q=0; if Q=1 [@true,@false]
\Bestimmung der Belohnungswahrscheinlichkeit aus D; Beginn der
Zeitzählung
         @true: ON^Feeder; ADD K; SHOW 3,Pellets,K; Z4--->S2
         @false:--->S2
```

S2,

```
1": if Z>=120 [@true,@false]
         @true:SET E(X)=K--->S3
         @false: RANDI Q=0; if Q=1 [@true,@false]
           @true: ON^Feeder; ADD K; SHOW 3,Pellets,K; Z4--->S2
```

```

                                @false:--->S2
S3,
    0.01":--->S1

S.S.3,    \Z2-Puls und Zeit im Feeder während CS
S1,
    #Z2: SET G=0; SHOW 1,Zeit CS+,G--->S2
S2,
    0.01":if Z>=120 [@true,@false]
            @true: SHOW 1,Zeit CS+,G; SET A(X)=G--->S4
            @false:--->S3
S3,
    #R^Sensor: ADD G; SHOW 1,Zeit CS+,G--->S2
    0.01":--->S2
S4,
    0.01":--->S1

S.S.4,    \Z3-Puls und Zeit im Feeder während ISI
S1,
    #Z3: SET H=0; SHOW 2,Zeit ISI,H; SET W=Z--->S2
S2,
    0.01":if W>=R+120 [@true,@false]
            @true: SET B(Y)=H--->S4
            @false:--->S3
S3,
    #R^Sensor: ADD H; SHOW 2,Zeit ISI,H--->S2
    0.01":--->S2
S4,
    0.01":--->S1

S.S.5,    \Z4-Puls und OFF^Feeder
S1,
    #Z4:--->S2
S2,
    0.1":OFF^Feeder--->S1

S.S.6,    \Z5-Puls und Beginn der fortlaufenden Zeitzählung
S1,
    #Z5: ADD Z--->S2
S2,
    1": ADD Z --->S2

S.S.7,    \Z6-Puls und "feeder entries" während CS
S1,
    #Z6: SET I=0--->S2
S2,
    0.01":if Z>=120 [@true,@false]
            @true: SET C(X)=I--->S5
            @false:--->S3
S3,
    #R^Sensor: ADD I--->S4
S4,
    #R^Sensor: --->S4
    0.01"--->S2
S5,
    0.01":--->S1

S.S.8,    \Z7-Puls und Messung der "feeder entries" während ISI
S1,
    #Z7: SET J=0; SET W=Z--->S2
S2,
    0.01":if W>=R+120 [@true,@false]
            @true:SET D(Y)=J--->S5
```

```

                @false:--->S3
S3,
    #R^Sensor:ADD J --->S4
S4,
    #R^Sensor:--->S4
    0.01":--->S2
S5,
    0.01":--->S1

S.S.9,    \Z1-Puls und eine Belohnungsgabe nach 60 sec. wenn bis dahin noch
          \keine Belohnung gegeben wurde
S1,
    #Z1:--->S2
S2,
    60": if K=0 [@true,@false]
          @true: ON^Feeder; ADD K; SHOW 3,Pellets,K; Z4--->S3
          @false:--->S3
S3,
    0.01":--->S1

```

8.2 Programm „Instrumentelle Konditionierung“

Die Programme für die Instrumentelle Konditionierung mit einem Random-Interval (RI)-15s, RI-30s und RI-60s entspricht dem des RI-2s. Lediglich die Menge der Variablen A wird dem jeweiligen Belohnungsschema angepasst. Für RI-15s enthält die Variable A die Zahlen von 1 bis 15, für RI-30s die Zahlen von 1 bis 30 und für RI-60s die Zahlen von 1 bis 60.

```

\Programm für Instrumental Training RI-2s Schedule
\Dauer 30min

```

```

\A=Random Interval 2s Schedule
\N=Anzahl der Belohnungen
\T=Anzahl der Tastendrucke
\Z=Fortlaufende Zeitzählung

```

```

\SHOW 1: Anzahl der Pellets
\SHOW 2: Anzahl der Tastendrucke
\SHOW 3: Gesamtlaufzeit

```

```

^Hauslicht=7           \Hauslicht; Output
^Feeder=3              \Futterspender; Output
^Sensor=3              \Lichtschanke; Input
^LinkeTaste=1         \Linker Hebel; In- und Output
^Schalter=4           \Türschalter; Input

```

```

\Initialisierung des Random-Interval 2s Schedules
\bei einem Random-Interval x Schedule beträgt die Wahrscheinlichkeit einer
Belohnung pro Sekunde  $p=1/x$ ; die Belohnung erfolgt dann mit dem nächsten
Hebeldruck

```

```

LIST A=1,2

```

```

S.S.1,
S1,
    0.01": ON^LinkeTaste --->S2
S2,

```

```

#R^Schalter: ON^Hauslicht; Z1; SET N=0; SHOW 1,Pellets,N--->S3
S3,
0.01": RANDI B=A; if B=1 [@true,@false]
        @true:--->S4
        @false:--->S6
S4,
#R^LinkeTaste: ON^Feeder; ADD N; SHOW 1,Pellets,N; Z2 ---> S5
S5,
#R^LinkeTaste:--->S5
0.01":--->S3
S6,
1": RANDI B=A; if B=1 [@true,@false]
        @true: --->S4
        @false:--->S6

S.S.2,      \Z1-Puls und zählen der Tastendrucke
S1,
#Z1: SET T=0; SHOW 2,Tastendrucke,T--->S2
S2,
#R^LinkeTaste: ADD T; SHOW 2,Tastendrucke,T--->S4
S4,
#R^LinkeTaste:--->S4
0.01":--->S2

S.S.3,      \Z2-Puls und Ausschalten des Feeders
S1,
#Z2:--->S2
S2,
0.01":OFF^Feeder--->S1

S.S.4,      \Z1-Puls und Programmende nach 30 min
S1,
#Z1:--->S2
S2,
30':OFF^Hauslicht; OFF^LinkeTaste ---> STOPABORTFLUSH

S.S.5,      \Z1-Puls und Fortlaufende Zeitzählung
S1,
#Z1: --->S2
S2,
1": ADD Z; SHOW 3,Zeit,Z --->S2

```

8.3 Programm „Reminder“ mit Ton als CS

Das Programm für den Reminder mit „Rauschen“ als CS entspricht weitestgehend dem Programm des Reminders mit „Ton“ als CS. Um Rauschen zu generieren wird die Frequenz auf $L = 0$ und die Amplitude auf $M = 75$ eingestellt. Aufgrund der integrierten MED-PC IV® Software wird dadurch ein Rauschen mit einer Lautstärke von 75dB erzeugt. Aufgrund der Intensität des Rauschens wird aber tatsächlich ein Rauschen mit 80dB wahrgenommen (gemessen mit USB Sound Pressure Level Measurement Package von Med Associates Inc., St. Albans, Vermont, USA).

