

Ultraschallvokalisationen im Sign- und Goal-Paradigma und der Einfluss der *Cacna1c*-Haploinsuffizienz

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Im Fachbereich Psychologie der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

Nivethini Sangarapillai

aus Bremen

Marburg, 2022

Vom Fachbereich Psychologie

Der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer K.W. Schwarting, Philipps-Universität Marburg

Zweitgutachter: Dr. Metin Üngör, Philipps-Universität Marburg

Tag der Disputation: _____

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	5
Summary	6
I. Anreizsalienz.....	7
i. Sign- und Goal-Paradigma	8
ii. Andere Verhaltensmerkmale der Sign- und Goal-Tracker	9
iii. Umgebungseinflüsse auf den Sign- und Goal-Phänotyp	9
iv. Neurobiologie des Sign- und Goal-Verhaltens	10
II. Ultraschallvokalisation	12
i. 50-kHz USV Subtypen	14
ii. Neurobiologie der 50-kHz USV	14
III. Psychische Störungen.....	16
i. <i>CACNA1C</i>	18
ii. <i>Cacna1c</i> -Tiermodelle und Verhaltensveränderungen	20
iii. 50-kHz USV in <i>Cacna1c</i> -Ratten.....	22
IV. Studiendesign	23
V. Zielsetzung.....	26
VI. Publikationen.....	27
i. Zusammenfassung der Publikationen	27
Studie 1: Ultrasonic vocalizations and individual differences in rats performing a Pavlovian conditioned approach task.....	27
Studie 2: Appetitive 50-kHz calls in a Pavlovian conditioned approach task in <i>Cacna1c</i> haploinsufficient rats.....	40
VII. Allgemeine Diskussion.....	53
i. 50-kHz USV im PCA-Paradigma	54
ii. USV als stabiler Merkmalsträger	55
iii. USV als Prädiktor im Sign- und Goal-Paradigma	57

iv.	Effekte durch die <i>Cacna1c</i> -Haploinsuffizienz	58
v.	Neurobiologische Zusammenhänge zwischen dem PCA-Paradigma, den 50-kHz USV und der <i>Cacna1c</i> -Haploinsuffizienz	60
vi.	Sign- und Goal-Tracking in <i>Cacna1c</i> -haploinsuffizienten Ratten als translationale Studie	65
vii.	ViolEx-Modell	66
viii.	Fazit	68
VIII.	Zukunftsperspektiven	69
IX.	Abschlussbemerkung.....	70
X.	Literaturverzeichnis	71
XI.	Anhang.....	101
i.	Nomenklatur.....	101
ii.	Abkürzungsverzeichnis	101
iii.	Abbildungsverzeichnis	103
	Danksagung	104
	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Erklärungen	105
	Eigene Beiträge der Veröffentlichungen	105
	Eidesstattliche Erklärung	106

Zusammenfassung

In diesem Dissertationsprojekt wurde ein etabliertes Rattenmodell für "Sign- und Goal-Tracking" untersucht. Bei dieser pawlowschen Aufgabe zeigen Ratten individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem bedingten Anreizstimulus. Sogenannte Sign- und Goal-Tracker reagieren nicht nur unterschiedlich auf die Präsentation eines Hinweissignals für die Belohnung bzw. der Belohnung selbst, sondern verhalten sich auch unterschiedlich bei Erwartungsverletzungen durch eine Extinktion. Die Klassifizierung basiert auf ihrem Annäherungsverhalten entweder an das Signal, welches die Belohnung vorhersagt, oder an die Belohnung, das Ziel selbst. Frühere Studien haben gezeigt, dass das dopaminerge System an der Expression dieses Verhaltens beteiligt ist. Vor allem lag ein großes Interesse an der Ermittlung des affektiven Zustands der Subjekte während der Ausführung der Aufgabe. Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift wurde untersucht, ob, welche Art und in welcher Häufigkeit Ultraschallvokalisationen (USV) während der Aufgabe emittiert werden und inwiefern diese mit dem Sign- und Goal-Verhalten zusammenhängen. Zudem wurde in diesem Zusammenhang geschaut, ob eine Mutation auf dem *Cacna1c*-Gen das Verhalten in diesem Paradigma beeinflusst. Das *Cacna1c*-Gen, das für die $\alpha 1c$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals vom L-Typ $Ca_v1.2$ codiert, gilt als eines der Vulnerabilitätsgene für verschiedene Störungen, insbesondere depressive Störung, Autismus-Spektrum-Störung, bipolare Störung und Schizophrenie. Frühere Arbeiten deuten darauf hin, dass die Verhaltensänderungen von *Cacna1c*-haploinsuffizienten Ratten zumindest teilweise durch Veränderungen im dopaminergen System bedingt sind. Das Sign- und Goal-Paradigma wurde auf das genetisch-veränderten *Cacna1c*-Rattenmodell angewandt und haploinsuffiziente Ratten mit ihren wildtyp Wurfgeschwistern verglichen. Die Subjekte emittierten 50-kHz USV während der Aufgabe. Dies weist auf einen affektiven Zustand hin. Trotz der starken interindividuellen Variabilität in der Rufrate waren diese über die Paradigmen und Extinktion hinweg intraindividuell stabil. Zudem zeigen sowohl die haploinsuffizienten Ratten als auch ihre Wurfgeschwister eine klare Tendenz zum Goal-Tracking-Verhalten. Die individuelle Rufrate war positiv mit dem Sign-Tracking und negativ mit Goal-Tracking assoziiert. Dies deutet auf eine zusammenhängende Persönlichkeitsdisposition hin. Es gab einen Genotypunterschied in der Rufrate. Die reduzierten 50-kHz Rufe bei den *Cacna1c*-haploinsuffizienten Subjekten könnten auf einen verringerten Affektzustand durch die Haploinsuffizienz hinweisen und stehen im Einklang mit der Annahme einer veränderten Dopamin-Signalisierung bei diesen Ratten. Das ist ein Ergebnis, das ihre Anwendbarkeit in Modellen für psychische Störungen unterstützt.

Summary

In this dissertation project, an established rat model for "sign-and goal-tracking" was investigated. In this Pavlovian task, rats show individual differences in sensitivity to the conditional incentive stimulus. So-called sign- and goal-tracker not only respond differently to the presentation of a cue signalling a reward or the reward itself, but also behave differently when expectations are violated during extinction. Classification is based on their approach behavior to either the signal predicting the reward or to the reward itself. Previous studies have shown that the dopaminergic system is involved in the expression of this behavior. In particular, there has been considerable interest in determining the affective state of subjects during task performance. It was investigated whether, what kind and in what frequency ultrasonic vocalizations are emitted during the task and to what extent they were related to sign- and goal-behavior. In addition, we tested if a mutation on the *Cacna1c* gene, alters behavior in this paradigm. Interactions between genetic and environmental risk factors play an important role in the development of mental disorders. This particular gene, which encodes the $\alpha 1C$ -subunit of the L-type voltage-gated calcium channel $Ca_v1.2$, is considered to be one of the vulnerability genes for the development of several disorders, among them depressive disorders, autism spectrum disorders, bipolar disorders, and schizophrenia. Previous work suggests that the behavioral changes seen in *Cacna1c* haploinsufficient rats are at least partly due to changes in the dopaminergic system. We applied this Pavlovian conditioning task in this genetically altered rat model and compared haploinsufficient rats with their wild-type littermates.

Subjects emitted appetitive 50-kHz USV during the task. Despite strong interindividual variability in call rate, these were intraindividually stable across paradigms and extinction. Moreover, both the haploinsufficient rats and their littermates showed a clear tendency toward goal-tracking behavior. Individual calling rate was positively associated with sign-tracking and negatively associated with goal-tracking. This suggests an associated personality disposition. There was a genotype difference in call rate. The reduced 50-kHz calls in the *Cacna1c* haploinsufficient subjects may indicate a reduced affect state due to haploinsufficiency and is consistent with the assumption of altered dopamine signaling in *Cacna1c* rats. This finding supports the applicability of this model in mental disorders.

I. Anreizsalienz

Menschen machen individuelle Erfahrungen und haben daher entsprechend subjektive Empfindungen zu durchlebten Erfahrungen, die ihr Verhalten und Entscheidungen unterbewusst zu einem gewissen Grad beeinflussen (Childress et al., 2008; Johansson et al., 2006). Der Lernprozess, bei dem ein bestimmter Stimulus ein bevorstehendes Ereignis vorhersagt, ist als pawlowsche oder klassische Konditionierung bekannt. Iwan Pawlow wies 1927 nach, dass die Präsentation einer Glocke (CS, engl. „conditioned stimulus“), die eine bevorstehende Futterlieferung ankündigte, bei Hunden Speichelfluss auslöste, selbst wenn kein Futter vorhanden war (US, engl. „unconditioned stimulus“). Im Allgemeinen kann zwischen appetitiver Konditionierung, einem positiven Ereignis, das ein Verlangen oder einen Appetit befriedigt (Domjan et al., 1986) und aversiver Konditionierung (Dudai et al., 1976; Estes & Skinner, 1941) unterschieden werden. Bei Letzterem wird gelernt, die Folgen eines erwarteten negativen Ereignisses zu antizipieren, zu vermeiden und zu minimieren. Bei der Verknüpfung eines US mit einem vorhersagenden Reizsignal findet ein Lernprozess statt (Saunders & Robinson, 2013). Durch die wiederholte Kopplung eines Hinweissignals, der normalerweise ein neutraler Reiz ist und einer Belohnung vorausgeht, mit einem unkonditionierten belohnenden Reiz, erwirbt das neutrale Hinweissignal selbst belohnende Eigenschaften. Auf diese Weise wird der neutrale Reiz in ein attraktives Wunsch-Signal umgewandelt. Dieses alleine genügt, das Verhalten der Individuen zu motivieren (Berridge, 2001; Bindra, 1978; Lajoie & Bindra 1976; Rescorla, 1988). Auch in Abwesenheit einer Belohnung reicht der zuvor neutrale, jedoch durch die Kopplung nun konditionierte Stimulus aus, um eine Reaktion hervorzurufen. Dieser Prozess wird als Anreizsalienz bezeichnet (Berridge, 2001; Bindra, 1978; Lajoie & Bindra 1976; Rescorla, 1988). Es gibt jedoch große individuelle Unterschiede bei der Zuschreibung von Anreizsalienz (für Übersichten siehe Robinson et al., 2014; Saunders & Robinson, 2013).

