

# **Die Wirkungen von akutem Stress auf Erlernen und Abruf erlernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen**

---

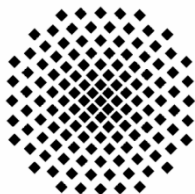
Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
Stephanie Braun geb. Bauer  
aus Reutlingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Wolfgang Hauber (apl.)

Mitberichter: Prof. Dr. Roland Kontermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2017



Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme  
der Universität Stuttgart, 2017



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

Stuttgart, den 25.09.2017

Stephanie Braun



<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	
2	Abkürzungsverzeichnis.....	8
3	Abbildungsverzeichnis.....	12
4	Zusammenfassung.....	14
5	Abstract .....	16
6	Einleitung.....	18
6.1	Lernen und Gedächtnis.....	18
6.2	Klassische und instrumentelle Konditionierung.....	21
6.2.1	Zielgerichtete Handlungen versus automatisierte Handlungen .....	29
6.2.2	Testaufgaben zur Messung von instrumentellen Handlungen.....	31
6.3	Aufbau des Gehirns: Übersicht.....	36
6.3.1	Limbisches System.....	38
6.3.2	Basalganglien.....	40
6.3.3	Striatum: Anatomische und funktionelle Eigenschaften .....	44
6.3.4	Steuerung instrumenteller Handlungen: cortico-striatal-thalamische Schaltkreise .....	47
6.3.5	Molekulare Grundlagen instrumenteller Handlungen im Striatum: der ERK-Signalweg.....	54
6.4	Stress.....	57
6.4.1	Stress-Konzepte.....	57
6.4.2	Stressreaktion.....	60
6.4.3	Stressreaktion – hormonelle Prozesse in der Peripherie (Körper) .....	61
6.4.4	Stressreaktion – Zelluläre und molekulare Prozesse im Gehirn .....	66
6.4.5	Stressreaktion – Lernen und Gedächtnis .....	74
6.4.6	Stressoren im Labor.....	80
6.4.7	Akute Stressor-Wirkungen bei Menschen .....	82

6.5	Fragestellung .....	83
7	Durchgeführte Experimente.....	85
7.1	Manuskript 1.....	85
7.2	Manuskript 2.....	99
7.3	Manuskript 3.....	114
7.4	Weitere Untersuchungen .....	133
7.4.1	Testaufgabe zur Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf das <i>Erlernen</i> von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen .....	133
7.4.2	Lokale pharmakologische Stressor-Wirkungen im mPFC während der Kontingenzdegradation .....	137
8	Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion.....	141
8.1	Ausgangsfragen und Zielsetzung.....	141
8.2	Testaufgaben zur Untersuchung von Stressor-Wirkungen bei instrumentellen Handlungen .....	142
8.2.1	Testaufgaben zur Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf das <i>Erlernen</i> von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen .....	143
8.2.2	Testaufgaben zur Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf den <i>Abruf</i> von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen .....	148
8.2.3	Fazit Testaufgaben .....	149
8.3	Akute Stressoren .....	150
8.3.1	Eignungsprüfung diverser Stressoren für den Einsatz in instrumentellen Testaufgaben.....	150
8.3.2	Möglichkeiten zur pharmakologischen Blockade von Stressor-Wirkungen ....	154
8.3.3	Fazit Identifikation akuter Stressoren und Stressor-Antagonisten.....	156
8.4	Stressor-Wirkungen in instrumentellen Testaufgaben und Möglichkeiten der pharmakologischen Blockade .....	156
8.4.1	Stressor-Wirkungen auf das <i>Erlernen</i> von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen	157
8.4.2	Stressor-Wirkungen auf den <i>Abruf</i> von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen ....	158

8.4.3	Blockade von Stressor-Wirkungen durch Betaxolol oder Diazepam .....	162
8.4.4	Fazit Stressor-Wirkungen in instrumentellen Testaufgaben und deren Blockade .....	163
8.5	Welche neuronalen Schaltkreise beeinflusst der kombinierte Stressor? .....	163
8.6	Schlussfolgerung.....	166
9	Literaturverzeichnis.....	168
10	Anhang: MED-PC Computerprogramme.....	178
10.1	<i>Magazine Training</i> .....	178
10.2	<i>Lever training (Continuous Reinforcement)</i> .....	179
10.3	<i>Lever training (RR 5, RR 10, RR 20)</i> .....	181
10.4	<i>Outcome Devaluation Test in Extinction</i> .....	183
10.5	<i>Contingency Training</i> .....	184
10.6	<i>Contingency Degradation Test in Extinction</i> .....	186
10.7	<i>Lever Training FI20</i> .....	188
10.8	<i>Lever Training VI30, VI60</i> .....	190
10.9	<i>Omission Contingency Training</i> .....	192
10.10	<i>Omission Test in Extinction</i> .....	194
11	Danksagung .....	196
12	Lebenslauf .....	198

## 2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BLA	Basolaterale Amygdala
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CEN	Zentralkern der Amygdala
CR	<i>Conditioned response</i> (konditionierte Reaktion)
CRF	<i>Continuous reinforcement</i> (Trainingsphase mit Verstärkerschema, bei dem jede Hebelbetätigung belohnt wird)
CRH	<i>Corticotropin-releasing Hormone</i>
CS	<i>Conditioned stimulus</i> (konditionierter Stimulus)
D1	Dopamin D1-Rezeptor
DA	Dopamin
DARPP-32	Dopamin-und-cAMP-reguliertes-Phosphoprotein-32
DLS	Dorsolaterales Striatum
DMS	Dorsomediales Striatum
elk-1	Transkriptionsfaktor
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FI 20	<i>Fixed interval 20</i> (Trainingsphase mit Verstärkerschema, bei dem alle 20 sec der Hebel aktiviert wird und die jeweils nächste Hebelbetätigung belohnt wird)
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
GABA	γ-Aminobuttersäure
GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	γ-Aminobuttersäure-A Rezeptor
GABA <sub>B</sub> -Rezeptor	γ-Aminobuttersäure-B Rezeptor
Glu	Glutamat
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HPA-Achse	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenocortical-axis</i> (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse)



Kv4.2	Spannungsgesteuerter Kalium-Kanal 4.2
LTP	<i>Long-term potentiation</i> (Langzeit-Potenzierung)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MD	Mediodorsaler Thalamus
MEK	<i>Mitogen/extracellular signal regulated kinase</i>
mPFC	Medialer Präfrontalcortex
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (messenger Ribonukleinsäure)
MSK	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase
MSN	<i>Medium spiny neuron</i>
MT	<i>Magazine training</i> (Trainingsphase mit Verstärkerschema, bei dem durchschnittlich alle 60 sec eine Belohnung zugeteilt wird, welche keine vorausgehende Handlung der Ratte bedingt, es ist kein Hebel verfügbar; in dieser ersten Sitzung wird der Ratte gezeigt, wo die Belohnung zugeteilt wird, nämlich in der Futterluke)
NAc	Nucleus accumbens
NAcC	<i>Nucleus accumbens core</i> (Kernregion des Nucleus accumbens)
NAcS	<i>Nucleus accumbens shell</i> (Schalenregion des Nucleus accumbens)
0,9 % NaCl	0,9 %-ige Natriumchlorid Lösung (isotonische Kochsalzlösung)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NS	Neutraler Stimulus
OFC	Orbitofrontalcortex
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
pDMS	Posteriores dorsomediales Striatum
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PFC	Präfrontalcortex
PIT-Test	<i>Pavlovian-instrumental transfer test</i> (Klassisch-instrumenteller Transfer Test)
PKA	Proteinkinase A
PL	Prälimbischer Teil des medialen Präfrontalcortex
PO	Posteriorer Thalamus
POMC	Proopiomelanocortin

PP-1	Protein-Phosphatase-1
PTSD	<i>Post-traumatic stress disorder</i> (Posttraumatische Belastungsstörung)
raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> (eine cytosolische Serin/Threonin-Kinase)
ras	GTP-Bindungsprotein
RI 5	<i>Random interval</i> 5 (Trainingsphase mit Verstärkerschema, bei dem nach Pausen von durchschnittlich 5 sec die nächste Hebelbetätigung belohnt wird; das maximale Zeitintervall zwischen 2 Belohnungen ist nicht definiert)
R-O	<i>Response-outcome-association</i> (Handlungs-Ergebnis-Beziehung)
RR 5	<i>Random ratio</i> 5 (Trainingsphase mit Verstärkerschema, bei dem jede Hebelbetätigung mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/5 belohnt wird, d.h. im Durchschnitt wird jede 5. Hebelbetätigung belohnt)
RSK	Ribosomale S6 Kinase
RU 28362	11 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxy-6,21-dimethyl-17 $\alpha$ -pregna-4,6-trien-20yn-3-one (ein Glucocorticoid-Rezeptor Agonist)
SAM-System	<i>Sympathetic-adrenomedullary-system</i> (sympathisches-Nebennierenmark-System)
SECPT	<i>socially evaluated cold-pressor stress</i> (starker akuter Stressor für Stress-Untersuchungen an Menschen)
SM	Sensomotorischer Cortex
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
S-R	<i>Stimulus-response-association</i> (Stimulus-Handlungs-Beziehung)
STEP	<i>Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase</i>
STN	Subthalamischer Nucleus
Thr	Threonin
UR	<i>Unconditioned response</i> (unkonditionierte Reaktion)
US	<i>Unconditioned stimulus</i> (unkonditionierter Stimulus)

VI 30	<i>Variable interval</i> 30 (Trainingsphase mit Verstärkerschema, bei dem nach Pausen von durchschnittlich 30 sec die jeweils nächste Hebelbetätigung belohnt wird; das Zeitintervall zwischen 2 Belohnungen ist definiert z.B. als Zeitspanne von 10-70 sec)
VI 60	<i>Variable interval</i> 60 (Trainingsphase mit Verstärkerschema, bei dem nach Pausen von durchschnittlich 60 sec die jeweils nächste Hebelbetätigung belohnt wird; das Zeitintervall zwischen 2 Belohnungen ist definiert z.B. als Zeitspanne von 15-150 sec)
vmPFC	Ventromedialer Präfrontalcortex
VP	Ventrales Pallidum
VTA	<i>Ventral tegmental area</i> (ventrales tegmentales Areal)

### 3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 6-1:	Verschiedene Gedächtnistypen des Menschen	19
Abbildung 6-2:	Prinzip der klassischen Konditionierung	23
Abbildung 6-3:	Ratte in einer Skinner-Box	25
Abbildung 6-4:	Assoziationen bei der instrumentellen Konditionierung	26
Abbildung 6-5:	Prinzip der instrumentellen Konditionierung	27
Abbildung 6-6:	Klassisch-instrumenteller Transfer Test	28
Abbildung 6-7:	Ablauf des Kontingenzdegradationstests	33
Abbildung 6-8:	Ablauf des Unterlassungskontingenztests	34
Abbildung 6-9:	Ablauf des Ergebnisdevaluationstests	36
Abbildung 6-10:	Limbisches System	39
Abbildung 6-11:	Basalganglien	41
Abbildung 6-12:	Verschaltungen der Basalganglien	42
Abbildung 6-13:	Afferenzen und Efferenzen von Teilstrukturen des Striatums	45
Abbildung 6-14:	Hauptfunktionen der Teilstrukturen des Striatums	46
Abbildung 6-15:	Zielgerichtetes System und Gewohnheitssystem	48
Abbildung 6-16:	Motivationssystem	52
Abbildung 6-17:	Interaktionen der cortico-striatal-thalamischen Schaltkreise	53
Abbildung 6-18:	ERK-Signalweg in Neuronen des Striatums	56
Abbildung 6-19:	Corticosteron-Spiegel von Ratten in verschiedenen Testsituationen	62
Abbildung 6-20:	HPA-Achse	64
Abbildung 6-21:	Signaltransduktion der MR und GR in limbischen Neuronen	71
Abbildung 6-22:	Drei zeitliche Domänen der Stressreaktion	73
Abbildung 6-23:	Stressor-Wirkungen zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Lernvorgangs	75
Abbildung 6-24:	Stressor- Wirkungen auf verschiedene nacheinander stattfindende Lernvorgänge	76
Abbildung 7-1:	Detailliertes Versuchsschema des Unterlassungskontingenztests	134
Abbildung 7-2:	Ergebnisse Unterlassungskontingenz: Test 1	135
Abbildung 7-3:	Ergebnisse Unterlassungskontingenz: Test 2	136
Abbildung 7-4:	Transversalschnitt des prälimbischen mPFC der Ratte	138

Abbildung 7-5:	Ergebnisse Kontingenzdegradation	139
Abbildung 8-1:	Schema des Kontingenzdegradationstests	144
Abbildung 8-2:	Schema des Unterlassungskontingenztests	146
Abbildung 8-3:	Schema des klassischen Ergebnisdevaluationstests	147
Abbildung 8-4:	Schema einer Variante des Ergebnisdevaluationstests	148
Abbildung 8-5:	Wirkungen von chronischem Stress auf zielgerichtetes System und Gewohnheitssystem	164
Tabelle 6-1:	Anatomische Einteilung des menschlichen Gehirns	37

### 4 ZUSAMMENFASSUNG

Instrumentelle Handlungen von Tieren, die dazu dienen ein Ergebnis, wie z.B. Futter oder Zuflucht, zu finden, werden von zwei Systemen gesteuert: dem zielgerichteten System und dem Gewohnheitssystem. Zu Beginn eines instrumentellen Lernvorgangs werden Handlungen hauptsächlich zielgerichtet ausgeführt, d.h. sie werden sowohl vom Wert des Ergebnisses als auch von der Kontingenz zwischen Handlung und Ergebnis gesteuert. Mit voranschreitendem Training werden die Handlungen jedoch zunehmend durch prädiktive Stimuli ausgelöst und unabhängig vom Ergebnis ausgeführt, d.h. sie werden automatisiert oder zur Gewohnheit.

Neue Befunde zeigen, dass akute Stressoren beim Menschen eine rasche Verlagerung von einer zielgerichteten zur automatisierten Handlungssteuerung bewirken. D.h. unter akutem Stress werden Handlungen automatisiert und inflexibel ausgeführt. Die vorliegende Studie untersuchte, ob akuter Stress bei Ratten ebenfalls die Steuerung instrumenteller Handlungen vom zielgerichteten System zum Gewohnheitssystem verlagern kann und welche neurochemischen Korrelate dafür verantwortlich sind.

In der ersten Versuchsreihe wurden verschiedene instrumentelle Testaufgaben für Ratten etabliert, mit dem Ziel, deren Sensitivität für die Erfassung von Stress-Effekten auf instrumentelle Handlungen zu testen. Zuerst verwendeten wir verschiedene Kontingenzdegradationstests. Diese Art Testaufgabe verlangte von Ratten zwei Hebel zu betätigen und zu lernen, dass ein Hebel Futterpellets zuteilte und der andere Zuckerlösung. Danach wurde eine der beiden Handlungs-Ergebnis-Beziehungen abgeschwächt durch eine sog. selektive Kontingenzdegradations-Prozedur. Die Ergebnisse zeigten, dass Kontingenzdegradationstests schwierig durchzuführen, relativ unempfindlich und daher wenig angemessen waren, um akute Stress-Effekte auf instrumentelle Handlungen zu untersuchen. Außerdem testeten wir Ergebnisdevaluationstests, in welchen Ratten trainiert wurden einen Hebel für Futterpellets und den anderen Hebel für Zuckerlösung zu betätigen. Danach wurde einer der beiden Ergebniswerte durch eine sog. spezifische Sättigungs-Prozedur entwertet. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass eingesetzte experimentelle Eingriffe zu reproduzierbaren Effekten führten. Ergebnisdevaluationstests waren demnach geeignet für die Untersuchung von Stress-Effekten auf instrumentelle Handlungen.

In der zweiten Versuchsreihe wurden verschiedene physische Stressoren daraufhin getestet, ob sie in den hier verwendeten Testaufgaben eingesetzt werden konnten. Die Ergebnisse zeigten, dass der Stressor „Wasser“ nicht geeignet war für die Anwendung in einer instrumentellen Testaufgabe. Hingegen waren die Stressoren „Plattform“ und „Röhre“, bei denen die Tiere auf einer kleinen Plattform oder in einer engen Röhre immobilisiert wurden, geeignet für den Einsatz in einer instrumentellen Testaufgabe. Zudem stellte sich ein pharmakologischer Stressor, d.h. die kombinierte Verabreichung von Corticosteron und Yohimbin, als angemessen heraus.

In der dritten Versuchsreihe wurden die oben identifizierten physischen und pharmakologischen Stressoren Ratten verabreicht und in der sensitivsten Testaufgabe, d.h. dem Ergebnisdevaluationstest, getestet. Dafür wurden verschiedene Gruppen von Ratten zunächst im Ergebnisdevaluationstest trainiert, dann der spezifischen Sättigungs-Prozedur unterzogen, verschiedenen akuten Stressoren ausgesetzt und anschließend ihre instrumentelle Performanz, d.h. ihre Sensitivität für eine Ergebnisdevaluation, getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass Ratten, die dem pharmakologischen Stressor oder dem Stressor Röhre unterzogen wurden, weiterhin sensitiv waren für die Ergebnisdevaluation, d.h. sie handelten zielgerichtet. Dagegen waren Ratten, die einer Kombination von akuten Stressoren ausgesetzt wurden, nicht sensitiv gegenüber einer Ergebnisdevaluation, d.h. sie handelten automatisiert.

In teilweiser Übereinstimmung mit Studien an Menschen weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass bei Ratten manche akute Stressoren jenes Lernsystem beeinflussen können, welches den Abruf von gelernten Handlungs-Ergebnis-Beziehungen vermittelt. Mit anderen Worten, instrumentelle Handlungen werden unter akutem Stress inflexibel und automatisiert, anstatt zielgerichtet, ausgeführt. Die Daten bestätigen das Konzept, dass akute Stressoren die Art und Weise wie sich Menschen und Tiere erinnern, d.h. die Qualität der Erinnerung, beeinflussen.

## 5 ABSTRACT

Instrumental actions of animals to obtain an outcome such as food or shelter are controlled by two systems: the goal-directed system and the habit system. During early stages of instrumental learning, actions are mainly goal-directed, i.e. they are controlled by the value of the outcome as well as the contingency between the action and the outcome. As training proceeds, however, actions become more and more guided by predictive stimuli and independent of the outcome, i.e. they are automated or habitual.

Recent findings in humans indicate that acute stressors can prompt a shift from goal-directed to habitual action control. Thus, under acute stress instrumental actions are performed automatic and inflexible. The present study examines in rats whether instrumental action can be shifted from goal-directed to habitual action control by acute stressors as well and sought to identify neurochemical correlates.

In the first series of experiments, several instrumental tasks for rats have been established to test their sensitivity to assess acute stressor effects on instrumental actions. First, we used different contingency degradation tasks. Such tasks require rats to press two levers, one lever delivering food pellets and the other lever delivering sucrose solution. Thereafter, one of the two action-outcome-associations was degraded using a selective contingency degradation procedure. Results showed that contingency degradation tasks were difficult to establish, relatively insensitive to experimental manipulation and, therefore, hardly appropriate to analyze acute stress effects on instrumental actions. We also tested outcome devaluation tasks in which rats were trained to press one lever for food pellets and the other lever for sucrose solution. Thereafter, one of the two outcomes was devalued using a specific satiety procedure. Results indicate that experimental interventions tested resulted in reproducible effects, suggesting that outcome devaluation tasks were appropriate to assess acute stressor effects on instrumental action.

In the second series of experiments, several physical stressors have been examined as to whether they can be used in the tasks employed here. Results showed that the stressor “water exposure” was not suitable for the application in those instrumental tasks. By contrast, the stressors “elevated platform” and “restraint”, that involve immobilization either on a small platform or in a narrow tube, were suitable to be applied in the instrumental task used here. Moreover, a pharmacological stressor, i.e. combined administration of corticosterone and yohimbine, was found to be appropriate.



In the third series of experiments, the acute physical and pharmacological stressors identified above were applied to rats tested in the most sensitive instrumental task, i.e. the outcome devaluation task. For this purpose, different groups of rats were first trained on the task, then subjected to the specific satiety procedure, exposed to various acute stressors and subsequently tested for their instrumental performance, i.e. their sensitivity for outcome devaluation. Results revealed that rats subjected to pharmacological stressors or the single restraint stressor were still sensitive to outcome devaluation, i.e. their responding was goal-directed. By contrast, rats subjected to a combination of acute stressors were insensitive to outcome devaluation and, thus, acted in a habitual manner.

Partially consistent with human studies, the data suggest that in rats some acute stressors can affect the memory system that mediates retrieval of learned action-outcome contingencies. In other words, under acute stress instrumental actions are performed in an inflexible and habitual, rather than in a goal-directed manner. The data provide further evidence to the idea that acute stressors can impact the way subjects remember, that is, the quality of memory.

## 6 EINLEITUNG

### 6.1 LERNEN UND GEDÄCHTNIS

Als *Lernen* bezeichnet man den Vorgang, bei dem ein Organismus Informationen aus der Umwelt aufnimmt sowie im Gedächtnis speichert und dadurch sein Verhalten ändert. Solche Verhaltensänderungen beruhen auf früheren Erfahrungen und können mehr oder weniger lange andauern. Sie geht mit zahlreichen Modifikationen in der Struktur und Funktion von Nervenzellen und ihren Verbindungen einher, wie z.B. der Bildung neuer Synapsen beim Lernen (Linder et al., 2010).

Das *Gedächtnis* umfasst alle Vorgänge mit denen ein Organismus aus der Umwelt aufgenommene Informationen in abrufbarer Form speichert. Grundlage des Gedächtnisses sind vielfältige Lernvorgänge (Linder et al., 2010).

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts beschäftigt sich die experimentelle neurobiologische Forschung intensiv mit dem Thema „Lernen und Gedächtnis“. Bis heute ist bekannt, dass es verschiedene Gedächtnisformen gibt, welche durch verschiedene neurale Systeme des Gehirns vermittelt werden (Übersicht bei Squire und Zola-Morgan, 2015). Die Gedächtnissysteme lassen sich einerseits anhand der *Dauer* einteilen, mit welcher Gedächtnisinhalte gespeichert werden, nämlich in *Kurzzeit-* und *Langzeitgedächtnis*. Das Kurzzeitgedächtnis speichert Informationen, die von Sinnesorganen aufgenommen werden für Sekunden bis zu wenigen Minuten. Dagegen ist das Langzeitgedächtnis ein Speichersystem mit großer Kapazität, aus dem Informationen über Jahre hinweg abrufbar sind (Linder et al., 2010).

Andererseits kann man die Gedächtnissysteme anhand der *Art der gespeicherten Inhalte* unterscheiden, so ergeben sich zunächst zwei Hauptformen des Gedächtnisses: das *Arbeitsgedächtnis* und das *Langzeitgedächtnis* (Abbildung 6-1). Das Arbeitsgedächtnis, eine besondere Art des Kurzzeitgedächtnisses, speichert eine begrenzte Informationsmenge in bearbeitbarer Form über einen kurzen Zeitraum oder ruft Informationen aus dem Langzeitgedächtnis ab und unterstützt damit verschiedene kognitive Fähigkeiten, wie z.B. Entscheidungsprozesse. Ein gesunder Mensch kann sich mit Hilfe des Arbeitsgedächtnisses beispielweise mindestens fünf bis sieben unbekannte Informationen, z.B. Zahlen, Wörter

oder Symbole, merken und korrekt wiedergeben (Thompson, 2001; Arnsten, 2009; Linder et al., 2010; Squire und Dede, 2015). Außerdem vermittelt es die Fähigkeit Gedächtnisinhalte aus dem Langzeitspeicher zu erinnern (Arnsten, 2009). Das Langzeitgedächtnis wird eingeteilt in das *deklarative* (explizite) Gedächtnis und verschiedene *nicht-deklarative* (implizite) Gedächtnisformen (Thompson, 2001; Linder et al., 2010; Squire und Dede, 2015).

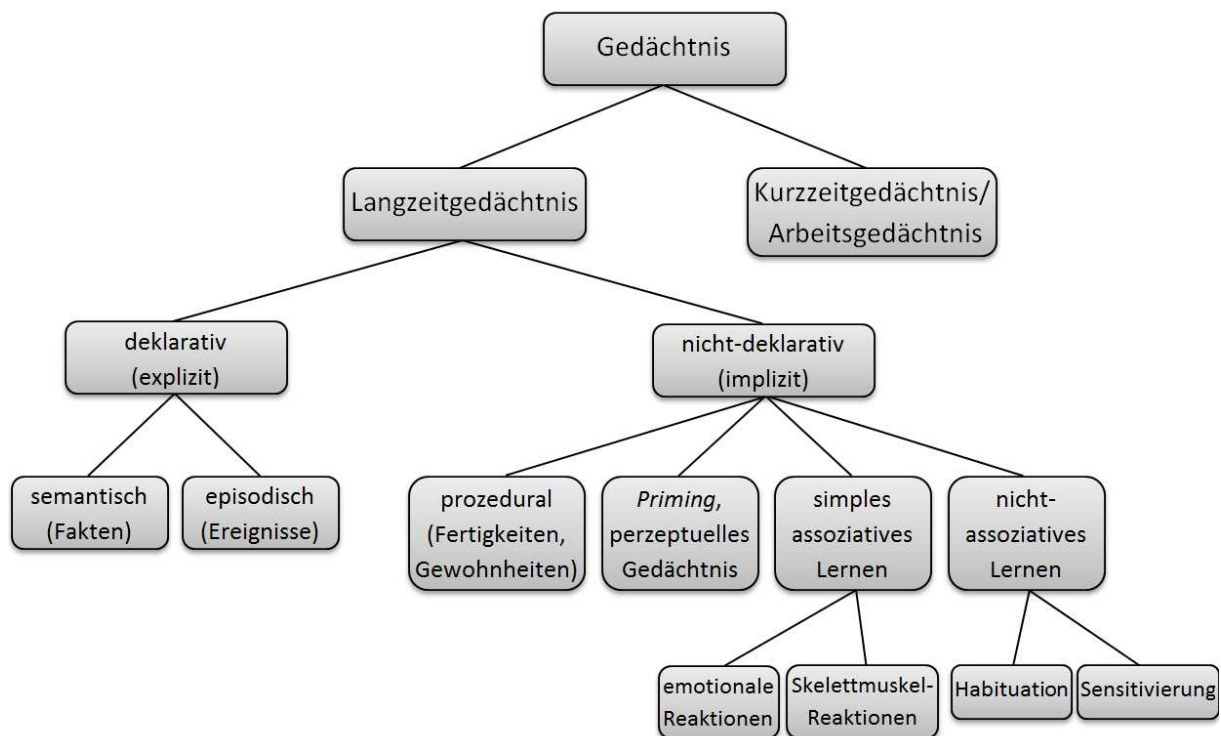


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung verschiedener Gedächtnistypen des Menschen gegliedert nach der Art der gespeicherten Inhalte. Abbildung modifiziert nach Squire und Dede, 2015.

Im deklarativen Gedächtnis werden Informationen über die Außenwelt abgespeichert, welche erinnert und verbal beschrieben werden können, wie z.B. ein bekanntes Geräusch, ein Bild oder ein vertrauter Geruch. Mittels des deklarativen Gedächtnisses werden Ereignisse schnell gelernt. Es umfasst das *semantische* Gedächtnis, welches Fakten über die Welt enthält, z.B. die Bedeutung von Wörtern oder das Einmaleins, und das *episodische* Gedächtnis, d.h. die Fähigkeit sich zeit- und ortsbezogen an ein Erlebnis zu erinnern, z.B. wann und wo man seinen letzten Urlaub verbracht hat (Thompson, 2001; Squire und Dede, 2015).

Das nicht-deklarative Gedächtnis umfasst eine Vielzahl an erworbenen Informationen, Kenntnissen und Fähigkeiten, die unbewusst sind und meist nicht verbal beschrieben werden können. Dazu zählen Gewohnheiten und Vorlieben, die zwar nicht bewusst erinnert

werden können, dennoch durch vergangene Ereignisse gebildet werden und unser aktuelles Verhalten beeinflussen. Ein Teil des nicht-deklarativen Gedächtnisses ist das *prozedurale Gedächtnis*, welches motorische Fertigkeiten und Gewohnheiten umfasst, z.B. Fahrradfahren, Tennis- oder Klavierspielen. Daneben gibt es das sog. *Priming* (engl. *prime* = instruieren, vorbereiten), d.h. die Fähigkeit zur verbesserten Verarbeitung, Wahrnehmung und Identifikation eines Reizes, die darauf beruht, dass dieser oder ein ähnlicher Reiz kurz zuvor bereits präsentiert wurde (Hanser et al., 2000). Ein Beispiel soll die Bedeutung von *Priming* verdeutlichen: Versuchspersonen wird zunächst eine Liste mit Wörtern vorgelegt. Im Anschluss werden ihnen die jeweils ersten beiden Buchstaben von Wörtern der Wortliste präsentiert mit der Aufgabe diese zu vervollständigen. So assoziieren sie nun z.B. die Wortsilbe „Tr“ mit „Treppe“, weil „Treppe“ auf der anfangs gezeigten Wortliste stand (Thompson, 2001). Mittels Priming kann ein Organismus schneller und effektiver mit der Umwelt interagieren. Hierbei spielt auch das *perzeptuelle Gedächtnis* (Wahrnehmungsgedächtnis) eine große Rolle. Es ermöglicht kurz zuvor gezeigte visuelle Stimuli bei wiederholter Darbietung rascher zu erkennen und von anderen zu unterscheiden (Squire und Dede, 2015).

Ein weiterer Teil des nicht-deklarativen Gedächtnisses umfasst erlernte Reaktionen, die auf *simplem Formen von assoziativem Lernen* beruhen, z.B. die Lidschlagkonditionierung bei Mensch oder Tier. Hierbei wird zunächst ein neutraler Stimulus, wie z.B. ein Ton, direkt vor dem unkonditionierten Stimulus (US), z.B. ein Luft-Stoß ins Auge, präsentiert. Nach mehrmaliger Durchführung schließt das Auge mit dem Lidschlagreflex bereits bei Präsentation des Tons, welcher somit vom neutralen zum konditionierten Stimulus (CS) wurde. Es wird eine CS-US Assoziation gelernt, die nicht unbedingt bewusst ist (Squire und Dede, 2015).

Zuletzt umfasst das nicht-deklarative Gedächtnis erlernte Reaktionen, die auf *nicht-assoziativen Lernvorgängen* beruhen, welches die einfachsten und ursprünglichsten Lernformen sind. Hierzu zählen die *Habituation* (Gewöhnung) und die *Sensitivierung* (Sensibilisierung). Bei der Habituation wird die Reaktion auf einen Stimulus, der weder positive noch negative Konsequenzen hat, nach mehrmaliger Darbietung abgeschwächt. Hingegen beschreibt die Sensitivierung, dass durch eine intensive Reizung die Reaktion auf nachfolgende, auch unterschwellige Stimuli verstärkt wird (Hanser et al., 2000; Thompson, 2001). Wird z.B. einer Ratte ein lauter akustischer Reiz präsentiert, so schreckt sie zunächst

auf und flüchtet. Nach mehrmaliger Darbietung des Reizes, der ohne weitere Folgen bleibt, zeigt sie keine Reaktion mehr. Es tritt Habituation auf. Wird der Ratte jedoch kurz vor dem Reiz ein leichter Stromstoß versetzt, so wird sie auf den Reiz stärker reagieren. Dieser Vorgang wird Sensitivierung genannt (Thompson, 2001).

Die vorgestellte Unterteilung des Langzeitgedächtnisses in ein deklaratives und nicht-deklaratives Gedächtnis ist eine starke Vereinfachung. Wird beispielsweise eine Handlung neu gelernt, so ist sich ein Individuum zu Beginn des Lernprozesses meist bewusst über die Lerninhalte, welche zunächst im deklarativen Gedächtnis gespeichert werden. Im weiteren Verlauf des Lernens jedoch werden Handlungen zunehmend unbewusst ausgeführt und die Lerninhalte werden dann im nicht-deklarativen Gedächtnis gespeichert. Dies ist beispielsweise beim Schwimmen lernen der Fall. Zu Beginn erinnert man sich bewusst daran, wie man Arme und Beine bewegen muss, um über Wasser zu bleiben und vorwärts zu kommen. Dies erfolgt über das deklarative Gedächtnis. Sobald die Bewegungsabläufe gelernt sind, schwimmt man, ohne sich bewusst an sie zu erinnern. Daran ist dann das nicht-deklarative Gedächtnis beteiligt. Dieses Beispiel macht deutlich, dass die verschiedenen Formen von Lern- und Gedächtnisprozessen nicht unabhängig arbeiten, sondern auf vielfache Weise miteinander interagieren.

## 6.2 KLASSISCHE UND INSTRUMENTELLE KONDITIONIERUNG

Beim *assoziativen Lernen* werden Verknüpfungen zwischen zeitlich nahe beieinander liegenden Ereignissen, z.B. Stimuli, Handlungen und Handlungsergebnissen, gebildet (Liljeholm und O'Doherty, 2012). Damit assoziatives Lernen stattfinden kann, ist sowohl die enge zeitliche Verbindung zwischen Stimulus und Ergebnis (Kontiguität) von Bedeutung, als auch die Wahrscheinlichkeit, mit der Stimulus und Ergebnis in enger zeitlicher Verbindung auftreten (Kontingenz) (Thompson, 2001). Es werden hauptsächlich zwei Formen von assoziativem Lernen unterschieden: die *klassische Konditionierung* und die *instrumentelle Konditionierung* (Übersicht bei Cardinal et al., 2002; Domjan, 2003). Dabei ist zu beachten, dass sich die Bezeichnungen der beiden Konditionierungs-Formen auf die experimentellen Vorgehensweisen beziehen und nicht auf den Lernvorgang als solchen (Cardinal et al., 2002).

*Klassische Konditionierung.* Bei der klassischen Konditionierung werden zwei zunächst voneinander unabhängige Stimuli miteinander verknüpft. Das Auftreten der Stimuli kann ein Individuum nicht aktiv durch sein Handeln beeinflussen. Einer der beiden Stimuli, der neutraler Stimulus (NS), hat keine biologische Bedeutung für den Organismus und löst daher auch keine Reaktion aus. Dagegen ist der sog. unconditionierte Stimulus (US), z.B. Futter, von großer biologischer Relevanz für den Organismus und löst eine unconditionierte Reaktion (UR), z.B. Speichelfluss, aus. Wird der NS wiederholt zeitgleich mit dem US präsentiert, so erlangt auch der NS eine biologische Bedeutung und wird zum konditionierten Stimulus (CS). Als solcher löst er nun nach alleiniger Präsentation die UR aus, welche dann als konditionierte Reaktion (CR) bezeichnet wird (Cardinal et al., 2002).

Das wohl bekannteste Beispiel einer klassischen Konditionierung geht auf Iwan Pawlow zurück, einen russischen Physiologen aus dem 19. Jahrhundert, der den Begriff „klassische Konditionierung“ in die experimentelle neurobiologische Forschung einführte. Er entdeckte, dass Hunde bereits beim Anblick von Futter (US) mit Speichelfluss (UR) reagierten (Abbildung 6-2). Nachdem er den Hunden mehrmals das Futter präsentierte während er eine Glocke (NS) läutete, reagierten die Hunde schließlich auch dann mit Speichelfluss, wenn die Glocke allein geläutet wurde. Der NS „Glocke“ wurde folglich zum CS, der nun die automatische CR „Speichelfluss“ auslösen konnte (Domjan, 2003; Bear et al., 2007).

Bei der klassischen Konditionierung werden mehrere assoziative Verknüpfungen zwischen CS und anderen Elementen der Konditionierung im Gehirn gebildet. Dabei ist das Erlernen des Zusammenhangs zweier Stimuli, d.h. die *US-CS-Assoziation*, grundlegend für die Ausbildung assoziativer Verknüpfungen des CS. Erstens wird der CS direkt mit der CR verknüpft, d.h. eine simple *S-R-Assoziation (stimulus-response-association)* wird gebildet ohne Informationen über den US. Zweitens wird der CS mit *Emotionen* verbunden, wie z.B. die Erwartung einer Belohnung. Und drittens kann der CS mit spezifischen *sensorischen Eigenschaften* des US assoziiert sein, wie z.B. optische Erscheinung oder Geschmack (Cardinal et al., 2002). Ein wichtiges Merkmal der klassischen Konditionierung ist, dass zwar die kognitive Repräsentation des CS, US oder deren Assoziation verfeinert werden kann, jedoch kann ein Mensch oder Tier die Ausführung der CR nicht unmittelbar beeinflussen (Balleine et al., 2009).

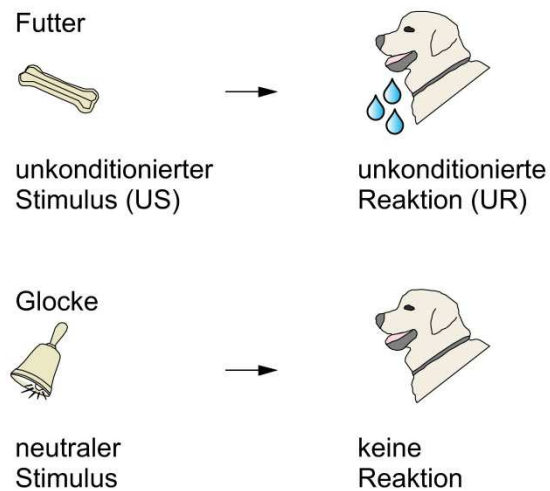
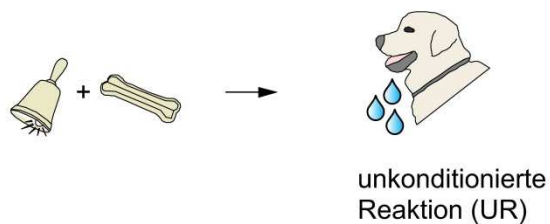
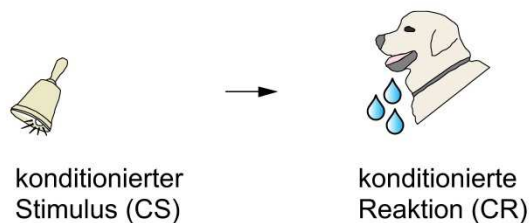
**vor der Konditionierung****während der Konditionierung****nach der Konditionierung**

Abbildung 6-2: Das Prinzip der klassischen Konditionierung am Beispiel des Pawlowschen Hundes.

Mittels der klassischen Konditionierung können bislang unbekannte Stimuli mit angeborenen Reaktionen assoziiert werden, sodass letztere einen größeren Nutzen für das Individuum erlangen. Auf diese Weise kann das Individuum Ereignisse vorhersagen, die in seiner Umwelt vorkommen, und sich in verschiedenen Situationen anpassen (Cardinal et al., 2002). Beispielsweise fasst ein Kind, das sich einmal an der Herdplatte verbrannt hat, zukünftig nicht mehr auf die Platte sobald es diese sieht.

*Instrumentelle Konditionierung.* Die Bezeichnung „instrumentell“ besagt, dass ein Mensch oder Tier eine Handlung als Instrument einsetzt, um ein bestimmtes Ziel oder Ergebnis zu erreichen. Erste systematische Untersuchungen zur instrumentellen Konditionierung gehen auf Edward Thorndike (1898) zurück, der die Intelligenz von Tieren untersuchen wollte. Er setzte ein hungriges Tier, z.B. eine Katze, ein Hund oder Huhn, in einen sog. „Problemkäfig“ und legte Futter außerhalb des Käfigs bereit. Das Tier konnte durch Betätigung eines Hebels oder durch Ziehen an einer Lasche aus dem Käfig entkommen und an das Futter gelangen. Wurde ein Tier erstmals in einen Problemkäfig gesetzt, so zeigte es zunächst typische Verhaltensweisen eines eingesperrten Tieres und betätigte irgendwann zufällig den Öffnungsmechanismus. Nach mehreren Durchgängen entkam das Tier immer schneller aus dem Käfig. Laut Thorndike bewirkt ein erfolgreiches Entkommen, dass eine Assoziation zwischen Stimuli im Problemkäfig und der zielführenden Handlung gebildet wird. Diese Assoziation wird in weiteren Durchgängen durch weiteres erfolgreiches Entkommen gestärkt und führt dazu, dass das Tier die Handlung nachfolgend immer schneller ausführt. Die Handlung als solche wird laut Thorndike durch Stimuli im Käfig ausgelöst. Daraufhin formulierte Thorndike das „Gesetz des Effekts“: Erzeugt eine Handlung (Hebel betätigen) in Anwesenheit eines Stimulus (Problemkäfig) ein zufriedenstellendes Ergebnis (Futter), so wird die Assoziation zwischen Stimulus (S) und Handlung (R) verstärkt (S-R-Assoziation). Das Handlungsergebnis dient lediglich dazu die S-R-Assoziation zu stärken und ist laut Thorndikes Theorie nicht Bestandteil der Assoziation (Domjan, 2003; Mazur, 2006).

Clark Hull (1930) und Kenneth Spence (1956) erweiterten Thorndikes Theorie. Laut ihren Annahmen wird eine instrumentelle Handlung durch zwei Faktoren ausgelöst. Erstens löst ein anwesender Stimulus die instrumentelle Handlung aus durch direkte Assoziation mit der Handlung, was Thorndikes S-R-Assoziation entspricht. Zweitens wird die instrumentelle Handlung durch die Erwartung einer Belohnung beeinflusst, welche auf der Assoziation von Stimulus und Ergebnis basiert (*stimulus-outcome-association*, S-O-Assoziation). Es ist durchaus naheliegend anzunehmen, dass ein instrumentell handelnder/s Mensch oder Tier eine Belohnungserwartung ausbildet, welche an bestimmte Stimuli geknüpft ist. Dieser Zusammenhang wird deutlich, wenn man ein Tier betrachtet, das einen Hebel betätigt um eine Futterbelohnung zu erhalten. Der Hebel signalisiert dem Tier einerseits, dass es durch dessen Betätigung Futter erhält (S-R-Assoziation) und andererseits genügt bereits der Anblick des Hebels um eine baldige Futter-Zuteilung zu signalisieren (S-O-Assoziation). Mit



anderen Worten erkannten Hull und Spence, dass ein Stimulus nicht nur auf „direktem“ Weg eine Handlung auslösen kann (S-R-Assoziation), sondern auch auf „indirektem“ Weg durch Verknüpfung mit dem Handlungsergebnis (S-O-Assoziation) (Domjan, 2003).

Der US-amerikanische Psychologe Burrhus Skinner (1938) sorgte dafür, dass die instrumentelle Konditionierung Mitte des 20. Jahrhunderts ins öffentliche Interesse rückte. Skinners Intention war es ein Verhalten im Labor zu messen, das kontinuierlich ausgeführt werden konnte. Er hatte erkannt, dass natürlich vorkommendes Verhalten eine fortwährende Abfolge von Bewegungsabläufen darstellt, die sich nur schwer voneinander abgrenzen lassen. Daher führte er das Konzept des „Operierens“ ein, oder mit anderen Worten die *operante Konditionierung*. Eine „operante Reaktion“, z.B. die Betätigung eines Hebels, wird durch ihre Auswirkungen auf die Umwelt definiert, z.B. die Zuteilung von Futter. Skinner vereinfachte Thorndikes Problemkäfig in der Weise, dass ein Tier viele Versuchsdurchgänge ausführen konnte ohne das Eingreifen des Experimentators zu erfordern. Bei Thorndikes Problemkäfig musste der Experimentator das Tier nach dem Entkommen aus dem Käfig wieder in selbigen zurücksetzen, damit ein weiterer Durchgang durchgeführt werden konnte. In einer sogenannten SKINNER Box (Abbildung 6-3) hingegen kann ein Tier, z.B. Taube oder Ratte, wiederholt dieselbe Handlung ausführen, ohne dass der Experimentator eingreift.



Abbildung 6-3: Ratte beim Hebelbetätigen in einer SKINNER-Box. Foto: Hauber.

Die einfachste Form eines Versuchsdurchgangs in einer SKINNER Box ist, dass das Tier einen Hebel betätigt und daraufhin eine Futterbelohnung erhält. Das Tier kann den Hebel viele Male in Folge betätigen. Der Experimentator zeichnet als Messgröße für operantes Verhalten die Reaktionsrate auf, d.h. die Hebelbetätigungen pro Zeiteinheit (Domjan, 2003; Mazur, 2006).

Skinner ging von folgendem kausalen Zusammenhang bei der operanten Konditionierung aus: in Anwesenheit eines Stimulus (S) tritt nur dann ein Ergebnis (O) auf, wenn eine bestimmte Handlung (R) stattfindet. Beispielsweise bewirkt der Anblick eines Hebels (S) in einer SKINNER-Box, dass eine Ratte ihn betätigt, weil sie gelernt hat, dass sie dann eine Futterbelohnung erhält (Hebelbetätigung-Futter-Assoziation; R-O). Aufgrund dieser drei Komponenten sprach Skinner von einer „Dreifachkontingenz“, die man auch als S-(R-O)-Assoziation<sup>1</sup> bezeichnet (Abbildung 6-4). Wichtig ist hierbei, dass der Stimulus nicht die Handlung selbst hervorruft, sondern die R-O-Assoziation (Domjan, 2003; Mazur, 2006; Balleine und Ostlund, 2007).

Zahlreiche weitere wissenschaftliche Untersuchungen kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass bei der instrumentellen Konditionierung eine S-(R-O)-Assoziation gebildet wird (Goodall und Mackintosh, 1987; Colwill und Rescorla, 1990; Colwill und Delamater, 1995; Domjan, 2003). Sodass in der experimentellen neurobiologischen Forschung bis heute die S-(R-O)-Assoziation als Grundlage für instrumentelles Handeln gilt.

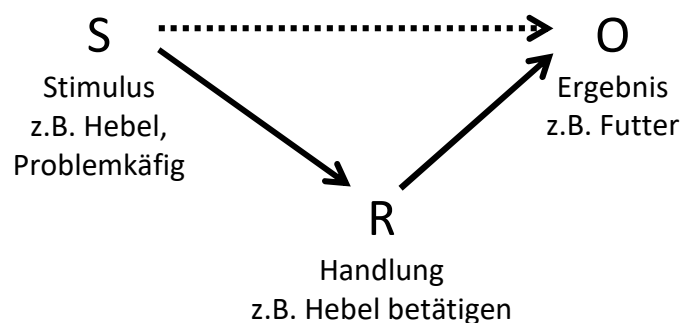


Abbildung 6-4: Assoziationen bei der instrumentellen Konditionierung. Eine instrumentelle Handlung (R) findet in der Anwesenheit eines Stimulus (S) statt und führt zum Ergebnis (O). Damit können verschiedene Arten von Assoziationen gebildet werden. So wird laut Thorndikes Gesetz des Effekts eine S-R-Assoziation gebildet. Hull und Spence fügten eine S-O-Assoziation hinzu. Skinners Dreifachkontingenz besagt, dass eine S-(R-O)-Assoziation gebildet wird. Abbildung modifiziert nach Domjan, 2003.

---

<sup>1</sup> In der Literatur wird hauptsächlich die Bezeichnung „R-O Assoziation“ verwendet, womit genau genommen eine „S-(R-O) Assoziation“ gemeint ist.

Die S-(R-O) Assoziation wird gespeichert und kann zu einem späteren Zeitpunkt wieder abgerufen werden. Dadurch dass ein Individuum lernt, welches Ergebnis seine Handlung zur Folge hat, kann es sein Handeln in einer sich stets ändernden Umwelt situationsgerecht anpassen. D.h. ein vorteilhaftes Ergebnis erhöht seine Handlungsbereitschaft, während ein nachteiliges Ergebnis seine Handlungsbereitschaft verringert (Domjan, 2003). Dies kann in einem einfachen Experiment gezeigt werden. Zunächst lernt eine Ratte in einer SKINNER-Box, dass sie bei Betätigung sowohl des linken als auch des rechten Hebels ein Futterpellet erhält. Diese beiden Zusammenhänge lernt sie schnell und betätigt beide Hebel in etwa gleich häufig. In einer Testsitzung folgt auf die Betätigung des rechten Hebels nun nicht mehr ein Pellet, sondern ein leichter Stromstoß (Abbildung 6-5). Die Ratte lernt rasch diese neue R-O-Assoziation und betätigt den rechten Hebel nur noch wenige Male, den linken Hebel hingegen betätigt sie weiterhin häufig (siehe Diagramm in Abbildung 6-5). Sie bildet somit eine Assoziation zwischen „linken Hebel betätigen“ und „Futterpellet“, bzw. „rechten Hebel betätigen“ und „Stromstoß“ (Killcross et al., 1997). Genauso lernt ein Mensch sehr schnell die Blätter einer Brennnessel von jenen eines Löwenzahns zu unterscheiden und erstere besser nicht mit bloßen Händen anzufassen.

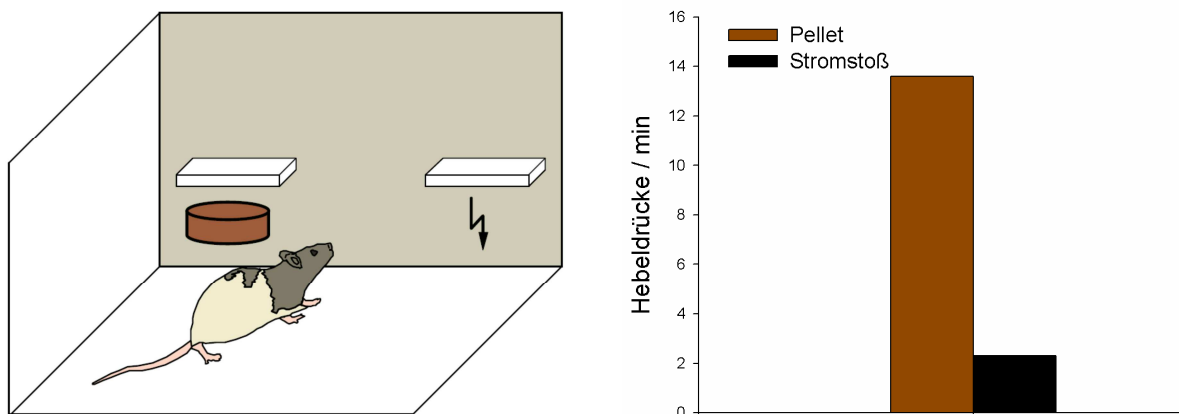


Abbildung 6-5: Die Ratte in der SKINNER-Box hat während des Trainings sowohl nach Betätigung des linken als auch des rechten Hebels ein Futterpellet erhalten. In der hier dargestellten 30-minütigen Testsitzung folgt auf die Betätigung des rechten Hebels ein Stromstoß anstatt wie bisher ein Pellet. Die Ratte lernt die neue R-O-Assoziation schnell und betätigt den rechten Hebel kaum noch, den linken jedoch weiterhin häufig. Das Diagramm stellt die Anzahl der Hebelbetätigungen in der Testsitzung dar. Diagramm nach Killcross et al., 1997.

*Klassisch-Instrumenteller Transfer.* Eine besondere Form der instrumentellen Konditionierung stellt der sog. Klassisch-Instrumentelle Transfer Test (*pavlovian-instrumental transfer test*, PIT-Test) dar. Hierbei beeinflusst ein klassisch konditionierter Stimulus (CS) die Intensität mit der eine instrumentelle Handlung ausgeführt wird (Rescorla

und Solomon, 1967; Berridge und Robinson, 1998; Cardinal et al., 2002; Holmes et al., 2010). Ein Beispiel soll diesen Zusammenhang verdeutlichen: Eine Ratte in einer SKINNER-Box bekommt zunächst nach Präsentation eines akustischen Signals, z.B. einem Ton, ein Futterpellet zugeteilt (Abbildung 6-6). Diese klassische Konditionierung wird mehrfach wiederholt und das Tier lernt den Zusammenhang von Ton (CS) und Pellet (US), d.h. es bildet eine CS-US Assoziation. In der folgenden Trainingsphase, der instrumentellen Konditionierung, bekommt sie, nachdem sie einen Hebel betätigt, ebenfalls ein Futterpellet zugeteilt. Die Ratte lernt den Zusammenhang zwischen Hebelbetätigung und Pellet (R-O-Assoziation) schnell und betätigt den Hebel häufig. Im abschließenden Test, dem klassisch-instrumentellen Transfer, wird erstmals der Hebel auch zusammen mit dem Ton präsentiert. Dies bewirkt, dass die Ratte während der Ton eingespielt wird den Hebel deutlich häufiger betätigt, als wenn kein Ton zu hören ist. Dieses Beispiel zeigt, dass vom CS (Ton) motivierende Effekte ausgehen, welche die Handlungsbereitschaft (Hebel betätigen) der Ratte erhöhen, da beide eine Belohnung vorhersagen (Murschall und Hauber, 2006; Holmes et al., 2010; Sommer und Hauber, 2016).

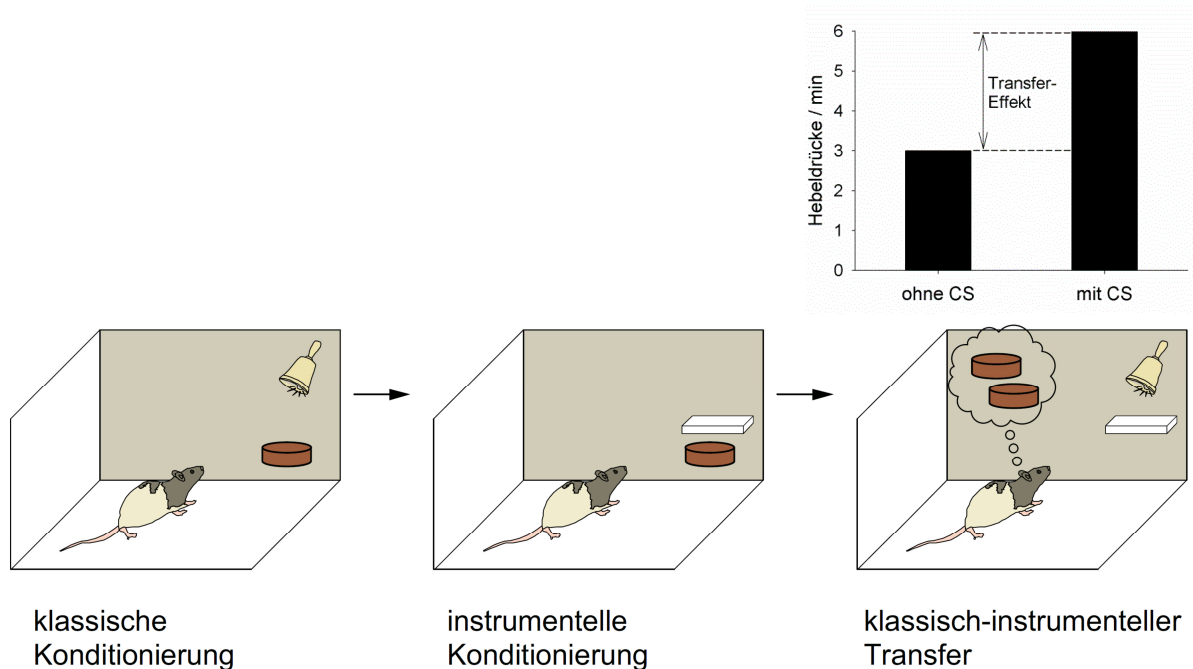


Abbildung 6-6: Klassisch-instrumenteller Transfer Test. In der ersten Trainingsphase, der klassischen Konditionierung, wird eine Assoziation zwischen dem Ton (CS) und dem Futterpellet (US) gebildet. Darauf folgt die instrumentelle Konditionierung, bei welcher eine Assoziation zwischen Hebelbetätigung und Pellet (R-O-Assoziation) gebildet wird. Im abschließenden Test, dem klassisch-instrumentellen Transfer, wird der Einfluss des CS auf die instrumentelle Handlung getestet. Das Balkendiagramm stellt dar, dass die Ratte im klassisch-instrumentellen Transfer den Hebel deutlich häufiger betätigt während der CS eingespielt wird, als wenn kein CS eingespielt wird. Die Differenz der beiden Werte wird als Transfer-Effekt bezeichnet, welcher durch die motivierenden Effekte des CS (Ton) auf die Handlungsbereitschaft (Hebel betätigen) der Ratte ausgelöst wird.

Das PIT-Modell hilft beim Verstehen von Handlungen, die unter der Kontrolle eines Stimulus ausgeführt werden, wie z.B. Essen, Trinken oder auch die Einnahme von Suchtstoffen (Holmes et al., 2010).

### 6.2.1 ZIELGERICHTETE HANDLUNGEN VERSUS AUTOMATISIERTE HANDLUNGEN

Instrumentelle Handlungen können mittels zweier voneinander verschiedenen Handlungsmodi ausgeführt werden. Ein möglicher Handlungsmodus besteht darin die Handlung *zielgerichtet* auszuführen. Der andere Modus ist, eine Handlung aus Gewohnheit, d.h. *automatisiert*, auszuführen. Ein zielgerichtet handelndes Individuum verfolgt ein bestimmtes Ziel mit seiner Handlung, z.B. Nahrung oder Sexualpartner. Hingegen führt ein automatisiert handelndes Individuum die Handlung aus Gewohnheit aus, d.h. wenn diese oft wiederholt wurde, z.B. Fahrradfahren oder Klavierspielen.

*Zielgerichtete Handlungen.* Per Definition ist eine Handlung dann *zielgerichtet*, wenn die beiden folgenden Kriterien erfüllt sind:

Erstens hat ein Mensch oder Tier die „Kontingenz“, d.h. den kausalen Zusammenhang, zwischen der Handlung und dem Erreichen des Handlungsziels (Handlungs-Ergebnis-Beziehung, R-O Assoziation) gelernt und eine Repräsentation dieser Kontingenz gespeichert.

Zweitens hat ein Mensch oder Tier den „Wert“ des Handlungsziels erfasst und eine Repräsentation dieses Ergebniswertes abgespeichert (Dickinson und Balleine, 1994; Cardinal et al., 2002; Dezfouli et al., 2014).

Betrachtet man eine zielgerichtet handelnde Ratte in einer SKINNER-Box, so betätigt sie einen Hebel für eine Futterbelohnung, weil sie vereinfacht gesagt „*weiß*“, dass die Hebelbetätigung Futter liefert (Handlungs-Ergebnis-Beziehung) und weil sie das Futter „*haben möchte*“ (Ergebniswert Repräsentation) (Cardinal et al., 2002). Ebenso betätigt ein zielgerichtet handelnder Mensch einen bestimmten Knopf einer Kaffeemaschine, weil er *weiß*, dass die Maschine auf diesen Knopfdruck eine Kaffee-Art, z.B. Cappuccino, zubereitet, die er *mag*.

Zielgerichtete Handlungen werden erlernt und sind flexibel, d.h. sie werden an Änderungen der Handlungs-Ergebnis-Kontingenz und an Wertänderungen des Handlungsziels angepasst.

Beispielsweise betätigt eine Ratte den Hebel für Futterbelohnung dann weniger häufig, wenn sie die Belohnung auch ohne Hebelbetätigung erhält (Kontingenzänderung) oder wenn sie sich zuvor an dem Futter satt gefressen hat (Wertänderung) (Balleine und Ostlund, 2007). Ebenso geht ein Mensch mit geringer Wahrscheinlichkeit zur Kaffeemaschine, wenn ihm der Kaffee an den Schreibtisch gebracht wird (Kontingenzänderung) oder wenn er soeben eine Tasse Kaffee getrunken hat (Wertänderung).

*Automatisierte Handlungen.* Wird eine bestimmte instrumentelle Handlung bei gleichbleibenden Umgebungsbedingungen lange trainiert, so wird sie nicht mehr zielgerichtet sondern gewohnheitsmäßig bzw. *automatisiert* ausgeführt (Cardinal et al., 2002; Dezfouli et al., 2014). Automatisierte Handlungen werden durch Stimulus-Handlungs-Beziehungen (S-R) gesteuert und unabhängig von den erwarteten Konsequenzen ausgeführt (Yin et al., 2006b). Sie sind inflexibel (Graybiel, 2008) und können nicht an Änderungen der Handlungs-Ergebnis-Kontingenz bzw. an Wertänderungen des Handlungsziels angepasst werden (Yin et al., 2006b). Beispielsweise betätigt eine automatisiert handelnde Ratte weiterhin häufig den Hebel für Futterbelohnung, obwohl sie die Belohnung auch frei zugeteilt bekommt, bzw. sich zuvor daran gesättigt hat. Dasselbe gilt für den Kaffeegenießer, der aus Gewohnheit auch dann zur Kaffeemaschine geht und den Knopf betätigt, obwohl ihm der Kaffee gebracht wird, bzw. wenngleich er bereits Kaffee getrunken hat. Automatisierte Handlungen werden, sobald sie ausgelöst sind, bis zum Ende durchgeführt, ohne dass sie ständig bewusst überwacht werden müssen. Dadurch werden kognitive Kapazitäten für gleichzeitig ablaufende Entscheidungsfindungs-Prozesse frei und die Aufmerksamkeit kann auf andere Stimuli gerichtet werden (Graybiel, 2008; Smith und Graybiel, 2013). Dies ist z.B. beim Autofahren oder Fahrradfahren der Fall; hier steuert ein geübter Fahrer das Fahrzeug im automatisierten Modus und nimmt zugleich aktuelle Vorkommnisse im Straßenverkehr, wie eine rote Ampel, wahr und reagiert zielgerichtet auf sie, indem er die Bremse betätigt.

Eine wesentlich neue Erkenntnis der letzten Jahre besteht darin, dass nicht nur langes Training, sondern auch die Einwirkung von Stress dazu führen kann, dass eine Handlung nicht zielgerichtet, sondern automatisiert ausgeführt wird. So waren Ratten nach Einwirkung von chronischem Stress nicht mehr in der Lage ihre Handlungen an Änderungen der Handlungs-Ergebnis-Kontingenz bzw. des Ergebniswertes anzupassen, d.h. sie handelten

automatisiert (Dias-Ferreira et al., 2009). Das Thema Stress und seine Wirkungen auf die Handlungssteuerung wird in Kapitel 6.4 ausführlich behandelt.

### 6.2.2 TESTAUFGABEN ZUR MESSUNG VON INSTRUMENTELLEN HANDLUNGEN

Ob die instrumentelle Handlung eines Menschen oder Tiers zielgerichtet oder automatisiert ausgeführt wird, lässt sich unter Laborbedingungen mittels zweier komplexer Testaufgaben feststellen: dem Kontingenzdegradationstest und dem Ergebnisdevaluationstest (Übersicht bei Balleine und O'Doherty, 2010). Der Kontingenzdegradationstest überprüft wie ein Individuum nach Änderungen der Handlungs-Ergebnis-Kontingenz handelt. Der Ergebnisdevaluationstest überprüft, wie ein Individuum nach Wertänderungen des Handlungszieles handelt.

Bei der Ratte werden die Testaufgaben in einer SKINNER-Box durchgeführt (Abbildung 6-3). Eine SKINNER-Box kann je nach Anforderung der Testaufgabe verschieden ausgestattet werden. Meist befinden sich mehrere Boxen in einem Versuchslabor. Sie sind einzeln in abgetrennten Schränken untergebracht, um Licht und Schall zu dämpfen. Daher sorgen in der einzelnen Box ein Hauslicht für die Grundbeleuchtung und ein Ventilator für eine ausreichende Belüftung. In der Futterluke kann der Ratte sowohl eine flüssige Belohnung (z.B. Zuckerwasser) als auch ein Futterpellet als Belohnung dargeboten werden. Beide Belohnungsarten werden über einen Vorratsbehälter, welcher sich über der SKINNER-Box befindet, portionsweise bzw. stückweise zugeteilt. Für eine aversive Konditionierung kann über ein Metallgitter, auf welchem die Ratte steht, ein leichter Stromstoß verabreicht werden. Es können verschiedene Lichtstimuli (z.B. hell, dunkel) oder akustische Stimuli (z.B. Ton, Rauschen) eingespielt werden, welche vor allem bei der klassischen Konditionierung zur Anwendung kommen. Für die Durchführung einer instrumentellen Konditionierung können Hebel eingefahren werden, welche die Ratte betätigt und daraufhin eine Belohnung, z.B. ein Futterpellet, erhält.

Der Experimentator bestimmt beim Zusammenbau der Box welche Ausstattungsgegenstände in die Box eingebaut werden und ein speziell für die Testaufgabe geschriebenes Computerprogramm steuert den Testverlauf (z.B. Zeitpunkt der Belohnungszuteilung) und zeichnet die gewünschten Daten auf (z.B. Anzahl an Hebelbetätigungen). Für die Durchführung des Kontingenzdegradationstests und des

Ergebnisdevaluationstests ist eine SKINNER-Box immer mit dem Hauslicht, einem Ventilator, einer Futterluke und zwei Hebeln jeweils links und rechts der Futterluke ausgestattet.

In der Fachliteratur werden verschiedene Arten von Kontingenzdegradationstests verwendet. Der „Standard-Kontingenzdegradationstest“ ist sehr gut beschrieben und etabliert, allerdings ist er relativ komplex und zeitaufwändig (Balleine und Dickinson, 1998; Lex und Hauber, 2010a). Eine vereinfachte Variante sowohl hinsichtlich der Teststruktur als auch der Testdauer stellt der Unterlassungskontingenztest dar (Coutureau et al., 2012). Diese beiden Arten von Kontingenzdegradationstests wurden für die vorliegende Arbeit ausgewählt und werden im Folgenden näher beschrieben.

*Standard-Kontingenzdegradationstest.* Mit Hilfe des Standard-Kontingenzdegradationstests<sup>2</sup> (engl. *contingency-degradation* = Kontingenz-Abschwächung) kann man bestimmen, ob ein Tier eine abgeschwächte bzw. verminderte Kontingenz zwischen Handlung, z.B. Hebelbetätigung, und Ergebnis, z.B. Futterbelohnung, erfasst. Mit anderen Worten, es wird überprüft, ob nach oben genannter Definition einer zielgerichteten Handlung das erste Kriterium erfüllt ist (vgl. Kapitel 6.2.1). Dafür wird eine Ratte im Training trainiert den einen Hebel zu betätigen, um Futterpellets zu erhalten, und den anderen Hebel zu betätigen, um Zuckerlösung zu erhalten (Abbildung 6-7). Dabei lernt sie die Kontingenzen, d.h. die kausalen Beziehungen, zwischen den Hebeln und den jeweils zugeordneten spezifischen Futterbelohnungen. Um zu überprüfen, ob ein Tier diese Zusammenhänge gelernt hat, wird im nächsten Schritt, der Kontingenzdegradation, eine der beiden kausalen Beziehungen „degradiert“, d.h. abgeschwächt, indem die entsprechende Belohnung (z.B. Pellet) nun auch „frei“ zugeteilt wird, d.h. ohne eine vorangehende Hebelbetätigung des Tieres (Balleine und Dickinson, 1998; Corbit und Balleine, 2003; Lex und Hauber, 2010a, 2010c). Ein zielgerichtet handelndes Tier, welches die ursprünglichen Handlungs-Ergebnis-Beziehungen gelernt hat, passt sein Handeln den veränderten Kontingenzbedingungen an. Es betätigt selektiv denjenigen Hebel deutlich weniger häufig, dessen zugeordnete Futterbelohnung nun auch frei zugeteilt wird. Dies wird nicht nur während der Kontingenzdegradation untersucht, sondern auch in einem weiteren Test unter Extinktions-Bedingungen, d.h. ohne Zuteilung einer Futterbelohnung. Der Extinktions-Test ist unerlässlich um zu beurteilen, ob das Tier die Kontingenzdegradation gelernt hat, da er ausschließlich das Gelernte abrufen und dem Tier

---

<sup>2</sup> Aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung wird der „Standard-Kontingenzdegradationstest“ im Folgenden verkürzt als „Kontingenzdegradationstest“ bezeichnet.



nicht ermöglicht während der Sitzung die Kontingenzen durch etwaige Belohnungsgaben erneut zu lernen. So betätigt ein zielgerichtet handelndes Tier auch beim Abruf des Gelernten im Extinktions-Test denjenigen Hebel weniger häufig, dessen Futterbelohnung zuvor frei zugeteilt wurde.

Ein automatisiert handelndes Tier hingegen reagiert nicht auf die veränderten Kontingenzbedingungen und betätigt beide Hebel gleich häufig, sowohl während der Kontingenzdegradation als auch beim Abruf im Extinktions-Test.

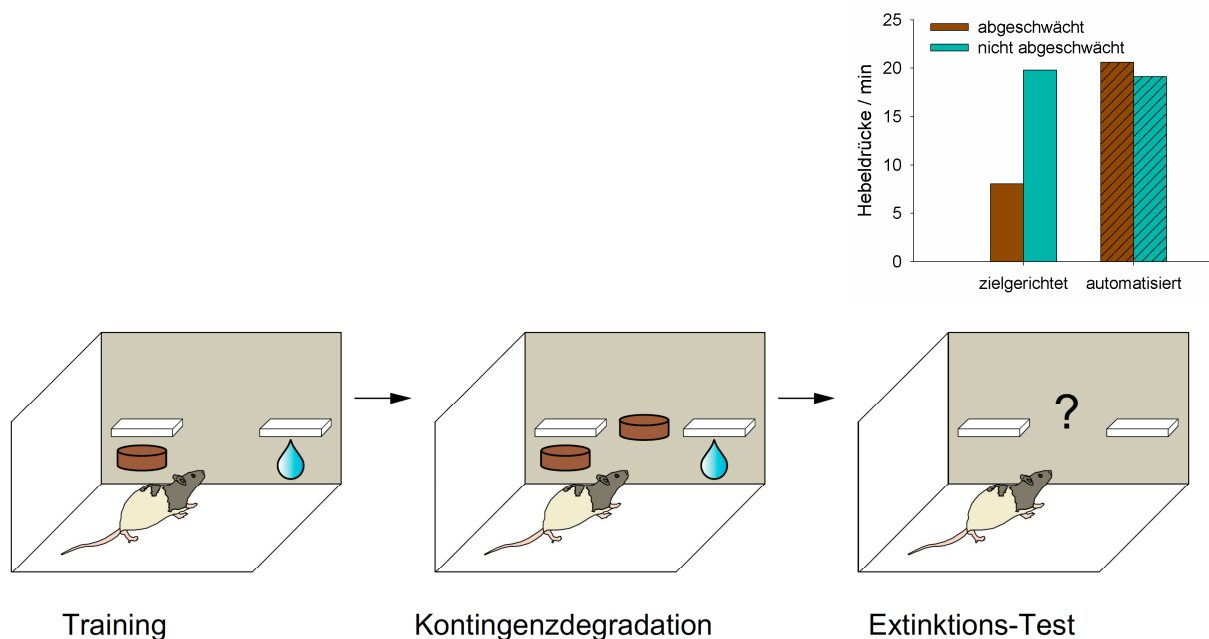


Abbildung 6-7: Ablauf des Kontingenzdegradationstests. Die Ratte erhält im Training bei Betätigung des linken Hebels Futterpellets und bei Betätigung des rechten Hebels Zuckerlösung. Sie lernt beide Hebel zu betätigen, um die jeweils zugeordnete Futterbelohnung zu erhalten. Während der Kontingenzdegradation wird zusätzlich auch ohne Hebelbetätigung eine Futterbelohnung, z.B. Pellets, „frei“ zugeteilt. Dabei verändert ein zielgerichtet handelndes Tier sein Verhalten und betätigt den linken Hebel weniger häufig, während ein automatisiert handelndes Tier weiterhin beide Hebel gleich häufig betätigt. Im abschließenden Extinktions-Test, d.h. beim Abruf des Gelernten, werden keine Belohnungen mehr erteilt und die Hebelaktivität des Tieres wird erneut gemessen. Das Balkendiagramm stellt dar, dass ein zielgerichtet handelndes Tier während des Extinktions-Tests den Hebel mit der abgeschwächten Kontingenzbeziehung deutlich weniger häufig betätigt als den mit der nicht abgeschwächten Kontingenzbeziehung. Ein automatisiert handelndes Tier betätigt beide Hebel gleich häufig.