```

\Programm für Pavlovian Reminder mit „Ton“ als CS
\Dauer ca. 26min

```

```

\6 x 2min CS (Ton: 3kHz, 80dB)u. 2 x 2min CSo (Rauschen: 75dB)
\ISI 2-4min
\Random Time 30-s Schedule

\A= Zeit im Feeder während CS
\B= Zeit im Feeder während ISI
\C= Feeder Entries während CS
\D= Feeder Entries während ISI
\E= Belohnungen im CS+
\F= Dauer des ISI

\G= Zeit im Feeder während CS
\H= Zeit im Feeder während ISI
\I= Feeder Entries während CS
\J= Feeder Entries während ISI
\K= Belohnung im CS+

\L= Frequenz
\M= Amplitude
\N= Flankenanstieg
\O= RT-30s Schedule
\P= Dauer des ISI
\Q= Zufallszahl aus O (RT-30s schedule)
\R= Zufallszahl aus P (bestimmt die Dauer des ISI)

\W= Hilfszahl für Z (Fortlaufende Zeitzählung)
\X= Anzahl der CS-Blöcke
\Y= Anzahl der ISI-Blöcke
\Z= Fortlaufende Zeitzählung

\SHOW 1: Zeit im Feeder während CS
\SHOW 2: Zeit im Feeder während ISI
\SHOW 3: Anzahl der Pellets während CS
\SHOW 4: CS Block

^Hauslicht=7                \Hauslicht; Output
^Feeder=3                   \Futterspender; Output
^Sensor=3                   \Lichtschanke; Input
^Schalter=4                 \Türschalter; Input

\Dauer des ISI von 2-4min im 5 sec. Schritten
LIST
P=120,125,130,135,140,145,150,155,160,165,170,175,180,185,190,195,200,205,2
10,215,220,225,230,235,240

\Random Time 30-s Schedule
LIST
O=1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,2
8,29,30

DIM A=10                    \Zeit im Feeder CS+; A(X)=G
DIM B=10                    \Zeit im Feeder ISI; B(Y)=H
DIM C=10                    \Feeder Entries CS+; C(X)=I
DIM D=10                    \Feeder Entries ISI; D(Y)=J
DIM E=10                    \Belohnung CS+; E(X)=K
DIM F=10                    \Dauer ISI; F(Y)=R

S.S.1,
S1,
  #R^Schalter:--->S2
S2,
  1":ON^Hauslicht;
      SET L=3000;
      \Frequenz 0Hz =Rauschen

```

```

SET M=80;                \Amplitude 80dB
SET N=10;                \Flankendauer 10ms
~InitANL926;~;          \ANL-926 initialisieren
~SetFreq(MG,BOX,L);~;   \Frequenz initialisieren
~SetAmp(MG,BOX,M);~;    \Amplitude initialisieren
~SetRF(MG,BOX,N);~;     \Flankendauer initialisieren
~ToneOn(MG,BOX);~;ADD X; SHOW 4, CS+-Block,X; Z1;Z2;Z5;Z6--->S3
S3,
0.01":if Z=120 [@true,@false]
    @true:~ToneOff(MG,BOX);~ --->S4
    @false:--->S3
S4,
0.01":if (X=3) OR (X=7) [@true,@false]
    @true: RANDI R=P; ADD Y; SET F(Y)=R; Z3;Z7 --->S6
    @false:RANDI R=P; ADD Y; SET F(Y)=R; Z3;Z7--->S5
S5,
0.01":if Z=120+R [@true,@false]
    @true: SET L=3000; SET M=80; ~SETAmp(MG,BOX,M);~;
    ~SetFreq(MG,BOX,L);~; ~ToneOn(MG,BOX);~; SET W=Z; SET
    Z=0; Z1;Z2;Z6; ADD X; SHOW 4, CS+-Block,X--->S3
    @false:--->S5
S6,
0.01":if Z=120+R [@true,@false]
    @true:if X=7 [@true,@false]
        @true: SET L=0; SET M=75; ~SETAmp(MG,BOX,M);~;
        ~SETFreq(MG,BOX,L);~; ~ToneOn(MG,BOX);~; SET
        W=Z; SET Z=0; Z2;Z6; ADD X; SHOW 4, CS+-Block,X-
        -->S7
        @false: SET L=0; SET M=75; ~SETAmp(MG,BOX,M);~;
        ~SETFreq(MG,BOX,L);~; ~ToneOn(MG,BOX);~; SET
        W=Z; SET Z=0; Z2;Z6; ADD X; SHOW 4, CS+-Block,X-
        -->S3
    @false:--->S6
S7,
0.01":if Z=120 [@true,@false]
    @true: ~ToneOff(MG,BOX);~; RANDI R=P; ADD Y; SET F(Y)=R;
Z3;Z7--->S8
    @false:--->S7
S8,
0.01":if Z=120+R [@true,@false]
    @true:SET B(Y)=H; SET D(Y)=J--->S9
    @false:--->S8
S9,
5":OFF^Hauslicht--->STOPABORTFLUSH

S.S.2,  \Z1-Puls und Steuerung der Belohnung im CS
S1,
#Z1: SET K=0; RANDI Q=0; if Q=1 [@true,@false]
\Bestimmung der Belohnungswahrscheinlichkeit aus D; Beginn der
Zeitzählung
    @true: ON^Feeder; ADD K; SHOW 3,Pellets,K; Z4--->S2
    @false:--->S2
S2,
1": if Z>=120 [@true,@false]
    @true:SET E(X)=K--->S3
    @false: RANDI Q=0; if Q=1 [@true,@false]
        @true: ON^Feeder; ADD K; SHOW 3,Pellets,K; Z4--->S2
        @false:--->S2
S3,
0.01":--->S1

S.S.3,  \Z2-Puls und Zeit im Feeder während CS
S1,

```

```

#Z2: SET G=0; SHOW 1,%CS,G--->S2
S2,
0.01":if Z>=120 [@true,@false]
      @true: SHOW 1,%CS,G; SET A(X)=G--->S4
      @false:--->S3
S3,
#R^Sensor: ADD G; SHOW 1,%CS,G--->S2
0.01":--->S2
S4,
0.01":--->S1

S.S.4,      \Z3-Puls und Zeit im Feeder während ISI
S1,
#Z3: SET H=0; SHOW 2,%ISI,H; SET W=Z--->S2
S2,
0.01":if W>=R+120 [@true,@false]
      @true: SET B(Y)=H--->S4
      @false:--->S3
S3,
#R^Sensor: ADD H; SHOW 2,%ISI,H--->S2
0.01":--->S2
S4,
0.01":--->S1

S.S.5,      \Z4-Puls und OFF^Feeder
S1,
#Z4:--->S2
S2,
0.1":OFF^Feeder--->S1

S.S.6,      \Z5-Puls und Beginn der fortlaufenden Zeitzählung
S1,
#Z5: ADD Z--->S2
S2,
1": ADD Z --->S2

S.S.7,      \Z6-Puls und "feeder entries" während CS
S1,
#Z6: SET I=0--->S2
S2,
0.01":if Z>=120 [@true,@false]
      @true: SET C(X)=I--->S5
      @false:--->S3
S3,
#R^Sensor: ADD I--->S4
S4,
#R^Sensor: --->S4
0.01"--->S2
S5,
0.01":--->S1

S.S.8,      \Z7-Puls und Messung der "feeder entries" während ISI
S1,
#Z7: SET J=0; SET W=Z--->S2
S2,
0.01":if W>=R+120 [@true,@false]
      @true:SET D(Y)=J--->S5
      @false:--->S3
S3,
#R^Sensor:ADD J --->S4
S4,
#R^Sensor:--->S4
0.01":--->S2

```

```

S5,
    0.01":--->S1

S.S.9,      \Z1-Puls und eine Belohnungsgabe nach 60 sec. wenn bis dahin
            noch keine Belohnung gegeben wurde
S1,
    #Z1:--->S2
S2,
    60": if K=0 [@true,@false]
           @true: ON^Feeder; ADD K; SHOW 3,Pellets,K; Z4--->S3
           @false:--->S3
S3,
    0.01":--->S1

```

8.4 Programm „Extinktion“

```

\Programm für Instrumental Extinction
\Dauer 30min

```

```

\T=Anzahl der Tastendrücke

```

```

\SHOW 2: Anzahl der Tastendrücke

```

```

^Hauslicht=7           \Hauslicht; Output
^Feeder=3              \Futterspender; Output
^Sensor=3              \Lichtschranke; Input
^LinkeTaste=1         \Linker Hebel; In- und Output
^Schalter=4           \Türschalter; Input

```