Die Theorie der Anreizsensibilisierung wurde 1993 von Terry Robinson und Kent Berridge entwickelt und besagt, dass die wiederholte Einnahme von Suchtmitteln zu einer Sensibilisierung des mesolimbischen Belohnungssystems und zu einer Steigerung des "Anreizwerts" eines Suchtmittels führt. Die zugrunde-liegenden Mechanismen und neurobiologischen Veränderungen bei der Sensibilisierung bzw. die individuelle Veranlagung zur Überempfindlichkeit gegenüber den motivierenden Effekten von drogenassoziierten Reizen bestimmen also die potenzielle Wahrscheinlichkeit, ein suchartiges Verhalten zu entwickeln (Robinson und Berridge, 1993). Diese Theorie ist gewissermaßen übertragbar auf motivierende Belohnungsstimuli. Im nächsten Abschnitt wird das Paradigma vorgestellt, welches im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde.

i. Sign- und Goal-Paradigma

Die Anreizsalienz kann bei Laborratten mit dem sogenannten „Sign- und Goal-Tracking“ Paradigma untersucht werden (Flagel et al., 2009). Diese Methode ermöglicht es, den prädiktiven Wert vom motivierenden Wert einer Belohnungsaufgabe zu trennen. Bei dieser pawlowschen Aufgabe der konditionierten Annäherung (PCA, engl. „Pavlovian Conditioned Approach“) zeigen Ratten individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem CS (Flagel et al., 2009; Robinson & Flagel, 2009). Die Einteilung in sogenannte Sign- und Goal-Tracker (ST; GT) basiert auf ihrem Annäherungsverhalten, entweder an das Signal (engl. „sign“), welches die Belohnung vorhersagt, oder an das Ziel (engl. „goal“), die Belohnung selbst (Fitzpatrick & Morrow, 2016). In dem Paradigma wird mit einem sonst inoperablen Hebel eine Futterlieferung acht Sekunden vorher angekündigt. Während einige Ratten dazu neigen, sich während der Phase mehr mit dem CS zu beschäftigen, zeigen andere ein größeres Interesse an der möglichen Belohnung selbst (Flagel et al., 2009). Dies ist in Abbildung 1 dargestellt. ST schreiben den CSs eine höhere Anreizwirkung zu (Robinson & Flagel, 2009). Dies macht die CSs zu einer effektiveren Verstärkung für ST im Vergleich zu GT (Flagel et al., 2007, 2009). Es ist wichtig zu verstehen, dass eine Belohnung unabhängig vom Verhalten des Individuums gewährt wird. Es ist keine instrumentelle, aber klassische Konditionierung. Dennoch zeigen ST eine instrumentenähnliche Reaktion, allerdings in einer nicht-instrumentalen Aufgabe. Es wird diskutiert, ob diese Tendenz, den Belohnungsreizen eine Anreizsalienz zuzuschreiben, ein Persönlichkeitsmerkmal widerspiegelt (Flagel et al., 2009; Robinson & Flagel, 2009). Diese Annahme basiert auf Befunden früherer Studien, die gezeigt haben, dass das dopaminerge System bei der Reaktion auf die Präsentation eines Hinweissignals oder einer Belohnung in unterschiedlicher Weise beteiligt ist (Flagel et al., 2007; Flagel et al., 2011; Haight et al., 2017; Sarter & Phillips, 2018).



Abbildung 1: Sign- (links) und Goal-Tracker (rechts) während der Ankündigung einer Futterlieferung durch einen sonst inoperablen Hebel (übernommen von Flagel et al., 2009).

ii. Andere Verhaltensmerkmale der Sign- und Goal-Tracker

Wie bereits erwähnt, zeigen die Tiere individuelle Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem CS, welches als Charakterzug angesehen werden kann (Flagel et al., 2009; Robinson & Flagel, 2009). Nichtsdestotrotz unterscheiden sich ST und GT nicht nur in dem pawlowsch-konditionierten Annäherungsparadigma selbst, sondern zeigen auch andere Eigenschaften z. B. in Bezug auf Löschung oder Änderungen der Reaktions- und Ergebniskontingenz. ST reagieren empfindlicher auf Veränderungen von Hinweissignalen, während die Devaluation von Belohnungen sich stark und selektiv auf die GTs auswirkt (Meyer et al., 2012; Yager & Robinson, 2010). Ratten unterscheiden sich in ihrer Neigung, sich mit dem CS (STs) oder einer möglichen Belohnung (GTs) zu beschäftigen. STs reagieren weniger empfindlich auf Erwartungsverletzungen, da sie ihre Aufmerksamkeit auf signalisierende Hinweise richten, die eine starke motivierende Eigenschaft erhalten und nicht auf die tatsächlichen Ergebnisse. Zudem wird oft die Tendenz, mit dem Hinweissignal, der die Belohnung vorhersagt, zu interagieren, mit Impulsivität (Flagel et al., 2010; Lovic et al., 2011) und süchtigem Verhalten in Verbindung gebracht (Saunders & Robinson, 2013; Tomie et al., 2008). ST schreiben nicht nur dem Futter, sondern auch drogenassoziierten Stimuli einen erhöhten motivierenden Wert zu (Saunders & Robinson, 2011). Daher wird das ST sogar häufig als Verhaltensmarker für die Anfälligkeit für Drogenabhängigkeit angesehen (Flagel et al., 2009; Flagel & Robinson, 2017). Zudem weisen STs im Vergleich zu GTs ein relativ geringes Maß kognitiver Kontrollfähigkeit begleitet mit Aufmerksamkeitsdefiziten auf (Kim et al., 2016; Paolone et al., 2013).

iii. Umgebungseinflüsse auf den Sign- und Goal-Phänotyp

Studien haben gezeigt, dass frühe Entwicklungserfahrungen die Bereitschaft beeinflussen, belohnungsbezogenen Reizen eine Anreizsignifikanz zuzuschreiben. Während Ratten, die ohne regelmäßige soziale Interaktion aufgezogen wurden, futterbezogenen Reizen eine größere Anreizwirkung zuschreiben, ist dies bei Tieren, die von der Mutter aufgezogen wurden, nicht der Fall (Lomanowska et al., 2011). In vorherigen Kapitel wurde beschrieben, wie das ST-Verhalten oft mit der Entwicklung von Suchtverhalten assoziiert wird (Saunders & Robinson, 2013; Tomie et al., 2008). Studien haben gezeigt, dass die Anreicherung der Umgebung vor der Anfälligkeit und dem Fortbestehen von suchtähnlichem Verhalten schützt (Stairs & Brado, 2009). Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit für die Selbstverabreichung von Drogen bei angereichert-gehaltenen Individuen geringer, als bei isoliert-gehaltenen Ratten (Gipson et al., 2011). Dies gilt auch für die Bereitschaft dafür zu arbeiten (Bardo et al., 2001; Green et al., 2002). Dieser positive Effekt durch die Umgebungsanreicherung auf missbrauchsähnliches Verhalten führt zu der Frage, welchen Effekt dieser

Faktor auf die Zuschreibung von Anreizsalienz zu belohnungsassoziierten Hinweissignalen hat. Beckman und Brado (2012) fanden heraus, dass die geringere Anfälligkeit für missbrauchsähnliches Verhalten möglicherweise auf den geringeren Anreizwert der mit der Belohnung verbundenen Reize zurückzuführen ist. Darüber hinaus zeigten sie in ihrer Studie, dass isolierte Ratten vor allem ST waren, während die Individuen, die eine Umweltsanreicherung hatten, mehr zielgerichtetes GT-Verhalten zeigten. Sie kamen zu dem Schluss, dass die positive Anreicherung in der Umwelt die Bereitschaft verringert, belohnungsassoziierten Reizen einen Anreizwert zuzuschreiben. Demnach verringert die positive Anreicherung in der Umwelt den Anreizwert, die mit Belohnung verbunden sind und deutet darauf hin, dass die Anreicherung vor Suchtverhalten schützt (Beckmann & Brado, 2012). Dies zeigt, wie wichtig die Berücksichtigung von sozialen und umweltbedingten Einflüssen bei dem Sign- und Goal-Verhalten ist.

iv. Neurobiologie des Sign- und Goal-Verhaltens

Die Erörterung neuronaler Mechanismen, die solche kognitiv-motivationalen Verhaltensweisen wie ST und GT vermitteln, ist essenziell, da die Kenntnisse aus diesen Konzepten bei der Erforschung grundlegender Gehirnfunktionen und Risikofaktoren für Krankheiten helfen kann. Bisherige Studien gehen davon aus, dass es sich beim ST um einen Dopamin (DA)-abhängigen Prozess handelt, der sich auf die subkortikalen Schaltkreise des hypothalamisch-thalamisch-striatalen Pfads stützen (Flagel et al., 2007; Flagel et al., 2011; Haight et al., 2017; Sarter & Phillips, 2018). Wohingegen das GT hauptsächlich durch acetylcholinerge (ACh)-kortikale kognitive Prozesse gesteuert wird (Paolone et al., 2013; Sarter & Phillips, 2018). Ein Ungleichgewicht zwischen diesen cholinergen „top-down“ und dopaminergen „bottom-up“ Prozessen führt zu den Verhaltensphänotypen, die beim ST und GT auftreten (Sarter & Phillips, 2018). Dies wird nun anhand von Ergebnissen aus Rattenstudien gezeigt.