*Unterlassungskontingenztest.* Der entscheidende Unterschied zwischen dem Kontingenzdegradationstest und dem Unterlassungskontingenztest besteht darin, dass beim Unterlassungskontingenztest nur eine Hebel-Belohnung Assoziation gelernt wird. Diese wird dann vermindert bzw. abgeschwächt, indem sie in eine „negative“ Kontingenz umgekehrt wird. D.h. betätigt die Ratte unter negativen Kontingenzbedingungen den Hebel, so erhält

sie erst nach einer Zeitsperre, z.B. 20 Sekunden, eine Belohnung. Jede weitere Hebelbetätigung setzt den Zähler wieder auf null und die 20 Sekunden Zeitsperre beginnt von neuem. Mit anderen Worten wirkt sich jede Handlung des Tieres nachteilig und somit negativ auf die Belohnungszuteilung aus.

Die Aufgabe umfasst ein Training, in welchem ein Tier in einer SKINNER-Box mit einem Hebel bei Betätigung des Hebels ein Futterpellet als Belohnung erhält (Abbildung 6-8). Während der anschließenden Kontingenzdegradations-Sitzung erhält es nur noch dann eine Futterbelohnung, wenn es den Hebel nicht betätigt. Diese Kontingenzänderung ist sehr markant, da die zuvor „positive“ Hebel-Belohnung Assoziation in eine „negative“ umgekehrt wird (Coutureau et al., 2012).

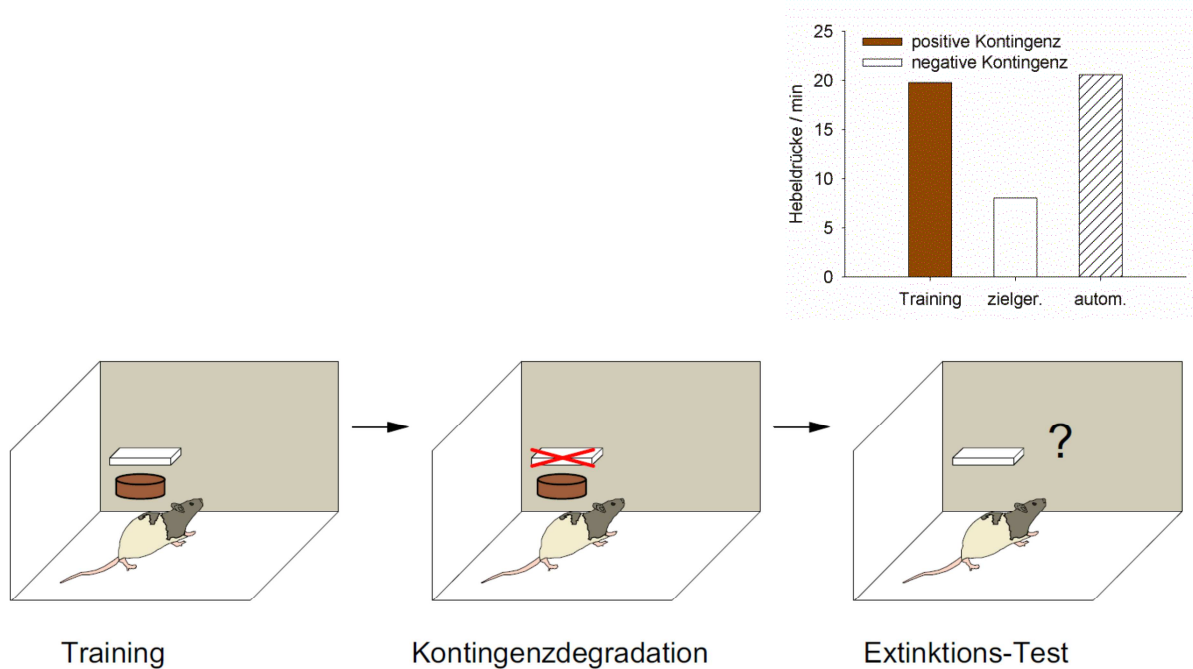


Abbildung 6-8: Ablauf des Unterlassungskontingenztests, einer vereinfachten Variante des Standard-Kontingenzdegradations-tests. Die Ratte erhält im Training bei Betätigung des Hebels Futterpellets. Sie lernt den Hebel zu betätigen, um Pellets zu erhalten. Während der Kontingenzdegradation werden erst dann Pellets zugeteilt, wenn der Hebel eine bestimmte Zeit lang nicht betätigt wurde. Eine zielgerichtet handelnde Ratte lernt die negative Kontingenz und betätigt den Hebel kaum noch, während eine automatisiert handelnde Ratte den Hebel weiterhin häufig betätigt. Im abschließenden Extinktions-Test, d.h. beim Abruf des Gelernten, werden keine Belohnungen mehr erteilt und es wird die Hebelaktivität des Tieres gemessen. Das Balkendiagramm zeigt, dass ein zielgerichtet handelndes Tier während des Extinktions-Tests seine Hebelaktivität im Vergleich zum Training deutlich reduziert, ein automatisiert handelndes Tier hingegen betätigt den Hebel gleich häufig wie im Training.

Ein zielgerichtet handelndes Tier betätigt während der Kontingenzdegradation den Hebel nur noch selten, weil es die Kontingenzänderung detektiert hat und von nun an „Nicht-

Hebeln“ mit der Belohnung assoziiert. Hingegen betätigt ein automatisiert handelndes Tier den Hebel weiterhin häufig, da es die Kontingenzänderung nicht erfasst. Der nachfolgende Extinktions-Test überprüft zusätzlich ohne Zuteilung von Futterbelohnung, ob ein Tier die negative Kontingenz gelernt hat und nun das Gelernte abrufen kann. Ein zielgerichtet handelndes Tier ruft die „negative“ Kontingenz ab und betätigt den Hebel nur selten. Dagegen ruft ein automatisiert handelndes Tier die anfangs gelernte „positive“ Kontingenz ab und betätigt den Hebel häufig.

Ein Vorteil des Unterlassungskontingenztests gegenüber dem Kontingenzdegradationstest besteht darin, dass eine Hebel-Belohnungs-Assoziation schneller gelernt wird als zwei und dass die negative Kontingenz markanter ist als die Kontingenzabschwächung durch frei zugewiesene Belohnung. Mit anderen Worten ist die Testdauer kürzer und die Aufgabe rascher erlernbar.

*Ergebnisdevaluationstest.* Mittels des Ergebnisdevaluationstests kann man überprüfen, ob ein Tier einen verminderten Wert des Handlungszieles erfasst. D.h. diese Testaufgabe ermittelt, ob nach oben genannter Definition einer zielgerichteten Handlung das zweite Kriterium erfüllt ist. Dafür lernt eine Ratte in einer SKINNER-BOX im Training, dass die Betätigung des einen Hebels mit Futterpellets belohnt wird und die Betätigung des anderen Hebels mit Zuckerlösung (Abbildung 6-9). Vor dem Extinktions-Test wird eine der beiden Futterbelohnungen (z.B. Pellets) frei dargeboten. Das Tier nimmt diese bis zur Sättigung auf, wodurch die Belohnung „devaluiert“ (entwertet) wird (Balleine und Dickinson, 1998; Killcross und Coutureau, 2003; Ostlund und Balleine, 2005; Lex und Hauber, 2010a). Ein zielgerichtet handelndes Tier passt sein Handeln den neuen Belohnungswerten an, indem es selektiv denjenigen Hebel deutlich weniger häufig betätigt, welcher mit der nun devaluierten Belohnung assoziiert ist. Es hat folglich gelernt, welcher Hebel welche Belohnung vorhersagt. Ein automatisiert handelndes Tier hingegen betätigt den mit der entwerteten Belohnung assoziierten Hebel weiterhin häufig, da es die Wertänderung nicht erfasst hat. Am Folgetag findet ein zweiter Extinktions-Test statt, vor welchem die entsprechend andere Belohnung (z.B. Zuckerwasser) frei dargeboten wird. Auf diese Weise werden für jedes Tier beide Belohnungen in Folge entwertet und mögliche individuelle Belohnungspräferenzen gleichen sich damit aus. Denn es ist durchaus möglich, dass einer Ratte beispielsweise Pellets besser schmecken als Zuckerwasser und sie daher den Hebel für Pellets grundsätzlich häufiger

betätigt als den Hebel für Zuckerwasser. Bei dieser Ratte würde die Devaluation von Zuckerwasser einen viel größeren Effekt erzielen als die Devaluation von Pellets, wodurch das Testergebnis bei Devaluation von nur einer Belohnung verfälscht würde.

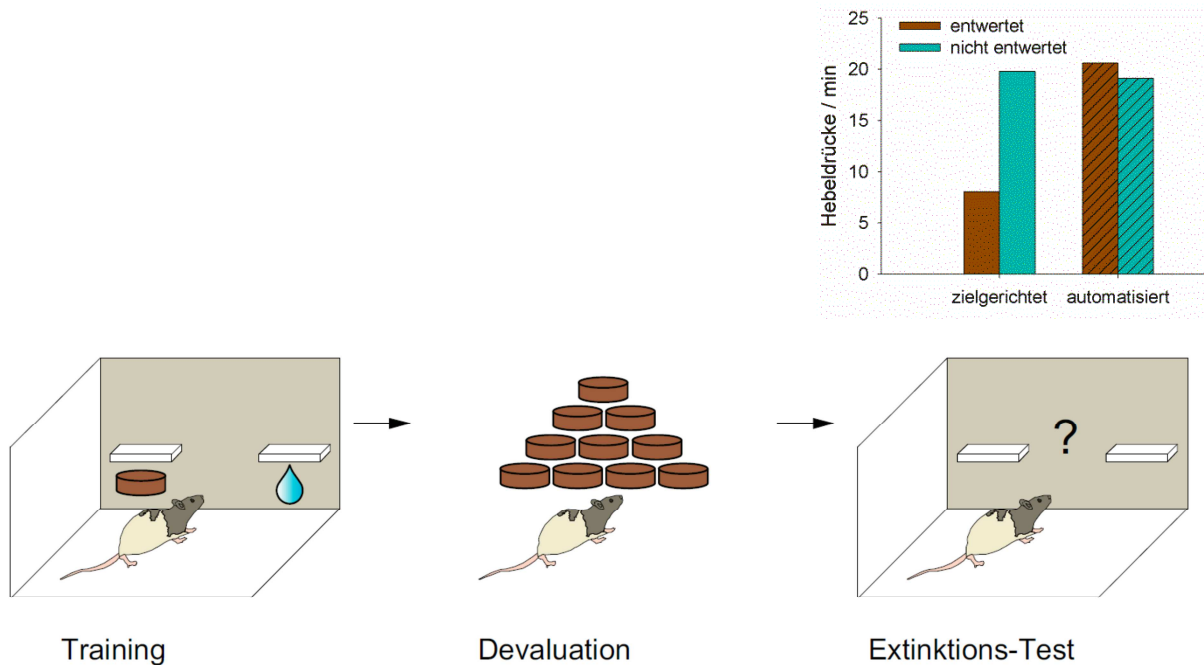


Abbildung 6-9: Ablauf des Ergebnisdevaluationstests. Die Ratte erhält im Training bei Betätigung des linken Hebels Futterpellets und bei Betätigung des rechten Hebels Zuckerlösung. Sie lernt beide Hebel zu betätigen um die jeweils zugeordnete Futterbelohnung zu erhalten. Während der Devaluation werden die Futterpellets entwertet, indem sie frei verfügbar sind und sich die Ratte an ihnen satt frisst. Im abschließenden Extinktions-Test, dem Abruf des Gelernten, werden keine Belohnungen mehr erteilt und die Hebelaktivität des Tieres wird gemessen. Das Balkendiagramm zeigt, dass ein zielgerichtet handelndes Tier während des Extinktions-Tests den Hebel, der die entwertete Belohnung erteilt, deutlich weniger häufig betätigt als den, der die nicht entwertete Belohnung erteilt. Dagegen betätigt ein automatisiert handelndes Tier beide Hebel gleich häufig.

Wo und wie instrumentelle Handlungen im Gehirn gespeichert und abgerufen werden, wird im nachfolgenden Kapitel aufgezeigt.

### 6.3 AUFBAU DES GEHIRNS: ÜBERSICHT

Als Gehirn bezeichnet man den Teil des Nervensystems, der die nervösen Aktivitäten eines Organismus koordiniert. Beim Mensch bildet das Gehirn zusammen mit dem Rückenmark das Zentralnervensystem. Es fungiert als übergeordnetes Steuerzentrum, indem es über Afferenzen Informationen aus der Umwelt aufnimmt, koordiniert, verrechnet und über Efferenzen den Erfolgsorganen zuleitet (Hanser et al., 2000).

Eine Möglichkeit das Gehirn in anatomische Bereiche einzuteilen ist anhand makroskopisch erkennbarer Bereiche. Dabei lassen sich drei Bereiche voneinander abgrenzen: Großhirn (Cerebrum), Kleinhirn (Cerebellum) und Hirnstamm (Truncus cerebri) (Hanser et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit das Gehirn einzuteilen ist es in verschiedenen Stadien während seiner embryonalen Entwicklung zu betrachten und zu gliedern. Die dabei erstellte Einteilung ist auch im erwachsenen Gehirn noch nachvollziehbar. Beispielsweise sind bereits im vier Wochen alten Embryo die drei Hauptbereiche Vorderhirn, Mittelhirn und Rautenhirn erkennbar (Tabelle 6-1). Sie differenzieren nach weiteren vier Wochen in fünf Teilbereiche: Großhirn, Zwischenhirn, Mittelhirn, Hinterhirn und Nachhirn. Diese Gliederung des Gehirns in fünf Teilbereiche ist in vielen Lehrbüchern gängig (Meyer und Quenzer, 2005; Carlson, 2007).

Tabelle 6-1: Anatomische Einteilung des erwachsenen menschlichen Gehirns. Tabelle aus Carlson, 2007.

Hauptbereich	Teilbereich	Hauptstruktur
Vorderhirn (Prosencephalon)	Großhirn/Endhirn (Telencephalon)	Großhirnrinde (Neocortex)
		Basalganlien
		Limbisches System
	Zwischenhirn (Diencephalon)	Thalamus
		Hypothalamus
Mittelhirn (Mesencephalon)	Mittelhirn (Mesencephalon)	Mittelhirndach (Tectum) Mittelhirnhaube (Tegmentum)
Rautenhirn (Rhombencephalon)	Hinterhirn (Metencephalon)	Kleinhirn (Cerebellum)
		Brücke (Pons)
	Nachhirn (Myelencephalon)	Verlängertes Rückenmark (Medulla oblongata)

Die wichtigsten Strukturen der drei Hauptbereiche des Gehirns und deren Funktion werden im Folgenden kurz vorgestellt.

*Vorderhirn.* Aus dem Großhirn entwickeln sich die Großhirnrinde, die Basalganlien und das limbische System. Das Zwischenhirn differenziert weiter in Thalamus und Hypothalamus. Das Vorderhirn ist der Ort der Sinneswahrnehmung, des Bewusstseins, der geistigen Wahrnehmung und der willentlichen Aktivität. Dies basiert auf den umfangreichen wechselseitigen Verbindungen mit den sensorischen und motorischen Neuronen des

Rückenmarks und Hirnstamms, welcher verlängertes Rückenmark, Pons und Mittelhirn umfasst (Bear et al., 2007).

*Mittelhirn.* Anders als das Vorderhirn differenziert das Mittelhirn relativ wenig. Der dorsale Bereich entwickelt sich in das Mittelhirndach und der ventrale Bereich in die Mittelhirnhaube. Das Mittelhirn leitet einerseits Informationen vom Rückenmark zum Vorderhirn und in umgekehrter Richtung weiter und andererseits vermitteln Neurone des Mittelhirns Sensorik, Willkürbewegungen und weitere Funktionen (Bear et al., 2007).

*Rautenhirn.* Das Hinterhirn differenziert in Kleinhirn und Brücke. Aus dem Nachhirn geht das verlängerte Rückenmark hervor. Das Rautenhirn ist wie das Mittelhirn ein wichtiger Transportweg für Informationen, die vom Vorderhirn zum Rückenmark und in umgekehrter Richtung verlaufen. Außerdem sind Neurone des Rautenhirns bei der Weiterverarbeitung von sensorischen Informationen, der Kontrolle von Willkürbewegungen und der vegetativen Regulierung beteiligt (Bear et al., 2007).

Die Basalganglien und das limbische System sind Netzwerke, die assoziative Lernvorgänge und damit instrumentelle Handlungen vermitteln. Daher werden sie im Folgenden detailliert erläutert.

### 6.3.1 LIMBISCHES SYSTEM

Der französische Neurologe Paul Broca (1878) bezeichnete eine Gruppe von Cortexarealen, welche einen saumartigen (lat. Saum = *limbus*) Ring um den Hirnstamm bilden, als *Lobus limbicus*. Einige Jahre später führte der US-amerikanische Neuroanatom James Papez (1937) ein, dass das neurale Substrat für Motivation und Emotion in einem Schaltkreis zwischen limbischem Cortex und Strukturen, die sich im Kern des Vorderhirns befinden, liegt. Der Physiologe Paul MacLean (1949) erweiterte dieses Netzwerk um einige Strukturen und führte den Begriff *limbisches System* ein. Das limbische System soll demnach an der Verarbeitung von Emotionen, am Lernen und an der Gedächtnisbildung beteiligt sein (Meyer und Quenzer, 2005; Bear et al., 2007; Carlson, 2007). Die wichtigsten Strukturen des limbischen Systems sind: *Amygdala*, *Hippocampus*, *limbischer Cortex* (vor allem der cinguläre Cortex), *Mammiliarkörper* (ein Teil des Hypothalamus) und *Fornix* (ein Axonbündel, das den Hippocampus mit anderen Hirnstrukturen verknüpft) (Abbildung 6-10).

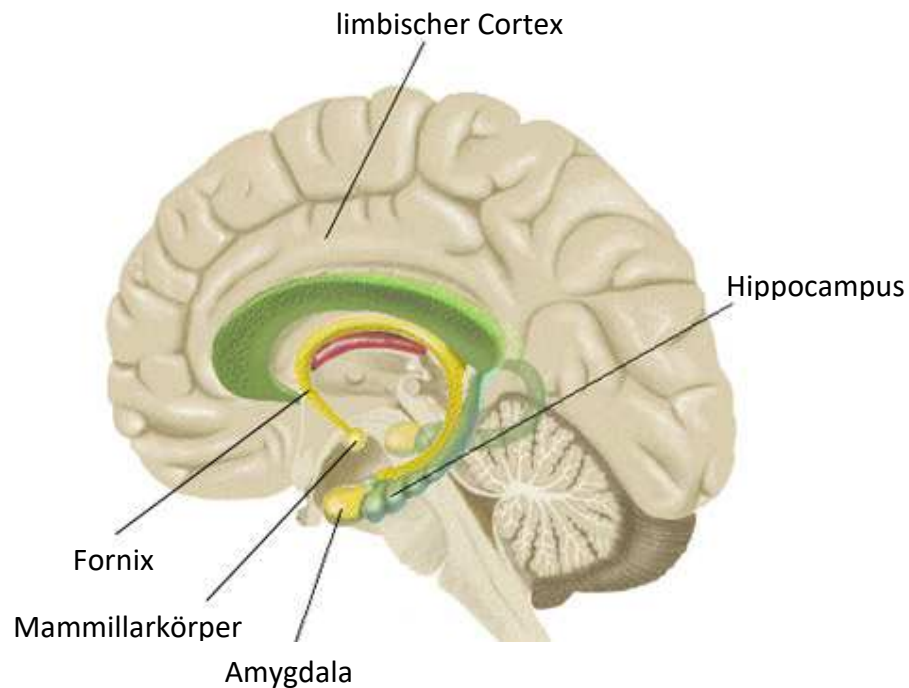


Abbildung 6-10: Die Hauptstrukturen des limbischen Systems im Gehirn des Menschen: Amygdala, Hippocampus, limbischer Cortex, Mammillarkörper und Fornix. Abbildung aus Carlson, 2007.

Die Amygdala spielt bei der Verarbeitung von Emotionen eine zentrale Rolle, z.B. bei Aggression, Furcht oder dem Erkennen von emotionalen Signalen anderer Menschen (Carlson, 2007). Fehlfunktionen der Amygdala treten bei verschiedenen Krankheiten wie Depressionen, Angststörungen, Alkohol- und Drogensucht auf (Meyer und Quenzer, 2005). Außerdem ist die Amygdala an der Aktivierung der Stressreaktion beteiligt, wodurch sie letztlich physische Funktionen wie z.B. die Blutdruckregulation beeinflusst (Bear et al., 2007). Die Stressreaktion ist für das Verständnis der vorliegenden Arbeit von großer Wichtigkeit und wird in Kapitel 6.4.2 ausführlich behandelt.

Der Hippocampus beinhaltet das Langzeitgedächtnis und das räumliche Gedächtnis. Letzteres wird mithilfe der sog. „Ortszellen“ (engl. *place cells*) des Hippocampus gebildet (Yin und Knowlton, 2006a). Die Ortszellen bilden quasi eine neuronale Landkarte der räumlichen Umgebung im Hippocampus ab und speichern die aktuelle Position eines Menschen oder Tieres im Raum. Untersucht man beispielsweise eine Ratte im Käfig, so ist eine bestimmte Gruppe von Ortszellen genau dann aktiv, wenn sie sich beim Futterspender aufhält und eine andere Gruppe von Ortszellen ist dann aktiv wenn sie in der Ecke sitzt. Die neuronale Karte erleichtert dem Tier die Orientierung im Raum und lässt es einen bekannten Ort wieder

finden (O'Keefe und Dostrovsky, 1971). Den Ortszellen vorgeschaltet sind die „Gitterzellen“ des entorhinal Cortex. Diese Zellen bilden die räumliche Umgebung als Gitter im Gehirn ab. Sie reagieren auf mehrere Positionen eines Tieres im Raum. Ihre Funktionen sind noch nicht vollständig erfasst (Hafting et al., 2005). Die Gitterzellen erhalten Informationen von den „Kopfrichtungszellen“ des entorhinal Cortex, welche wie eine Art Kompass die Ausrichtung des Kopfes im Raum registrieren (McNaughton et al., 2006).

Bei der Alzheimer-Krankheit degenerieren Zellen im Hippocampus und Cortex überaus stark. Dadurch sind bei Alzheimer-Patienten räumliche Erinnerungen und Langzeiterinnerungen zunehmend beeinträchtigt und es treten Orientierungsschwierigkeiten auf (Meyer und Quenzer, 2005).

Nicht zuletzt beeinflusst das limbische System, vor allem Hippocampus und Amygdala, auch die instrumentelle Konditionierung durch seine Eigenschaft als emotionales und räumliches Gedächtnis (vgl. Kapitel 6.3.4).

### 6.3.2 BASALGANGLIEN

Die *Basalganglien* spielen eine wichtige Rolle für die Bewegungskontrolle und für kognitive Leistungen, wie das assoziative Lernen. Sie haben keine direkte Verbindung mit dem Rückenmark und erhalten auch keine direkt von Sinnesorganen kommende Informationen. Vielmehr kommen ihre Afferenzen aus verschiedenen Gebieten des Cortex. Ihre Efferenzen senden sie über den Thalamus direkt an den präfrontalen und primär motorischen Cortex (Kandel et al., 1996). Ist die Funktion der Basalganglien beeinträchtigt, so treten Krankheiten mit motorischen Störungen auf, z.B. Morbus Parkinson. Hierbei degenerieren dopaminerge, d.h. Dopamin-produzierende, Neurone der Substantia nigra, die Axone zum Nucleus caudatus und Putamen sendet. Es treten Symptome auf wie Tremor, Rigor, Gleichgewichts-Probleme und Schwierigkeiten bei der Einleitung von Bewegungen (Kandel et al., 1996; Bear et al., 2007).

Die Basalganglien bestehen aus einer Sammlung von Kernen, die im Zentrum der Großhirnhemisphären liegen und stark untereinander vernetzt sind. Die Hauptkerne sind: *Nucleus caudatus*, *Putamen* und *Globus pallidus* (Abbildung 6-11). Zwei Strukturen des Mittelhirns, die *Substantia nigra (SN)* und der *Nucleus subthalamicus (STN)*, weisen starke Verbindungen zu Nucleus caudatus und Putamen auf und können daher funktionell zu den Basalganglien gezählt werden (Thompson, 2001). Der Nucleus caudatus und das Putamen



bilden eine funktionelle und anatomische Einheit und werden gemeinsam als dorsales Striatum (DS) bezeichnet. Der Globus Pallidus wird weiter unterteilt in ein internes (GPi) und ein externes Segment (GPe). Die SN besteht aus einer ventralen blassen Zone, der *Pars reticulata* (SNr), und einer dorsalen pigmentierten Zone, der *Pars compacta* (SNc), die im Horizontalschnitt des Gehirns schwarz erscheint durch Melanin, welches bei der Synthese des Neurotransmitters Dopamin als Nebenprodukt gebildet wird. GPi und SNr sind in Verschaltung und Funktion auffallend ähnlich und können daher als eine einzige Struktur betrachtet werden, welche durch eine innere Kapsel untergliedert wird, ganz ähnlich wie der Nucleus caudatus und das Putamen (Kandel et al., 1996).

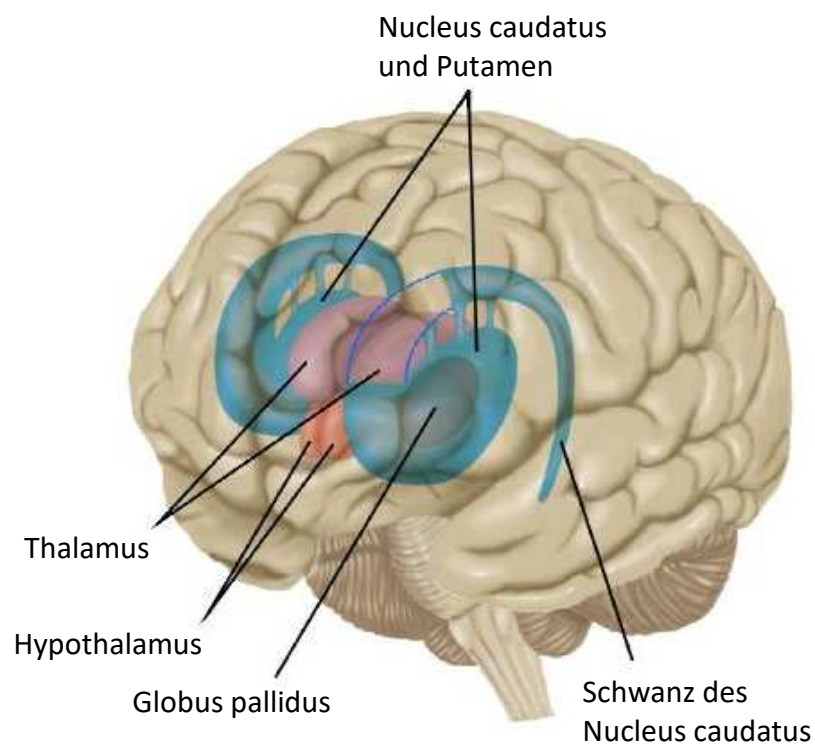


Abbildung 6-11: Lage der Basalganglien (Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus) sowie Thalamus und Hypothalamus im halbtransparent dargestellten Gehirn des Menschen. Abbildung aus Carlson, 2007.

Die vorgestellten Strukturen der Basalganglien und des limbischen Systems im Gehirn des Menschen sind homolog auch bei der Ratte zu finden. Die anatomischen Bezeichnungen weichen teilweise etwas ab; so ist der „Nucleus caudatus“, als „dorsomediales Striatum“ (DMS) der Ratte bekannt und das „Putamen“ entspricht dem „dorsolateren Striatum“ (DLS) der Ratte.

Die Basalganglien nehmen aufgrund ihrer anatomischen Verschaltung untereinander und zu anderen Strukturen eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Willkürmotorik und der Verarbeitung kognitiver Prozesse ein (Abbildung 6-12). Der hauptsächliche Informationsfluss verläuft aus dem Cortex in das Striatum und über den Thalamus zurück in den Cortex, sodass eine cortico-striatale-thalamisch-corticale Funktionsschleife gebildet wird (Joel und Weiner, 1994; Yin et al., 2006b). Die Signalweiterleitung dieser Funktionsschleife wird im Folgenden detailliert dargestellt.

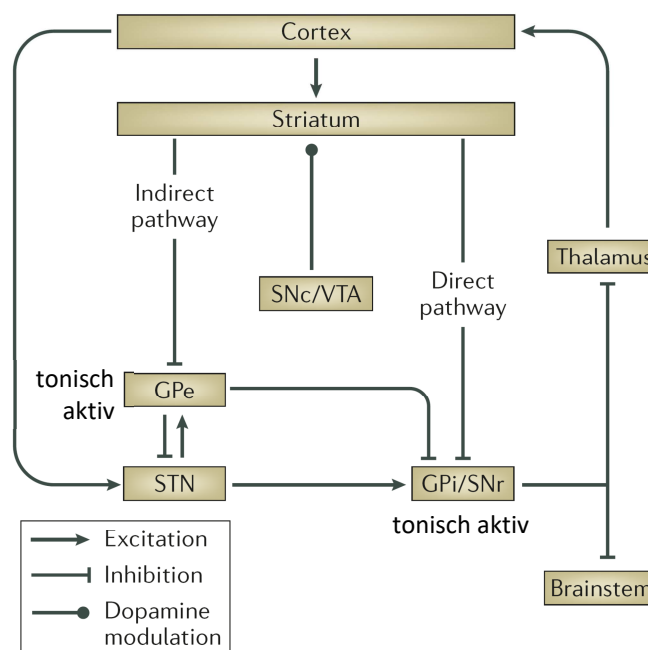


Abbildung 6-12: Schematisch dargestellt sind die Verschaltungen der Basalganglien am Beispiel des Primatenhirns. Das Striatum nimmt als Eingangsstruktur Informationen aus dem Cortex und Thalamus auf und leitet sie über den direkten oder indirekten Signalweg weiter an die Ausgangsstrukturen GPi und SNr. Letztere leiten die Informationen weiter über den Thalamus an Zielnetzwerke im Cortex oder direkt an den Hirnstamm. Die Aktivierung des direkten Signalwegs führt zur Aktivierung der corticalen Zielstrukturen (z.B. dem motorischen Cortex) und des Hirnstamms, wohingegen die Aktivierung des indirekten Signalwegs zur Hemmung der corticalen Zielstrukturen und des Hirnstamms führt. Abkürzungen: GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, SNc: Substantia nigra pars compacta, SNr: Substantia nigra pars reticulata, STN: subthalamischer Nucleus, VTA: ventrales tegmentales Areal. Abbildung aus Yin und Knowlton, 2006a.

Das Striatum ist die Eingangsstruktur der Basalganglien. Es erhält Projektionen aus nahezu allen Arealen des Cortex und auch vom Thalamus (Smith et al., 1998). Anders als der Cortex, welcher exzitatorische (erregende) glutamaterge Projektionsneurone hat, bestehen die Basalganglien aus inhibitorischen (hemmenden) GABA-ergen ( $\gamma$ -Aminobuttersäure

produzierenden) Projektionsneuronen. Werden Neurone des Striatums durch Signale aus dem Cortex oder in geringerem Ausmaß vom Thalamus aktiviert, so erhöht sich die striatale Inhibition auf den GPi und die SNr, die Hauptausgangsstrukturen der Basalganglien. Dadurch wird deren inhibitorischer tonischer Ausgang auf den Thalamus reduziert und somit beispielsweise das motorische Zielnetzwerk im Cortex aktiviert. Dieser disinhibitorische Weg ist der Hauptausgang der Basalganglien, der sog. „direkte Signalweg“<sup>3</sup> (Yin und Knowlton, 2006a).

Findet dagegen die Informationsweiterleitung über den „indirekten Signalweg“<sup>4</sup> statt, so wird durch die Hemmung des GPe der subthalamische Nucleus (STN) disinhibiert. Der STN ist die einzige Struktur der Basalganglien, die exzitatorisch auf nachfolgende Areale wirkt. Durch die Disinhibition des STN wird dieser aktiviert, was zu einer erhöhten Aktivität von GPi und SNr führt, welche wiederum als Ausgangsstruktur nachgeschaltete thalamocorticale und Hirnstamm-Netzwerke inhibieren. Damit führt die Aktivierung des indirekten Signalweges letztlich zur Hemmung von z.B. der motorischen Aktivität (Yin und Knowlton, 2006a).

Das Striatum wird nicht nur über glutamaterge Projektionen aus dem Cortex aktiviert, sondern auch über dopaminerge Afferenzen aus dem ventralen tegmentalen Areal (VTA) und der SNc. Im Striatum gibt es zwei Arten von Dopamin-Rezeptoren: die D<sub>1</sub>-Rezeptoren, welche exzitatorisch wirken und auf Neuronen des direkten Signalweges vorkommen, und die D<sub>2</sub>-Rezeptoren, welche eine inhibitorische Wirkung haben und auf Neuronen des indirekten Signalweges vorkommen. Werden über dopaminerge Neurone die D<sub>1</sub>-Rezeptoren aktiviert, so aktivieren diese wiederum den direkten Weg, was letztlich zu einer erhöhten Aktivität der Zielstrukturen führt. Hingegen bewirkt die Aktivierung der D<sub>2</sub>-Rezeptoren eine Inhibition des indirekten Weges, was letzten Endes ebenfalls zur Aktivitätserhöhung der Zielstrukturen führt. Dadurch dass die beiden Signalwege über zwei unterschiedliche Dopamin-Rezeptoren moduliert werden, bewirken die dopaminergen Afferenzen aus der SNc insgesamt eine erhöhte Aktivierung der Zielnetzwerke im Hirnstamm und Cortex, was z.B. eine gesteigerte motorische Aktivität zur Folge hat (Surmeier et al., 2007; Reinius et al.,

---

<sup>3</sup> Der „direkte Signalweg“ wird auch als „striatonigraler Signalweg“ bezeichnet (Gerfen, 1992; Shiflett und Balleine, 2011b).

<sup>4</sup> Der „indirekte Signalweg“ wird auch als „striatopallidaler Signalweg“ bezeichnet (Gerfen, 1992; Shiflett und Balleine, 2011b).

2015). Ist dieser dopaminerge Eingang der Basalganglien beeinträchtigt, wie beispielsweise bei der Parkinson Krankheit, so erhöht sich die neurale Aktivität der Ausgangsstrukturen, was letztlich eine stärkere Hemmung des Thalamus und somit der motorischen Aktivität bewirkt. Es kommt zu Störungen bei der Ausführung von Bewegungen, z.B. Bewegungsverlangsamung oder Schwierigkeiten eine Bewegung zu beginnen (Kandel et al., 1996; Bear et al., 2007).

Obwohl der direkte und der indirekte Signalweg die Hauptübertragungswege der Basalganglien sind, sind sie nicht die einzigen Verbindungen. Es gibt beispielsweise auch Projektionen des direkten Signalwegs zum GPe, welcher wiederum nicht nur zum STN, sondern auch zu GPi, SNc und SNr projiziert (Smith et al., 1998; Shiflett und Balleine, 2011b). Dadurch dass nahezu der gesamte Cortex auf das Striatum (Nucleus caudatus und Putamen) projiziert, geht eine gewaltige Menge an Informationen sensorischer und motorischer Art sowie Informationen über interne Zustände im Striatum ein. Aus dieser Flut an Informationen, welche sich jeden Moment ändern können, wählt das Striatum spezifisch Informationen aus und verstärkt sie (Yin und Knowlton, 2006a). Unter anderem aufgrund dieser Eigenschaft als Signalfilter und -verstärker nimmt das Striatum nicht nur eine wichtige Funktion an der Steuerung der Willkürmotorik, sondern auch bei der instrumentellen Konditionierung ein (vgl. Kapitel 6.3.4).

### 6.3.3 STRIATUM: ANATOMISCHE UND FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN

Das Striatum ist die größte Struktur der Basalganglien und als Eingangsstruktur der cortico-striatal-thalamischen Schaltkreise (siehe Kapitel 6.3.4) liegt es seit ungefähr 30 Jahren im Fokus der experimentellen neurobiologischen Forschung (Shiflett und Balleine, 2011b).

*Anatomische Eigenschaften.* Das Striatum erscheint im histologischen Bild als anatomisch einheitliche Struktur und ist anhand des zellulären Erscheinungsbildes nicht in Teilstrukturen untergliederbar, mit der Ausnahme beim Menschen, wo Nucleus caudatus und Putamen durch eine interne Kapsel getrennt sind (Kandel et al., 1996). Frühe anatomische Studien an Primaten und Ratten beschrieben eine Unterteilung des Striatums anhand der Afferenzen und Efferenzen zum Cortex in einen dorsolateralen (DLS), einen dorsomedialen (DMS) und einen ventralen (Nucleus accumbens, NAc) Bereich. Der NAc lässt sich weiter unterteilen in eine Kernregion (*core*, NAcC) und eine Schalenregion (*shell*, NAcS) (Abbildung 6-13). Die

Studien zeigten weiterhin, dass das DLS (d.h. Putamen) vor allem mit dem somatosensorischen und motorischen Cortex verknüpft ist, während das DMS (d.h. Nucleus caudatus) mit dem frontalen und parietalen Assoziationscortex verknüpft ist. Dagegen ist das ventrale Striatum mit limbischen Strukturen, d.h. mit Amygdala, Hippocampus, orbitofrontalem und cingulärem Cortex, verknüpft (Alexander et al., 1986; Lynd-Balta und Haber, 1994a, 1994b; Zahm et al., 1996).

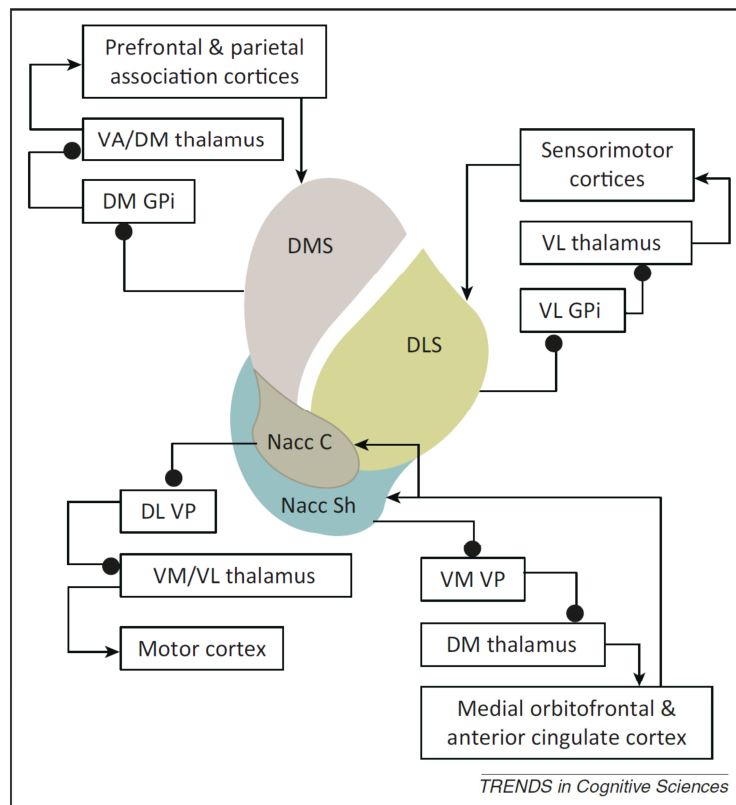


Abbildung 6-13: Schematisch dargestellt ist die anatomische Unterteilung des Striatums der Ratte anhand der Afferenzen und Efferenzen zum Cortex. Eingezeichnet sind die Verbindungen der Teilstrukturen des Striatums zu Cortex, Thalamus und Globus Pallidus. Verschiedene Regionen des Cortex projizieren zu verschiedenen Teilstrukturen des Striatums, die dann über den Globus pallidus internus und den Thalamus wieder zum Cortex zurück projizieren (direkter Signalweg der Basalganglien). Nicht dargestellt sind Verbindungen des indirekten Signalwegs sowie dopaminerge Projektionen aus dem Mittelhirn (vgl. Abbildung 6-12). Punkte stellen inhibitorische Verbindungen dar, Pfeile zeigen exzitatorische Verbindungen. Abkürzungen: DMS: dorsomediales Striatum, DLS: dorsolaterales Striatum, GPi: Globus pallidus internus, VP: ventrales Pallidum, VA: ventral-anterior, DM: dorsomedial, VL: ventrolateral, VM: ventromedial, NAcc C: Kernregion des Nucleus accumbens, NAcc Sh: Schalenregion des Nucleus accumbens. Abbildung aus Liljeholm und O'Doherty, 2012.

**Funktionelle Eigenschaften.** Studien aus jüngster Zeit, welche instrumentelle Testaufgaben verwendeten, zeigten dass das Striatum viele verschiedenen Funktionen beim Erlernen und der Ausführung einer Handlung ausübt. Einer der wichtigsten Aspekte, der mehrfach gezeigt wurde ist, dass eine instrumentelle Handlung, z.B. die Betätigung eines Hebels für

Futterbelohnungen in unterschiedlichen Phasen des Lernens durch verschiedene Lern- und Motivationsprozesse gesteuert wird (Abbildung 6-14) (Yin et al., 2008; Shiflett und Balleine, 2011b). Wird beispielsweise eine Handlung neu gelernt, so wird sie zunächst zielgerichtet ausgeführt und die Aktivität im DMS ist hoch. Wurde diese Handlung häufig wiederholt, so wird sie zunehmend automatisiert ausgeführt bei höher werdender Aktivität des DLS (Yin et al., 2005a; Yin et al., 2006b). Nimmt man die verschiedenen Funktionen des Striatums als Grundlage für dessen Untergliederung in Teilbereiche, so ergibt sich das in Abbildung 6-14 dargestellte Bild.

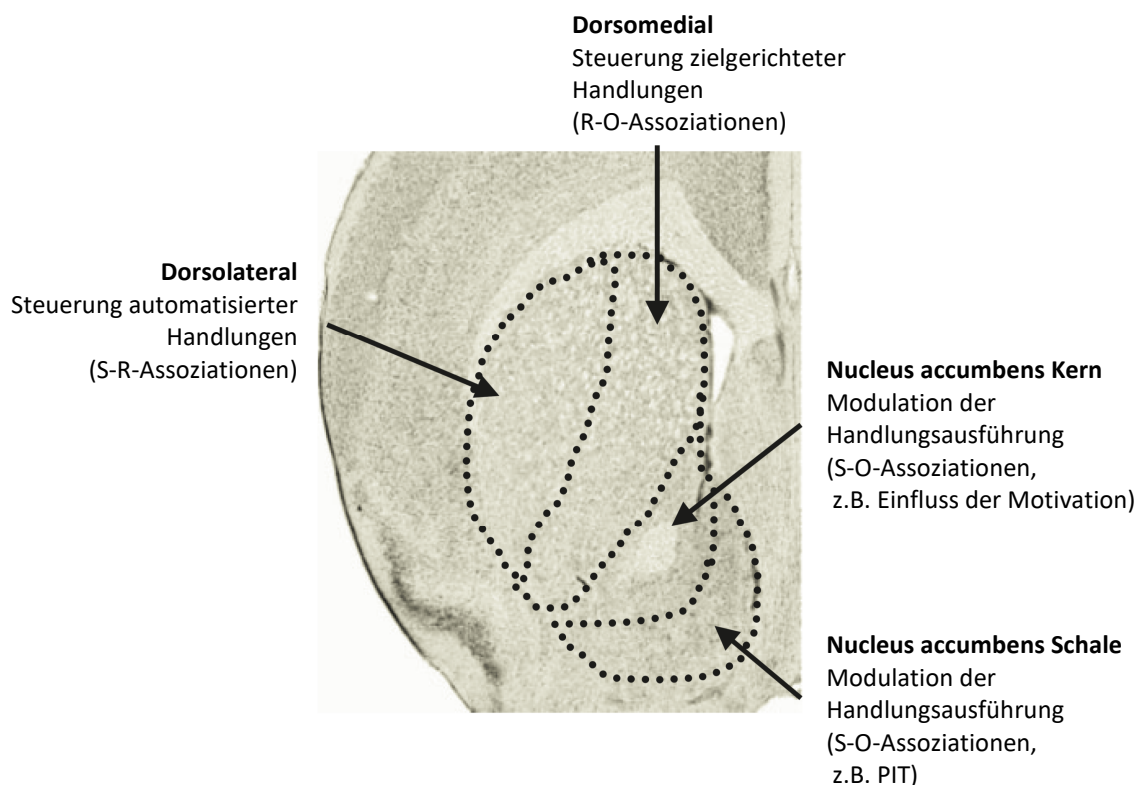


Abbildung 6-14: Dargestellt ist ein mikroskopisches Bild einer Gehirnhälfte der Ratte im Transversalschnitt, welches das Striatums zeigt. Die eingezeichnete Unterteilung des Striatums ist anatomisch nicht sichtbar, sondern wurde anhand der dort vermittelten Hauptfunktionen gemacht. Messungen mittels instrumenteller Testaufgaben ergaben, dass das dorsale Striatum das Lernen einer Handlung vermittelt und das ventrale Striatum (Nucleus accumbens) die Handlungsausführung beeinflusst, indem es Information über die Belohnung übermittelt. Abbildung modifiziert nach Yin et al., 2008.

Schließlich ergibt die Unterteilung des Striatums sowohl anhand der anatomischen als auch der funktionellen Eigenschaften ein ähnliches strukturelles Bild. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die spezifischen Verschaltungen der Teilstrukturen mit anderen Gehirnarealen einzigartige funktionelle Aspekte einer instrumentellen Handlung vermitteln.

Wie die Teilstrukturen des Striatums mit anderen Bereichen des Gehirns interagieren, um instrumentelle Handlungen zu vermitteln, wird im folgenden Kapitel dargestellt.

#### 6.3.4 STEUERUNG INSTRUMENTELLER HANDLUNGEN: CORTICO-STRIATAL-THALAMISCHE SCHALTKREISE

Zielgerichtete und automatisierte Handlungen werden durch separate Lern- und Gedächtnissysteme des Gehirns vermittelt. Das DMS und DLS spielen dabei eine Schlüsselrolle. Beide Teilstrukturen gehören zwei parallel angeordneten Schaltkreisen an, die zwischen Cortex, Striatum und Thalamus gebildet werden: dem *assoziativen* und dem *sensomotorischen* cortico-striatal-thalamischen Schaltkreis. Ein dritter Schaltkreis, der *limbische* cortico-striatal-thalamische Schaltkreis, übt indirekten Einfluss auf zielgerichtete und automatisierte Handlungen aus, indem er motivationsgesteuerte Signale übermittelt (Balleine und O'Doherty, 2010; Liljeholm und O'Doherty, 2012).

Die vorgestellten Bezeichnungen der Schaltkreise heben deren strukturelle Merkmale hervor. In der vorliegenden Arbeit soll jedoch ihre Funktion im Vordergrund stehen, weshalb folgende Bezeichnungen gewählt werden:

assoziativer cortico-striatal-thalamischer Schaltkreis	→ zielgerichtetes System
sensomotorischer cortico-striatal-thalamischer Schaltkreis	→ Gewohnheitssystem
limbischer cortico-striatal-thalamischer Schaltkreis	→ Motivationssystem

*Zielgerichtetes System.* Das Erlernen und die Ausführung zielgerichteter Handlungen werden u.a. durch das *deklarative* (explizite) Lern- und Gedächtnissystem vermittelt, d.h. das Wissen ist explizit verfügbar als bewusste Erinnerung von Fakten, Erlebnissen oder spezifischen Stimuli (vgl. Kapitel 6.1) (Carlson, 2007). Bei der Ratte werden zielgerichtete Handlungen insbesondere durch zwei Strukturen des zielgerichteten Systems gesteuert: dem prälimbischen Teil des medialen Präfrontalcortex (PL) und dem DMS (Abbildung 6-15). Aus Läsions-Studien an Ratten geht hervor, dass der PL bei der Akquisition, d.h. dem Erlernen, zielgerichteter Handlungen aktiv ist, jedoch nicht für den Abruf zielgerichteter Handlungen erforderlich ist (Hart et al., 2014).

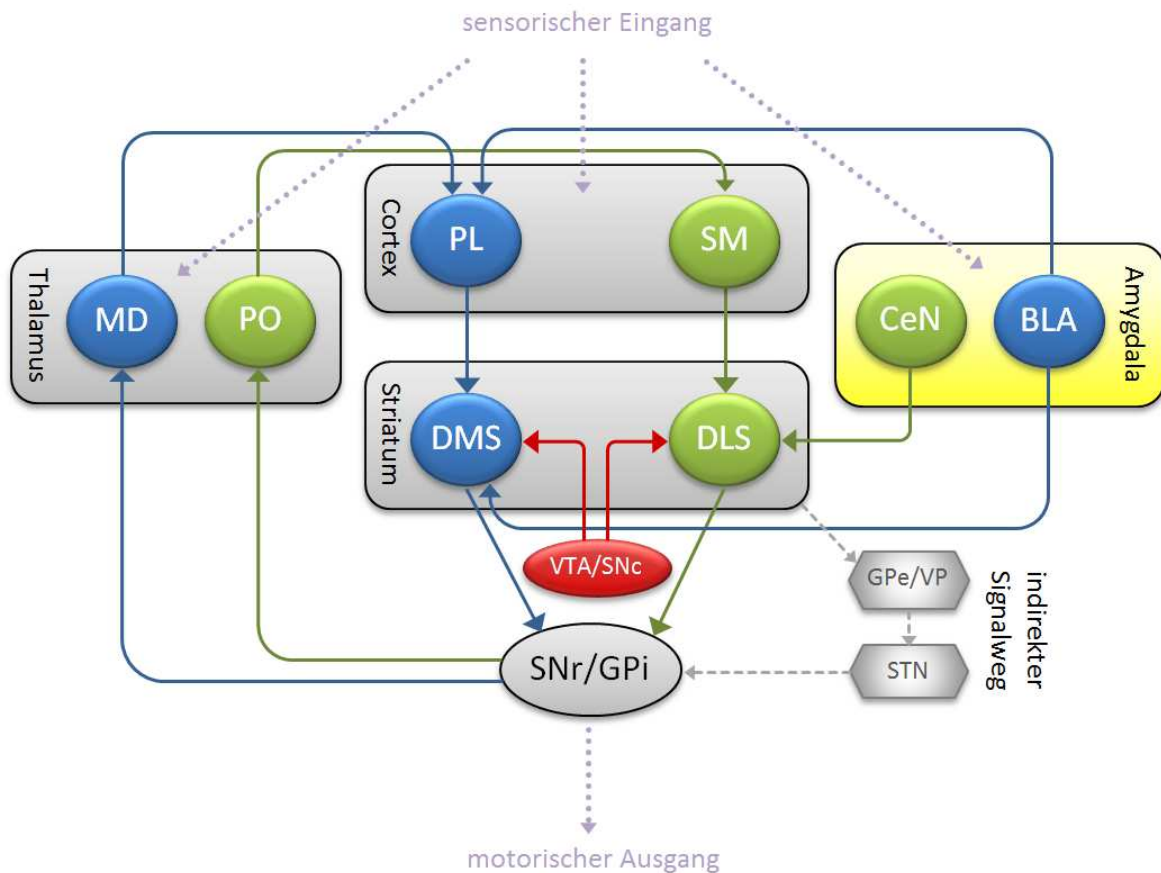


Abbildung 6-15: Schematisch vereinfacht dargestellt sind die cortico-striatal-thalamischen Schaltkreise, welche zielgerichtete Handlungen (blau) bzw. automatisierte Handlungen (grün) vermitteln. Im Mittelpunkt des zielgerichteten Systems (blau) steht das dorsomediale Striatum (DMS). Das DMS erhält Eingänge aus dem prälimbischen Teil des medialen Präfrontalcortex (PL) und projiziert zurück zum Cortex über die Substantia nigra pars reticulata/ Globus pallidus internus (SNr/GPi) und den mediodorsalen Thalamus (MD). Außerdem erhält das DMS dopaminerge Eingänge (rot) aus dem Mittelhirn von ventralem tegmentalem Areal (VTA) und Substantia nigra pars compacta (SNc). Im parallel angeordneten Gewohnheitssystem (grün) steht das dorsolaterale Striatum (DLS) im Zentrum. In diesem Schaltkreis werden sensomotorischer Cortex (SM), dorsolaterales Striatum (DLS), SNr/GPi und posteriorer Thalamus (PO) miteinander vernetzt. Zudem projizieren dopaminerge Neurone (rot) aus VTA und SNc in das DLS. Die basolaterale Amygdala (BLA) beeinflusst das zielgerichtete System, wohingegen der Zentralkern der Amygdala (CeN) das Gewohnheitssystem beeinflusst. Es bestehen außerdem Projektionen des indirekten Signalwegs der Basalganglien über Globus Pallidus externus/ventrales Pallidum (GPe/VP) und den subthalamischen Nucleus (STN). Abbildung modifiziert nach Balleine und O'Doherty, 2010; Shiflett und Balleine, 2011b.

Das DMS hingegen ist sowohl an der Akquisition als auch am Abruf zielgerichteter Handlungen beteiligt (Hart et al., 2014). Erkenntnisse aus der aktuellen Forschung zeigen außerdem, dass besonders der posteriore Teil des DMS (pDMS) hierfür erforderlich ist, jedoch nicht der anteriore Teil (Yin et al., 2005a). Das DMS projiziert zu SNr und GPi, welche als Ausgangsstrukturen des Schaltkreises zu den (motorischen) Zielstrukturen projizieren. Außerdem verlaufen von SNr und GPi Projektionen über den mediodorsalen Thalamus (MD) zurück zum PL, dem Ursprung des Schaltkreises. Diese Rückkopplungsschleife ist u.a. wichtig



für das erfolgreiche Speichern von R-O Assoziationen (Ostlund und Balleine, 2008). Der vorgestellte Schaltkreis stellt einen „direkten Signalweg“ der Basalganglien dar. Darüber hinaus bestehen auch Projektionen vom Striatum (DMS und DLS) über GPe und STN, d.h. über den „indirekten Signalweg“, zu GPi und SNr (Shiflett und Balleine, 2011b).

Zudem beeinflussen dopaminerge Signale aus VTA und SNr in das DMS die Handlungsausführung und vermitteln Informationen über die Natur der Belohnung (Hyman und Malenka, 2001).

Außerdem gibt es eine Struktur des limbischen Systems, die Informationen über die Belohnung an den PL und das DMS übermittelt: die basolaterale Amygdala (BLA). Die BLA speichert Informationen über den Wert einer Belohnung, insbesondere über die spezifischen sensorischen Eigenschaften der Belohnung. Dabei verknüpft sie eingehende sensorische Informationen über die Belohnung aus dem sensorischen Cortex mit motivationalen und emotionalen Informationen aus Hypothalamus, Thalamus, PFC und Inselcortex. Der auf diese Weise berechnete sensorische Belohnungswert wird dann von der BLA zum PL und DMS weiter geleitet und beeinflusst somit die Ausführung zielgerichteter Handlungen (Balleine und Killcross, 2006; Balleine und O'Doherty, 2010).

Des Weiteren sind räumliche Informationen, die in Bezug zur Belohnung stehen, aus dem entorhinalen Cortex wichtig für die Ausführung zielgerichteter Handlungen (Corbit et al., 2002; Lex und Hauber, 2010c).

Daraus ergibt sich, dass das zielgerichtete System kein abgeschlossener Schaltkreis ist, welcher ausschließlich aus Cortex, Basalganglien und Thalamus besteht. Sondern weitere Strukturen, wie BLA und entorhinaler Cortex, beeinflussen die Verarbeitung einer R-O-Assoziation im zielgerichteten System, indem sie z.B. sensorische und räumliche Informationen über die Belohnung vermitteln.

Während bei der Ratte Gehirnstrukturen, die zielgerichtete Handlungen steuern, beispielsweise mittels Läsions-Studien untersucht werden, setzt man beim Menschen bildgebende Verfahren ein. Eine Vielzahl an funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRI) Studien am Menschen hat den ventromedialen Präfrontalcortex (vmPFC) als Struktur ermittelt, die ähnliche Funktionen hat wie der Präfrontalcortex der Ratte. Denn der vmPFC speichert R-O Assoziationen und Informationen über den Wert einer Belohnung, welcher die

Auswahl einer Handlung beeinflusst (Balleine und O'Doherty, 2010; Morris et al., 2016). Außerdem sind der Orbitofrontalcortex (OFC) und der Nucleus caudatus beim Lernen und Speichern von R-O Assoziationen beteiligt (Tanaka et al., 2008). Mit anderen Worten, beim Menschen bilden der *vmPFC*, *OFC* und *Nucleus caudatus* einen funktionellen Schaltkreis, der zielgerichtete Handlungen speichert und abruft.

*Gewohnheitssystem.* Automatisierte Handlungen werden durch das *nicht-deklarative* (implizite) Lern- und Gedächtnissystem vermittelt, d.h. das Wissen umfasst Verhaltensfertigkeiten oder kognitiven Fähigkeiten, die nicht bewusst überwacht werden müssen (vgl. Kapitel 6.1) (Domjan, 2003). Das Gewohnheitssystem steuert automatisierte Handlungen, die bei der Ratte vor allem durch das dorsolaterale Striatum (DLS) vermittelt werden (Abbildung 6-15). Das DLS erhält Eingänge aus dem Sensomotorischen Cortex (SM) und projiziert weiter zu SNr und GPi, ebenso wie das DMS. Dadurch dass sowohl Efferenzen des DLS als auch des DMS zu SNr und GPi verlaufen, fließen hier Informationen über S-R Assoziationen (automatisierte Lernvorgänge) und R-O Assoziationen (zielgerichtete Lernvorgänge) zusammen und beeinflussen die Ausführung einer Handlung. Überwiegen die Eingänge aus dem DLS, so wird die Handlung automatisiert ausgeführt, wohingegen ein überwiegender Eingang aus dem DMS dazu führt, dass die Handlung zielgerichtet ausgeführt wird. Von SNr und GPi wiederum verlaufen Projektionen über den posterioren Thalamus (PO) zurück zum SM, womit die funktionelle Schleife geschlossen ist (Balleine und O'Doherty, 2010).

Das DLS hat zudem Afferenzen aus dem Zentralkern der Amygdala (CeN), welcher S-R Assoziationen speichert und abruft (Cardinal et al., 2002).

Auch das Gewohnheitssystem wird durch dopaminergen Eingang aus VTA und SNr beeinflusst. Dabei sind vor allem Informationen aus der VTA über belohnungsprädiktive Stimuli von Bedeutung, welche die Ausführung einer Handlung verstärken können (Murschall und Hauber, 2006; Corbit et al., 2007). Die Wirkungen eines Stimulus als Handlungsverstärker können am Beispiel des PIT-Tests untersucht werden (ausführliche Beschreibung des PIT-Tests in Kapitel 6.2).

Eine relativ neue Erkenntnis der letzten Jahre ist, dass der infralimbische Cortex (IL) ebenfalls Teil des Gewohnheitssystems ist. Bislang ist noch unbekannt, wie IL und DLS interagieren, da keine direkte Verbindung zwischen den beiden Strukturen existiert. Man weiß nur, dass für

das Erlernen und die Ausführung automatisierter Handlungen sowohl IL als auch DLS intakt sein müssen (Killcross und Coutureau, 2003; Smith und Graybiel, 2013). Der Gegenspieler des IL ist der PL, welcher bewirkt, dass eine Handlung im zielgerichteten Modus ausgeführt wird (Killcross und Coutureau, 2003).

Die Verschaltungen des Gewohnheitssystems und wie es letztlich automatisierte Handlungen steuert, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Balleine und O'Doherty, 2010).

Beim Menschen sind das *Putamen* und seine Efferenzen in die *supplementär-motorische Rinde* verantwortlich für das Lernen von S-R Assoziationen. Mit anderen Worten bilden diese beiden Strukturen eine anatomische und funktionelle Einheit beim Lernen und Ausführen automatisierter Handlungen (Balleine und O'Doherty, 2010; Morris et al., 2016).

*Motivationssystem.* Ein weiterer cortico-striatal-thalamischer Schaltkreis, der instrumentelles Verhalten beeinflusst, ist das Motivationssystem. Dieses System unterstützt das Erlernen von klassisch konditionierten Reaktionen (Yin und Knowlton, 2006a; Liljeholm und O'Doherty, 2012). Im Zentrum des Motivationssystems steht der Nucleus Accumbens (NAc), welcher auch als ventrales Striatum oder limbisches Striatum bezeichnet wird (Abbildung 6-16). Der NAc erhält Afferenzen aus dem OFC und sendet seine Efferenzen an das ventrale Pallidum (VP), welches als Ausgangsstruktur des Schaltkreises die Informationen an den Hirnstamm weiterleitet. Das VP sendet auch Projektionen zum MD und dieser projiziert wieder zurück zum NAc, wodurch eine Rückkopplungsschleife gebildet wird. Außerdem erhält der NAc sowohl Afferenzen aus dem limbischen System, nämlich von der BLA, als auch dopaminergen Eingang aus VTA und SNc (Kalivas und Nakamura, 1999; Balleine und O'Doherty, 2010).

Das Motivationssystem hat zwei Hauptfunktionen: einerseits steuert es die Handlungsauswahl und andererseits die Intensität, mit der eine Handlung ausgeführt wird aufgrund von motivationsbezogenen Stimuli, z.B. Hunger. Die Steuerung der Handlungsauswahl kann beispielsweise mittels einer „Risiko“-Testaufgabe untersucht werden, welche überprüft wie viel Arbeit ein Tier bereit ist zu leisten, damit es eine Belohnung erhält (Mai et al., 2012). Der Einfluss von motivationsbezogenen Stimuli auf die Handlungssteuerung kann mittels des PIT-Tests untersucht werden, bei welchem ein belohnungsprädiktiver konditionierter Stimulus, z.B. ein Ton, die Ausführung einer mit dem

Stimulus und der Belohnung in Bezug stehenden Handlung verstärkt, z.B. Betätigung eines Hebels (Balleine und O'Doherty, 2010; Lex und Hauber, 2010b).

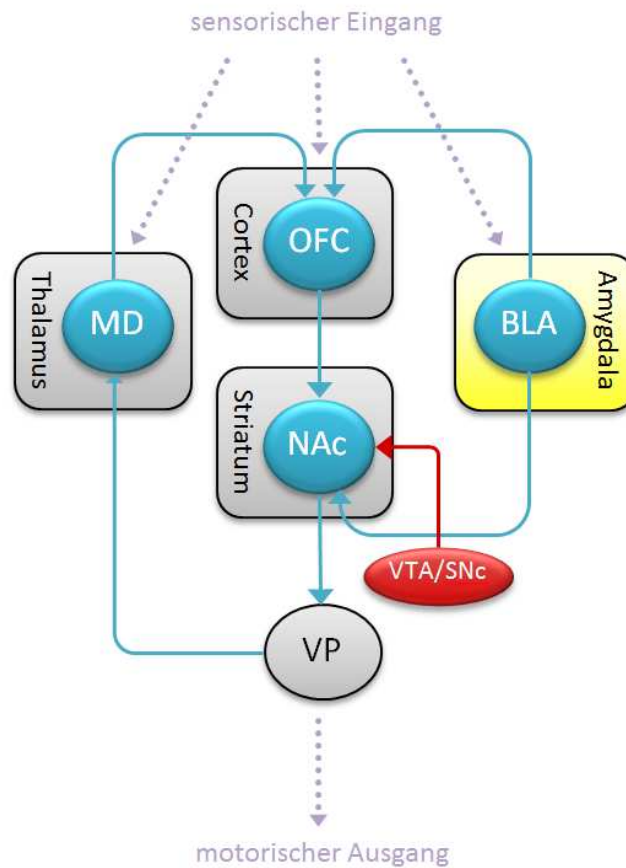


Abbildung 6-16: Schematische dargestellt ist das Motivationssystem. Es steuert die Handlungsauswahl und verarbeitet motivationsbezogene Informationen, z.B. über den Wert einer Belohnung oder belohnungsprädiktive Stimuli. Der im Zentrum stehende Nucleus accumbens (NAc) erhält Afferenzen aus dem Orbitofrontalcortex (OFC) und sendet Efferenzen an das ventrale Pallidum (VP). Über den mediodorsalen Thalamus (MD) wird eine Rückkopplungsschleife zurück zum OFC gebildet. Die basolaterale Amygdala (BLA) sendet Efferenzen an OFC und NAc. Zudem erhält der NAc dopaminerge Projektionen (rot) aus dem ventralen tegmentalen Areal (VTA) und der Substantia nigra pars compacta (SNc). Abbildung modifiziert nach Kalivas und Nakamura, 1999; Balleine und O'Doherty, 2010.

*Interaktionen der cortico-striatal-thalamischen Schaltkreise.* Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass das zielgerichtete System, das Gewohnheitssystem und das Motivationssystem miteinander interagieren. Basierend auf Kenntnissen aus der experimentellen neurobiologischen Forschung und Anatomie wurden zwei Modelle entwickelt, die die Informationsweiterleitung zwischen den Schaltkreisen beschreiben.

Ein erster Befund ist, dass automatisiert handelnde Tiere nach Inaktivierung einer Struktur des Gewohnheitssystems, z.B. des DLS (Yin et al., 2005a) oder des IL (Killcross und

Coutureau, 2003), wie zu Beginn des Lernens wieder zielgerichtet handeln. Das bedeutet, dass die im zielgerichteten System gespeicherte S-(R-O)-Assoziation nach wie vor vorhanden ist und nach Inaktivierung des DLS bzw. IL wieder handlungssteuernd wird.

Der zweite Befund ist, dass beim Ausführen von automatisierten Handlungen auch Neurone des DMS, einer Struktur des zielgerichteten Systems, aktiv sind (Thorn et al., 2010).

Diese beiden Befunde sprechen unter anderen dafür, dass die drei Schaltkreise in sich geschlossen sind und parallel arbeiten.

Daneben gibt es Hinweise darauf, dass die drei Schaltkreise seriell verknüpft sind. Daphna Joel und Ina Weiner (1994) erstellten anhand von anatomischen Studien an Ratten und Primaten das Modell der „geteilten Schaltkreise“ (*split circuits*). Demzufolge besteht ein Schaltkreis immer aus einer „geschlossenen“ und einer „offenen“ Schleife. Beispielsweise führt beim zielgerichteten System die geschlossene Schleife vom DMS zurück zum PL, während die offene Schleife vom DMS weiter zum SM führt, wobei letzterer eine Struktur des Gewohnheitssystems ist (Joel und Weiner, 1994, 2000). Suzanne Haber (2003) erstellte ein ähnliches Modell, bei dem zwischen Striatum und Strukturen des Mittelhirns „spiralförmig“ angeordnete Verbindungen bestehen, die einen Informationsfluss über die Schaltkreise hinweg ermöglichen (Abbildung 6-17).

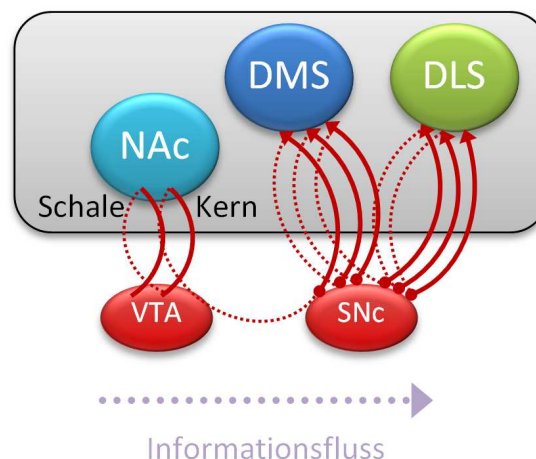


Abbildung 6-17: Spiralförmige Verbindungen zwischen Striatum und Mittelhirn ermöglichen den Austausch von Informationen zwischen Motivationssystem (hellblau), zielgerichtetem System (blau) und Gewohnheitssystem (grün). Der Informationsfluss läuft über dopaminerge Neurone in eine Richtung von VTA über NAc zu SNc und Striatum. Abkürzungen: DLS: dorsolaterales Striatum, DMS: dorsomediales Striatum, NAc: Nucleus accumbens, SNc: Substantia nigra pars compacta, VTA: ventrales tegmentales Areal. Abbildung modifiziert nach Balleine und O'Doherty, 2010.

Jeweils innerhalb dieser strukturellen Verbindungen gibt es sowohl rückwärts (*feedback*) als auch vorwärts (*feedforward*) gerichtete Verbindungen, wobei letztere die Information in

andere Schaltkreise weiterleiten (Haber, 2003). Bei diesem Modell verläuft der Informationsfluss in drei Ebenen vom Motivationsystem zum zielgerichteten System und weiter zum Gewohnheitssystem (Yin und Knowlton, 2006a).

### 6.3.5 MOLEKULARE GRUNDLAGEN INSTRUMENTELLER HANDLUNGEN IM STRIATUM: DER ERK-SIGNALWEG

Wie bereits vorgestellt ist das Striatum als Haupteingangsstruktur der cortico-striatal-thalamischen Schaltkreise die zentrale Struktur, die instrumentelle Handlungen steuert. Die molekularen Mechanismen im Striatum, die das Lernen und die Ausführung instrumenteller Handlungen vermitteln, sind noch nicht vollständig erfasst. Jedoch ist bereits bekannt, dass der „extrazellulär-signalregulierte Kinase“ Signalweg (ERK, *extracellular signal regulated kinase*) ein wichtiger molekularer Mechanismus für die Weiterleitung von Signalen in Neuronen des Striatums ist (Übersicht des ERK-Signalwegs bei Shiflett und Balleine, 2011a). Der ERK-Signalweg ist eine der am besten erforschten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden. Er ermöglicht die Weiterleitung von Signalen von Rezeptoren an der Zelloberfläche zu Zielmolekülen in Cytoplasma und Zellkern, z.B. dem Nervenwachstumsfaktor (Hanser et al., 2000). Die ERK gehört zur „Mitogen-aktivierten Kinase“ Familie (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) und ist essentiell für die Entwicklung und Plastizität des Nervensystems beim Erwachsenen. Daher spielt der ERK-Signalweg eine wichtige Rolle bei kognitiven Funktionen, beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung (Sweatt, 2004; Samuels et al., 2009). Außerdem beruhen die Wirkungen von psychoaktiven Substanzen, z.B. Suchtstoffen, zumindest teilweise auf ihrer Fähigkeit ERK im Nervensystem zu aktivieren. Umgekehrt führt die Inhibition von ERK, beispielsweise durch das Stresshormon Corticosteron, zu einem depressionsähnlichen Zustand bei Ratten (Shiflett und Balleine, 2011a).