```

S.S.1,
S1,
    #R^Schalter:--->S2
S2,
    1":ON^Hauslicht; ON^LinkeTaste; Z1 --->S3
S3,
    30':OFF^Hauslicht;OFF^LinkeTaste--->STOPABORTFLUSH

```

```

S.S.2,      \Z1-Puls und zählen der Tastendrücke
S1,
    #Z1: SET T=0; SHOW 2,Responses,T --->S2
S2,
    #R^LinkeTaste: SET T=T+1; SHOW 2,Responses,T--->S3
S3,
    #R^LinkeTaste:--->S3
    0.01":--->S2

```

8.5 Programm „Klassisch-Instrumenteller Transfer“

```

\Programm PIT
\4 x 2min Ton (3kHz, 80dB); 4 x 2min Rauschen (75dB) und 8 x 2min ISI
\Pseudorandomisierte Reihenfolge: 4 x ISI-Rauschen-ISI-Ton
\Gesamtdauer ca. 32min

```

```

\A=Frequenz
\B=Amplitude
\C=Flankenanstieg
\N=Anzahl der Stimuli Blöcke
\P=Anzahl der Tastendrücke pro Stimulus (ausgegeben)
\T=Tastendrücke

```

\U=Tastendrucke (ausgegeben)

\SHOW 1: Stimulus Block

\SHOW 2: Anzahl der Tastendrucke

^Hauslicht=7	\Hauslicht; Output
^Feeder=3	\Futterspender; Output
^Sensor=3	\Lichtschanke; Input
^Schalter=4	\Türschalter; Input
^LinkeTaste=1	\Linker Hebel; In- und Output

DIM U=20 \Ausgabe der Tastendrucke pro Stimulus-Block

S.S.1,

S1,

#R^Schalter: SET A=0;	\Frequenz 0Hz
SET B=75;	\Amplitude 75dB
SET C=10;	\Flankendauer 10ms
~InitANL926;~;	\ANL-926 initialisieren
~SetFreq(MG,BOX,A);~;	\Klick-Frequenz initialisieren
~SetAmp(MG,BOX,B);~;	\Amplitude initialisieren
~SetRF(MG,BOX,C);~;---	S2

S2,

1": ON^Hauslicht; ON^LinkeTaste; ADD N; SHOW 1,ISI,N--->S3

S3,

2': SET U(N)=T; SET A=0; SET B=75 ---> S4

S4,

0.01": SET T=0; ~SetFreq(MG,BOX,A);~; ~SETAmp(MG,BOX,B);~;
~ToneOn(MG,BOX);~; ADD N; SHOW 1,Rauschen,N--->S5

S5,

2': ~ToneOff(MG,BOX);~; SET U(N)=T --->S6

S6,

0.01": SET T=0; ADD N; SHOW 1,ISI,N --->S7

S7,

2': SET U(N)=T; SET A=3000; SET B=80 ---> S8

S8,

0.01": SET T=0; ~SetFreq(MG,BOX,A);~; ~SETAmp(MG,BOX,B);~;
~ToneOn(MG,BOX);~; ADD N; SHOW 1,Ton,N --->S9

S9,

2': SET U(N)=T; ~ToneOff(MG,BOX);~ --->S10

S10,

0.01": SET T=0; ADD N; SHOW 1,ISI,N; if N=17 [@true,@false]
@true: ---> S11
@false: ---> S3

S11,

0.01": OFF^Hauslicht; OFF^LinkeTaste ---> STOPABORTFLUSH

S.S.2, \ Zählen der Tastendrucke

S1,

#R^Schalter:SET T=0--->S2

S2,

#R^LinkeTaste:SET T=T+1;SHOW 2,Tastendrucke,T--->S3

S3,

#R^LinkeTaste:--->S3

0.01":--->S2

9 Literaturverzeichnis

- Lexikon der Neurowissenschaft (2000). Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Aberman JE, Salamone JD (1999) Nucleus accumbens dopamine depletions make rats more sensitive to high ratio requirements but do not impair primary food reinforcement. *Neuroscience* 92:545-552.
- Addolorato G, Leggio L, Agabio R, Colombo G, Gasbarrini G (2006) Baclofen: a new drug for the treatment of alcohol dependence. *Int J Clin Pract* 60:1003-1008.
- Ahn S, Phillips AG (2002) Modulation by central and basolateral amygdalar nuclei of dopaminergic correlates of feeding to satiety in the rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 22:10958-10965.
- Ahn S, Phillips AG (2003) Independent modulation of basal and feeding-evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex by the central and basolateral amygdalar nuclei in the rat. *Neuroscience* 116:295-305.
- Ambroggi F, Turiault M, Milet A, Deroche-Gamonet V, Parnaudeau S, Balado E, Barik J, van der Veen R, Maroteaux G, Lemberger T, Schutz G, Lazar M, Marinelli M, Piazza PV, Tronche F (2009) Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nat Neurosci* 12:247-249.
- Anderson SM, Bari AA, Pierce RC (2003) Administration of the D1-like dopamine receptor antagonist SCH-23390 into the medial nucleus accumbens shell attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168:132-138.
- Backstrom P, Hyytia P (2003) Attenuation of cocaine-seeking behaviour by the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 166:69-76.
- Backstrom P, Hyytia P (2004) Ionotropic glutamate receptor antagonists modulate cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior. *Alcohol Clin Exp Res* 28:558-565.
- Baldo BA, Sadeghian K, Basso AM, Kelley AE (2002) Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res* 137:165-177.
- Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:525-557.
- Balleine B (1994) Asymmetrical interactions between thirst and hunger in Pavlovian-instrumental transfer. *Q J Exp Psychol B* 47:211-231.
- Balleine B, Killcross S (1994) Effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on instrumental action. *Behav Brain Res* 65:181-193.
- Balleine BW, Killcross S (2006) Parallel incentive processing: an integrated view of amygdala function. *Trends Neurosci* 29:272-279.
- Bari AA, Pierce RC (2005) D1-like and D2 dopamine receptor antagonists administered into the shell subregion of the rat nucleus accumbens decrease cocaine, but not food, reinforcement. *Neuroscience* 135:959-968.

- 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) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience* 89:637-641.
- Bassareo V, De Luca MA, Di Chiara G (2002) Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 22:4709-4719.
- Baxter MG, Murray EA (2002) The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci* 3:563-573.
- Bayer VE, Pickel VM (1991) GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res* 559:44-55.
- Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175:191-217.
- Beggs JM, Brown TH, Byrne JH, Crow T, LeDoux JE, LeBar K, Thompson RF (1999) Learning and Memory: Basic Mechanisms. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 1411-1454. San Diego: Academic Press.
- Bennett MR (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol* 60:109-137.
- Bergquist F, Ludwig M (2008) Dendritic transmitter release: a comparison of two model systems. *J Neuroendocrinol* 20:677-686.
- Berke JD (2003) Learning and memory mechanisms involved in compulsive drug use and relapse. *Methods Mol Med* 79:75-101.
- Berridge KC (2000) Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev* 24:173-198.
- Berridge KC (2001) Reward Learning: Reinforcement, Incentives, and Expectations. In: *The Psychology of Learning and Motivation*, pp 223-278: Academic Press.
- Berridge KC (2004) Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav* 81:179-209.
- Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 191:391-431.
- Berridge KC, Valenstein ES (1991) What psychological process mediates feeding evoked by electrical stimulation of the lateral hypothalamus? *Behav Neurosci* 105:3-14.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309-369.
- Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW (2009) Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol*.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

- Blundell P, Hall G, Killcross S (2001) Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. *J Neurosci* 21:9018-9026.
- Bohn I, Gierler C, Hauber W (2003) Orbital prefrontal cortex and guidance of instrumental behavior of rats by visuospatial stimuli predicting reward magnitude. *Learn Mem* 10:177-186.
- Bouyer JJ, Park DH, Joh TH, Pickel VM (1984) Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res* 302:267-275.
- Bray S, Rangel A, Shimojo S, Balleine B, O'Doherty JP (2008) The neural mechanisms underlying the influence of pavlovian cues on human decision making. *J Neurosci* 28:5861-5866.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 338:255-278.
- Burns LH, Robbins TW, Everitt BJ (1993) Differential effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala, ventral subiculum and medial prefrontal cortex on responding with conditioned reinforcement and locomotor activity potentiated by intra-accumbens infusions of D-amphetamine. *Behav Brain Res* 55:167-183.
- Burns LH, Everitt BJ, Kelley AE, Robbins TW (1994) Glutamate-dopamine interactions in the ventral striatum: role in locomotor activity and responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 115:516-528.
- Cador M, Robbins TW, Everitt BJ (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience* 30:77-86.
- Caine SB, Heinrichs SC, Coffin VL, Koob GF (1995) Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Res* 692:47-56.