Es wird angenommen, dass der präfrontale Kortex (PFC) eine inhibitorische Kontrolle ausübt, die es den Individuen erlaubt, nur bedeutungsvolle Reize zu beachten, und so zielgerichtetes Verhalten zu vermitteln (Asplund et al., 2010; Ridderinkhof et al., 2004). Bei GTs findet eine cholinerge Neuromodulation im PFC statt, welche die Aufmerksamkeitskontrolle moduliert (Paolone et al., 2013; Sarter & Phillips, 2018). Paolone et al. (2013) zeigten eine geringe cholinerge Modulation in STs. Dies weist darauf hin, dass die Kapazität für cholinerge Neuromodulation in STs durch neuronale Cholinrezeptoren (CHT) begrenzt ist, da diese nicht auf eine Zunahme der neuronalen Aktivität reagieren. Zudem weisen STs im Vergleich zu GTs ein relativ geringes Maß kognitiver Kontrollfähigkeit auf, wobei STs im Vergleich zu GTs bei einer Aufmerksamkeitsaufgabe (engl. „Sustained Attention Task-SAT“) niedrigere und instabilere Trefferquoten aufweisen. Paolone et al. (2013) fanden zwar keine

Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die absolute ACh-Freisetzung, aber sie stellten fest, dass die mit der SAT-Leistung verbundene erhöhte ACh-Freisetzung bei GTs höher war (Paolone et al., 2013). Unterstützend zu dieser Studie berichten Kim et al. (2016), dass STs sich schneller ablenken lassen, was wiederum für eine schlechte Aufmerksamkeitssteuerung spricht (Kim et al., 2016).

Im Gegensatz dazu vermitteln die subkortikalen Strukturen eher Emotionen wie Belohnung und Angst (Baxter & Murray 2002; Shin & Liberzon, 2010). Das Verhalten, das bei ST festzustellen ist, ist dass diese nicht nur mit dem Hinweissignal interagieren, sondern sogar daran arbeiten, diese Hinweise auch ohne Belohnung zu erreichen (Sarter & Phillips, 2018). Das weist auf eine eher subkortikal gesteuerte bottom-up Kontrolle hin (Sarter & Phillips, 2018), insbesondere die Aktivität des mesolimbischen DA-Systems, die bei den STs erhöht ist (Flagel et al., 2007; Flagel et al., 2011; Haight et al., 2017; Sarter & Phillips, 2018). Das frontale DA-System von GTs reagiert im Gegensatz zu STs nicht auf Drogenstimuli und unterstützt daher kein auf Stimuli ausgerichtetes Verhalten (Sarter & Phillips, 2018). ST und GT zeigen nicht nur unterschiedliche Profile in der DA-Freisetzung, sondern sind durch unterschiedliche Aktivitätsmuster des Nucleus Accumbens (NAc) gekennzeichnet (Gillis & Morrison, 2019). Außerdem zeigen ST eine reduzierte Tyrosinhydroxylase-mRNA-Expression im ventralen tegmental Areal (VTA), begleitet von einer reduzierten D2-mRNA-Expression im NAc (Flagel et al., 2007). Darüber hinaus zeigen ST erhöhte DA- und 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC)-Gewebespiegel im NAc (Tomie et al., 2004) und weisen eine höhere DA-Freisetzung im NAc auf, wenn sie während des PCA-Trainings einem nahrungsbezogenen Hinweis ausgesetzt sind (Flagel et al., 2011). Die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung von DA-Rezeptoren im NAc zeigen eine stärkere Expression von D1-Rezeptor-mRNA in STs (Flagel et al., 2007). Diese Befunde belegen, dass das ST-Verhalten über ventral-striatal-phasische DA-Reaktionen vermittelt wird (Flagel et al., 2011; Saunders & Robinson, 2012).

Anreizsalienz wird durch mesokortikolimbische Gehirnsysteme vermittelt (Berridge, 2007; Robinson und Berridge, 1993). Der erhöhte Corticosteronspiegel bei ST deutet darauf hin, dass die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse an der Attribution von Anreizsalienz beteiligt ist (Flagel et al. 2009). Die Verringerung der Aktivität der HPA-Achse durch positive Umgebungseinflüsse bzw. Anreicherung bietet jedoch die Möglichkeit einer Verringerung der Anreizsalienz für belohnungsbezogene Signale. Das erklärt die Verringerung des ST-Verhaltens nach Anreicherung (Beckmann und Brado, 2012). Dies wird auch durch andere Studien bestätigt, die zeigen, dass ST nach Anreicherung erhöhte Corticosteronspiegel (Flagel et al., 2009; Tomie et al., 2004) und niedrigere basale Corticosteronspiegel aufweisen (Stairs and Brado, 2009). Eine weitere Struktur neben der HPA-Achse, die häufig im Zusammenhang mit ST und GT diskutiert wird, sind die DA-Mechanismen innerhalb der mesokortikolimbischen Bahnen, die ebenfalls durch Umgebungseinflüsse

verändert werden können. So erhöht die Anreicherung einerseits die Gesamtproteinexpression des Dopamintransporters (DAT) im NAc (Zakharova et al., 2009) und führt zu einer erhöhten drogeninduzierten DA-Synthese und einem erhöhten DA-Stoffwechsel im NAc und im Striatum (Bowling et al. 1993; Zhu et al., 2004). Andererseits wird die DAT-Bindung im Striatum, DAT-mRNA pro DA-Neuron auf Zellebene (Bezard et al., 2003) verringert. Des Weiteren, gibt es Hinweise auf eine geringere DA-Aufnahme im medialen PFC (Zhu et al., 2004), zu einer verringerten DAT-Funktion und Zelloberflächenexpression im präfrontalen Kortex ohne Veränderung der DA-Transporter Bindung (Zhu et al., 2005) und zu einer verringerten D1-Rezeptorexpression im PFC (Del Arco A et al., 2007). Neben DA und ACh wird die glutamergische Signalübertragung innerhalb des mesokortikolimbischen Weges auch durch Umgebungseinflüsse beeinflusst (Melendez RI et al. 2004). Eine Umgebungsanreicherung verursacht einen erhöhten mGluR2-vermittelten glutamergischen Tonus im PFC (Melendez RI et al. 2004) und angereicherte Ratten zeigen im Vergleich zu isolierten Ratten eine erhöhte drogeninduzierte Glutamatfreisetzung im NAc (Rahman & Brado, 2008). Diese Ergebnisse zeigen, wie komplex die Mechanismen sind und welche Vielfalt an genetischen und umweltbedingten Faktoren das Gleichgewicht der neurobiologischen Mechanismen, die dem ST und GT zugrunde liegen, verändern und beeinflussen können.

In diesem Kapitel wurde aufgezeigt, dass mit dem Sign- und Goal-Verhalten individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem CS gemessen werden kann (Flagel et al., 2009; Robinson & Flagel, 2009). Dieses subjektabhängige Verhalten steht im Zusammenhang mit anderen Verhaltensmerkmalen (Flagel et al., 2009, 2010; Flagel & Robinson, 2017; Kim et al., 2016; Lovic et al., 2011; Meyer et al., 2012; Saunders & Robinson, 2011, 2013; Tomie et al., 2008; Paolone et al., 2013; Yager und Robinson, 2010). Neben der Beeinflussung dieses Phänotyps durch Umgebungseinflüsse kann anhand der Erörterung der neuronalen Mechanismen aufgezeigt werden, dass das Sign- und Goal-Verhalten auf grundlegende Gehirnfunktionen basiert (Flagel et al., 2007; Flagel et al., 2011; Haight et al., 2017; Sarter & Phillips, 2018; Palone et al., 2013). Bisher existieren noch keine Studien über den affektiven Zustand der Individuen, während der Ausführung dieser PCA-Aufgabe. Im Folgenden Kapitel werden die Ultraschallvokalisationen erläutert, die es erlauben, den Affektzustand zu ermitteln.

II. Ultraschallvokalisation

Nagetiere verfügen über die Fähigkeit, Rufe im Ultraschallbereich auszusenden, die aufgrund ihrer Frequenz über 20-kHz nicht von Menschen wahrgenommen werden können. Ultraschallvokalisation (USV) ist ein hochsensibler Marker, um das Verhalten von Nagetieren zu testen. Auf diese Weise können die positiven und negativen Affekte, sowie ihre Reaktion auf soziale Reize analysiert werden

(Wöhr & Schwarting, 2013). Dabei ist jedoch zu beachten, dass das Auftreten der verschiedenen USV-Klassen nicht nur stark vom Geschlecht und Alter der Tiere abhängt (Portfors & Perkel, 2014; Wöhr & Schwarting, 2013), sondern auch von den physischen oder psychischen Anforderungen der Umgebung (Brudzynski, 2013; Wöhr & Schwarting, 2013). Diese Rufe können unter anderem verwendet werden, um Kommunikationsdefizite bei psychische Störungen zu messen (Wöhr & Schwarting, 2013). Bislang wurden bei Ratten drei verschiedene Klassen von USV-Emissionen nachgewiesen: isolationsinduziert, interaktionsinduziert und angstinduziert (Wöhr & Schwarting, 2013).