Ungefähr 95% der Zellen des Striatums sind inhibitorische GABAerge Projektionsneurone, die als *medium spiny* Neurone (MSN) bezeichnet werden. Sie sind der einzige Ausgang auf nachgeschaltete Strukturen der Basalganglien und werden in zwei Arten unterschieden: die *striatonigralen* MSNs und die *striatopallidalen* MSNs. Die *striatonigralen* MSNs projizieren direkt zu GPi und SNr, womit sie den „direkten“ Signalweg der Basalganglien vermitteln, welcher deren Haupt-Signalweg ist. Hingegen projizieren die *striatopallidalen* MSNs zum GPe

und vermitteln den „indirekten“ Signalweg der Basalganglien. Außerdem geht im Striatum ein Großteil der dopaminergen Signale aus dem Mittelhirn ein. Aus histochemischen Analysen ist bekannt, dass striatonigrale MSNs D<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren wohingegen striatopallidale MSNs D<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimieren (Albin et al., 1989; Gerfen, 1992; Kreitzer, 2009; Shiflett und Balleine, 2011a; Reinius et al., 2015). Dadurch dass die exzitatorischen D<sub>1</sub>-Rezeptoren den direkten Signalweg aktivieren und die inhibitorischen D<sub>2</sub>-Rezeptoren den indirekten Signalweg inhibieren, werden bei dopaminergem Eingang im Striatum die Zielstrukturen der Signalwege insgesamt aktiviert (vgl. Kapitel 6.3.2 „direkter“ und „indirekter“ Signalweg).

Das Striatum hat außer diesen *dopaminergen* Eingängen aus dem Mittelhirn auch *glutamaterge* Eingänge aus corticalen, limbischen und thalamischen Regionen. Während des Lernens einer instrumentellen Handlung werden in den MSNs im Striatum sowohl NMDA-Rezeptoren als auch Dopamin-Rezeptoren koinzident aktiviert. Dies ist eine Besonderheit der striatalen MSNs, denn damit ERK in ausreichender Stärke aktiviert werden kann, ist der zeitgleiche Eingang von glutamatergen und dopaminergen Signalen notwendig. Hingegen führt der nicht-koinzidente Eingang dieser Signale nur zu einer schwachen ERK-Aktivierung. Die Notwendigkeit dieser simultanen Rezeptoraktivierung lässt vermuten, dass die ERK-Aktivierung während assoziativer Lernvorgänge selektiv neuronale Plastizität induziert, wie z.B. während dem Lernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen. Zudem verhindert diese Selektivität, dass willkürlich Assoziationen zwischen Handlungen und irrelevanten Ergebnissen gebildet werden. Mit anderen Worten fungiert das Dopamin-Signal als Filter, der bei unkoordiniertem glutamatergem Eingang die Aktivität der MSNs reduziert und bei koordiniertem glutamatergem Eingang die Aktivität der MSNs verstärkt (Shiflett und Balleine, 2011a, 2011b).

Im Folgenden werden die molekularen Abläufe des ERK-Signalwegs beschrieben. Erreichen glutamaterge Signale das Striatum, so werden NMDA-Rezeptoren aktiviert. Dies führt letztlich zur Aktivierung von ERK, indem es von der *mitogen/extracellular signal regulated kinase* (MEK) am Serin- und Threonin-Rest phosphoryliert wird (Abbildung 6-18). MEK selbst wird durch die Kinase *rapidly accelerated fibrosarcoma* (raf) phosphoryliert, welche durch Bindung an das GTP-Bindungsprotein ras aktiviert wird. Die ras-ERK-Aktivität kann als Reaktion auf verschiedene Stimuli erhöht werden, z.B. durch Ca<sup>2+</sup> Einstrom und durch die

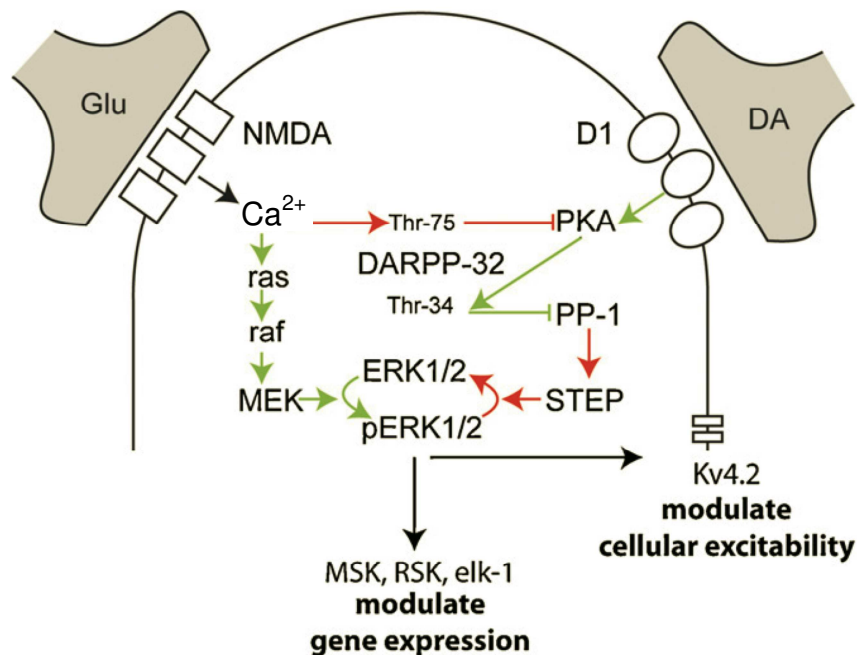


Abbildung 6-18: Der ERK-Signalweg in Neuronen des Striatums. In striatalen MSNs erfolgt durch die zeitgleiche Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und D<sub>1</sub>-Rezeptoren eine maximale Aktivierung von ERK. Das aktivierte ERK beeinflusst die Genexpression durch Interaktion mit Transkriptionsregulatoren wie RSK, MSK1 und elk-1. Ebenso erhöht ERK die zelluläre Erregbarkeit durch Phosphorylierung der K<sub>v</sub>4.2-Kanäle. Grüne Linien zeigen Signalwege, die zur Phosphorylierung/Aktivierung von ERK führen. Rote Linien kennzeichnen Signalwege, die zur Dephosphorylierung/Deaktivierung von ERK führen.

Abkürzungen: Ca<sup>2+</sup>: Calcium-Ionen, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, D<sub>1</sub>: Dopamin D<sub>1</sub>-Rezeptor, DA: dopaminerge Synapse, DARPP-32: Dopamin-und-cAMP-reguliertes-Phosphoprotein-32, elk-1: Transkriptionsfaktor, ERK: *extracellular signal regulated kinase*, Glu: glutamaterge Synapse, Kv4.2: spannungsgesteuerter Kalium-Kanal 4.2, MEK: *mitogen/extracellular signal regulated kinase*, MSK: Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase, MSN: *medium spiny neuron*, NMDA: N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor, PKA: Proteinkinase A, PP-1: Protein-Phosphatase-1, raf: *rapidly accelerated fibrosarcoma* (eine cytosolische Serin/Threonin-Kinase), ras: GTP-Bindungsprotein, RSK: ribosomale S6 Kinase, STEP: *striatal enriched phosphatase*, Thr: Threonin. Abbildung modifiziert nach Shiflett und Balleine, 2011a.

Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder Thyrosinkinase-Rezeptoren. In striatalen Neuronen wird ERK außerdem über die Aktivität von D<sub>1</sub>-Rezeptoren reguliert. Die Aktivierung von D<sub>1</sub>-Rezeptoren erhöht die Aktivität der zyklischen Adenosinmonophosphat-Proteinkinase A (cAMP-PKA) und damit die Phosphorylierung des Dopamin-und-cAMP-regulierten-Phosphoproteins-32 (DARPP-32) am Thr-34 Rest durch PKA. Thr-34 DARPP-32 ist ein starker Inhibitor der Phosphatase Kaskade, die aus der Protein-Phosphatase 1 (PP-1) und der *striatal enriched phosphatase* (STEP) besteht. Die Phosphatase Kaskade endet bei ERK, wodurch die Inhibition von ERK aufgehoben wird (Shiflett und Balleine, 2011a, 2011b).

Zusätzlich wird ERK in striatalen Neuronen durch NMDA-Rezeptoren auch negativ reguliert. Dies geschieht über eine Ca<sup>2+</sup> vermittelte Phosphorylierung von DARPP-32 am Thr-75 Rest



und Dephosphorylierung von DARPP-32 am Thr-34 Rest. Thr-75 DARPP-32 wird zum Inhibitor der PKA Aktivität, wodurch die Phosphatasen wieder aktiviert werden und zuletzt ERK dephosphoryliert und somit inaktiviert wird. Folglich wird ERK im intakten Striatum optimal aktiviert, wenn NMDA- und D<sub>1</sub>-Rezeptoren zugleich aktiv sind. Sobald ERK aktiviert ist, hat es viele zelluläre Ziele und beeinflusst damit viele zelluläre Funktionen. ERK beeinflusst die Genexpression indem es mit Transkriptionsregulatoren interagiert, beispielsweise mit ribosomaler S6 Kinase (RSK), Mitogen- und Stress-aktivierter Proteinkinase-1 (MSK1) und auch mit dem Transkriptionsfaktor elk-1. Zudem beeinflusst ERK die Proteinbiosynthese. ERK vermittelt vermutlich auch neuronale Plastizität im Striatum, indem sie beispielsweise Transkriptionsfaktoren wie das *cAMP response element binding* (CREB) Protein reguliert (Hanser et al., 2000; Shiflett und Balleine, 2011a).

Darüber hinaus ist ERK an der Steuerung der Erregbarkeit von striatalen Neuronen beteiligt. ERK phosphoryliert spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle (Kv4.2-Kanäle) im Striatum, welche dann gehemmt sind. Durch die Hemmung der Kv4.2-Kanäle ist die Erregbarkeit der Zelle erhöht und die synaptische Plastizität im Striatum wird unterstützt (Shiflett und Balleine, 2011a).

Aus Studien an Ratten ist bekannt, dass die ERK-Aktivität wichtig ist für das Lernen und die Ausführung zielgerichteter Handlungen. Die Blockade von ERK durch den Inhibitor U0126 im pDMS führte dazu, dass Ratten beim Ergebnisdevaluationstest nicht mehr zielgerichtet handelten (Shiflett et al., 2010b). Ob ERK auch beim Lernen und der Ausführung automatisierter Handlungen beteiligt ist, muss noch erforscht werden (Shiflett und Balleine, 2011a).

## 6.4 STRESS

*„Everybody knows what stress is and nobody knows what it is.“*

“Jeder kennt Stress und niemand weiß was Stress ist.” (Selye, 1973)

### 6.4.1 STRESS-KONZEPTE

Der Begriff „Stress“ ist allgemein bekannt und wird in verschiedenen Alltagssituationen verwendet, so als wäre er eine physische/psychische Messgröße, wie beispielsweise der

Blutdruck. Stress umfasst nicht nur physische und psychische Reaktionen sondern auch verschiedene Verhaltensreaktionen. Ursprünglich kommt der Terminus Stress (engl. Druck, Kraft) aus der Technik, wo er eine Kraft beschreibt, die eine physikalische Belastung auf eine mechanische Struktur ausübt und zur Deformation dieser Struktur führen kann (Kim und Diamond, 2002; Nelson, 2005; Carlson, 2007; Goldstein und Kopin, 2007).

Der Physiologe Walter Cannon (1929), einer der beiden Pioniere der Stressforschung, prägte zunächst den Begriff „Homöostase“. Damit beschrieb er, dass verschiedene Größen, z.B. Blutdruck, Blutglucose oder intrazelluläre Osmolarität, einen bestimmten Sollwert haben und der Organismus bestrebt ist diesen optimalen Wert zu erhalten bzw. ihn nach einer Störung wiederzuerlangen (Goldstein und Kopin, 2007). Die Homöostase kann durch jegliche Art von Umwelteinflüssen oder Aktivitäten des Organismus gestört werden, z.B. durch Stress, Nahrungsaufnahme oder körperliche Anstrengung (Kim und Diamond, 2002). Zudem führte Cannon die „Kampf-oder-Flucht-Reaktion“ (*fight-or-flight-response*) ein, womit er die physische Reaktion eines Tieres auf die Wahrnehmung einer aversiven oder bedrohlichen Situation beschreibt. Er machte die für die Stressforschung wichtige Entdeckung, dass während dieser Reaktion das sympathische Nervensystem aktiviert wird und, dass das Nebennierenmark Adrenalin ausschüttet. Diese beiden Effektoren arbeiten in Einheit zusammen als das „sympathische-Nebennierenmark-System“ (SAM-System, *sympathetic-adrenomedullary-system*), mit dem Ziel die Homöostase wieder zu erlangen. Kurze Zeit später entdeckte Ulf von Euler (1946) Noradrenalin als Neurotransmitter im sympathischen Nervensystem von Säugetieren (Goldstein und Kopin, 2007).

Der Mediziner Hans Selye (1956) gilt als zweiter Pionier der Stressforschung und führte den Terminus „Stress“ in die Forschung ein. Er definierte *Stress als unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung* (Selye, 1974). Selye unterschied zwei Formen von Stress: Mit „Distress“ bezeichnete er den als Belastung empfundenen Stress und mit „Eustress“ den als angenehm empfundenen. Er beschrieb drei Phasen einer Stressreaktion: erstens die Alarmreaktion, analog zu Cannons Kampf-oder-Flucht-Reaktion, zweitens die Phase der Anpassung und drittens die Phase der Erschöpfung. Er beschrieb zudem Anpassungen des Körpers in Folge von Stress, die aus der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse, *hypothalamic-pituitary-adrenocortical-axis*) resultieren, wie z.B. Vergrößerung der Nebenniere, Verkleinerung der Lymphgewebe in Thymus, Milz und Lymphknoten und Bildung von Geschwüren im Magen-Darm-Trakt. Selyes

Stress-Konzept ist längst anerkannt, welches besagt, dass lang anhaltender Stress zu neuropsychischen Krankheiten führt, wie z.B. die Posttraumatische Belastungsstörung (PTSD, *post-traumatic stress disorder*) oder Depressionen (Goldstein und Kopin, 2007).

Das Konzept der Homöostase geht von konstanten optimalen Werten bestimmter Größen eines Organismus aus, ohne auf tagesrhythmische Schwankungen, z.B. Aktivitäts- und Ruhephasen, einzugehen. Ebenso wenig berücksichtigt es, dass die Anpassung an einen Stressor auch durch Veränderungen der Werte innerhalb angemessener Bereiche erreicht werden kann. Daher führten Peter Sterling und Joseph Eyer (1988) den Begriff „Allostase“ (aus dem Griechischen: „Erreichen von Stabilität durch Änderung“) ein. Sie beschrieben damit, dass ein Organismus Stabilität erreicht, indem er mithilfe des kardiovaskulären Systems bestimmte Größen innerhalb angemessener Spannbreiten variiert. Dabei ist das Gehirn die Stelle, die Wirkungen von Stressoren wahrnimmt und koordinierte Verhaltensreaktionen und neuroendokrine Reaktionen einleitet (McEwen, 1998; de Kloet et al., 2005; Goldstein und Kopin, 2007).

Jeansok Kim und David Diamond (2002) präzisieren die Definition von Stress noch weiter, indem sie verschiedene Komponenten von physischen und zudem psychischen Reaktionen eines Individuums mit einbezogen. Ihre dreiteilige Definition von Stress ist für verschiedene Spezies und Beispiele anwendbar.

Erstens erzeugt Stress eine *erhöhte Erregbarkeit* des Individuums, die mittels elektrophysiologischer (z.B. Elektroenzephalogramm), Verhaltens- (z.B. motorische Aktivität) oder neurochemischer (z.B. Adrenalin, Glucocorticoide) Messgrößen gemessen werden kann.

Zweitens muss die erfahrene *Situation* als *aversiv* wahrgenommen werden. Dies kann beurteilt werden, indem einem Individuum die Möglichkeit gegeben wird, der Situation zu entkommen oder sie zu vermeiden. Z.B. bewirkt ein elektrischer Schock bei einem Tier, dass es erregt ist und versucht den Schock zu vermeiden oder zu minimieren. Ein weiteres Beispiel ist ein Fallschirmsprung, der zwar bei allen Menschen eine erhöhte Erregung erzeugt, jedoch empfindet ein leidenschaftlicher Fallschirmspringer den Sprung als angenehm, wohingegen jemand, der Höhenangst hat, den Sprung als unangenehm wahrnimmt.

Die dritte Komponente der Definition von Stress ist die *Kontrollierbarkeit*. Werden z.B. zwei Tiere einem gleich starken elektrischen Schock ausgesetzt, so können sie gleich stark erregt

sein und beide versuchen der Situation zu entkommen. Jedoch kann dieses Erlebnis sehr verschiedene Verhaltens- und physische Effekte haben, wenn eines der beiden Tiere die Kontrolle darüber hat den Schock zu beenden. Dieses Element der Kontrollierbarkeit und das damit zusammenhängende Konzept der *Vorhersagbarkeit* ist die Variable, welche die Stärke des erlebten Stresses bestimmt und festlegt, ob ein Individuum anfällig für stressbedingte Beeinträchtigungen ist (Kim und Diamond, 2002; Arnsten, 2009; Koolhaas et al., 2011).

Die Definition von Kim und Diamond (2002) lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Stress ist ein Zustand, in welchem ein Individuum *erregt* ist durch eine *aversive* Situation, z.B. ein verpasster Zug oder bei Tieren ein Fressfeind. Das Ausmaß an Stress und die physischen Konsequenzen hängen stark von der individuellen *Wahrnehmung* ab und der Fähigkeit die Präsenz oder Intensität der Stimulation zu *kontrollieren*.

Das Stress-Konzept wurde außerdem präzisiert durch einige terminologische Unterscheidungen. So bezeichnet **Stressor** einen Stimulus oder eine Situation, welche/n ein Individuum als potentiell nachteilig oder bedrohlich empfindet. Er veranlasst u.a. die Freisetzung von Molekülen, den **Stressmediatoren**, die an Ziel-Rezeptoren binden. Jeder Stressmediator aktiviert in spezifischen Gehirnarealen nachgeschaltete Signalwege. Die Aktivierung der Signalwege durch die Stressmediatoren und die von ihnen ausgelöste physische Reaktion des Organismus bilden gemeinsam die **Stressreaktion**. Die Stressreaktion hilft dem Organismus die Situation zu bewältigen und bringt ihn wieder ins Gleichgewicht, d.h. in die Allostase (Carlson, 2007; Joels und Baram, 2009; Schwabe et al., 2012a).

In der vorliegenden Arbeit wird zusätzlich der Begriff **Stressor-Wirkungen** verwendet. Er bezeichnet Stressor-bedingte veränderte kognitive Leistungen eines Tiers, welche in einer instrumentellen Testaufgabe, z.B. im Ergebnisdevaluationstest, messbar sind.

### 6.4.2 STRESSREAKTION

Unzählige Arten von Stressoren erfordern viele verschiedene Formen von Stressreaktionen. Es gibt zwei Arten von natürlich vorkommenden Stressoren: physische Stressoren, z.B. Blutverlust oder Infektionen, und psychologische Stressoren, z.B. eine Prüfung oder eine peinliche Situation. Wobei physische und psychologische Stressoren nicht gänzlich voneinander getrennt werden können, da sie sich auch gegenseitig beeinflussen. Zudem

spielt die Dauer der Stressor-Exposition eine Rolle. So gibt es akute Stressoren, die von Minuten bis zu Stunden andauern und ein- bis dreimal verabreicht werden, und chronische Stressoren, die mehrmals verabreicht werden über einen Zeitraum von ein bis drei Wochen. Die Wirkung dieser vielfältigen Stressoren wird zudem durch weitere Faktoren beeinflusst, wie Alter, Geschlecht und bisherige Erfahrungen mit Stressoren. Jeder einzelne Stressor erfordert eine effiziente Reaktion von zahlreichen neuronalen Prozessen im gesamten ZNS, die raffiniert zusammenspielen. Das Zusammenspiel erfolgt durch körpereigene Signalmoleküle, die eine zeitlich und räumlich fein abgestimmte Stressreaktion hervorrufen (Joels et al., 2006; Joels und Baram, 2009).

Die hoch komplexen Vorgänge der Stressreaktion bei Vertebraten sind längst nicht komplett erforscht. Jedoch sollen die folgenden Kapitel einen Überblick über bisher bekannte Prozesse verschaffen, die in den Körperorganen und im Gehirn stattfinden.

#### 6.4.3 STRESSREAKTION – HORMONELLE PROZESSE IN DER PERIPHERIE (KÖRPER)

Das erstmals von Cannon beschriebene SAM-System und die von Selye entdeckte HPA-Achse nehmen eine Schlüsselrolle bei der Stressreaktion ein. Beide Systeme setzen Stressmediatoren frei und beeinflussen Körper- und Gehirnfunktionen (Goldstein und Kopin, 2007; Koolhaas et al., 2011). Während der Einwirkung eines Stressors sind die beiden Systeme hauptverantwortlich für die Energiemobilisation und Umverteilung von Sauerstoff und Nährstoffen hin zu aktiven Organen und Geweben. Sie bereiten metabolische und kardiovaskuläre Systeme des Körpers darauf vor ein bestimmtes Verhalten auszuführen. Dabei bewirken metabolisch aufwändigere Reaktionen eine stärkere Aktivierung der Systeme. Überaus wichtig ist, dass nicht nur aversive Stimuli, sondern auch appetitive Stimuli die HPA-Achse aktivieren können (Abbildung 6-19). D.h. die Aktivierung der HPA-Achse, gemessen anhand der Konzentration von Corticosteron im Blutplasma, im Beispiel bei Ratten, ist nicht allein durch das Stress-Konzept zu erklären. Denn appetitive Situationen wie beispielsweise Sexualverhalten oder der Sieg in einer sozialen Auseinandersetzung aktivieren die HPA-Achse vergleichbar stark wie hoch aversive Situationen, z.B. eine soziale Niederlage (Koolhaas et al., 1997). Der Grad der Aktivierung der HPA-Achse spiegelt vermutlich direkt den Grad an physikalischer Aktivität und den damit verbundenen metabolischen Bedarf wieder (Koolhaas et al., 2011).

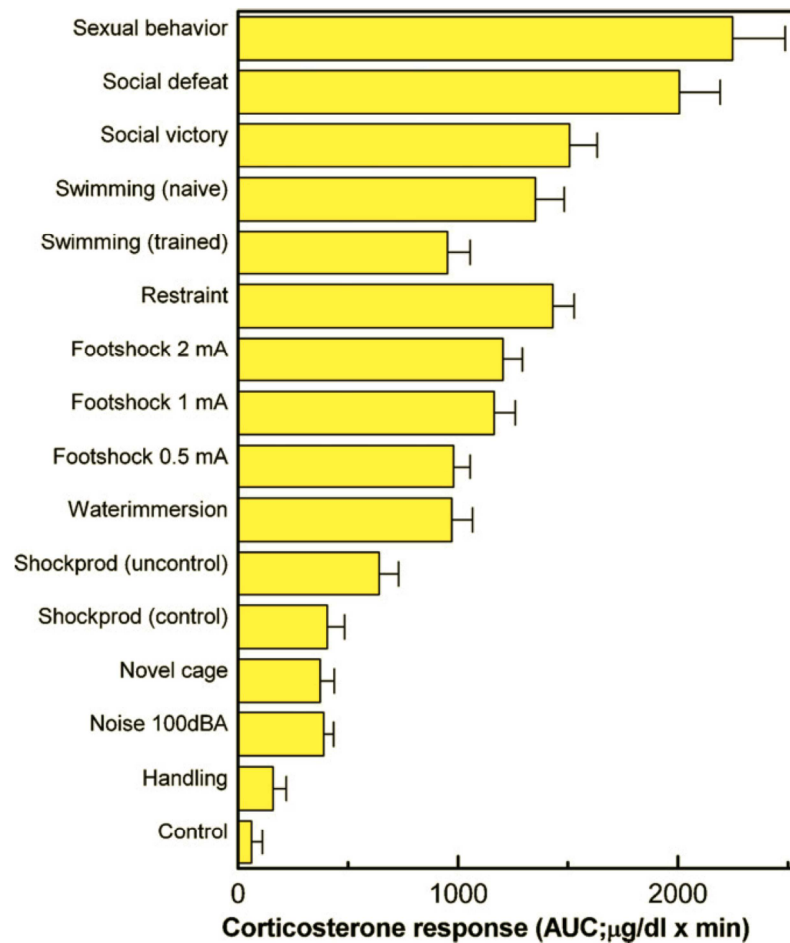


Abbildung 6-19: Plasma-Corticosteron-Spiegel von adulten Wistar Ratten in verschiedenen Testsituationen, quantifiziert als Fläche unter der Messkurve (AUC, *area under response curve*). Jeder Test bestand aus dem Basiswert, 15 min Stressor-Exposition und einer einstündigen Erholungsphase. Für die Kontrollbedingung wurde eine Probe im Heimkäfig während der Aktivitätsphase entnommen. Die Blutproben wurden über permanent implantierte Kanülen in der Vena jugularis entnommen. Abbildung aus Koolhaas et al., 1997.

**SAM-System.** Der Hirnstamm registriert Störungen der Allostase, z.B. Blutverlust, Atemnot, Schmerz oder eine Entzündung, und aktiviert das SAM-System. Dabei induzieren Neurone des sympathischen Nervensystems im Thorax- und Lendenwirbelbereich des Rückenmarks sowohl auf direktem Weg die Aktivierung von Endorganen, z.B. Herz-Kreislaufsystem und innere Organe, als auch die Freisetzung der Stress-Hormone *Adrenalin* und *Noradrenalin* im Nebennierenmark (Ulrich-Lai und Herman, 2009). Adrenalin beeinflusst den Glucose Metabolismus, indem es die Freisetzung von in den Muskeln gespeicherten Nährstoffen bewirkt (Carlson, 2007). Damit wird Energie für Muskelbewegungen bereitgestellt. Zusammen mit Noradrenalin veranlasst Adrenalin eine stärkere Durchblutung von Muskeln und Herz, einen erhöhten Blutdruck, die Hemmung des Immunsystems und die Ausrichtung von kognitiven Prozessen im Gehirn auf Stress-bewältigende Verhaltensreaktionen

(Groeneweg et al., 2012). Aufgrund dieser Wirkungen kann lange andauernder Stress zu Herz-Kreislauf Erkrankungen führen. Adrenalin und Noradrenalin können die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, sondern nehmen indirekten Einfluss auf kognitive Funktionen, indem sie über den Nervus vagus noradrenerge Neurone in STN und Locus coeruleus zur Freisetzung von Noradrenalin in spezifischen Gehirnarealen, z.B. Amygdala, anregen. Auf diese Weise wirkt Noradrenalin im Gehirn als Neurotransmitter des Stress-Systems und beeinflusst Gedächtnisprozesse und letztlich auch Verhaltensreaktionen (Nelson, 2005; Carlson, 2007; Schwabe et al., 2012a).

Das parasympathische Nervensystem wird ebenfalls durch einen Stressor aktiviert. Prinzipiell wirkt es dem sympathischen Nervensystem und damit dem SAM-System entgegen. D.h. es reguliert die durch das SAM-System aktivierten autonomen Reaktionen, z.B. Blutdruck, wieder zurück und begrenzt damit deren Wirkungsdauer (Ulrich-Lai und Herman, 2009).

*HPA-Achse.* Kurze Zeit nach Aktivierung des SAM-Systems wird die HPA-Achse durch den Hirnstamm oder die Lamina terminalis aktiviert, letztere registriert Störungen im Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt und im Blutdruck (Ulrich-Lai und Herman, 2009). Die HPA-Achse arbeitet mittels zweier Mechanismen: Erstens setzt sie aufgrund einer intrinsischen Aktivität in stündlichen Pulsen Glucocorticoide aus der Nebenniere frei. Diese rhythmische Freisetzung von Glucocorticoiden ist unabhängig von Stressor-Einflüssen und dient der Steuerung von Ereignissen, die mit dem Tag-Nacht-Rhythmus in Beziehung stehen; beispielsweise wird bei Ratten der Höchstwert an Corticosteron zu Beginn der Aktivitätsphase gemessen. Zweitens ermöglicht die HPA-Achse einem Individuum zu jedem Zeitpunkt einen Stressor zu bewältigen. Diese Aktivierung der HPA-Achse wird durch den Stressor ausgelöst und ist unabhängig von der intrinsischen Aktivität der HPA-Achse (de Kloet et al., 2008b).

Bei Aktivierung der HPA-Achse wird im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus das Polypeptid Corticotropin-releasing Hormon (CRH) freigesetzt (Abbildung 6-20). CRH gelangt über Portalgefäße direkt in den Hypophysenvorderlappen und bindet dort an der Zelloberfläche an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche die Synthese von Proopiomelanocortin (POMC), einem Vorläufer-Peptid von Adrenocorticotropin (ACTH), und schließlich die Freisetzung von ACTH und anderen POMC-Derivaten induzieren. ACTH tritt in

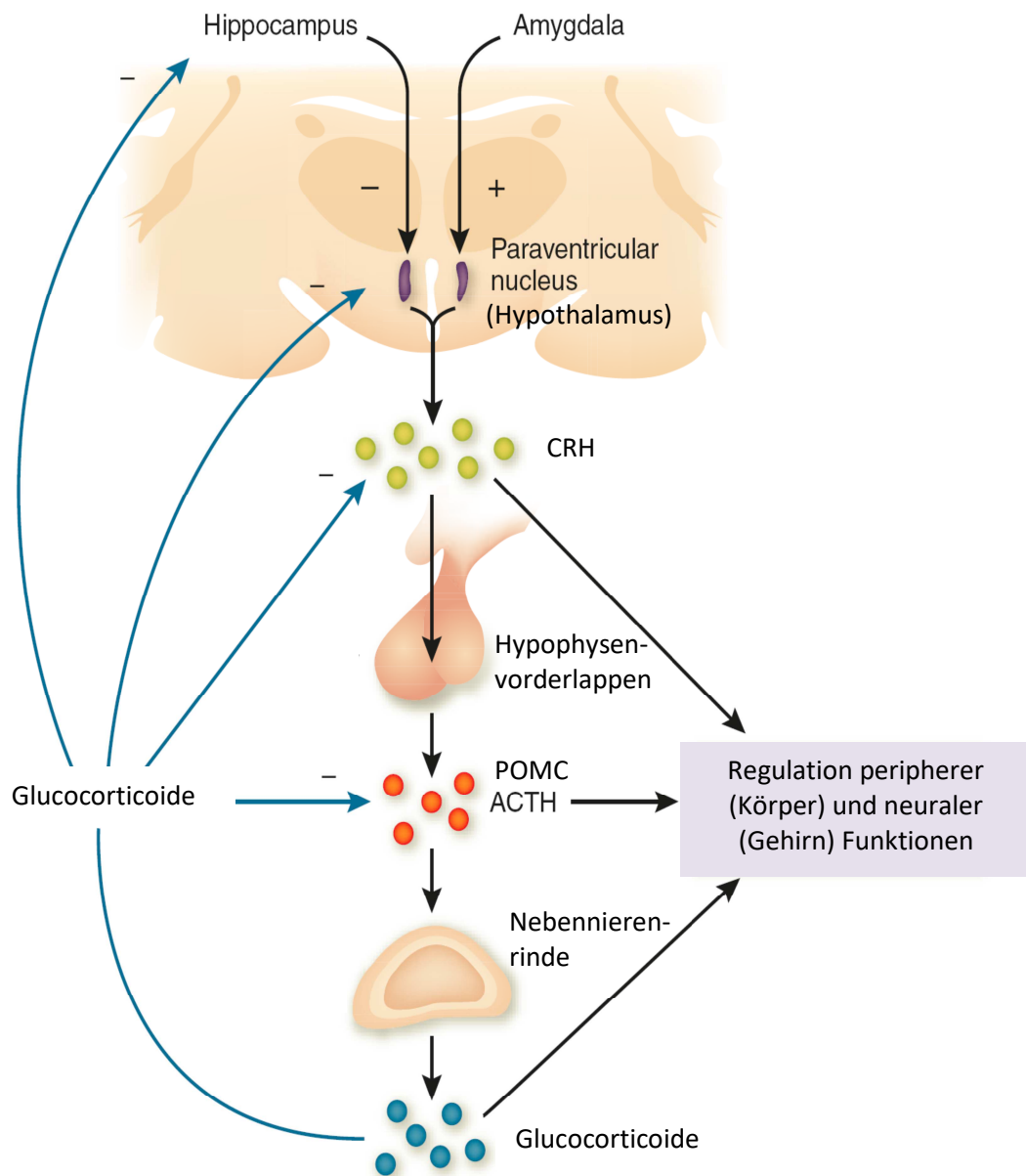


Abbildung 6-20: Die HPA-Achse wird als Reaktion auf einen Stressor aktiviert. Dabei setzt der Nucleus paraventricularis, ein Teil des Hypothalamus, Corticotropin-releasing Hormon (CRH) in das Portalgefäßsystem frei, welches direkt zur Hypophyse führt. Im Hypophysenvorderlappen bewirkt CRH die Freisetzung von Adrenocorticotropin (ACTH), welches über das Blutgefäßsystem zur Nebennierenrinde gelangt und die Synthese und Freisetzung der Glucocorticoide Cortisol (beim Menschen) bzw. Corticosteron (bei der Ratte oder Maus) induziert. Die Glucocorticoide regulieren die HPA-Achse über negative Rückkopplung auf Ebene von Hippocampus, Hypothalamus und Hypophyse. Eine zusätzliche Regulation der HPA-Achse erfolgt über aktivierenden Einfluss von der Amygdala und inhibitorischen Einfluss vom Hippocampus. Abbildung modifiziert nach Hyman, 2009.

das Blutkreislaufsystem ein und bewirkt in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Glucocorticoiden. Das Haupt-Glucocorticoid bzw. Stress-Hormon beim Menschen ist *Cortisol* und bei der Ratte oder Maus *Corticosteron* (Turnbull und Rivier, 1999; Nelson, 2005; Hyman, 2009).



Glucocorticoide erreichen über das Blutkreislaufsystem jedes Organ. Als lipophile Substanz passieren sie die Blut-Hirn-Schranke, sodass sie nicht nur im Körper, sondern auch im Gehirn ihre Wirkung entfalten. Sie koordinieren Körper- und Gehirnfunktionen dahingehend, dass der Organismus den Stress bewältigt, sich von ihm erholt und letztlich sein Verhalten anpasst, um zukünftigen Stressoren zu begegnen (de Kloet et al., 2005). Dies geschieht indem Glucocorticoide zelluläre Funktionen aktivieren oder hemmen, sodass der erhöhte metabolische, endokrine, neurale, kardiovaskuläre und immunologische Bedarf gedeckt wird und das Überleben eines Individuums gesichert ist (Turnbull und Rivier, 1999).

*Regulation der HPA-Achse.* Die HPA-Achse wird vor allem durch die limbischen Strukturen Amygdala und Hippocampus reguliert, welche als Gegenspieler agieren. Wird der Zentralkern der Amygdala durch eingehende sensorische Informationen aktiviert, so aktiviert er wiederum die HPA-Achse. Hingegen führt die Aktivierung des Hippocampus dazu, dass die HPA-Achse gehemmt wird. Die hemmende Wirkung des Hippocampus ist vor allem auf den Mechanismus der negativen Rückkopplung der Glucocorticoide zurückzuführen (Bear 2008). So regulieren Glucocorticoide in ihrer Funktion als Neurotransmitter die Freisetzung von CRH und damit letztlich ihre eigene Freisetzung, indem sie die HPA-Achse durch Bindung an Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) in Hippocampus, PVN und Hypophyse inhibieren. Auf diese Weise wird die Stressreaktion wieder beendet und die Reaktion der HPA-Achse auf einen weiteren nachfolgenden Stressor ist geringer (Hyman, 2009).

*Weitere Stress-Hormone.* Die Stressor-bedingte Aktivierung der HPA-Achse führt neben der Ausschüttung des Stress-Hormons Cortisol/ Corticosteron zur Freisetzung weiterer Hormone. Unter anderem wird POMC auch in *Beta-Endorphin* gespalten, welches von der Hypophyse in den Blutkreislauf freigesetzt wird. Beta-Endorphin ist ein sog. endogenes Opiat und wirkt mit bei Schmerzstillung, motorischer Koordination, Nahrungsaufnahme, Regulation von Körpertemperatur und Wasserhaushalt und bei Stressreaktionen (Meyer und Quenzer, 2005).

Der Hormontransport vom Hypothalamus zur Hypophyse erfolgt nicht nur über das Blutgefäßsystem, sondern es gibt außerdem neurosekretorische Zellen im Hypothalamus, deren Axone im Hypophysenhinterlappen enden, wo sie nach Stressor-Einwirkung *Vasopressin* und *Oxytocin* ausschütten. Die Hormone gelangen dann von der Hypophyse über den Blutkreislauf zum Zielorgan. Vasopressin bewirkt in Synergie mit CRH die

Ausschüttung von ACTH (Tsigos und Chrousos, 2002). Zusätzlich erhöht Vasopressin den Blutdruck und das Blutvolumen, wodurch die Energiebereitstellung in den Muskeln gesteigert wird (Meyer und Quenzer, 2005; Nelson, 2005). Vasopressin beeinflusst auch das Verhalten, indem es die Speicherung und den Abruf von Gedächtnisinhalten erhöht (Nelson, 2005). Zudem reguliert Vasopressin beim männlichen Säugetier das sympathische Nervensystem während der Stressreaktion, wohingegen im weiblichen Säugetier Oxytocin dafür zuständig (de Kloet, 2004; de Kloet et al., 2008b). Ein weiteres Hormon, das vom Hypophysenvorderlappen ausgeschüttet wird, ist *Prolaktin*. Dieses inhibiert vorübergehend Reproduktions-Prozesse, sodass weitere Energieressourcen für die Stressreaktion frei werden (Nelson, 2005).

Wird die Stressreaktion als Reaktion auf eine reale Bedrohung aktiviert, so verbessert sie die Überlebenschancen, indem die Energieressourcen von weniger wichtigen aber energetisch anspruchsvollen Funktionen, z.B. Reproduktionsprozessen, hin zu jenen Organen verschoben werden, welche das Überleben sichern, z.B. Muskeln und Gehirn. Beispielsweise ist ein Kaninchen, das vor dem Fuchs flüchtet, auf eine hohe Energiebereitstellung in den Muskeln angewiesen. Unter diesen Umständen ist eine Stressreaktion absolut nützlich. Wird sie jedoch nicht effektiv beendet, zu häufig ausgeführt oder als Reaktion auf unangemessene Stimuli aktiviert, so kann dies schädliche und krankmachende Folgen für das Individuum haben, z.B. PTSD oder Depressionen (Nelson, 2005).

Als *Schlüssel-Hormone* der HPA-Achse gelten CRH und Vasopressin, da sie beide in Synergie die Synthese von POMC-Derivaten, u.a. ACTH, induzieren (Bardleben und Holsboer, 1989; de Kloet et al., 2008b).

#### 6.4.4 STRESSREAKTION – ZELLULÄRE UND MOLEKULARE PROZESSE IM GEHIRN

Das SAM-System und die HPA-Achse stellen die physiologischen Funktionen eines Organismus bestmöglich ein, damit dieser angemessen auf einen Stressor reagieren kann. Doch ein Stressor führt nicht nur zu Anpassungen auf physiologischer Ebene, z.B. Blutdruckerhöhung, sondern er verändert auch Funktionen des Gehirns und die Art und Weise wie ein Individuum lernt. Einerseits finden dabei strukturelle Veränderungen statt. Beispielsweise blockiert ein starker akuter Stressor das Wachstum von sog. Dornenfortsätzen (engl. *spines*) auf Dendriten von Neuronen des Hippocampus, welche für

die Speicherung von neuen Informationen im Langzeitgedächtnis verantwortlich sind (Diamond et al., 2006). Chronischer Stress verändert auch die Zellvernetzung, gemessen als Wachstum der Dendriten, in Strukturen der oben vorgestellten Lernsysteme. So nimmt die Zellvernetzung im DLS zu und im DMS ab (Dias-Ferreira et al., 2009). Andererseits werden molekulare Mechanismen verändert, z.B. inhibiert Stress die Langzeit-Potenzierung (LTP), welche maßgeblich für die Speicherung von Erinnerungen im Hippocampus verantwortlich ist (Kim und Diamond, 2002). Bei der LTP wird die Übertragungsstärke einer Synapse erhöht. Dies geschieht, indem das afferente Axon innerhalb kurzer Zeit (z.B. eine Sekunde) mit hoher Frequenz stimuliert wird. Das hat zur Folge, dass in der Postsynapse die Sensitivität der NMDA-Rezeptoren erhöht wird und AMPA-Rezeptoren vermehrt in die Zellmembran eingebaut werden. Diese Veränderungen bleiben bei der Ratte 48 Stunden und bei der Maus 24 Stunden erhalten (Kim und Diamond, 2002).

Bei der Stressreaktion werden zahlreiche Stressmediatoren ausgeschüttet, die im vorigen Kapitel bereits zum Großteil eingeführt wurden. Man kann sie in drei Gruppen einteilen: *Monoamine*, *Neuropeptide* und *Steroid-Hormone*. Ihre Wirkungen im Gehirn sind vielfältig. Jeder Stressmediator hat einen bevorzugten zeitlichen (d.h. Wirkungszeitpunkt bezogen auf den Stressor-Beginn) und räumlichen (d.h. Wirkungsort im Gehirn und lokal auf/ in der Zelle) Wirkungsbereich (Joels und Baram, 2009).

Kurz nach Stressor-Beginn werden *Monoamine*, u.a. Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin freigesetzt. Sie können die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, sondern werden von spezifischen Neuronen direkt in das Gehirn freigesetzt (McGaugh, 2000; Schwabe et al., 2012a). Eine erhöhte Freisetzung von Monoaminen unter Stressor-Einwirkung wurde in Hippocampus, Amygdala, PFC und NAc festgestellt, wobei sie vermutlich auch in vielen weiteren Gehirnarealen stattfindet. Die Freisetzung findet innerhalb weniger Minuten statt und überdauert nur selten die gesamte Dauer der Stressor-Exposition. Monoamine aktivieren generell G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche ihrerseits unverzüglich nachgeschaltete Effektoren aktivieren. Dadurch verändert die rasch erhöhte Konzentration an Monoaminen schnell die Funktion solcher Neurone, die jene Rezeptoren exprimieren. Jedes Monoamin steuert spezifische Verhaltensreaktionen und Abläufe während einer Stressreaktion bei, z.B. bewirkt Noradrenalin, dass die visuelle Wahrnehmung nicht mehr auf

Details, sondern allgemeiner auf die Umgebung gerichtet wird, wodurch vermutlich schnell situationsgerechte Handlungen in Gang gesetzt werden. Noradrenalin spielt zudem eine zentrale Rolle bei der Regulation von Stressor-Effekten auf Lern- und Gedächtnisvorgänge (Roosendaal et al., 2009b). Dopamin verbessert das Abschätzen von Risiken und verändert Entscheidungsstrategien (Joels und Baram, 2009).

Eine große Anzahl an *Neuropeptiden* wird ebenfalls im Sekunden- bis Minuten-Bereich nach Stressor-Beginn ausgeschüttet; unter anderen CRH, Vasopressin, Urocortin, Orexin und Dynorphin. Im Folgenden werden die Wirkungen von CRH vorgestellt, welches als eines der Schlüssel-Hormone der HPA-Achse gilt. CRH wird bei Aktivierung der HPA-Achse vom PVN des Hypothalamus in die Hypophyse ausgeschüttet und entfaltet dort seine Wirkung. Aktuelle Forschungsergebnisse ergaben, dass CRH zudem in der Amygdala, dem Hippocampus und dem Locus coeruleus, einem Teil des Hirnstamms, exprimiert wird (Joels und Baram, 2009). CRH wirkt lokal und erzielt seine Effekte über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, dem CRH-Rezeptor 1 und 2 (CRHR1 und CRHR2), welche eine entgegengesetzte Wirkungsweise haben. So hat CRHR1 einen aktivierenden Einfluss auf die HPA-Achse im Zeitrahmen von Sekunden bis Minuten. Im Gegensatz dazu setzen die Effekte von CRHR2 später ein und führen zur Deaktivierung der Stressreaktion, d.h. sie vermitteln die Erholung von der Stressreaktion und Anpassungsmechanismen für zukünftige Stressor-Expositionen (de Kloet et al., 2005). Der Einfluss auf Genexpression und Verhalten hängt von der Menge an CRH und dem Wirkungsort im Gehirn ab. Z.B. führt die Stress-bedingte CRH-Freisetzung in der Amygdala dazu, dass die Erinnerung verbessert ist; ein akuter Stressor verbessert ebenfalls Funktionen des Hippocampus, wohingegen ein chronischer Stressor zum Verlust der Dornenfortsätze auf den Dendriten der hippocampalen Pyramidenzellen führt (Joels und Baram, 2009).

*Steroide*, insbesondere Corticosteroide, sind die dritte Gruppe der Stressmediatoren, die während der Stressreaktion in Aktion treten. Corticosteroide (lat. *cortex* = Rinde, gr. *stereos* = fest) werden in der Nebennierenrinde gebildet (Hanser et al., 2000). Zu den Corticosteroiden zählen die Glucocorticoide, die aufgrund ihrer tiefgreifenden Effekte auf den Glucose-Metabolismus als solche bezeichnet werden. Beispielsweise wirken sie beim Umbau von Proteinen zu Glucose mit, unterstützen die Fettmobilisation für die

Energiegewinnung, erhöhen die Durchblutung und beeinflussen Funktionen des Gehirns (Carlson, 2007). Das für die Stressreaktion bedeutendste Glucocorticoid ist beim Menschen Cortisol und bei der Ratte und Maus Corticosteron (Meyer und Quenzer, 2005). Corticosteroide können als lipophile Moleküle die Blut-Hirn-Schranke passieren und gelangen über das Blutgefäßsystem in das gesamte Gehirn, anders als die lokal begrenzt ausgeschütteten Monoamine und Neuropeptide. Jedoch wirken sie nur in jenen Gehirnarealen, die Corticosteroid-Rezeptoren exprimieren (Joels und Baram, 2009). Corticosteroide binden im Gehirn vor allem in Strukturen des limbischen Systems (Hippocampus, Amygdala) an drei verschiedene Arten von Corticosteroid-Rezeptoren. Aufgrund ihrer Lipophilie diffundieren sie mühelos durch die Zellmembran und binden an zwei intrazellulär vorkommende Rezeptoren, an den Mineralocorticoid- (MR) und den Glucocorticoid-Rezeptor (GR). Der dritte Rezeptor ist bislang noch nicht identifiziert und befindet sich in der Zellmembran, wo er vermutlich an ein G-Protein gekoppelt ist (de Kloet et al., 2005; Groeneweg et al., 2012). Die intrazellulären GR und MR sind Liganden-gesteuerte Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung an Corticosteroide in den Zellkern wandern und dort die Gentranskription beeinflussen. Diese genomischen Prozesse setzen langsam ein und daraus folgende physiologische Reaktionen treten frühestens nach 15 Minuten, meist erst nach ein bis 24 Stunden auf (de Kloet et al., 2005; Joels und Baram, 2009; Groeneweg et al., 2012). Diesen langsamen genomischen Prozessen gehen schnelle nicht genomische Prozesse voraus. Die meisten schnellen nicht-genomischen Prozesse werden durch die bereits vorgestellten Monoamine und Neuropeptide ausgelöst, z.B. erhöhter Blutfluss zu Muskeln und Herz, Hemmung des Immunsystems und Modulation kognitiver Prozesse (Groeneweg et al., 2012). Darüber hinaus gibt es im Gehirn auch schnelle nicht-genomische Prozesse, die von Corticosteroiden gesteuert werden. Sie setzen bereits nach Sekunden oder Minuten ein und sind bislang noch kaum erforscht. Dazu gehört zum einen die Eigenschaft von Corticosteron die Hormonfreisetzung durch das Gehirn sehr rasch zu steuern; so inhibiert es über negative Rückkopplung die Freisetzung von CRH und somit auch seine eigene Freisetzung innerhalb von 5 bis 15 Minuten (Groeneweg et al., 2012). Und zum anderen vermittelt Corticosteron schnelle Anpassungen im Verhalten und im Gedächtnis, z.B. führt die Verabreichung von Corticosteron bei Ratten dazu, dass sie sich in einer neuen Umgebung schneller fortbewegen (Sandi et al., 1996), oder, dass sie das Risiko sich in einer neuen Umgebung zu bewegen, höher einschätzen (Mikics et al., 2005). Diese

schnellen nicht-genomischen Effekte sind unabhängig von der Gentranskription und der Proteinsynthese. Sie werden durch membranständige MR und GR und/oder einen noch unbekanntem Corticosteroid-Rezeptor in der Membran vermittelt. Insgesamt befindet sich nur ein geringer Anteil der GR und MR in der Zellmembran, der Großteil der Rezeptoren befindet sich im Zytoplasma (vermutlich 90 bis 95 Prozent). Das Vorkommen der Rezeptoren in der Zellmembran ist wichtig, da manche Bindungspartner der Corticosteroide nur an der Zellmembran verfügbar sind. Welche Signalwege die membranständigen Rezeptoren aktivierten ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich sind die Kinasen ERK (siehe Kapitel 6.3.5) und Proteinkinase A und C von Bedeutung (Groeneweg et al., 2012).

Anders als die schnellen nicht-genomischen Prozesse der Corticosteroide sind ihre langsamen genomischen Prozesse gut erforscht und werden im Folgenden genauer erläutert. Langsame genomische Prozesse werden durch die beiden intrazellulär vorkommenden MR und GR vermittelt, welche einen zehnfachen Unterschied in der Affinität für Corticosteroide aufweisen. Bereits geringe Mengen an Corticosteroiden aktivieren die hoch affinen MR, wodurch z.B. die Stressreaktion in Gang gehalten wird. GR werden durch große Mengen an Corticosteroiden erst im späteren Verlauf der Stressreaktion aktiviert. Sie bewirken auch, dass die Stressreaktion wieder beendet wird und dass sich der Organismus von der Stressreaktion erholt (de Kloet et al., 2005). MR sind hoch exprimiert im Hippocampus und weniger stark in Amygdala, PVN und Locus coeruleus. GR hingegen sind im gesamten Gehirn zu finden, jedoch kommen sie vermehrt im Hippocampus und PVN vor (de Kloet et al., 2005; Joels und Baram, 2009).

Diffundieren Corticosteroide in die Zelle, so binden sie an MR oder GR, wodurch der multimere Proteinkomplex dissoziiert (Abbildung 6-21a). Dadurch wird der Ligand-Rezeptor-Komplex frei, welcher Hetero- oder Homodimere bildet. Diese binden an das *glucocorticoide response element* (GRE) und rekrutieren Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren. Dagegen interagieren Ligand-GR Monomere mit Stress-induzierten Transkriptionsfaktoren oder anderen Proteinen, um deren Transkriptionsaktivität zu hemmen und somit die Stressreaktion wieder zu beenden. Die translatierten Proteine verändern z.B. die Erregbarkeit der Zellmembran von Nervenzellen, indem sie die Funktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Ionenkanälen, ionotropen Rezeptoren und Ionenpumpen beeinflussen (Abbildung 6-21b) (de Kloet et al., 2005).

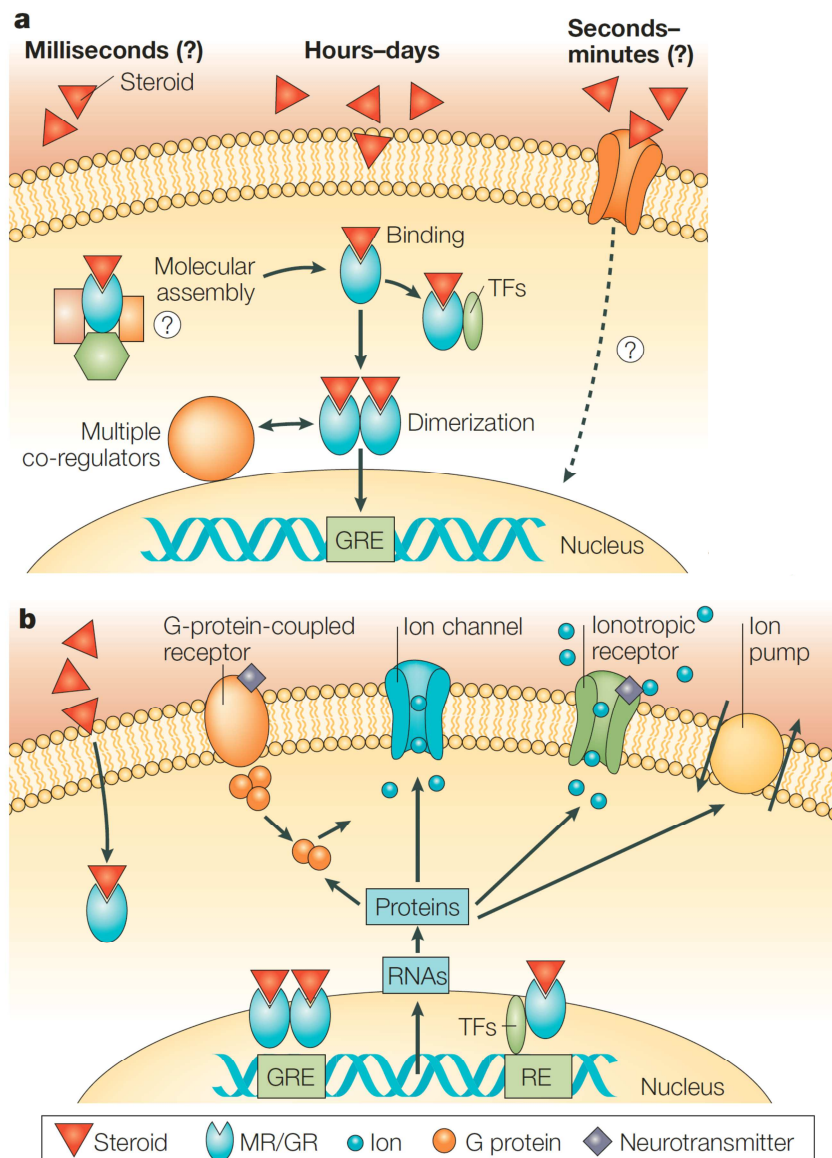


Abbildung 6-21: Signaltransduktion der MR und GR in limbischen Neuronen. Teilabbildung **(a)** Der multimere Proteinkomplex dissoziiert durch Bindung eines Corticosteroids und gibt den Steroid-MR/GR Komplex frei. Dieser bildet Hetero- oder Homodimere, die an das *glucocorticoid response element* (GRE) binden und Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren rekrutieren. Steroid-GR-Monomere interagieren mit Stress-induzierten Transkriptionsfaktoren (TFs) oder anderen Proteinen und hemmen deren Transkriptionsaktivität. Teilabbildung **(b)** Die translatierten Proteine beeinflussen die Funktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Ionenkanälen, ionotropen Rezeptoren und Ionenpumpen, wodurch sie die Erregbarkeit der Zellmembran verändern. Abkürzungen: RE: *response element*, RNAs: Ribonukleinsäuren. Abbildung aus de Kloet et al., 2005.

Epigenetische Studien haben gezeigt, dass die Expression der GR im Hippocampus variieren kann. So führt beispielsweise die intensive Fellpflege durch das Muttertier beim Nachwuchs von Ratten dazu, dass dieser viele GR im Hippocampus exprimiert. Dadurch ist die negative Rückkopplung der HPA-Achse erhöht und bei einer Stressreaktion wird die Ausschüttung von Corticosteron stärker gehemmt. Mit anderen Worten kann fürsorglich gepflegter Nachwuchs einen Stressor schneller und effektiver bewältigen (Hyman, 2009). Andererseits kann ein

Stressor Funktionen des Hippocampus auch beeinträchtigen und damit die Bildung deklarativer Gedächtnisinhalte beim Menschen, bzw. kontextbezogener/ räumlicher Erinnerungen bei der Ratte stören. So ist beispielsweise bei Patienten mit PTSD der Hippocampus verkleinert und sie haben Defizite bei Hippocampus-abhängigen Aufgaben (Kim und Diamond, 2002).

Jeder der vorgestellten Stressmediatoren hat einen bevorzugten zeitlichen und räumlichen Freisetzung- und Aktionsradius. Dadurch ergibt sich eine Vielzahl an zeitlichen und räumlichen Faktoren, die bei der Stressreaktion exakt abgestimmt zusammenspielen, ähnlich wie es beim Zusammenspiel der verschiedenen Instrumente eines Orchesters ist (Joels und Baram, 2009).

*Zeitliche Domänen.* Die klassische zeitliche Einteilung unterteilt die Stressreaktion in eine erste schnelle „Welle“ von Effekten und eine zweite langsamer einsetzende Welle. Die erste Welle wird ausgelöst durch Noradrenalin, Serotonin, Dopamin und CRH. Sie führt u.a. zur erhöhten Aufmerksamkeit des Individuums und ggfs. zur Auslösung von Verhaltensreaktionen. Die lokal erhöhte Konzentration an Stressmediatoren der ersten Welle ist kurzlebig und die erzeugten Effekte lassen rasch nach. Dagegen ist die zweite Welle von Effekten länger anhaltend. Sie wird durch Corticosteroide ausgelöst und beeinflusst die Gedächtnisbildung durch Änderungen von Genexpression und zellulären Funktionen (Joels und Baram, 2009).

Neue Forschungserkenntnisse zeigen jedoch, dass eine zeitliche Einteilung in drei Domänen (Abbildung 6-22) die Stressreaktion besser beschreibt als die der zwei Wellen. Demnach setzen Effekte an Synapsen innerhalb von Sekunden bis Minuten ein. Danach beginnen Effekte von Stressmediatoren, die als Transkriptionsfaktoren agieren und innerhalb von Minuten bis Stunden einsetzen. Zuletzt setzen genomische und strukturelle Effekte ein, die von Stunden bis zu Tagen und Monaten anhalten können. Jeder Stressmediator hat zwar eine bevorzugte zeitliche Domäne, allerdings kann er auch in den jeweils anderen Domänen agieren (Joels und Baram, 2009). Beispielsweise hat Corticosteron bevorzugt späte genomische Effekte, die nach Stunden oder Tagen einsetzen, jedoch hat es auch schnelle nicht-genomische Effekte an Synapsen innerhalb von Minuten (de Kloet et al., 2008a).



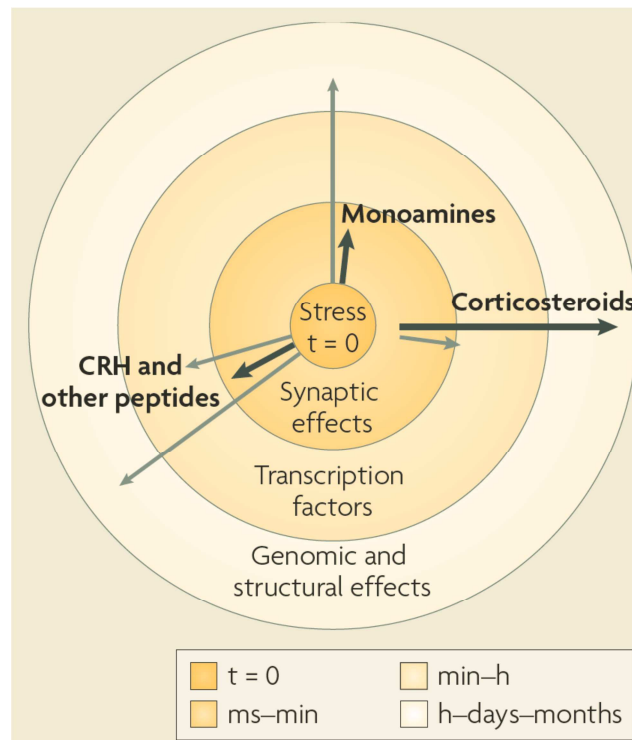


Abbildung 6-22: Die drei zeitlichen Domänen der Stressreaktion. Die konzentrischen Kreise zeigen die zellulären Funktionen, die nach Stressbeginn in drei Zeitrastern einsetzen. Die dicken schwarzen Pfeile stellen die bevorzugte zeitliche Domäne eines Stressmediators und dessen zellulären Effekte dar (z.B. hat CRH Effekte an Synapsen innerhalb von Sekunden bis Minuten). Die grauen Pfeile zeigen weitere zeitliche Domänen eines Stressmediators (z.B. agiert CRH als Transkriptionsfaktor nach Minuten bis Stunden). Die Effekte von Corticosteron setzen zeitlich etwas später ein als die der Monoamine und Peptide, da Zeit vergeht, bis das Hormon von den Nebennieren über das Blutsystem ins Gehirn transportiert ist, wo es letztlich wirkt. Abbildung aus Joels und Baram, 2009.

*Räumliche Domänen.* Der bevorzugte Freisetzungs- und Aktionsradius von Stressmediatoren wird nicht nur durch den Faktor Zeit bestimmt, sondern auch durch den Faktor Raum. Erstens werden Stressmediatoren an spezifischen Orten im Gehirn freigesetzt, wie z.B. die beschriebenen Monoamine und Neuropeptide. Auch beeinflussen ins Blutsystem freigesetzte Stressmediatoren nur jene Gehirnareale, welche die passenden Rezeptoren exprimieren. Zweitens sind die Rezeptoren auf/ in der einzelnen Zelle lokal unterschiedlich verteilt; so befinden sich GR hauptsächlich im Zellkörper und Zellkern, während sich Noradrenalin-Rezeptoren vor allem auf den Dendriten befinden (Joels und Baram, 2009).

#### 6.4.5 STRESSREAKTION – LERNEN UND GEDÄCHTNIS

Wird ein Individuum im Rahmen eines Lernvorgangs<sup>5</sup> einem Stressor ausgesetzt, kann dies sowohl positive als auch negative Wirkungen auf das Verhalten und die Gedächtnisbildung haben. Die Wirkungen hängen vor allem von zwei Faktoren ab: erstens wann die Stressor-Darbietung bezüglich des Lernvorgangs stattfindet, d.h. vor oder nach dem Lernen, und zweitens welche Gehirnareale der Stressor beeinflusst und welche Schaltkreise des Gehirns den Lernvorgang steuern. Man spricht im ersten Fall von der zeitlichen Konvergenz zwischen Stressor und Lernvorgang und im zweiten Fall von der räumlichen Konvergenz zwischen Stressmediatoren und neuraler Aktivität (Joels et al., 2006).

*Zeitliche Konvergenz von Stressor und Lernvorgang.* Ein Lernvorgang besteht aus mehreren Phasen. Vereinfacht kann man ihn einteilen in (1) Informationsaufnahme, (2) Gedächtnisbildung und (3) Informationsabruf. Ein Stressor wirkt sich auf die jeweiligen Phasen eines Lernvorgangs unterschiedlich aus.

Trifft ein Stressor mit dem Beginn eines Lernvorgangs zusammen, so sind während der Informationsaufnahme zusätzlich Stressmediatoren im Gehirn aktiv. Dabei spielen vor allem die Wirkungen des zu Beginn der Stressreaktion rasch ausgeschütteten Noradrenalins und die schnell einsetzenden nicht-genomischen Effekte der Glucocorticoide eine wichtige Rolle. In dieser Phase verstärken die Stressmediatoren die neuronalen Vorgänge, die während der Informationsaufnahme stattfinden (Abbildung 6-23B). Mit anderen Worten führt die Stressor-Darbietung zu Beginn des Lernvorgangs dazu, dass die Informationsaufnahme und auch die Gedächtnisbildung und spätere Erinnerung des Gelernten verbessert sind (Joels et al., 2006; Schwabe et al., 2012a). Es gibt allerdings auch Studien, die bei Stressor-Darbietung vor der Informationsaufnahme von einer Beeinträchtigung der späteren Erinnerung berichten (Diamond et al., 2006; Schwabe und Wolf, 2009; Schwabe et al., 2011a).

Wird dagegen der Stressor zu einem späteren Zeitpunkt während eines Lernvorgangs wirksam, nämlich vor dem Informationsabruf, so blockieren die raschen Wirkungen von Noradrenalin und die der Glucocorticoide den Abruf der Erinnerung (Abbildung 6-23C). Ebenso ist bei Stressor-Darbietung lange vor dem Lernvorgang, z.B. eine Stunde vorher, die

---

<sup>5</sup> Zur sprachlichen Vereinfachung wird hier und nachfolgend „Lernvorgang“ anstelle von „Lern- und Gedächtnisvorgang“ verwendet.

Informationsaufnahme durch die bereits einsetzenden langsamen genomischen Wirkungen der Glucocorticoide blockiert (Abbildung 6-23A) (Schwabe et al., 2012a).

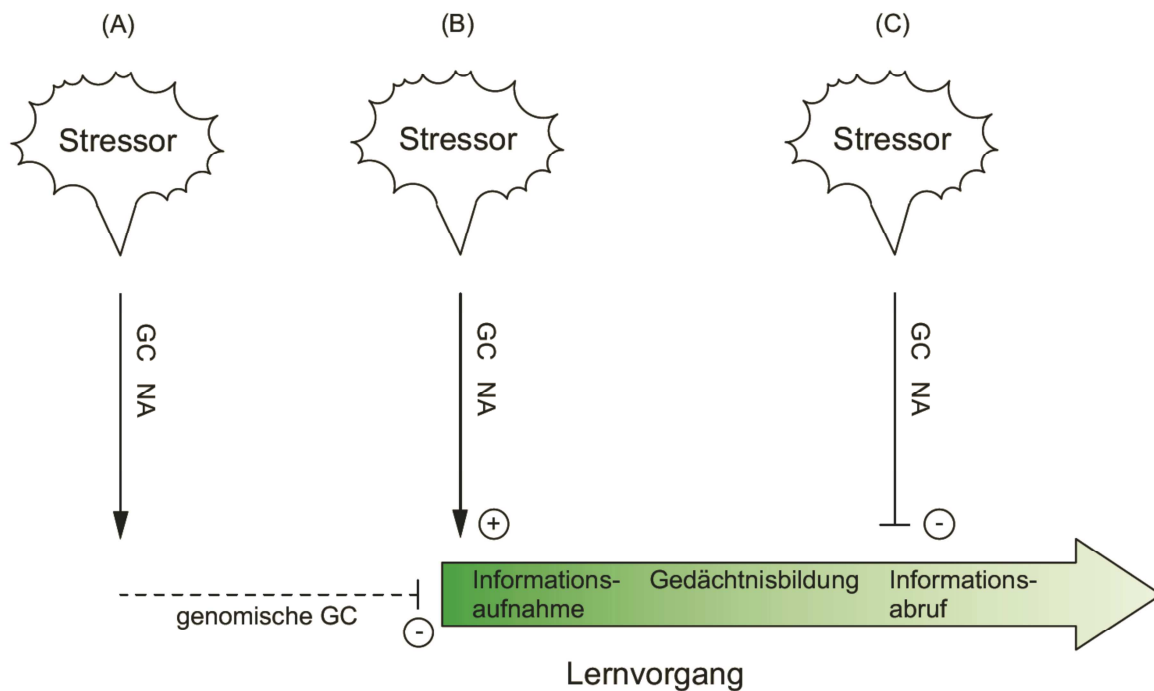


Abbildung 6-23: Dargestellt sind die unterschiedlichen Wirkungen eines Stressors zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Lernvorgangs. (B): Trifft ein Stressor mit dem Beginn des Lernvorgangs zusammen, so verstärken freigesetzte Glucocorticoide (GC) und Noradrenalin (NA) die Informationsaufnahme, Gedächtnisbildung und den nachfolgenden Informationsabruf. (C): Wird ein Stressor vor dem Informationsabruf wirksam, so blockieren GC und NA diesen. (A): Wird ein Stressor lange vor Beginn des Lernvorgangs wirksam, so blockieren die bereits einsetzenden langsamen genomischen Wirkungen der GC die Informationsaufnahme. Abbildung modifiziert nach Schwabe et al., 2012a.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese vorgestellten gegensätzlichen Wirkungen eines Stressors auf die jeweiligen Phasen eines Lernvorgangs ein gemeinsames Ziel verfolgen können. Die Antwort ist: ja. Betrachtet man mehrere voneinander unabhängige Lernvorgänge, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten begonnen haben, so sind die Wirkungen eines Stressors darauf ausgerichtet, das mit dem Stressor in Bezug stehende Ereignis so exakt wie möglich zu erfassen und abzuspeichern und zugleich andere Lernvorgänge zu blockieren. Findet demzufolge die Stressor-Darbietung zu Beginn des Lernvorgangs, d.h. vor, während oder nach der Informationsaufnahme statt, so steht der Stressor sozusagen im Kontext dieses Lernvorgangs und die zugehörigen Lern- und Gedächtnisprozesse werden durch Noradrenalin und Glucocorticoide verstärkt (Abbildung 6-24). Dagegen werden andere Lernvorgänge blockiert, bei denen der Stressor nicht im Kontext steht, sodass sie nicht mit der Gedächtnisbildung des im Kontext stehenden Lernvorgangs interferieren. Dies ist dann

der Fall, wenn ein Lernvorgang bereits begonnen hat und der Stressor erst am Ende desselbigen, d.h. vor dem Informationsabruf, wirksam wird. Dabei wird der Informationsabruf von den raschen Wirkungen der Glucocorticoide und von Noradrenalin blockiert. Ebenso wird ein Lernvorgang, der einige Zeit nach Stressor-Darbietung beginnt, durch die bereits einsetzenden langsamen genomischen Wirkungen der Glucocorticoide blockiert (Abbildung 6-24) (Rooszendaal, 2002; Schwabe et al., 2012a).