- Calaminus C, Hauber W (2007) Intact discrimination reversal learning but slowed responding to reward-predictive cues after dopamine D1 and D2 receptor blockade in the nucleus accumbens of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 191:551-566.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002a) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26:321-352.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall G, Everitt BJ (2003a) The contribution of the amygdala, nucleus accumbens and prefrontal cortex to emotion and motivated behaviour. *International congress series* 1250:347 - 370.
- Cardinal RN, Pennicott DR, Sugathapala CL, Robbins TW, Everitt BJ (2001) Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science* 292:2499-2501.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Marbini HD, Toner AJ, Bussey TJ, Robbins TW, Everitt BJ (2003b) Role of the anterior cingulate cortex in the control over behavior by Pavlovian conditioned stimuli in rats. *Behav Neurosci* 117:566-587.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Lachenal G, Halkerston KM, Rudarakanchana N, Hall J, Morrison CH, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2002b) Effects of selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core, anterior cingulate cortex, and central nucleus of the amygdala on autoshaping performance in rats. *Behav Neurosci* 116:553-567.

- Carr DB, Sesack SR (2000) GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38:114-123.
- Cheng JJ, de Bruin JP, Feenstra MG (2003) Dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core in response to appetitive classical conditioning. *Eur J Neurosci* 18:1306-1314.
- Chudasama Y, Robbins TW (2004) Psychopharmacological approaches to modulating attention in the five-choice serial reaction time task: implications for schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 174:86-98.
- Chuhma N, Zhang H, Masson J, Zhuang X, Sulzer D, Hen R, Rayport S (2004) Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *J Neurosci* 24:972-981.
- Church WH, Justice JB, Jr., Neill DB (1987) Detecting behaviorally relevant changes in extracellular dopamine with microdialysis. *Brain Res* 412:397-399.
- Churchill L, Dilts RP, Kalivas PW (1992) Autoradiographic localization of gamma-aminobutyric acidA receptors within the ventral tegmental area. *Neurochem Res* 17:101-106.
- Clineschmidt BV, Martin GE, Bunting PR (1982a) Anticonvulsant activity of (1)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a, d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic, and apparent anxiolytic properties. *Drug Development Res* 2:123-134.
- Clineschmidt BV, Martin GE, Bunting PR, Papp NL (1982b) Central sympathomimetic activity of MK-801, a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties. *Drug Development Res* 2:135.
- Colwill RM, Rescorla RA (1988) Associations between the discriminative stimulus and the reinforcer in instrumental learning. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 14:155-164.
- Colwill RM, Motzkin DK (1994) Encoding of the unconditioned stimulus in Pavlovian conditioning. *Animal Learn Behav* 22:384-394.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Conrad LC, Pfaff DW (1976) Autoradiographic tracing of nucleus accumbens efferents in the rat. *Brain Res* 113:589-596.
- Cooke SF, Bliss TV (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129:1659-1673.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (2003). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Eighth Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Corbit LH, Balleine BW (2003a) Instrumental and Pavlovian incentive processes have dissociable effects on components of a heterogeneous instrumental chain. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 29:99-106.
- Corbit LH, Balleine BW (2003b) The role of prelimbic cortex in instrumental conditioning. *Behav Brain Res* 146:145-157.
- Corbit LH, Balleine B (2005) Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general outcome-specific forms of pavlovian-instrumental transfer. *J Neurosci* 25:962-970.
- Corbit LH, Janak PH (2007a) Inactivation of the lateral but not medial dorsal striatum eliminates the excitatory impact of Pavlovian stimuli on instrumental responding. *J Neurosci* 27:13977-13981.

- Corbit LH, Janak PH (2007b) Ethanol-associated cues produce general pavlovian-instrumental transfer. *Alcohol Clin Exp Res* 31:766-774.
- Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci* 21:3251-3260.
- Corbit LH, Janak PH, Balleine BW (2007) General and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer: the effect of shifts in motivational state and inactivation of the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 26:3141-3149.
- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25:271-284.
- Coyle JT, Leski ML, Morrison JH (2002) The diverse roles of L-glutamic acid in brain signal transduction. In: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress* (Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, eds), pp 71-90. New York: Lippincott Williams & Wilkins.
- Crombag HS, Sutton JM, Takamiya K, Holland PC, Gallagher M, Haganir RL (2008) A role for alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid GluR1 phosphorylation in the modulatory effects of appetitive reward cues on goal-directed behavior. *Eur J Neurosci* 27:3284-3291.
- Dackis CA, O'Brien CP (2001) Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *J Subst Abuse Treat* 21:111-117.
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl:SUPPL 232:231-255*.
- Dalley JW, Laane K, Theobald DE, Armstrong HC, Corlett PR, Chudasama Y, Robbins TW (2005) Time-limited modulation of appetitive Pavlovian memory by D1 and NMDA receptors in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6189-6194.
- Danysz W, Essmann U, Bresink I, Wilke R (1994) Glutamate antagonists have different effects on spontaneous locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48:111-118.
- Datla KP, Ahier RG, Young AM, Gray JA, Joseph MH (2002) Conditioned appetitive stimulus increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat. *Eur J Neurosci* 16:1987-1993.
- de Borchgrave R, Rawlins JN, Dickinson A, Balleine BW (2002) Effects of cytotoxic nucleus accumbens lesions on instrumental conditioning in rats. *Exp Brain Res* 144:50-68.
- Delamater AR, Oakeshott S (2007) Learning about multiple attributes of reward in Pavlovian conditioning. *Ann N Y Acad Sci*.
- Deutch AY, Roth RH (1999) Neurotransmitters. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 193-234. San Diego: Academic Press.
- Di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7:69-76.
- Di Ciano P, Everitt BJ (2003) The GABA(B) receptor agonist baclofen attenuates cocaine- and heroin-seeking behavior by rats. *Neuropsychopharmacology* 28:510-518.
- Di Ciano P, Everitt BJ (2004) Contribution of the ventral tegmental area to cocaine-seeking maintained by a drug-paired conditioned stimulus in rats. *Eur J Neurosci* 19:1661-1667.

- Di Ciano P, Everitt BJ (2005) Neuropsychopharmacology of drug seeking: Insights from studies with second-order schedules of drug reinforcement. *Eur J Pharmacol* 526:186-198.
- Dickinson A (1983) The effect of the instrumental training contingency on susceptibility to reinforcer devaluation. *Quarterly Journal of Experimental Psychology* 35:35-51.
- Dickinson A (1985) Actions and habits: the development of behavioural autonomy. *Philos Trans R Soc Lond B* 308:67-78.
- Dickinson A, Dawson GR (1987) Pavlovian Processes in the Motivational Control of Instrumental Performance. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology* 39:201-213.
- Dickinson A, Balleine B (1994) Motivational control of goal-directed action. *Animal Learn Behav* 22:1-18.
- Dickinson A, Smith J, Mirenowicz J (2000) Dissociation of Pavlovian and instrumental incentive learning under dopamine antagonists. *Behav Neurosci* 114:468-483.
- Domjan M (2010). *The Principles of Learning and Behavior*. 6th Edition. Wadsworth, Cengage Learning. Belmont.
- Dunn AJ, Berridge CW (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Brain Res Rev* 15:71-100.
- El-Amamy H, Holland PC (2007) Dissociable effects of disconnecting amygdala central nucleus from the ventral tegmental area or substantia nigra on learned orienting and incentive motivation. *Eur J Neurosci* 25:1557-1567.