Der isolationsbedingte USV-Ruf ist das Ergebnis eines negativen Gefühlszustands und wird auch als "Pfeifen in der Einsamkeit" oder "Notruf" bezeichnet (Wöhr et al., 2008). Diese Rufe der Jungtiere treten auf, wenn sie von ihrer Mutter zurückgelassen oder getrennt werden. Dieser isolationsbedingte USV-Kommunikationsbereich bei Rattenwelpen, der aus einer Notlage resultiert, kann im Bereich von ~40 kHz gemessen werden (Ehret, 1987; Ehret & Haak, 1981; Sewell, 1970; Wöhr et al., 2008).

Basierend auf ihrer Frequenz können USV der erwachsenen Tiere in 22- und 50-kHz-USV unterteilt werden (Brudzynski, 2013, 2021; Portfors, 2007; Wöhr & Schwarting, 2013). Beide haben eine kommunikative Funktion (Seffer et al., 2014; Wöhr, 2018; Wöhr & Schwarting, 2007) und es wird angenommen, dass sie den motivationalen und affektiven Zustand des Individuums widerspiegeln (Burgdorf et al., 2020; Brudzynski, 2013, 2021; Knutson et al., 2002; Wöhr, 2018; Wöhr & Schwarting, 2013). Im Gegensatz zu den Jungtieren stoßen erwachsene Ratten mit Frequenzen um 23-28 kHz sogenannte "Alarmrufe" aus (Brudzynski, 2013; Covington & Miczek, 2003; Litvin et al., 2007; Wöhr & Schwarting 2007, 2013). Während 22-kHz Rufe typisch für aversive Situationen sind (Knapp & Pohorecky, 1995; Sales, 1972; Van der Poel et al., 1989), wie z. B. Furcht und Angst (Wöhr et al., 2005; Borta et al., 2006), werden 50-kHz Rufe in appetitiven Situationen wie bei der Paarung (Burgdorf et al., 2008), beim Spielen (Knutson et al., 1998) oder nach Verabreichung von Psychostimulanzien (Engelhardt et al., 2017) ausgestoßen. Diese Rufe sind auch als „Rattenlachen“ bekannt, werden durch die Interaktion ausgelöst und weisen auf einen positiven affektiven Zustand hin (Seffer et al., 2014). Zudem können diese aber auch kommunikative Funktionen haben (Seffer et al., 2015). Sie können auch durch die Erwartung einer Belohnung oder eines belohnungsbezogenen Hinweises ausgelöst werden und spiegeln das Verlangen wider (Burgdorf et al., 2000; Brenes & Schwarting, 2014, 2015; Knutson et al., 1998; Panksepp & Burgdorf, 2000, 2003;). Die Messung dieser Rufe kann dabei helfen, einen Einblick sowohl in den aktuellen emotionalen Zustand einer Ratte, als auch in charakteristische Eigenschaften der Tiere zu gewinnen (Ahrens et al., 2013; Taracha et al., 2012), da diese Rufe interindividuell sehr variabel, jedoch intraindividuell stabil sind (Schwarting et al., 2007).

i. 50-kHz USV Subtypen

Während die aversiven 22-kHz Rufe flache, circa 300-3000 msec lange Rufe sind, können 50-kHz Rufe mit einer Rufdauer bei 20-100 msec je nach Charakteristik in Subtypen aufgeteilt werden (Wöhr & Schwarting, 2012, 2013). Basierend auf strukturellen und akustischen Eigenschaften hat Wright et al. (2010) eine detaillierte Klassifizierung in 14 Kategorien vorgestellt. Im Gegensatz zu dieser detaillierten Klassifikation werden oft die 50-kHz Subtypen auch in vier Kategorien klassifiziert, den sogenannten flachen nicht-frequenzmodulierten (engl. „Flat“) Rufen und frequenzmodulierten (FM) 50-kHz USV. Die FM lassen sich in „Step“-Rufe (stufige) mit mehr als 5-kHz Unterschied zwischen direkt aufeinanderfolgenden Rufen, „Trill“-Rufe mit ein oder mehreren Kurven und „Mixed“-Rufe gemischt auftretende Rufe unterteilen (Engelhardt et al., 2017; Kisko et al., 2018, 2020; Pereira et al., 2014; Wöhr et al., 2015). Dies ist in Abbildung 2 dargestellt. Es wird vermutet, dass bestimmte Ruftypen mit bestimmten Verhaltensmustern assoziiert werden können (Burgdorf et al., 2008; Pereira et al., 2014; Wright et al., 2010). Es wird angenommen, dass die „Flat“-Rufe zum Wiederherstellen von sozialen Kontakten nach Trennung von Artgenossen, dienen (Wöhr et al., 2008; Wright et al., 2010). Zudem wurde gezeigt, dass FM 50-kHz USV positiv mit der Paarung und Spielverhalten assoziiert waren (Burgdorf et al., 2008) und Individuen in der direkten Interaktion miteinander oder nach Administration von Psychostimulanzien höhere „Trill“-Rufe von sich geben, die sich durch ihre kurvige Form auszeichnen (Pereira et al., 2014; Wright et al., 2010).

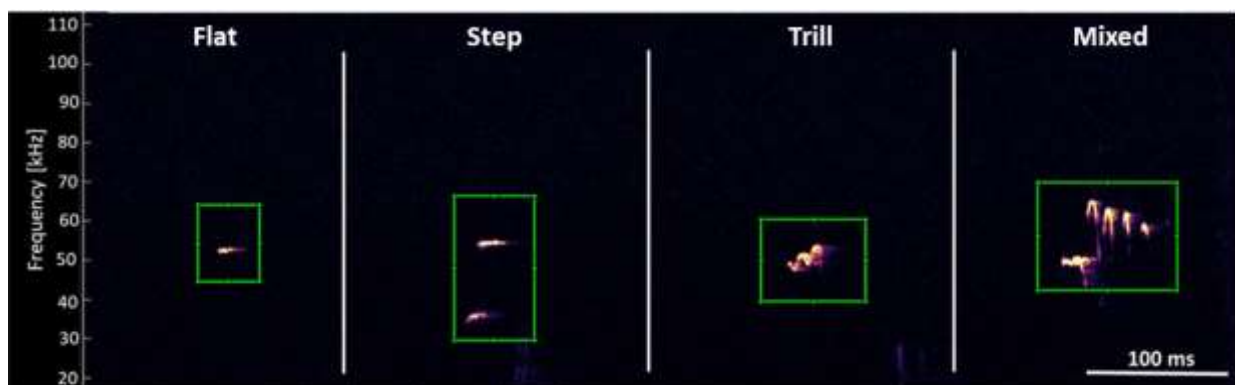


Abbildung 2: Subtypen der 50-kHz Ultraschallvokalisationen. Spektrogramm mit repräsentativen Flat, Step, Trill und Mixed-Rufe von weiblichen *Cacna1c^{+/+}* Ratten während des Sign- und Goal-Paradigmas. (Eigene Illustration)

ii. Neurobiologie der 50-kHz USV

Das Zusammenspiel mehrerer Bahnen und unterschiedlicher Areale ist für die Weiterleitung emotionaler Erregungsreaktionen verantwortlich (Burgdorf et al., 2007; Brudzynski, 2013, 2014; Brudzynski et al., 2011; Ikemoto, 2007). Zwei Systeme, die in diesem Zusammenhang oft diskutiert werden, sind zum einen das aufsteigende mesolimbisch-cholinerge System durch die Freisetzung von