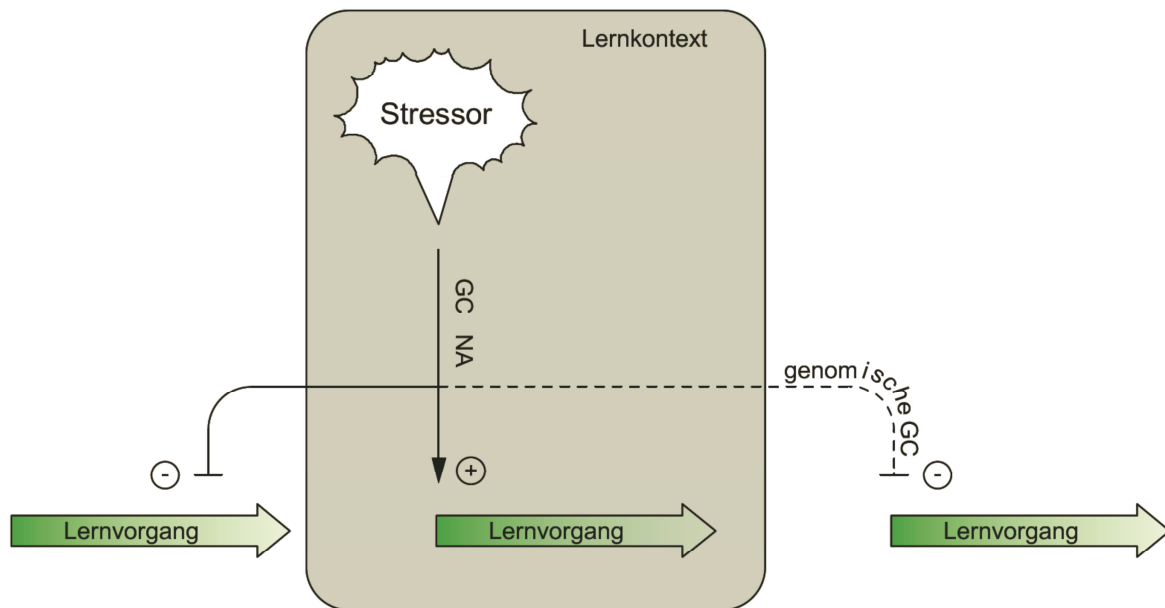


Abbildung 6-24: Dargestellt sind die unterschiedlichen Wirkungen eines Stressors auf verschiedene nacheinander stattfindenden Lernvorgänge. Trifft der Stressor mit dem Beginn eines Lernvorgangs zusammen, d.h. der Stressor steht im Kontext des Lernvorgangs, so verstärken freigesetzte Glucocorticoide (GC) und Noradrenalin (NA) die Informationsaufnahme, Gedächtnisbildung und den nachfolgenden Informationsabruf. Hingegen werden andere nicht im Kontext stehende Lernvorgänge blockiert. Dies gilt sowohl für bereits vor Stressor-Darbietung begonnene Lernvorgänge, die durch GC und NA blockiert werden, als auch für zu späteren Zeitpunkten beginnende Lernvorgänge, die durch langsame genomische Wirkungen der GC blockiert werden. Abbildung modifiziert nach Schwabe et al., 2012a.

Ein Beispiel soll diese Zusammenhänge verdeutlichen: befinden sich Personen in einer Prüfung, so erinnern sie sich manchmal nicht an zuvor gelernte Informationen (Informationsabruf ist blockiert), dagegen prägt sich ihnen die aktuelle peinliche Situation stark ein (verstärkte Informationsaufnahme und Gedächtnisbildung). Eine solche Konkurrenz zwischen früher gelernten Informationen und aktuellen Lernvorgängen muss nicht immer unvorteilhaft sein (Joels et al., 2006). So ist es z.B. für ein Kaninchen auf der Futtersuche, das vor einem Fuchs flüchtet, irrelevant sich daran zu erinnern wo es Karotten finden kann, jedoch sollte es sich gut einprägen, wo es den Fuchs getroffen hat, um zukünftig diesen Ort zu meiden.

*Räumliche Konvergenz von Stressmediatoren und neuraler Aktivität.* Die Wirkungsweise eines Stressors auf Verhaltens- und Gedächtnisfunktionen hängt auch davon ab, ob die ausgeschütteten Stressmediatoren in jenen Lernsystemen im Gehirn wirken, die am betreffenden Lernvorgang beteiligt sind (Joels et al., 2006).

Wie bereits erwähnt kann man Stressoren in zwei Gruppen einteilen: die physischen und die psychologischen. Physische Stressoren stellen für den Organismus eine akute Lebensbedrohung dar, wie z.B. ein verminderter Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut (Hypoxie), und aktivieren auf direktem Weg den PVN und niedere Hirnstammssysteme. Damit bewirken sie eine schnelle Aktivierung der Stressreaktion ohne vorangehende langwierige kognitive Informationsauswertung. Dagegen bewirken psychologische Stressoren, z.B. eine Prüfungssituation, dass Strukturen des limbischen Systems, wie Hippocampus, PFC oder Amygdala, aktiviert werden. Diese Stressoren stellen keine akute Lebensbedrohung dar und erfordern die Auswertung vieler sensorischer Informationen bevor die Stressreaktion gestartet wird (Herman und Cullinan, 1997; Joels et al., 2006). Da psychologische Stressoren Strukturen des limbischen Systems aktivieren, eignen sie sich besonders gut zur Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf Lernvorgänge, die ihrerseits ebenfalls limbische Strukturen aktivieren. Um Funktionen des Hippocampus, der das räumliche oder deklarative Gedächtnis vermittelt, unter Laborbedingungen zu untersuchen werden in der Regel Testaufgaben im Labyrinth verwendet. Beispielsweise ergab eine Untersuchung an Ratten im strahlenförmigen Arm-Labyrinth, dass diese nach Darbietung des starken Stressors „Katze“, also einem Fressfeind, Schwierigkeiten hatten den korrekten Ziel-Arm zu finden. Hingegen war ein schwacher psychologischer Stressor, der einen Zustand der erhöhten Aufmerksamkeit erzeugt, ohne Wirkung (Woodson et al., 2003). Dieses Beispiel zeigt, dass der starke Stressor „Katze“ während des Lernvorgangs Funktionen des Hippocampus beeinträchtigte; d.h. im Hippocampus hatte eine räumliche Konvergenz von Stressmediatoren und neuronaler Aktivität stattgefunden. Der zugrunde liegende zelluläre Mechanismus ist vermutlich die LTP, die maßgeblich für die Speicherung von Erinnerungen im Hippocampus verantwortlich ist. Die LTP wird hauptsächlich über Corticosteron moduliert, das bei Darbietung eines starken Stressors in hoher Konzentration ausgeschüttet wird. Die große Menge an Corticosteron aktiviert GRn, welche die LTP reduzieren und damit die Speicherung von Erinnerungen verschlechtern (Kim und Diamond, 2002). Dieser Zusammenhang zwischen GR-Aktivität und LTP im Hippocampus konnte auch in einer Studie

gezeigt werden, in welcher durch Verabreichung des GR-Antagonisten RU38486 die Stressbedingte Blockade der LTP verhindert wurde (Xu et al., 1998). Dagegen führt ein schwacher Stressor, der eine geringe Erhöhung der Corticosteron-Konzentration verursacht, zur Aktivierung der MRs und erhöht damit die LTP (Kim und Diamond, 2002). Je nach Stärke des Stressors können folglich Funktionen des Hippocampus und damit die Speicherung von Erinnerungen verschlechtert oder verbessert sein.

Funktionen des PFC, welcher das Arbeitsgedächtnis vermittelt und an der Handlungssteuerung beteiligt ist, werden ebenfalls durch Stressoren beeinflusst. Hierbei ist vor allem die Konzentration an präfrontalem Noradrenalin und Dopamin entscheidend. Beide Stressmediatoren haben einen invertiert U-förmigen Einfluss auf Funktionen des PFC, d.h. sowohl eine zu geringe als auch eine zu hohe Menge an Noradrenalin oder Dopamin führt zu Beeinträchtigungen; nur eine mittlere Konzentration stellt PFC-Funktionen optimal ein.

Ein starker Stressor aktiviert zudem die Amygdala, welche noradrenerge Neurone im Hirnstamm und dopaminerge Neurone im Mittelhirn aktiviert. Dadurch werden wiederum PFC-Funktionen gehemmt. Infolgedessen wird die Verhaltenssteuerung durch den PFC gehemmt und der Einfluss der Amygdala wird stärker, womit vermehrt schnelle simple Reaktionen auftreten (Arnsten, 2009). Beispielsweise zeigte eine Studie an Ratten, dass ein starker akuter Stressor zu Beeinträchtigungen in einer Testaufgabe führte, die PFC-gesteuertes flexibles Handeln der Tiere erforderte. Die Tiere hatten nach Stressor-Darbietung Schwierigkeiten eine neue Handlungsstrategie zu lernen, d.h. im PFC hatte die räumliche Konvergenz von Stressmediatoren und neuraler Aktivität stattgefunden (George et al., 2015). Darüber hinaus führt chronischer Stress zur Atrophie (Gewebeschwund) des PFC (Cerqueira et al., 2007).

Die BLA vermittelt emotionale Aspekte eines Lernvorgangs und wird ebenfalls durch Einwirkung eines Stressors beeinflusst. Ein Stressor führt zur Freisetzung von Noradrenalin in die BLA. Zudem passieren die bei der Stressreaktion systemisch freigesetzten Glucocorticoide die Blut-Hirn-Schranke und binden in der BLA an Corticosteroid-Rezeptoren (Roosendaal, 2000; Roosendaal et al., 2009b). In einer Studie an Ratten wurde aufgezeigt, dass sowohl Noradrenalin als auch Glucocorticoide zugleich in der BLA präsent sein müssen, um die Gedächtnisbildung zu beeinflussen. In der verwendeten Testaufgabe wurden Ratten ein bekanntes und ein unbekanntes Objekt präsentiert. Auf diese Weise wurde geprüft, ob

sie das bekannte Objekt wiedererkennen, was sich daran zeigt, dass sie sich längere Zeit beim unbekanntem Objekt aufhalten. Die anschließende Verabreichung von Corticosteron in Kombination mit Yohimbin; einem  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Antagonisten, der die Noradrenalin Konzentration im Gehirn erhöht; verbesserte die Gedächtnisbildung (Roosendaal et al., 2006b). Mit anderen Worten hatte in der BLA die räumliche Konvergenz von Stressmediatoren (Noradrenalin und Corticosteron) und neuraler Aktivität (Erkennung und Speicherung des neuen Objektes) stattgefunden.

Außerdem moduliert die BLA Funktionen des Hippocampus, des PFC und des Striatums. Demgemäß ist die Interaktion der BLA mit dem Hippocampus von großer Bedeutung für die beeinträchtigende Wirkung eines Stressors auf den Abruf von räumlichen oder deklarativen Informationen (Kim und Diamond, 2002). Ebenso spielt die Interaktion der BLA mit dem PFC eine wichtige Rolle bei der Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses durch einen Stressor (Arnsten, 2009). Diese blockierenden Auswirkungen der BLA auf deklarative Lernvorgänge und das Arbeitsgedächtnis sind darauf ausgerichtet die aktuellen Informationen korrekt zu speichern, ohne dass letztere durch Informationen anderer Lernvorgänge gestört und verändert werden (de Quervain et al., 2009; Roosendaal et al., 2009b).

*Stressor-Wirkungen bei instrumentellen Handlungen.* Ein Stressor beeinflusst auch instrumentelle Handlungen, indem er die Funktionsweise des Striatums verändert. So bewirkt ein Stressor die Verschiebung von DMS-gelenktem zielgerichtetem Handeln hin zu DLS-gelenktem automatisiertem Handeln (Schwabe und Wolf, 2013). Dies zeigen sowohl Studien an Menschen unter akutem Stressor-Einfluss (Schwabe und Wolf, 2009, 2010c) als auch eine Studie an chronisch gestressten Ratten (Dias-Ferreira et al., 2009). Eine weitere Studie zeigte, dass die gleichzeitige Aktivität von Corticosteron und Noradrenalin für diese Verschiebung von zielgerichteter zu automatisierter Handlungsstrategie entscheidend ist (Schwabe et al., 2012b). Überdies verändern sich unter chronischem Stressor-Einfluss zelluläre Strukturen, sodass die Zellvernetzung in Strukturen des zielgerichteten Systems wie PFC und DMS abnimmt und dagegen in Strukturen des Gewohnheitssystems wie dem DLS zunimmt (Dias-Ferreira et al., 2009). Solche zellulären Veränderungen sind vermutlich nur unter chronischem und nicht unter akutem Stressor-Einfluss zu erwarten (Schwabe et al., 2012a). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass eine chronische Stressor-Darbietung

solches instrumentelles Handeln beeinträchtigt, welches durch einen konditionierten Stimulus gesteuert wird (Morgado et al., 2012).

#### 6.4.6 STRESSOREN IM LABOR

*Stressoren beim Mensch.* In der aktuellen Fachliteratur werden hauptsächlich zwei Stressoren verwendet, um beim Menschen unter Laborbedingungen eine Stressreaktion auszulösen. Eine Möglichkeit ist die kombinierte Verabreichung von Hydrocortison und Yohimbin in Form von Tabletten. Hydrocortison ist ein synthetisches Glucocorticoid, das die systemische Cortisol-Konzentration erhöht. Yohimbin ist ein  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Antagonist, der die Noradrenalin-Konzentration im Gehirn erhöht. Als biochemische Messgröße für die Auslösung einer Stressreaktion dient zum einen die Cortisol-Konzentration im Speichel, welche ein Indikator für die Aktivität der HPA-Achse ist, und zum anderen der Blutdruck als indirekte Messgröße für die Aktivität des SAM-Systems (Schwabe et al., 2010b, 2012b). Die zweite Möglichkeit eine Stressreaktion auszulösen ist mittels des sog. *socially evaluated cold-pressor test* (SECP), einem sozialen Stressor. Dabei hält ein Proband seine Hand in eiskaltes Wasser, während ihm eine unbekannte Person gegenüber sitzt und die Situation per Videokamera aufgezeichnet wird. Das kalte Wasser aktiviert das SAM-System und führt zur Erhöhung des Blutdrucks, während die soziale Komponente des Stressors (unbekannte Person mit Kamera) die HPA-Achse aktiviert, gemessen an einer erhöhten Cortisol-Konzentration im Speichel (Schwabe et al., 2008).

*Stressoren bei der Ratte.* In der Fachliteratur sind zahlreiche Stressoren für die Auslösung einer Stressreaktion bei der Ratte bekannt. Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen: pharmakologische, physische und psychologische Stressoren. Pharmakologische Stressoren sind Wirkstoffe, die entweder systemisch verabreicht werden oder lokal in bestimmte Gehirnregionen injiziert werden und durch Bindung an Rezeptoren eine Stressreaktion des Körpers hervorrufen. Dies sind beispielsweise Dexamethason, ein synthetisches Glucocorticoid (Roozendaal et al., 1999); RU 28362, ein GR-Agonist (Roozendaal et al., 2003; Roozendaal et al., 2009a); Corticosteron (Roozendaal et al., 2004b) oder Yohimbin, ein  $\alpha_2$ -Adrenozeptor Antagonist, der die Freisetzung von Noradrenalin im Gehirn aktiviert (Abercrombie et al., 1988; Schwager et al., 2014). Die zeitgleiche Aktivierung der HPA-Achse und des SAM-Systems hat sich als am wirkungsvollsten erwiesen. Dies kann beispielsweise



durch die kombinierte Verabreichung von Corticosteron und Yohimbin, erreicht werden (Roozendaal et al., 2006a; Roozendaal et al., 2006b; Schwabe et al., 2010b). Physische Stressoren stören die Homöostase und versetzen den Körper in einen solchen Zustand, der eine Stressreaktion auslöst. Das ist z.B. Blutverlust oder die Verabreichung von Interleukin-1 $\beta$ , welches eine Immunreaktion auslöst (Dayas et al., 2001). Die psychologischen Stressoren beinhalten immer auch eine physische Komponente und sind daher nicht gänzlich von letzteren zu trennen. Einige Beispiele sind ein lautes Geräusch (Dayas et al., 2001), schwimmen in Wasser (Dayas et al., 2001; Rittenhouse et al., 2002), Darbietung eines Fressfeindes, z.B. Katze (Woodson et al., 2003; Park et al., 2008), Immobilisierung auf einer kleinen erhöhten Plattform (Wong et al., 2007; Howland und Cazakoff, 2010; Sardari et al., 2014) oder Immobilisierung in einer Röhre (Keim und Sigg, 1977; Dayas et al., 2001; Sadowski et al., 2009). Die Effektivität der Immobilisierung einer Ratte in der Röhre hängt ab von der Tageszeit; so ist sie während der Aktivitätsphase (Dunkelphase) stärker ausgeprägt als während der Ruhephase (Perez-Cruz et al., 2009).

Werden die vorgestellten Stressoren bei der Ratte ein- bis dreimal dargeboten, so bezeichnet man sie als „akute Stressoren“. Bei länger andauernder Stressor-Darbietung spricht man von „chronischen Stressoren“. Ein chronischer Stressor ist z.B. der Aufenthalt in einem 4-6°C kalten Raum während drei bis vier Wochen (Finlay et al., 1995) oder die tägliche Darbietung eines von mehreren Stressoren in randomisierter Reihenfolge während drei bis vier Wochen (Cerqueira et al., 2007; Dias-Ferreira et al., 2009; Morgado et al., 2012).

*Blockade von Stressor-Wirkungen bei der Ratte.* Die Wirkungen akuter Stressoren auf physische und kognitive Funktionen können mittels pharmakologischer Wirkstoffe zumindest teilweise blockiert werden. Dafür werden Wirkstoffe aus verschiedenen Wirkstoffgruppen eingesetzt. Eine Gruppe sind die Anxiolytika, z.B. Diazepam, welches die Stress-bedingt erhöhte Corticosteron- und Dopamin-Konzentration reduziert (Keim und Sigg, 1977; Finlay et al., 1995; Kalman et al., 1997), oder auch Midazolam, welches den inhibitorischen Einfluss der GABAA-Rezeptoren erhöht und damit Stressor-Effekte blockiert (Giachero et al., 2015). Es werden auch Antipsychotika, z.B. Haloperidol, oder Betäubungsmittel, z.B. Phenobarbital, eingesetzt, die beide eine Reduktion der Stressor-bedingt erhöhten Corticosteron-Menge bewirken (Keim und Sigg, 1977). Eine häufig verwendete Wirkstoffgruppe stellen die sog. Betablocker dar, die  $\beta_1$ - und/oder  $\beta_2$ -

Adrenozeptoren blockieren und damit die Noradrenalin-Freisetzung reduzieren. Dies sind z.B. Propranolol (Roozendaal et al., 2004a; Roozendaal et al., 2006b), Atenolol (Roozendaal et al., 1999) oder Betaxolol (Stone et al., 1996; Cecchi et al., 2002; Ramos et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit ist die Blockade von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren durch Benoxathian (Cecchi et al., 2002) oder die Blockade von NMDA-Rezeptoren durch Ro25-6981 (Howland und Cazakoff, 2010).

### 6.4.7 AKUTE STRESSOR-WIRKUNGEN BEI MENSCHEN

Wie sich ein akuter Stressor auf instrumentelle Handlungen eines Menschen auswirkt, kann man im Labor untersuchen. Eine geeignete Testaufgabe hierfür ist der Ergebnisdevaluationstest, welcher überprüft, ob ein Mensch zielgerichtet oder automatisiert handelt. Als Stressor kann entweder SECPT eingesetzt oder eine Kombination von Hydrocortison und Yohimbin verabreicht werden. Bislang wurden zwei verschiedene Zeitpunkte der Stressor-Darbietung im Verlauf der Testaufgabe untersucht. Bei den meisten Studien wurde der Stressor vor Testbeginn verabreicht und nur eine Studie berichtet über die Stressor-Darbietung direkt vor dem Informationsabruf. Wird SECPT oder Corticosteron/Yohimbin vor Beginn der Testaufgabe eingesetzt, d.h. vor Beginn des Lernvorgangs, so reagieren die Probanden nicht auf Wertänderungen des Ergebnisses, d.h. sie handeln nicht zielgerichtet sondern automatisiert (Schwabe und Wolf, 2009; Schwabe et al., 2010b, 2012b). Da in diesen Studien die Stressor-Darbietung vor Beginn der Testaufgabe stattfand, lässt sich nicht eindeutig klären, ob Stressor-Effekte auf die Informationsaufnahme, d.h. das Erlernen der Handlungs-Ergebnis-Beziehung, oder auf den Informationsabruf des Gelernten ursächlich für die Beeinträchtigung gewesen sind. Eine Studie gibt Hinweise darauf, dass vor allem Stressor-Effekte auf den Informationsabruf für die Beeinträchtigung im Ergebnisdevaluationstest verantwortlich sind. Hier wurden die Probanden erst nachdem sie die Testaufgabe gelernt hatten und die Devaluationsprozedur beendet hatten, d.h. direkt vor dem Abruf im Extinktionstest, der SECPT Methode unterzogen. Auch hier war die Stressor-bedingte Verschiebung vom zielgerichteten zum automatisierten Handeln feststellbar (Schwabe und Wolf, 2010c). Die beeinträchtigenden Stressor-Wirkungen können mittels des Betablockers Propranolol blockiert werden. So bewirkte die Verabreichung von Propranolol vor Darbietung der SECPT Methode, dass die Probanden im Extinktionstest zielgerichtet handelten (Schwabe et al., 2011a).

## 6.5 FRAGESTELLUNG

Die Auswahl zielgerichteter Handlungen von Mensch und Tier beruht auf Vorhersagen, durch welche erlernten Handlungen bestimmte Ziele, z.B. verschiedene Futterbelohnungen, erreicht werden können. Dazu muss ein Individuum die ursächlichen Beziehungen zwischen Handlungen und erzielten Belohnungen (Handlungs-Ergebnis-Beziehungen) erlernen und abrufen (Balleine und Dickinson, 1998).

Aus aktuellen Untersuchungen am Mensch geht hervor, dass akuter Stress das Erlernen bzw. den Abruf gelernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen beeinträchtigt. So werden unter akutem Stress erlernte Handlungen nicht mehr zielgerichtet, sondern automatisiert und inflexibel ausgeführt (Schwabe und Wolf, 2011b). Dieses Phänomen kann man als Anpassung an Stress auffassen, denn automatisierte Handlungen werden rascher ausgeführt. Außerdem werden kognitive Ressourcen verfügbar, die möglicherweise für erhöhte Anforderungen an die Informationsaufnahme und -verarbeitung unter Stress nutzbar sind (Nelson 2005). Akuter Stress verändert also die Art und Weise wie Handlungen gelernt werden und was erinnert wird, d.h. die Qualität des Gedächtnisses.

Die neuralen und neurochemischen Mechanismen dieser akuten Stresswirkungen sind noch kaum bekannt und tierexperimentell weitgehend unerforscht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungen bestimmter akuter Stressoren auf das Erlernen und den Abruf zielgerichteter Handlungen bei der Ratte zu untersuchen.

1. Zunächst wurden instrumentelle Testaufgaben, die zielgerichtetes Handeln der Ratte erfordern, etabliert und auf ihre Eignung für den Einsatz eines akuten Stressors geprüft. Ausgewählt wurden der Ergebnisdevaluationstest (Balleine und Dickinson, 1998; Lex und Hauber, 2010b), der Kontingenzdegradationstest (Balleine und Dickinson, 1998; Lex und Hauber, 2010a) und der Unterlassungskontingenztest (Coutureau et al., 2012).
2. Danach wurden verschiedene akute pharmakologische und physische Stressoren auf ihre Anwendbarkeit in einer instrumentellen Testaufgabe untersucht.
3. Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen eines als geeignet befundenen akuten Stressors auf das Erlernen und den Abruf einer gelernten Handlungs-Ergebnis-Beziehung untersucht.

4. In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, ob die Applikation der Stressmediatoren Corticosteron und Noradrenalin ähnlich wirkt wie ein akuter physischer Stressor.
5. Zuletzt wurde untersucht, ob der mPFC das neurale Substrat der akuten Stressor-Wirkungen in instrumentellen Handlungen ist und ob Glucocorticoid-Rezeptoren im mPFC diese Wirkungen vermitteln.

Basierend auf den dargestellten Vorkenntnissen aus Studien über Stressor-Wirkungen auf instrumentelles Handeln beim Mensch wurde erwartet, dass ein akuter Stressor sowohl das Erlernen als auch den Abruf einer Handlungs-Ergebnis-Beziehung bei Ratten beeinträchtigt. Außerdem wurde erwartet, dass systemisch freigesetztes Corticosteron und Noradrenalin für die Beeinträchtigung des Erlernens und Abrufs von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen hauptverantwortlich sind. Insbesondere sollten hierbei die Wirkungen von freigesetzten Glucocorticoiden im mPFC eine entscheidende Rolle spielen.

## 7 DURCHGEFÜHRTE EXPERIMENTE

Nachfolgend sind die zur Veröffentlichung eingereichten und akzeptierten Manuskripte der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen wissenschaftlichen Daten eingebunden (S.86 - S.132). Daran anschließend sind die Ergebnisse weiterer Experimente dargestellt, die nicht veröffentlicht wurden (S.133 - S.140).

### 7.1 MANUSKRIFT 1

BRAUN S, HAUBER W (2012) STRIATAL DOPAMINE DEPLETION IN RATS PRODUCES VARIABLE EFFECTS ON CONTINGENCY DETECTION: TASK-RELATED INFLUENCES. EUR J NEUROSCI 35:486-495. DOI: 10.1111/J.1460-9568.2011.07969.X.

Dieses Manuskript beschreibt die Etablierung des Kontingenzdegradationstests.

#### BEITRÄGE DER AUTOREN

Braun S:

- Konzeption des experimentellen Designs
- Erstellung der MED-PC Programme
- Durchführung der stereotaktischen Eingriffe und Behandlungen
- Erprobung und Etablierung der Testaufgaben
- Durchführung der Testaufgaben (Kontingenzdegradationstests)
- Datenerfassung, Auswertung und Analyse
- Histologische Analyse
- Erstellung aller Abbildungen
- Schreiben und Editieren des Manuskripts

Hauber W:

- Konzeption des experimentellen Designs
- Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, Diskussion der Daten
- Unterstützung beim Schreiben und Editieren des Manuskripts

# Striatal dopamine depletion in rats produces variable effects on contingency detection: task-related influences

Stephanie Braun & Wolfgang Hauber, 2012

**Key words:** 6-hydroxydopamine, rats, cognition, instrumental conditioning, striatum

## Abstract

Dopamine (DA) depletion of the posterior dorsomedial striatum (pDMS) can impair the capability of rats to detect changes in the causal efficacy of actions. Here we sought to characterize in more detail effects of pDMS DA depletions on contingency detection as a function of different contingency degradation training protocols. In experiment 1, sham controls and rats with pDMS DA depletions received limited contingency degradation training (4 days) that involved an invariable and high degree of degradation to one of two contingencies controlling instrumental choice behaviour. Results demonstrate that lesioned rats were insensitive to contingency manipulations both during contingency degradation training and in the subsequent extinction test. Experiment 2 further indicated that rats with pDMS DA depletion subjected to extended contingency degradation training (12 days) became sensitive to contingency manipulations during the training phase but not in the subsequent extinction test. In experiment 3, an extended but more complex contingency degradation training protocol (12 days) was used that involved a gradual shift from a low to an intermediate and a high degree of contingency degradation rather than a high and invariable degree of contingency degradation as in experiment 1 and 2. Notably, lesioned rats were sensitive to contingency manipulations both during the contingency degradation training phase and in the subsequent extinction test. Thus, pDMS DA depletions can impair the capability to detect changes in the causal efficacy of actions; however, occurrence and pattern of impairments depend on the contingency degradation training protocol being used.

## Introduction

Animals as humans not only can encode the causal relationship between actions and their consequences but also detect changes in the causal efficacy of their actions (Shanks & Dickinson, 1991). For instance, in rats subjected to instrumental conditioning, post-training degradation of one of two action-outcome contingencies selectively reduced performance of the action that is no longer causal to the delivery of a reward (Balleine & Dickinson, 1998). Such a flexible control of actions in the pursuit of goals is crucial for adapting goal-directed behaviour to changing environments.

In rats, the capacity to detect changes in action-outcome contingencies is governed by a neural circuit including the prelimbic cortex (Balleine & Dickinson, 1998) and the posterior dorsomedial striatum (pDMS) (Yin *et al.*, 2005). Furthermore, this capacity depends on dopamine (DA) signalling in the pDMS (Lex & Hauber, 2010a; b). In these and many related studies, a standard behavioural protocol was used in which subjects were first trained on random ratio-schedules of reinforcement. Subsequently, the action-outcome contingency of one of two contingencies controlling instrumental behaviour was degraded during contingency degradation training with the probability of outcome delivery by pressing a lever set at  $P(O|A)=0.05$  and the probability of outcome delivery by not pressing a lever set at  $P(O|no\ A)=0.05$  (e.g., Corbit & Balleine, 2000). Thus, the experienced probability of outcome delivery should be the same, regardless if the animal performed that action or not. Thereafter, a contingency degradation test was performed in extinction to assess the memory of action-outcome contingencies present during training.

Notably, our previous studies indicated that rats with pDMS DA depletions were partially sensitive to contingency manipulations during contingency degradation training but completely insensitive to contingency manipulations in the extinction test (Lex & Hauber, 2010b). These findings point to the possibility that the capacity of lesioned rats to detect contingency changes could be intact to some

extent. Therefore, in the present study we sought to characterize in more detail impairments of rats with pDMS DA depletions to detect contingency changes in the training phase and in extinction. In experiment 1, we examined whether lesioned animals were partially sensitive to contingency changes in the training phase and in extinction even if the amount of contingency degradation training was reduced relative to our earlier studies (4 instead of 6 days). In experiment 2, we explored whether lesioned animals were sensitive to contingency changes in the training phase/extinction, if the amount of contingency degradation training was considerably extended relative to experiment 1 and to our earlier studies (12 days instead of 4 and 6 days, respectively). Additionally, in experiment 3, we examined whether lesioned animals were sensitive to contingency changes in the training phase/extinction, if the amount of contingency training was extended as in experiment 2, but involved a gradual shift from a low to an intermediate and a high degree of contingency degradation. Such subtle gradual contingency changes during contingency degradation training may be more difficult to detect than an invariable and high degree of contingency degradation as in experiment 2.

## Materials and methods

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

### Experiment 1

#### *Rationale*

We examined whether a reduction of the amount of contingency degradation training relative to our earlier studies (4 x 2 daily sessions 15 min each instead of 6 x 2 daily sessions 30 min each) rendered animals with pDMS DA depletions insensitive to contingency degradation during training. Specifically, sham controls and lesioned rats were tested over 4 days using the standard contingency degradation training protocol that involved an invariable and high degree of contingency degradation ( $P(O|A)=0.05$ ;  $P(O|no A)=0.05$ ) followed by a contingency degradation test performed in extinction. Thereafter, a re-test was performed, i.e., contingency degradation training was given for another 4 days followed by a further contingency degradation test in extinction.

#### *Subjects*

Subjects were 14 male Lister-hooded rats (Charles River, Sulzfeld, Germany) weighing between 250 g and 300 g at the beginning of the experiment. They were housed in groups of up to four animals in transparent plastic cages (55 x 39 x 27 cm, Ferplast, Nuernberg, Germany). Throughout the experiment water was available *ad libitum* and standard laboratory maintenance chow (Altromin, Lage, Germany) was restricted to 15 g per animal and day to maintain them at ~85% of their free-feeding weight. Temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50 \pm 10\%$ ) were kept constant in the animal house. Behavioural training and testing was conducted during the light phase of the 12:12 hours light - dark cycle (light on at 7:00 a.m.).

#### *Apparatus*

Training and testing took place in identical operant chambers (24 cm x 21 cm x 30 cm; Med Associates, St. Albans, VT, USA) housed within sound-attenuating cubicles. Each operant chamber was equipped with a pellet dispenser that delivered 45 mg Noyes Pellets (formula A/I; Sandown Scientific, Hampton, Middlesex, UK) into a dual pellet/liquid cup receptacle which was positioned in the middle of the right wall, and a syringe pump that delivered 0.1 ml of a 20% sucrose solution into the same receptacle. Each chamber also contained two retractable levers located on either side of the dual pellet/liquid cup receptacle. A 24 V / 3 W houselight mounted on the top-centre of the opposite wall illuminated the chambers and an electric fan integrated into the cubicle provided a constant background noise (~70 dB). A computer with the PC program MED-PC IV controlled the equipment and recorded the data.

***Surgical procedures***

After pre-treatment with atropine (0.2 mg/kg i.p.; WDT, Garbsen, Germany), the animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.; Medial GmbH, Hallbergmoos, Germany) and xylazine (4 mg/kg i.m.; Bayer AG, Leverkusen, Germany) before being placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, USA). The skull surface was exposed and two small holes were drilled bilaterally above the pDMS. Animals subjected to DA depletion received bilateral intra-pDMS injections of 6 µg 6-hydroxydopamine hydrochloride (6-OHDA; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in 0.4 µl saline containing 0.01% ascorbic acid (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) at the following coordinates using a 1 µl Hamilton syringe: AP -0.4, ML ±2.6, DV -4.5 with the tooth bar 3.3 mm below the interaural line. Coordinates were determined from the atlas of Paxinos and Watson (1998). Sham controls received injections of 0.4 µl vehicle, i.e., saline containing 0.01% ascorbic acid, at the same coordinates. The infusion time was 4 min and the needle was left in place for additional 5 min to allow diffusion. After surgery animals were sutured and received a subcutaneous injection of 2 ml saline and 4 mg/kg carprofen (Pfizer GmbH, Karlsruhe, Germany). Animals were allowed to recover for 7-12 days before behavioural testing.

***Behavioural procedures***

Each magazine and lever-press training session lasted for 20 min, began with the illumination of the houselight as well as the insertion of the appropriate lever and ended with the retraction of the lever and the turning off of the houselight.

*Magazine and lever-press training.* First, all animals received two magazine training sessions in which both outcomes (pellets and 20% sucrose solution) were delivered on independent random-time schedules (RT-60) with both levers withdrawn. Thereafter, lever-press training was started; for half of the animals of each lesion group pressing the left lever earned one pellet and pressing the right lever earned 0.1 ml 20% sucrose solution. The other half received the opposite action-outcome pairings. All animals received two daily lever-press training sessions in which only one lever and one outcome was available. After the first training session, there was at least a two-hour break before the second training session with the other lever-outcome pairing began. The order of the pellet and sucrose sessions was alternated each day. Lever-press training was conducted for 8 consecutive days with progressively leaner random ratio (RR-) schedules of reinforcement, except for the first two days in which a continuous reinforcement schedule (CRF) was used, as follows: day 1-2 = CRF,  $P(O|A) = 1.0$  / day 3-4 = RR-5,  $P(O|A) = 0.2$  / day 5-6 = RR-10,  $P(O|A) = 0.1$  / day 7-8 = RR-20,  $P(O|A) = 0.05$ .

*Contingency degradation training and tests in extinction.* To assess whether the animals were sensitive to a degradation of one action-outcome contingency, a contingency degradation training protocol was applied upon completion of the lever-press training. During contingency degradation training one of the two outcomes was additionally given in a non-contingent manner, i.e., the same outcome earned by pressing one of the two levers was additionally given in a non-contingent manner with a specific probability in each second without a response. Since the animals received two training sessions each day (one with each action-outcome pairing) and the outcome given non-contingently was the same in both sessions, one action-outcome association was degraded while the other action-outcome association was not degraded. For half of the animals of each lesion group the lever-pellet contingency was degraded (i.e., pellets were the non-contingently given outcome), whereas for the other half the lever-sucrose contingency was degraded. During contingency degradation training the probability of outcome delivery by pressing a lever was always  $P(O|A) = 0.05$  and the probability of outcome delivery by not pressing a lever was always  $P(O|no A) = 0.05$ . This protocol generates a high degree of contingency degradation (see Balleine & Dickinson, 1998, for details). Here, the experienced probability of outcome delivery should be the same regardless, if the animal performed that action or not, as responding e.g., to the degraded pellet lever at a rate of one press per sec to the pellet lever would earn one pellet every 20 sec, not responding to this lever would earn one free pellet every 20 sec. As pointed out by Hammond (1980), the assessment of contingency in rat free-operant paradigms raises the problem how to program in advance the probabilities of the response and no response categories in a manner that is independent of response rate. Therefore, our

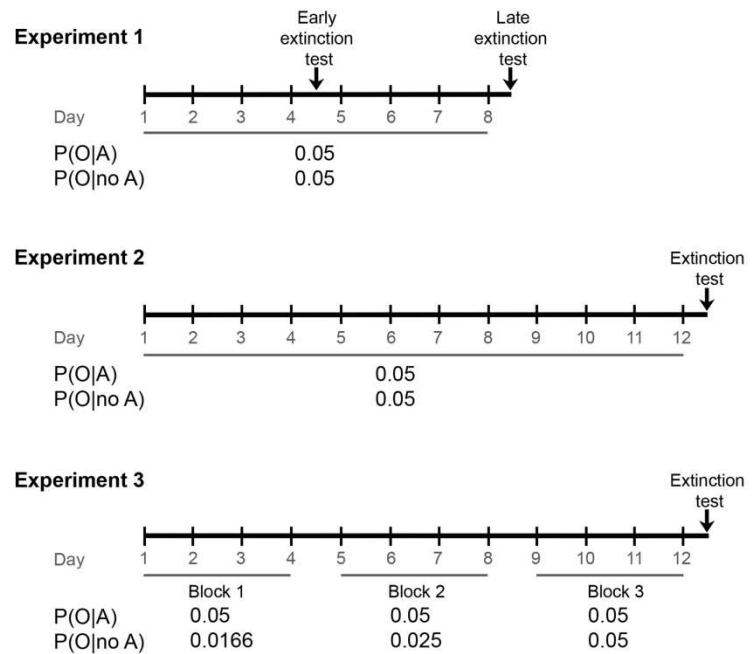


contingency degradation protocol originally developed by Hammond (1980) relies on several arbitrary assumptions, e.g., a response is defined as at least one lever press in any second, while a nonresponse is defined as the absence of any response in a second. However, it is not clear whether this assumption on response vs. no-response quantification in rats is adequate or whether other time cycles may be more appropriate (see Hammond, 1980, for a detailed discussion).

The rats received two 15 min training sessions each day (one on each lever) and had a break of at least two hours between the two sessions. The order of the two sessions was alternated each day.

Contingency degradation training was given for 4 days. Subsequently, we tested whether the effect of contingency degradation during contingency degradation training sessions persisted in an early test conducted in extinction. Therefore, on the day after the last contingency degradation training session, a 5 min choice extinction test was given. Both levers were inserted but no rewards were given.

After the extinction test, one retraining session under a RR-20 schedule was inserted. Thereafter, contingency degradation training was given to the same conditions as above for another 4 days followed by a late extinction test as above (see timeline, Fig. 1).



**Fig. 1.** Timelines with contingency manipulations in experiment 1, 2 and 3. Probabilities of outcome delivery by pressing a lever [ $P(O|A)$ ] and probabilities of outcome delivery by not pressing a lever [ $P(O|no A)$ ] are given.

### Immunohistochemistry

After the behavioural testing animals were killed by an overdose of isoflurane (cp-pharma, Burgdorf, Germany), perfused transcardially with 0.05% buffered heparin solution followed by a 4% buffered formalin solution. The brains were extracted, postfixed in a 4% buffered formalin solution for 24 h and then transferred into a 30% sucrose solution for at least 48h. Coronal brain sections were cut (40  $\mu$ m; Microm, Walldorf, Germany) in the region of the pDMS. The slices were initially washed in TRIS-buffered saline (TBS; 3 x 10 min), treated for 15 min with TBS containing 2% hydrogen peroxide and 10% methanol, washed again in TBS (3 x 10 min) and then blocked for 20 min with 4% natural horse serum (NHS; Vector Laboratories Burlingame, CA, USA) in TBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma Aldrich; TBS-T). Slices were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (mouse, anti-TH, 1:7500 in TBS-T containing 4% NHS; Immunostar, Hudson, WI, USA), then washed in TBS-T (3 x 10min) and incubated with the secondary antibody (horse, anti-mouse, rat-adsorbed, biotinylated IgG (H+L), 1:500 in TBS-T containing 4% NHS; Vector Laboratories) for 90 min at room temperature. Using the biotin-avidin system, slices were washed in TBS-T containing the avidin-biotinylated enzyme complex (1:500, ABC-Elite Kit; Vector Laboratories) for 60 min at room temperature, washed in TBS (3 x 10 min) and stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB Substrate Kit, Vector Laboratories). The brain slices were then washed in TBS (3 x 10 min), mounted on coated slides, dried overnight, dehydrated in ascending alcohol concentrations, treated with xylene and finally coverslipped using DePeX (Serva, Heidelberg, Germany). To determine the size and placement of the lesions the TH-immunoreactivity was analyzed under a microscope with reference to the atlas of Paxinos and Watson (1998).

**Data analysis and statistics**

In order to achieve homogeneity of variance, the raw values for lever presses to the non-degraded and degraded lever were subjected to a square root transformation for analysis and presentation. The data were subjected to a repeated-measures ANOVA with two within-subject factors (days of testing and degradation) and one between-subject factor (treatment). All statistical computations were carried out with STATISTICA™ (version 7.1, StatSoft®, Inc., Tulsa, USA). The level of statistical significance ( $\alpha$ -level) was set at  $p < 0.05$ .

**Experiment 2****Rationale**

We examined whether an extended amount of contingency degradation training, relative to our earlier studies (12 x 2 daily sessions 20 min each instead of 6 x 2 daily sessions 30 min each), facilitated in animals with pDMS DA depletion the capacity to detect contingency degradation during training. Specifically, sham controls and lesioned rats were tested over 12 days using the standard contingency degradation training protocol that involved an invariable and high degree of contingency degradation ( $P(O|A)=0.05$ ;  $P(O|\text{no } A)=0.05$ ) followed by a contingency degradation test performed in extinction.

Unless otherwise noted the same behavioural, surgical and immunohistochemical procedures as in experiment 1 were used.

**Subjects**

Subjects were 24 male Lister-hooded rats (Harlan-Winkelmann, Borchon, Germany) weighing between 230 g and 260 g at the beginning of the experiment. After surgery, animals were allowed to recover for 4-9 days before behavioural testing.

**Behavioural procedures**

*Magazine and lever-press training.* Magazine and lever-press training was conducted as follows: day 1-2 = CRF,  $P(O|A) = 1.0$  / day 3-5 = RR-5,  $P(O|A) = 0.2$  / day 6-8 = RR-10,  $P(O|A) = 0.1$  / day 9-12 = RR-20,  $P(O|A) = 0.05$ .

*Contingency degradation training.* Upon completion of the lever-press training, a contingency degradation training protocol was applied for 12 days with the probability of outcome delivery by pressing a lever was always  $P(O|A) = 0.05$  and the probability of outcome delivery by not pressing a lever was always  $P(O|\text{no } A) = 0.05$ . The rats received two 20 min training sessions each day (one on each lever) and had a break of at least two hours between the two sessions. The order of the two sessions was alternated each day.

*Contingency degradation test in extinction.* Thereafter, we tested whether the effect of contingency degradation during contingency degradation training sessions ( $P(O|A) = 0.05$  and  $P(O|\text{no } A) = 0.05$ ) persisted in a test conducted in extinction. Therefore, on the day after the last contingency degradation training session, a 5 min choice extinction test was given (see timeline, Fig. 1). Both levers were inserted but no rewards were given.

**Experiment 3****Rationale**

We applied a protocol which, as in experiment 2, comprised an extended amount of contingency degradation training (12 days) but involved a gradual shift from a low to an intermediate and a high degree of contingency degradation rather than an invariable and high degree of contingency degradation as in experiment 2. Specifically, we examined sham controls and lesioned rats over 12 days with 2 daily sessions using an incremental training protocol that involved a gradual shift from

low ( $P(O|A)=0.05$ ;  $P(O|\text{no } A)=0.0166$ ) to intermediate ( $P(O|A)=0.05$ ;  $P(O|\text{no } A)=0.025$ ) and high degree ( $P(O|A)=0.05$ ;  $P(O|\text{no } A)=0.05$ ) of contingency degradation followed by a contingency degradation test performed in extinction.

Unless otherwise noted the same behavioural, surgical and immunohistochemical procedures as in experiment 1 and 2 were used.

### **Subjects**

Subjects were 20 male Lister-hooded rats (Harlan-Winkelmann, Borchon, Germany) weighing between 240 g and 280 g at the beginning of the experiment. After surgery, animals were allowed to recover for 4-7 days before behavioural testing.

### **Behavioural procedures**

*Magazine and lever-press training.* Magazine and lever-press training conforms to lever-press training of experiment 2.

*Contingency degradation training.* A contingency degradation training protocol was applied for 12 days upon completion of the lever-press training. Unlike in experiment 2, the contingency degradation training protocol included 3 subsequent blocks of 4 days each; over blocks the degree of contingency degradation became increasingly higher. For the first 4 days of contingency degradation training, the probability of outcome delivery by pressing a lever was  $P(O|A) = 0.05$  and the probability of outcome delivery by not pressing a lever was  $P(O|\text{no } A) = 0.0166$ . This protocol produced a moderate degree of contingency degradation, e.g., responding to the degraded pellet lever at a rate of one press per sec would earn one pellet every 20 sec, not responding to this lever would earn one "free" pellet every 60 sec. The rats received two 20 min training sessions each day (one on each lever) and had a break of at least two hours between the two sessions. The order of the two sessions was alternated each day.

Thereafter, the action-outcome contingency was degraded further for another 4 days of training. Specifically, the probability of outcome delivery by pressing a lever was maintained at  $P(O|A) = 0.05$  and the probability of outcome delivery by not pressing a lever was set at  $P(O|\text{no } A) = 0.025$ . This schedule produces an intermediate degree of contingency degradation, as responding to the degraded pellet lever at a rate of one press per sec would earn one pellet every 20 sec, not responding to this lever would earn one free pellet every 40 sec. Subsequently, the action-outcome contingency was degraded further for another 4 days of training, i.e., the probability of outcome delivery by pressing a lever was maintained at  $P(O|A) = 0.05$  and the probability of outcome delivery by not pressing a lever was set at  $P(O|\text{no } A) = 0.05$  (see timeline, Fig. 1). This protocol generates a high degree of contingency degradation as responding e.g., to the degraded pellet lever at a rate of one press per sec would earn one pellet every 20 sec, not responding to this lever would earn one free pellet every 20 sec.

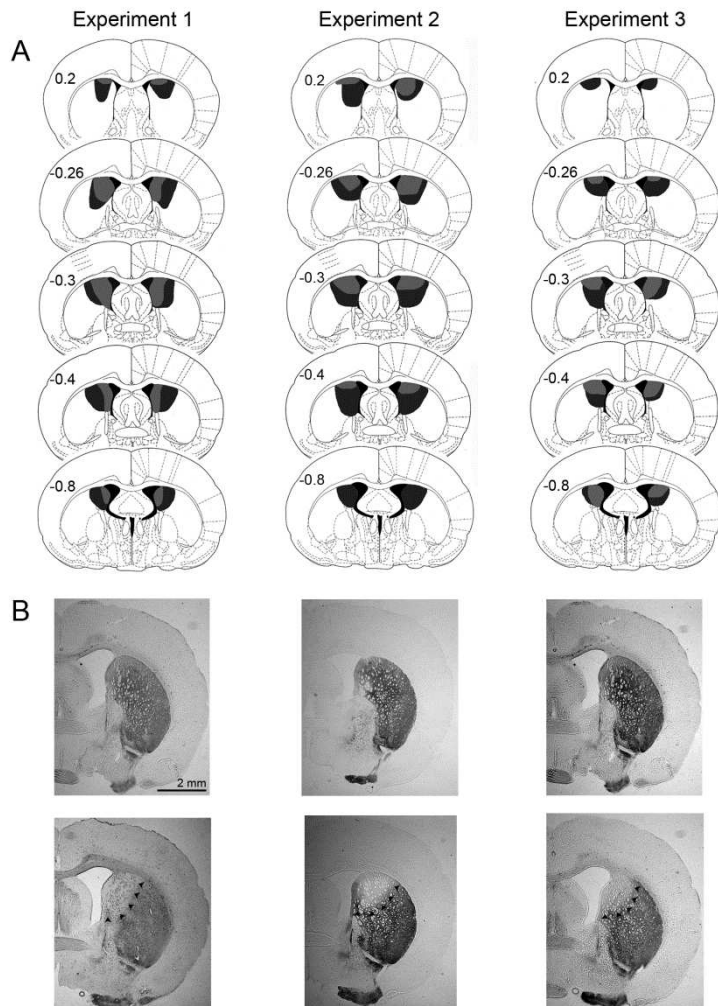
*Contingency degradation test in extinction.* Thereafter, we tested whether the effect of contingency degradation during the last 4 contingency degradation training sessions ( $P(O|A) = 0.05$  and  $P(O|\text{no } A) = 0.05$ ) persisted in a test conducted in extinction. Therefore, on the day after the last contingency degradation training session, a 5 min choice extinction test was given. Both levers were inserted but no rewards were given.

## **Results**

### **Histology**

A schematic representation of the extent of striatal damage caused by infusions of 6-OHDA in experiments 1-3 is given in Fig. 2. The lesion placement was assessed by reconstructing the damaged area onto standard stereotaxic atlas templates (Paxinos & Watson, 1998). 6-OHDA produced a circumscribed loss of TH-positive fibers restricted to the posterior dorsomedial subregion of the

striatum. Inspection of the stained tissue did not reveal any damage outside the dorsal striatum. In experiment 1, one animal with a too large lesion was excluded from further analysis. In keeping with previous studies using the same lesion protocol (e.g., Calaminus & Hauber, 2009; Lex & Hauber, 2010a; b), loss of TH-positive fibers in the pDMS appeared from about +0.2 to -0.8 relative to bregma with the maximum extension at around 0.2 - 0.4 mm behind bregma. In almost all animals of our experiments, the lesions did not extend more than about 3.0 mm laterally from the midline indicating an intact DA innervation of the dorsolateral striatum. Moreover, lesions did not protrude beyond 0.2 mm anterior to bregma suggesting an intact DA innervation of the anterior dorsomedial striatum. Thus, discrepancies in lesion size or localization may not account for the differential capability of lesioned animals in experiments 1-3 to detect contingency changes. Consistent with our observation that rats subjected to 6-OHDA infusions had a near complete pDMS DA depletion, a striatal infusion of a lower dose of 6-OHDA as used here profoundly reduced tissue concentrations of DA (>85%) (Brown *et al.*, 1991) as well as the density of TH-positive fibers and DA transporters (Winkler *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2005). Furthermore, a detailed analysis of the time course demonstrated that a 6-OHDA induced loss of striatal DA terminals remained stable over 4 weeks (Blandini *et al.*, 2007). Thus, it is unlikely that pDMS DA depletion did recover markedly during the course of our experiments lasting up to 37 days post-lesion.



**Fig. 2:** (A) Schematic representation of the minimum (grey shading) and maximum (black shading) extension of 6-OHDA pDMS lesions in animals of experiments 1-3. Plates are adaptations from Paxinos and Watson (1998); scales are relative to bregma. (B) Representative photomicrographs of coronal sections showing intact TH-positive fibers in sham controls (top panel) and the striatal loss of TH-positive fibers in 6-OHDA-lesioned animals (bottom panel).

## Experiment 1

### Lever-press training

After recovery from surgery, all animals received instrumental training on both levers one delivering food pellets, the other sucrose solution. Sham controls and lesioned animals both showed increased response rates during instrumental training as the ratio schedule parameter increased across consecutive training days. One animal did not respond to both levers and was excluded from further analysis. An ANOVA revealed a main effect of day [ $F_{(7,70)} = 37.51$ ,  $p < 0.01$ ], no main effect of treatment [ $F_{(1,109)} < 0.5$ , n.s.] and no day x treatment interaction [ $F_{(7,70)} < 0.6$ , n.s.]. On the last day of training, mean lever presses in both treatment groups did not differ significantly (sham controls:  $3.9 \pm 0.2$ , lesioned rats:  $4.3 \pm 0.5$ ) [ $t_{(10)} = 0.70$ , n.s., t-test].

**Contingency degradation training and tests in extinction**

As shown in Fig. 3A, during early contingency degradation training (training days 1-4;  $P(O|A) = 0.05$ ,  $P(O|no A) = 0.05$ ), responses to the degraded lever became moderately lower than those to the non-degraded lever in sham controls, but not in lesioned animals. An ANOVA revealed no main effects of treatment [ $F_{(1,10)} < 0.4$ , n.s.], degradation [ $F_{(1,10)} < 0.4$ , n.s.] and day [ $F_{(1,10)} < 1.8$ , n.s.], but a significant degradation x day interaction [ $F_{(3,30)} = 5.52$ ,  $p < 0.01$ ] that was independent of treatment (no degradation x day x treatment interaction [ $F_{(3,30)} < 1.1$ , n.s.]).

In the early extinction test (Fig. 3B), lever press rates to the degraded and non-degraded lever were different in sham controls, but not in lesioned animals. An ANOVA revealed a main effect of degradation [ $F_{(1,10)} = 12.37$ ,  $p < 0.01$ ], no main effect of treatment [ $F_{(1,10)} < 0.4$ , n.s.], but, importantly, a degradation x treatment interaction [ $F_{(1,10)} = 6.45$ ,  $p < 0.05$ ].

As shown in Fig. 4A, during late contingency degradation training (training days 5-8;  $P(O|A) = 0.05$ ,  $P(O|no A) = 0.05$ ), lever press rates to the degraded and non-degraded lever over days became different in sham controls, but not in lesioned animals. An ANOVA revealed no main effects of treatment [ $F_{(1,10)} < 0.4$ , n.s.], degradation [ $F_{(1,10)} < 0.2$ , n.s.] and day [ $F_{(3,30)} < 0.5$ , n.s.], but a degradation x day x treatment interaction [ $F_{(3,30)} = 3.12$ ,  $p < 0.05$ ]. Likewise, in the late extinction test (Fig. 4B), lever press rates to the degraded and non-degraded lever were different in sham controls, but not in lesioned animals. An ANOVA revealed no main effect of degradation [ $F_{(1,10)} < 1.7$ , n.s.] and no main effect of treatment [ $F_{(1,10)} < 0.4$ , n.s.], but a degradation x treatment interaction [ $F_{(1,10)} = 6.96$ ,  $p < 0.03$ ].

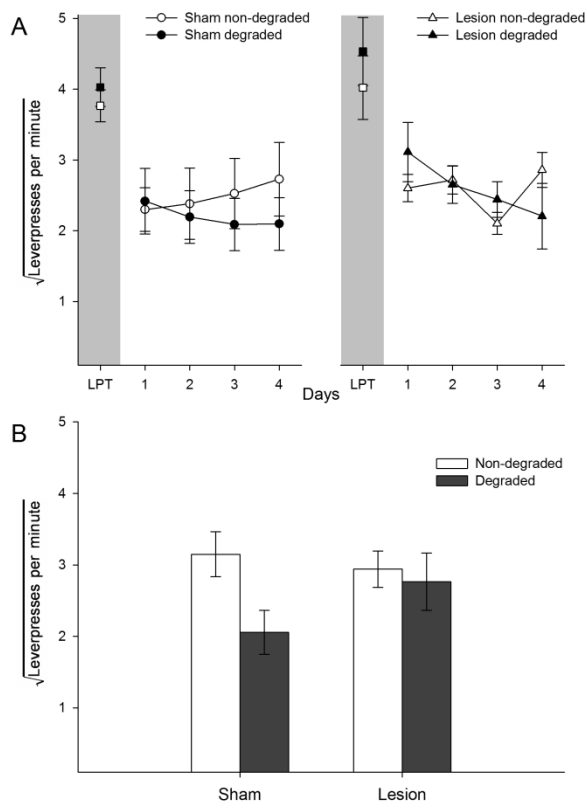
**Experiment 2****Lever-press training**

Sham controls and animals with pDMS DA depletion both showed increasing response rates, as the ratio schedule parameter increased across consecutive training days. An ANOVA revealed a main effect of day [ $F_{(11,220)} = 154.39$ ,  $p < 0.0001$ ], no main effect of treatment [ $F_{(1,20)} < 0.5$ , n.s.] and a trend of day x treatment interaction [ $F_{(11,220)} = 1.67$ ,  $p = 0.08$ ]. On the last day of training, mean lever presses in both treatment groups did not differ significantly (sham controls:  $3.7 \pm 0.1$ , lesioned rats:  $3.3 \pm 0.2$ ) [ $t_{(20)} = 1.59$ , n.s., t-test]. Upon completion of lever-press training, two rats, one from the sham and one from the lesion group, were excluded from further testing as they showed high instrumental response rates which differed from respective group means on the last training day by more than 2 standard deviations.

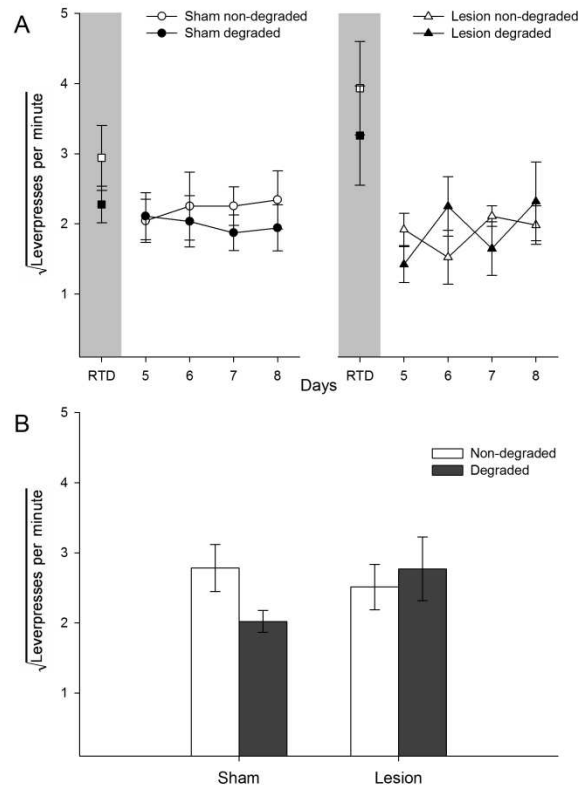
**Contingency degradation training and test in extinction**

As shown in Fig. 5A, responding to the degraded and non-degraded lever became different both in sham controls and, albeit markedly less pronounced, in lesioned animals during contingency degradation training (training days 1-12;  $P(O|A) = 0.05$ ,  $P(O|no A) = 0.05$ ). An ANOVA revealed main effects of degradation [ $F_{(1,20)} = 39.75$ ,  $p < 0.0001$ ] and day [ $F_{(11,220)} = 17.97$ ,  $p < 0.0001$ ], but no main effect of treatment [ $F_{(1,20)} < 1.5$ , n.s.]. Importantly, there was a significant degradation x treatment interaction [ $F_{(1,20)} = 6.47$ ,  $p < 0.02$ ] and a degradation x day interaction [ $F_{(11,220)} = 7.24$ ,  $p < 0.0001$ ]. Further analysis of this interaction revealed a significant simple effect of degradation in sham controls [ $F_{(1,10)} = 62.72$ ,  $p < 0.0001$ ] and a simple effect in lesioned animals that hardly meets the significance criterion [ $F_{(1,10)} = 5.14$ ,  $p = 0.047$ ].

Furthermore, in the extinction test (Fig. 5B), mean lever press rates to the degraded and non-degraded lever were different in sham controls, but not in lesioned animals. An ANOVA revealed a main effect of degradation [ $F_{(1,20)} = 36.70$ ,  $p < 0.0001$ ], no main effect of treatment [ $F_{(1,20)} < 2.5$ , n.s.], but, importantly, a degradation x treatment interaction [ $F_{(1,20)} = 7.07$ ,  $p < 0.02$ ].



**Fig. 3:** Experiment 1. (A) Early contingency degradation training (4 days) in animals with pDMS DA depletion and sham controls (left panels: sham group, N=6; right panels: lesion group, N=6). Square root means of responses per minute ( $\pm$  SEM) during contingency degradation training are given as well as responses to the to-be-degraded (■)/to-be-non-degraded (□) lever on the last day of lever-press training (LPT). One action-outcome contingency was degraded by unpaired delivery of an outcome that was the same as that was earned by pressing the degraded lever [(P(O|A) = 0.05, P(O|no A) = 0.05)]. An ANOVA revealed that both treatment groups were insensitive to contingency degradation. (B) Early extinction test. Square root means of lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during the 5 min-choice extinction test are given. Both levers were inserted but no outcomes were given. An ANOVA revealed that sham controls, but not rats with pDMS DA depletion, were sensitive to contingency degradation.



**Fig. 4:** Experiment 1. (A) Late contingency degradation training (days 5-8) in animals with pDMS DA depletion and sham controls (left panels: sham group, N=6; right panels: lesion group, N=6). Square root means of lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during contingency degradation training are given as well as responses to the to-be-degraded (■)/to-be-non-degraded (□) lever on the retraining day (RTD). One action-outcome contingency was degraded by unpaired delivery of an outcome that was the same as that was earned by pressing the degraded lever [(P(O|A) = 0.05, P(O|no A) = 0.05)]. An ANOVA revealed that over days, sham controls but not animals with pDMS DA depletion became sensitive to contingency degradation (days x treatment x contingency interaction;  $p < 0.05$ ). (B) Late extinction test. Square root means of lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during the 5 min-choice extinction test are given. Both levers were inserted but no outcomes were given. An ANOVA revealed that sham controls, but not rats with pDMS DA depletion, were sensitive to contingency degradation.

### Experiment 3

#### Lever-press training

Sham controls and animals with pDMS DA depletion both showed increasing response rates, as the ratio schedule parameter increased across consecutive training days. An ANOVA revealed a main effect of day [ $F_{(11,198)} = 66.8, p < 0.01$ ], no main effect of treatment [ $F < 1.5, n.s.$ ] and no day x treatment interaction [ $F < 0.5, n.s.$ ]. On the last day of training, mean lever presses in both treatment groups did not differ significantly (sham controls:  $4.1 \pm 0.4$ , lesioned rats:  $4.2 \pm 0.2$ ) [ $t_{(18)} = 0.36, n.s., t$ -test]. Furthermore, overall mean lever press rates on the last day of training of groups from experiment 1, 2 and 3 did not differ [ $F_{(5,48)} < 2.0, n.s., ANOVA$ ].

### **Contingency degradation training and test in extinction**

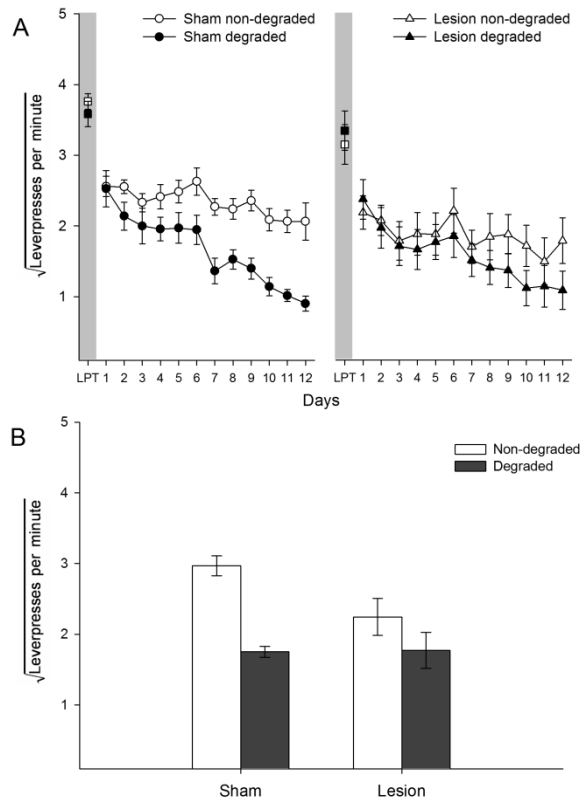
As shown in Fig. 6A, lever press rates to the degraded and non-degraded lever became different both in sham controls and lesioned animals over blocks (3 blocks including 4 days each) with different degrees of contingency degradation (block 1:  $P(O|A) = 0.05$ ,  $P(O|\text{no } A) = 0.0166$ / block 2:  $P(O|A) = 0.05$ ,  $P(O|\text{no } A) = 0.025$ / block 3:  $P(O|A) = 0.05$ ,  $P(O|\text{no } A) = 0.05$ ). In line with this description, an ANOVA revealed a significant main effect of block [ $F_{(2,24)} = 29.85$ ,  $p < 0.01$ ], no main effects of treatment [ $F_{(1,12)} < 0.2$ , n.s.] and degradation [ $F_{(1,12)} < 3.0$ , n.s.] and no block x treatment interaction [ $F_{(2,24)} < 1.2$ , n.s.]. In addition, there was a degradation x block interaction [ $F_{(2,24)} = 15.62$ ,  $p < 0.0001$ ] and a degradation x day interaction [ $F_{(3,36)} = 3.11$ ,  $p < 0.05$ ]. Furthermore, separate ANOVA for each block revealed a significant main effect of degradation in block 3 [ $F_{(1,18)} = 12.95$ ,  $p = 0.002$ ], but not in blocks 1 [ $F_{(1,18)} < 0.3$ , n.s.] and 2 [ $F_{(1,12)} < 2.0$ , n.s.].

As depicted in Fig. 6B, in the extinction test, lever press rates to the degraded and non-degraded lever were different both in sham controls and lesioned animals. An ANOVA revealed a main effect of degradation [ $F_{(1,18)} = 8.13$ ,  $p < 0.01$ ], but no main effect of treatment [ $F < 1.0$ , n.s.] and no degradation x treatment interaction [ $F < 0.5$ , n.s.].

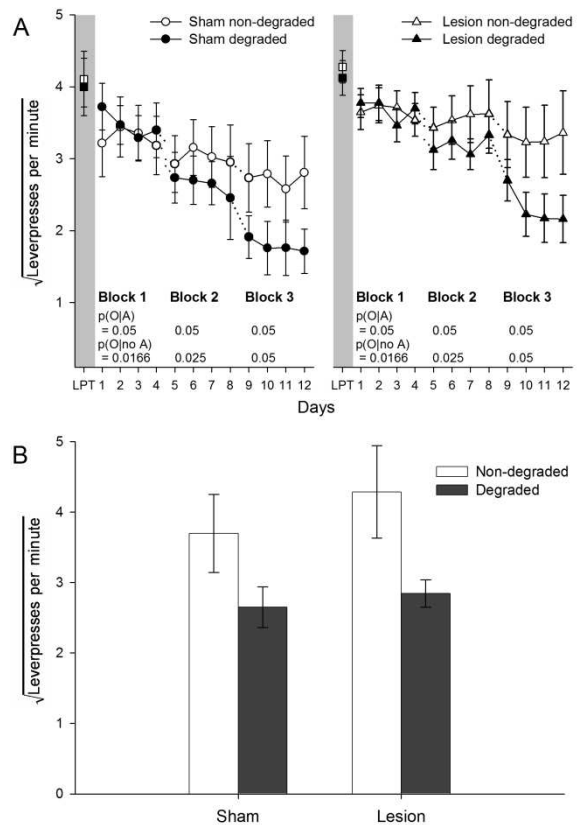
### **Discussion**

Here we sought to characterize effects of pDMS DA depletions on contingency detection as a function of different contingency degradation training protocols. Experiment 1 demonstrated that rats with pDMS DA depletions exposed to limited contingency degradation training (4 days) were insensitive to contingency manipulations both during the training phase and in the extinction test conducted at the end of training. Experiment 2 further indicated that lesioned rats subjected to extended contingency degradation training (12 days) became sensitive to contingency manipulations during the training phase and but not in the subsequent extinction test. In experiment 3, an extended but more complex contingency degradation training protocol (12 days) was used that involved a gradual shift from a low to an intermediate and a high degree of contingency degradation rather than a high and invariable degree of contingency degradation as in experiment 1 and 2. Notably, lesioned rats were sensitive to contingency manipulations both during the contingency degradation training phase and in the subsequent extinction test. Together, these findings suggest that pDMS DA depletions can impair the capability to detect changes in the causal efficacy of actions; however, occurrence and pattern of impairments depend on the contingency degradation training protocol being used.

Previous studies revealed that rats with pDMS DA depletions were partially sensitive to contingency manipulations during contingency degradation training over 6 days, but insensitive to contingency manipulations in the subsequent extinction test (Lex & Hauber, 2010b). Thus, reducing the amount of contingency degradation training should render lesioned rats insensitive to contingency manipulations both in the training phase and in the extinction test. Consistent with this notion, experiment 1 demonstrated that rats with pDMS DA depletion were insensitive to non-contingent outcome delivery during training. By contrast, sham controls selectively but moderately reduced responding to the degraded lever. However, this effect clearly missed statistical significance suggesting that the reduction of contingency degradation training might have hampered contingency detection in sham controls. Notably, in the subsequent extinction test, sham controls were sensitive to contingency degradation while lesioned rats were not. The observation that sham controls were able to discriminate the degraded and non-degraded lever in the extinction test but less so during the contingency training phase is consistent with a number of earlier studies (Corbit & Balleine, 2000; Corbit *et al.*, 2002; Lex & Hauber, 2010a; b), however, the reasons for this discrepancy are not clear. It is conceivable that the contingency degradation training phase is less sensitive because non-contingent reward delivery could have induced magazine-directed responses competing with lever pressing, in particular during contingency degradation training which involves actual reward delivery. In line with this account, relative to the last day of lever-press training, response rates not only to the degraded lever but also to the non-degraded lever were lower throughout contingency degradation training. In addition, the variability of responding to both levers, at least in our studies, was often



**Fig. 5:** Experiment 2. (A) Contingency degradation training (12 days) in animals with pDMS DA depletion and sham controls (left panels: sham group, N=11; right panels: lesion group, N=11). Square root means of lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during contingency degradation training are given as well as responses to the to-be-degraded (■)/to-be-non-degraded (□) lever on the last day of lever-press training (LPT). One action-outcome contingency was degraded by unpaired delivery of an outcome that was the same as that was earned by pressing the degraded lever [ $P(O|A) = 0.05$ ,  $P(O|no A) = 0.05$ ]. An ANOVA revealed that both treatment groups were sensitive to contingency degradation. (B) Extinction test in animals with pDMS DA depletion (N=11) and sham controls (N=11). Square root means of lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during the 5 min-choice extinction test are given. Both levers were inserted but no outcomes were given. An ANOVA revealed that sham controls, but not rats with pDMS DA depletion, were sensitive to contingency degradation.



**Fig. 6:** Experiment 3. (A) Contingency degradation training (12 days) in animals with pDMS DA depletion and sham controls (left panels: sham group, N=10; right panels: lesion group, N=10). Square root means of lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during contingency degradation training are given as well as responses to the to-be-degraded (■)/to-be-non-degraded (□) lever on the last day of lever-press training (LPT). One action-outcome contingency was degraded by unpaired delivery of an outcome that was the same as that was earned by pressing the degraded lever. The degree of contingency degradation [ $P(O|A)$  vs.  $P(O|no A)$ ] was increased over blocks of 4 days each. An ANOVA revealed that across blocks both treatment groups became sensitive to contingency degradation. (B) Extinction test in animals with pDMS DA depletion (N=10) and sham controls (N=10). Square root means of lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during the 5 min-choice extinction test are given. Both levers were inserted but no outcomes were given. An ANOVA revealed that sham controls and rats with pDMS DA depletion were sensitive to contingency degradation.

higher in training as compared with extinction sessions suggesting that intervening effects of non-contingent reward delivery cannot be discarded. By contrast, further analysis indicated that parameters such as outcome identity, outcome or session order did not account for variability in responding on subsequent contingency degradation training days, e.g., in experiment 1 (data not shown). Likewise, as response rates to the to-be-degraded and to-be-non-degraded lever were similar at the end of lever-press training and display lower variances, training effects are unlikely to account for increased variability of responding during contingency degradation training. Another more likely possibility is that the extinction test performed in a single session with concurrent presentation of the degraded and non-degraded lever is more sensitive than contingency



degradation training involving subsequent presentation of one lever during separate sessions, respectively. Taken together, results of experiment 1 confirm that pDMS DA depletion can impair contingency detection but show that contingency degradation testing in extinction is crucial as it can reveal a memory for effected contingency changes (or the lack thereof in lesioned animals) that occurred in the contingency degradation training phase even if responding during training does not indicate a significant sensitivity to contingency changes.