- Estes W (1948) Discriminative conditioning. II. Effects of a pavlovian conditioned stimulus upon a subsequently established operant response. *J Exp Psychol* 38:173-177.
- Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* 22:3312-3320.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489.
- Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci* 985:233-250.
- Fadel J, Deutch AY (2002) Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111:379-387.
- Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-580.
- Faure A, Haberland U, Conde F, El Massioui N (2005) Lesion to the nigrostriatal dopamine system disrupts stimulus-response habit formation. *J Neurosci* 25:2771-2780.
- Feltenstein MW, See RE (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br J Pharmacol* 154:261-274.
- Fibiger HC, Carter DA, Phillips AG (1976) Decreased intracranial self-stimulation after neuroleptics or 6-hydroxydopamine: evidence for mediation by motor deficits rather than by reduced reward. *Psychopharmacology (Berl)* 47:21-27.
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM (2007) Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement. *Annu Rev Neurosci*.

- Fink-Jensen A, Judge ME, Hansen JB, Jacobsen P, Turski L, Olney J, Honore T (1992) Inhibition of cisplatin-induced emesis in ferrets by the non-NMDA receptor antagonists NBQX and CNQX. *Neurosci Lett* 137:173-177.
- Ford LM, Norman AB, Sanberg PR (1989) The topography of MK-801-induced locomotor patterns in rats. *Physiol Behav* 46:755-758.
- Freund TF, Powell JF, Smith AD (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13:1189-1215.
- Fudge JL, Haber SN (2000) The central nucleus of the amygdala projection to dopamine subpopulations in primates. *Neuroscience* 97:479-494.
- Gallagher M, Graham PW, Holland PC (1990) The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior. *J Neurosci* 10:1906-1911.
- Gawin FH (1991) Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* 251:1580-1586.
- Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490:270-294.
- Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173-5187.
- Gerlai R, Henderson JT, Roder JC, Jia Z (1998) Multiple behavioral anomalies in GluR2 mutant mice exhibiting enhanced LTP. *Behav Brain Res* 95:37-45.
- Gierler C, Bohn I, Hauber W (2003) The rat nucleus accumbens is involved in guiding of instrumental responses by stimuli predicting reward magnitude. *Eur J Neurosci* 18:1993-1996.
- Gierler C, Bohn I, Hauber W (2004) Transient inactivation of the rat nucleus accumbens does not impair guidance of instrumental behaviour by stimuli predicting reward magnitude. *Behav Pharmacol* 15:55-63.
- Gierler C, Bohn I, Hauber W (2005) Involvement of NMDA and AMPA/KA receptors in the nucleus accumbens core in instrumental learning guided by reward-predictive cues. *Eur J Neurosci* 21:1689-1702.
- Glasner SV, Overmier JB, Balleine BW (2005) The role of Pavlovian cues in alcohol seeking in dependent and nondependent rats. *J Stud Alcohol* 66:53-61.
- Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41:1-24.
- Grace AA (1995) The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. *Drug Alcohol Depend* 37:111-129.
- Grace AA (2000) The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* 95 Suppl 2:S119-128.
- Grace AA, Bunney BS (1985) Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res* 333:271-284.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30:220-227.

- Groenewegen HJ, Trimble M (2007) The ventral striatum as an interface between the limbic and motor systems. *CNS Spectr* 12:887-892.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV (1996) The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res* 107:485-511.
- Hall J, Parkinson JA, Connor TM, Dickinson A, Everitt BJ (2001) Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *Eur J Neurosci* 13:1984-1992.
- Hatfield T, Han JS, Conley M, Gallagher M, Holland P (1996) Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *J Neurosci* 16:5256-5265.
- Hauber W, Bohn I, Gierler 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, Gierler C, Bohn I (2001) NMDA and dopamine D2 receptors in the caudate-putamen are not involved in control of motor readiness in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 155:43-51.
- 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.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151-180.
- Hernandez PJ, Andrzejewski ME, Sadeghian K, Panksepp JB, Kelley AE (2005) AMPA/kainate, NMDA, and dopamine D1 receptor function in the nucleus accumbens core: a context-limited role in the encoding and consolidation of instrumental memory. *Learn Mem* 12:285-295.
- Holland PC (1980) CS-US interval as a determinant of the form of Pavlovian appetitive conditioned responses. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 6:155-174.
- Holland PC, Gallagher M (1999) Amygdala circuitry in attentional and representational processes. *Trends Cogn Sci* 3:65-73.
- Holland PC, Gallagher M (2003) Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and Pavlovian-instrumental transfer. *Eur J Neurosci* 17:1680-1694.
- Hollerman JR, Schultz W (1998) Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nat Neurosci* 1:304-309.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hollon TR, Bek MJ, Lachowicz JE, Ariano MA, Mezey E, Ramachandran R, Wersinger SR, Soares-da-Silva P, Liu ZF, Grinberg A, Drago J, Young WS, 3rd, Westphal H, Jose PA, Sibley DR (2002) Mice lacking D5 dopamine receptors have increased sympathetic tone and are hypertensive. *J Neurosci* 22:10801-10810.
- Homayoun H, Moghaddam B (2009) Differential representation of Pavlovian-instrumental transfer by prefrontal cortex subregions and striatum. *Eur J Neurosci*.
- Horvitz JC (2002) Dopamine gating of glutamatergic sensorimotor and incentive motivational input signals to the striatum. *Behav Brain Res* 137:65-74.

- Howland JG, Taepavarapruk P, Phillips AG (2002) Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. *J Neurosci* 22:1137-1145.
- Hurd YL, McGregor A, Ponten M (1997) In vivo amygdala dopamine levels modulate cocaine self-administration behaviour in the rat: D1 dopamine receptor involvement. *Eur J Neurosci* 9:2541-2548.
- Hyland BI, Reynolds JN, Hay J, Perk CG, Miller R (2002) Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114:475-492.
- Hyman SE (2005) Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 162:1414-1422.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu Rev Neurosci*.
- Jia Z, Agopyan N, Miu P, Xiong Z, Henderson J, Gerlai R, Taverna FA, Velumian A, MacDonald J, Carlen P, Abramow-Newerly W, Roder J (1996) Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17:945-956.
- Johnson LR, Aylward RL, Hussain Z, Totterdell S (1994) Input from the amygdala to the rat nucleus accumbens: its relationship with tyrosine hydroxylase immunoreactivity and identified neurons. *Neuroscience* 61:851-865.
- Johnson SW, North RA (1992) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* 450:455-468.
- Kalivas PW (1993) Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* 18:75-113.
- Kalivas PW (2004) Glutamate systems in cocaine addiction. *Curr Opin Pharmacol* 4:23-29.
- Kalivas PW, Duffy P (1993) Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya. *J Neurosci* 13:276-284.
- Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* 9:223-227.
- Kalivas PW, Duffy P, Eberhardt H (1990) Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 253:858-866.
- Kandel ER (2000) Cellular Mechanisms of Learning and the Biological Basis of Individuality. In: *Principles of Neural Science, Fourth Edition* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 1247-1279. New York: McGraw-Hill.
- Kandel ER, Siegelbaum SA (2000) Synaptic Integration. In: *Principles of Neural Science, 4th Edition* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 207-228. New York: McGraw-Hill.
- Kandel ER, Kupfermann I, Iversen SD (2000) Learning and Memory. In: *Principles of neural science, 4th Edition* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 1227-1246. New York: McGraw-Hill.