ACh in medio-basalen Zwischen- und Voderhirnregionen, bei negativer aversiver Erregung und Emission von 22-kHz Rufen (Brudzynski, 2014; Brudzynski et al., 2011) und zum anderen das aufsteigende mesolimbische System, durch die Freisetzung von DA im NAc, bei der Auslösung belohnender appetitiver emotionaler Erregung (Burgdorf et al., 2007; Brudzynski, 2013; Ikemoto, 2007). Zudem wird in Brudzynski (2007, 2021) die Aktivität des mesolimbischen-DAergen Systems als das verantwortliche limbische Fundament für die Auslösung von 50-kHz USV debattiert. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass die DA-Aktivität in belohnungsbezogenen Hirnarealen mit 50-kHz USV verbunden ist (Burgdorf et al., 2007; Willuhn et al., 2014). Die synaptische Freisetzung von DA in der NAc als Ergebnis feuerner VTA-Neuronen (Somers et al., 2009) steht in direktem Zusammenhang mit der Erzeugung eines positiven emotionalen Zustands und der 50-kHz USV Produktion (Brudzynski, 2013, 2015). Außerdem berichteten Willuhn et al. (2014) über eine phasische DA-Freisetzung im NAc als Reaktion auf 50-kHz USV. Mehrere andere Studien belegen, dass die DAerge Signalübertragung auch mit der Aussendung von 50-kHz USV bei Ratten verbunden ist (Ahrens et al., 2013; Taracha et al., 2012; Wöhr & Schwarting, 2013). Außerdem werden hohe Raten von 50-kHz Rufen durch d-Amphetamin ausgelöst (Engelhardt et al., 2017; Natusch & Schwarting, 2010; Wöhr, 2021). Heal et al. (2013) berichten, dass die Verabreichung dieses Psychostimulans zu einer enormen extrazellulären Verfügbarkeit von DA führt, und zwar aufgrund eines erhöhten Efflux, einer gehemmten Wiederaufnahme und eines verringerten Abbaus. 50-kHz USV verstärken die Aktivität von DA im NAc, was die Belohnungsverarbeitung stark beeinflusst (Willuhn et al., 2014). Außerdem führt die Injektion von d-Amphetamin nicht nur zu einer übermäßigen Emission von 50-kHz USV (Pereira et al., 2014), sondern auch zu einer erhöhten Verfügbarkeit von DA (Heal et al., 2013; Wright et al., 2013). Die wichtigste Hirnstruktur, von der diskutiert wird, dass sie an der drogeninduzierten Erzeugung von 50-kHz USV beteiligt ist, ist die Hülle des NAc (Burgdorf et al., 2001; Brudzynski et al., 2011; Thompson et al., 2006). Pereira et al. (2014) berichteten, dass die d-Amphetamin-induzierte Zunahme der 50-kHz USV auch mit einer hyperlokomotorischen Aktivität einherging. Zudem führt die Administration von Flupentixol, einem DA-Rezeptor Antagonisten, zu geringeren 50-kHz Rufen (Burgdorf et al., 2007). Wöhr (2021) erörterte in seiner Übersichtsarbeit, dass alle drei von ihm verabreichten antimanischen Medikamente (Lithium, Tamoxifen und Myricitrin) indirekt molekulare Signalübertragungen hemmen (Armani et al., 2014; Meotti et al., 2006; Zarate & Manji, 2009), die das DA-System modulieren. Dies könnte zu einer Blockierung der DAergen Neurotransmission führen, die zur Unterdrückung der medikamenteninduzierten 50-kHz USV führt (Wöhr et al., 2021). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die 50-kHz Rufe zumindest teilweise durch den mesolimbischen Belohnungsweg, insbesondere DAerge Neuronen, reguliert werden.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass die Aufnahme von USV Aufschluss über den affektiven Zustand der Ratten gibt (Burgdorf et al., 2020; Brudzynski, 2013, 2021; Knutson et al., 2002; Wöhr, 2018; Wöhr & Schwarting, 2013). Dabei deuten die 50-kHz Rufe, die wiederum in Subtypen aufgetilt werden können auf einen positiven Affektzustand hin (Engelhardt et al., 2017; Kisko et al., 2018, 2020; Pereira et al., 2014; Wöhr et al., 2015). Diese appetitiven Rufe, wie auch das ST- und GT-Verhalten werden zum Teil von DAergen Schaltkreisen moduliert (Heal et al., 2013; Pereira et al., 2014; Willuhn et al., 2014; Wright et al., 2013). Tripi et al. (2017) haben gezeigt, dass sich die USV-Reaktion auf Kokain zwischen den Tieren in Abhängigkeit von ihrem Verhalten in der PCA-Aufgabe stark unterscheidet. Aufgrund dieser Zusammenhänge und um den affektiven Zustand der Subjekte bei Durchführung der PCA-Aufgabe zu untersuchen wurde in Studie 1 die Vokalrate der Individuen während des Paradigmas aufgenommen. Veränderungen des Affektzustandes und die Performance in Belohnungsaufgaben stehen im engen Zusammenhang zu psychischen Störungen (Dao et al., 2010; Green et al., 2010; Heyes et al., 2015; Lancaster, 2014). Die Kenntnisse aus diesen Konzepten und Erforschung des Verhaltens und der grundlegenden Mechanismen kann helfen Risikofaktoren der Störungen und ihre Komorbidität zu verstehen. Im folgenden Kapitel wird daher auf psychische Störungen eingegangen.

III. Psychische Störungen

Psychische Störungen lassen sich unterteilen in affektive Stimmungsstörungen, wie depressive Störungen (engl. „major depressive disorder“; MDD), bipolare Störungen (engl. „bipolar disorder“; BD) und Entwicklungsstörungen des Nervensystems wie Autismus-Spektrum-Störungen (engl. „autism spectrum disorder“; ASD) oder Schizophrenie (SCZ) (Dao et al., 2010; DSM-5; Ferreira et al., 2008; Green et al., 2010; Moskvina et al., 2009; Nyegaard et al., 2010; Ripke et al., 2011, 2014; Sklar et al., 2008; Splawski et al., 2005, 2004; Witt et al., 2014). Stimmung ist definiert als ein innerlich durchdringender und anhaltender Gefühlston, der sich auf fast alle Aspekte des Verhaltens einer Person in der Außenwelt auswirkt (Amado-Boccaro et al., 1993). Stimmungsstörungen oder affektive Störungen werden durch ausgeprägte Störungen der Emotionen beschrieben, schwere Tiefpunkte, die als Depression bezeichnet werden, oder Höhepunkte, die als Hypomanie oder Manie bezeichnet werden (DSM-5; ICD-10; Sekhon & Gupta, 2021). Diese betreffen weltweit eine große Anzahl von Menschen. Studien, die in den letzten zwei Jahrzehnten Daten erhoben haben, zeigen, dass die Prävalenz zwischen 14 % (Alonso et al., 2004) und 21 % (Kessler et al., 2005) liegt, was darauf hindeutet, dass eine von sechs Personen an einer schweren MDD oder einer BD leiden wird. Frauen haben eine fast doppelt so hohe Prävalenzrate wie Männer (Rakofsky & Rapaport, 2018; Richards, 2011), während

Männer häufiger an ASD und SCZ erkranken (Abel et al., 2010; Eaton et al., 2012; Halladay et al., 2015; Steel et al., 2014).

Die Ätiologie ist jedoch nach wie vor nur unzureichend erforscht. Es wird diskutiert, dass die Kombination bestimmter Umweltbedingungen mit dem Vorhandensein von Risikogenen zum Ausbruch bzw. Auftreten dieser Störungen führt. Obwohl die neurobiologischen Korrelate, die die Gehirnstruktur und -funktion beeinflussen, noch unklar sind, deutet die hohe Erbllichkeit auf einen starken genetischen Einfluss hin. Die Erbllichkeit von MDD wird auf etwa 40-50 % geschätzt, für BD auf 60-85 % , bei SCZ liegt diese bei 80-85 % und bei ASD sogar bei 90 % (Cannon et al., 1998; Cardno & Gottesman, 2000; Kendler & Prescott, 1999; Kieseppä et al., 2004; McGuffin et al., 1996, 2003; Sandin et al., 2017; Smoller & Finn, 2003; Sullivan et al., 2000). Nach der Diagnose wird nur ein kleiner Prozentsatz der Betroffenen erfolgreich geheilt, ohne dass es zu einem Rückfall kommt (Conradi et al., 2017; Ferrari et al., 2016; Lambert et al., 2010; Möller et al., 2011). Der Ausbruch dieser Störungen schränkt die Lebensqualität der betroffenen Menschen enorm ein. Ihre Existenz führt nicht nur zu einem großen Leidensdruck für die Betroffenen selbst, sondern auch für das soziale Umfeld (Simon, 2003). Neben der hohen wirtschaftlichen und finanziellen Belastung durch Faktoren wie Arbeitslosigkeit (Fajutrao et al., 2009), Produktivitätsverlust (Goldberg & Ernst, 2002) oder Kosten für das Gesundheitswesen (Simon, 2003) sind auch die Unabhängigkeit, die psychische Stabilität und die sozialen Beziehungen bzw. das Funktionieren (Harvey, 2014; Simon, 2003) von Belangen. In extremen Fällen kann die verminderte Erfahrung des Wohlbefindens der Patienten (Parker et al., 2018) sogar zu Selbstmord führen (Chesney et al., 2014; McGrath et al., 2008; Otte et al., 2016).

In Anbetracht der Tatsache, dass Stimmungsstörungen und andere psychische Störungen einen so großen Prozentsatz der Weltbevölkerung betreffen, ist es erstaunlich, dass die dahinterstehenden Mechanismen noch immer nicht vollständig aufgeklärt sind. Das liegt daran, dass es sich um recht komplexe Krankheiten handelt, die nicht nur durch einen einzigen genetischen Locus verursacht werden. Der Ausbruch der Krankheit ist das Ergebnis des Zusammenspiels mehrerer genetischer und umweltbedingter Mechanismen (Uitterlinden, 2016). Die Unklarheit über die Ätiologie schränkt auch die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden ein. Die meisten der bisherigen Behandlungen zielen eher auf die Symptome als auf die pathophysiologischen Ursachen ab (Bhat et al., 2012). Dies ist auch einer der Hauptgründe für die oben erwähnten hohen Rückfallquoten der Störungen.

Angesichts der hohen Prävalenz und des immensen Leidens auf der einen Seite und des mangelnden Wissens über die Ätiologie auf der anderen Seite wird deutlich, wie wichtig die Forschung auf diesem Gebiet ist. Die häufigen Überschneidungen in den Störungsbildern wie auch die Komorbidität (Steel et al., 2014) deuten auf gemeinsame grundlegende Mechanismen hin. Eines der Gene, das immer wieder

im Zusammenhang mit affektiven Störungen, aber auch mit ASD und SCZ genannt wird, ist *CACNA1C* (Dao et al., 2010; Green et al., 2010; Heyes et al., 2015). Die vorliegende Arbeit wird sich auf dieses Gen konzentrieren.