Relative to experiment 1, the amount of contingency degradation training was extended in experiment 2 to facilitate discrimination of the degraded and non-degraded lever. In fact, during extended contingency degradation training lesioned rats selectively reduced responding to the degraded lever. However, compared to sham controls, this effect was markedly less pronounced. Furthermore, unlike sham controls, lesioned rats were only marginally sensitive to contingency degradation in the critical extinction test. First, these findings suggest that lesioned animals are not insensitive but merely less to contingency degradation. Possibly, a further extension of contingency degradation training could render lesioned animals sensitive to contingency degradation not only during training but in extinction as well. Second, these findings further substantiate the claim that contingency degradation testing in extinction is crucial as responding during training does not necessarily indicate whether a robust memory for the effected contingency changes occurred. Reduced contingency detection during training in lesioned rats might not reflect impairments in assessing or encoding action–outcome associations *per se*, as rats with pDMS DA depletions were sensitive to outcome devaluation (Lex & Hauber, 2010b) and show intact outcome-selective Pavlovian-instrumental-transfer (PIT) (Pielock *et al.*, 2011), i.e., processes that rely on intact encoding and representation of action–outcome associations. Of note, response rates to the degraded and non-degraded lever were considerably lower in experiment 1 and 2 throughout contingency degradation training compared to the last day of lever-press training, probably due to non-contingent reward delivery during degradation training. It is well known that ratio schedules set up a strong correlation between response and reward rates (Dickinson, 1994). However, relatively low response rates in an RR-20 schedule as observed here and in related studies (e.g., Corbit and Balleine, 2000) markedly extend time to reward delivery and might, in turn, reduce the experienced contingency. Thus, a low rate of lever pressing could have hampered the assessment of the actual causal status of responding to both levers, at least in lesioned rats. If so, a contingency degradation training protocol with lower probabilities of non-contingent reward delivery possibly associated with less response competition could increase responding and facilitate contingency detection in lesioned rats rather than reducing contingency detection as we predicted.

In fact, rats with pDMS DA depletion, like sham controls, were sensitive to contingency changes over blocks of contingency degradation training with gradual increases of contingency degradation in experiment 3. Likewise, sham controls as lesioned rats were sensitive to contingency degradation in extinction. Remarkably, unlike in experiment 1 and 2, response rates to both levers during the first block of contingency degradation training were reduced only moderately relative to the last day of instrumental training. However, over blocks with increasing probabilities to gain non-contingent reward, response rates to the degraded but less so to the non-degraded lever became lower and variances higher indicating that competing reward-directed responses may progressively interfere with lever pressing. Thus, results of experiment 3 suggest that pDMS DA depletion can leave intact contingency detection. Facilitated contingency detection in lesioned rats might be accounted for by the incremental contingency degradation training protocol involving higher response rates in particular to the non-degraded lever. Furthermore, as demonstrated by Hammond (1980), repeated contingency shifts made rats increasingly more sensitive to contingency changes. Thus, it is possible that, in addition to increased rates of lever pressing, the gradually shifting nature of the contingency degradation training protocol used here rendered lesioned animals more sensitive and allowed them to compensate for their reduced sensitivity to contingency degradation as determined in experiments 1 and 2. Yet, this notion is speculative and requires further experimental verification. For instance, from our data it is not clear in which ways variables such as amount of contingency degradation training, degree of contingency degradation or nature of the shifting pattern interact to provide sensitivity to contingency degradation. Furthermore, at variance with the assumptions of

Hammond (1980), in our as in many other studies lever press rates with this contingency degradation training protocol were lower than one per second. Therefore, it is questionable whether, e.g., a protocol with  $P(O|A) = 0.05$  and  $P(O|no A) = 0.05$  represents a zero contingency in which the experienced probability of outcome delivery is the same regardless, if an action is performed or not. In addition, though low response rates in an RR-20 schedule do not necessarily impair contingency detection (Lex & Hauber, 2010b), they could alter experienced contingency and hamper contingency detection, at least in lesioned rats. Thus, to understand effects of pDMS DA depletions on contingency detection in detail, experiments are required that involve systematic variation of probabilities of gaining response-contingent and non-contingent outcomes including omission contingencies that force a rat to withhold a previously rewarded action to gain reward (e.g., Yin *et al.*, 2006).

### **Conclusions**

Our present results demonstrate that pDMS DA depletions can impair the capability to detect changes in the causal efficacy of actions. Importantly, presence and pattern of impairments depends on the training protocol being used. These latter findings suggest that in rodent studies aimed to analyse causal learning, a more accurate description of the capability to detect contingency changes both in intact and lesioned animals could be achieved by the complementary use of contingency degradation training protocols others than those used in most rodent studies so far (e.g., Corbit & Balleine, 2000; Lex & Hauber, 2010b). However, to establish appropriate contingency degradation trainings protocols, an identification of relevant contingency degradation training parameters and a systematic analysis of their influence on the capacity to detect contingency changes is required which was not intended in the present study. As brain systems that encode the causal effects of actions are highly conserved between mammalian species (Tanaka *et al.*, 2008; Liljeholm *et al.*, 2011), the development of novel and sensitive contingency degradation training protocols for rats may help to further unravel similarities and dissimilarities in the capacity to detect contingency changes across species.

### **Acknowledgements**

This research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HA2340/8-2) and a grant of the Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg to S.B. We are grateful to Susanne Sommer for technical assistance and Harald Feuchter for assistance in animal husbandry. We also wish to thank Dr. B. Lex for his computer programming assistance.

### **Abbreviations**

6-OHDA, 6-hydroxydopamine hydrochloride; CRF, continuous reinforcement; DA, dopamine; LPT, lever-press training;  $P(O|A)$ , probability of receiving an outcome, O, given that an action, A, is performed;  $P(O|no A)$ , probability of receiving an outcome, O, in the absence of an action, no A; pDMS, posterior dorsomedial striatum; RR, random ratio; RT, random-time; RTD, retraining day; SEM, Standard error of the mean, TBS, TRIS-buffered saline; TH, tyrosine hydroxylase

### **References**

- Balleine, B.W. & Dickinson, A. (1998) Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, **37**, 407-419.
- Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G. & Armentero, M.T. (2007) Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 397-405.
- Brown, V.J., Bowman, E.M. & Robbins, T.W. (1991) Response-related deficits following unilateral lesions of the medial agranular cortex of the rat. *Behav. Neurosci.*, **105**, 567-578.
- Calaminus, C. & Hauber, W. (2009) Modulation of behaviour by expected reward magnitude depends on dopamine in the dorsomedial striatum. *Neurotox. Res.*, **15**, 97-110.
- Corbit, L.H. & Balleine, B.W. (2000) The role of the hippocampus in instrumental conditioning. *J. Neurosci.*, **20**, 4233-4239.

- Corbit, L.H., Ostlund, S.B. & Balleine, B.W. (2002) Sensitivity to instrumental contingency degradation is mediated by the entorhinal cortex and its efferents via the dorsal hippocampus. *J. Neurosci.*, **22**, 10976-10984.
- Dickinson, A. (1994) Instrumental Conditioning. In Mackintosh, N.J. (ed) *Animal learning & cognition*. Academic Press, Cambridge, pp. 45-76.
- Hammond L.J. (1980) The effect of contingency upon the appetitive conditioning of free-operant behaviour. *J. Exp. Anal. Behav.*, **34**, 297-304.
- Lex, B. & Hauber, W. (2010a) Disconnection of the entorhinal cortex and dorsomedial striatum impairs the sensitivity to instrumental contingency degradation. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 1788-1796.
- Lex, B. & Hauber, W. (2010b) The role of dopamine in the prelimbic cortex and the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Cereb. Cortex*, **20**, 873-883.
- Liljeholm, M., Tricomi, E., O'Doherty, J.P. & Balleine, B.W. (2011) Neural correlates of instrumental contingency learning: differential effects of action-reward conjunction and disjunction. *J. Neurosci.*, **31**, 2474-2480.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pielock, S.M., Lex, B. & Hauber, W. (2011) The role of dopamine in the dorsomedial striatum in general and outcome-selective Pavlovian-instrumental transfer. *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 717-725.
- Shanks, D.R. & Dickinson, A. (1991) Instrumental judgment and performance under variations in action-outcome contingency and contiguity. *Mem. Cognit.*, **19**, 353-360.
- Tanaka, S.C., Balleine, B.W. & O'Doherty, J.P. (2008) Calculating consequences: brain systems that encode the causal effects of actions. *J. Neurosci.*, **28**, 6750-6755.
- Winkler, C., Kirik, D., Bjorklund, A. & Cenci, M.A. (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis.*, **10**, 165-186.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J. & Balleine, B.W. (2005) Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 505-512.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J. & Balleine, B.W. (2006) Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behav. Brain Res.*, **166**, 189-196.
- Yuan, H., Sarre, S., Ebinger, G. & Michotte, Y. (2005) Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Methods.*, **144**, 35-45.

## 7.2 MANUSKRIFT 2

PIELOCK SM, BRAUN S, HAUBER W (2013) THE EFFECTS OF ACUTE STRESS ON PAVLOVIAN-INSTRUMENTAL TRANSFER IN RATS. COGN AFFECT BEHAV NEUROSCI 13:174-185. DOI: 10.3758/s13415-012-0129-3.

In Rahmen dieses Manuskripts wurden Stressoren und ihre Wirkungen auf instrumentelles Handeln untersucht.

### BEITRÄGE DER AUTOREN

#### Pielock SM:

- Konzeption des experimentellen Designs
- Erstellung der MED-PC Programme
- Erprobung und Etablierung der Testaufgaben
- Durchführung der Testaufgaben (PIT-Tests)
- Datenerfassung, Auswertung und Analyse
- Analyse der Plasma-Corticosteron Werte
- Erstellung aller Tabellen und Abbildungen
- Schreiben und Editieren des Manuskripts

#### Braun S:

- Konzeption von Stress-Protokollen
- Erprobung der Stress-Protokolle
- Etablierung geeigneter Stress-Protokolle in Testaufgaben

#### Hauber W:

- Konzeption des experimentellen Designs
- Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, Diskussion der Daten
- Unterstützung beim Schreiben und Editieren des Manuskripts

# The effects of acute stress on Pavlovian-instrumental transfer in rats

Steffi M. Pielock & Stephanie Braun & Wolfgang Hauber, 2013

**Keywords:** acute stress, incentive motivation, anxiety, Pavlovian-instrumental transfer, rat

## Abstract

Pavlovian stimuli invigorate ongoing instrumental action, a phenomenon termed the Pavlovian-instrumental transfer (PIT) effect. Acute stressors can markedly enhance the release of corticotropin-releasing factor (CRF), and CRF injection into the nucleus accumbens increases the PIT effect. However, it is unknown whether acute stressors by themselves would amplify the PIT effect. Here, we examined the effects of acute stressors on PIT. Rats first received Pavlovian and instrumental training, and then the impact of the Pavlovian stimuli on instrumental responding was analyzed in the subsequent PIT test. Acute stressors were applied prior to the PIT test. Because the effects of acute stressors critically depend on stressor type and time of day, we used two acute stressors that involved one or several distinct stressors (denoted here as “single” vs. “multiple” stressors) applied either in the light or the dark period of the light:dark cycle. The results revealed that single and multiple stressors applied in the light period did not alter the PIT effect—that is, the ability of an appetitive Pavlovian stimulus to enhance leverpressing or the basal leverpress rate. When applied in the dark period, single and multiple stressors also did not alter the PIT effect, but they did markedly reduce the basal leverpress rate. Diazepam pretreatment did not counteract the declines in basal instrumental responding in the PIT test that were induced by either a single or multiple stressors. Our findings suggest that acute stressors were unable to amplify the incentive salience of reward-predictive Pavlovian stimuli to activate instrumental responding, but, depending on the time of day of stressor exposure, they did reduce basal instrumental responding.

Pavlovian stimuli predictive of natural rewards such as food can increase leverpressing for food, a phenomenon termed the Pavlovian-instrumental transfer effect (PIT effect) (Estes, 1948; Lovibond, 1983). One important mechanism by which Pavlovian stimuli influence the vigor of an action is to create a general appetitive arousal that elevates instrumental responding (Rescorla & Solomon, 1967). The central nucleus of the amygdala (Corbit & Balleine, 2005; Holland & Gallagher, 2003), the nucleus accumbens core (Corbit & Balleine, 2011; Hall, Parkinson, Connor, Dickinson, & Everitt, 2001), the ventral tegmental area (Corbit, Janak, & Balleine, 2007; Murschall & Hauber, 2006), and the mesoaccumbens dopamine system (Hall, et al., 2001; Lex & Hauber, 2008; Wyvell & Berridge, 2000) are major components of a neural circuitry mediating the PIT effect. Notably, Pecina, Schulkin, and Berridge (2006) demonstrated that the PIT effect was markedly enhanced not only by intraaccumbens amphetamine infusion but also by intraaccumbens infusion of corticotropin-releasing factor (CRF), and they concluded that activation of CRF subsystems in the nucleus accumbens—and, thus, acute stress—could amplify positive motivation for signaled rewards. Importantly, such paradoxical positive incentive effects could explain why acute stress can produce stimulus-triggered bursts of binge eating, drug relapse, or other excessive pursuits of reward (Pecina et al., 2006).

It is well known that acute stress is associated with increased brain CRF and dopamine release (Bale & Vale, 2004; Imperato, Puglisi-Allegra, Casolini, Zocchi, & Angelucci, 1989).

However, although CRF plays a crucial role (Bale & Vale, 2004), it is important to note that acute stress responses involve the release of multiple stress mediators, including a number of other neuropeptides, such as vasopressin or dynorphin, as well as monoamine neurotransmitters and steroids (Joels & Baram, 2009) and entail complex interacting circuits, in particular in the limbic forebrain, the hypothalamus, and the brainstem (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Because intra-accumbens CRF infusion may mimic the multifaceted neurochemical responses induced by acute stressors only to a minor extent, it is questionable whether acute stress would be able to amplify the PIT effect in a manner similar to intra-accumbens infusions of CRF. Therefore, in the present study we sought to explore the as-yet-unknown effects of acute stressors on PIT. Rats first received Pavlovian and instrumental training, and thereafter, the impact of the Pavlovian stimuli on instrumental responding was analyzed in a subsequent PIT test. Acute stressors were applied immediately prior to the PIT test. As the impact of acute stress critically depends on the stressor type and the time of day (Koolhaas et al., 2011), we included two distinct stressors that involved either one or several stressors (denoted here as “single” vs. “multiple” stressors) that were applied during the light or the dark period of the light: dark cycle. To assess hypothalamus–pituitary–adrenocortical (HPA) axis activity in response to these stressors, we also measured plasma corticosterone levels. Furthermore, we examined whether the standard anxiolytic drug diazepam would be able to reverse the impact of acute stressors on PIT.

## **Materials and method**

All animal experiments were in compliance with the German Law of Animal Protection and were approved by the proper authorities.

### ***Subjects and apparatus***

Experimentally naive male Lister hooded rats (Harlan Winkelmann, Borchon, Germany) served as the subjects. The rats were housed in groups of four in transparent plastic cages (55 × 39 × 27 cm; Ferplast, Nürnberg, Germany) in a temperature- and humidity-controlled room (20 ± 2 °C, 50 %–60 %) on a 12:12-h light:dark cycle (lights on at 7.00 a.m.; Exp. 1) or on an inverted 12:12-h light:dark cycle (lights off at 8.00 a.m.; Exps. 2 and 3). The rats had ad libitum access to water. Standard laboratory maintenance chow (Altromin, Lage, Germany) was given ad libitum for 5 days after arrival. Thereafter, food was restricted to 15 g per animal per day to maintain them at ~85 % of their freefeeding weight.

Training and testing took place in identical operant chambers (24 × 21 × 30 cm; Med Associates, St. Albans, VT) housed within sound-attenuating cubicles. Each operant chamber was equipped with a pellet dispenser that delivered a 45-mg pellet into a receptacle that was positioned in the center of one wall. In addition, each chamber contained a retractable lever located on the left side of the receptacle. A 24-V/3-W houselight mounted at the top center of the opposite wall illuminated the chambers. The speaker that delivered the auditory conditioned stimuli was mounted on the wall opposite to the levers and the receptacle. Two auditory stimuli (white noise and a tone) served as conditioned stimuli. A computer system (MedPC Software; Med Associates) controlled the equipment and recorded the data.

### **Pavlovian-instrumental transfer**

The testing for PIT consisted of three separate parts: instrumental training and Pavlovian training, followed by a transfer test in which the invigorating influences of the Pavlovian

stimuli on instrumental behavior were determined in extinction. Each session started with the illumination of the houselight and the insertion of the appropriate lever, and each ended with the retraction of the lever and the turning off of the houselight.

*Magazine training.* First, all subjects received one session of magazine training in order to habituate the animals to the operant chamber. During the magazine training, food pellets (45-mg pellets; Bio-Serv, Frenchtown, NJ) were delivered on a random-time (RT) 30-s schedule with no lever available.

*Instrumental and Pavlovian training.* Thereafter, eight training days were given with two sessions per day, an instrumental training session in the morning and a Pavlovian training session in the afternoon. In the instrumental training sessions, the lever was inserted, and 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 s and RI 30 s, and for the remaining five sessions, to RI 60 s; a session ended after 30 min. The rats received Pavlovian training sessions with the lever retracted. An 80-dB sound pressure level (SPL) auditory stimulus (3-kHz tone or white noise) served as the CS+ (conditioned stimulus, rewarded) in a counterbalanced fashion. Each session contained six 2-min presentations of the CS+, followed by an interstimulus interval (ISI) of 2–4 min. Food reward pellets were delivered only during the presentation of the CS+, on an RT-30-s schedule. Subsequent to this combined instrumental-Pavlovian training, the animals received a single 30-min instrumental extinction session, with the lever available but not reinforced. In addition, one Pavlovian reminder was given. This session was similar to the Pavlovian training sessions, except that two additional, nonrewarded 2-min presentations of an 80-dB SPL auditory (3-kHz tone or white noise) CS<sub>0</sub> stimulus (neutral stimulus, nonrewarded), as well as an additional ISI, were given preceding the fifth and following the sixth presentation of the CS+. If the tone was the CS+, the white noise was the CS<sub>0</sub>, and vice versa.

*Transfer test.* The PIT effect was tested in extinction, while the lever was inserted into the operant chamber. Each stimulus (CS+ and CS<sub>0</sub>) was 2 min in duration and was preceded by a 2-min ISI period. The session always started with the presentation of the white noise, thus counterbalancing the order of the presentations of CS+ and CS<sub>0</sub> within each group, and the session ended after four presentations of each stimulus type (CS+ and CS<sub>0</sub>).

### **Experimental design**

Three experiments were performed.

*Experiments 1 and 2:* We examined whether two distinct types of stressors, involving one or several prototypical types of acute stressors (“single” vs. “multiple” stressors; see below) and applied in either the light (Exp. 1) or the dark (Exp. 2) period of the light:dark cycle could alter the PIT effect measured in the transfer test. Instrumental and Pavlovian training and the transfer test were performed during either the light or the dark period; single or multiple stressors were applied to separate groups of rats immediately prior to the transfer test. Nonstressed rats served as the controls.

*Experiment 3:* Experiments 1 and 2 had revealed stressor effects on PIT when the stressors were applied during the dark, but not during the light, period. Therefore, in Experiment 3 we examined whether the observed darkperiod-related single- or multiple-stressor effects on the PIT test could be reduced by pretreatment with the standard anxiolytic drug diazepam. Nonstressed rats subjected to vehicle injections served as the controls.

**Types of acute stressors**

*Single stressor.* This stressor consisted of acute restraint for 60 min in a brightly lit novel room (see, e.g., Reis et al., 2011; Wong et al., 2007): Rats were placed in air-accessible Plexiglas cylinders of 7-cm diameter and variable length, in order to accommodate different-sized animals.

*Multiple stressor.* This stressor consisted of a combination of acute stressors, applied for 60 min in total in a brightly lit, novel room with music from a local radio station (~70 dB SPL), similar to the conditions used in previous studies (Chen et al., 2010). First, the rats were exposed to restraint for 20 min by placing them in Plexiglas cylinders. Thereafter, the rats were placed on an elevated platform (12 × 12 cm, 1 m tall) for 20 min (Wong et al., 2007). Eventually, the rats were reexposed to restraint for 20 min by placing them back in the Plexiglas cylinders. During this restraint, five tail shocks (1 mA, 1 s) were applied (e.g., Waddell, Mallimo, & Shors, 2010). Rats were exposed to single or multiple stressors during the light or the dark phase of the light:dark cycle. Note that in those rats examined during the dark phase, stressor exposure in the bright room represented a light pulse that might act, per se, as an additional stressor (Song & Rusak, 2000; Zubidat, Ben-Shlomo, & Haim, 2007).

**Drug treatment**

Diazepam (1 mg/kg, i.p.; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) or vehicle (1 ml/kg, i.p.) was given 90 min prior to the onset of PIT testing (i.e., 30 min before stressor exposure). Previous studies and our own pilot experiments had revealed that diazepam at 1 mg/kg i.p. produced anxiolytic-like effects devoid of marked locomotor inhibition (Boissier, Simon, & Aron, 1968; Treit & Fundytus, 1988) or suppression of instrumental responding (George, Hutson, & Stephens, 2009). Due to sedative effects of this drug, higher doses reduced basal rates of leverpressing on their own (see also George et al., 2009). Diazepam was dissolved in a vehicle of 50 % saline (0.9 % NaCl), 10 % pure ethanol, and 40 % polyethylene glycol.

**Blood sampling and corticosterone analysis**

To assess the stressor effects in Experiments 1 and 2 on glucocorticoid secretion, we measured plasma corticosterone levels in separate groups of experimentally naive rats exposed to no, single, or multiple stressors in the light (N=3, respectively) or in the dark (N=3, respectively) period. In addition, to assess the stressor and drug effects in Experiment 3 on glucocorticoid secretion, plasma corticosterone levels were measured in experimentally naive rats subjected to vehicle administration and no stress or to diazepam administration and single or multiple stressors (N=3, respectively). Upon completion of the stressor exposure, the rats were anesthetized with an overdose of isoflurane (cppharma, Burgdorf, Germany) and decapitated. Short-term treatment with isoflurane per se, as used here, does not alter corticosterone levels (Zardooz, Rostamkhani, Zaringhalam, & Faraji Shahrivar, 2010). Trunk blood was collected in a falcon tube (50 ml) for 15 min and centrifuged (4,000 rpm for 10 min; 8 °C). Subsequently, the blood plasma was centrifuged (4,000 rpm for 4 min, RT) and stored at -20 °C. Plasma corticosterone levels (ng/ml) were measured using the corticosterone ELISA kit RE52211 (IBL International GmbH, Hamburg, Germany).

**Data analysis**

The data from the instrumental and Pavlovian training were subjected to an analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, with Groups Exposed to Stressors as a



betweensubjects factor and Training Day as a within-subjects factor. The PIT data were also subjected to an ANOVA for repeated measures, with Stressor Type as a between-subjects factor and Interval (ISI, CS<sub>0</sub>, or CS<sub>+</sub>) as a within-subjects factor. Post hoc analyses were performed using the least significant difference test. Plasma corticosterone values were also subjected to an ANOVA, with Stressor Type and Time of Day as between-subjects factors. The level of statistical significance was  $p \leq .05$ . All statistical computations were carried out with STATISTICA (Version 7.1; StatSoft, Inc., Tulsa, OK).

## Results

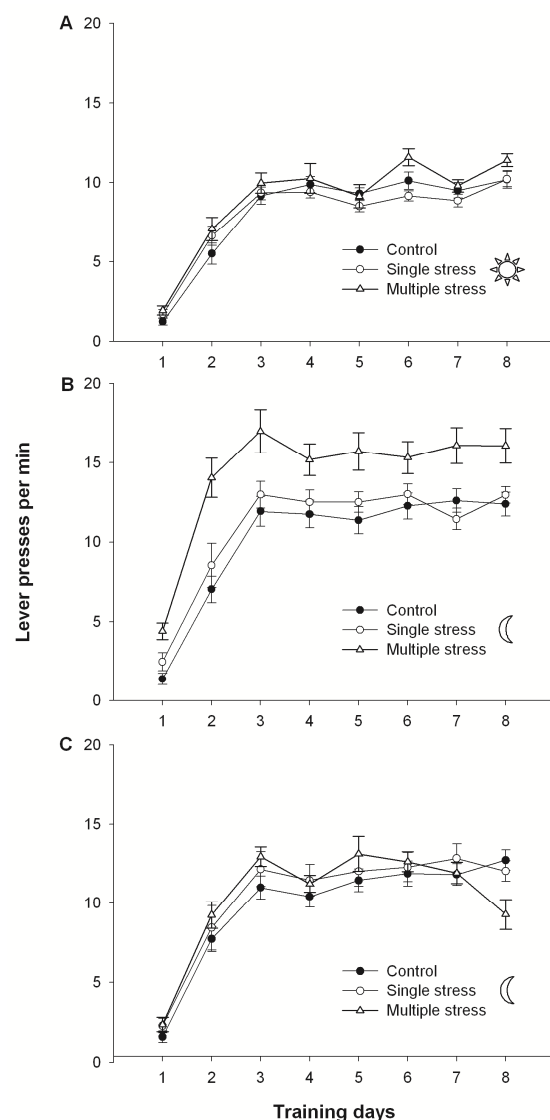
### Instrumental training

*Experiment 1.* Separate groups of rats to be exposed to no stressor ( $n=22$ ), a single stressor ( $n=23$ ), or multiple stressors ( $n=20$ ) were used; the rats were randomly assigned to their respective groups. Leverpress rates during instrumental training were similar across groups (Fig. 1a). An ANOVA revealed a significant effect of day [ $F(7, 427)=190.61, p < .01$ ] but not of group [ $F(2, 61)=1.73, p = .19$ ], and no Day  $\times$  Group interaction [ $F(14, 427)=1.60, p = .08$ ].

*Experiment 2:* Separate groups of rats to be exposed to no stressor ( $n=15$ ), a single stressor ( $n=12$ ), or multiple stressors ( $n=11$ ) were used; the rats were randomly assigned to the respective groups. We found a significant effect of day [ $F(7, 245)=110.85, p < .01$ ], a significant effect of group [ $F(2, 35)=10.60, p < .01$ ], and a trend toward a significant Day  $\times$  Group interaction [ $F(14, 245)=1.62, p = .07$ ] (Fig. 1b).

*Experiment 3.* Separate groups to be exposed to no stressor ( $n=14$ ), a single stressor ( $n=12$ ), or multiple stressors ( $n=12$ ) were used; the rats were randomly assigned to the respective groups. An ANOVA revealed a significant effect of day [ $F(7, 245)=97.042, p < .01$ ] and a significant Day  $\times$  Group interaction [ $F(14, 245)=2.13, p = .01$ ], but no effect of group [ $F(2, 35)=0.37, p = .69$ ] (Fig. 1c).

The results from Experiments 2 and 3 indicated that the leverpress performance over days differed somewhat between groups during instrumental training. The reasons for the differences between groups are unknown, but they may not influence the PIT



**Fig. 1.** Instrumental training. Mean lever presses per minute ( $\pm$  SEM) during instrumental training sessions in experiments 1-3 (A-C) in control rats and rats to be exposed to single stress or multiple stress. Training was given in the light (experiment 1) or dark period (experiments 2 and 3).

effect measured in the subsequent PIT test, for several reasons: (1) the approach ratios during Pavlovian training were similar across groups (see below); (2) the instrumental response rates during training did not predict the instrumental response rates in the PIT test performed in extinction; and (3) the PIT effect size does not critically depend on the instrumental response rate in the PIT test (Lex & Hauber, 2008).

### Pavlovian training

Stimulus-directed behavior during Pavlovian training was measured by calculating the approach ratio—that is, the percentages of time spent in the food receptacle during the CS+ versus during the ISI—as follows:  $\text{approach ratio} = (\%CS+) / (\%CS+ + \%ISI)$  (Hall et al., 2001).

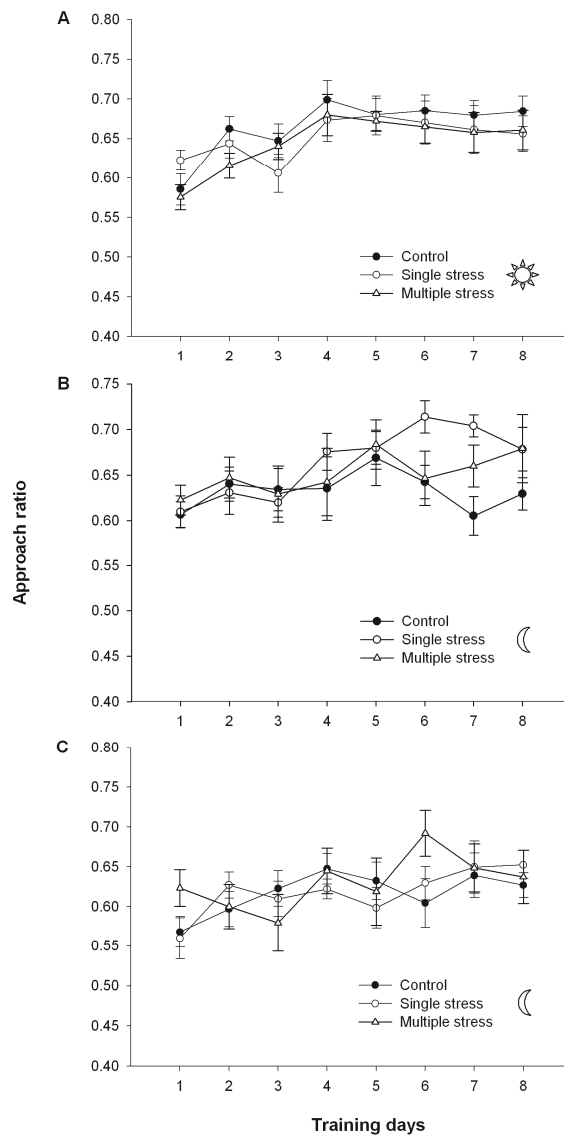
*Experiment 1.* The approach ratios were similar in all groups (Fig. 2a). An ANOVA demonstrated a significant effects of day [ $F(7, 392)=6.48, p < .01$ ], but no effect of group [ $F(2, 56)=0.79, p = .46$ ] and no Day  $\times$  Group interaction [ $F(14, 392)=0.54, p = .91$ ].

*Experiment 2.* Likewise, in Experiment 2, the approach ratios of all groups were similar (Fig. 2b). An ANOVA showed a significant effect of day [ $F(7, 245)=3.65, p < .01$ ], but no effect of group [ $F(2, 35)=1.14, p = .33$ ] and no Day  $\times$  Group interaction [ $F(14, 245)=1.19, p = .28$ ].

*Experiment 3.* Also, in Experiment 3 (Fig. 2c) the approach ratios increased to a similar extent in all groups, and an ANOVA revealed a significant effect of day [ $F(7, 238)=2.81, p < .01$ ], but no significant group effect [ $F(2, 34)=0.20, p = 0.82$ ] and no Day  $\times$  Group interaction [ $F(14, 238)=1.24, p = .25$ ].

### Transfer test

*Experiment 1.* Presentation of the CS+ enhanced leverpressing relative to the ISI in both nonstressed control rats and rats exposed to single and to multiple acute stressors immediately before the transfer test. Furthermore, a minor decrease in overall response rates across all intervals was observed in rats subjected to multiple stressors, relative to control rats (Fig. 3a). An ANOVA demonstrated no effect of stressor type (no, single, or multiple stressors) [ $F(2, 61)=1.85, p = .17$ ], a significant effect of interval (CS+, CSo, or ISI) [ $F(2, 122)=55.99, p <$

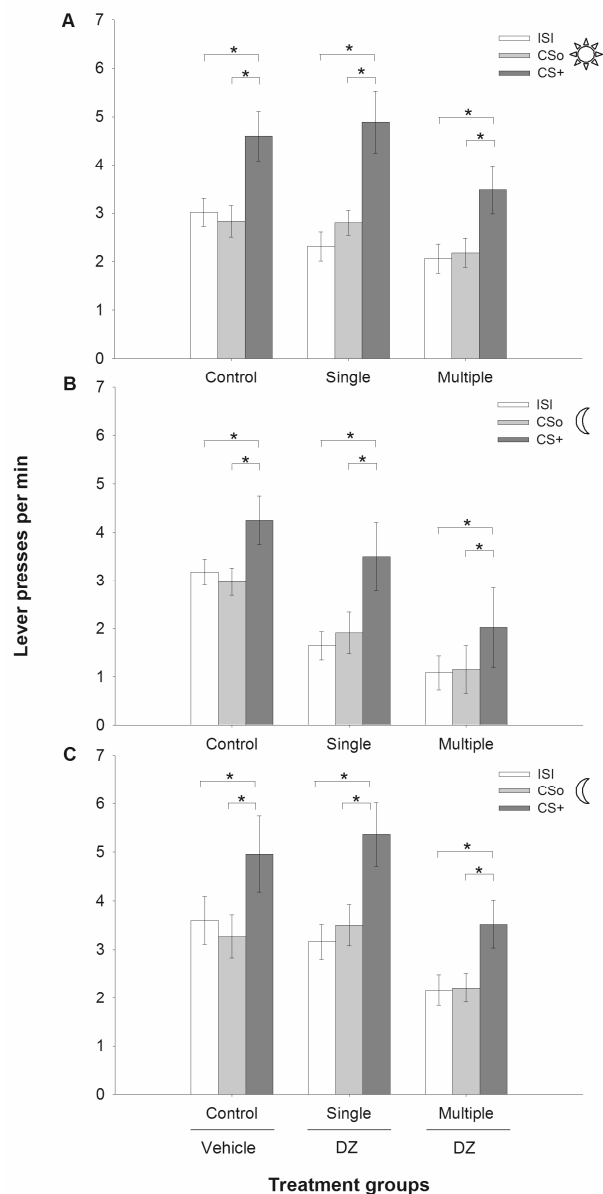


**Fig. 2.** Pavlovian training. Mean approach ratios ( $\pm$  SEM) during Pavlovian training in experiments 1-3 (A-C) in control rats and rats to be exposed to single or multiple stress. Training was given in the light (experiment 1) or dark period (experiments 2 and 3).

.01], and no Interval  $\times$  Stressor Type interaction [ $F(4, 122)=1.94, p= .11$ ]. Post hoc comparisons further indicated higher responding in control rats during the CS+ relative to the ISI ( $p < .05$ ), but not during the CS0 relative to the ISI ( $p= .53$ ). Likewise, in rats exposed to single and multiple stressors, leverpressing during the CS+ was higher relative to the ISI (single stressor,  $p < .01$ ; multiple stressors,  $p < .01$ ), but not during the CS0 relative to the ISI (single stressor,  $p < .23$ ; multiple stressors,  $p= .69$ ).

**Experiment 2.** This experiment demonstrated a PIT effect in both control rats and rats exposed to single and multiple stressors. However, baseline responding was lower in the rats exposed to single and multiple stressors, relative to control rats (Fig. 3b). Consistent with this notion, an ANOVA demonstrated significant effects of stressor type [ $F(2, 35)=7.05, p < .01$ ] and interval [ $F(2, 70)=14.09, p < .01$ ], but no Interval  $\times$  Stressor Type interaction [ $F(4, 70)=0.62, p= .65$ ]. Post hoc comparisons further indicated higher responding during the CS+ relative to the ISI in control rats and in rats exposed to single and multiple stressors (controls,  $p < .02$ ; single stressor,  $p < .01$ ; multiple stressors,  $p= .03$ ), but not during the CS0 relative to the ISI (controls,  $p= .65$ ; single stressor,  $p= .63$ ; multiple stressor,  $p= .87$ ). For a more detailed analysis of the treatment effect on overall leverpress rates, we performed separate pair-wise ANOVAs. The results revealed that the overall leverpress rates across all intervals (ISI, CS+, and CS0) were lower in the single-stressor group than in the control group [ $F(1, 25)=5.97, p= .02$ ] and also lower in the multiple-stressor group than in the control group [ $F(1, 24)=13.47, p= .01$ ], but not between the single-stressor and multiple-stressor groups [ $F(1, 21)=1.98, p= .17$ ].

**Experiment 3.** A PIT effect was observed in the vehicle-treated control rats exposed to no stressor, as well as in the diazepam-pretreated rats exposed to a single stressor and to multiple stressors (Fig. 3c). An ANOVA revealed significant effects of stressor type [ $F(2, 35)=3.26, p= .05$ ] and interval [ $F(2, 70)=22.68, p < .01$ ], but no Interval  $\times$  Stressor Type interaction [ $F(4, 70)=0.61, p= .66$ ]. Post hoc comparisons further indicated higher responding in all



**Fig. 3.** Pavlovian-Instrumental transfer. Mean lever presses per minute ( $\pm$  SEM) in control rats and rats exposed to single and multiple stress. In experiment 1 (A), transfer testing was performed in the light period, in experiment 2 and 3 (B,C) in the dark period. In experiment 3, controls rats were pretreated with vehicle, rats exposed to single or multiple stress with diazepam (1 mg/kg, i.p.). \* $P < 0.05$  inter-stimulus interval ISI or unconditioned, neutral stimulus (CS0) vs. conditioned stimulus (CS+).

treatment groups during the CS+ relative to the ISI (control,  $p = .01$ ; single stressor,  $p < .01$ ; multiple stressor,  $p < .01$ ), but not during the CS0 relative to the ISI (control,  $p = .52$ ; single stressor,  $p = .55$ ; multiple stressor,  $p = .88$ ). For a more detailed analysis, we analyzed the treatment effect on overall leverpress rates using separate pair-wise ANOVAs. The results revealed that the overall leverpress rates across intervals (ISI, CS+, and CS0) did not differ between the single-stressor and control groups [ $F(1, 24) = 0.01$ ,  $p = .92$ ], but that they were lower in the multiple-stressor group than in the control group [ $F(1, 24) = 4.37$ ,  $p < .05$ ], as well as in the single-stressor group [ $F(1, 22) = 7.70$ ,  $p = .01$ ].

Collectively, the data from Experiments 2 and 3 point to the possibility that diazepam moderately reduced the stressor-induced decline in overall leverpress rates, in particular in rats exposed to the single stressor. To characterize the diazepam effects in more detail, we performed an ANOVA on the PIT effects measured in Experiments 2 and 3, with Experiment and Stressor Type as between-subjects factors and Interval as a within-subjects factor. The results revealed significant effects of experiment [ $F(1, 70) = 11.06$ ,  $p < .01$ ], stressor type [ $F(2, 70) = 8.80$ ,  $p < .01$ ], and interval [ $F(2, 140) = 36.31$ ,  $p < .01$ ], but, importantly, no Experiment  $\times$  Stressor Type interaction [ $F(2, 70) = 1.14$ ,  $p = .32$ ], suggesting that diazepam had only marginal effects that failed to reach significance.

### Plasma corticosterone levels

Corticosterone levels were higher in the untreated rats exposed to single and multiple stressors than in controls, and the effects of time of day seemed to be moderate (Table 1). In line with this notion, an ANOVA with Time of Day (light or dark period) and Stressor Type (no, single, or multiple stressors) as factors showed significant effects of stressor type [ $F(2, 12) = 35.6$ ,  $p < .01$ ] and time of day [ $F(1, 12) = 5.3$ ,  $p < .05$ ], but no interaction between these factors. Post hoc comparisons indicated that in both the light and dark periods, corticosterone levels were increased in stressorexposed rats relative to control rats (Table 1). By contrast, corticosterone levels in the rats treated with vehicle or diazepam did not differ. An ANOVA with Stressor Type (no, single, or multiple stressors) as a factor revealed no significant treatment effects [ $F(2, 5) = 1.81$ ,  $p > .05$ ]. The corticosterone value of one diazepam-treated animal exposed to the single stressor was excluded, as it deviated from the group mean by more than 2 SDs.

**Table 1** Time of day, stressor, and drug effects on mean plasma corticosterone levels

Time of Day	Stressor	Drug	Corticosterone (ng/ml)	<i>n</i>
Light period	Control	–	195.4 $\pm$ 72	3
Light period	Single	–	738.6 $\pm$ 36*	3
Light period	Multiple	–	1,053.3 $\pm$ 99* #	3
Dark period	Control	–	503.7 $\pm$ 103	3
Dark period	Single	–	902.8 $\pm$ 101*	3
Dark period	Multiple	–	1,060.2 $\pm$ 81*	3
Dark period	Control	Vehicle	661.9 $\pm$ 233	3
Dark period	Single	Diazepam	1,259.8 $\pm$ 358	2
Dark period	Multiple	Diazepam	896.8 $\pm$ 36	3

\*  $p < .01$  vs. the respective control; #  $p < .05$  single vs. multiple stressors

### Discussion

Here, we examined the impact of two types of acute stressors when they were applied in the light or the dark period of the light:dark cycle immediately prior to the PIT test. The main finding of our study was that both types of stressors applied in the light did not alter the PIT effect—that is, the ability of an appetitive Pavlovian stimulus to enhance leverpressing—and also left basal leverpress rates unchanged. By contrast, when applied in the dark period, both types of stressors did not amplify the PIT effect but did markedly reduce basal leverpress rates.

### **Acute stressor effects: Influence of time of day**

In the light period, the acute single stressor stimulated the HPA axis, resulting in increased plasma corticosterone, as was shown by earlier studies (e.g., Keim & Sigg, 1976; Porterfield et al., 2011; Ulrich-Lai et al., 2010), but it did not alter the PIT effect or basal instrumental response rates. Our pilot studies using other prototypical acute stressors applied in the light period—for instance, elevated platform stress (Howland & Cazakoff, 2010) or extended restraint stress (Yuen et al., 2009)—gave similar results. Therefore, we employed a novel multiple stressor involving a combination of typical acute stressors used in previous studies (e.g., Howland & Cazakoff, 2010; Keim & Sigg, 1976; Musazzi et al., 2010; Yuen et al., 2009). Notably, exposure to the multiple stressor during the light period increased plasma corticosterone to a larger extent than did the single stressor applied during the light period, but it did not alter the PIT effect and instrumental response rates.

By contrast, in the dark period, single and multiple stressors elevated plasma corticosterone to about the same extent and significantly reduced instrumental response rates, but they left the PIT effect per se unaffected. This finding suggests that our acute stressors, which involved solely or predominately restraint, were, in behavioral terms, most effective in the dark period. This view is consistent with an earlier notion that, for rats, stress procedures involving restraint elicit more pronounced physiological and behavioral effects during the dark (activity) period than during the

light (inactivity) period (Koolhaas et al., 2011). As was pointed out by the authors of this previous study, from an ecological point of view this observation is not surprising, as, for instance, during the light (inactivity) period feral Norway rats hide in narrow burrow systems.

Consistent with earlier reports (e.g., Atkinson & Waddell, 1997; Chacon et al., 2005; Gallo & Weinberg, 1981), plasma corticosterone levels in our rats were generally higher during the dark period than during the light period. Moreover, plasma corticosterone elevations after single or multiple stressor correspond to those reported in previous studies using similar or other acute stressors (e.g., Kavushansky, Klein, & Ben-Shachar, 2010; Kavushansky & Richter-Levin, 2006; Ulrich-Lai & Herman, 2009; Woodson, Macintosh, Fleshner, & Diamond, 2003). The plasma corticosterone elevations reported in previous studies were not or were only partially related to stressor type or intensity, the timing of the stress exposure, or the magnitude of the stress-induced behavioral effects. For instance, male rats exposed to a predator such as a cat or to a female receptive rat showed equivalent increases in plasma corticosterone levels, but only cat-exposed rats exhibited working memory deficits (Woodson et al., 2003). Furthermore, the effects of acute restraint stress on cost/benefit decision making in rats were not mimicked by systemic administration of corticosterone, suggesting that increased corticosterone levels may be not sufficient to impair this form of behavioral choice (Shafiei, Gray, Viau, & Floresco, 2012). Overall, these findings suggest that plasma corticosterone levels may not always be a sensitive index of stress intensity (e.g., Natelson et al., 1987). Correspondingly, our present findings provide strong support for the notion that, in rats, the behavioral effects of acute stressors involving restraint critically depend on the time of day, but depend less on stressor intensity.

### **Acute stress effects on PIT**

A major 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 & Solomon, 1967). Notably, this PIT effect has been markedly enhanced not only by intra-accumbens amphetamine infusion (Wyvell & Berridge, 2000) but also by intra-accumbens

CRF infusion, suggesting that the activation of CRF subsystems in the nucleus accumbens and, by implication, acute stress could amplify positive motivation for signaled rewards (Pecina et al., 2006). Importantly, such paradoxical positive incentive effects could explain why acute stress sometimes produces stimulus-triggered bursts of binge eating, drug relapse, or other excessive pursuits of reward (Dallman, Pecoraro, Houshyar, & Griffith, 2005; Marinelli & Piazza, 2002). Contrasting with this view, our results indicate that, unlike intra-accumbens CRF, acute stressors applied prior the PIT test did not enhance the ability of an appetitive CS+ to invigorate instrumental responding, but rather impaired basal instrumental responding for an expected reward. As only high but not low doses of intra-accumbens CRF have been effective (Pecina et al., 2006), the failure to observe an amplified PIT effect could be due simply to subthreshold accumbens CRF levels induced by the acute stressors used here. To our knowledge, the effects of the stressors used here on intra-accumbens CRF levels are unknown. Microdialysis studies have revealed that restraint stress for 20 min produced a threefold increase of CRF levels in limbic brain areas such as the amygdala (Merlo Pich et al., 1995), and possibly in the nucleus accumbens as well; however, direct evidence for the latter claim is missing. Furthermore, restraint stress for 90 min markedly increased intra-accumbens dopamine release (Imperato et al., 1989), indicating that the stressors used in the present study can produce marked neurochemical effects. Furthermore, our observation that both single and multiple stressors applied in the dark period reduced basal leverpressing suggests that the stressors were behaviorally effective. Importantly, acute stress responses involve the release of multiple stress mediators, including a number of other neuropeptides, such as vasopressin or dynorphin, as well as monoamine neurotransmitters and steroids (Joels & Baram, 2009). Furthermore, acute stress responses are mediated by complex neural circuits in the limbic forebrain, the hypothalamus, and the brainstem (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Thus, an intra-accumbens CRF infusion may mimic the multifaceted neurochemical responses in many brain areas induced by acute stressors only to a minor extent.

For instance, it is conceivable that acute stressors activate the CRF subsystems that mediate aversive states (Schulkin, Morgan, & Rosen, 2005), possibly counteracting the expression of an amplified PIT effect governed by accumbens CRF subsystems. Overall, our finding that acute stressors were unable to amplify the incentive salience of a rewardpredictive CS+ in order to activate reward-directed responding puts in question a general role of acute stressors in precipitating paradoxical incentive effects—for instance, stimulus-triggered bursts of binge eating or drug relapse (Pecina et al., 2006). Yet, it is important to note that acute stressor effects depend on multiple variables; thus, other types of expected rewards, such as drugs, could enhance the incentive motivation triggered by an appetitive CS+, in particular in rats chronically pretreated with addictive drugs. Furthermore, the fact that the PIT effect was insensitive to acute stressors implies that the retrieval of well-learned memories for CS–US associations, unlike other forms of memory (de Kloet, Oitzl, & Joels, 1999), and the behavioral impact mediated by the appetitive CS+ seem to be relatively resistant to acute stress. To some extent, the resistance of the PIT effect to acute stressors may be explained by Pavlovian training over not less than 8 days, as it has been implemented in most PIT protocols (Holmes, Marchand, & Coutureau, 2010). In other words, it is possible that the PIT effect could become sensitive to acute stressors if a PIT protocol with more limited Pavlovian training would be used.

Importantly, our results further show that acute stressors significantly reduced basal instrumental responding for an expected reward during the PIT test. As acute stressors can compromise performance of skilled paw movements (Metz, Jadavji, & Smith, 2005), the

reduced leverpressing seen here could simply reflect impaired motor function per se. However, such a chronic, state-like motor impairment should have applied for the entire transfer test, regardless of whether or not the CS+ stimulus was present. By contrast, we observed that presentation of an appetitive CS+ was still able to invigorate leverpressing, an observation that seems to rule out basic motor impairments as an explanation for reduced instrumental responding. Considerable evidence suggests that, rather than reducing reward-seeking behavior, exposure to an acute stressor can have the opposite effect, stimulating palatable food intake or reinstating drug-taking behavior (Cador et al., 1992; Kalivas, Duffy, & Latimer, 1987; Stewart, 2003). In turn, pleasurable behaviors such as palatable food intake were able to reduce neuroendocrine, cardiovascular, and behavioral responses to acute stress (Ulrich-Lai & Herman, 2009). By contrast, a large number of studies have suggested that both acute stress and intracerebroventricular CRF inhibited food intake and behaviors associated with food intake. For instance, CRF decreased food-maintained instrumental responding under various reinforcement schedules, including differential reinforcements of low rate or combined fixed-interval and fixed-ratio schedules (see Glowa, Barrett, Russell, & Gold, 1992, for a review). Remarkably, depending on a number of variables, such as stress intensity or context, acute stress can either reinstate or inhibit drug seeking (Lu, Shepard, Hall, & Shaham, 2003; Shaham, Erb, & Stewart, 2000). Furthermore, it is well documented that acute stress can produce fear and anxiety (Davis, 2006; Schulkin et al., 2005). For instance, by producing anxiety, a footshock-predictive stimulus can markedly suppress instrumental responding (Blanchard & Blanchard, 1969; Hunt & Brady, 1951). These findings point to the possibility that stress-induced anxiety could have contributed to the reduced instrumental responding observed here. However, our data do not provide support to this notion, as the standard anxiolytic drug diazepam at a dose of 1 mg/kg only marginally reduced leverpressing after stressor exposition. Notably, in acute-stress paradigms, low doses of diazepam (<3 mg/kg) can produce anxiolytic effects on a variety of behavioral measures (Grahn, Kalman, Brennan, Watkins, & Maier, 1995; Kalman, Kim, Cole, Chi, & Spencer, 1997) without decreasing stress-induced rises in plasma corticosterone (Keim & Sigg, 1976). Nevertheless, we cannot exclude the possibility that higher doses of diazepam could have antagonized stress-induced behavioral effects. However, our pilot studies indicated that higher doses reduced basal rates of leverpressing on their own. Likewise, a study by George et al. (2009) demonstrated that, due to sedative effects, diazepam at doses of 3 and 10mg/kg reduced basal rates of leverpresses in the PIT test, an effect not seen with a dose of 1 mg/kg, as used here. Thus, anxiolytic or antidepressant drugs with a lower incidence of sedative effects could be an option for future studies. Taken together, our findings clearly show that acute stressors impaired basal instrumental responding; however, the underlying behavioral mechanisms remain to be determined.

### **Conclusions**

Our study demonstrated for the first time that acute stressors did not amplify the PIT effect, but rather reduced basal instrumental responding during the PIT test, an effect that critically depended on the time of day of stressor exposure. Importantly, these findings suggest that, unlike intra-accumbens CRF (Pecina et al., 2006), acute stress was unable to enhance the incentive salience of a CS+ that was predictive of natural reward so as to invigorate reward-directed responding, but instead impaired basal instrumental responding.

## Author note

This research was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant No. HA2340/6-3. We thank our colleagues F. Wollnik and E. Scheibler for technical advice and scientific discussions, as well as I. Nevar for assistance in animal husbandry. The authors declare no conflict of interest. The authors' contributions were as follows: S.M.P. participated in the research design, performed behavioral testing and data analysis, and drafted the manuscript; S.B. developed the stress protocols; and W.H. participated in the research design and data analysis and revised the manuscript.

## References

- Atkinson, H. C., & Waddell, B. J. (1997). Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: Sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*, *138*, 3842–3848.
- Bale, T. L., & Vale, W. W. (2004). CRF and CRF receptors: Role in stress responsivity and other behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44*, 525–557.
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *68*, 129–135.
- Boissier, J. R., Simon, P., & Aron, C. (1968). A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. *European Journal of Pharmacology*, *4*, 145–151.
- Cador, M., Dumas, S., Cole, B. J., Mallet, J., Koob, G. F., Lemoal, M., & Stinus, L. (1992). Behavioral sensitization induced by psychostimulants or stress—Search for a molecular-basis and evidence for a crf-dependent phenomenon. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *654*, 416–420.
- Chacon, F., Esquifino, A. I., Perello, M., Cardinali, D. P., Spinedi, E., & Alvarez, M. P. (2005). 24-hour changes in ACTH, corticosterone, growth hormone, and leptin levels in young male rats subjected to calorie restriction. *Chronobiology International*, *22*, 253–265. doi:10.1081/cbi-200053522
- Chen, Y., Rex, C. S., Rice, C. J., Dube, C. M., Gall, C. M., Lynch, G., & Baram, T. Z. (2010). Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*, 13123–13128. doi:10.1073/pnas.1003825107
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2005). Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general and outcomespecific forms of Pavlovian–instrumental transfer. *Journal of Neuroscience*, *25*, 962–970.
- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2011). The general and outcomespecific forms of Pavlovian–instrumental transfer are differentially mediated by the nucleus accumbens core and shell. *Journal of Neuroscience*, *31*, 11786–11794. doi:10.1523/JNEUROSCI.2711-11.2011
- Corbit, L. H., Janak, P. H., & 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. *European Journal of Neuroscience*, *26*, 3141–3149.
- Dallman, F., Pecoraro, C., Houshyar, H., & Griffith, K. (2005). Stress, glucocorticoids and obesity. *Behavioural Pharmacology*, *16*, S13–S13.
- Davis, M. (2006). Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *American Psychologist*, *61*, 741–756. doi:10.1037/0003-066X.61.8.741
- de Kloet, E. R., Oitzl, M. S., & Joels, M. (1999). Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences*, *22*, 422–426.
- Estes, W. K. (1948). Discriminative conditioning: II. Effects of a Pavlovian conditioned stimulus upon a subsequently established operant response. *Journal of Experimental Psychology*, *38*, 173–177. doi:10.1037/h0057525
- Gallo, P. V., & Weinberg, J. (1981). Corticosterone rhythmicity in the rat—Interactive effects of dietary restriction and schedule of feeding. *Journal of Nutrition*, *111*, 208–218.
- George, S. A., Hutson, P. H., & Stephens, D. N. (2009). Differential effects of MPEP and diazepam in tests of conditioned emotional response and Pavlovian-to-instrumental transfer suggests “anxiolytic” effects are mediated by different mechanisms. *Psychopharmacology*, *204*, 499–509. doi:10.1007/s00213-009-1479-6
- Glowa, J. R., Barrett, J. E., Russell, J., & Gold, P. W. (1992). Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors. *Peptides*, *13*, 609–621.
- Grahn, R. E., Kalman, B. A., Brennan, F. X., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (1995). The elevated plus-maze is not sensitive to the effect of stressor controllability in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *52*, 565–570.
- Hall, J., Parkinson, J. A., Connor, T. M., Dickinson, A., & Everitt, B. J. (2001). Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *European Journal of Neuroscience*, *13*, 1984–1992.



- Holland, P. C., & Gallagher, M. (2003). Double dissociation of the effects of lesions of basolateral and central amygdala on conditioned stimulus-potentiated feeding and Pavlovian-instrumental transfer. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1680–1694.
- Holmes, N. M., Marchand, A. R., & Coutureau, E. (2010). Pavlovian to instrumental transfer: A neurobehavioural perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34, 1277–1295.
- Howland, J. G., & Cazakoff, B. N. (2010). Effects of acute stress and GluN2B-containing NMDA receptor antagonism on object and object-place recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93, 261–267. doi:10.1016/j.nlm.2009.10.006
- Hunt, H. F., & Brady, J. V. (1951). Some effects of electro-convulsive shock on a conditioned emotional response (anxiety). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 44, 88–98.
- Imperato, A., Puglisi-Allegra, S., Casolini, P., Zocchi, A., & Angelucci, L. (1989). Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine-release in limbic structures—Role of corticosterone. *European Journal of Pharmacology*, 165, 337–338.
- Joels, M., & Baram, T. Z. (2009). OPINION: The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, U459–U484. doi:10.1038/nrn2632
- Kalivas, P. W., Duffy, P., & Latimer, L. G. (1987). Neurochemical and behavioral effects of corticotropin-releasing factor in the ventral tegmental area of the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 242, 757–763.
- Kalman, B. A., Kim, P. J., Cole, M. A., Chi, M. S., & Spencer, R. L. (1997). Diazepam attenuation of restraint stress-induced corticosterone levels is enhanced by prior exposure to repeated restraint. *Psychoneuroendocrinology*, 22, 349–360.
- Kavushansky, A., Klein, E., & Ben-Shachar, D. (2010). A possible involvement of opioid-degrading enzymes in individual reactivity to acute traumatic stress. *European Neuropsychopharmacology*, 20, S41–S42.
- Kavushansky, A., & Richter-Levin, G. (2006). Effects of stress and corticosterone on activity and plasticity in the amygdala. *Journal of Neuroscience Research*, 84, 1580–1587. doi:10.1002/jnr.21058
- Keim, K. L., & Sigg, E. B. (1976). Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. *Pharmacol Biochemistry and Behavior*, 4, 289–297.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flugge, G., Korte, S. M., . . . Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 1291–1301. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003
- Lex, A., & Hauber, W. (2008). Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer. *Learning & Memory*, 15, 483–491.
- Lovibond, P. F. (1983). Facilitation of instrumental behavior by a Pavlovian appetitive conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 9, 225–247. doi:10.1037/0097-7403.9.3.225
- Lu, L., Shepard, J. D., Hall, F. S., & Shaham, Y. (2003). Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 457–491. doi:10.1016/S0149-7634(03)00073-3
- Marinelli, M., & Piazza, P. V. (2002). Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *European Journal of Neuroscience*, 16, 387–394.
- Merlo Pich, E., Lorang, M., Yeganeh, M., Rodriguez de Fonseca, F., Raber, J., Koob, G. F., & Weiss, F. (1995). Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *Journal of Neuroscience*, 15, 5439–5447.
- Metz, G. A., Jadavji, N. M., & Smith, L. K. (2005). Modulation of motor function by stress: A novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior. *European Journal of Neuroscience*, 22, 1190–1200. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04285.x
- Murschall, A., & Hauber, W. (2006). Inactivation of the ventral tegmental area abolished the general excitatory influence of Pavlovian cues on instrumental performance. *Learning & Memory*, 13, 123–126.
- Musazzi, L., Milanese, M., Farisello, P., Zappettini, S., Tardito, D., Barbiero, V. S., & Popoli, M. (2010). Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/ frontal cortex: The dampening action of antidepressants. *Plos ONE*, 5, 8566. doi:10.1371/journal.pone.0008566
- Natelson, B. H., D. Creighton, et al. (1987). Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiology & Behavior* 39(1):117–125.
- Pecina, S., Schulkin, J., & Berridge, K. C. (2006). Nucleus accumbens corticotropin-releasing factor increases cue-triggered motivation for sucrose reward: Paradoxical positive incentive effects in stress? *BMC Biology*, 4, 8.
- Porterfield, V. M., Zimomra, Z. R., Caldwell, E. A., Camp, R. M., Gabella, K. M., & Johnson, J. D. (2011). Rat strain differences in restraint stress-induced brain cytokines. *Neuroscience*, 188, 48–54. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.05.023
- Reis, D. G., A. A. Scopinho, et al. (2011). Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. *PLoS ONE* 6(8):e23171.

- Rescorla, R. A., & Solomon, R. L. (1967). Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychological Review*, 74, 151–182. doi:10.1037/h0024475
- Schulkin, J., Morgan, M. A., & Rosen, J. B. (2005). A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends in Neurosciences*, 28, 629–635. doi:10.1016/j.tins.2005.09.009
- Shafiei, N., Gray, M., Viau, V., & Floresco, S. B. (2012). Acute stress induces selective alterations in cost/benefit decision-making. *Neuropsychopharmacology*, 37, 2194–2209. doi:10.1038/npp.2012.69
- Shaham, Y., Erb, S., & Stewart, J. (2000). Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: A review. *Brain Research Reviews*, 33, 13–33.
- Song, X., & Rusak, B. (2000). Acute effects of light on body temperature and activity in Syrian hamsters: Influence of circadian phase. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278, R1369–R1380.
- Stewart, J. (2003). State and trait changes in motivational systems control: The re-initiation of drug seeking after abstinence. *Behavioural Pharmacology*, 14, S23–S23.
- Treit, D., & Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 31, 959–962.
- Ulrich-Lai, Y. M., Christiansen, A. M., Ostrander, M. M., Jones, A. A., Jones, K. R., Choi, D. C., & Herman, J. P. (2010). Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 20529–20534. doi:10.1073/pnas.1007740107
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 397–409. doi:10.1038/nrn2647
- Waddell, J., Mallimo, E., & Shors, T. (2010). d-cycloserine reverses the detrimental effects of stress on learning in females and enhances retention in males. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93, 31–36. doi:10.1016/j.nlm.2009.08.002
- Wong, T. P., Howland, J. G., Robillard, J. M., Ge, Y., Yu, W., Titterness, A. K., . . . Wang, Y. T. (2007). Hippocampal long-term depression mediates acute stress-induced spatial memory retrieval impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 11471–11476. doi:10.1073/pnas.0702308104
- Woodson, J. C., Macintosh, D., Fleshner, M., & Diamond, D. M. (2003). Emotion-induced amnesia in rats: Working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learning & Memory*, 10, 326–336. doi:10.1101/lm.62903
- Wyvell, C. L., & 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. *Journal of Neuroscience*, 20, 8122–8130.
- Yuen, E. Y., Liu, W. H., Karatsoreos, I. N., Feng, J., McEwen, B. S., & Yan, Z. (2009). Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 14075–14079. doi:10.1073/pnas.0906791106
- Zardoos, H., Rostamkhani, F., Zaringhalam, J., & Faraji Shahrivar, F. (2010). Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO<sub>2</sub> in male rats. *Physiological Research*, 59, 973–978.
- Zubidat, A. E., Ben-Shlomo, R., & Haim, A. (2007). Thermoregulatory and endocrine responses to light pulses in short-day acclimated social voles (*Microtus socialis*). *Chronobiology International*, 24, 269–288. doi:10.1080/07420520701284675

### 7.3 MANUSKRIFT 3

BRAUN S, HAUBER W (2013) ACUTE STRESSOR EFFECTS ON GOAL-DIRECTED ACTION IN RATS. LEARN MEM 20:700-709. DOI: 10.1101/LM.032987.113.

Dieses Manuskript beschreibt die Etablierung des Ergebnisdevaluationstests und die Wirkungen von Stressoren auf den Abruf der gelernten Handlungs-Ergebnis-Beziehung. Ebenfalls wurde untersucht, wie sich die Blockade der Stressor-Wirkungen durch Diazepam auf instrumentelles Handeln auswirkt.

#### BEITRÄGE DER AUTOREN

##### Braun S:

- Konzeption des experimentellen Designs
- Erstellung der MED-PC Programme
- Konzeption, Etablierung und Durchführung der Stress-Protokolle
- Erprobung und Etablierung der Testaufgaben
- Durchführung der Testaufgaben (Ergebnisdevaluationstests)
- Datenerfassung, Auswertung und Analyse
- Analyse der Plasma-Corticosteron Werte
- Erstellung aller Tabellen und Abbildungen
- Schreiben und Editieren des Manuskripts
- 

##### Hauber W:

- Konzeption des experimentellen Designs
- Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, Diskussion der Daten
- Unterstützung beim Schreiben und Editieren des Manuskripts

## Acute stressor effects on goal-directed action in rats

Stephanie Braun & Wolfgang Hauber, 2013

### Abstract

Here we examined effects of acute stressors that involve either systemic coadministration of corticosterone/yohimbine (3 mg/kg each) to increase glucocorticoid/noradrenaline activity (denoted as “pharmacological” stressor) or one or several distinct restraint stressors (denoted as “single” vs. “multiple” stressor) on performance of goal-directed actions. Rats were trained over 11 d to perform two instrumental actions, one for food pellets the other for sucrose solution, followed by two consecutive tests days. On each test day, rats were first sated in a counterbalanced manner on one of the two outcomes by prefeeding (selective outcome devaluation), then subjected to an acute stressor, and tested afterward in a two-lever choice task in extinction to assess whether instrumental performance is goal-directed, i.e., sensitive to changes in outcome value. Like in control rats, in rats subjected to the pharmacological or single restraint stressor prior to the choice test, performance of instrumental action was goal-directed, i.e., sensitive to outcome devaluation. By contrast, in rats exposed to the multiple stressor prior to the choice test, performance of instrumental action was habitual, i.e., insensitive to outcome devaluation. Pretreatment with diazepam (1 and 2 mg/kg) did not alleviate (or only marginally) this multiple stressor-induced effect. Thus, an intense acute stressor can render performance of previously acquired instrumental action habitual, possibly due to a compromised retrieval of encoded relationships between actions and their outcome value. Our observation in rats that an acute stressor can shift instrumental responding from goal-directed to habitual control is consistent with similar findings in humans.

### Introduction

Two interacting learning systems govern the performance of instrumental action, one controls the acquisition of goal-directed actions and the other the acquisition of habits (Dickinson 1985). The acquisition of goal-directed actions is driven by causal relations between actions and outcomes and, hence, sensitive to changes of action–outcome contingencies and outcome devaluation. By contrast, the acquisition of habits is driven by stimulus–response relations and insensitive to changes of action–outcome contingencies or outcome devaluation (Balleine and Dickinson 1998). Goal-directed actions are flexible and can be adapted to changing environments, whereas habits are inflexible and performed almost automatically, allowing attention to be focused elsewhere (for comprehensive reviews, see Graybiel 2008; Balleine and O’Doherty 2010).

Accumulating evidence from rodent studies suggests that the medial prefrontal cortex (mPFC), the dorsomedial striatum (DMS), and the basolateral amygdala play key roles in the acquisition and/or performance of goal-directed action (Balleine et al. 2003; Ostlund and Balleine 2005; Yin et al. 2005; Naneix et al. 2009; Balleine and O’Doherty 2010; Lex and Hauber 2010a; Braun and Hauber 2011), whereas the dorsolateral striatum (DLS) and the central nucleus of the amygdala support habit learning (Yin et al. 2004; Lingawi and Balleine 2012). Similarly, studies in humans implicated the mPFC and DMS in encoding the causal effects of actions and the DLS in habit formation (Tanaka et al. 2008; Valentin and O’Doherty 2009), indicating that brain systems involved in controlling goal-directed action and habit formation are highly conserved across mammalian species (Tanaka et al. 2008).

Importantly, acute physical/psychosocial stress in humans can modulate processes governing learning and expression of action–outcome contingencies in a manner that favors the habit system over the goal-directed system (Schwabe and Wolf 2009). These acute stress effects on instrumental responding can be mimicked by an increased glucocorticoid/noradrenergic activity elicited throughcoadministrationof the glucocorticoid hydrocortisone and the  $\alpha$ 2-adrenoceptor antagonist yohimbine (Schwabe et al. 2010). A reduced capacity of the prefrontal cortex to assess changes in the incentive value of actions may account for the stress-induced shift from goal-directed action to habit behavior (Schwabe et al. 2012).

In animal studies, to date stress effects on goal-directed action have rarely been investigated. Chronic stress in rats facilitated a shift from goal-directed to habitual control of instrumental action (Dias-Ferreira et al. 2009; Gourley et al. 2012) and caused a neuronal atrophy in the DMS as well as a neuronal hypertrophy in the DLS (Dias-Ferreira et al. 2009). However, it is as yet unknown whether acute stress in rats can shift instrumental responding from goal-directed to habitual control, as shown in humans. Here we examined the effects of acute stressors that involve either systemic coadministration of corticosterone/yohimbine to increase glucocorticoid/noradrenaline activity (denoted here as “pharmacological” stressor) or one or several distinct restraint stressors (denoted here as “single” vs. “multiple” stressor) on performance of goal-directed actions guided by previously acquired action–outcome associations. In four experiments, separate groups of rats were trained over 11 d to press two levers for distinct outcomes followed by two consecutive test days. One each test day, rats were first sated in a counterbalanced manner on one of these two outcomes by prefeeding (selective outcome devaluation). Then, rats were subjected to an acute stressor and tested afterward in a two-lever choice task in extinction to assess whether instrumental performance was goal-directed, i.e., sensitive to changes in the outcome value. We examined the effects of a pharmacological stressor (Experiment 1), a single restraint stressor (Experiment 2), and a multiple restraint stressor (Experiment 3) applied prior to the choice test on instrumental performance. Furthermore, we examined whether multiple stressor effects on instrumental performance can be reversed by pretreatment with a low (Experiment 4A) or high (Experiment 4B) dose of the standard anxiolytic drug diazepam. Previous studies revealed that diazepam can decrease hypothalamus-pituitaryadrenal (HPA) axis activity after acute stress induced by single or repeated restraint (Kalman et al. 1997). To assess stressor-induced HPA axis activity, in another group of rats that did not undergo behavioral training and testing, we also measured the effects of stressors applied in Experiments 2–4 on plasma corticosterone levels (Experiment 5).

## Results

### Experiment 1: corticosterone/yohimbine effects on goal-directed action

#### *Lever-press training*

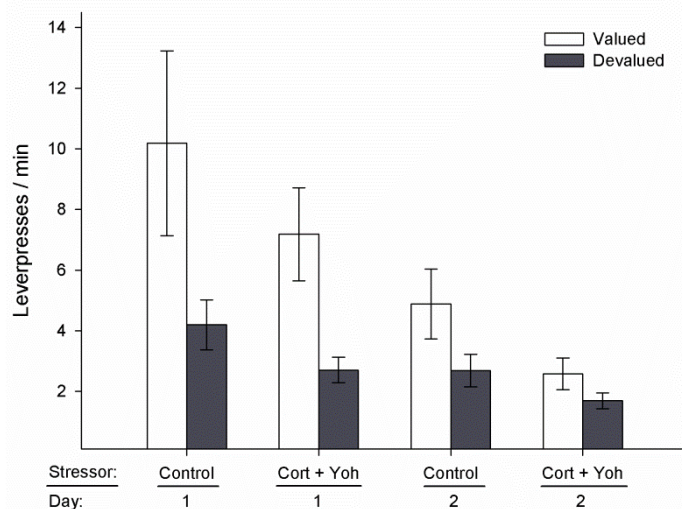
All animals received instrumental training on both levers one delivering food pellets, the other sucrose solution. Both treatment groups (to be subjected or not subjected to corticosterone/ yohimbine administration) showed increasing response rates during instrumental training as the ratio schedule parameter increased across consecutive training days (data not shown). An ANOVA revealed an effect of day [ $F_{(1,20)} = 14.1$ ,  $p < 0.001$ ], but no effect of treatment group [ $F_{(1,20)} < 0.7$ , n.s.] and no day x treatment group interaction

[ $F_{(1,20)} < 0.6$ , n.s.]. Mean lever press rates/min ( $\pm$ SEM) on the last day of training were  $17.7 \pm 3.1$  (controls) and  $18.3 \pm 3.2$  (to be subjected to drugs).

### **Outcome devaluation and choice test in extinction**

During outcome devaluation on two subsequent test days, individual rats consumed on average  $5.2 \text{ g} \pm 0.3 \text{ g}$  pellets and  $13.3 \text{ g} \pm 0.4 \text{ g}$  sucrose. In the choice tests on two subsequent days, control rats and rats subjected to corticosterone/yohimbine administration displayed a selective devaluation effect, that is, fewer responses were emitted to the lever that in training delivered the now devaluated outcome (Fig. 1). This observation was confirmed by the statistical analysis. An ANOVA showed an effect of day [ $F_{(1,20)}=30.51$ ;  $p<0.001$ ] and devaluation [ $F_{(1,20)}=22.43$ ;  $p<0.001$ ], a day x devaluation interaction [ $F_{(1,20)}=4.67$ ,  $p<0.05$ ] but no effect of treatment [ $F_{(1,20)} < 2.8$ , n.s.].