- Kelley AE, Domesick VB, Nauta WJ (1982) The amygdalostratial projection in the rat--an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience* 7:615-630.

- Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ (1997) Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* 388:377-380.
- Klitenick MA, DeWitte P, Kalivas PW (1992) Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 12:2623-2632.
- Klockgether T, Turski L, Honore T, Zhang ZM, Gash DM, Kurlan R, Greenamyre JT (1991) The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 30:717-723.
- Kloog Y (1988) Mode of binding of [3H]dibenzocycloalkenimine (MK-801) to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and its therapeutic implications. *FEBS* 230:167-170.
- Kluver H, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Archives of Neurology and Psychiatry* 42:979-997.
- Koob GF, Bloom FE (1985) Corticotropin-releasing factor and behavior. *Fed Proc* 44:259-263.
- Koob GF, Volkow ND (2009) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217-238.
- Koob GF, Swerdlow N, Seeligson M, Eaves M, Sutton R, Rivier J, Vale W (1984) Effects of alpha-flupenthixol and naloxone on CRF-induced locomotor activation. *Neuroendocrinology* 39:459-464.
- Krettek JE, Price JL (1978) Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol* 178:225-254.
- Kupfermann I, Kandel ER (1996) Lernen und Gedächtnis. In: *Neurowissenschaften - Eine Einführung* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 667-684. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Laruelle M, Abi-Dargham A (1999) Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *J Psychopharmacol* 13:358-371.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R (1999) Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry* 46:56-72.
- Lavin A, Nogueira L, Lapish CC, Wightman RM, Phillips PE, Seamans JK (2005) Mesocortical dopamine neurons operate in distinct temporal domains using multimodal signaling. *J Neurosci* 25:5013-5023.
- Laviolette SR, van der Kooy D (2001) GABA(A) receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signalling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems. *Eur J Neurosci* 13:1009-1015.
- Lex A, Hauber W (2008) Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer. *Learn Mem* 15:483-491.
- Lorenz K, Leyhausen P (1973). *Motivation of human and animal behavior; an ethological view.* van Nostrand-Reinhold. New York.
- Loscher W, Honack D (1992) The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol* 215:199-208.
- Louilot A, Simon H, Taghzouti K, Le Moal M (1985) Modulation of dopaminergic activity in the nucleus accumbens following facilitation or blockade of the dopaminergic transmission in the amygdala: a study by in vivo differential pulse voltammetry. *Brain Res* 346:141-145.

- Lovibond PF (1983) Facilitation of instrumental behavior by a Pavlovian appetitive conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 9:225-247.
- Lu XY, Ghasemzadeh MB, Kalivas PW (1998) Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience* 82:767-780.
- Ludwig AM, Wikler A, Stark LH (1974) The first drink: psychobiological aspects of craving. *Arch Gen Psychiatry* 30:539-547.
- Mahler SV, Smith KS, Berridge KC (2007) Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. *Neuropsychopharmacology* 32:2267-2278.
- Makino S, Gold PW, Schulkin J (1994) Effects of corticosterone on CRH mRNA and content in the bed nucleus of the stria terminalis; comparison with the effects in the central nucleus of the amygdala and the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 657:141-149.
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW (1995) Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 136:4517-4525.
- Maldonado-Irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE (1995) Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 15:6779-6788.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI (1999) Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 405:299-321.
- Marinelli M, Piazza PV (2002) Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci* 16:387-394.
- May LJ, Kuhr WG, Wightman RM (1988) Differentiation of dopamine overflow and uptake processes in the extracellular fluid of the rat caudate nucleus with fast-scan in vivo voltammetry. *J Neurochem* 51:1060-1069.
- Mazur JE (2004). *Lernen und Gedächtnis*. Pearson Education. München.
- McCullough LD, Salamone JD (1992) Involvement of nucleus accumbens dopamine in the motor activity induced by periodic food presentation: a microdialysis and behavioral study. *Brain Res* 592:29-36.
- McDonald AJ (1991) Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience* 44:1-14.
- McDonald AJ (1996) Localization of AMPA glutamate receptor subunits in subpopulations of non-pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci Lett* 208:175-178.
- McDonald AJ, Mascagni F (1996) Cortico-cortical and cortico-amygdaloid projections of the rat occipital cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience* 71:37-54.
- McFarland K, Kalivas PW (2001) The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 21:8655-8663.

- McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW (2003) Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 23:3531-3537.
- McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW (2004) Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci* 24:1551-1560.
- McGregor A, Roberts DC (1993) Dopaminergic antagonism within the nucleus accumbens or the amygdala produces differential effects on intravenous cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement. *Brain Res* 624:245-252.
- Mead AN, Stephens DN (1999) CNQX but not NBQX prevents expression of amphetamine-induced place preference conditioning: a role for the glycine site of the NMDA receptor, but not AMPA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 290:9-15.
- Mead AN, Stephens DN (2003a) Involvement of AMPA receptor GluR2 subunits in stimulus-reward learning: evidence from glutamate receptor *gria2* knock-out mice. *J Neurosci* 23:9500-9507.
- Mead AN, Stephens DN (2003b) Selective disruption of stimulus-reward learning in glutamate receptor *gria1* knock-out mice. *J Neurosci* 23:1041-1048.
- Meredith GE, Totterdell S (1999) Microcircuits in nucleus accumbens' shell and core involved in cognition and reward. *Psychobiology* 27:165-186.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69-97.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17:2921-2927.
- Murschall A, Hauber W (2005) Effects of a systemic AMPA/KA and NMDA receptor blockade on pavlovian-instrumental transfer. *Psychopharmacology (Berl)* 182:290-296.
- Murschall A, Hauber W (2006) Inactivation of the ventral tegmental area abolished the general excitatory influence of Pavlovian cues on instrumental performance. *Learn Mem* 13:123-126.
- Myrick H, Anton RF, Li X, Henderson S, Drobos D, Voronin K, George MS (2004) Differential brain activity in alcoholics and social drinkers to alcohol cues: relationship to craving. *Neuropsychopharmacology* 29:393-402.
- Nemeroff CB (1992) New vistas in neuropeptide research in neuropsychiatry: focus on corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology* 6:69-75.
- Nicola SM (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl)* 191:521-550.
- Nicola SM, Taha SA, Kim SW, Fields HL (2005) Nucleus accumbens dopamine release is necessary and sufficient to promote the behavioral response to reward-predictive cues. *Neuroscience* 135:1025-1033.
- Nie H, Janak PH (2003) Comparison of reinstatement of ethanol- and sucrose-seeking by conditioned stimuli and priming injections of allopregnanolone after extinction in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 168:222-228.
- Nisim AA, Hernandez CM, Cohen RW (1999) The neuroprotective effects of non-NMDA antagonists in the cerebellum of the spastic Han Wistar mutant. *Dev Neurosci* 21:76-86.

- Nowend KL, Arizzi M, Carlson BB, Salamone JD (2001) D1 or D2 antagonism in nucleus accumbens core or dorsomedial shell suppresses lever pressing for food but leads to compensatory increases in chow consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 69:373-382.