i. ***CACNA1C***

Im Gegensatz zu MDD, BD, SCZ und ASD (Bhat et al., 2012; Dao et al., 2010; Ferreira et al., 2008; Green et al., 2010; Heyes et al., 2015; Li et al., 2015; Ripke et al., 2014; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011) wird eine Verstärkung der Genaktivität der *CACNA1C*-Mutation mit der Entwicklung vom Timothy-Syndrom (TS), welches sich durch ähnliche Symptome wie ASD auszeichnet, assoziiert (Liao & Soong, 2010; Splawski et al., 2004, 2005). Bei MDD, BD SCZ und ASD stehen vor allem Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in *CACNA1C* im Mittelpunkt der genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011). Bei Menschen befindet sich das *CACNA1C*-Gen auf Chromosom 12p13.33 und kodiert für die 1α -Untereinheit des L-Typ spannungsgesteuerten Kalziumkanals (LTCC) $Ca_v1.2$ (Bhat et al., 2012; Heyes et al., 2015). Neben $Ca_v1.2$ gibt es drei weitere LTCC, $Ca_v1.1$, $Ca_v1.3$ und $Ca_v1.4$ (Catterall, 2011). $Ca_v1.2$ macht jedoch etwa 80 % und damit die Mehrheit aller L-Typ-Kalziumkanäle im Säugetiergehirn aus (Sinnegger-Brauns et al., 2009). Es wird vor allem in neuronalen Zellkörpern und proximalen Dendriten exprimiert, wobei die höchste Expression im Hippocampus, Kortex und Kleinhirn zu beobachten ist (Obermair et al., 2008; Schlick et al., 2010; Sinnegger-Brauns et al., 2009; Splawski et al., 2004). Neben dem zentralen Nervensystem (ZNS) sind diese Proteinkanäle auch in Herzgewebe, glatten Muskeln und endokrinen Zellen zu finden (Casamassima et al., 2010; Catterall, 2011; Striessnig et al., 2014). Der Ionenkanal besteht aus vier Untereinheiten, wobei jede Untereinheit von einem anderen Gen kodiert wird (Bhat et al., 2012). Die beiden Transmembran-Untereinheiten $\alpha1c$ und $\alpha2\delta$ werden von *CACNA1C* bzw. *CACNA2D1-3* kodiert. Die genetische Information des intrazellulären β -Teils liegt auf dem *CACNB1-4*-Gen und die des Calmodulin-Teils auf dem *CaM*-Gen. Während $\alpha2\delta$, β und Calmodulin an der Regulierung der Expression und der Modulation der allgemeinen Eigenschaften des Kanals beteiligt sind, hängen die funktionellen Eigenschaften von der $\alpha1c$ -Untereinheit ab, die aus 24 Transmembransegmenten aufgebaut ist. Diese bilden eine Pore, durch die Ionen in die Zelle gelangen können (Bhat et al., 2012; Catterall, 2011; Heyes et al., 2015). Dieser Kanal dient als wichtiger Transduktor des Membranpotenzials an der Zelloberfläche in lokale intrazelluläre Ca^{2+} -Transienten und vermittelt die Depolarisierung der Zellmembran. Durch die Erhöhung der Membrandurchlässigkeit für den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und die Modulation der neuronalen Erregung werden viele verschiedene physiologische Ereignisse

ausgelöst (Sinneger-Brauns et al., 2009; Zamponi, 2016). Dies reguliert viele nachgeschaltete Pfade wie die Genexpression, die Neurogenese und beeinflusst die synaptische Plastizität (Ghosh et al., 1994; Lee et al., 2016; Zamponi et al., 2016; Zuccotti et al., 2011). Eine Veränderung in diesem Gen führt zu einem Ungleichgewicht der $Ca_v1.2$ -Expression. Studien an Mäusen haben gezeigt, dass dieses Ungleichgewicht zu Herzversagen führen kann, insbesondere bei homozygoten *Cacna1c*-Gendeaktivierung (engl. „knock out“), wobei die Tiere das Embryonalstadium nicht überleben (Striessnig et al., 2014). Im ZNS wird es als Auslöser für den Phänotyp bestimmter neuropsychiatrischer Störungen angesehen, unter anderem für Stimmungsstörungen (Ferraira et al., 2008; Green et al., 2010; Striessnig et al., 2014). Es wird angenommen, dass die bei MDD und BD beobachteten Phänotypen wie Depression durch PFC-Amygdala-Hippocampus-Strukturen vermittelt werden (Erk et al., 2010, 2014; Kabir et al., 2016). Strukturelle und funktionelle Veränderungen sind hier mit dem rs1006737-Allel assoziiert (Dietsche et al., 2014; Perrier et al., 2011; Wang et al., 2011), welches das *CACNA1C*-Risikoallel mit MDD und BD in Verbindung bringt (Mallas et al., 2016). Außerdem ist die Reaktivität der HPA-Achse eng mit Stimmungsstörungen verbunden, da diese durch die LTCCs reguliert wird (Gunnar et al., 2009; Karst et al., 2002). Darüber hinaus wurde das *CACNA1C*-Gen mit Alterationen in der Sprachentwicklung und -funktion in Verbindung gebracht (Casamassima et al., 2010; Splawski et al., 2004), welche ebenfalls ein zentrales Symptom bei Stimmungsstörungen sind. Dennoch sind die tatsächlichen direkten Auswirkungen von Veränderungen im Gen noch nicht klar. Dies liegt vor allem daran, dass SNPs wie rs1006737 Teil eines nicht-kodierenden Abschnitts des Gens sind und daher ein direkter Einfluss auf strukturelle und funktionelle Aspekte des $Ca_v1.2$ -Kanals ausgeschlossen werden kann. Es wird jedoch vermutet, dass es sich um einen Teil des Gens handelt, der an der Transkription beteiligt ist und daher die Genexpression beeinflusst (Kabir et al., 2017a). Diese Idee wird auch durch Befunde gestützt, die über eine verminderte Expression von *CACNA1C* im Gehirn von Patienten mit neuropsychologischen Störungen berichten (Eckart et al., 2016; Gershon et al., 2014; Roussos et al., 2014). In weiteren Studien wurde berichtet, dass das Risiko-Allel rs1006737 mit einer erhöhten grauen Substanz im präfrontalen und anterior-cingulären Kortex (Kempton et al., 2009; Wang et al., 2011) und einer höheren Dichte der grauen Substanz in der Amygdala und im Hypothalamus (Perrier et al., 2011) verbunden ist.

Soziales Verhalten und Kommunikation sind ein schwerwiegendes Merkmal, welche bei Stimmungsstörungen beeinträchtigt sind (Bai et al., 2019; Cattane et al., 2018; DiLalla et al., 2017; Hirschfeld et al., 2000; O'Donovan & Owen, 2016; Sanchez-Moreno et al., 2009). Über den direkten Einfluss des $Ca_v1.2$ -Expressionsniveaus auf den Phänotyp, den wir bei Stimmungsstörungen sehen, ist wenig bekannt. Die Verwendung von Tiermodellen ist ein elementarer Vorteil, da sie gezielt manipuliert werden können, um ihren Einfluss auf das Verhalten besser zu untersuchen und zu

ergründen. Miro et al. (2012) und Lee et al. (2012) haben gezeigt, dass Knock-outs dieses Gens in Nagetiermodellen Phänotypen zeigen, die für den Menschen relevant sind. Untersuchungen (Ferraïra et al., 2008; Green et al., 2010) zeigen, dass dieses Gen sowohl in klinischen Populationen als auch in Nagetiermodellen mit affektiven Störungen in Verbindung steht.

ii. *Cacna1c*-Tiermodelle und Verhaltensveränderungen

Da die DNA-Sequenz von Nagetieren zu 80-90 % ortholog zum Menschen ist (Mogil et al., 2019), sind Nagetiere ein kompatibler Kandidat für die Forschung. Die Nutzung eines Tiermodells ist notwendig, da es für die Kontrolle von Menschen höhere ethische Beschränkungen gibt und umgebungsbedingte Faktoren, die neben der genetischen Variation eine große Rolle beim Ausbruch der Krankheit spielen. Dies kann in Nagetiermodellen kontrolliert werden, da diese unter den gleichen Bedingungen gehalten werden. Die homozygote Ablation des *Cacna1c*-Gens ist tödlich (Seisenberger et al., 2000). Daher basieren die meisten aktuellen Erkenntnisse in Tiermodellen entweder auf heterozygoter Ablation (*Cacna1c*^{+/-}; Braun et al., 2018, 2019; Kisko et al., 2018, 2020) oder auf regionalspezifischen Ablationen im Gehirn (Jeon et al., 2010; Kabir et al., 2017a). In heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} Nagetiermodellen ist die Expression von Ca_v1.2 global reduziert (Dao et al., 2010; Lee et al., 2012). Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Ergebnisse jedoch recht widersprüchlich sind, was die Komplexität dieser Störungen zeigt. Nichtsdestotrotz ist die Validität dieser Modelle sehr hoch, da die beobachteten Phänotypen denen beim Menschen entsprechen (Kabir et al., 2016; Moon et al., 2018).

Funktionsstörungen des Hippocampus werden mit der Pathogenese von Gemütskrankheiten und Schizophrenie in Verbindung gebracht und könnten für die emotionale Instabilität und die Gedächtnisstörungen im Hippocampus, die bei beiden Krankheiten beobachtet werden, von Bedeutung sein (Bhat et al., 2012; Small et al., 2011). Die bedingte Deletion von *Cacna1c* im Hippocampus und im Kortex führt zu Hippocampus-abhängigen Verhaltensänderungen, wie z. B. einer Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses im Morris-Wasserlabyrinth-Test (Moosmang et al., 2005). Im Gegensatz dazu fand White et al. (2008) nicht einen solchen Effekt im Morris-Wasserlabyrinth, aber berichtet von kognitiven Defiziten im räumlichen Lernen. Dies wurde von weiteren Studien bestätigt, die zeigten, dass eine Deletion von *Cacna1c* im Vorderhirn von Mäusen eine Veränderung im räumlichen Lernen (Dedic et al., 2018; Kabir et al., 2017b; Moosmang et al., 2005), in sozialen Präferenzaufgaben (Dedic et al., 2018; Kabir et al., 2017a) und im Umkehrlernen (Dedic et al., 2018) aufweist. Auch heterozygote Ratten zeigten Beeinträchtigungen beim Umkehrlernen (Sykes et al., 2019). Andererseits zeigten Studien an heterozygoten Ratten keinen Effekt

bei der sozialen Präferenz Aufgabe (Bader et al., 2011; Dedic et al., 2018) und sogar bessere Leistungen bei der Objektwiedererkennung (Zanos et al., 2015).