For a more detailed analysis of treatment effects across days, we performed separate ANOVA for outcome devaluation effects on day 1 and 2. On day 1 there was a devaluation effect [ $F_{(1,20)}=16.59$ ;  $p<0.001$ ], but no effect of treatment [ $F_{(1,20)} < 1.6$ , n.s.] and no treatment x devaluation interaction [ $F_{(1,20)} < 0.004$ , n.s.]. Likewise, on day 2 there was an effect of devaluation [ $F_{(1,20)}=7.01$ ;  $p<0.05$ ], a trend for a significant treatment effect [ $F_{(1,20)} < 3.6$ ,  $p=0.072$ ] but no treatment x devaluation interaction [ $F_{(1,20)} < 0.7$ , n.s.]. Thus, on both test days, rats subjected to corticosterone/yohimbine treatment, like controls, were able to discriminate the lever that delivered the valued outcome from the lever that delivered the devaluated outcome.



**Fig. 1.** Effects of corticosterone/yohimbine (3 mg/kg, each, i.p.) (n=11) or vehicle (n=11) applied prior to the two-lever choice tests on lever preference (Experiment 1). Response rates for the lever that delivered that valued and devaluated outcome on test days 1 and 2 are shown. On both test days, the outcomes (pellets vs. sucrose) were devaluated in a counterbalanced manner. On days 1 and 2, respectively, there was a significant devaluation effect, but no outcome devaluation x treatment interaction.

## **Experiment 2: Single stressor effects on goal-directed action**

### **Lever-press training**

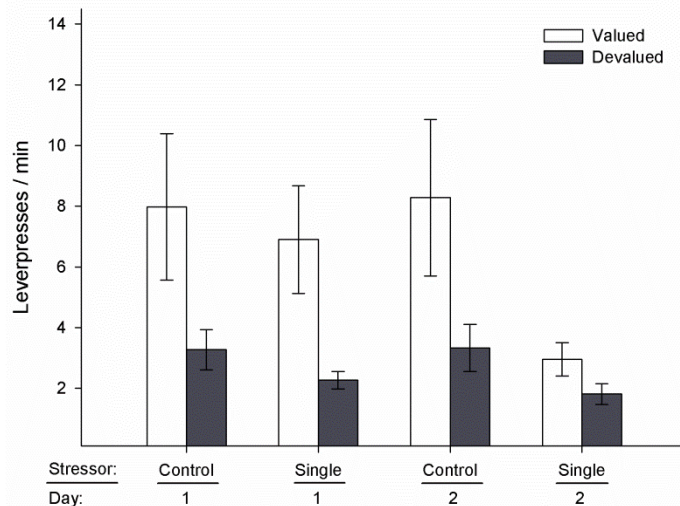
Rats to be exposed to the single stressor as well as controls showed increasing response rates to both levers during instrumental training (data not shown). An ANOVA revealed an effect of day [ $F_{(1,16)}=8.13$ ,  $p < 0.05$ ], but no effect of treatment [ $F_{(1,16)} < 0.01$ , n.s.] and no day x treatment interaction [ $F_{(1,16)} < 0.4$ , n.s.]. Mean lever press rates/min on the last day of training were  $16.2 \pm 4.0$  (controls) and  $14.6 \pm 3.0$  (to be stressor exposed).

### **Outcome devaluation and choice test in extinction**

During outcome devaluation on two subsequent test days, rats consumed on average  $5.8 \text{ g} \pm 0.2 \text{ g}$  pellets and  $13.9 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$  sucrose. In the choice test, control rats and rats subjected to the single stressor displayed a selective devaluation effect (Fig. 2). Accordingly, an ANOVA revealed an effect of devaluation [ $F_{(1,16)}=14.21$ ;  $p<0.01$ ], but not of treatment [ $F_{(1,16)} < 3.4$ ,

n.s.] and no devaluation x treatment interaction [ $F_{(1,16)} < 0.6$ , n.s.]. Furthermore, treatment effects were influenced by day (treatment x day interaction: [ $F_{(1,16)}=5.59$ ;  $p < 0.05$ ]).

A separate ANOVA for treatment effects on day 1 revealed an effect of devaluation [ $F_{(1,16)}=8.62$ ;  $p < 0.01$ ], but no effect of treatment [ $F_{(1,16)} < 0.3$ , n.s.] and no devaluation x treatment interaction [ $F_{(1,16)} < 0.1$ , n.s.]. On day 2, the ANOVA detected an effect of devaluation [ $F_{(1,16)}=7.16$ ;  $p < 0.05$ ] and treatment [ $F_{(1,16)}=8.24$ ,  $p < 0.05$ ], but no devaluation x treatment interaction [ $F_{(1,16)} < 1.4$ , n.s.]. Thus, on both test days, rats exposed to the single stressor, like controls, displayed a selective devaluation effect.

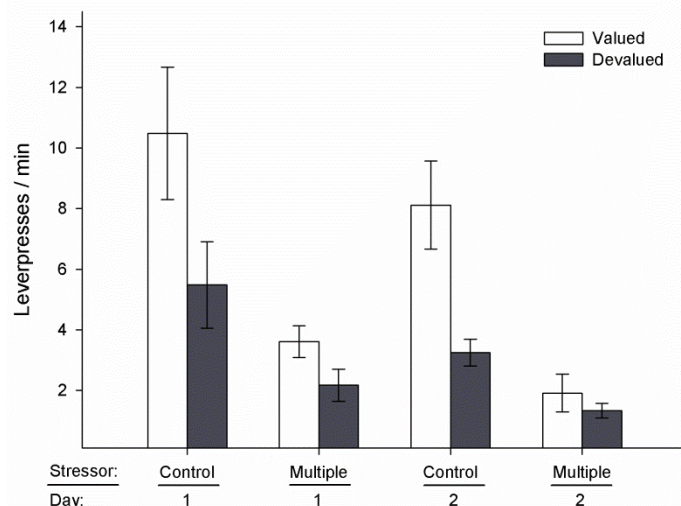


**Fig. 2.** Effects of single stressor exposure (stress-exposed rats  $n=9$ , controls  $n=9$ ) prior to the two-lever choice tests on lever preference (Experiment 2). Response rates for the lever that delivered that valued and devalued outcome on test days 1 and 2 are shown. On both test days, the outcomes (pellets vs. sucrose) were devaluated in a counterbalanced manner. On day 1, there was a significant devaluation effect, but no devaluation x treatment interaction. On day 2, there was a significant effect of devaluation and treatment, but no devaluation x treatment interaction.

### Experiment 3: Multiple stressor effects on goal-directed action

#### Lever-press training

Rats to be exposed to the multiple stressor as well as controls showed increasing response rates to both levers during instrumental training (data not shown). The ANOVA revealed an effect of day [ $F_{(1,22)} = 12.91$ ,  $p < 0.002$ ], but no effect of treatment [ $F_{(1,22)} < 0.5$ , n.s.] and no day x treatment interaction [ $F_{(1,22)} < 0.2$ , n.s.]. Mean lever press rates/min on the last day of training were  $20.2 \pm 2.9$  (controls) and  $18.5 \pm 3.9$  (to be stressor exposed).



**Fig. 3.** Effects of multiple stressor exposure (stress-exposed rats  $n=12$ , controls  $n=12$ ) prior to the two-lever choice tests on lever preference (Experiment 3). Response rates for the lever that delivered that valued and devalued outcome on test days 1 and 2 are shown. On both test days, the outcomes (pellets vs. sucrose) were devaluated in a counterbalanced manner. On day 1, there was a significant effect of devaluation and treatment, but no devaluation x treatment interaction. On day 2, there was a significant effect of devaluation, treatment and, importantly, a significant devaluation x treatment interaction. Subsequent planned contrasts revealed a significant devaluation effect in controls ( $p < 0.001$ ) but not in stressed rats ( $p > 0.05$ ).

#### Outcome devaluation and choice test in extinction

During the outcome devaluation on two subsequent test days, rats consumed on average  $5.8 \text{ g} \pm 0.3 \text{ g}$  pellets and  $11.8 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$  sucrose. In the choice test, control rats emitted fewer responses to the devaluated compared to the valued outcome (Fig. 3), however, this effect was

markedly reduced in rats exposed to the multiple stressor. Accordingly, there was an effect of treatment [ $F_{(1,22)}=35.06$ ;  $p<0.0001$ ], devaluation [ $F_{(1,22)}=40.82$ ;  $p<0.0001$ ] and day [ $F_{(1,22)}=7.35$ ;  $p<0.05$ ] and a devaluation x treatment interaction [ $F_{(1,22)}=10.40$ ;  $p<0.004$ ]. Furthermore, an ANOVA on data from day 1 showed an effect of devaluation [ $F_{(1,22)}=10.00$ ;  $p<0.005$ ] and treatment [ $F_{(1,22)}=14.39$ ;  $p<0.001$ ], but no devaluation x treatment interaction [ $F_{(1,22)} < 0.76$ , n.s.]. Importantly, on day 2, there was an effect of devaluation [ $F_{(1,22)}=12.55$ ;  $p<0.002$ ], treatment [ $F_{(1,22)}=31.02$ ;  $p<0.0001$ ] and a devaluation x treatment interaction [ $F_{(1,22)}=7.44$ ;  $p<0.05$ ]. Subsequent planned contrasts revealed a selective devaluation effect in controls ( $p<0.0001$ ) but not in stressed rats ( $p>0.5$ ). Therefore, the selective devaluation effect observed in rats exposed to the multiple stressor on test day 1 was abolished on test day 2.

#### **Experiment 4: Diazepam modulation of multiple stressor effects on goal-directed action**

##### ***Lever-press training***

*Experiment 4A (lower dose diazepam).* All groups showed increasing response rates to both levers during instrumental training (data not shown). An ANOVA revealed an effect of day [ $F_{(1,20)} = 37.73$ ,  $p < 0.001$ ], but no effect of treatment group [ $F_{(2,20)} < 0.5$  n.s.] and no day x treatment group interaction [ $F_{(2,20)} < 0.9$ , n.s.]. Mean lever press rates/min. on the last day of training were  $24.9 \pm 3.4$  (to be exposed to diazepam + no stressor);  $22.0 \pm 2.8$  (to be exposed to vehicle + multiple stressor);  $28.2 \pm 4.5$  (to be exposed to diazepam + multiple stressor).

*Experiment 4B (higher dose diazepam).* Likewise, all groups showed increasing response rates to both levers during instrumental training (data not shown). There was an effect of day [ $F_{(1,19)} = 28.91$ ,  $p < 0.001$ ], but no effect of treatment group [ $F_{(2,19)} < 0.5$ , n.s.] and no day x treatment group interaction [ $F_{(2,19)} < 0.8$ , n.s.]. Mean lever press rates/min on the last day of training were  $21.3 \pm 2.8$  (to be exposed to diazepam + no stressor);  $19.8 \pm 3.1$  (to be exposed to vehicle + multiple stressor);  $22.3 \pm 1.1$  (to be exposed to diazepam + multiple stressor).

##### ***Outcome devaluation and choice test in extinction***

*Experiment 4A (lower dose diazepam).* During outcome devaluation rats consumed on average  $5.9 \text{ g} \pm 0.4 \text{ g}$  pellets and  $13.3 \text{ g} \pm 0.7 \text{ g}$  sucrose. In the choice test, control rats subjected to diazepam treatment displayed a selective devaluation effect which was reduced in rats subjected to the multiple stressor/vehicle or diazepam treatment (Fig. 4A). Consistent with this description, an ANOVA revealed an effect of days [ $F_{(2,21)}=14.14$ ;  $p<0.001$ ], treatment [ $F_{(2,21)}=14.81$ ;  $p<0.0001$ ] and devaluation [ $F_{(2,21)}=47.4$ ;  $p<0.0001$ ] and a devaluation x treatment interaction [ $F_{(2,21)}=5.86$ ;  $p<0.01$ ]. A separate ANOVA for treatment effects on day 1 indicated an effect of devaluation [ $F_{(1,21)}=55.85$ ;  $p<0.0001$ ], treatment [ $F_{(2,21)}=22.12$ ;  $p<0.0001$ ] and a devaluation x treatment interaction [ $F_{(2,21)}=3.904$ ;  $p<0.05$ ]. Planned contrasts further revealed selective devaluation effects in all treatment groups ( $p<0.05$ , each). On day 2, there was an effect of devaluation [ $F_{(1,20)}=19.8$ ;  $p<0.001$ ], treatment [ $F_{(2,21)}=13.62$ ;  $p<0.001$ ] and, importantly, a devaluation x treatment interaction [ $F_{(2,21)}=4.06$ ;  $p<0.05$ ]. Planned contrasts demonstrated selective devaluation effects in control rats that received diazepam and stressed rats that received diazepam ( $p<0.05$ , each), but not in stressed rats that received vehicle ( $p>0.5$ ). Thus, on test day 1 all treatment groups were able to discriminate the lever that delivered the valued outcome from the one

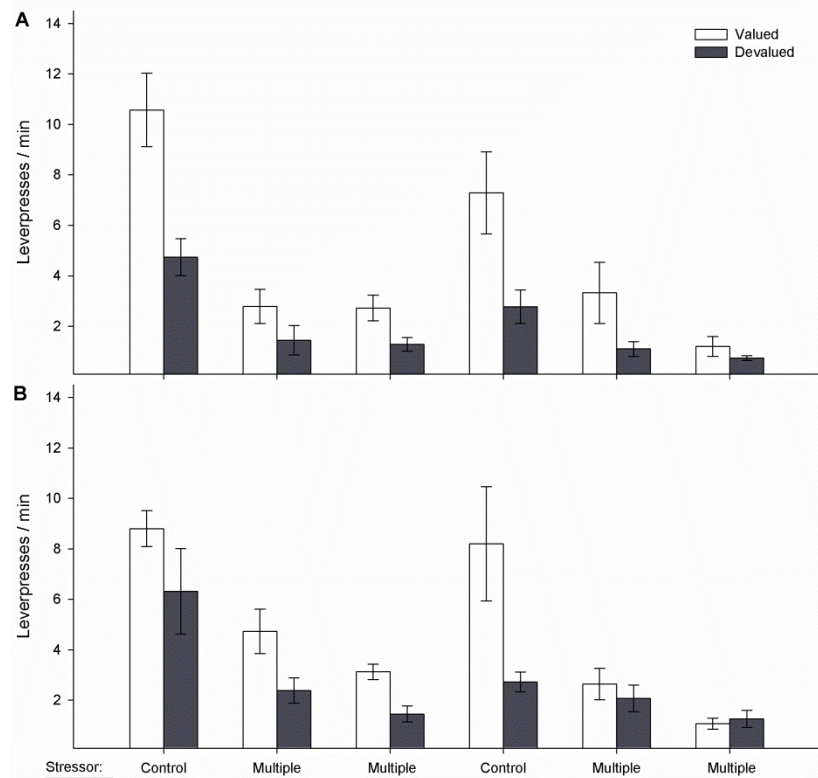


that delivered the devalued outcome. By contrast, on day 2, this selective devaluation effect was abolished specifically in stress-exposed rats that received vehicle treatment.

*Experiment 4B (higher dose of diazepam).*

Rats consumed on average 5.8 g  $\pm$  0.6 g pellets and 14.1 g  $\pm$  1.0 g sucrose during the devaluation procedure. In the choice test, control rats subjected to diazepam treatment showed a selective devaluation effect that was reduced in rats subjected to the multiple stressor/vehicle or diazepam treatment (Fig. 4B). Accordingly, an ANOVA revealed an effect of day [F<sub>(1,19)</sub>=21.54; p<0.001], treatment [F<sub>(2,19)</sub>=16.87; p<0.001] and devaluation [F<sub>(1,19)</sub>=62.79; p<0.0001] and an interaction of devaluation x treatment [F<sub>(2,19)</sub>=6.96; p<0.005]. Subsequent ANOVA for data from day 1 detected an effect of devaluation [F<sub>(1,19)</sub>=22.65; p<0.001] and treatment [F<sub>(2,19)</sub>=16.82;

p<0.0001], but no devaluation x treatment interaction [F<sub>(2,19)</sub><0.3; n.s.]. On day 2, there was an effect of devaluation [F<sub>(1,19)</sub>=10.01; p<0.005] and treatment [F<sub>(2,19)</sub>=10.44; p<0.001] and, importantly, a devaluation x treatment interaction [F<sub>(2,19)</sub>=7.18; p<0.005]. Planned contrasts revealed selective devaluation effects in control rats that received diazepam (p<0.001) but not in stressed rats that received diazepam or vehicle (p>0.05, each). Therefore, on day 1 rats of all treatment groups displayed a selective devaluation effects, however, on day 2 this effect was abolished in stress-exposed rats that received vehicle or diazepam treatment.



**Fig. 4.** Effects of multiple stressor exposure prior to the two-lever choice tests on lever preference in rats pretreated with diazepam (A: 1 mg/kg, i.p.; B: 2 mg/kg, i.p.) (Experiment 4A, B). Response rates for the lever that delivered that valued and devalued outcome on test days 1 and 2 are shown. On both test days, the outcomes (pellets vs. sucrose) were devaluated in a counterbalanced manner. **A:** On day 1 and 2, respectively, there was a significant effect of devaluation, treatment and a devaluation x treatment interaction. Planned contrasts further revealed selective devaluation effects on day 1 in all treatment groups (p<0.05, each), while on day 2 selective devaluation effects were found in control and stressed rats that received diazepam (p<0.05, each), but not in stressed rats that received vehicle (p>0.05). **B:** On day 1, there was a significant effect of devaluation and treatment, but no devaluation x treatment interaction. On day 2, there was a significant effect of devaluation, treatment and, importantly, a significant devaluation x treatment interaction. Planned contrasts revealed a selective devaluation effect in control rats that received diazepam (p<0.001) but not in stressed rats that received diazepam or vehicle (p>0.05, each). *Sample sizes:* A: diazepam (1 mg/kg) + no stressor (n=7), diazepam + multiple stressor (n=8), vehicle (2 ml/kg) + multiple stressor (n=8); B: diazepam (2 mg/kg) + no stressor (n=8), diazepam + multiple stressor (n=7), vehicle (2ml/kg) + multiple stressor (n=7).

**Experiment 5: Single and multiple stressor effects on plasma corticosterone**

Single and multiple stressor exposition markedly elevated plasma corticosterone levels regardless of stressor identity (Tab. 1). Consistent with this description, a repeated measures ANOVA with stressor identity (single, multiple stressor), group (control, stressed) and point

in time (before outcome devaluation, before stressor exposition, after stressor exposition) as variables demonstrated no significant effect of stressor identity [ $F_{(1,7)}=0.01$ ;  $p=0.91$ ], significant effects of group [ $F_{(1,7)}=23.35$ ;  $p<0.001$ ] and point in time [ $F_{(2,14)}=108.65$ ;  $p<0.001$ ] and a stressor identity x group x point in time interaction [ $F_{(2,14)}=5.22$ ;  $p<0.05$ ]. *Post hoc* comparisons revealed that corticosterone levels in control rats and rats exposed to the single stressor did not differ before outcome devaluation and stressor exposition, but after stressor exposition ( $p<0.01$ , Tukey HSD-test). Likewise, in control rats and rats exposed to the multiple stressor corticosterone levels did not differ before outcome devaluation and stressor exposition, but after stressor exposition ( $p<0.01$ , Tukey HSD-test).

**Tab. 1:** (Top) Corticosterone levels in control animals and animals exposed to the single or multiple stressor before outcome devaluation, before and after stress exposition (n=3 per group, except n=2 for rats examined after single stress exposure). (Bottom) Schematic illustration of blood collection schedule.

Corticosterone [ng/ml]		Pre-OD	Pre-stressor	Post-stressor
Time of day	Stressor			
Light period	Control	119.5 ± 34	121.7 ± 28	112.4 ± 14
Light period	Single	119.9 ± 46	111.4 ± 28	652.0 ± 110*
Dark period	Control	122.4 ± 23	163.3 ± 14	178.9 ± 7
Dark period	Multiple	104.7 ± 22	153.4 ± 20	510.3 ± 42*

Time point of blood collection	Pre-OD	Pre-stressor	Post-stressor
Control rats	↓ 45 min OD	↓ 60 min no stressor exposure	↓
Stressor-exposed rats	↓ 45 min OD	↓ 60 min stressor exposure	↓

\*  $p<0.01$  vs. respective control, OD: outcome devaluation

## Discussion

Here we show that rats subjected to the pharmacological or single restraint stressor prior to the choice test displayed goal-directed responding sensitive to outcome devaluation. By contrast, rats exposed to the multiple restraint stressor were biased toward habitual responding, i.e., they showed a selective devaluation effect on test day 1, but no longer on test day 2. Diazepam pretreatment did not alleviate (or only marginally) this multiple stressor-induced impairment. Thus, in rats an acute intense stressor, such as multiple restraint, can render performance of previously acquired instrumental action habitual. Experiment 1 demonstrated that, unlike in humans (Schwabe et al. 2010), in rats concurrent glucocorticoid/noradrenaline activity did not shift instrumental responding from goal-directed to habitual control. Furthermore, as in all other experiments, we observed a decrease of overall lever press rates across both test days, an effect that predominantly reflects repeated testing in extinction. The failure of corticosterone/yohimbine to alter responding might not be accounted for by inappropriate drug dosing or timing of the injections. For instance, corticosterone given at similar doses 30 min before test (as done here) resulted in increased plasma corticosterone levels that resemble those measured during moderate-to-severe stress and impaired memory retrieval, in a similar manner as acute stress (de Quervain et al. 1998). Furthermore, in rats tested in a maze task, comparable doses of yohimbine favored caudate-dependent habit learning over hippocampus-dependent cognitive learning (Packard and Wingard 2004). Concerted glucocorticoid/noradrenergic activity plays a key role in mediating stressor effects on learning and memory (Roosendaal et al. 2009); however, acute administration of corticosterone and yohimbine only partially mimics the complex neurochemical responses to acute physical stressors that involve the release of multiple stress mediators (Joels and Baram 2009). Hence, we also investigated effects of acute physical stressors on goal-directed action. Experiment 2 revealed that a typical stressor, i.e., restraint in a cylinder for 60 min,

known to alter learning and memory (Conrad et al. 2004) increased plasma corticosterone levels, as shown by earlier studies (Keim and Sigg 1976; Ulrich-Lai and Herman 2009). Yet this single stressor, though behaviorally effective, as indicated by decreased overall lever press rates on choice test day 2, did not render the rats' performance habitual. Of note, plasma corticosterone levels after single stressor exposure in the light cycle (Experiment 2) and multiple stressor exposure in the dark cycle (Experiment 3) were increased significantly, but only multiple stressor exposure produced a bias toward habitual responding. Importantly, acute stressor-induced plasma corticosterone elevations reported in a number of previous studies were not or only partially related to the light–dark cycle (Pielock et al. 2013), stressor intensity, and the magnitude of the stressor-induced cognitive impairments (Woodson et al. 2003). For instance, male rats exposed to a predator, such as a cat, or to a female receptive rat showed equivalent increases in plasma corticosterone levels, but only cat-exposed rats exhibited working memory deficits (Woodson et al. 2003). Together, these findings provide further evidence to the notion that plasma corticosterone levels are not always a sensitive index for stressor-induced behavioral effects (e.g., Natelson et al. 1987; Pielock et al. 2013).

It is well known that the effect size of acute stressors is critically determined by a number of variables, including time of day of exposition or predictability. For instance, in rats, restraint stressors elicit more pronounced physiological and behavioral effects in the dark (activity) period as compared with the light (inactivity) period (Koolhaas et al. 2011). Therefore, in Experiment 3, we examined the effects of an acute stressor that involved an unpredictable combination of typical restraint stressors (Keim and Sigg 1976; Howland and Cazakoff 2010; Musazzi et al. 2010) on goal-directed action and performed the experiment in the dark period. Results show that the multiple stressor increased plasma corticosterone and produced a bias toward habitual responding, i.e., rats showed a devaluation effect on test day 1, but no longer on test day 2, pointing to sequential effects of twofold multiple stressor exposure. In view of lowered lever press rates across test days, one could argue that the failure to detect a devaluation effect simply reflects impaired instrumental performance. However, a selective devaluation effect on choice performance is a robust phenomenon that does not require high rates of performance (Yin et al. 2005) and can be observed if baseline responding is as low as observed here (Shiflett et al. 2010). Consistent with this notion, a selective devaluation effect was also detected in rats exposed to the pharmacological (Experiment 1) or single stressor (Experiment 2), though baseline responding was low. In an earlier study we showed that instrumental responding was altered by the single and multiple stressor exposure in the dark but not in the light period, suggesting that their efficacy is determined in particular by the time of day of administration (Pielock et al. 2013). Furthermore, the multiple stressor, in behavioral terms, was moderately more effective in the dark period than the single stressor (Pielock et al. 2013); therefore, we used the former stressor in the current study. However, it is conceivable that the single stressor if applied in dark period could also induce a bias toward habitual responding, a possibility that we did not test in the current study.

As baseline responding and flexibility of instrumental responding was not reduced significantly after combined corticosterone/ yohimbine injections (Experiment 1), the effects observed after multiple stressor exposition (Experiment 3) may not, or not exclusively, be related to an increased corticosterone/glucocorticoid activity. However, acute stressors can produce fear and anxiety (Davis 2006; McEwen et al. 2012), thereby suppressing instrumental responding (Hunt and Brady 1951; Blanchard and Blanchard 1969; Minor et al. 2001) and cognitive functions (Packard 2009). To examine the possibility that reduced

baseline lever pressing and flexibility of responding were related to multiple stressor-induced anxiety, we investigated effects of prestress administration of the standard anxiolytic drug diazepam. In Experiments 4A and 4B we were able to replicate the multiple stressor effects on instrumental performance seen in control animals of Experiment 3. Furthermore, our results demonstrate that diazepam at doses of 1 and 2 mg/kg, which are devoid of sedative effects interfering with lever pressing by its own (George et al. 2009), did not alleviate reduced baseline responding and had no (Experiment 4B) or only marginal (Experiment 4A) effects on habitual responding induced by prior multiple stressor exposition. In acute stress paradigms, even low doses of diazepam (0.3mg/kg) produced anxiolytic effects on a variety of behavioral measures (Grahn et al. 1995; Kalman et al. 1997), suggesting that diazepam dosing might have been adequate. Taken together, Experiments 4A and 4B confirmed that rats exposed to the multiple restraint stressor were biased toward habitual responding and displayed reduced baseline responding, but gave no clues to the neurochemical and psychological mechanisms underlying these multiple stressor-induced effects. Ongoing studies further revealed that the selective b-1 antagonist betaxolol (5 mg/kg, i.p.; S Braun and W Hauber, unpubl.) did not reduce habitual responding induced by prior multiple stressor exposition. Higher doses reduced lever pressing by its own and are, therefore, not appropriate. Thus, an analysis of the neurochemical mechanisms underlying stressor-induced effects on goal-directed action is hampered by the fact that systemic administration of relevant drugs at higher doses can produce motor inhibition.

According to the dual system concept, action control is mediated by the balance between a goal-directed and a habitual system (Dickinson 1985). Previous studies in humans revealed that acute stressors can shift this balance in favor of the habit system, thereby affecting both instrumental learning as well as the expression of previously acquired actions without compromising processes involved in instrumental learning (Schwabe and Wolf 2011). For instance, acute physical/psychosocial stress administered after instrumental learning and outcome devaluation immediately prior to the extinction test prompted habitual responding, suggesting acute stress in humans may render instrumental behavior habitual without any effects on instrumental learning (Schwabe and Wolf 2010). Our present study in rodents provides partial support to this notion and shows that at least an intense stressor can render performance of previously acquired instrumental action habitual. Performance of goal-directed actions relies on an animal's previous learning of the outcomes that results from its action. Thus, it is likely that multiple stressor exposition interferes with the retrieval of encoded relationships between actions and their outcome values guiding goal-directed action in the choice test. Unexpectedly, unlike in humans (Schwabe and Wolf 2009; Schwabe et al. 2010), in rats corticosterone/noradrenaline activity and a moderate stressor were unable to induce a shift from goal-directed to habitual responding. Methodological discrepancies might account for this difference. In studies in humans, the acute stressor or the pharmacological manipulation was often administered before the initial acquisition of instrumental learning task, and thus not only the retrieval, but also the acquisition, might have been mediated by the habitual system. Furthermore, in humans, choice behavior in the extinction test is being tested immediately after brief instrumental training over one session (Schwabe and Wolf 2011), whereas in rats instrumental training requires many trials over several days. Therefore, repeated action–outcome learning in rats may increase memory and render retrieval of action–outcome contingencies in the choice test less sensitive to prior exposition to mild but not to intense acute stressors. In turn, as in humans, in rats the expression of learned responses that has been acquired through brief training is highly sensitive even to mild acute stressors. For instance, in spatial memory tasks in water mazes,

acute stressors were able to impair retrieval of goal approach responses acquired through short training, e.g., in 8–12 trials over 1–3 d (de Quervain et al. 1998; Roozendaal et al. 2003; Diamond et al. 2006). Our present findings in rodents that an intense acute stressor makes rats less able to perform actions based on their outcome values extend previous evidence in rodents that chronic stress also leads to a shift from goal-directed to habitual instrumental responding (Dias-Ferreira et al. 2009). Together, these findings suggest that habits, though inflexible, seem to be advantageous both under acute and chronic stress as they are performed almost automatically and thus allow the mobilization of attentional and decision making resources.

Notably, rats exposed to the multiple stressor in Experiments 3 and 4 consistently displayed a significantly impaired expression of learned action–outcome contingencies on the second, but not the first, test day. This latter finding is critical as it suggests that twofold exposure to the multiple stressor is necessary to abolish the retrieval of action–outcome contingencies. A number of inter-related mechanisms might account for this sequential effect. First, it is well known that morphological neuronal changes and memory actions induced by acute stressors increase with the number of stressor exposures (Cerqueira et al. 2007; Sousa and Almeida 2012). Second, single exposure to an acute stressor not only triggers immediate short-lasting effects but also delayed effects in an hours-to-days range that involve neurochemical and genomic actions of stress mediators (Joels and Baram 2009). For instance, an acute restraint stressor can cause an immediate increase in striatal dopamine release followed by a delayed down-regulation of midbrain dopamine neuron activity 24 h after cessation of restraint (Chang and Grace 2013). Furthermore, multiple stressor exposure could compromise reconsolidation after retrieval of action–outcome contingencies on test day 1 and, in turn, retrieval on test day 2. Thus, it is likely that several mechanisms activated by twofold stressor exposure mediate the shift toward habitual responding, however their precise role is open to question. Studies utilizing rats exposed to the multiple stressor only on day 1 may help to clarify the issue whether delayed effects of stressor exposition on day 1 or additive of stressor exposition on both days may cause the observed shift to habitual responding on day 2. A preliminary experiment tentatively suggests that delayed effects of stressor exposition on day 1 alone may not produce a shift toward habitual responding, however these data require further experimental support.

Interestingly, in a recent study we examined the effects of acute stress using a Pavlovian-instrumental transfer task. Results indicated that single exposure of the same multiple stressor as used in the current study reduced the overall lever press rate, but left intact the ability of a reward-predictive stimulus to invigorate instrumental responding, thereby suggesting that the acute stressor did not impair the retrieval of stimulus–reward associations (Pielock et al. 2013). Our present results point to the possibility that twofold instead of single multiple stressor exposure could impair this type of stimulus modulation of instrumental performance.

At the neural level, converging lines of evidence implicated the mPFC and DMS in goal-directed instrumental actions (Ostlund and Balleine 2005; Yin et al. 2005). Importantly, the mPFC, a brain region particularly sensitive to stress (Roozendaal et al. 2009), is selectively involved in the acquisition of, but not permanent storage or expression of, action–outcome associations in instrumental conditioning (Ostlund and Balleine 2005). By contrast, the DMS supports both acquisition and expression of action–outcome learning (Yin et al. 2005), suggesting that this brain region is critical for the expression of action–outcome associations guiding action selection in the choice test used here. Furthermore, the DMS is highly sensitive to chronic stress (Dias-Ferreira et al. 2009) and, thus, may be one key region

mediating the detrimental effects of the multiple stressor on expression of action–outcome learning seen here.

In summary, a growing literature from studies in laboratory rodents (Holmes and Wellman 2009; Czakoff and Howland 2010) demonstrates that acute stressor exposition induces multifaceted alterations in a variety of cognitive and executive processes underlying acquisition and performance of reward-related behavior, including working memory (Butts et al. 2011), memory retrieval (Wong et al. 2007), and decision-making (Shafiei et al. 2012), as well as cognitive flexibility (Butts et al. 2013; Thai et al. 2013). For instance, under certain conditions acute stressor exposition can reduce the ability to suppress a previously learned cognitive set, thus preventing the adoption of new behavioral strategies appropriate to changing circumstances (Butts et al. 2013). Here, we examined for the first time acute stressors effects on performance of goal-directed action in animals. Our data show that an intense acute stressor can render performance of previously acquired instrumental action habitual, possibly due to a compromised retrieval of encoded relationships between actions and their outcome values. Our observation in rats that an acute stressor can shift instrumental responding from goal-directed to habitual control is reminiscent of similar findings in humans (Schwabe et al. 2011). However, as in rats only twofold exposure to an intense physical stressor prompted habitual responding, but not, for instance, concurrent glucocorticoid/noradrenaline activity as observed in humans (Schwabe et al. 2011), the underlying stress signaling pathways may differ across species.

## **Materials and Methods**

All experiments comply with the German Law on Animal Protection and were approved by the proper authorities in Stuttgart, Germany.

### ***Subjects***

Experimentally naive male Lister-hooded rats (Harlan-Winkelmann, Borchon, Germany; Charles River, Sulzfeld, Germany) weighing between 190 g and 280 g, at the beginning of the experiments, were used. They were housed in groups of four animals in transparent plastic cages (55 x 39 x 27 cm, Ferplast, Nuernberg, Germany). Throughout the experiments water was available *ad libitum* and standard laboratory maintenance chow (Altromin, Lage, Germany) was restricted to 15 g per animal and day to maintain them at ~85% of their free-feeding weight. All animals were fed at the same time each day after the last training session. Temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $50 \pm 10\%$ ) were kept constant in the animal house. In experiments 1 and 2, animals were kept on a 12:12 hours light - dark cycle (lights on at 8:00 a.m.). Behavioral training and tests were conducted in the light phase. In experiments 3 and 4, animals were kept on an inverted 12:12 hours light - dark cycle (lights off at 8:00 a.m.). Behavioral training and tests were performed in the dark phase.

### ***Apparatus***

Training and tests took place in six identical operant chambers (24 cm x 21 cm x 30 cm; Med Associates, St. Albans, VT, USA) housed within sound-attenuating cubicles. Each operant chamber was equipped with a pellet dispenser that delivered 45 mg grain-based pellets (formula A/I; TestDiet; Sandown Scientific, Hampton, Middlesex, UK) into a dual pellet/liquid cup receptacle, which was positioned in the middle of the right wall, and a syringe pump that delivered 0.1 ml of a 20% sucrose solution into the same receptacle. Each chamber also contained two retractable levers located on either side of the dual pellet/liquid cup receptacle. A 24 V / 3 W houselight mounted on the top-center of the left wall illuminated

the chambers and an electric fan integrated into the cubicle provided a constant background noise (~70 dB). A computer with the PC program MED-PC IV controlled the equipment and recorded the data.

### **Experiment 1: Corticosterone/yohimbine effects on goal-directed action**

#### ***Behavioral procedures***

Each magazine and lever-press training session lasted for 30 min and began with the illumination of the houselight and the insertion of the appropriate lever. The sessions ended with the retraction of the lever and the turning off of the houselight.

*Magazine and lever-press training.* On the first day of training all animals received two magazine training sessions in which both outcomes (pellets and 20% sucrose solution) were delivered on independent random-time schedules (RT-60) with both levers withdrawn. Thereafter, lever-press training began; for half of the animals of each treatment group pressing the left lever earned one pellet and pressing the right lever earned 0.1 ml 20% sucrose solution. The remaining animals were assigned to the opposite action-outcome pairings. All animals received two daily lever-press training sessions in which only one lever and one outcome was available, respectively. After the first training session, there was at least a two-hour break before the second training session began with the opposite lever-outcome pairing. The order of pellet and sucrose sessions was alternated each day. Lever-press training was conducted for 11 consecutive days with progressively leaner random ratio (RR-) schedules of reinforcement, except for the first two days in which a continuous reinforcement schedule (CRF) was used, as follows: day 1-2 = CRF,  $P(O|A) = 1.0$  / day 3-5 = RR-5,  $P(O|A) = 0.2$  / day 6-8 = RR-10,  $P(O|A) = 0.1$  / day 9-11 = RR-20,  $P(O|A) = 0.05$ .

*Outcome devaluation, drug administration and choice test in extinction.* On each of the following 2 days, rats were first sated in a counterbalanced manner on one of these two outcomes by prefeeding (selective outcome devaluation), then subjected to the pharmacological stressor and tested afterwards in a two-lever choice task in extinction. For outcome devaluation, the animals were placed individually in separate transparent plastic cages (42 x 26 x 18 cm, Ferplast, Nuernberg, Germany) and got *ad libitum* access to one food outcome for 60 min. On the first test day, half of the animals received 40 g pellets in a feeding bowl and the other half received 150 ml 20 % sucrose solution in a drinking bottle. On the second test day, the same procedure was used, but the two types of outcome were switched (animals that received pellets on day 1 received sucrose on day 2, and *vice versa*), so that finally each animal got both outcomes devalued on consecutive days. Rats received injections of vehicle solution (n=11) or yohimbine and corticosterone (n=11) 30 min after the onset of the outcome devaluation (duration 60 min), i.e. rats were removed from the cage with *ad libitum* access to the food outcome, received i.p. injections, and were placed back into their individual cage for another 30 min with *ad libitum* access to the food outcome. This protocol was used as it takes about 30 min for yohimbine (Shepard et al., 2004) and corticosterone (Koot et al., 2013) to become behaviorally active after systemic administration. Upon completion of outcome devaluation, animals were tested in the two-lever choice extinction test for 10 min to test for their lever preference, with both levers inserted but without outcome delivery.

**Drug administration**

Corticosterone and yohimbine drugs were co-administered systemically at a dose of 3 mg/kg (i.p.), respectively, in a volume of 2 ml/kg. Yohimbine was dissolved in distilled water, corticosterone in 5% DMSO in isotonic saline. Control animals received vehicle injections (2 ml/kg, i.p.).

**Data analysis and statistics**

*Lever training.* Lever presses, but not magazine entries were recorded in each session. Data from lever press training were subjected to repeated-measures analysis of variance (ANOVA) with training days as within-subject factor and group (to be subjected to vehicle vs. drug treatment) as between-group factor. According to Levene's test data meet the criterion of homogeneity of variances.

*Outcome devaluation.* Mean lever press rates for levers that delivered valued and devalued outcome on choice tests day 1 and 2 were subjected to repeated-measures ANOVA with two within-subject factors (devaluation, choice test day) and one between-subject factor (treatment). We included test day as with-subject factor to detect possible order effects of acute stress applied on both choice test days, while in most previous studies, outcome devaluation effects were analyzed across both choice test days (e.g. (Lex and Hauber, 2010b)). A square root transformation was used for outcome devaluation data to meet the criterion of homogeneity of variances analyzed by means of Levene's test. All statistical computations were carried out with STATISTICA™ (version 7.1, StatSoft®, Inc., Tulsa, USA). The level of statistical significance ( $\alpha$ -level) was set at  $P < 0.05$ . Mean lever presses per minute ( $\pm$  standard error of the mean, SEM) were reported throughout the paper.

**Experiment 2: Single stressor effects on goal-directed action**

Unless otherwise noted, the same procedures as in experiment 1 were used.

**Behavioral procedures**

*Outcome devaluation, stressor exposure and choice test in extinction.* Outcome devaluation was conducted in a separate cage for 45 min. On the first test day, half of the animals received *ad libitum* access to 40 g pellets in a feeding bowl and the other half received *ad libitum* access to 150 ml 20 % sucrose solution in a drinking bottle. On the second test day, the same procedure was used, switching the two types of outcome (animals that received pellets on day 1 received sucrose on day 2, and *vice versa*), so that finally each animal got both outcomes devalued on consecutive days.

Both on the first and second test day, animals exposed to the single stressor (n=9) received 60 min restraint stress in transparent plastic tubes (height: 63.5 mm, min. length: 58 mm; max. length: 195 mm) after outcome devaluation and prior to the choice test. Control animals not exposed to the single stressor (n=9) remained upon completion of outcome devaluation in the outcome devaluation cage for an additional 60 min with feeding bowls and drinking bottles removed. Subsequently, animals exposed to the single stressor and controls were tested in the choice test in extinction.

**Experiment 3: Multiple stressor effects on goal-directed action**

Unlike experiments 1 and 2, experiment 3 was performed in the dark period of the light-dark cycle because this multiple stressor is highly effective to alter reward-directed responding if



applied in the dark period (Pielock et al., 2013). Unless otherwise noted, the same procedures as in experiment 1 and 2 were used.

### **Behavioral procedures**

*Outcome devaluation, stressor exposure and choice test in extinction.* Pre-feeding was conducted in a separate cage for 45 min. After outcome devaluation, control animals (n=12) remained therein for an additional 60 min with feeding bowls and drinking bottles removed. By contrast, other animals (n=12) were exposed to the multiple stressor for 60 min. This stressor consisted of a combination of acute stressors applied for 60 min in total in a brightly lit novel room with music from a local radio station (~83 dB SPL) (Chen et al., 2010; Wong et al., 2007). First, rats were exposed to restraint for 20 min by placing them into Plexiglas cylinders. Thereafter, rats were placed on an elevated platform (12 x 12 cm, 1 m tall) for 20 min (Chen et al., 2010). Eventually, rats were re-exposed to restraint for 20 min by placing them into Plexiglas cylinders. During this restraint, 5 tail shocks (1 mA, 1 s) were applied (e.g. Waddell et al., 2010). Subsequently, animals were tested in the extinction test. Note that for these rats examined in the dark phase, stressor exposure in the bright room represents a light pulse that might act *per se* as additional stressor (Song and Rusak, 2000; Zubidat et al., 2007).

### **Experiment 4: Diazepam modulation of multiple stressor effects on goal-directed action**

As experiment 3, experiment 4 was performed in the dark period of the light-dark cycle. Unless otherwise noted, the same procedures as in experiments 1-3 were used.

*Drug administration.* Diazepam (1 mg/kg or 2 mg/kg) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) was dissolved in a vehicle solution of 10 % absolute ethanol, 40 % polyethylene glycol and 50 % isotonic saline and administered at a volume of 1 ml/kg (i.p.) 5 min before outcome devaluation lasting for 45 min. (i.e. 50 min before multiple stressor exposure for 60 min). Control animals received vehicle solution at a volume of 1 ml/kg. Previous studies revealed that diazepam at 1 or 2 mg/kg i.p. produced anxiolytic-like effects without marked locomotor inhibition (Chaouloff et al., 1997; Johnson, 1978) and did not reduce instrumental responding (George et al., 2009; Poncelet et al., 1983). The following treatment groups were used:

Experiment 4A: low dose diazepam (1 mg/kg) + no stressor (n=7), low dose diazepam + multiple stressor (n=8), vehicle (2 ml/kg) + multiple stressor (n=8);

Experiment 4B: high dose diazepam (2 mg/kg) + no stressor (n=8), high dose diazepam + multiple stressor (n=7), vehicle (2ml/kg) + multiple stressor (n=7).

### **Experiment 5: Single and multiple stressor effects on plasma corticosterone**

To assess stressor effects applied in experiment 2 and 4 on HPA axis activity, we measured plasma corticosterone levels in 36 experimentally naïve rats without prior behavioral training and test. Rats were assigned to four treatment groups and exposed to either no stressor (n=9)/ single stressor (n=9) in the light period (see experiment 2) or no stressor (n=9) / multiple stressor (n=9) in the dark period (see experiment 3). Trunk blood was collected in rats exposed to the single or multiple stressor i) before the onset of the specific satiety procedure (n=3 per group), ii) before the onset of the stressor exposure (n=3 per group) and iii) after termination stressor exposure (n=3 per group); respective control rats were left in the home cage rather than exposed to a stressor (see Tab. 1). The specific satiety

procedure (outcome devaluation) and stress protocols were used as described for experiments 2 and 3.

Rats were anesthetized with an overdose of isoflurane (cp-pharma, Burgdorf, Germany) and decapitated. Short-term treatment with isoflurane *per se* did not alter corticosterone levels (Zardooz et al., 2010). Trunk blood was collected into a falcon tube (50 ml) and after 15 min incubation at room temperature the sample was centrifuged (4000 rpm, 10 min; 8°C). The supernatant was transferred and divided into two 1.5 ml Eppendorf tubes and re-centrifuged (4000 rpm 10 min; 8°C). The blood serum was aliquoted into 0.5 ml Eppendorf tubes and stored at -20°C. Serum corticosterone levels (ng/ml) were measured using the corticosterone ELISA kit RE52211 (IBL International GmbH, Hamburg, Germany).

### **Data analysis and statistics**

Plasma corticosterone levels in rats exposed to no, single or multiple stressor were subjected to an ANOVA with treatment and time point of blood collection as factors. The level of statistical significance ( $\alpha$ -level) was always set at  $P < 0.05$ . Mean plasma corticosterone levels ( $\pm$  SEM) were reported.

### **Acknowledgements**

This research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HA2340/8-2) and a grant of the Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg to S.B. We are grateful to I. Nevar for assistance in animal husbandry and S. Mueller technical assistance.

### **References**

- Balleine, B.W., Dickinson, A., 1998. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 37, 407-419.
- Balleine, B.W., O'Doherty, J.P., 2010. Human and rodent homologies in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35, 48-69.
- Balleine, B.W., Killcross, A.S., Dickinson, A., 2003. The effect of lesions of the basolateral amygdala on instrumental conditioning. *J Neurosci* 23, 666-675.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1969. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J of Comp Physiol Psychol* 68, 129-135.
- Braun, S., Hauber, W., 2011. The dorsomedial striatum mediates flexible choice behavior in spatial tasks. *Behav Brain Res* 220, 288-293.
- Butts, K.A., Weinberg, J., Young, A.H., Phillips, A.G., 2011. Glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex regulate stress-evoked dopamine efflux and aspects of executive function. *PNAS* 108: 18459-18464.
- Butts K.A., Floresco S.B., Phillips A.G. ,2013. Acute stress impairs set-shifting but not reversal learning. *Behav Brain Res* 252: 222-229.
- Cazakoff B.N., Howland J.G. ,2010. Acute stress disrupts paired pulse facilitation and long-term potentiation in rat dorsal hippocampus through activation of glucocorticoid receptors. *Hippocampus* 20: 1327-1331.
- Cerqueira, J.J., Mailliet, F., Almeida, O.F., Jay, T.M., Sousa, N., 2007. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27, 2781-2787.
- Chang, C.H., Grace, A.A., 2013. Amygdala beta-Noradrenergic Receptors Modulate Delayed Downregulation of Dopamine Activity following Restraint. *J Neurosci* 33, 1441-1450.
- Chaouloff, F., Durand, M., Mormede, P., 1997. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res* 85, 27-35.
- Chen, Y., Rex, C.S., Rice, C.J., Dube, C.M., Gall, C.M., Lynch, G., Baram, T.Z., 2010. Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling. *PNAS* 107, 13123-13128.
- Conrad, C.D., Jackson, J.L., Wiczorek, L., Baran, S.E., Harman, J.S., Wright, R.L., Korol, D.L., 2004. Acute stress impairs spatial memory in male but not female rats: influence of estrous cycle. *Pharmacol Biochem Behav* 78, 569-579.
- Davis, M., 2006. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *Am Psychol* 61, 741-756.
- de Quervain, D.J., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.

- Diamond, D.M., Campbell, A.M., Park, C.R., Woodson, J.C., Conrad, C.D., Bachstetter, A.D., Mervis, R.F., 2006. Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis. *Hippocampus* 16, 571-576.
- Dias-Ferreira, E., Sousa, J.C., Melo, I., Morgado, P., Mesquita, A.R., Cerqueira, J.J., Costa, R.M., Sousa, N., 2009. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 325, 621-625.
- Dickinson, A., 1985. Actions and habits: the development of behavioural autonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308, 67-78.
- George, S.A., Hutson, P.H., Stephens, D.N., 2009. Differential effects of MPEP and diazepam in tests of conditioned emotional response and Pavlovian-to-instrumental transfer suggests 'anxiolytic' effects are mediated by different mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 204, 499-509.
- Gourley, S.L., Swanson, A.M., Jacobs, A.M., Howell, J.L., Mo, M., Dileone, R.J., Koleske, A.J., Taylor, J.R., 2012. Action control is mediated by prefrontal BDNF and glucocorticoid receptor binding. *PNAS* 109, 20714-20719.
- Grahn, R.E., Kalman, B.A., Brennan, F.X., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1995. The elevated plus-maze is not sensitive to the effect of stressor controllability in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 52, 565-570.
- Graybiel, A.M., 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Ann Rev Neurosci* 31, 359-387.
- Holmes A., Wellman C.L. 2009. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 773-783.
- Howland, J.G., Czakoff, B.N., 2010. Effects of acute stress and GluN2B-containing NMDA receptor antagonism on object and object-place recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 93, 261-267.
- Hunt, H.F., Brady, J.V., 1951. Some effects of electro-convulsive shock on a conditioned emotional response ("anxiety"). *J Comp Physiol Psychol* 44, 88-98.
- Joels, M., Baram, T.Z., 2009. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews. Neurosci* 10, 459-466.
- Johnson, D.N., 1978. Effect of diazepam on food consumption in rats. *Psychopharmacology* 56, 111-112.
- Kalman, B.A., Kim, P.J., Cole, M.A., Chi, M.S., Spencer, R.L., 1997. Diazepam attenuation of restraint stress-induced corticosterone levels is enhanced by prior exposure to repeated restraint. *Psychoneuroendocrinology* 22, 349-360.
- Keim, K.L., Sigg, E.B., 1976. Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 4, 289-297.
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flugge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E., 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35, 1291-1301.
- Koot, S., Baars, A., Hesselings, P., van den Bos, R., Joels, M., 2013. Time-dependent effects of corticosterone on reward-based decision-making in a rodent model of the Iowa Gambling Task. *Neuropharmacology* 70, 306-315.
- Lex, B., Hauber, W., 2010a. The role of dopamine in the prelimbic cortex and the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Cereb Cortex* 20, 873-883.
- Lex, B., Hauber, W., 2010b. The role of nucleus accumbens dopamine in outcome encoding in instrumental and Pavlovian conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 93, 283-290.
- Lingawi, N.W., Balleine, B.W., 2012. Amygdala central nucleus interacts with dorsolateral striatum to regulate the acquisition of habits. *J Neurosci* 32, 1073-1081.
- McEwen, B.S., Eiland, L., Hunter, R.G., Miller, M.M., 2012. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62, 3-12.
- Minor, T.R., Rowe, M.K., Soames Job, R.F., Ferguson, E.C., 2001. Escape deficits induced by inescapable shock and metabolic stress are reversed by adenosine receptor antagonists. *Behav Brain Res* 120, 203-212.
- Musazzi, L., Milanese, M., Farisello, P., Zappettini, S., Tardito, D., Barbiero, V.S., Bonifacino, T., Mallei, A., Baldelli, P., Racagni, G., Raiteri, M., Benfenati, F., Bonanno, G., Popoli, M., 2010. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS ONE* 5, e8566.
- Naneix, F., Marchand, A.R., Di Scala, G., Pape, J.R., Coutureau, E., 2009. A role for medial prefrontal dopaminergic innervation in instrumental conditioning. *J Neurosci* 29, 6599-6606.
- Natelson, B.H., Creighton D., McCarty R., Tapp W.N., Pitman D., et al. ,1987. Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol Behav* 39: 117-125.
- Ostlund, S.B., Balleine, B.W., 2005. Lesions of medial prefrontal cortex disrupt the acquisition but not the expression of goal-directed learning. *J Neurosci* 25, 7763-7770.
- Packard, M.G., 2009. Anxiety, cognition, and habit: a multiple memory systems perspective. *Brain Res* 1293, 121-128.
- Packard, M.G., Wingard, J.C., 2004. Amygdala and "emotional" modulation of the relative use of multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem* 82, 243-252.
- Pielock, S.M., Braun, S., Hauber, W., 2013. The effects of acute stress on Pavlovian-instrumental transfer in rats. *Cogn Affect Behav Neurosci* 13, 174-185.
- Poncelet, M., Chermat, R., Soubrie, P., Simon, P., 1983. The progressive ratio schedule as a model for studying the psychomotor stimulant activity of drugs in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 80, 184-189.

- Roosendaal, B., Griffith, Q.K., Buranday, J., De Quervain, D.J., McGaugh, J.L., 2003. The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. *PNAS* 100, 1328-1333.
- Roosendaal, B., McReynolds, J.R., Van der Zee, E.A., Lee, S., McGaugh, J.L., McIntyre, C.K., 2009. Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *J Neurosci* 29, 14299-14308.
- Schwabe, L., Wolf, O.T., 2009. Stress prompts habit behavior in humans. *J Neurosci* 29, 7191-7198.
- Schwabe, L., Wolf, O.T., 2010. Socially evaluated cold pressor stress after instrumental learning favors habits over goal-directed action. *Psychoneuroendocrinology* 35, 977-986.
- Schwabe, L., Wolf, O.T., 2011. Stress-induced modulation of instrumental behavior: from goal-directed to habitual control of action. *Behav Brain Res* 219, 321-328.
- Schwabe, L., Tegenthoff, M., Hoffken, O., Wolf, O.T., 2010. Concurrent glucocorticoid and noradrenergic activity shifts instrumental behavior from goal-directed to habitual control. *J Neurosci* 30, 8190-8196.
- Schwabe, L., Tegenthoff, M., Hoffken, O., Wolf, O.T., 2012. Simultaneous glucocorticoid and noradrenergic activity disrupts the neural basis of goal-directed action in the human brain. *J Neurosci* 32, 10146-10155.
- Shafiei N., Gray M., Viau V., Floresco S.B. 2012. Acute stress induces selective alterations in cost/benefit decision-making. *Neuropsychopharmacology* 37: 2194-2209.
- Shepard, J.D., Bossert, J.M., Liu, S.Y., Shaham, Y., 2004. The anxiogenic drug yohimbine reinstates methamphetamine seeking in a rat model of drug relapse. *Biol Psychiatry* 55, 1082-1089.
- Shiflett, M.W., Brown, R.A., Balleine, B.W., 2010. Acquisition and performance of goal-directed instrumental actions depends on ERK signaling in distinct regions of dorsal striatum in rats. *J Neurosci* 30, 2951-2959.
- Song, X., Rusak, B., 2000. Acute effects of light on body temperature and activity in Syrian hamsters: influence of circadian phase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R1369-1380.
- Sousa, N., Almeida, O.F., 2012. Disconnection and reconnection: the morphological basis of (mal)adaptation to stress. *Trends Neurosci* 35, 742-751.
- Tanaka, S.C., Balleine, B.W., O'Doherty, J.P., 2008. Calculating consequences: brain systems that encode the causal effects of actions. *J Neurosci* 28, 6750-6755.
- Thai C.A., Zhang Y., Howland J.G. 2013. Effects of acute restraint stress on set-shifting and reversal learning in male rats. *Cogn Affect Behav Neurosci* 13: 164-173.
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10, 397-409.
- Valentin, V.V., O'Doherty, J.P., 2009. Overlapping prediction errors in dorsal striatum during instrumental learning with juice and money reward in the human brain. *J Neurophysiol* 102, 3384-3391.
- Waddell, J., Mallimo, E., Shors, T., 2010. d-cycloserine reverses the detrimental effects of stress on learning in females and enhances retention in males. *Neurobiol Learn Mem* 93, 31-36.
- Woodson JC, Macintosh D, Fleshner M, Diamond DM. 2003. Emotion-induced amnesia in rats: Working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learn Mem* 10: 326-336.
- Wong, T.P., Howland, J.G., Robillard, J.M., Ge, Y., Yu, W., Titterness, A.K., Brebner, K., Liu, L., Weinberg, J., Christie, B.R., Phillips, A.G., Wang, Y.T., 2007. Hippocampal long-term depression mediates acute stress-induced spatial memory retrieval impairment. *PNAS* 104, 11471-11476.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J., Balleine, B.W., 2004. Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur J Neurosci* 19, 181-189.
- Yin, H.H., Ostlund, S.B., Knowlton, B.J., Balleine, B.W., 2005. The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci* 22, 513-523.
- Zardoos, H., Rostamkhani, F., Zaringhalam, J., Faraji Shahrivar, F., 2010. Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO<sub>2</sub> in male rats. *Physiolog Research / Academia Sci Bohem* 59, 973-978.
- Zubidat, A.E., Ben-Shlomo, R., Haim, A., 2007. Thermoregulatory and endocrine responses to light pulses in short-day acclimated social voles (*Microtus socialis*). *Chronobiol Int* 24, 269-288.

## 7.4 WEITERE UNTERSUCHUNGEN

In Kapitel 7.3 wurde untersucht, ob ein systemischer pharmakologischer bzw. ein physischer Stressor den *Abruf* erlernter Informationen über Handlugen und assoziierte Werte blockiert. Die ermittelten Daten sprechen dafür, dass physisch induzierter Stress den Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen blockiert. Im Folgenden werden einige Versuche unternommen, um festzustellen, ob ein pharmakologischer bzw. physischer Stressor das *Erlernen* von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen beeinträchtigen kann. In zwei Versuchen werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche Testaufgabe könnte geeignet sein, um solche Stress-Effekte zu untersuchen?
2. Ist es möglich eine Wirkstoffverabreichung via Mikroinfusion in dieser Testaufgabe durchzuführen?
3. Welche Rolle spielt der prälimbische mPFC bei der Vermittlung von Stress-Effekten?

Mit der ersten Fragestellung befasst sich Kapitel 7.4.1 und die Fragestellungen zwei und drei werden in Kapitel 7.4.2 untersucht.

### 7.4.1 TESTAUFGABE ZUR UNTERSUCHUNG VON STRESSOR-WIRKUNGEN AUF DAS *ERLERNEN* VON HANDLUNGS-ERGEBNIS-BEZIEHUNGEN

Hier wurde der Unterlassungskontingenzttest (engl. *omission contingency test*) etabliert mit dem Ziel Wirkungen pharmakologischer und physischer Stressoren auf das *Erlernen* von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen tiefgehend zu untersuchen. Die wichtigste Eigenschaft dieser Testaufgabe besteht darin, dass eine außerordentlich starke Kontingenzänderung im Verlauf der Aufgabe verlangt wird. Um weiterhin Belohnungen zu erhalten, muss statt wie zuvor im Training zu handeln, in der Kontingenzdegradations-Sitzung nicht mehr gehandelt werden. Das Erlernen der Kontingenzänderung findet in einer Sitzung statt und sollte daher geeignet sein für die Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf das Erlernen dieser Kontingenzänderung. Erwartet wurde, dass Tiere unter Stressor-Einwirkung beim Erlernen der Kontingenzdegradation beeinträchtigt sein sollten.

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 7-1 dargestellt und wird im Folgenden näher erläutert. Während des Trainings erhielten alle Tiere eine Pellet-Belohnung (Rezeptierung A/I, TestDiet, Sandown Scientific, Hampton, UK) nach Betätigung des linken Hebels, sodass sie eine positive Kontingenz, d.h. einen kausalen Zusammenhang, zwischen Hebelbetätigung und Pellet-Belohnung ausbildeten. Am Tag der Kontingenzdegradation wurde für die Hälfte

der Tiere die Kontingenzen „umgekehrt“, d.h. die Tiere erhielten nur noch dann ein Pellet, wenn sie den Hebel nicht betätigten (negative Kontingenzen zwischen Hebel und Belohnung). Im nachfolgenden Extinktions-Test wurde geprüft, ob sie diese negative Kontingenzen erfasst hatten. Die andere Hälfte der Tiere wurde am Tag der Kontingenzen-degradation wie im Training weiter trainiert (positive Kontingenzen zwischen Hebel und Belohnung) und dann im Extinktions-Test getestet. Sie dienten als Kontrolle, d.h. ihre Hebeldruckraten waren die Referenz für die erwarteten geringeren Hebeldruckraten der unter negativen Kontingenzen-Bedingungen trainierten Tiere. Um die Anzahl an Lerngelegenheiten beider Gruppen gleich zu halten, wurde die Dauer der Sitzung der Tiere mit positiver Kontingenzen nicht wie üblich zeitlich begrenzt, sondern die Sitzung endete dann, wenn ein Tier genauso viele Belohnungen erhalten hatte, wie sie im Durchschnitt den Tieren mit negativer Kontingenzen zugeteilt wurden. Der gesamte Versuch wurde während der Aktivitätsphase der Ratten (Dunkelphase) durchgeführt.

Die eine Hälfte der Tiere wurde vor der Kontingenzen-degradation einer Stressor-Exposition unterzogen („kombinierter Stressor“ siehe Pielock et al., 2013), die andere Hälfte der Tiere wurde ohne vorherige Stressor-Exposition in der Kontingenzen-degradations-Sitzung trainiert. Am darauffolgenden Tag fand für alle Tiere der erste Extinktions-Test statt.

Nach einer Trainingspause von 4 Tagen erhielten die Tiere nochmals 2 Tage Training. Vor der anschließenden Kontingenzen-degradation wurden der Stress-Gruppe die Wirkstoffe Corticosteron und Yohimbin (jeweils 3 mg/kg) verabreicht, d.h. sie wurden dem pharmakologischen Stressor ausgesetzt. Am folgenden Tag wurden alle Tiere im zweiten Extinktions-Test getestet.

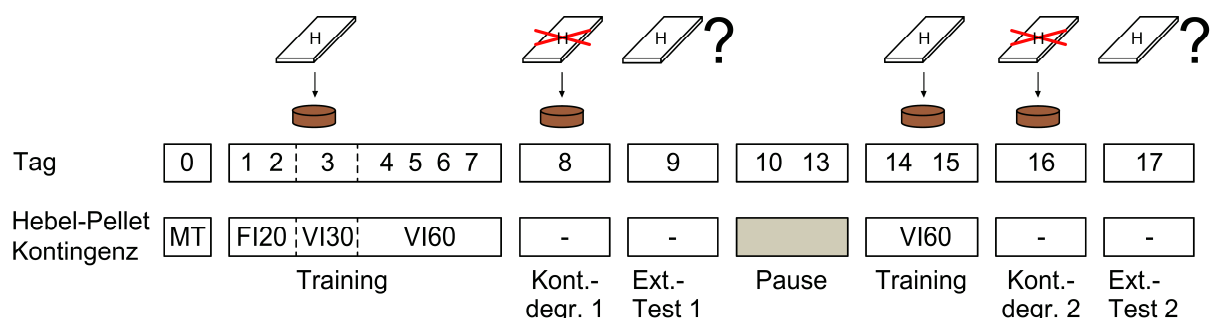


Abbildung 7-1: Trainings-Schema des Unterlassungskontingenztests. Dem Training geht ein *magazine training* (MT) voran, in welchem die Ratte ohne Hebelpräsentation durchschnittlich alle 60 sec ein Futterpellet zugeteilt bekommt. Während des Trainings wird ein Pellet nach Hebelbetätigung gemäß der jeweiligen Hebel-Pellet Kontingenzen zugeteilt (positive Kontingenzen). In der Kontingenzen-degradation wird nach 20 sec nicht-Hebelbetätigung ein Pellet zugeteilt (negative Kontingenzen). Während des Abrufs (Extinktions-Test) werden keine Pellets zugeteilt. In der Pause findet kein Training statt. FI20: *fixed interval* 20, VI30: *variable interval* 30, VI60: *variable interval* 60.

Eine Trainings-Sitzung endete nach 45 Minuten oder nach Zuteilung von 50 Belohnungen (während FI 20) bzw. 30 Belohnungen (während aller VI Sitzungen), je nachdem welche Bedingung zuerst erreicht wurde. Die Kontingenzdegradation dauerte 60 Minuten, bzw. endete nach entsprechender Anzahl an erhaltenen Belohnungen; der Extinktions-Test dauerte 30 Minuten.

Aus den Ergebnissen ging hervor, dass Kontrolltiere und Tiere nach kombinierter Stressor-Exposition sensitiv waren für das Erlernen der negativen Kontingenz und diese im Extinktions-Test abrufen konnten (Abbildung 7-2), d.h. sie reduzierten ihre Hebeldruckrate bei negativer Kontingenz-Bedingung gegenüber der bei positiver Kontingenz-Bedingung. Die statistische Auswertung mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse bestätigte dieses Ergebnis, indem sie einen Haupteffekt der Kontingenz [ $F_{1,36}=60,4$ ;  $p<0,001$ ], keinen Haupteffekt der Behandlung [ $F_{1,36}<0,01$ ; n.s.] und keine Interaktion von Kontingenz x Behandlung [ $F_{1,36}<2,0$ ; n.s.] ergab.

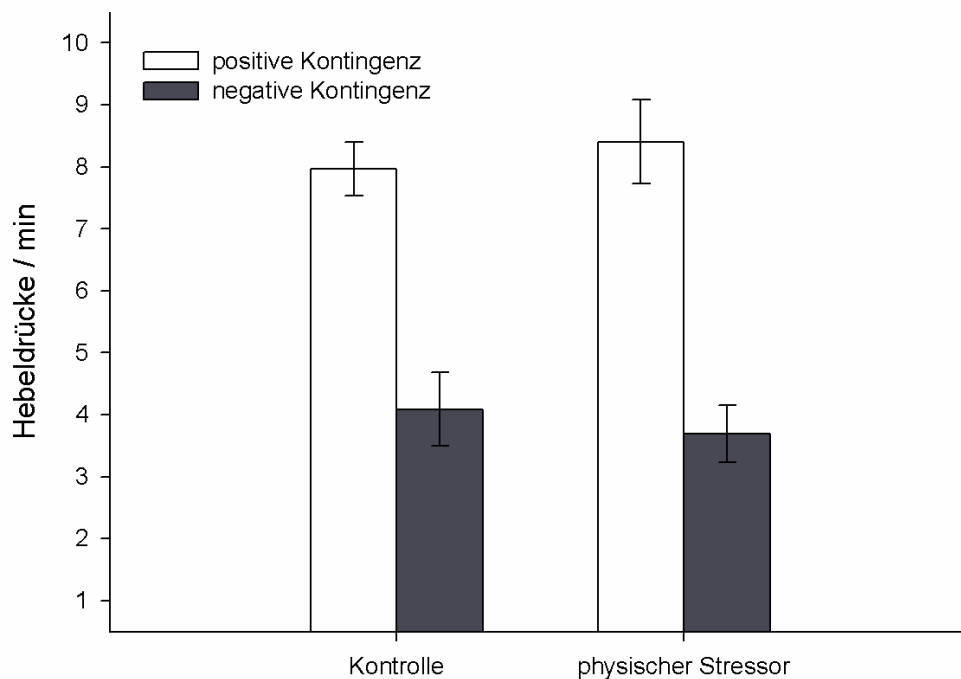


Abbildung 7-2: Extinktions-Test 1. Dargestellt ist das Hebeldruckverhalten im Extinktions-Test 1 von Kontrolltieren und Tieren mit physischer Stressor-Exposition vor der Kontingenzdegradation. Als physischer Stressor diente der kombinierte Stressor. Die Kontrolltiere waren nicht Stressor-exponiert. (ANOVA: Kontingenz [ $F_{1,36}=60,4$ ;  $p<0,001$ ], Behandlung [ $F_{1,36}<0,01$ ; n.s.], Kontingenz x Behandlung [ $F_{1,36}<2,0$ ; n.s.]

Ebenso waren Tiere nach Verabreichung von Corticosteron/Yohimbin in der Lage die negative Kontingenz wie Kontrolltiere zu erlernen und sie im Extinktions-Test abzurufen (Abbildung 7-3), d.h. ihre Hebeldruckrate war reduziert verglichen mit der bei positiver Kontingenz gemessenen Hebeldruckrate. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch die statistische Analyse bestätigt, die einen Haupteffekt der Kontingenz [ $F_{1,36}=50,6$ ;  $p<0,001$ ], keinen Haupteffekt der Behandlung [ $F_{1,36}<1,0$ ; n.s.] und keine Interaktion Kontingenz x Behandlung [ $F_{1,36}<0,6$ ; n.s.] ergab.

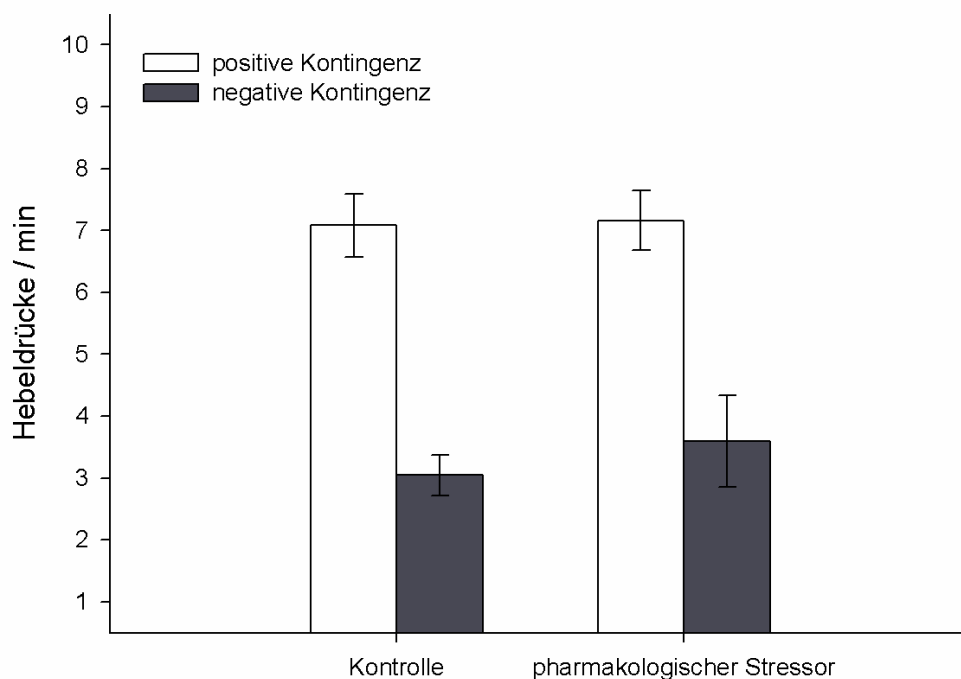


Abbildung 7-3: Extinktions-Test 2. Dargestellt ist das Hebeldruckverhalten im Extinktions-Test 2 von Kontrolltieren und Tieren mit pharmakologischer Stressor-Exposition vor der Kontingenzzegradation. Als pharmakologischer Stressor wurden jeweils 3 mg/kg Corticosteron und Yohimbin systemisch verabreicht. Die Kontrolltiere waren nicht Stressor-exponiert. (ANOVA: Kontingenz [ $F_{1,36}=50,6$ ;  $p<0,001$ ], Behandlung [ $F_{1,36}<1,0$ ; n.s.], Kontingenz x Behandlung [ $F_{1,36}<0,6$ ; n.s.]).