- O'Brien CP, Childress AR, Ehrman R, Robbins SJ (1998) Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *J Psychopharmacol* 12:15-22.
- Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.
- Olpe HR, Koella WP, Wolf P, Haas HL (1977) The action of baclofen on neurons of the substantia nigra and of the ventral tegmental area. *Brain Res* 134:577-580.
- Olson VG, Nestler EJ (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87-95.
- Ostlund SB, Balleine BW (2007) Orbitofrontal cortex mediates outcome encoding in pavlovian but not instrumental conditioning. *J Neurosci* 27:4819-4825.
- Palij P, Bull DR, Sheehan MJ, Millar J, Stamford J, Kruk ZL, Humphrey PP (1990) Presynaptic regulation of dopamine release in corpus striatum monitored in vitro in real time by fast cyclic voltammetry. *Brain Res* 509:172-174.
- Parkinson JA, Robbins TW, Everitt BJ (2000a) Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *Eur J Neurosci* 12:405-413.
- Parkinson JA, Cardinal RN, Everitt BJ (2000b) Limbic cortical-ventral striatal systems underlying appetitive conditioning. *Prog Brain Res* 126:263-285.
- Parkinson JA, Willoughby PJ, Robbins TW, Everitt BJ (2000c) Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behavior: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behav Neurosci* 114:42-63.
- 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.
- Parkinson JA, Dalley JW, Cardinal RN, Bamford A, Fehnert B, Lachenal G, Rudarakanchana N, Halkerston KM, Robbins TW, Everitt BJ (2002) Nucleus accumbens dopamine depletion impairs both acquisition and performance of appetitive Pavlovian approach behaviour: implications for mesoaccumbens dopamine function. *Behav Brain Res* 137:149-163.
- Pecina S, Berridge KC (2000) Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: map based on microinjection Fos plumes. *Brain Res* 863:71-86.
- Pecina S, Berridge KC, Parker LA (1997) Pimozide does not shift palatability: separation of anhedonia from sensorimotor suppression by taste reactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 58:801-811.
- Pecina S, Schulkin J, Berridge KC (2006) Nucleus accumbens corticotropin-releasing factor increases cue-triggered motivation for sucrose reward: paradoxical positive incentive effects in stress? *BMC Biol* 4:8.

- Phillips AG, Ahn S, Howland JG (2003) Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 27:543-554.
- Phillipson OT (1979) The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 187:85-98.
- Pickel VM, Beckley SC, Joh TH, Reis DJ (1981) Ultrastructural immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the neostriatum. *Brain Res* 225:373-385.
- Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20:517-523.
- Price JL, Amaral DG (1981) An autoradiographic study of the projections of the central nucleus of the monkey amygdala. *J Neurosci* 1:1242-1259.
- Rescorla RA, Solomon RL (1967) Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychol Rev* 74:151-182.
- 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. *Nature* 398:567-570.
- Robbins TW, Everitt BJ (1999b) Motivation and Reward. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 1245-1260. San Diego: Academic Press.
- Roberts DC (2005) Preclinical evidence for GABAB agonists as a pharmacotherapy for cocaine addiction. *Physiol Behav* 86:18-20.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247-291.
- Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95 Suppl 2:S91-117.
- Schultz W (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7:191-197.
- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.
- Schultz W (2000) Multiple reward signals in the brain. *Nat Rev Neurosci* 1:199-207.
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36:241-263.
- Schultz W (2007a) Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci* 30:203-210.
- Schultz W (2007b) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30:259-288.
- Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR (2000) Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia. *Cereb Cortex* 10:272-284.
- Schwartz JH (2000) Neurotransmitters. In: *Principles of neural science, Fourth Edition* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 280-297. New York: McGraw Hill.
- Schweimer J, Fendt M, Schnitzler HU (2005) Effects of clonidine injections into the bed nucleus of the stria terminalis on fear and anxiety behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 507:117-124.
- Seeman P, Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15:264-270.

- Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42:335-350.
- Semba K, Fibiger HC (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunclopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 323:387-410.
- Setlow B (1997) The nucleus accumbens and learning and memory. *J Neurosci Res* 49:515-521.
- Shaham Y, Erb S, Stewart J (2000) Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 33:13-33.
- Sharp T, Zetterstrom T, Ungerstedt U (1986) An in vivo study of dopamine release and metabolism in rat brain regions using intracerebral dialysis. *J Neurochem* 47:113-122.
- Simon H, Scatton B, Moal ML (1980) Dopaminergic A10 neurones are involved in cognitive functions. *Nature* 286:150-151.
- Simon H, Taghzouti K, Gozlan H, Studler JM, Louilot A, Herve D, Glowinski J, Tassin JP, Le Moal M (1988) Lesion of dopaminergic terminals in the amygdala produces enhanced locomotor response to D-amphetamine and opposite changes in dopaminergic activity in prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res* 447:335-340.
- Smith-Roe SL, Kelley AE (2000) Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning. *J Neurosci* 20:7737-7742.
- Smith KS, Berridge KC (2005) The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake. *J Neurosci* 25:8637-8649.
- Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ (1998) Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 18:8003-8015.
- Suaud-Chagny MF, Chergui K, Chouvet G, Gonon F (1992) Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 49:63-72.
- Sugita S, Johnson SW, North RA (1992) Synaptic inputs to GABAA and GABAB receptors originate from discrete afferent neurons. *Neurosci Lett* 134:207-211.
- Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9:321-353.
- Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331.
- Swerdlow NR, Koob GF (1985) Separate neural substrates of the locomotor-activating properties of amphetamine, heroin, caffeine and corticotropin releasing factor (CRF) in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 23:303-307.
- Takahashi YK, Roesch MR, Stalnaker TA, Haney RZ, Calu DJ, Taylor AR, Burke KA, Schoenbaum G (2009) The orbitofrontal cortex and ventral tegmental area are necessary for learning from unexpected outcomes. *Neuron* 62:269-280.
- Talmi D, Seymour B, Dayan P, Dolan RJ (2008) Human pavlovian-instrumental transfer. *J Neurosci* 28:360-368.

- Taylor JR, Robbins TW (1986) 6-Hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens, but not of the caudate nucleus, attenuate enhanced responding with reward-related stimuli produced by intra-accumbens d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 90:390-397.
- Tiffany ST (1990) A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. *Psychol Rev* 97:147-168.
- Tiffany ST, Drobes DJ (1990) Imagery and smoking urges: the manipulation of affective content. *Addict Behav* 15:531-539.
- Tobler PN, Fiorillo CD, Schultz W (2005) Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science* 307:1642-1645.
- Totterdell S, Smith AD (1989) Convergence of hippocampal and dopaminergic input onto identified neurons in the nucleus accumbens of the rat. *J Chem Neuroanat* 2:285-298.
- Turner LH, Solomon RL, Stellar E, Wampler SN (1975) Humoral factors controlling food intake in dogs. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 35:491-498.
- Van Bockstaele EJ, Pickel VM (1995) GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682:215-221.
- Van Den Bos R, Van Der Harst J, Vijftigschild N, Spruijt B, Van Luitelaar G, Maes R (2004) On the relationship between anticipatory behaviour in a Pavlovian paradigm and Pavlovian-to-Instrumental Transfer in rats (*Rattus norvegicus*). *Behav Brain Res* 153:397-408.