Andere Studien belegen, dass haploinsuffiziente Nagetiere eine erhöhte Ängstlichkeit aufweisen (Bader et al., 2011; Dao et al., 2010; Lee et al., 2012). Die Amygdala spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Angst (Moosmang et al., 2005) und bei der allgemeinen Funktion des limbischen Systems, die bei neuropsychiatrischen Erkrankungen eine Rolle spielt (Krishnan und Nestler, 2010). Es ist bekannt, dass LTCCs die Funktion der Amygdala sowie die von der Amygdala vermittelten Verhaltensweisen modulieren (Bauer et al., 2002, Langwieser et al., 2010; Niikura et al., 2004). Mithilfe eines konditionalen Knock-out-Mausmodells sowie pharmakologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass $Ca_v1.2$ die relevante genetische LTCC-Isoform im Thalamus-Amygdala-Weg darstellt (Langwieser et al., 2010). Weitere Studien mit genetisch veränderte Mäuse weisen auf eine entscheidende Rolle der $Ca_v1.2$ -Kanäle bei der Furchtkonditionierung hin (Busquet et al., 2008). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Konzentration des $Ca_v1.2$ -Proteins in der Amygdala als Reaktion auf die Furchtkonditionierung bei Ratten erhöht ist (Shinnick-Gallagher et al., 2003). $Ca_v1.2$ -Kanäle spielen auch eine Rolle beim beobachtenden Furchtlernen, wie die Beeinträchtigung des beobachtenden Furchtlernens in einem Mausmodell mit einer selektiven Deletion von $Ca_v1.2$ -Kanälen im anterioren cingulären Kortex zeigt (Jeon et al., 2010). Ein erhöhtes Angstverhalten wird jedoch nur bei einem Funktionsverlust von $Ca_v1.2$ beobachtet. Bei einem Funktionsgewinn von $Ca_v1.2$, wie er beim Timothy-Syndrom beim Menschen zu beobachten ist, kommt es bei Nagetieren zu keinen Veränderungen (Bader et al., 2011).

In Bezug auf die Rolle des *Cacna1c*-Gens bei wirksamen Störungen sind die Ergebnisse noch nicht einheitlich. Es wurden nur wenige Studien durchgeführt, die von einem antidepressiven Phänotyp im Zusammenhang mit dem *Cacna1c*-Gen berichten (Dao et al., 2010; Lee et al., 2012). Dao et al. (2010) haben gezeigt, dass heterozygote *Cacna1c*-Mäuse weniger exploratives Verhalten, eine verringerte Hyperlokomotion nach d-Amphetamine-Administration und antidepressives Verhalten zeigen. Dabei wurde letzteres untersucht, indem die Subjekte zum Schwimmen gezwungen (engl. „forced swim test“) und in dem die Mäuse kurzfristig durch das Aufhängen mit dem Schwanz an eine Stange (engl. „tail suspension test“) unausweichlichem Stress ausgesetzt wurden. Während eine zuvor veröffentlichte Studie von Dao et al. (2010) Hinweise auf einen "belastbaren, stimmungsstabilisierenden Phänotyp" bei heterozygoten *Cacna1c*-Mäusen fand, berichtete eine andere Studie von erhöhter Angst im erhöhten-Plus-Labyrinth, aber nicht von solchen Verhaltenstendenzen im Offenfeld (Lee et al., 2012). Daher können keine Rückschlüsse auf einen spezifischen Phänotyp gezogen werden, der mit *Cacna1c* assoziiert ist, und es sind weitere Untersuchungen erforderlich.

iii. 50-kHz USV in *Cacna1c*-Ratten

Mit umfangreichen Experimenten wurden Verhaltensänderungen bei *Cacna1c*-haploinsuffizienten Ratten untersucht, z. B. in Bezug auf soziale Interaktion, Spielverhalten und Emission von USV (Kisko et al., 2018, 2020; Kircher et al., 2019; Redecker et al., 2019; Wöhr et al., 2021). Die Messung der USV kann Aufschluss über Beeinträchtigungen der sozialen Interaktion und Kommunikation geben (Silvermann et al., 2010; Wöhr & Scattoni et al., 2013). Defizite in der Kommunikationsfähigkeit gehören zu den Kernsymptomen der psychischen Störungen (Bai et al., 2019; Cattane et al., 2018; Hirschfeld et al., 2000; Kennedy & Adolphs, 2012). Frühere Ergebnisse unterstützen dies, da *Cacna1c*-haploinsuffiziente Weibchen während direkter wechselseitiger sozialer Interaktion weniger 50-kHz USV vokalisieren (Redecker et al., 2019). Andere Befunde mit männlichen Ratten desselben Genotyps zeigen ähnliche Ergebnisse, da diese nicht nur eine geringere Anzahl an Rufen während des Rough-and-Tumble-Spiels ausstießen, sondern sich auch die Rufsubtypen unterschieden. Die Flat- und Mixed-Rufe waren reduziert (Kisko et al., 2018). Darüber hinaus war auch das soziale Annäherungsverhalten an 50-kHz USV während des Playback-Paradigmas bei haploinsuffizienten Ratten reduziert (Kisko et al., 2018, 2020). Dieser auffällige Effekt auf die Emission von 50-kHz USV wurde jedoch bei Weibchen im Spielverhalten (engl. „rough-and-tumble-play“) nicht festgestellt (Kisko et al., 2020, 2021). Dennoch stießen die Weibchen im Vergleich zu den Kontrolltieren mehr Step-Rufe aus. Die höhere Anzahl von Rufen während dieses Spielverhaltens bei den Weibchen ging mit einer verstärkten Hypermaskulinisierung während des Spieles bei den haploinsuffizienten Weibchen einher. Dies deutet auf Geschlechtsunterschiede in der *Cacna1c*-Haploinsuffizienz hin (Wöhr et al., 2021).

In Studie 2 der vorliegenden Arbeit wurde ein *Cacna1c*-Rattenmodell verwendet, um die Auswirkungen des Gens auf das Sign-und Goal-Verhalten und den Affektzustand mithilfe der Messung von USV während der Performance zu untersuchen. Da in gewissem Maße von einem neurobiologischen Zusammenhang zwischen allen drei Parametern ausgegangen wird, wird eine gegenseitige Beeinflussung der Korrelate angenommen. Im Hinblick auf die Übertragung auf den Menschen ist das Rattenmodell in gewisser Weise vorteilhafter und anwendbarer als das der Maus, da Ratten sehr soziale Tiere sind (Ellenbroek & Youn, 2016; Homberg et al., 2017). Daher wurden Ratten verwendet, um die zugrunde liegenden neurologischen Schaltkreise auszuarbeiten, die mit der Entwicklung und Interaktion bei diesen Störungen in Verbindung stehen. Aufgrund der Erkenntnisse aus humanen Studien, dass Frauen stärker von affektiven Störungen betroffen sind (Takeuchi et al., 2018; Witt et al., 2014) und des Wissens über Geschlechtsunterschiede aufgrund der *Cacna1c*-Haploinsuffizienz (Braun et al., 2018; Kisko et al., 2020; Redecker et al., 2019), wurden ausschließlich weibliche Subjekte in diesem Dissertationsprojekt untersucht.

IV. Studiendesign

Ein transgenes *Cacna1c*-Rattenmodell basierend auf dem Sprague-Dawley-Rattenstamm, das mit Hilfe der Zinkfingernuklease-Technologie erzeugt wurde (für eine Übersicht siehe: Geurts et al., 2009), wurde verwendet, um heterozygote *Cacna1c*^{+/-} Ratten zu züchten. Die *Cacna1c*-Deletion bei den Basenpaaren 460649-460652 bp des Genoms verursachen eine Reduktion von 50 % der mRNA, die zu einem globalen Verlust von Ca_v1.2 führt, wird dann durch die Verpaarung heterozygoter *Cacna1c*-Männchen mit wildtyp Weibchen von Charles River übertragen (Kisko et al., 2018, 2020). Demnach weisen die heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} Nachkommen, im Vergleich zu ihren *Cacna1c*^{+/+} Wurfgeschwistern, eine 50 %-ige Verringerung des Ca_v1.2-Proteinspiegels im Gehirn auf (Kisko et al., 2018). Die Tiere wurden in der Philipps-Universität Marburg gezüchtet.

Substantiell ist, dass Veränderungen des *Cacna1c*-Gens bisher fast ausschließlich bei männlichen Tieren untersucht wurden sind (Bader et al., 2011; Dedic et al., 2018; Kabir et al., 2017a; Terrillion et al., 2017), was zu einem geschlechtsspezifischen Verzerrungseffekt führen kann (Beery & Zucker, 2011). Studien haben gezeigt, dass weibliche Individuen stärker von Veränderungen in dem *Cacna1c* bzw. *CACNA1C*-Gen betroffen sind (Braun et al., 2018; Kisko et al., 2020; Redecker et al., 2019; Takeuchi et al., 2018; Witt et al., 2014). In dieser Studie wurden ausschließlich 34 weibliche *Cacna1c*^{+/-} und 38 *Cacna1c*^{+/+} Wurfgeschwister getestet.