Zusammengefasst ging aus den Daten hervor, dass Kontrolltiere sehr rasch eine negative Kontingenz (bzw. eine massive Kontingenzzänderung) detektieren und die Handlungsausführung entsprechend anpassen konnten. Entgegen der Erwartung galt dies auch für Tiere, die vorher einem physischen oder pharmakologischen Stressor ausgesetzt wurden. Mit dem entwickelten Test lässt sich folglich feststellen, ob Tiere in der Lage sind starke Kontingenzzänderungen zu detektieren. Diese Fähigkeit ist offenbar sehr robust gegenüber einem systemisch verabreichten akuten Stressor.



Daher wurde im nächsten Versuch untersucht, ob ein lokal verabreichter Stressor, nämlich die transiente Aktivierung von Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) im mPFC, messbare Stressor-Effekte im instrumentellen Handeln von Ratten auslösen kann.

#### 7.4.2 LOKALE PHARMAKOLOGISCHE STRESSOR-WIRKUNGEN IM MPFC WÄHREND DER KONTINGENZDEGRADATION

In dieser weiterführenden Studie wurde untersucht, ob die transiente Aktivierung von GR im mPFC die Sensitivität von Ratten auf Kontingenzänderungen zu reagieren beeinträchtigt. Dafür wurde der unter 7.4.1 etablierte Unterlassungskontingenztest verwendet. GR werden bei der physischen Reaktion auf einen Stressor von Glucocorticoiden, u.a. von dem Stresshormon Corticosteron, aktiviert. Da der mPFC selektiv beteiligt ist an der Akquisition von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen bei instrumentellen Handlungen (Ostlund und Balleine, 2005), nehmen wir an, dass eine lokale GR-Aktivierung zu Beeinträchtigungen führen sollte. Für diese Untersuchung war es notwendig, die Methode der intrazerebralen Mikroinfusion zu etablieren. Mittels dieser Methode können Wirkstoffe gezielt in ein Gehirnareal verabreicht werden. Die Vorgehensweise ist sehr komplex (siehe Murschall und Hauber, 2006) und wird im Folgenden verkürzt dargestellt.

Zunächst wurden Ratten unter Narkose einer stereotaktischen Operation unterzogen. Dabei wurden Führungskanülen (0,8 mm Durchmesser) bilateral in den PL implantiert (Abbildung 7-4) (Paxinos und Watson, 1998). Die Zielkoordinaten des PL waren: 3,2 mm anterior Bregma;  $\pm 1,26$  mm lateral der Mittellinie und 3,86 mm ventral des Schädelknochens bei einem Winkel von  $10^\circ$  (LaLumiere und Kalivas, 2008). Jedes Tier hatte mindestens 3 Tage Zeit sich zu erholen, bevor das Training in der SKINNER-Box begann. Die Wirkstoff-Verabreichung erfolgte über Injektionskanülen mit 0,45 mm Durchmesser.

Als Wirkstoff wurde RU 28362, ein hoch selektiver GR Agonist (Teutsch et al., 1981), in den PL mPFC verabreicht. Der Wirkstoff wurde in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst, weshalb als Kontroll-Lösung 0,9 % NaCl-Lösung diente. Pro Hemisphäre wurden 10 ng RU 28362 in 0,5  $\mu$ L injiziert, die Infusionszeit betrug 34 sec und die Injektionskanüle wurde weitere 26 sec in der Führungskanüle belassen, um die Diffusion der Lösung in das umgebende Gewebe zu gewährleisten (Barsegyan et al., 2010). Die Verabreichung von RU 28362 bzw. der Kontroll-Lösung erfolgte direkt vor der Kontingenzdegradation, wodurch das Erlernen der negativen

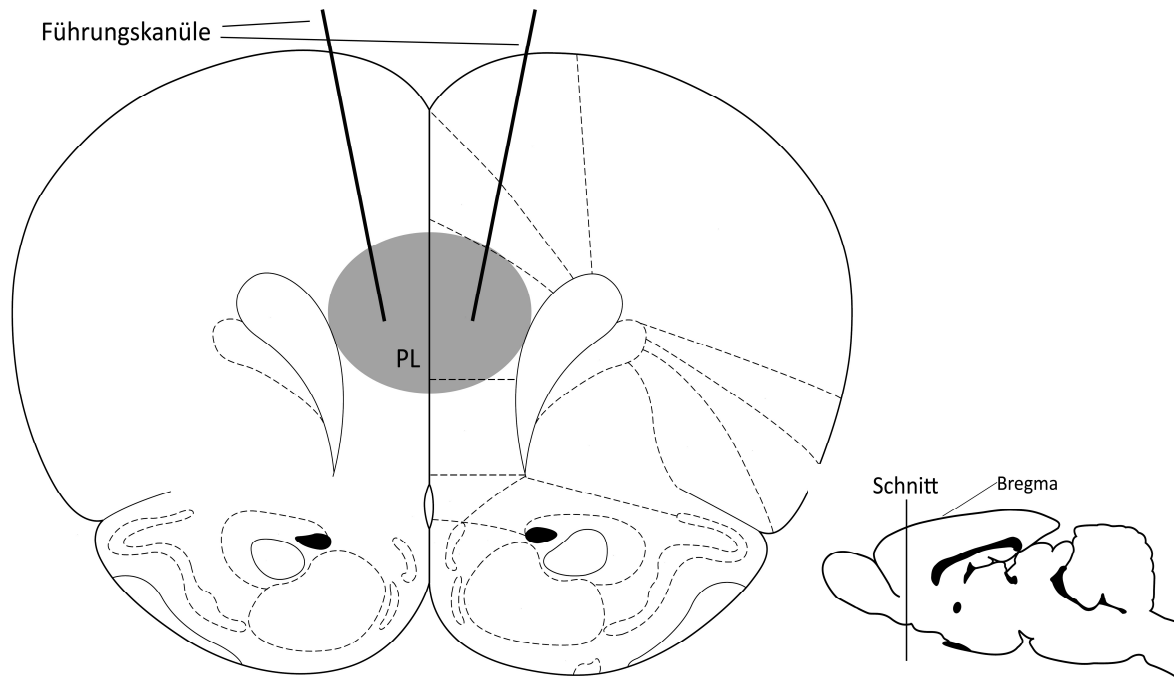


Abbildung 7-4: Transversalschnitt durch den prälimbischen Teil des medialen Präfrontalcortex (PL) der Ratte. Dargestellt sind die bilateral implantierten Führungskanülen. Rechts unten ist die Position der Schnittebene (3,2 mm anterior Bregma) im Sagittalschnitt dargestellt. Abbildungen modifiziert nach Paxinos und Watson, 1998.

Kontingenz beeinflusst werden sollte. Bis auf weiteres erfolgte der Versuchsablauf wie in Kapitel 7.4.1 beschrieben und ist in Abbildung 7-1 dargestellt. Der Unterschied war, dass anstatt in der Kontingenzdegradations-Sitzung eine separate Tiergruppe unter positiven Kontingenzbedingungen zu trainieren, die Daten aus dem Training als Kontrolle für die Hebeldruckrate unter positiven Kontingenzbedingungen bei der Versuchsauswertung herangezogen wurden. Zudem endete der Versuch bereits nach dem ersten Extinktions-Test und es fanden keine weiteren Trainings- und Test-Sitzungen statt.

Die Ergebnisse zeigten, dass Kontrolltiere und Tiere, die einer Mikroinfusion mit RU 28362 unterzogen wurden, die negative Kontingenz detektieren konnten (Abbildung 7-5). Die Detektionsleistung der Kontrolltiere war geringfügig stärker ausgeprägt. Die statistische Auswertung mit einer zweifaktoriellen ANOVA ergab einen Haupteffekt der Kontingenz [ $F_{1,17}=102,70$ ;  $p<0,001$ ], keinen Haupteffekt der Behandlung [ $F_{1,17}<0,01$ ; n.s.] und keine Interaktion von Kontingenz x Behandlung [ $F_{1,17}<0,5$ ; n.s.]. D.h. Tiere mit aktivierten GR im mPFC waren in der Lage, markante Änderungen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen zu detektieren.

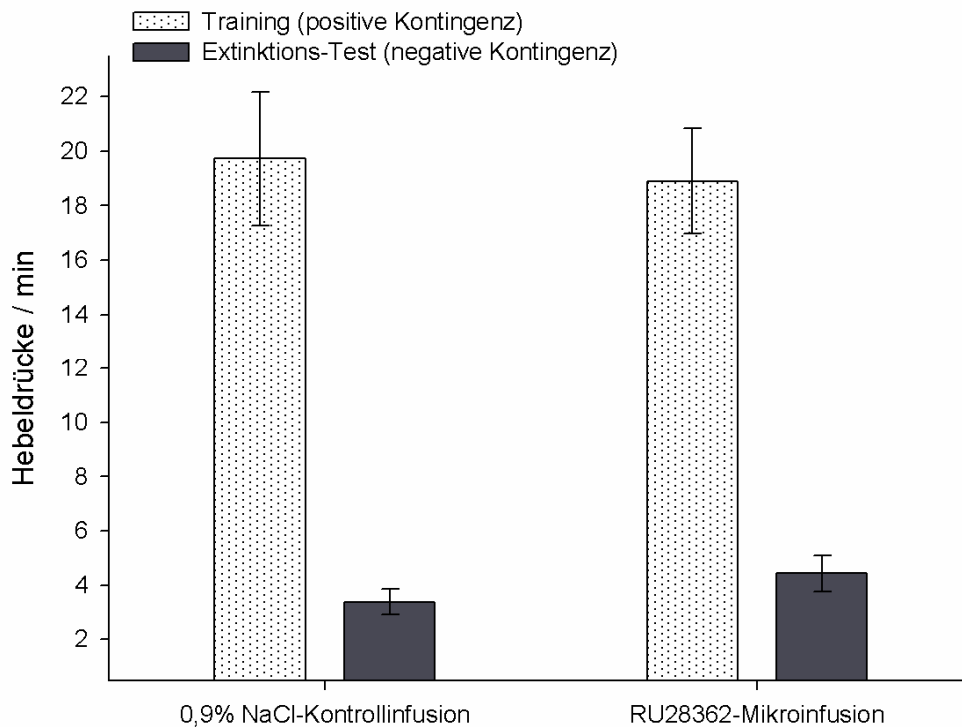


Abbildung 7-5: Dargestellt ist das Hebeldruckverhalten in der letzten Trainings-Sitzung und im Extinktions-Test von Kontrolltieren und Tieren mit lokaler pharmakologischer Stressor-Exposition vor der Kontingenzdegradation. Als pharmakologischer Stressor wurde 10 ng RU28362 bilateral in den PL mPFC verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten eine Mikroinfusion mit 0,9% NaCl. (ANOVA: Kontingenz [ $F_{1,17}=102,70$ ;  $p<0,001$ ], Behandlung [ $F_{1,17}<0,01$ ; n.s.], Kontingenz x Behandlung [ $F_{1,17}<0,5$ ; n.s.]

Insgesamt ging aus den weiterführenden Untersuchungen hervor, dass die Etablierung einer Testaufgabe, mit welcher sich akute Stressor-Wirkungen auf das *Erlernen* von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen erfassen lassen, erhebliche Probleme bereitete.

Der eingesetzte Unterlassungskontingenztest war zwar robust, aber sehr einfach. Er ließ sich entgegen der Erwartung auch von Tieren erlernen, die unter akuter Stressor-Einwirkung standen. Ebenso konnten überraschenderweise auch solche Tiere die negative Kontingenz erlernen, die durch Verabreichung des Wirkstoffs RU 28362 unter lokaler Stressor-Wirkung standen. Demnach war die Umkehrung der Kontingenzbeziehung von einer positiven zu einer negativen Kontingenz so prägnant, dass sie sogar von Tieren unter akuter Stress-Einwirkung gelernt werden konnte. Dabei war sowohl ein schwacher pharmakologischer als auch ein intensiver physischer Stressor ohne messbare Wirkung. Aufgrund seiner Robustheit eignete sich der Unterlassungskontingenztest nicht für die Untersuchung von Effekten unterschiedlicher Stressoren.

Ein weiteres Resultat der weiterführenden Untersuchungen war, dass die Durchführung einer Mikroinfusion im Unterlassungskontingenztest erfolgreich etabliert werden konnte. Kontrolltiere waren nach Verabreichung der Kontrolllösung in der Lage die negative Kontingenz zu erfassen und abzurufen. Die Toleranz der Mikroinfusions-Prozedur war nicht unerheblich, da die Tiere an den intensiven Umgang mit dem Experimentator während der Infusion gewöhnt werden mussten ohne dadurch im anschließenden instrumentellen Handeln beeinträchtigt zu sein.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich der Unterlassungskontingenztest für Stress-Untersuchungen als nicht geeignet herausgestellt hatte. Die Mikroinfusions-Prozedur hingegen konnte erfolgreich etabliert werden.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 8.1 AUSGANGSFRAGEN UND ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von akutem Stress auf das Erlernen und den Abruf erlernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen am Tiermodell der Ratte untersucht. Handlungs-Ergebnis-Beziehungen bilden die Grundlage zielgerichteter Handlungen von Mensch und Tier (Graybiel, 2008). Zielgerichtete Handlungen sind flexibel und werden durch den „Wert“ des Handlungszieles gesteuert sowie durch die „Kontingenz“, d.h. den kausalen Zusammenhang zwischen einer Handlung und dem Erreichen des Zieles (Balleine und O'Doherty, 2010). Die Fähigkeit eines Individuums den Wert und die kausale Effektivität von Handlungen, bzw. deren Veränderungen, zu erfassen, sichert sein Überleben in einer sich ständig ändernden Umwelt (Schwabe und Wolf, 2009).

Das Erlernen, Speichern und der Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen bei Mensch und Tier lässt sich mithilfe weitgehend analoger instrumenteller Testaufgaben untersuchen (Balleine und O'Doherty, 2010; Schwabe et al., 2010a; Schwabe et al., 2010d). Aus Studien an Menschen ist bekannt, dass Personen, die unter akuter Stress-Einwirkung stehen, bereits erlernte Handlungen nicht flexibel an veränderte Handlungs-Bedingungen anpassen können (Schwabe et al., 2010b; Schwabe und Wolf, 2010c). Beispielsweise wählen sie nach Corticosteron/Yohimbin Applikation in einer instrumentellen Aufgabe am Computer die Option Orangensaft, obwohl sie sich zuvor an Orangen satt gegessen haben, d.h. sie führen diese Handlungen unter akutem Stress automatisiert und nicht flexibel aus. Nicht-gestresste Kontrollpersonen handeln demgegenüber flexibel, d.h. sie wählen jene Option kaum, welche eine Belohnung mit verringertem Wert zuteilt.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren, die noch weitgehend unbekanntem Wirkungen von akutem Stress auf das Erlernen und den Abruf erlernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen bei der Ratte zu erforschen sowie mögliche neurochemische Signale zu erfassen, welche solche akute Stressor-Wirkungen vermitteln.

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Etablierung von Testaufgaben mit deren Hilfe das Erlernen und der Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen untersucht werden konnte. Im Mittelpunkt standen drei Testaufgaben: der Kontingenzdegradationstest, der Unterlassungskontingenztest und der Ergebnisdevaluationstest. Besonderes Augenmerk lag

darauf, die bereits bekannten Testaufgaben für die Ratte so zu modifizieren, dass sie sich für Untersuchungen von akutem Stress eignen.

Der zweite Teil der Arbeit diente der Identifikation akuter Stressoren, welche für die vorgesehenen Untersuchungen geeignet waren und eine ausreichende Stimulation der HPA-Achse erzeugten. Es wurden sowohl pharmakologische als auch physische Stressoren untersucht. Des Weiteren wurden Möglichkeiten der pharmakologischen Blockade von akuten Stressor-Wirkungen untersucht. Hierfür wurden zusätzlich zur Stressor-Exposition Pharmaka verabreicht, welche Rezeptoren von Stressmediatoren blockierten.

Der dritte Teil der Arbeit befasste sich damit, akute pharmakologische und akute physische Stressor-Wirkungen auf das Erlernen und den Abruf erlernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen zu erfassen. Dafür wurden jene Testaufgaben und Stressoren eingesetzt, welche sich in den vorangegangenen Arbeitsteilen als geeignet herausgestellt hatten.

Die durchgeführten Experimente und ihre Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### 8.2 TESTAUFGABEN ZUR UNTERSUCHUNG VON STRESSOR-WIRKUNGEN BEI INSTRUMENTELLEN HANDLUNGEN

Die nachfolgend beschriebenen Testaufgaben in SKINNER-Boxen verlangen von einem Tier Handlungs-Ergebnis-Beziehungen zu erlernen und abzurufen. Mithilfe des sog. Kontingenzdegradationstests und des Unterlassungskontingenztests kann man überprüfen, ob ein Tier den kontingenten, d.h. kausalen, Zusammenhang von Handlung und Ergebnis gelernt hat (Hammond, 1980; Balleine und Dickinson, 1998; Dickinson, 1998; Balleine und Ostlund, 2007; Balleine und O'Doherty, 2010). Bei beiden Tests wird die Reaktion des Tiers auf Kontingenzänderungen untersucht. Eine solche Reaktion erfolgt nur dann, wenn das Tier zuvor die Handlungs-Ergebnis-Beziehung gelernt hat. Zusätzlich kann mithilfe des Ergebnisdevaluationstests überprüft werden, ob ein Tier den Wert einer Belohnung erfasst hat, welche mit einer Handlung verknüpft ist (Balleine und Dickinson, 1998; Killcross und Coutureau, 2003). Bei diesem Test wird untersucht, ob ein Tier auf Wertänderungen der Belohnung reagiert. Eine Sensitivität auf Kontingenz- und Wertänderungen zeigt an, dass ein Tier die Handlungs-Ergebnis-Beziehungen gelernt hat und mithin flexibel handelt (Balleine und Dickinson, 1998; Lex und Hauber, 2010a, 2010c).

Die Untersuchung von akuten Stressor-Wirkungen in den genannten Testaufgaben stellt nun bestimmte Anforderungen an den zeitlichen Ablauf einer Testaufgabe, denen die in der Literatur beschriebenen Aufgaben nicht gerecht werden. Beispielsweise dauert eine Lernphase in der Regel über mehrere Tage an, nämlich über mindestens sechs Tage (Lex und Hauber, 2010a, 2010c). Akute Stressor-Wirkungen sind üblicherweise solche, die durch ein bis ca. drei Stressor-Expositionen erzeugt werden. D.h. um akute Stressor-Wirkungen auf das Erlernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen zu erfassen, muss die Aufgabe so konzipiert sein, dass der Lernvorgang nicht länger als ein bis drei Tage dauert. Alternativ wurde außerdem untersucht, ob durch die Erhöhung der Komplexität bekannter Testaufgaben Stress-induzierte Störungen entdeckt werden könnten.

Nachfolgend werden die Ergebnisse zu den Testaufgaben und ihren Varianten mit veränderten Lernzeiträumen diskutiert.

### 8.2.1 TESTAUFGABEN ZUR UNTERSUCHUNG VON STRESSOR-WIRKUNGEN AUF DAS *ERLERNEN* VON HANDLUNGS-ERGEBNIS-BEZIEHUNGEN

*Kontingenzdegradationstest.* Zur Untersuchung von Stressor-Effekten auf das Erlernen von Kontingenzbeziehungen wurde zunächst der „Standard-Kontingenzdegradationstest“ etabliert (Balleine und Dickinson, 1998; Lex und Hauber, 2010a). Diese Testaufgabe ist im Allgemeinen relativ zeitaufwändig, d.h. die Kontingenzdegradation dauert mehrere Tage (Corbit und Balleine, 2003; Lex und Hauber, 2010c). Deshalb wurden Modifikationen der Aufgabe geprüft, mit dem Ziel der Sensitivitätserhöhung. Dadurch sollte es in Folgeuntersuchungen ermöglicht werden, auch eher geringgradige Wirkungen akuter Stressoren zu entdecken.

Zur Eignungsprüfung der modifizierten Aufgaben wurden Tiere mit einer 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) Läsion im pDMS verwendet. Es ist bekannt, dass Tiere mit dieser Behandlung während der Kontingenzdegradation eine reduzierte und im Extinktions-Test keine Sensitivität für die Kontingenzdetektion aufweisen (Lex und Hauber, 2010c). Auf diese Weise behandelte Tiere wurden in den modifizierten Tests als Positivkontrollen untersucht. Bei den Testaufgaben wurden Veränderungen hinsichtlich des Lernzeitraumes und der Art der Kontingenzänderung vorgenommen mit dem Ziel die Aufgabe zu erschweren. Erwartet wurde, dass Kontrolltiere die modifizierten Aufgaben nur schwer lernen, Tiere mit Läsionen

jedoch nicht. Die Beeinträchtigung durch den Eingriff, so die Erwartung, sollte unter diesen Bedingungen stärker sein.

Drei Varianten des Standard-Kontingenzdegradationstest wurden untersucht (Abbildung 8-1). In Variante 1 wurde überprüft, ob eine Verkürzung des Lernzeitraumes um ein Drittel das Erlernen der Kontingenzdegradation unter Standardbedingungen erschwerte. Zur Kontrolle wurde in Variante 2 untersucht, ob eine Verlängerung des Lernzeitraumes auf das Doppelte das Erlernen der Kontingenzdegradation unter Standardbedingungen erleichterte. Darauf aufbauend wurde in Variante 3 überprüft, wie sich zusätzlich zur Verlängerung des Lernzeitraumes eine erhebliche Erhöhung der Anforderungen an die Kontingenzdetektion auswirkte (Braun und Hauber, 2012).

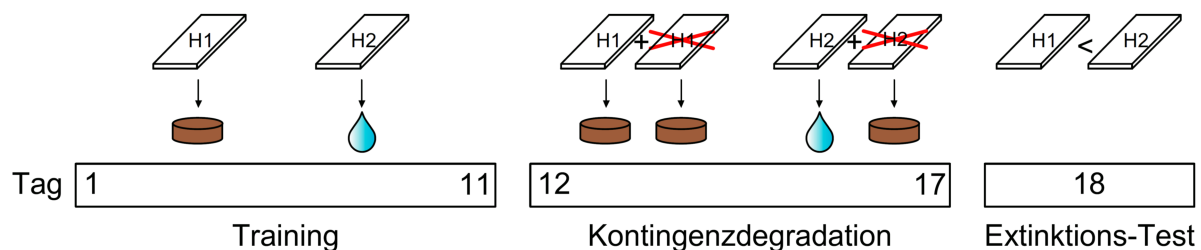


Abbildung 8-1: Schematischer Verlauf des klassischen Kontingenzdegradationstests. Während des Trainings erhält ein Tier bei Betätigung von Hebel 1 (H1) ein Futterpellet und bei Betätigung von Hebel 2 (H2) Zuckerwasser. In der Kontingenzdegradation erhält es zusätzlich ohne Betätigung eines Hebels ein Pellet. Damit wird der kausale Zusammenhang zwischen H1 und Pellet abgeschwächt. Beim Abruf im Extinktions-Test wird schließlich geprüft, ob das Tier die Degradation der Kontingenz zwischen H1 und Pellet erfasst hat und H1 weniger häufig betätigt als H2. In den drei vorgestellten Varianten der klassischen Testaufgabe wurde jeweils die Kontingenzdegradation wie im Text beschrieben verändert.

Die statistische Analyse der Ergebnisse zeigte, dass scheinoperierte Kontrolltiere in allen drei Variationen der Testaufgabe sowohl während des Erlernens der Kontingenzdegradation als auch beim Abruf des Gelernten im Extinktions-Test sensitiv gegenüber den jeweils untersuchten Kontingenzänderungen waren. D.h. intakte Tiere konnten auch unter veränderten Bedingungen die Aufgabe lösen.

Die Kontingenzdetektion von Läsionstieren unterschied sich demgegenüber in den Aufgabenvarianten. Tiere mit 6-OHDA Läsion waren erwartungsgemäß nicht in der Lage während eines kurzen Lernzeitraumes die Kontingenzänderungen zu erfassen. Während eines langen Lernzeitraumes erfassten sie Kontingenzänderungen ebenfalls nicht. Dieser Befund war unerwartet, weil die Tiere offenbar trotz des langen Trainings eine Insensitivität gegenüber den Kontingenzänderungen aufwiesen. Überraschenderweise führte in Variante 3



eine Lernzeitraumverlängerung mit einer gleichzeitig erhöhten Komplexität der Kontingenzdegradation zu einer verbesserten Detektionsleistung. Die Gründe dafür sind noch unbekannt. Aus weiteren Versuchen (Ergebnisse nicht dargestellt) ging zudem hervor, dass der Kontingenzdegradationstest schon bei geringen Abweichungen in der Versuchsdurchführung Ergebnisse ermittelte, die nicht reproduzierbar waren.

Insgesamt sprechen die erhobenen Daten dafür, den Kontingenzdegradationstest mit seinen hier erprobten Varianten nicht als Testaufgabe zur Messung von Stressor-Wirkungen einzusetzen. Denn die Veränderungen von einzelnen Aufgabenparametern führten zu schwer erklärbaren Veränderungen in der Kontingenzdetektionsleistung. Außerdem war die Reproduzierbarkeit der Messdaten nicht ausreichend hoch. Ferner waren die Lernzeiträume aller Varianten zu lang für Messungen von akuten Stressor-Effekten auf das Erlernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen, d.h. mindestens vier Tage anstatt wie für akute Stress-Untersuchungen verlangt ein bis drei Tage.

Auch wenn diese Messungen zeigten, dass der Kontingenzdegradationstest für Stress-Untersuchungen wenig geeignet ist, ergaben sich aus den Untersuchungen neue Einblicke hinsichtlich der Rolle des Striatums bei der Kontingenzdetektion. Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass eine 6-OHDA Läsion des pDMS keine absolute Beeinträchtigung bei der Kontingenzdetektion hervorruft, wie dies von Lex und Hauber (2010a) nachgewiesen wurde, sondern dass das verwendete Trainingsprotokoll das Vorhandensein und die Art der Beeinträchtigung bestimmt (Braun und Hauber, 2012). Aus den Daten geht folglich hervor, dass allein durch Verwendung des Standardtests (Yin et al., 2005a; Lex und Hauber, 2010a, 2010c) nicht sicher beurteilt werden kann, ob ein bestimmter Eingriff die Kontingenzdetektionsleistung beeinträchtigt oder nicht. Außerdem zeigte die Studie, dass kaum bekannt ist, auf welche Weise eine Veränderung der Testparameter die Detektionsleistung beeinflusst.

*Unterlassungskontingenztest.* Im Folgenden wurde die Eignung des Unterlassungskontingenztests für die Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf das Erlernen von Kontingenz Beziehungen überprüft. Diese Testaufgabe sollte robust sein und ihre Einflussgrößen sollten leichter modifizierbar sein, denn die sog. negative Kontingenz zwischen Handlung und Ergebnis wird in nur einer Sitzung gelernt (Abbildung 8-2).

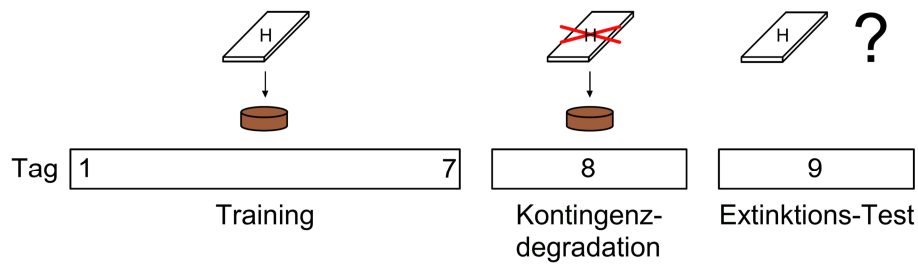


Abbildung 8-2: Schematischer Verlauf des Unterlassungskontingenztests. Während des Trainings betätigt ein Tier einen Hebel (H), um ein Futterpellet zu bekommen. In der Kontingenzdegradation wird nur noch dann eine Belohnung zugeteilt, wenn das Tier den Hebel nicht betätigt. Damit wird die Kontingenz zwischen Hebel und Pellet entwertet. Im Extinktions-Test wird überprüft, ob das Tier die Unterlassungskontingenz gelernt hat und den Hebel nur noch selten oder überhaupt nicht betätigt.

Als Vorlage für den Unterlassungskontingenztest diente das von Coutureau und Kollegen (2012) dargestellte Lernschema. Unbehandelte Kontrolltiere wurden in der Unterlassungskontingenz trainiert und getestet. Aus der statistischen Analyse der Ergebnisse ging hervor, dass Kontrolltiere während der Kontingenzdegradation und beim Abruf des Gelernten im Extinktions-Test sensitiv gegenüber der Kontingenzänderung waren (vgl. Kontrolltiere in Abbildung 7-2 und Abbildung 7-5). D.h. sie hatten die negative Kontingenz innerhalb einer Lernsitzung gelernt.

Diese Daten bestätigten die von Coutureau und Kollegen (2012) ermittelten Ergebnissen, dass Kontrolltiere eine negative Kontingenz in nur einer Sitzung erlernen und danach abrufen können. Interessanterweise zeigte eine andere Studie, dass Kontrolltiere nach längerem Training nicht mehr in der Lage waren, eine negative Kontingenz zu erfassen und abzurufen (Yin et al., 2006b). Grund dafür ist vermutlich, dass sich während des langen Trainings die Handlungs-Ergebnis-Beziehung so stark eingepreßt hatte, dass diese auch in der anschließenden Kontingenzdegradation und während des Abrufs des Gelernten im Extinktions-Test dominierte. D.h. nach langem Training handeln die Tiere inflexibel und erfassen nicht die Kontingenzdegradation (Dickinson, 1998). Folglich spielt die Länge des Trainings eine entscheidende Rolle für die Detektion von Kontingenzänderungen. Um eine Detektion von Kontingenzänderungen zu ermöglichen, muss das Training ausreichend lang sein, damit die Tiere einen kausalen Zusammenhang zwischen Hebel und Belohnung erfassen, ohne dass es zur Ausbildung eines Handlungsautomatismus kommt. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit zur Messung von Stressor-Wirkungen ein Test mit kurzem Training gewählt.

*Ergebnisdevaluationstest.* In einer weiteren Messreihe wurde untersucht, ob sich der Ergebnisdevaluationstest für die Untersuchung von akuten Stressor-Wirkungen auf das Erlernen von Wertänderungen eignet. Im klassischen Ergebnisdevaluationstest (Ostlund und Balleine, 2005; Lex und Hauber, 2010a) dauert das Training mehrere Tage (Abbildung 8-3). Daher wurden Modifikationen der klassischen Testaufgabe erarbeitet und geprüft, mit dem Ziel den Lernzeitraum auf ein bis drei Tage zu verkürzen, um Stressor-Wirkungen erfassen zu können. Vorversuche ergaben allerdings, dass die Lernphase in der klassischen Testaufgabe nicht ausreichend gekürzt werden konnte ohne die Detektionsleistung intakter Tiere bei der Devaluation zu beeinträchtigen (Daten nicht gezeigt). Mit anderen Worten war eine Verkürzung des Lernzeitraumes im klassischen Ergebnisdevaluationstest nicht möglich und wurde daher nicht weiter verfolgt.

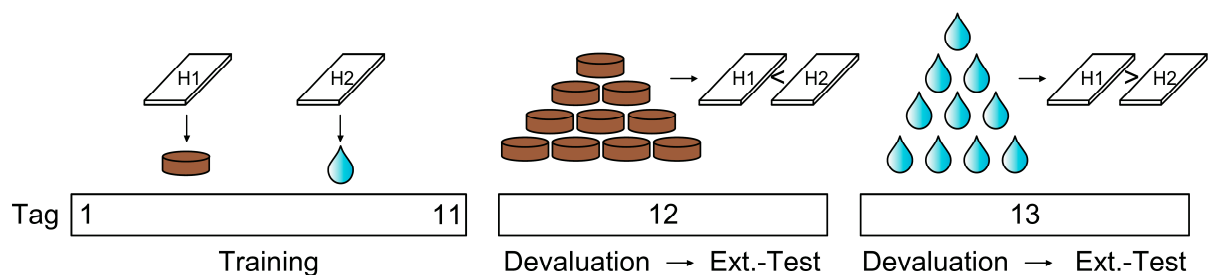


Abbildung 8-3: Schematischer Verlauf des klassischen Ergebnisdevaluationstests. Während des Trainings erhält ein Tier ein Futterpellet bei Betätigung von Hebel 1 (H1) und Zuckerlösung bei Betätigung von Hebel 2 (H2). Bei der ersten Devaluation werden die Pellets entwertet, indem sich das Tier an ihnen satt fressen kann. Direkt im Anschluss wird beim Abruf im Extinktions-Test geprüft, ob das Tier die Entwertung der Pellets erfasst hat, d.h. H1 weniger häufig betätigt als H2. In der zweiten Devaluation wird die Zuckerlösung entwertet, indem sie dem Tier in ausreichender Menge angeboten wird. Beim anschließenden Abruf im zweiten Extinktions-Test wird dann geprüft, ob das Tier die Entwertung der Zuckerlösung erfasst hat und H2 weniger häufig betätigt als H1.

*Variante des Ergebnisdevaluationstests.* In einem weiteren Vorversuch wurde eine Variante (Yin et al., 2005b) des klassischen Ergebnisdevaluationstests geprüft (Daten nicht dargestellt). Der für Stressuntersuchungen wesentliche Vorteil dieser Variante würde darin bestehen, dass das Lernen zweier neuer Handlungs-Ergebnis-Beziehungen in einer einzigen Sitzung stattfindet (Abbildung 8-4). Diese Variante wurde in verschiedenen Formen zu etablieren versucht. Es ist allerdings nicht gelungen diese Testaufgabe erfolgreich zu etablieren. Eigene Tests sowie eine Studienarbeit (Muth, 2012) ergaben, dass die von Yin und Kollegen (2005b) eingesetzten Belohnungen sehr unterschiedliche Belohnungswirkungen hatten und die Ergebnisse massiv verzerrten.

Insgesamt konnte keine Variante des Ergebnisdevaluationstests erfolgreich etabliert werden, weshalb dieser Typ Testaufgabe für die Untersuchung von Stressor-Effekten auf das Erlernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen nicht weiter eingesetzt wurde.

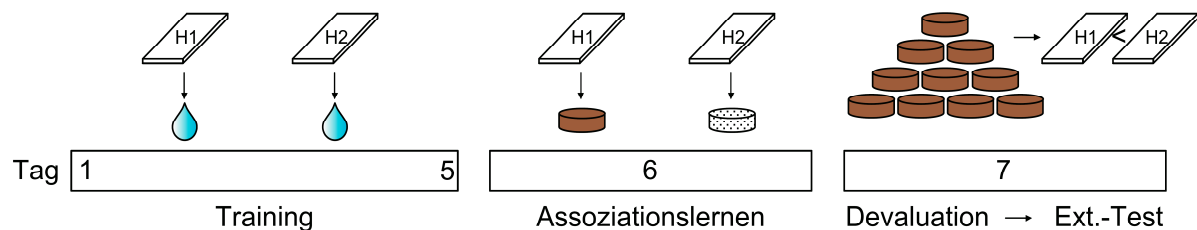


Abbildung 8-4: Schematischer Verlauf der Variante des modifizierten Ergebnisdevaluationstests nach Yin und Kollegen (2005b). Während des Trainings erhält ein Tier sowohl bei Betätigung von Hebel 1 (H1) als auch bei Betätigung von Hebel 2 (H2) Zuckerwasser. Beim Assoziationslernen werden nun die beiden Hebel mit zwei neuen unterschiedlichen Belohnungen assoziiert, d.h. bei Betätigung von H1 werden Getreide-Pellets zugeteilt und bei Betätigung von H2 Zucker-Pellets. In der Devaluation werden dann die Getreide-Pellets entwertet, indem sich das Tier an ihnen satt fressen kann. Direkt im Anschluss wird beim Abruf im Extinktions-Test geprüft, ob das Tier die Entwertung der Getreide-Pellets erfasst hat und H1 weniger häufig betätigt als H2.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich der Kontingenzdegradationstest und der Ergebnisdevaluationstest für die Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf das Erlernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen als ungeeignet herausgestellt hatten. Hingegen wurde der Unterlassungskontingenztest erfolgreich etabliert und konnte im späteren Teil der Arbeit für die Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf das Erlernen von Kontingenzänderungen eingesetzt werden, da die Kontingenzdegradation in einer einzigen Sitzung stattfindet und somit eine einmalige Stressor-Exposition möglich machte.

## 8.2.2 TESTAUFGABEN ZUR UNTERSUCHUNG VON STRESSOR-WIRKUNGEN AUF DEN ABRUF VON HANDLUNGS-ERGEBNIS-BEZIEHUNGEN

*Ergebnisdevaluationstest.* Zunächst wurde die Eignung des klassischen Ergebnisdevaluationstests (Abbildung 8-3) (Killcross und Coutureau, 2003; Ostlund und Balleine, 2005; Lex und Hauber, 2010a, 2010b, 2010c) für die Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf den Abruf von Wertänderungen überprüft.

Aus den Versuchsergebnissen ging hervor, dass Kontrolltiere sensitiv waren für die Ergebnisdevaluation und einen statistisch belegbaren Devaluationseffekt an beiden Test-Tagen zeigten (Braun und Hauber, 2013). Dieses Resultat konnte in verschiedenen Testdurchläufen reproduziert werden und entsprach den Daten von Lex und Hauber (2010a, 148

2010b, 2010c). Daher war davon auszugehen, dass mittels dieser Testaufgabe auch Versuchsdaten von behandelten oder gestressten Tieren zuverlässig erhoben werden konnten.

Es war auffallend, dass in allen Experimenten, die mit dem Ergebnisdevaluationstest durchgeführt wurden, die allgemeinen Hebeldruckraten im zweiten Extinktions-Test geringer waren als im ersten. Dieser Effekt beruhte in erster Linie auf dem wiederholten Testen in Extinktion, d.h. ohne Belohnungsverabreichung. Dadurch reduzierte sich die Motivation der Tiere und im Verlauf einer 10-minütigen Sitzung nahm die Hebeldruckrate ab. Dieser Effekt war am zweiten Test-Tag noch stärker ausgeprägt. Kontrolltiere waren demnach an beiden Test-Tagen sensitiv für die Ergebnisdevaluation, obgleich die Sensitivität am zweiten Tag weniger stark ausgeprägt war.

Die Testaufgabe ließ sich wie in der Literatur beschrieben etablieren und sollte ausreichend sensitiv sein, akute Stressor-Wirkungen auf den Abruf gelernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen zu messen.

### 8.2.3 FAZIT TESTAUFGABEN

Aus Studien an Menschen ist bekannt, dass akuter Stress sowohl das Erlernen als auch den Abruf erlernter Handlungen verändert, d.h. Handlungs-Ergebnis-Beziehungen werden unter akutem Stress nicht erlernt und deren Abruf ist beeinträchtigt (Schwabe und Wolf, 2009; Schwabe et al., 2010b; Schwabe und Wolf, 2010c; Schwabe et al., 2012b). Im ersten Teil meiner Arbeit wurden Standard-Testaufgaben für das Erlernen bzw. den Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen untersucht und Modifikationen erprobt, die für die Untersuchungen akuter Stressor-Wirkungen zweckmäßig sein könnten. Als Indikator für den Lernerfolg wurde getestet, ob Tiere auf eine Änderung der Kontingenz von Handlung und Ergebnis bzw. auf eine Wertänderung des Ergebnisses reagierten. Die Versuche ergaben folgende Resultate:

1. Der Kontingenzdegradationstest hatte sich aus methodischen Gründen als ungeeignet für Untersuchungen von Stressor-Wirkungen herausgestellt.
2. Der Unterlassungskontingenztest war potentiell geeignet, um akute Stressor-Wirkungen auf das Erlernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen zu messen.
3. Der Standard-Ergebnisdevaluationstest war geeignet, um akute Stressor-Wirkungen auf den Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen zu messen.

### 8.3 AKUTE STRESSOREN

In diesem Kapitel werden einige pharmakologische und physische Stressoren vorgestellt, die in der aktuellen Literatur an Ratten verwendet werden. Ihre Eignung für den Einsatz in instrumentellen Testaufgaben wurde in Vorexperimenten untersucht. Darüber hinaus wurden Möglichkeiten geprüft, mit welchen Pharmaka Stressor-Wirkungen blockiert werden können. Mit dem Einsatz solcher Pharmaka können neurochemische Mechanismen entdeckt werden, durch die akute Stressoren ihre Wirkungen vermitteln.

#### 8.3.1 EIGNUNGSPRÜFUNG DIVERSER STRESSOREN FÜR DEN EINSATZ IN INSTRUMENTELLEN TESTAUFGABEN

Es gibt vor allem zwei Möglichkeiten, um bei Ratten unter Laborbedingungen Stressreaktionen auszulösen. Die pharmakologische Methode besteht darin, bestimmte Wirkstoffe zu verabreichen, welche die Konzentration bestimmter Stresshormone beeinflussen und einen physischen Zustand des Organismus induzieren, welcher einer Stressreaktion ähnelt. Bei der physischen Methode wird eine Stressreaktion ausgelöst, indem ein Tier einer Situation ausgesetzt wird, die es als bedrohlich wahrnimmt.

*Pharmakologischer Stressor „Corticosteron/Yohimbin“.* Mithilfe der pharmakologischen Methode werden Wirkstoffe entweder systemisch in den gesamten Organismus oder lokal in ein spezifisches Gehirnareal verabreicht. Für die systemische Verabreichung wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus Corticosteron und Yohimbin gewählt. Beim Menschen erzeugten diese beiden Wirkstoffe in kombinierter Verabreichung inflexibles Handeln in einer instrumentellen Aufgabe (Shiflett et al., 2010b).

Die Wahl der Dosierung der Wirkstoffe für die Ratte (jeweils 3 mg/kg) beruht auf Studien, wonach 3 mg/kg Corticosteron die Erinnerung von Ratten beeinträchtigt (de Quervain et al., 1998; Roozendaal et al., 2004b) und 2,5 mg/kg Yohimbin ihre Lernleistung mindert (Packard und Wingard, 2004; Schwager et al., 2014). Zudem zeigten eigene Vorversuche, dass Corticosteron und Yohimbin in den hier verwendeten Dosierungen keine negativen Nebeneffekte hervorriefen, wie z.B. Sedierung der Tiere. Weitere eigene Vorversuche ergaben, dass eine höhere Dosierung (jeweils 5 mg/kg) sedative Nebeneffekte induzierte. Insgesamt sprechen diese Messungen dafür, dass die hier verwendeten Dosen von je

3 mg/kg adäquat gewählt waren, um die Wirkung von Corticosteron/ Yohimbin auf instrumentelles Handeln zu untersuchen.

Der Applikationszeitpunkt ist ebenfalls ein entscheidender Parameter, welcher die Wirksamkeit der Wirkstoffe auf instrumentelle Handlungen bestimmt. Er wurde in meinen Messungen auf 30 min vor Testbeginn festgelegt. Denn 30 min nach Applikation ist die Yohimbin-induzierte Noradrenalin Freisetzung im Hippocampus maximal (Abercrombie et al 1988) und die Corticosteron-induzierte Dopamin-Ausschüttung im PFC und Nucleus accumbens ebenfalls (Imperato et al., 1991).

Ein Vorversuch bestätigte, dass die systemische Verabreichung von Corticosteron/ Yohimbin (je 3 mg/kg) 30 min vor Testbeginn sich für die Anwendung in einer instrumentellen Aufgabe eignete.

*Pharmakologischer Stressor „RU28362“.* Um die Wirkung von Stresshormonen im Gehirn zu untersuchen, wurde in weiterführenden Voruntersuchungen der hochaffine GR-Agonist RU28362 lokal appliziert (Teutsch et al., 1981; Roozendaal et al., 2004b). Als Zielregion wurde der PL, d.h. der dorsale Bereich des mPFC, ausgewählt. Der PL spielt eine wichtige Rolle beim Erlernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen (Ostlund und Balleine, 2005). Des Weiteren sind GR im PL in großer Anzahl exprimiert (Butts et al., 2011), sodass die bei einer Stress-Reaktion ausgeschütteten Stresshormone dort eine erhebliche Wirkung entfalten. Werden dagegen die GR im PL blockiert, so verringern sich sowohl Stress-induzierte kognitive Beeinträchtigungen als auch die Stress-bedingt erhöhte Dopamin Ausschüttung im PL (Butts et al., 2011). Der PL hat demzufolge nicht nur eine Schlüsselrolle beim Erlernen von instrumentellen Handlungen, sondern ist auch zentraler Wirkungsort für Stresshormone und damit eine optimale Zielstruktur für Stress-Untersuchungen in instrumentellen Handlungen. Dosis und Applikationszeitpunkt wurden anhand einer Literaturrecherche festgelegt. Sie ergab, dass 10 ng RU28362 pro Hemisphäre eine Stunde vor Testbeginn verabreicht, zu messbaren Effekten bei kognitiven Leistungen führen sollte (Barsegyan et al., 2010).

Die Anwendbarkeit einer lokalen Applikation von RU28362 in einer instrumentellen Testaufgabe wurde in Vorexperimenten überprüft, welche zeigten, dass diese Verabreichungsmethode erfolgreich in instrumentellen Aufgaben eingesetzt werden konnte.

*Physischer Stressor „Wasser“.* In weiteren Vorversuchen wurden eine Reihe verschiedener physischer Stressoren auf ihre Anwendbarkeit in instrumentellen Testaufgaben getestet. Per Definition wird ein physischer Stressor durch die Merkmale Unvorhersehbarkeit und Unkontrollierbarkeit charakterisiert (Koolhaas et al., 2011). Diese beiden Anforderungen erfüllt der Stressor Wasser, ein häufig verwendeter physischer Stressor (Liu et al., 2007; Linthorst et al., 2008). Hierbei wird eine Ratte unerwartet für 10 Minuten in ein wassergefülltes Gefäß (24 cm Durchmesser, 24°C Wassertemperatur) gesetzt, aus welchem sie weder entkommen kann, noch den Boden des Gefäßes berühren kann. Die Anwendung des Stressors Wasser induziert Furchtverhalten bei Ratten in einem Test im Pluslabyrinth, d.h. die Tiere meiden die offenen ungeschützten Arme des Labyrinths (Liu et al., 2007). Als Zeitpunkt für die Stressor-Exposition in instrumentellen Testaufgaben wurde 30 Minuten vor Testbeginn gewählt, da die Corticosteron Werte im Blutplasma 30 min nach Beendigung der Stressor-Exposition ihr Maximum erreichen (Rittenhouse et al., 2002).

Die Einsetzbarkeit des Stressors Wasser in einer instrumentellen Testaufgabe wurde in einem Vorversuch geprüft. Allerdings stellte sich bei der Versuchsdurchführung heraus, dass die Tiere nach dem Aufenthalt im Wasser die Hebel in der SKINNER-Box nicht betätigten, sondern Fellpflege betrieben. Auch Wärmen und Trocknen der Tiere unter einer Rotlichtlampe für 30 Minuten änderte dies nicht. Folglich war der Stressor Wasser für die Untersuchung von Stressor-Effekten auf instrumentelles Handeln nicht geeignet.

*Physischer Stressor „Plattform“.* Eine weitere Möglichkeit physischen Stress auszulösen besteht darin, ein Tier in seiner Bewegungsfreiheit einzuschränken. Dies wird realisiert, indem die Ratte entweder auf eine kleine, erhöhte Plattform gesetzt wird (Wong et al., 2007; Howland und Cazakoff, 2010) oder indem sie in eine enge Röhre eingebracht wird (Reis et al., 2011; Shafiei et al., 2012). Ratten, die dem Stressor Plattform 30 Minuten lang ausgesetzt wurden, haben danach Probleme beim Abruf von räumlichen Gedächtnisinhalten im Wasserlabyrinth (Wong et al., 2007). Ebenso sind Ratten durch den Stressor Plattform beim Abruf von Langzeiterinnerungen in Schockvermeidungsaufgaben beeinträchtigt (Sardari et al., 2014).

Der Zeitpunkt der Stressor-Exposition in instrumentellen Aufgaben wurde so gewählt, dass die Corticosteron-Werte im Blut während des Tests erhöht waren, nämlich direkt nach dem



30-minütigen Aufenthalt auf der Plattform (Wong et al., 2007). Der Stressor Plattform erhöht den Corticosteron-Spiegel signifikant (Wong et al., 2007; Yuen et al., 2009).

Aus einem Vorversuch ging hervor, dass der Stressor Plattform geeignet war, um in instrumentellen Testaufgaben eingesetzt zu werden.

*Physischer Stressor „Röhre“.* Der Stressor Röhre umfasst die Immobilisierung eines Tiers eine Stunde lang in einer engen Röhre. Der Stressor Röhre erzeugt bei Ratten Furchtverhalten im Pluslabyrinth, d.h. sie betreten die offenen Arme des Labyrinths nur selten (Heinrichs et al., 1994; Gameiro et al., 2006). Außerdem verändert der Stressor Röhre das „Hebeldruckverhalten“ von Ratten in einer instrumentellen Testaufgabe, welche kostenabhängige Entscheidungen erfordert (Shafiei et al., 2012).

Der Zeitpunkt der Stressor-Exposition in instrumentellen Testaufgaben wurde so gewählt, dass die erzeugte Zunahme der Corticosteron-Werte während des anschließenden Tests ihr Maximum hatte. Der Plasma-Corticosteron-Spiegel erreicht bei Ratten nach einer Stunde in der Röhre sein Maximum und führt zu Änderungen bei der Entscheidungsfindung (Shafiei et al., 2012). Aufgrund dieser Vorkenntnisse und der eigenen Plasma-Corticosteron-Messung wurden die Tiere direkt im Anschluss an die Stressor-Verabreichung getestet. Die Corticosteron Konzentration ist dann um das 6-Fache auf 650 ng/ml erhöht (Braun und Hauber, 2013), ähnlich wie in anderen Studien (400-900 ng/ml: Keim und Sigg, 1976), (400-900 ng/ml: Ulrich-Lai et al., 2010). Somit ist davon auszugehen, dass die Stressor-Exposition zeitlich adäquat in die Testaufgabe eingebunden wurde.

In Vorexperimenten wurde der Stressor Röhre auf seine Anwendbarkeit in instrumentellen Testaufgaben untersucht und erwies sich als geeignet.

*Physischer kombinierter Stressor.* Eine Möglichkeit die Wirkung von Stressoren zu verstärken ist, sie zu kombinieren. Deshalb wurde auch eine Kombination der beiden bereits einzeln getesteten Immobilisierungs-Stressoren Plattform und Röhre eingesetzt.

Ein weiteres Mittel die Effektivität von akuten Immobilisierungsstressoren zu verstärken ist sie während der Aktivitätsphase der Tiere zu verabreichen. Denn in der Aktivitätsphase (bei der Ratte: Dunkelphase) sind die physischen Effekte und die Verhaltens-Effekte von Immobilisierungsstressoren stärker ausgeprägt als in der Ruhephase (bei der Ratte: Lichtphase) (Perez-Cruz et al., 2009). Aus ökologischer Sicht ist dies durchaus

nachvollziehbar, da sich die Wanderratte während ihrer Ruhephase in engen Höhlensystemen versteckt und nur sehr eingeschränkt bewegt (Koolhaas et al., 2011). Somit erzeugt eine Immobilisierung während ihrer Aktivitätsphase mehr Stress als während ihrer Ruhephase. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der kombinierte Stressor während der Aktivitätsphase (Dunkelphase) verabreicht.

Die physische Wirkung dieses kombinierten Stressors wurde über die Analyse von Corticosteron im Blutplasma nachgewiesen. Hierbei ergaben die Messungen, dass die Corticosteron-Konzentration im Blutplasma nach Stressor-Exposition um das 5-Fache, auf 510 ng/ml, gegenüber dem Initialwert erhöht war (Braun und Hauber, 2013). Dieser Wert war vergleichbar mit Werten, die nach Exposition typischer einfacher, d.h. nicht kombinierter, Immobilisierungsstressoren gemessen wurden (Plattform-Stress: 550 ng/ml, Röhre: 450 ng/ml; Yuen et al., 2009). Daraus ließ sich schließen, dass der kombinierte Stressor die HPA-Achse aktivierte.

Tiere, die dem kombinierten Stressor unterzogen wurden, wurden direkt im Anschluss an die Stressor-Exposition getestet. Denn zu diesem Zeitpunkt zeigten gestresste Tiere veränderte Hebeldruckraten (Pielock et al., 2013).

Der kombinierte Stressor hatte sich in Vorversuchen als geeignet für den Einsatz in instrumentellen Testaufgaben erwiesen.

Zusammenfassend ergaben die Vorversuche, dass der Stressor Wasser für die Anwendung in einer instrumentellen Testaufgabe ungeeignet war. Hingegen waren die beiden vorgestellten pharmakologischen Stressoren, sowie die Stressoren Plattform, Röhre und deren Kombination geeignet und wurden für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche in instrumentellen Testaufgaben eingesetzt.

### 8.3.2 MÖGLICHKEITEN ZUR PHARMAKOLOGISCHEN BLOCKADE VON STRESSOR-WIRKUNGEN

In diesem Kapitel wird auf potentielle pharmakologische Wirkstoffe eingegangen, welche die Wirkungen der genannten akuten Stressoren auf Lernleistungen in instrumentellen Testaufgaben blockieren könnten. Auf diese Weise könnte man Hinweise darauf erhalten, über welche Rezeptoren ein akuter Stressor, wie Immobilisierung, seine Wirkungen vermittelt. So wie beispielsweise durch Kokain-Entzug induziertes Furchtverhalten durch die Blockade von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren in der Amygdala mittels Betaxolol vermindert wird. D.h.

$\beta_1$ - Adrenozeptoren in der Amygdala vermittelten das unter Kokainentzug auftretende Furchtverhalten (Rudoy und Van Bockstaele, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Substanzen aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen überprüft: Betaxolol, ein  $\beta_1$ - Adrenozeptor Antagonist, und Diazepam, ein Anxiolytikum.

Der Einsatz dieser beiden Substanzen soll Aufschluss darüber geben, ob die in dieser Arbeit gemessenen Stress-bedingten kognitiven Beeinträchtigungen durch  $\beta_1$ -Adrenozeptoren vermittelt werden oder durch Furcht verursacht werden.

*Betaxolol.*  $\beta$ -Rezeptoren sind wichtige Vermittler von Stressor-Effekten auf kognitive Leistungen; beispielsweise bewirkt bei gestressten Mäusen eine spezifische Blockade der  $\beta_1$ -Rezeptoren durch Betaxolol die Wiederherstellung kognitiver Funktionen (Stone et al., 1996). Ebenso verbessert Betaxolol kognitive Leistungen bei unbehandelten Ratten und Affen (Ramos et al., 2005). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der  $\beta_1$ -Adrenozeptor Antagonist Betaxolol eingesetzt, um Stressor-Wirkungen zu blockieren.

Für die Wahl einer geeigneten Dosis wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Sie ergab, dass 5 mg/kg Betaxolol bei Ratten kognitive Leistungen im Plus-Labyrinth verbesserten (Rudoy und Van Bockstaele, 2007). Außerdem ergaben eigene Vorversuche, dass diese Dosis keine motorischen Beeinträchtigungen bei Ratten erzeugte. In einem weiteren Vorversuch wurde 5 mg/kg Betaxolol auf seine Anwendbarkeit in instrumentellen Testaufgaben untersucht und als dafür geeignet befunden.

*Diazepam.* Stressoren lösen mitunter Furcht aus und beeinflussen dadurch kognitive Funktionen (McEwen et al., 2012). Durch Stress ausgelöste Furcht und Beeinträchtigungen kognitiver Leistungen können deshalb auch durch das Anxiolytikum Diazepam blockiert werden. Diazepam hat in geringer Dosis (weniger als 3 mg/kg) anxiolytische Effekte bei der Ratte (Kalman et al., 1997). Außerdem bewirkt eine höhere Dosis Diazepam (5-10 mg/kg), dass ein stressbedingt erhöhter Plasma-Corticosteron-Spiegel wieder abnimmt (Keim und Sigg, 1977).

Um eine geeignete Dosis für den Einsatz von Diazepam in instrumentellen Testaufgaben zu identifizieren, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Diese ergab, dass 1,25 mg/kg, 5 mg/kg und 10 mg/kg Diazepam anxiolytisch wirksam waren und kognitive Leistungen verbesserten, wobei mit zunehmender Dosis die Wirksamkeit von Diazepam abnahm

(Stephens und Voet, 1994). Aufgrund dieser Kenntnisse wurde für die hier durchgeführten Versuche 1 mg/kg und 2 mg/kg Diazepam gewählt. In diesen Dosen (1 mg/kg und 2 mg/kg, intraperitoneal) sind keine Nebeneffekte von Diazepam auf instrumentelles Handeln bekannt (George et al., 2009). Daher war anzunehmen, dass die gewählten Dosen geeignet waren, um in instrumentellen Testaufgaben messbare anxiolytische Effekte zu erzeugen. Vorversuche ergaben, dass entsprechend 1 mg/kg und 2 mg/kg Diazepam in instrumentellen Testaufgaben eingesetzt werden konnten.

### 8.3.3 FAZIT IDENTIFIKATION AKUTER STRESSOREN UND STRESSOR-ANTAGONISTEN

Der zweite Teil meiner Arbeit diente dazu akute pharmakologische und physische Stressoren zu prüfen, die sich für den Einsatz in instrumentellen Testaufgaben eignen. Außerdem wurden Möglichkeiten erprobt, um Stressor-Wirkungen pharmakologisch zu blockieren. Aus den Versuchsergebnissen ergaben sich folgende Resultate:

1. Der Stressor Wasser eignete sich nicht für den Einsatz in einer instrumentellen Testaufgabe, da er die Tiere motorisch beeinträchtigte.
2. Die beiden pharmakologischen Stressoren, die Stressoren Plattform und Röhre und deren Kombination waren geeignet für die Anwendung in einer instrumentellen Testaufgabe.
3. Für die Wirkstoffe Betaxolol und Diazepam wurden in Vorversuchen geeignete Dosierungen ermittelt. Sie können in instrumentellen Testaufgaben zur pharmakologischen Blockade von Stressor-Wirkungen eingesetzt werden.

### 8.4 STRESSOR-WIRKUNGEN IN INSTRUMENTELLEN TESTAUFGABEN UND MÖGLICHKEITEN DER PHARMAKOLOGISCHEN BLOCKADE

Entscheidend für die Art und Weise einer Stressor-Wirkung auf Lern- und Gedächtnisleistungen ist der Zeitpunkt der Darbietung. Eine Übersicht zu Stressor-Wirkungen auf Lern- und Gedächtnisleistungen beschreiben Schwabe und Kollegen (2012a) und Roozendaal (2002). Demnach gibt es drei relevante Zeitpunkte der Stressor-Darbietung: vor dem Lernen, nach dem Lernen und vor dem Abruf des Gelernten. Wird ein Individuum vor dem Lernen einem Stressor ausgesetzt, so werden Lern- und Konsolidierungsprozesse auf vielfältige Weise beeinflusst und die Erinnerung kann sowohl verbessert als auch

verschlechtert sein. Erfolgt die Stressor-Exposition nach dem Lernen, d.h. sind die Stressor-Wirkungen während der Konsolidierung präsent, so sind Konsolidierungsprozesse und die damit verknüpften Erinnerungsleistungen meist verstärkt. Dagegen beeinträchtigt die Darbietung eines Stressors während der Phase des Erinnerns das Abrufen von Erinnerungen. Im Folgenden werden die Ergebnisse meiner Messungen über Stressor-Effekte auf das Erlernen und den Abruf gelernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen diskutiert.

#### 8.4.1 STRESSOR-WIRKUNGEN AUF DAS *ERLERNEN* VON HANDLUNGS-ERGEBNIS-BEZIEHUNGEN

Für die Untersuchung von Stressor-Wirkungen auf das *Erlernen* von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen wurde der Unterlassungskontingenztest eingesetzt. Vorversuche mit dem Einsatz verschiedener Stressoren ergaben folgende Ergebnisse.

Die systemische Applikation von Yohimbin und Corticosteron führte nicht zu Beeinträchtigungen des Lernens im Unterlassungskontingenztest (Abbildung 7-3). Auch die Verabreichung des physischen kombinierten Stressors induzierte keine Lernbeeinträchtigungen (Abbildung 7-2). Diese Befunde waren überraschend, da Studien an Menschen nachwiesen, dass ein pharmakologischer oder ein physischer Stressor das Erlernen von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen beeinträchtigte (Schwabe und Wolf, 2009; Schwabe et al., 2010b, 2012b). Auch ein Folgeversuch, bei dem der GR Agonist RU28362 lokal in den prälimbischen mPFC appliziert wurde, bewirkte keine Veränderung der Lernleistung im Unterlassungskontingenztest (Abbildung 7-5).

Der ausbleibende Effekt der Stressoren auf die Lernleistung der Tiere kann vor allem drei Gründe haben. Erstens ist es möglich, dass die Testaufgabe zu einfach war, da im Unterlassungskontingenztest eine sehr markante Kontingenzänderung gelernt wird. Zweitens kann die Stressor-Intensität zu gering gewesen sein. Beispielsweise ist es möglich, dass sich Corticosteron oder RU28362 wegen ihrer Lipophilie nicht vollständig in der Vehikel-Lösung gelöst hatten, da sie große und lipophile Moleküle sind. D.h. die tatsächlich den Tieren verabreichte Dosis könnte zu gering gewesen sein. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Lösungen mithilfe eines Lösungsvermittlers so hergestellt wurden, wie vergleichbare Studien in der Literatur angeben (de Quervain et al., 1998; Roozendaal et al., 2004a; Roozendaal et al., 2004b; Barsegyan et al., 2010). Drittens könnte für die lokale Applikation die falsche Zielstruktur gewählt worden sein. Dagegen spricht jedoch, dass der PL eine hohe Dichte an GR aufweist (Butts et al., 2011) und eine wichtige Rolle bei der

Vermittlung von Stress-Effekten auf instrumentelle Handlungen einnimmt (Dias-Ferreira et al., 2009). Jedoch ist zu beachten, dass außer dem mPFC weitere Gehirnareale durch Stress beeinflusst werden, wie z. B. der Hippocampus oder die Amygdala (McEwen et al., 2012). Daher ist es möglich, dass die alleinige Aktivierung der GR im prälimbischen mPFC nicht genügt um solche Stress-Effekte auszulösen, deren Wirkungen auf das Erlernen instrumenteller Handlungen messbar waren.

Schlussendlich scheint der zutreffendste Grund für die fehlenden Auswirkungen der eingesetzten Stressoren in der Einfachheit des Kontingenztests zu liegen. Die in dieser instrumentellen Testaufgabe geforderte Lernleistung kann auch unter erheblichem Stress erbracht werden. Deshalb wurden in den weiteren Experimenten Stressor-Wirkungen auf den Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen getestet.

### 8.4.2 STRESSOR-WIRKUNGEN AUF DEN *ABRUF* VON HANDLUNGS-ERGEBNIS-BEZIEHUNGEN

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zu Stressor-Wirkungen auf den *Abruf* von erlernten Handlungs-Ergebnis-Beziehungen im Ergebnisdevaluationstest diskutiert.

Nach Applikation des pharmakologischen Stressors Corticosteron/ Yohimbin wurde ein selektiver Devaluationseffekt gemessen, d.h. der Abruf erlernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen war unter akutem pharmakologischem Stress nicht beeinträchtigt (Braun und Hauber, 2013). Dieses Ergebnis war überraschend, da aus anderen Studien bekannt war, dass kognitive Leistungen von Ratten durch Corticosteron und Yohimbin beeinträchtigt sind (Packard und Wingard, 2004; Roozendaal et al., 2004a). Auch die Verabreichung des physischen Stressors Röhre veränderte den Abruf erlernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen nicht (Braun und Hauber, 2013). Zwar war nach Stressor-Exposition die Corticosteron Konzentration im Blutplasma der Tiere signifikant erhöht, was für die Wirksamkeit des Stressors spricht, jedoch ist ein erhöhter Corticosteron-Wert allein kein zwingender Indikator für die Induktion kognitiver Beeinträchtigungen. Dies zeigte z.B. eine Studie von Woodson und Kollegen (2003), in der männliche Ratten nach Sichtkontakt zu einer weiblichen Ratte zwar erhöhte Blut-Corticosteron Werte hatten, ohne jedoch in ihrem räumlichen Erinnerungsvermögen beeinträchtigt zu sein. Hingegen hatten die Ratten nach Sichtkontakt zu einer Katze ebenfalls erhöhte Corticosteron Werte und zudem ein beeinträchtigt räumliches Erinnerungsvermögen.

Ein weiteres Experiment ergab, dass erst die Kombination der physischen Stressoren Plattform und Röhre den selektiven Devaluationseffekt blockierte (Braun und Hauber, 2013). Daraus geht hervor, dass der kombinierte Stressor Gedächtnisprobleme induzierte, d.h. den Abruf gelernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen beeinträchtigte. Überraschenderweise konnte diese Beeinträchtigung der Devaluationsdetektion nicht durch eine Verabreichung von Corticosteron/Yohimbin imitiert werden. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Shafiei und Kollegen (2012). In ihrer Studie waren Ratten nach einer Stunde akutem Immobilisierungsstress bei kostenabhängigen Entscheidungen beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung konnte nicht durch die Verabreichung des Stresshormones Corticosteron nachgeahmt werden, d.h. Ursache für die Beeinträchtigung war nicht allein eine erhöhte Corticosteron-Aktivität. Die Ergebnisse zeigten ähnlich wie die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass akuter Stress Belohnungs-gerichtetes Verhalten beeinträchtigte und dass dafür eine Erhöhung des Blut-Corticosteronspiegels nicht ausreichend war.

Die durch den kombinierten Stressor verursachte Beeinträchtigung beim Abruf von Wertänderungen war am zweiten Testtag stärker ausgeprägt als am ersten. Dieser sequenzielle Effekt des Detektionsdefizits könnte zum einen auf additiven Wirkungen beruhen, d.h. erst die zweifache Stressor-Exposition könnte die untersuchten Gedächtnisprozesse stören. Hinweise für solche additiven Wirkungen von Stressoren auf Gedächtnisleistungen fanden Cerqueira und Kollegen (2007) und Sousa und Almeida (2012). Ihre Arbeiten ergaben, dass durch akuten Stress verursachte Veränderungen in der Morphologie von Neuronen sowie Veränderungen der Gedächtnisleistung erst nach wiederholten Stressor-Expositionen auftreten.

Außerdem könnte eine mögliche Ursache für den sequenziellen Effekt eine zeitlich verzögerte Wirkung sein, d.h. neuronale Veränderungen, die am Testtag 1 nach Testende einsetzen, führen erst am Testtag 2 zu messbaren Wirkungen in der Gedächtnisleistung. Denn Corticosteron hat nicht nur rasche Wirkungen an Synapsen innerhalb von wenigen Minuten, indem es an membranständige MR bindet und die Ausschüttung von Glutamat verstärkt. Vielmehr aktiviert es auch GR und verändert nach wenigen Stunden die Genexpression (Karst et al., 2005; Joels und Baram, 2009).

Eine weitere mögliche verzögerte Wirkung der Stressor-Exposition könnte sein, dass durch die Stressor-Exposition an Testtag 1 die erneute Speicherung der Handlungs-Ergebnis-

Beziehung nach Testende beeinträchtigt wurde, sodass am Testtag 2 ihr Abruf beeinträchtigt war.

Um zu klären, ob additive oder zeitlich verzögerte Wirkungen für den hier gemessenen sequenziellen Effekt der Gedächtnisbeeinträchtigung ursächlich waren, sind noch weitere experimentelle Daten nötig. Ein potentiell klärendes Experiment könnte sein, eine Gruppe von Tieren nur am Testtag 1 dem Stressor zu unterziehen, die andere Tiergruppe ausschließlich am Testtag 2 und beide Gruppen am Testtag 2 zu untersuchen.

Die hier gemessenen Wirkungen des kombinierten Stressors auf den Abruf instrumenteller Handlungen von Ratten ähneln denen von chronischem Stress. So sind chronisch gestresste Tiere nicht sensitiv gegenüber Wertänderungen im Ergebnisdevaluationstest und handeln damit automatisiert (Dias-Ferreira et al., 2009). Dieses chronische Stressprotokoll besteht ähnlich wie der kombinierte Stressor aus einer Kombination unterschiedlicher Stressoren, jedoch mit dem Unterschied, dass die Stressoren über mehrere Tage (21 Tage) hinweg verabreicht werden.

Bei allen im Ergebnisdevaluationstest ermittelten Ergebnissen war auffallend, dass sowohl der pharmakologische als auch die beiden physischen Stressoren die allgemeine Hebeldruckaktivität der Tiere minderte, was sich im Vergleich mit den Kontrolltieren in reduzierten Hebeldruckraten zeigte. Die Abnahme der Hebeldruckraten war vor allem am zweiten Testtag stark ausgeprägt. Diese verminderte Hebeldruckaktivität könnte auf ein Defizit in der instrumentellen Performanz hindeuten, z.B. eine Stress-bedingte motorische Hemmung. Dafür spricht eine Studie von Shafiei und Kollegen (2012), die zeigte, dass Tiere in einer Entscheidungsaufgabe nach akutem physischem Stress die Handlungsoption mit geringerem Aufwand und weniger Futterbelohnung bevorzugten. D.h. der Stressor verlagerte die Aufwandsbeurteilung hin zur weniger anstrengenden Handlung, wodurch jedoch die langfristig zu erwartende Belohnungsmenge reduziert wurde. Diese zunächst nachteilig erscheinende Entscheidungs-Strategie führt hingegen zur Einsparung von Energiereserven, welche dann anderweitig zur Verfügung stehen. Somit könnte auch die vorliegende verringerte Hebeldruckaktivität auf das Einsparen von Energiereserven hindeuten, was allerdings anhand der Versuchsdaten nicht eindeutig belegt werden kann. Gegen ein Stress-bedingtes Performanz-Defizit spricht, dass der Ergebnisdevaluationstest ein zuverlässiges und robustes Verfahren ist, welches auch bei Tieren mit geringen



Hebeldruckraten einsetzbar ist (Yin et al., 2005a). Devaluations-Effekte können auch dann gemessen werden, wenn die basalen Hebeldruckraten eher gering sind wie in der vorliegenden Arbeit (Shiflett et al., 2010b). Schlussfolgernd ist hier nicht von einem Performanz-Defizit auszugehen, sondern vielmehr von einer Beeinträchtigung bei der Devaluationsdetektion.