- Vanderschuren LJ, Di Ciano P, Everitt BJ (2005) Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *J Neurosci* 25:8665-8670.
- Wagner FA, Anthony JC (2002) From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* 26:479-488.
- Wallace DM, Magnuson DJ, Gray TS (1992) Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. *Brain Res Bull* 28:447-454.
- Waszczak BL, Walters JR (1980) Intravenous GABA agonist administration stimulates firing of A10 dopaminergic neurons. *Eur J Pharmacol* 66:141-144.
- Weiss F, Maldonado-Vlaar CS, Parsons LH, Kerr TM, Smith DL, Ben-Shahar O (2000) Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4321-4326.
- Weiss F, Martin-Fardon R, Ciccocioppo R, Kerr TM, Smith DL, Ben-Shahar O (2001) Enduring resistance to extinction of cocaine-seeking behavior induced by drug-related cues. *Neuropsychopharmacology* 25:361-372.
- Westbrook GL (2000) Seizure and Epilepsy. In: *Principles of Neural Science, Fourth Edition* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 910-935. New York: McGraw-Hill.
- Westerink BH, Kwint HF, deVries JB (1996) The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 16:2605-2611.

- Westerink BH, Enrico P, Feimann J, De Vries JB (1998) The pharmacology of mesocortical dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and prefrontal cortex of the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 285:143-154.
- Wikler A, Pescor FT (1967) Classical conditioning of a morphine abstinence phenomenon, reinforcement of opioid-drinking behavior and "relapse" in morphine-addicted rats. *Psychopharmacologia* 10:255-284.
- Wise RA (1982) Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. *Behav Brain Sci* 5:39-87.
- Wise RA (1998) Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51:13-22.
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483-494.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469-492.
- Wise RA, Spindler J, deWit H, Gerberg GJ (1978) Neuroleptic-induced "anhedonia" in rats: pimozide blocks reward quality of food. *Science* 201:262-264.
- Wolterink G, Phillips G, Cador M, Donselaar-Wolterink I, Robbins TW, Everitt BJ (1993) Relative roles of ventral striatal D1 and D2 dopamine receptors in responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 110:355-364.
- Wright CI, Beijer AV, Groenewegen HJ (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci* 16:1877-1893.
- Wyvell CL, Berridge KC (2000) Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *J Neurosci* 20:8122-8130.
- Wyvell CL, Berridge KC (2001) Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered "wanting" for sucrose reward. *J Neurosci* 21:7831-7840.
- Xi ZX, Stein EA (1998) Nucleus accumbens dopamine release modulation by mesolimbic GABA_A receptors-an in vivo electrochemical study. *Brain Res* 798:156-165.
- Yang CR, Seamans JK, Gorelova N (1999) Developing a neuronal model for the pathophysiology of schizophrenia based on the nature of electrophysiological actions of dopamine in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 21:161-194.
- Yoshiyama M, Roppolo JR, de Groat WC (1995) Effects of GYKI 52466 and CNQX, AMPA/kainate receptor antagonists, on the micturition reflex in the rat. *Brain Res* 691:185-194.
- Yun IA, Nicola SM, Fields HL (2004a) Contrasting effects of dopamine and glutamate receptor antagonist injection in the nucleus accumbens suggest a neural mechanism underlying cue-evoked goal-directed behavior. *Eur J Neurosci* 20:249-263.
- Yun IA, Wakabayashi KT, Fields HL, Nicola SM (2004b) The ventral tegmental area is required for the behavioral and nucleus accumbens neuronal firing responses to incentive cues. *J Neurosci* 24:2923-2933.
- Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24:85-105.
- Zahm DS (2005) The evolving theory of basal forebrain functional-anatomical 'macrosystems'. *Neurosci Biobehav Rev* 30:148-172.

- Zahm DS, Brog JS (1992) On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 50:751-767.
- Zahm DS, Jensen SL, Williams ES, Martin JR, 3rd (1999) Direct comparison of projections from the central amygdaloid region and nucleus accumbens shell. *Eur J Neurosci* 11:1119-1126.
- Zahm DS, Williams EA, Latimer MP, Winn P (2001) Ventral mesopontine projections of the caudomedial shell of the nucleus accumbens and extended amygdala in the rat: double dissociation by organization and development. *J Comp Neurol* 436:111-125.
- Zorawski M, Killcross S (2003) Glucocorticoid receptor agonist enhances pavlovian appetitive conditioning but disrupts outcome-specific associations. *Behav Neurosci* 117:1453-1457.

10 Danksagung

Abschließend möchte ich mich nun bei allen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss meiner Promotion beigetragen haben.

Zu aller erst gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Hauber für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und nahm sich viel Zeit um sowohl fachliche Thematiken ausführlich zu diskutieren, als auch zur gründlichen Korrektur der gemeinsam veröffentlichten Artikel und dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich aber dafür bedanken, dass er es mir auch nach einer längeren Babypause ermöglichte, meine Promotion innerhalb weniger Wochen abzuschließen.

Bei Prof. Dr. Franziska Wollnik möchte ich mich dafür bedanken, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte, und sich Zeit zur Korrektur dieser Arbeit nahm. Auch sie ermöglichte es mir meine Promotion doch noch schnell und reibungslos zum Abschluss zu bringen.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Tierphysiologie für das angenehme Arbeitsklima, die vielen Hilfen und Anregungen bei fachlichen Fragen, sowie die ein oder andere verlängerte Mittagspause mit vielen Gesprächen weit ab der Biologie.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung meiner Promotion.

Ganz besonderer Dank gilt Judith und Carsten. Die vielen ausführlichen Diskussionen über sowohl fachliche als auch nicht fachliche Themen haben meinen Arbeitsalltag sehr bereichert, und mit Eurer Tatkräftigen Hilfe konnte ich die nötige Zeit finden, diese Arbeit fertig zu stellen. Danke.

Bei all meinen Freunden möchte ich mich für das Interesse an meiner Arbeit, die nötige Ablenkung und ihre Freundschaft bedanken.

Auch meiner gesamten „Schwiegerfamilie“ danke ich für die vielen schönen gemeinsam verbrachten Stunden und die Herzlichkeit mit der ich in Eure Familie aufgenommen wurde.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meinen Eltern sowie meinen Geschwistern samt Familie. Während des gesamten Studiums und der Promotion ward Ihr immer für mich da, und habt mich stets unterstützt, wann immer ich Eure Hilfe benötigte. Ich bin froh und stolz eine so tolle Familie zu haben. Danke.

Aber mein größter Dank gilt meiner „eigenen“ kleinen Familie. Durch Eure Liebe und Unterstützung habt Ihr mir die nötige Kraft gegeben, diese Arbeit erfolgreich abschließen zu können.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Anja Lex, geb. Murschall
geboren am 26.09.1977 in Velbert
verheiratet, zwei Kinder

Promotion

04 / 2004 – 08 / 2007

Promotion an der Universität Stuttgart, Biologisches Institut, Abteilung Tierphysiologie; Betreuer Prof. Dr. W. Hauber
"Modulation des Klassisch-Instrumentellen Transfers durch die Neurotransmitter Dopamin und Glutamat,"

Hochschulstudium

10 / 2002 – 09 / 2003

Diplomarbeit in der Abteilung Tierphysiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen; Betreuer Prof. Dr. M. Fendt
„Untersuchungen zur Auswirkung postnataler Hypoxie in Tiermodellen der Schizophrenie“ (Note 1,1)
Gesamtnote des Diplomzeugnisses: „sehr gut“
Abschluss: Diplom Biologin

10 / 1997 – 10 / 2002

Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen;
Hauptfach: Tierphysiologie (Note 1,0)
Nebenfach: Genetik (Note 2,0)
Nebenfach: Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Note 2,0)

Schulbildung

1984 – 1988

Grund- und Hauptschule Stockach

1989

Friedrich-Ebert-Gymnasium Velbert

1990 – 1997

Nellenburg Gymnasium Stockach; Abschluss: Abitur (2,2)