Aus Studien am Menschen ist bekannt, dass moderater akuter physischer Stress den Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen im Ergebnisdevaluationstest beeinträchtigt (Schwabe und Wolf, 2010c). Diese Studie verwendet ein ähnliches Protokoll, wie hier an der Ratte eingesetzt wurde. Allerdings mit dem entscheidenden Unterschied, dass Training und Test beim Menschen an einem einzigen Tag innerhalb weniger Stunden stattfinden. Ratten hingegen werden in der Testaufgabe über mehrere Tage in vielen Sitzungen trainiert und danach getestet. Durch das intensive und sich wiederholende Training der Handlungs-Ergebnis-Beziehung über mehrere Tage ist diese möglicherweise so stark gelernt, dass sie im Extinktions-Test nach Exposition milder Stressoren bzw. Corticosteron/Yohimbin abgerufen werden kann, nicht jedoch nach intensiverem akutem Stress. Mit anderen Worten, das lang andauernde Training bei der Ratte bedingt möglicherweise die relativ geringe Stressor-Wirkung auf das Erinnerungsvermögen. Dafür spricht, dass bei Ratten der Abruf von gelernten Reaktionen, welche durch kurzes vorangegangenes Training erworben wurden, sehr sensitiv gegenüber einem milden Stressor ist. Beispielsweise sind Ratten nach milder Stressor-Exposition in Wasserlabyrinth-Aufgaben beeinträchtigt, die nur 12-18 Trainingssitzungen in 1-3 Tagen erfordern. Dabei ist der Abruf von räumlichen Erinnerungen beeinträchtigt, d.h. die Position einer nicht sichtbaren Plattform (de Quervain et al., 1998; Roozendaal et al., 2003; Diamond et al., 2006; Park et al., 2008). Folglich ist es durchaus möglich, dass auch im Tierexperiment ein akuter milder Stressor den Abruf von Gelerntem beeinträchtigt, wenn die Trainingsdauer und –intensität möglichst gering sind. Der Vergleich von Human- und Tierstudien macht deutlich, dass die hier untersuchten komplexen kognitiven Aufgaben von Menschen schneller gelernt werden als von Ratten. Daher reagieren Menschen in der Testaufgabe vermutlich sowohl beim Lernen als auch beim Abruf von Gelerntem sensitiver auf eine Stressor-Exposition und sind im Ergebnisdevaluationstest stärker beeinträchtigt als Ratten.

#### 8.4.3 BLOCKADE VON STRESSOR-WIRKUNGEN DURCH BETAXOLOL ODER DIAZEPAM

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob die Beeinträchtigung der Ratte bei der Devaluations-Detektion durch den kombinierten Stressor mit Hilfe von Betaxolol bzw. Diazepam blockiert werden kann. Betaxolol ist ein  $\beta_1$ -Adrenozeptor Antagonist und vermindert Stress-induzierte Beeinträchtigungen kognitiver Leistungen, insbesondere durch Blockade präfrontaler  $\beta_1$ -Rezeptoren (Ramos et al. 2005). Diazepam ist ein Anxiolytikum und mindert durch akuten Stress induzierte kognitive Beeinträchtigungen durch Aktivierung von GABA-Rezeptoren insbesondere in der Amygdala (Roozendaal et al., 2009b; Giachero et al., 2015).

Die Verabreichung von Betaxolol verbesserte die durch den kombinierten Stressor beeinträchtigte Devaluationsdetektion nur marginal (Daten nicht dargestellt). Dieser Effekt war nicht-signifikant. Das Ergebnis war überraschend, da eine Stress-mindernde Wirkung von Betaxolol bekannt ist, beispielsweise hat eine Studie an Mäusen nachgewiesen, dass Betaxolol die durch akuten physischen Stress bedingte Beeinträchtigung im Risikoverhalten blockierte (Stone et al., 1996). D.h. gestresste Tiere betraten schneller einen ihnen unbekanntes Raum als Kontrolltiere. Diese erhöhte Risikobereitschaft wurde durch Betaxolol vermindert, sodass gestresste Tiere nach Betaxolol-Verabreichung wieder fast genauso lange zögerten den unbekanntes Raum zu betreten wie Kontrolltiere.

Eine weitere Versuchsreihe ergab, dass Diazepam in den beiden vorgestellten Dosierungen ebenfalls nur eine sehr geringe Verbesserung der Stressor-bedingt beeinträchtigten Devaluationsdetektion bewirkte (Braun und Hauber, 2013). Dieses Ergebnis war ebenfalls entgegen der Erwartung, da Diazepam zumindest auf physischer Ebene Stress-mindernde Effekte hat, zum Beispiel senkt es den durch akuten Stress erhöhten Plasma-Corticosteron Spiegel (Keim und Sigg, 1977). Eine Stress-mindernde Wirkung von Diazepam auf die hier untersuchten Lern- und Gedächtnisleistungen konnte nicht festgestellt werden.

Die vorliegenden Daten sprachen dafür, dass weder die Aktivierung von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren noch Stress-bedingte Furcht für die durch den kombinierten Stressor induzierten Beeinträchtigungen beim Abruf von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen verantwortlich waren.

#### 8.4.4 FAZIT STRESSOR-WIRKUNGEN IN INSTRUMENTELLEN TESTAUFGABEN UND DEREN BLOCKADE

Der dritte Teil meiner Arbeit befasste sich mit akuten Stressor-Wirkungen auf instrumentelle Handlungen in Testaufgaben. Die Versuchsergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Es konnten keine Stressor-Wirkungen auf das *Erlernen* von Handlungs-Ergebnis-Beziehungen im Unterlassungskontingenztest gemessen werden. Vermutlich war diese Testaufgabe so einfach, dass die negative Kontingenzbeziehung auch nach Stressor-Einwirkung gelernt werden konnte.
2. Hingegen war der *Abruf* einer erlernten Handlungs-Ergebnis-Beziehung im Ergebnisdevaluationstest beeinträchtigt durch einen starken akuten Stressor, den kombinierten Stressor.
3. Die Verabreichung von Betaxolol bzw. Diazepam hatten keine Auswirkungen auf die Stressor-bedingte Beeinträchtigung beim Abruf einer erlernten Handlungs-Ergebnis-Beziehung. Somit sind weder  $\beta_1$ -Adrenozeptoren noch Stress-induzierte Furcht für die Vermittlung der hier gemessenen Stressor-Effekte verantwortlich.

#### 8.5 WELCHE NEURALEN SCHALTKREISE BEEINFLUSST DER KOMBINIERTER STRESSOR?

Abschließend ist noch die Frage offen, in welchen Gehirnarealen ein *akuter* Stressor seine Wirkungen entfaltet und damit instrumentelle Handlungen beeinträchtigt. Darüber ist allgemein noch wenig bekannt. Eine Studie von Dias-Ferreira und Kollegen (2009) gibt Aufschlüsse über die Wirkungsweise eines *chronischen* Stressors auf beteiligte Hirnstrukturen. Ein chronischer Stressor bewirkte die strukturelle Reorganisation jener corticostriatalen Schaltkreise, welche instrumentelles Handeln bei der Ratte steuern. Dabei nahm die neurale Vernetzung im DLS zu (Abbildung 8-5). Das DLS steuert zusammen mit dem sensomotorischen Cortex (SM), dessen neurale Dichte unverändert blieb, automatisierte Handlungen. Somit übernimmt das Gewohnheitssystem nach chronischer Stressor-Exposition mehr Einfluss über die Handlungssteuerung. Hingegen zeigten aktuelle Studien an Menschen, welche bildgebende Verfahren einsetzen, dass die neuronalen Korrelate des Gewohnheitssystems nach akuter Stressor-Exposition unverändert blieben (Schwabe und Wolf, 2013).

Des Weiteren zeigten Dias-Ferreira und Kollegen (2009), dass sich nach chronischer Stressor-Exposition die neurale Interaktion von PL und DMS verringerte, welche zielgerichtete Handlungen steuern (Abbildung 8-5). D.h. der Einfluss des zielgerichteten Systems auf die Handlungssteuerung war vermindert. Die eigenen vorliegenden Messungen gaben keine Hinweise darauf, dass ein akuter Stressor Funktionen des PL beeinträchtigt (Abbildung 7-5). Andere Gehirnareale wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, d.h. es ist durchaus möglich, dass der akute kombinierte Stressor ähnlich wie ein chronischer Stressor die Funktion des DMS und somit die Handlungssteuerung beeinträchtigte.

Beim Menschen konnten ebenfalls Stress-bedingte Änderungen der neuronalen Aktivität im Gehirn und Defizite bei der Steuerung zielgerichteter Handlungen gemessen werden (Schwabe und Wolf, 2013). Probanden, die einem *akuten* Stressor, nämlich der oralen Verabreichung von Yohimbin und Corticosteron, ausgesetzt waren, wiesen eine reduzierte neurale Aktivität im OFC und mPFC sowie Veränderungen bei der Steuerung zielgerichteter Handlungen auf. Allerdings geben Tierstudien keine Hinweise über eine Beteiligung des OFC an der Steuerung instrumenteller Handlungen (Ostlund und Balleine, 2007). Da widersprüchliche Studienergebnisse über den OFC vorliegen, lässt sich zurzeit nicht mit Sicherheit beantworten, ob er ein Wirkungsort des akuten kombinierten Stressors der vorliegenden Arbeit ist.

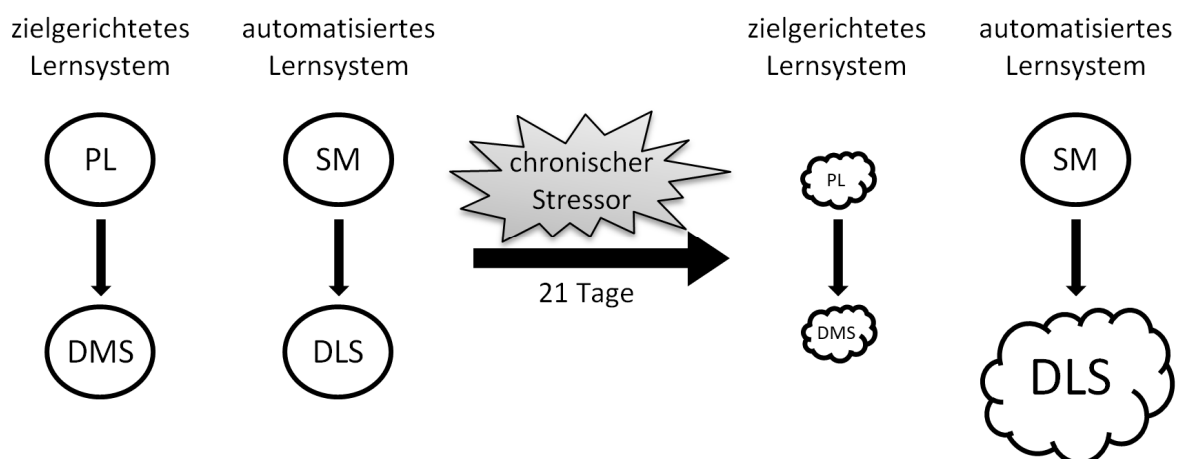


Abbildung 8-5: Vereinfachte Darstellung der neuronalen Korrelate des zielgerichteten Systems und des Gewohnheitssystems der Ratte. Nach chronischer Stressor-Exposition ist die neurale Interaktion von PL und DMS verringert, die von DLS und SM erhöht. Somit übernimmt das zielgerichtete System weniger Einfluss über die Handlungssteuerung, das Gewohnheitssystem hingegen mehr (vgl. Dias-Ferreira et al 2009). PL: Prälimbischer Teil des Präfrontalcortex, DMS: dorsomediales Striatum, SM: sensomotorischer Cortex, DLS: dorsolaterales Striatum.

Für das in dieser Arbeit durch den akuten kombinierten Stressor verursachte Defizit beim Abruf einer Handlungs-Ergebnis-Beziehung lässt sich vermuten, dass, ähnlich wie nach chronischer Stressor-Exposition, das zielgerichtete System weniger Einfluss über die Handlungssteuerung einnimmt und das Gewohnheitssystem mehr. Aus den erhobenen Daten lässt sich allerdings nicht ableiten, ob diese Stressor-induzierte Lernstörung durch eine verminderte Aktivität des DMS und/ oder eine erhöhte Aktivität des DLS bedingt wurde.

Ein Stressor verändert bei Mensch und Tier die neuronalen Korrelate, welche instrumentelles Handeln vermitteln, dahingehend, dass das zielgerichtete System weniger aktiv ist und somit das Gewohnheitssystem mehr Einfluss über die Handlungssteuerung einnimmt. Aus biologischer Sicht ist diese Stressor-bedingte Verlagerung hin zu automatisierten Handlungsstrategien zweckmäßig, da zielgerichtete Handlungen eine ständige Überwachung benötigen und große neurale Verarbeitungskapazitäten einfordern, wodurch das zielgerichtete System in vielen Situationen sehr ineffektiv wäre. Daher ist es vorteilhaft eine Handlung, wenn sie nach wiederholter Ausführung immer zum selben Ergebnis führt ohne dass Änderungen in der Handlungs-Ergebnis-Kontingenz oder dem Belohnungswert auftreten, zur Gewohnheit zu machen, bzw. sie automatisiert auszuführen. Einem gesunden Individuum ist es ohne weiteres möglich zwischen den beiden Lernsystemen umzuschalten bzw. in der jeweiligen Situation mit dem dafür geeigneten Lernsystem zu reagieren. Bei einem gestressten Individuum ist der schnelle Wechsel zur automatisierten Handlungsausführung ein Bewältigungsmechanismus, der dazu führt, dass gut trainierte Handlungen ausgeführt werden und zugleich kognitive Ressourcen zur Verarbeitung neuer Informationen bereitgestellt werden. Dies ist für die Anpassung eines Individuums an eine komplexe Umwelt von großer Bedeutung. Wenn jedoch die Handlungsstrategie an neue Bedingungen angepasst werden muss, um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen, so ist die Unfähigkeit eines gestressten Individuums zurück zur zielgerichteten Handlungsausführung zu wechseln von großem Nachteil (Dias-Ferreira et al., 2009). Eine solche stressbedingte Beeinträchtigung ist von großer Bedeutung beim Verstehen von psychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Zwangsneurosen, Suchterkrankungen oder der PTSD. Die PTSD wird durch ein traumatisches Ereignis, z.B. ein Gewaltverbrechen, ausgelöst. Der dabei extrem hohe durchlebte Stress führt vermutlich dazu, dass für die Speicherung und den Abruf des traumatischen Ereignisses maßgeblich das Gewohnheitssystem aktiviert wird und nicht das

zielgerichtete System. Die gebildeten impliziten Gedächtnisinhalte werden sehr langfristig gespeichert, sind inflexibel und schwer löschar. Daher bleiben die traumatischen Erinnerungen auch meist hartnäckig erhalten und eine starke emotionale Reaktion der Betroffenen kann bereits durch einen einzigen akustischen Stimulus, wie z.B. einen Pistolenschuss, hervorgerufen werden (Schwabe et al., 2010d).

### 8.6 SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie akuter Stress das Zusammenwirken von Lern- und Gedächtnissystemen im Gehirn beim Abruf gelernter Informationen verändert. Im Fokus stand das zielgerichtete System, welches das Erlernen von Handlungen und den damit verknüpften Ergebnissen, z.B. verschiedenen Futterbelohnungen, steuert. Dieses System vermittelt auch das Speichern und Abrufen solcher Informationen. Das zielgerichtete System ist zu Beginn eines Lernvorgangs stark aktiv. Nach häufiger Wiederholung einer Handlung unter gleichbleibenden Bedingungen übernimmt zunehmend das Gewohnheitssystem die Handlungssteuerung. Die Handlung wird dann automatisiert und inflexibel ausgeführt, wodurch kognitive Ressourcen für andere aufmerksamkeitsfordernde Prozesse verfügbar sind. Dies ist beispielsweise bei einem routinierten Autofahrer der Fall, der das Fahrzeug automatisiert steuert, d.h. ohne aktiv darüber nachzudenken, zugleich aktuelle Vorkommnisse im Straßenverkehr wahrnimmt und zielgerichtet auf sie reagiert.

Aus aktuellen Studien an Menschen ist bekannt, dass akuter Stress instrumentelles Handeln beeinflusst. So handeln Menschen unter akutem Stress nicht mehr zielgerichtet, sondern automatisiert und inflexibel; d.h. das Gewohnheitssystem hat dann die Handlungssteuerung übernommen. Demnach sind die beteiligten Lern- und Gedächtnissysteme des Menschen Stress-sensitiv.

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit ging hervor, dass akuter Stress bei Ratten eine automatisierte und inflexible Handlungssteuerung bewirkte, vermutlich weil der Abruf der vorher gelernten Handlungs-Ergebnis-Beziehungen beeinträchtigt war. Weiterhin zeigten die Daten, dass nur eher starke akute Stressoren instrumentelles Handeln veränderten, nicht jedoch moderate akute Stressoren. Daraus ließ sich schließen, dass die an der Handlungssteuerung beteiligten Lern- und Gedächtnissysteme der Ratte durch akute Stressoren beeinflusst werden. Anders als beim Menschen waren allerdings nur stärkere

Stressoren effektiv. Grund dafür ist möglicherweise, dass Ratten sehr viel länger als Menschen in der Testaufgabe trainiert werden müssen, was offenbar mit einer reduzierten Stress-Empfindlichkeit einhergeht. Aus weitergehenden Untersuchungen ging hervor, dass diese Stressor-Effekte nicht durch  $\beta$ 1-Adrenozeptoren vermittelt wurden und auch nicht auf Furcht-induzierten Diazepam-sensitiven Wirkungen beruhten. Auch eine Aktivierung präfrontaler GR schien nicht an der Vermittlung der beobachteten Stress-Effekte beteiligt zu sein. Die vorliegende Arbeit gibt daher keine Hinweise auf die beteiligten neuronalen bzw. neurochemischen Substrate, welche den Stressor-Effekten zugrunde liegen. Möglicherweise spielt hierbei eine Dysfunktion des DMS oder eine Hyperfunktion des DLS eine Rolle, sowie eine verstärkte Noradrenalin-Freisetzung, z.B. im PFC.

Die vorliegenden Daten zeigten erstmals, dass manche Formen von akutem Stress den Abruf erlernter instrumenteller Handlungen bei der Ratte auf ähnliche Weise beeinträchtigten wie beim Menschen. Allerdings bestehen auch Diskrepanzen; so handelten Ratten nach kombinierter systemischer Corticosteroid-/ Noradrenalin-Rezeptoraktivierung, anders als Menschen, flexibel. Nicht auszuschließen ist, dass die neurochemischen Mechanismen, die den Stressor-Wirkungen zugrunde liegen, bei Mensch und Ratte möglicherweise nicht vollkommen identisch sind. Insgesamt geben die Daten neue Hinweise darauf, dass akute Stressoren das Erinnerungsvermögen von Menschen und Tieren verändern.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abercrombie ED, Keller RW, Jr., Zigmond MJ (1988) Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience* 27:897-904.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357-381.
- Arnsten AF (2009) Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci* 10:410-422.
- Balleine BW, Dickinson A (1998) Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* 37:407-419.
- Balleine BW, Killcross S (2006) Parallel incentive processing: an integrated view of amygdala function. *Trends Neurosci* 29:272-279.
- Balleine BW, Ostlund SB (2007) Still at the choice-point: action selection and initiation in instrumental conditioning. *Ann N Y Acad Sci* 1104:147-171.
- Balleine BW, O'Doherty JP (2010) Human and rodent homologues in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35:48-69.
- Balleine BW, Liljeholm M, Ostlund SB (2009) The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav Brain Res* 199:43-52.
- Bardeleben U, Holsboer F (1989) Cortisol response to a combined dexamethasone-human corticotrophin-releasing hormone challenge in patients with depression. *J Neuroendocrinol* 1:485-488.
- Barsegyan A, Mackenzie SM, Kurose BD, McGaugh JL, Roozendaal B (2010) Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16655-16660.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2007) *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*, 3rd Edition. Heidelberg: Springer Spektrum.
- 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.
- Braun S, Hauber W (2012) Striatal dopamine depletion in rats produces variable effects on contingency detection: task-related influences. *Eur J Neurosci* 35:486-495.
- Braun S, Hauber W (2013) Acute stressor effects on goal-directed action in rats. *Learn Mem* 20:700-709.
- Broca P (1878) Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série des mammifères. *Revue d'Anthropologie* 21:384-498.
- Butts KA, Weinberg J, Young AH, Phillips AG (2011) Glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex regulate stress-evoked dopamine efflux and aspects of executive function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18459-18464.
- Cannon WB (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9:399-431.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26:321-352.



- Carlson NR (2007) *Physiology of behavior*, 9th Edition. Boston, MA, USA: Pearson Education, Inc.
- Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA (2002) Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience* 112:13-21.
- Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27:2781-2787.
- Colwill RM, Rescorla RA (1990) Evidence for the hierarchical structure of instrumental learning. *Anim Learn Behav* 18:71-82.
- Colwill RM, Delamater BA (1995) An associative analysis of instrumental biconditional discrimination learning. *Anim Learn Behav* 23:218-233.
- Corbit LH, Balleine BW (2003) The role of prelimbic cortex in instrumental conditioning. *Behav Brain Res* 146:145-157.
- Corbit LH, Ostlund SB, Balleine BW (2002) Sensitivity to instrumental contingency degradation is mediated by the entorhinal cortex and its efferents via the dorsal hippocampus. *J Neurosci* 22:10976-10984.
- 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.
- Coutureau E, Esclassan F, Di Scala G, Marchand AR (2012) The Role of the Rat Medial Prefrontal Cortex in Adapting to Changes in Instrumental Contingency. *PLoS One* 7:e33302.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 14:1143-1152.
- de Kloet ER (2004) Hormones and the stressed brain. *Ann N Y Acad Sci* 1018:1-15.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.
- de Kloet ER, Karst H, Joels M (2008a) Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* 29:268-272.
- de Kloet ER, de Jong IE, Oitzl MS (2008b) Neuropharmacology of glucocorticoids: focus on emotion, cognition and cocaine. *Eur J Pharmacol* 585:473-482.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL (1998) Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394:787-790.
- de Quervain DJ, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B (2009) Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30:358-370.
- Dezfouli A, Lingawi NW, Balleine BW (2014) Habits as action sequences: hierarchical action control and changes in outcome value. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369.
- Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Woodson JC, Conrad CD, Bachstetter AD, Mervis RF (2006) Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis. *Hippocampus* 16:571-576.
- Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM, Sousa N (2009) Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 325:621-625.
- Dickinson A (1998) Omission Learning after Instrumental Pretraining. *Q J Exp Psychol B* 51:271-286.
- Dickinson A, Balleine B (1994) Motivational control of goal-directed action. *Anim Learn Behav* 22:1-18.

- Domjan M (2003) The principles of learning and behavior, 5th Edition. Belmont, CA, USA: Wadsworth/ Thomson Learning.
- Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED (1995) Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience* 64:619-628.
- Gameiro GH, Gameiro PH, Andrade Ada S, Pereira LF, Arthuri MT, Marcondes FK, Veiga MC (2006) Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav* 87:643-649.
- George SA, Hutson PH, Stephens DN (2009) Differential effects of MPEP and diazepam in tests of conditioned emotional response and Pavlovian-to-instrumental transfer suggests 'anxiolytic' effects are mediated by different mechanisms. *Psychopharmacology* 204:499-509.
- George SA, Rodriguez-Santiago M, Riley J, Abelson JL, Floresco SB, Liberzon I (2015) Alterations in cognitive flexibility in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Behav Brain Res* 286:256-264.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15:285-320.
- Giachero M, Calfa GD, Molina VA (2015) Hippocampal dendritic spines remodeling and fear memory are modulated by GABAergic signaling within the basolateral amygdala complex. *Hippocampus* 25:545-555.
- Goldstein DS, Kopin IJ (2007) Evolution of concepts of stress. *Stress* 10:109-120.
- Goodall G, Mackintosh NJ (1987) Analysis of the pavlovian properties of signals for punishment. *Q J Exp Psychol B* 39:1-21.
- Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359-387.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol* 350:299-309.
- Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat* 26:317-330.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801-806.
- Hammond LJ (1980) The effect of contingency upon the appetitive conditioning of free-operant behavior. *J Exp Anal Behav* 34:297-304.
- Hanser H, Scholtyssek C, Ludolph A, Pickenhain, Reichert H, Spitzer M (2000) *Lexikon der Neurowissenschaft*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Hart G, Leung BK, Balleine BW (2014) Dorsal and ventral streams: the distinct role of striatal subregions in the acquisition and performance of goal-directed actions. *Neurobiol Learn Mem* 108:104-118.
- Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Baldwin HA, Rassnick S, Britton KT, Koob GF (1994) Anti-stress action of a corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. *Neuropsychopharmacology* 11:179-186.
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84.
- Holmes NM, Marchand AR, Coutureau E (2010) Pavlovian to instrumental transfer: a neurobehavioural perspective. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1277-1295.
- Howland JG, Cazakoff BN (2010) Effects of acute stress and GluN2B-containing NMDA receptor antagonism on object and object-place recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 93:261-267.

- Hull CL (1930) Knowledge and purpose as habit mechanisms. *Psychological Review* 37:511-525.
- Hyman SE (2009) How adversity gets under the skin. *Nat Neurosci* 12:241-243.
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703.
- Imperato A, Puglisi-Allegra S, Casolini P, Angelucci L (1991) Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res* 538:111-117.
- Joel D, Weiner I (1994) The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. *Neuroscience* 63:363-379.
- Joel D, Weiner I (2000) The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience* 96:451-474.
- Joels M, Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10:459-466.
- Joels M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ (2006) Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* 10:152-158.
- Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. *Curr Opin Neurobiol* 9:223-227.
- Kalman BA, Kim PJ, Cole MA, Chi MS, Spencer RL (1997) Diazepam attenuation of restraint stress-induced corticosterone levels is enhanced by prior exposure to repeated restraint. *Psychoneuroendocrinology* 22:349-360.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jesell TM (1996) *Neurowissenschaften: Eine Einführung*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19204-19207.
- Keim KL, Sigg EB (1976) Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 4:289-297.
- Keim KL, Sigg EB (1977) Plasma corticosterone and brain catecholamines in stress: effect of psychotropic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 6:79-85.
- Killcross AS, Everitt BJ, Robins TW (1997) Symmetrical effects of amphetamine and alpha-flupenthixol on conditioned punishment and conditioned reinforcement: contrasts with midazolam. *Psychopharmacology (Berl)* 129:141-152.
- Killcross S, Coutureau E (2003) Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cerebral cortex* 13:400-408.
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3:453-462.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:69-72.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E (2011) Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1291-1301.
- Kreitzer AC (2009) Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:127-147.
- LaLumiere RT, Kalivas PW (2008) Glutamate release in the nucleus accumbens core is necessary for heroin seeking. *J Neurosci* 28:3170-3177.

- Lex B, Hauber W (2010a) The role of dopamine in the prelimbic cortex and the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Cereb Cortex* 20:873-883.
- Lex B, Hauber W (2010b) The role of nucleus accumbens dopamine in outcome encoding in instrumental and Pavlovian conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 93:283-290.
- Lex B, Hauber W (2010c) Disconnection of the entorhinal cortex and dorsomedial striatum impairs the sensitivity to instrumental contingency degradation. *Neuropsychopharmacology* 35:1788-1796.
- Liljeholm M, O'Doherty JP (2012) Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends Cogn Sci* 16:467-475.
- Linder H, Knodel H, Bayrhuber H, Hauber W, Kull U (2010) *Linder Biologie*, 23rd Edition. Braunschweig: Schroedel.
- Linthorst AC, Flachskamm C, Reul JM (2008) Water temperature determines neurochemical and behavioural responses to forced swim stress: an in vivo microdialysis and biotelemetry study in rats. *Stress* 11:88-100.
- Liu J, Garza JC, Truong HV, Henschel J, Zhang W, Lu XY (2007) The melanocortinergic pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. *Endocrinology* 148:5531-5540.
- Lynd-Balta E, Haber SN (1994a) Primate striatonigral projections: a comparison of the sensorimotor-related striatum and the ventral striatum. *J Comp Neurol* 345:562-578.
- Lynd-Balta E, Haber SN (1994b) The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience* 59:625-640.
- MacLean PD (1949) Psychosomatic Disease and the "Visceral Brain": Recent Developments Bearing on the Papez Theory of Emotion. *Psychosom Med* 11:338-353.
- Mai B, Sommer S, Hauber W (2012) Motivational states influence effort-based decision making in rats: the role of dopamine in the nucleus accumbens. *Cogn Affect Behav Neurosci* 12:74-84.
- Mazur JE (2006) *Lernen und Verhalten*, 6th Edition. München: Pearson Studium.
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840:33-44.
- McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM (2012) Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62:3-12.
- McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- McNaughton BL, Battaglia FP, Jensen O, Moser EI, Moser MB (2006) Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat Rev Neurosci* 7:663-678.
- Meyer JS, Quenzer LF (2005) *Psychopharmacology: Drugs, the brain and behavior*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Mikics E, Barsy B, Barsvari B, Haller J (2005) Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Horm Behav* 48:152-162.
- Morgado P, Silva M, Sousa N, Cerqueira JJ (2012) Stress Transiently Affects Pavlovian-to-Instrumental Transfer. *Front Neurosci* 6:93.
- Morris LS, Kundu P, Dowell N, Mechelmans DJ, Favre P, Irvine MA, Robbins TW, Daw N, Bullmore ET, Harrison NA, Voon V (2016) Fronto-striatal organization: Defining functional and microstructural substrates of behavioural flexibility. *Cortex* 74:118-133.

- 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.
- Muth B (2012) Etablierung eines instrumentellen Lernparadigmas zur Untersuchung akuter Stresswirkungen an der Ratte. In: Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Abteilung Tierphysiologie: Universität Stuttgart.
- Nelson RJ (2005) An introduction to behavioral endocrinology, 3rd ed. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- Ostlund SB, Balleine BW (2005) Lesions of medial prefrontal cortex disrupt the acquisition but not the expression of goal-directed learning. *J Neurosci* 25:7763-7770.
- Ostlund SB, Balleine BW (2007) Orbitofrontal cortex mediates outcome encoding in Pavlovian but not instrumental conditioning. *J Neurosci* 27:4819-4825.
- Ostlund SB, Balleine BW (2008) Differential involvement of the basolateral amygdala and mediodorsal thalamus in instrumental action selection. *J Neurosci* 28:4398-4405.
- Packard MG, Wingard JC (2004) Amygdala and "emotional" modulation of the relative use of multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem* 82:243-252.
- Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion. *Archives of Neurology & Psychiatry* 38:725-743.
- Park CR, Zoladz PR, Conrad CD, Fleshner M, Diamond DM (2008) Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus-dependent memory in male and female rats. *Learn Mem* 15:271-280.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th Edition. San Diego: Academic Press.
- Perez-Cruz C, Simon M, Czeh B, Flugge G, Fuchs E (2009) Hemispheric differences in basilar dendrites and spines of pyramidal neurons in the rat prelimbic cortex: activity- and stress-induced changes. *Eur J Neurosci* 29:738-747.
- Pielock SM, Braun S, Hauber W (2013) The effects of acute stress on Pavlovian-instrumental transfer in rats. *Cogn Affect Behav Neurosci* 13:174-185.
- Ramos BP, Colgan L, Nou E, Ovadia S, Wilson SR, Arnsten AF (2005) The beta-1 adrenergic antagonist, betaxolol, improves working memory performance in rats and monkeys. *Biol Psychiatry* 58:894-900.
- Reinius B, Blunder M, Brett FM, Eriksson A, Patra K, Jonsson J, Jazin E, Kullander K (2015) Conditional targeting of medium spiny neurons in the striatal matrix. *Front Behav Neurosci* 9:71.
- Reis DG, Scopinho AA, Guimaraes FS, Correa FM, Resstel LB (2011) Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. *PLoS One* 6:e23171.
- Rescorla RA, Solomon RL (1967) Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychol Rev* 74:151-182.
- Rittenhouse PA, Lopez-Rubalcava C, Stanwood GD, Lucki I (2002) Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology* 27:303-318.
- Roosendaal B (2000) Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25:213-238.
- Roosendaal B (2002) Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 78:578-595.

- Roozendaal B, Williams CL, McGaugh JL (1999) Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 11:1317-1323.
- Roozendaal B, McReynolds JR, McGaugh JL (2004b) The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairment. *J Neurosci* 24:1385-1392.
- Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009b) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10:423-433.
- Roozendaal B, de Quervain DJ, Schelling G, McGaugh JL (2004a) A systemically administered beta-adrenoceptor antagonist blocks corticosterone-induced impairment of contextual memory retrieval in rats. *Neurobiol Learn Mem* 81:150-154.
- Roozendaal B, Okuda S, de Quervain DJ, McGaugh JL (2006a) Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 138:901-910.
- Roozendaal B, Okuda S, Van der Zee EA, McGaugh JL (2006b) Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6741-6746.
- Roozendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL (2003) The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1328-1333.
- Roozendaal B, McReynolds JR, Van der Zee EA, Lee S, McGaugh JL, McIntyre CK (2009a) Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *J Neurosci* 29:14299-14308.
- Rudoy CA, Van Bockstaele EJ (2007) Betaxolol, a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist, diminishes anxiety-like behavior during early withdrawal from chronic cocaine administration in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1119-1129.
- Sadowski RN, Jackson GR, Wiczorek L, Gold PE (2009) Effects of stress, corticosterone, and epinephrine administration on learning in place and response tasks. *Behav Brain Res* 205:19-25.
- Samuels IS, Saitta SC, Landreth GE (2009) MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. *Neuron* 61:160-167.
- Sandi C, Venero C, Guaza C (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 8:794-800.
- Sardari M, Rezayof A, Khodaghali F, Zarrindast MR (2014) Basolateral amygdala GABA-A receptors mediate stress-induced memory retrieval impairment in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:603-612.
- Schwabe L, Wolf OT (2009) Stress prompts habit behavior in humans. *J Neurosci* 29:7191-7198.
- Schwabe L, Wolf OT (2010c) Socially evaluated cold pressor stress after instrumental learning favors habits over goal-directed action. *Psychoneuroendocrinology* 35:977-986.
- Schwabe L, Wolf OT (2011b) Stress-induced modulation of instrumental behavior: from goal-directed to habitual control of action. *Behavioural brain research* 219:321-328.
- Schwabe L, Wolf OT (2013) Stress and multiple memory systems: from 'thinking' to 'doing'. *Trends Cogn Sci* 17:60-68.
- Schwabe L, Haddad L, Schachinger H (2008) HPA axis activation by a socially evaluated cold-pressor test. *Psychoneuroendocrinology* 33:890-895.

- Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS (2010d) Memory formation under stress: quantity and quality. *Neurosci Biobehav Rev* 34:584-591.
- Schwabe L, Schachinger H, de Kloet ER, Oitzl MS (2010a) Corticosteroids operate as a switch between memory systems. *J Cogn Neurosci* 22:1362-1372.
- Schwabe L, Tegenthoff M, Hoffken O, Wolf OT (2010b) Concurrent glucocorticoid and noradrenergic activity shifts instrumental behavior from goal-directed to habitual control. *J Neurosci* 30:8190-8196.
- Schwabe L, Hoffken O, Tegenthoff M, Wolf OT (2011a) Preventing the stress-induced shift from goal-directed to habit action with a beta-adrenergic antagonist. *J Neurosci* 31:17317-17325.
- Schwabe L, Tegenthoff M, Hoffken O, Wolf OT (2012b) Simultaneous glucocorticoid and noradrenergic activity disrupts the neural basis of goal-directed action in the human brain. *J Neurosci* 32:10146-10155.
- Schwabe L, Joels M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS (2012a) Stress effects on memory: an update and integration. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1740-1749.
- Schwager AL, Haack AK, Taha SA (2014) Impaired flexibility in decision making in rats after administration of the pharmacological stressor yohimbine. *Psychopharmacology (Berl)* 231:3941-3952.
- Selye H (1956) *The stress of life*. New York, US: McGraw-Hill.
- Selye H (1973) The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American Scientist* 61:692-699.
- Selye H (1974) *Stress Without Distress*. New York: The New American Library.
- Shafiei N, Gray M, Viau V, Floresco SB (2012) Acute stress induces selective alterations in cost/benefit decision-making. *Neuropsychopharmacology* 37:2194-2209.
- Shiflett MW, Balleine BW (2011a) Contributions of ERK signaling in the striatum to instrumental learning and performance. *Behav Brain Res* 218:240-247.
- Shiflett MW, Balleine BW (2011b) Molecular substrates of action control in cortico-striatal circuits. *Prog Neurobiol* 95:1-13.
- Shiflett MW, Brown RA, Balleine BW (2010b) Acquisition and performance of goal-directed instrumental actions depends on ERK signaling in distinct regions of dorsal striatum in rats. *J Neurosci* 30:2951-2959.
- Skinner B (1938) *The behavior of organisms: an experimental analysis*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Smith KS, Graybiel AM (2013) A dual operator view of habitual behavior reflecting cortical and striatal dynamics. *Neuron* 79:361-374.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Sommer S, Hauber W (2016) N-methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area mediate the excitatory influence of Pavlovian stimuli on instrumental performance. *Brain Struct Funct* 221:4399-4409.
- Sousa N, Almeida OF (2012) Disconnection and reconnection: the morphological basis of (mal)adaptation to stress. *Trends Neurosci* 35:742-751.
- Spence KW (1956) *Behavior theory and conditioning*. New Haven, CT, US: Yale University Press.
- Squire LR, Zola-Morgan M (1991) *The memory system: a story of discovery*. Cold Spring Harbor Perspect Biol 7:a021667.

- Stephens DN, Voet B (1994) Differential effects of anxiolytic and non-anxiolytic benzodiazepine receptor ligands on performance of a differential reinforcement of low rate (DRL) schedule. *Behav Pharmacol* 5:4-14.
- Sterling P, Eyer J (1988) Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: *Handbook of life stress, cognition and health* (Reason SFJ, ed), pp 629-649. Oxford, England: John Wiley & Sons.
- Stone EA, Rhee J, Quartermain D (1996) Blockade of effect of stress on risk assessment behavior in mice by a beta-1 adrenoceptor antagonist. *Pharmacol Biochem Behav* 55:215-217.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228-235.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311-317.
- Tanaka SC, Balleine BW, O'Doherty JP (2008) Calculating consequences: brain systems that encode the causal effects of actions. *J Neurosci* 28:6750-6755.
- Teutsch G, Costerousse G, Deraedt R, Benzoni J, Fortin M, Philibert D (1981) 17 alpha-alkynyl-11 beta, 17-dihydroxyandrostane derivatives : a new class of potent glucocorticoids. *Steroids* 38:651-665.
- Thompson RF (2001) *Das Gehirn: Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung*, 3rd Edition. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Thorn CA, Atallah H, Howe M, Graybiel AM (2010) Differential dynamics of activity changes in dorsolateral and dorsomedial striatal loops during learning. *Neuron* 66:781-795.
- Thorndike EL (1898) *Animal intelligence: An experimental study of the associative processes in animals*. The Psychological Review: Monograph Supplements 2.
- Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865-871.
- Turnbull AV, Rivier CL (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79:1-71.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397-409.
- Ulrich-Lai YM, Christiansen AM, Ostrander MM, Jones AA, Jones KR, Choi DC, Krause EG, Evanson NK, Furay AR, Davis JF, Solomon MB, de Kloet AD, Tamashiro KL, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC, Herman JP (2010) Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20529-20534.
- von Euler US (1946) A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiologica Scandinavica* 12:73-97.
- Wong TP, Howland JG, Robillard JM, Ge Y, Yu W, Titterness AK, Brebner K, Liu L, Weinberg J, Christie BR, Phillips AG, Wang YT (2007) Hippocampal long-term depression mediates acute stress-induced spatial memory retrieval impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11471-11476.
- Woodson JC, Macintosh D, Fleshner M, Diamond DM (2003) Emotion-induced amnesia in rats: working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learn Mem* 10:326-336.
- Xu L, Holscher C, Anwyl R, Rowan MJ (1998) Glucocorticoid receptor and protein/RNA synthesis-dependent mechanisms underlie the control of synaptic plasticity by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3204-3208.



- Yin HH, Knowlton BJ (2006a) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7:464-476.
- Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2005b) Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci* 22:505-512.
- Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2006b) Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behav Brain Res* 166:189-196.
- Yin HH, Ostlund SB, Balleine BW (2008) Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: the integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *Eur J Neurosci* 28:1437-1448.
- Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW (2005a) The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci* 22:513-523.
- Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Feng J, McEwen BS, Yan Z (2009) Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14075-14079.
- Zahm DS, Williams E, Wohltmann C (1996) Ventral striatopallidothalamic projection: IV. Relative involvements of neurochemically distinct subterritories in the ventral pallidum and adjacent parts of the rostroventral forebrain. *J Comp Neurol* 364:340-362.

## 10 ANHANG: MED-PC COMPUTERPROGRAMME

### 10.1 MAGAZINE TRAINING

Das *Magazine Training* dient als erste Trainingssitzung eines Lernexperiments dazu eine naive Ratte an die SKINNER-Box zu gewöhnen und ihr zu zeigen, wo die Futterbelohnungen zu finden sind, nämlich in der Futterluke. Eine Belohnung wird durchschnittlich alle 60 sec erteilt (RT 60).

```
\Magazine Training
\Keine Hebel
\Zwei Belohnungen: Pellets und Sucrose
\Jede Belohnung hat einen eigenen RT 60
\Sessionlänge: 30 Minuten
```

```
\Inputs:
^sensor = 3
```

```
\Outputs:
^houcelight = 7
^pellet = 3
^sucrose = 8
```

```
\Variables:
\A = Number of pellet rewards
\B = Number of sucrose rewards
\C = Number of pokes into the receptacle
\P = Number from variable U drawn with RANDI (pellets)
\S = ~~~~~~ (sucrose)
\U = List of RT 60 values
```

```
List U =
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
,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,4
9,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60
```

```
S.S.1, \*****Pellets delivery and counter
S1,
#start: on^houcelight; RANDI P=U ---> S2
S2,
0.01": IF P=10 [@True,@False]
    @True: on^pellet; Z1 ---> S3
    @False: ---> S4
S3,
2.0": off^pellet ---> S4
S4,
178
```

```
1": RANDI P=U; IF P=10 [@True,@False]
    @True: on^pellet; Z1 ---> S3
    @False: ---> S4
```

```
S.S.2, \*****Sucrose delivery and counter
S1,
#start: RANDI S=U ---> S2
S2,
0.01": IF S=20 [@True,@False]
    @True: on^sucrose; Z2 ---> S3
    @False: ---> S4
S3,
2.0": off^sucrose ---> S4
S4,
1": RANDI S=U; IF S=20 [@True,@False]
    @True: on^sucrose; Z2 ---> S3
    @False: ---> S4
```

```
S.S.3,
S1,
#Z1: Add A; Show 1, Pellets, A ---> S1
#Z2: Add B; Show 2, Sucrose, B ---> S1
```

```
S.S.4, \*****Pokes counter
S1,
#start: ---> S2
S2,
#R^sensor: Add C; Show 3, Pokes, C ---> S3
S3,
#R^sensor:---->S3
0.01":---->S2
```

```
S.S.5,
S1,
#start: ---> S2
S2,
30'---> Stopabortflush
```

## 10.2 LEVER TRAINING (CONTINUOUS REINFORCEMENT)

Im nachfolgend aufgeführten *Lever Training* wird eine Hebel-Belohnungs-Assoziation trainiert, indem jede Hebelbetätigung belohnt wird. Es kann ggf. abgeändert werden, sodass statt linkem Hebel (*left lever*) der rechte Hebel (*right lever*) eingesetzt wird, oder anstelle von Pellets Zuckerwasser (*sucrose*).

\Lever Training Continuous Reinforcement (CRF) --> jeder Hebeldruck gibt eine Belohnung

\Linker Hebel

\Eine Belohnung: Pellets

\Sessionlänge: 30 min bzw. Ende nach 100 rewards

\Inputs:

^leftlever = 1

^sensor = 3

^switch = 4

\Outputs:

^houelight = 7

^pellet = 3

\Variables:

\A = Number of responses "SHOW 1"

\B = Number of pellet rewards given "SHOW 2"

\C = Number of pokes into receptacle "SHOW 3"

\T = Session Time "SHOW 4"

S.S.1, \\*\*\*\*\*Response counter

S1,

#R^switch: ON^houelight; ON^leftlever ---> S2

S2,

#R^leftlever: ADD A; SHOW 1, Responses, A; Z1 ---> S3

S3,

#R^leftlever:--->S3

0.01":--->S2

S.S.2, \\*\*\*\*\*Reward delivery and counter

S1,

#Z1: ON^pellet; ADD B; SHOW 2, Rewards, B ---> S2

S2,

2.0": OFF^pellet ---> S1

S.S.3, \\*\*\*\*\*Pokes counter

S1,

#R^switch: ---> S2

S2,

#R^sensor: ADD C; SHOW 3, Pokes, C ---> S3

S3,

#R^sensor:--->S3

0.01":--->S2

S.S.4, \\*\*\*\*\*Session time in sec

S1,

#R^switch:--->S2

S2,

```

0.01": SET T=0 --->S3
S3,
1": ADD T; SHOW 4, Sessiontime, T ---> S3

S.S.5, \*****End after 100 rewards
S1,
#R^switch:--->S2
S2,
0.01":IF B=100 [@True,@False]
        @True:--->S3
        @False:--->S2
S3,
2.0":--->Stopabortflush

S.S.6,
S1,
#R^switch: ---> S2
S2,
30'---> Stopabortflush

```

### 10.3 LEVER TRAINING (RR 5, RR 10, RR 20)

Im nachfolgend aufgeführten *Lever Training* wird eine Hebel-Belohnungs-Assoziation trainiert und die Hebelbetätigung wird mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit belohnt. Es kann ggf. abgeändert werden, sodass statt linkem Hebel (*left lever*) der rechte Hebel (*right lever*) eingesetzt wird, oder anstelle von Pellets Zuckerwasser (*sucrose*).

Die Belohnungswahrscheinlichkeiten (RR 10, RR 20) können ggf. abgeändert werden. Dazu wird der „WITHPI“-Befehl entsprechend angepasst (2000 steht für RR 5, 1000 steht für RR 10, 500 steht für RR 20; siehe MED-PC Handbuch).

```

\Lever Training RR 20
\Linker Hebel
\Belohnung: Sucrose
\Sessionlänge: 30 min.

```

```

\Inputs:
^leftlever = 1
^sensor = 3
^switch = 4

```

```

\Outputs:
^houselight = 7
^sucrose = 8

```

\Variables:

\A = Number of responses "SHOW 1"

\B = Number of sucrose rewards given "SHOW 2"

\C = Number of pokes into receptacle "SHOW 3"

S.S.1, \\*\*\*\*\*Response counter

S1,

#R^switch: ON^houelight; ON^leftlever ---> S2

S2,

#R^leftlever: ADD A; SHOW 1, Responses, A; Z1 ---> S3

S3,

#R^leftlever:--->S3

0.01":--->S2

S.S.2, \\*\*\*\*\*Reward delivery and counter

S1,

#Z1: WITHPI = 500 [@True,@False]

@True: ON^sucrose; ADD B; SHOW 2, Rewards, B ---> S2

@False: Z2 ---> S1

S2,

2.0": OFF^sucrose ---> S1

S.S.3, \\*\*\*\*\*first reward at least after 50 leverpresses

S1,

#Z2:IF A >=50 [@True,@False]

@True:IF B=0 [@True,@False]

@True: ON^sucrose; ADD B; SHOW 2, Rewards, B ---> S2

@False:--->SX

@False:--->S1

S2,

2.0": OFF^sucrose ---> SX

S.S.4, \\*\*\*\*\*Pokes counter

S1,

#R^switch: ---> S2

S2,

#R^sensor: ADD C; SHOW 3, Pokes, C ---> S3

S3,

#R^sensor:--->S3

0.01":--->S2

S.S.5,

S1,

#R^switch:---> S2

S2,

30'---> Stopabortflush

## 10.4 OUTCOME DEVALUATION TEST IN EXTINCTION

Im *Outcome Devaluation Test* sind beide Hebel verfügbar, jedoch werden keine Belohnungen zugeteilt (Test in Extinktion). Die Hebelbetätigungen werden alle 2 Minuten für jeden Hebel separat aufgezeichnet (DIM E und DIM F).

```
\Outcome Devaluation
\Beide Hebel
\keine Belohnung
\Alle 1min. werden die Hebeldrücke aufgezeichnet (10 x 1 min. BINS)
\Sessionlänge: 10 min.
```

```
\Inputs:
^leftlever = 1
^rightlever = 2
^sensor = 3
^switch = 4
```

```
\Outputs:
^housetlight = 7
```

```
\Variables:
\A = Number of responses leftlever "SHOW 1"
\B = Number of responses rightlever "SHOW 2"
\C = Number of pokes into receptacle "SHOW 3"
\L = Number of Responses pro bin leftlever
\R = Number of Responses pro bin rightlever
```

```
DIM E=10 \*****leftlever E(I)=L
DIM F=10 \*****rightlever F(I)=R
```

```
S.S.1, \*****Response counter and display leftlever
S1,
#R^switch: ON^housetlight; ON^leftlever; ON^rightlever ---> S2
S2,
#R^leftlever: ADD A; ADD L; SHOW 1, leftlever, A ---> S3
S3,
#R^leftlever: ---> S3
0.01": ---> S2
```

```
S.S.2, \*****Response counter and display rightlever
S1,
#R^switch: ---> S2
S2,
#R^rightlever: ADD B; ADD R; SHOW 2, rightlever, B ---> S3
S3,
#R^rightlever: ---> S3
```

0.01": ---> S2

S.S.3, \\*\*\*\*\*Response counter per bin  
S1,  
#R^switch:--->S2  
S2,  
1': Set E(I)=L; Set F(I)=R --->S3  
S3,  
0.01": Add I; Set L=0; Set R=0 --->S2

S.S.4, \\*\*\*\*\*Pokes counter  
S1,  
#R^switch: ---> S2  
S2,  
#R^sensor: ADD C; SHOW 3, Pokes, C ---> S3  
S3,  
#R^sensor:--->S3  
0.01":--->S2

S.S.5,  
S1,  
#R^switch: ---> S2  
S2,  
10': Set E(I)=L; Set F(I)=R ---> Stopabortflush

## 10.5 CONTINGENCY TRAINING

Im nachfolgend aufgeführten *Contingency Training* wird eine Hebel-Belohnungs-Assoziation trainiert und zusätzlich wird eine Belohnung nicht-kontingent zugeteilt. Das Programm kann ggf. abgeändert werden, sodass statt linkem Hebel (*left lever*) der rechte Hebel (*right lever*) eingesetzt wird, oder anstelle von Pellets Zuckerwasser (*sucrose*).

Die unter S.S.2 aufgeführte erste *True/False*-Bedingung gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der eine nicht-kontingente Belohnung zugeteilt wird. Die zweite *True/False*-Bedingung gibt die Belohnungswahrscheinlichkeit für eine kontingent zugeteilte Belohnung wieder. Die Belohnungswahrscheinlichkeiten können ggf. abgeändert werden (WITHPI 1000 = RR-10, WITHPI 500 = RR-20). Außerdem werden die Hebelbetätigungen alle 2 Minuten (DIM E) ausgegeben, um den Trainingseffekt innerhalb einer Sitzung beurteilen zu können.

```
\Contingency Training RR20  
\Linker Hebel  
\Belohnung: Pellets (RR20)  
\Nichtkontingente Belohnung: Pellets (RR20)
```



\Sessionlänge: 20 min.

\Inputs:

^leftlever = 1

^sensor = 3

\Outputs:

^housetlight = 7

^pellet = 3

\Variables:

\A = Number of responses

\B = Number of pellet rewards given

\C = Number of no contingently rewards given

\D = Number of pokes into receptacle

DIM E=10 \\*\*\*\*\*leftlever E(I)=A

S.S.1, \\*\*\*\*\*Response counter and display

S1,

#start: on^housetlight; on^leftlever ---> S2

S2,

#R^leftlever: Add A; Show 1, Responses, A ---> S3

S3,

#R^leftlever:--->S3

0.01":--->S2

S.S.2,

S1, \\*\*\*\*\*non-contingent and contingent reward delivery

#start: ---> S2

S2,

1": WITHPI = 500 [@True,@False]

@True: on^pellet; Add C; Show 3, NC Rewards, C ---> S3

@False: ---> S2

#R^leftlever: WITHPI = 500 [@True,@False]

@True: on^pellet; Add B; Show 2, Rewards, B ---> S4

@False: ---> S5

S3,

2.0": off^pellet ---> S2

S4,

2.0": off^pellet ---> S5

S5,

#R^leftlever:--->S5

0.01":--->S2

S.S.3, \\*\*\*\*\*Pokes counter

S1,

#start:--->S2

S2,

```
#R^sensor: Add D; Show 4, Pokes, D ---> S3
S3,
#R^sensor:--->S3
0.01":--->S2
```

```
S.S.4, \*****Response counter per bin
S1,
#start:--->S2
S2,
2': Set E(I)=A --->S3
S3,
0.01": Add I; Set A=0 --->S2
```

```
S.S.5,
S1,
20': Set E(I)=A ---> Stopabortflush
```

## 10.6 CONTINGENCY DEGRADATION TEST IN EXTINCTION

Im *Contingency Degradation Test* sind beide Hebel verfügbar, jedoch werden keine Belohnungen zugeteilt (Test in Extinktion). Die Hebelbetätigungen werden alle 2 Minuten für jeden Hebel separat ausgegeben (DIM E und DIM F).

```
\Contingency Degradation
\Beide Hebel
\keine Belohnung
\Alle 2min. werden die Hebeldrücke aufgezeichnet (10x 2min. BINS)
\Sessionlänge: 20 min.
```

```
\Inputs:
^leftlever = 1
^rightlever = 2
^sensor = 3
```

```
\Outputs:
^houelight = 7
```

```
\Variables:
\A = Number of responses leftlever
\B = Number of responses rightlever
\C = Number of pokes into receptacle
```

```
DIM E=10 \*****leftlever E(I)=A
DIM F=10 \*****rightlever F(I)=B
```

```
S.S.1 \*****Response counter and display leftlever
186
```

---

```
S1,  
#start: on^housetlight; on^leftlever; on^rightlever ---> S2  
S2,  
#R^leftlever: Add A; Show 1, leftlever, A ---> S3  
S3,  
#R^leftlever: ---> S3  
0.01": ---> S2
```

```
S.S.2,    \*****Response counter and display rightlever  
S1,  
#start: ---> S2  
S2,  
#R^rightlever: Add B; Show 2, rightlever, B ---> S3  
S3,  
#R^rightlever: ---> S3  
0.01": ---> S2
```

```
S.S.3,    \*****Response counter per bin  
S1,  
#start:--->S2  
S2,  
2': Set E(I)=A; Set F(I)=B --->S3  
S3,  
0.01": Add I; Set A=0; Set B=0 --->S2
```

```
S.S.4,    \*****Pokes counter  
S1,  
#start: ---> S2  
S2,  
#R^sensor: Add C; Show 3, Pokes, C ---> S3  
S3,  
#R^sensor:--->S3  
0.01":--->S2
```

```
S.S.5,  
S1,  
20': Set E(I)=A; Set F(I)=B ---> Stopabortflush
```

## 10.7 LEVER TRAINING FI20

Im nachfolgend aufgeführten *Lever Training* FI20 wird eine Hebel-Belohnungs-Assoziation trainiert. Der Hebel wird alle 20 sec aktiviert und die nächste Hebelbetätigung wird belohnt. Das Programm kann ggf. abgeändert werden, sodass statt linkem Hebel (*left lever*) der rechte Hebel (*right lever*) eingesetzt wird, oder anstelle von Pellets Zuckerwasser (*sucrose*).

```
\Lever Training FI 20
\Linker Hebel
\Belohnung: Pellets
\Sessionlänge: 45 min bzw. Ende nach 50 Rewards
\1 bin = 10 Rewards

\Inputs:
^leftlever = 1
^sensor = 3
^switch = 4

\Outputs:
^houelight = 7
^pellet = 3

\Variables:
\A = Number of Responses "SHOW 1"
\B = Number of Pellet Rewards given "SHOW 2"
\C = Number of Pokes into Receptacle "SHOW 3"
\T = Session Time "SHOW 4"
\L = Number of Responses pro bin
\M = Number of Rewards für bins (5 rewards = 1 bin)
\N = Zeit zw. 2 bins

DIM E=10      \*****Responses leftlever E(I)=L
DIM G=10      \*****Zeit G(I)=N

S.S.1,       \*****Reward delivery and counter
S1,
  #R^switch: ON^houelight; ON^leftlever ---> S2
S2,
  #R^leftlever: ON^pellet; ADD M; ADD B; SHOW 2, Pellets, B; Z1--->S5
S3,
  20": ---> S4
S4,
  #R^leftlever: ON^pellet; ADD M; ADD B; SHOW 2, Pellets, B; Z2--->S5
S5,
  2": OFF^pellet ---> S3
```

```
S.S.2,      \*****Response counter and display
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  #R^leftlever: ADD L; ADD A; SHOW 1, Responses, A ---> S3
S3,
  #R^leftlever: ---> S3
  0.01": ---> S2

S.S.3,      \*****Responses pro bin und Zeit zw. 2 bins
S1,
  #Z2: IF M=5 [@True,@False]
        @True: SET E(I)=L; SET G(I)=N --->S2
        @False: ---> S1
S2,
  0.01": ADD I; SET L=0; SET N=0; SET M=0 ---> S1

S.S.4,      \*****Pokes counter
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  #R^sensor: ADD C; SHOW 3, Pokes, C ---> S3
S3,
  #R^sensor: ---> S3
  0.01": ---> S2

S.S.5,      \*****Fortlaufende Zeitzählung
S1,
  #Z1: ADD N ---> S2
S2,
  1": ADD N ---> S2

S.S.6,      \*****Session Time in sec
S1,
  #R^switch:--->S2
S2,
  0.01": SET T=0 --->S3
S3,
  1": ADD T; SHOW 4, Sessiontime, T ---> S3

S.S.7,      \*****Ende nach 50 Pellet Rewards
S1,
  #Z2: IF B=50 [@True,@False]
        @True: ---> S2
        @False: ---> S1
S2,
  5": ---> Stopabortflush

S.S.8,
```

```
S1,  
  #R^switch: ---> S2  
S2,  
  45': SET E(I)=L; SET G(I)=N ---> Stopabortflush
```

## 10.8 LEVER TRAINING VI30, VI60

Die über LIST U aufgelisteten Zahlen stellen Zeitintervalle zwischen 2 Belohnungen dar, welche mithilfe einer geometrischen Progression ermittelt wurden:  $a_{i+1} = a_i * q$

Für das Schema VI30 wurde eine Zeitspanne von 10 bis 70 sec gewählt und für das Schema VI60 wurden 15 bis 150 sec gewählt. Daraus ergeben sich das Anfangsglied der geometrischen Progression als  $a_1 = 10$  bzw.  $a_1 = 15$  und das letzte Glied als  $a_{25} = 73,9$  bzw.  $a_{25} = 147,7$ . Der Quotient wurde auf  $q = 1,1$  festgelegt.

Auf diese Weise wurde eine Zahlenfolge ermittelt, welche dann über den Befehl „Zufallszahl“ in Microsoft Excel sortiert wurde und demgemäß unten im Programm aufgelistet ist. Das geometrische Mittel der jeweiligen Zahlenfolge ist 30 bzw. 60, woraus sich die Bezeichnung VI30 bzw. VI60 ergibt.

```
\Lever Training VI 30  
\Linker Hebel  
\Belohnung: Pellets  
\Sessionlänge: 45 min bzw. Ende nach 30 Rewards
```

```
\Inputs:  
^leftlever = 1  
^sensor = 3  
^switch = 4
```

```
\Outputs:  
^houselight = 7  
^pellet = 3
```

```
\Variables:  
\A = Number of Responses "SHOW 1"  
\B = Number of Pellet Rewards given "SHOW 2"  
\C = Number of Pokes into Receptacle "SHOW 3"  
\P = "LIST-Output" "SHOW 4"  
\U = "LIST-Array" for VI 30 Schedule  
\X = actual TimeInterval in sec  
\T = Session Time in sec  
\Y = Time since last response, inter response time "SHOW 5"
```

```
LIST U =
50.5,11.0,37.9,41.7,13.3,61.1,8.3,14.6,28.5,7.5,16.1,45.9,12.1,34.5,
21.4,67.2,10.0,23.5,55.5,31.3,19.5,73.9,17.7,25.9,9.1
```

```
S.S.1,    \*****Interval counter
S1,
  #R^switch: ON^housetlight; ON^leftlever ---> S2
S2,
  0.01": LIST P = U(H); SET X = P*1" ; SHOW 4, TimeInterval, P---> S3
S3,
  X#T: Z1 ---> S4
S4,
  #Z2: SET Y=0 --->S2
```

```
S.S.2,    \*****Reward delivery and counter
S1,
  #Z1: ---> S2
S2,
  #R^leftlever: Z2; ON^pellet; ADD B; SHOW 2, Pellets, B ---> S3
S3,
  2": OFF^pellet ---> S1
```

```
S.S.3,    \*****Response counter and display
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  #R^leftlever: ADD A; SHOW 1, Responses, A ---> S3
S3,
  #R^leftlever: ---> S3
  0.01": ---> S2
```

```
S.S.4,    \*****Pokes counter
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  #R^sensor: ADD C; Show 3, Pokes, C ---> S3
S3,
  #R^sensor: ---> S3
  0.01": ---> S2
```

```
S.S.5,    \*****Session Time in sec
S1,
  #R^switch:--->S2
S2,
  0.01": SET T=0; SET Y=0 --->S3
S3,
  1": ADD T; ADD Y; SHOW 5, InterResponseTime, Y ---> S3
```

```
S.S.6,    \*****Ende nach 30 Rewards
```

```
S1,  
  #R^switch:--->S2  
S2,  
  0.01":IF B=30 [@True,@False]  
    @True:--->S3  
    @False:--->S2  
S3,  
  2.0":--->Stopabortflush
```

```
S.S.7,  
S1,  
  #R^switch: ---> S2  
S2,  
  45': ---> Stopabortflush
```

## 10.9 OMISSION CONTINGENCY TRAINING

Beim *Omission Contingency Training* wird eine negative Kontingenz trainiert, d.h. eine Belohnung wird nur dann erteilt, wenn 20 sec lang kein Hebel betätigt wurde. Jede Hebelbetätigung innerhalb dieser 20 sec lässt den Zeitzähler wieder von vorn beginnen.

```
\Omission Contingency 20sec  
\Linker Hebel  
\Belohnung: Pellets  
\Sessionlänge: 60 min.
```

```
\Inputs:  
^leftlever = 1  
^sensor = 3  
^switch = 4
```

```
\Outputs:  
^housetlight = 7  
^pellet = 3
```

```
\Variables:  
\A = Number of responses "SHOW 1"  
\B = Number of pellet rewards given "SHOW 2"  
\C = Number of pokes into receptacle "SHOW 3"  
\D = Number of pellets for T  
\Y = Timer for omission (20sec without response = reward)  
\T = Time between 2 rewards (for yoked controls) "Show 4"  
\L = Number of Responses pro bin (1 min)  
\N = Number of Pokes pro bin (1 min)  
\W = Number of Rewards pro bin (1 min)
```



```

DIM E=60 \***** Responses leftlever E(I)=L
DIM M=60 \***** Pokes M(I)=N
DIM V=60 \Rewards V(I)=W
DIM T=120 \Inter reward time T(H)=X

S.S.1, \***** Response counter
S1,
  #R^switch: ON^houelight; ON^leftlever ---> S2
S2,
  #R^leftlever: SET Y=0; ADD A; ADD L; SHOW 1, Responses, A ---> S3
S3,
  #R^leftlever:--->S3
  0.01":--->S2

S.S.2, \***** Reward delivery and counter
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  0.01": IF Y =20 [@True,@False]
          @True: ON^pellet; ADD D; ADD W; ADD B; SHOW 2, Rewards,
                B; SET Y=0 ---> S3
          @False:--->S2
S3,
  2.0": OFF^pellet ---> S2

S.S.3, \***** Timer for omission & inter reward time
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  1": ADD Y; ADD X; SHOW 4, InterRewardTime, X ---> S2

S.S.4, \***** Inter reward time recording
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  0.01": IF D = 1 [@True,@False]
          @True: SET T(H)=X ---> S3
          @False: ---> S2
S3,
  0.01": ADD H; SET D=0; SET X=0 ---> S2

S.S.5, \***** Pokes counter
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  #R^sensor: ADD C; ADD N; SHOW 3, Pokes, C ---> S3
S3,
  #R^sensor:--->S3
  0.01":--->S2

```

```
S.S.6,    \***** Responses & Pokes pro bin
S1,
  #R^switch:--->S2
S2,
  1': SET E(I)=L; SET M(I)=N; SET V(I)=W ---> S3
S3,
  0.01": ADD I; SET L=0; SET N=0; SET W=0 ---> S2
```

```
S.S.7,
S1,
  #R^switch: ---> S2
S2,
  60': SET E(I)=L; SET M(I)=N; SET V(I)=W ---> Stopabortflush
```

## 10.10 OMISSION TEST IN EXTINCTION

Beim Omission Test ist nur ein Hebel verfügbar (da zuvor nur ein Hebel trainiert wurde) und er findet in Extinktion statt.

```
\Omission Test Extinction
\linker Hebel
\keine Belohnung
\Alle 1min. werden die Hebeldrücke & Pokes aufgezeichnet (30 x 1min.
BINS)
\Sessionlänge: 30 min.
```

```
\Inputs:
^leftlever = 1
^sensor = 3
^switch = 4
```

```
\Outputs:
^housetlight = 7
```

```
\Variables:
\A = Number of responses leftlever "SHOW 1"
\C = Number of pokes into receptacle "SHOW 3"
\L = Number of Responses pro bin leftlever
\N = Number of Pokes pro bin
```

```
DIM E=30    \*****leftlever E(I)=L
DIM M=30    \*****Pokes M(I)=N
```

```
S.S.1,    \*****Response counter and display leftlever
S1,
194
```

---

```
#R^switch: ON^housetlight; ON^leftlever; ---> S2
S2,
#R^leftlever: ADD A; ADD L; SHOW 1, leftlever, A ---> S3
S3,
#R^leftlever: ---> S3
0.01": ---> S2
```

```
S.S.2,      \*****Response & Pokes counter per bin
S1,
#R^switch: ---> S2
S2,
1': Set E(I)=L; SET M(I)=N ---> S3
S3,
0.01": Add I; Set L=0; SET N=0 ---> S2
```

```
S.S.3,      \*****Pokes counter
S1,
#R^switch: ---> S2
S2,
#R^sensor: ADD C; Add N; SHOW 3, Pokes, C ---> S3
S3,
#R^sensor: ---> S3
0.01": ---> S2
```

```
S.S.4,
S1,
#R^switch: ---> S2
S2,
30': Set E(I)=L; SET M(I)=N ---> Stopabortflush
```

## 11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Zuerst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Hauber für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation. Danke für die Hilfe bei der Planung der Experimente und die vielen bereichernden wissenschaftlichen Diskussionen. Mit unermüdlicher Geduld hat er mir die Grundlagen der Lern- und Stressforschung sowie neurale Zusammenhänge erläutert und wertvolle Literatur zur Vertiefung der Themen zur Verfügung gestellt. Danke für die Hilfe bei der Auswertung meiner Versuchsergebnisse sowie für die Korrekturen der publizierten wissenschaftlichen Artikel und dieser Arbeit. Danke für die unaufhörliche Ermutigung und geduldige Unterstützung während der Schreib-Phase meiner Arbeit. Und nicht zuletzt danke für die hilfreichen Tipps bei der Vorbereitung meines Promotionsvortrags und die angenehme Atmosphäre während der Promotionsprüfung.

Prof. Dr. Franziska Wollnik danke ich für die freundliche Aufnahme in der Abteilung Tierphysiologie und für die Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten. Während unserer gemeinsamen Zeit in der Abteilung hat sie durch ihre fürsorgliche und wohlwollende Art eine Atmosphäre geschaffen, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe. Ich werde sie als eine vorbildliche Wissenschaftlerin und liebenswerte Frau in Erinnerung behalten.

Meinen Mitpromovendinnen Bettina und Steffi danke ich für den fortwährenden wissenschaftlichen Austausch und die praktische Hilfe im Labor. Danke für die Gespräche über die Wissenschaft hinaus, die gemeinsamen Kinobesuche und das traditionelle Plätzchen-Backen im Advent.

Bilitis danke ich für die im Rahmen ihrer Studienarbeit erhobenen Daten, die für meine Arbeit sehr hilfreich waren. Danke für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die bereichernden persönlichen Gespräche über Gemeinsamkeiten unserer Lebenssituationen.

Alexandra und Corinna danke ich insbesondere für die Korrektur einiger Kapitel meiner Arbeit und die hilfreichen Tipps für meinen Promotionsvortrag.

Susanne und Angeline danke ich für die vielen wertvollen Tipps bei der Durchführung meiner Experimente und die praktische Hilfe bei den Herausforderungen des Laboralltags.

Danke Sonja für die ganz praktische Unterstützung bei zeitlichen Überschneidungen während der Durchführung der Stressexperimente.

Danke Harald und Igor für die Unterstützung bei der Tierhaltung.

Der gesamten Abteilung danke ich für die netten Gespräche während der kurzweiligen gemeinsamen Mittags- und Kaffeepausen. Danke für die allgemeine Hilfsbereitschaft und die Zusammenarbeit vor allem bei den abwechselnd übernommenen Wochenenddiensten.

Danke an die Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg, die den finanziellen Rahmen dieser Arbeit gestellt hat.

Meinen Freunden danke ich für ihr aufrichtiges Interesse an meiner Arbeit, die gemeinsam verbrachte Zeit und vor allem für ihre Freundschaft. Danke für die Begleitung während meiner Promotionsprüfung in Gedanken und im Gebet.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die praktische und emotionale Unterstützung. Insbesondere danke ich meinen Eltern, die in der letzten Phase meiner Arbeit unzählige Stunden in die Betreuung meiner Kinder investiert haben, sodass ich Zeit zum Schreiben hatte. Ihr seid wunderbar.

Meinen Kindern danke ich für die kindliche Unbekümmertheit, Fröhlichkeit und Liebe, die mein Mutterherz immer wieder aufs Neue erwärmt haben. Ihr seid so einmalig kostbar. Ganz besonders danke ich dir Michi für deine Hilfe beim Erstellen vieler Abbildungen meiner Arbeit. Danke für deine fortwährenden Ermutigungen, deinen bedingungslosen Beistand und deine beständige Liebe.

Danke Gott für deine Liebe, die mich als Person meint und mir die Kraft gegeben hat, meine Dissertation durchzuführen und abzuschließen.

## 12 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Stephanie Braun, geb. Bauer  
geboren am 12.10.1983 in Reutlingen  
verheiratet, drei Kinder  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Studium/ Promotion

- 2010-2017      Promotion an der Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Abteilung Tierphysiologie; Betreuer Prof. Dr. W. Hauber  
*„Die Wirkungen von akutem Stress auf Erlernen und Abruf erlernter Handlungs-Ergebnis-Beziehungen“*
- 2010-2014      Stipendiatin der Landesgraduiertenförderung
- 2008-2009      Diplomarbeit an der Universität Stuttgart, Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme, Abteilung Tierphysiologie;  
Betreuer Prof. Dr. W. Hauber  
*„Entscheidungsverhalten bei Ratten: Neurobiologische Untersuchungen zur Funktion des dorsomedialen Striatums“*
- 2003-2009      Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart  
Abschluss: Diplom-Biologin (technisch orientiert), Note: „sehr gut“  
Hauptfächer: Tierphysiologie, Mikrobiologie  
Nebenfächer: Immunologie, Bioinformatik

### Schul Ausbildung

- 1994-2003      Johannes Kepler Gymnasium Reutlingen
- 1990-1994      Grundschule an der Freien Evangelischen Schule Reutlingen