Für die Bestimmung des Genotyps der Nachkommen wurden zwischen dem postnatalen Tag (PND, engl. „postnatal day“) 4 und 6 circa ~0.3 cm Schwanzbiopsie entnommen. Die Probenaufbereitung für die DNA-Isolation erfolgte mit dem Qiagen DNAeasy Blood & Tissue Kit (Hilden, Deutschland). Die Proben wurden zur Kollaboration nach Mannheim für die Genotypisierung versandt. Die verwendeten Primer für die Genotypisierung sind GCTGCTGAGCCTTTTATTGG (*Cacna1c* Cel-1 Forward) und CCTCCTGGATAGCTGCTGAC (*Cacna1c* Cel-1 Reverse). Die Individuen werden direkt bei der Entnahme an den Pfoten tätowiert für die spätere Identifikation. Ab dem PND 21 werden die Jungtiere von der Mutter getrennt und in Gruppen von 4-6 Geschlechter-getrennten, Genotyp-gemischten Polycarbonat Makrolon Typ IV Käfigen gehalten. Um Stress bei den Experimentaltieren zu vermeiden, wurde mit allen Tieren vor Beginn der Experimente eine dreitägige Handling-Prozedur durchgeführt. Darauf folgte die Testdurchführung.

Zwischen PND 40 und 45 wurde die Ratten für ein allgemeines Screening des Spontanverhaltens im Offenfeld an zwei aufeinanderfolgenden Tagen habituiert und getestet. Die Beobachtung der Psychomotorik, des Erkundungsverhaltens, der Ängstlichkeit und Risikobereitschaft sowie der Aussendung von USV-Rufen könnte Aufschluss über vorprogrammierte Persönlichkeitseigenschaften

der Versuchstiere geben und bei einem eventuellen Vergleich der Testergebnisse von Individuen über verschiedene Paradigmen hinweg hilfreich sein.

Zu Beginn der Testung wurden die Tiere an die Futterpellets in ihren Heimkäfigen gewöhnt. Das darauffolgende Pretraining und das PCA-Paradigma zur Bestimmung des Sign- und Goal-Verhaltens wurden in einer Skinner Box durchgeführt, die einen einziehbaren Hebel, einen Pelletsponder, ein Mikrophon und eine Kamera enthält. Vor Beginn des PCA-Trainings wird ein Shaping-Phänomen eingesetzt, um die gewünschte Reaktion erfolgreich zu verstärken. Während des Shapings, das im Folgenden als Pretraining bezeichnet wird, wird Futter aus dem Pelletsponder in die Konditionierungskammer abgegeben, damit die Individuen die Assoziation zwischen Pelletsponder und Futter erlernen. Es ist bekannt, dass Futter eine gute Verstärkung für hungrige Tiere ist, da diese das Bedürfnis des Wiedereintrittes des Ereignisses verspüren. Den Versuchstieren wurde jedoch kein Futter vorenthalten. Es wurden Futterpellets mit Bananengeschmack verwendet. Da alle Subjekte die Pellets verzehrten, wurden keine Ratten von der Studie ausgeschlossen. Nach dem Pretraining wurden die Tiere an fünf aufeinander folgenden Tagen zwischen PND 45 und 60 der PCA-Aufgabe unterzogen. Ein einziehbarer Hebel signalisierte 8 Sek. vorher die bevorstehende Futterausgabe. Es ist zu beachten, dass im Gegensatz zur operanten Konditionierung, bei der das Ergebnis von der Reaktion der Ratte abhängt, das Ergebnis hier unabhängig von dem Verhalten präsentiert wird. Mit anderen Worten: Das Futter wird unabhängig von der Reaktion der Individuen auf den Hebel geliefert. Während des 5-tägigen PCA-Trainings wurde das Sign- und Goal-Verhalten gemessen. Die Extinktion diente dazu, die erlernte Reaktion auszulöschen, d. h. der Reiz wurde nicht mehr mit dem Ergebnis verknüpft. Das in Abbildung 3 dargestellte Fließdiagramm zeigt den Versuchsablauf.

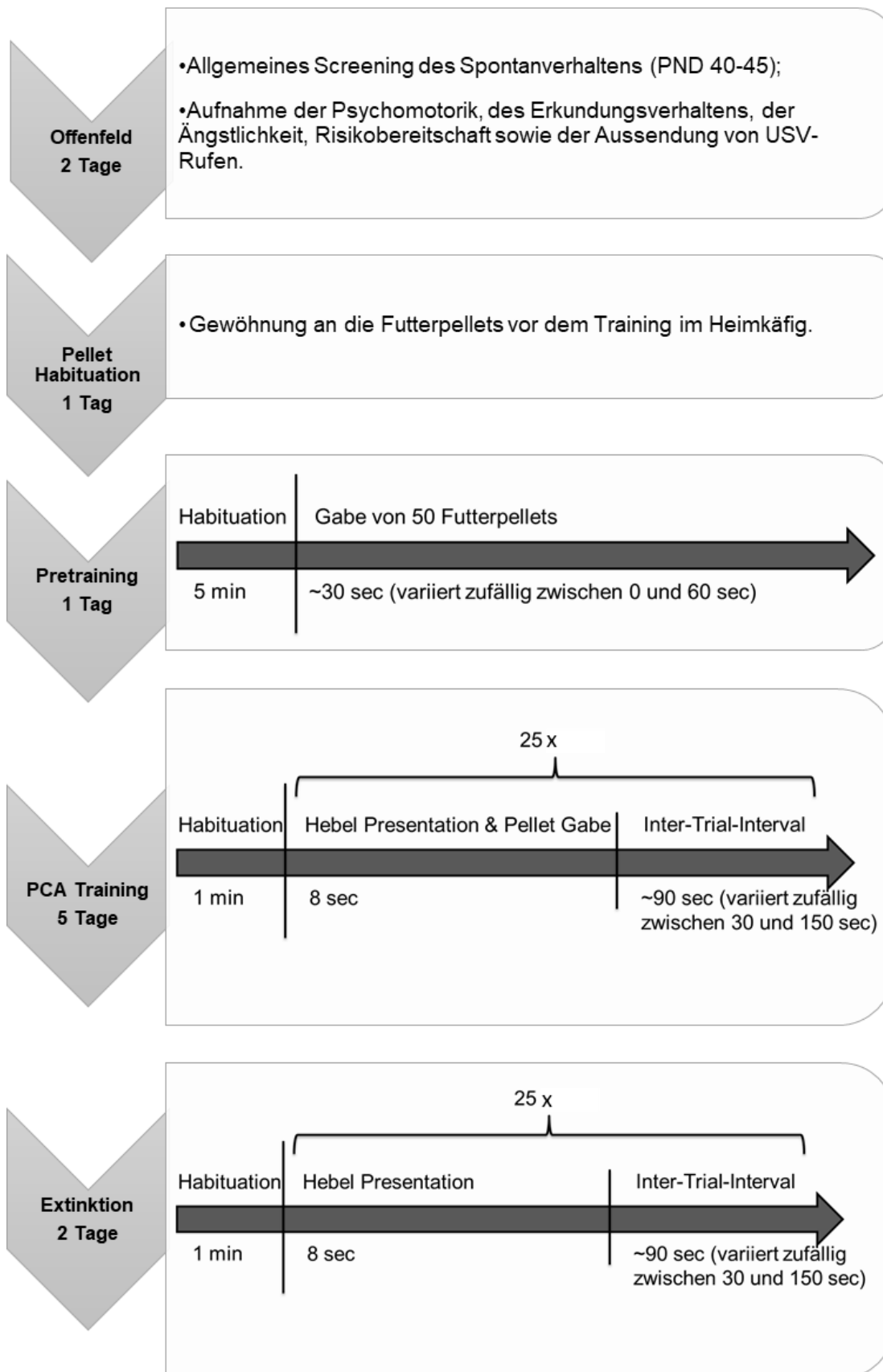


Abbildung 3: Studiendesign. Flow Chart mit der Darstellung der Vorgehensweise.

V. Zielsetzung

In diesem Projekt wurde ein etabliertes Rattenmodell für Sign- und Goal-Tracking verwendet, um die Rolle externer und interner Faktoren und Mechanismen, die diesen Phänotypen zugrunde liegen, zu untersuchen. In den bisher publizierten ST- und GT-Paradigmen wurde noch keine USV während des Testens aufgenommen, die den aktuellen appetitiven Zustand des Subjektes widerspiegeln. Auch wenn bekannt ist, dass Ratten in sozialen Interaktionen tendenziell mehr Rufen, kann aufgrund des appetitiven Belohnungsparadigmas davon ausgegangen werden, hier auch die 50-kHz Rufe zu sehen, wenn auch nicht in der Häufigkeit wie bei sozialen Interaktionen. In Studie 1 lag das Interesse in erster Linie auf das Verhalten der Ratten bei pawlowscher Annäherungskonditionierung. Zudem wurde in der Extinktion begutachtet, inwiefern dies Auswirkungen auf das Sign- und Goal-Verhalten und auf die USV hat. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es bestimmte Verhaltensmerkmale gibt, die spezifisch für das ST oder GT sprechen, aufgrund derer dieses Verhalten prognostiziert werden kann. In Anbetracht des neurobiologisch DAergen Ansatzes des ST- und GT-Verhaltens wie auch der Aktivität des mesolimbischen DA-Systems bei Belohnung und der Emission von appetitiven 50-kHz Rufen wird vermutet, einen positiven Zusammenhang zwischen diesen zu beobachten. Konkret wird angenommen, dass die Individuen, die sich mehr mit dem Signal, welches die Belohnung ankündigt, beschäftigen, die sogenannten ST auch mehr 50-kHz Rufe von sich geben.

Studie 2 ist eine Folgestudie aufbauend auf der ersten Studie, wobei der Schwerpunkt auf der genetischen Komponente lag. Konkret wurde das Sign- und Goal-Paradigma auf das genetische *Cacna1c*-Rattenmodell angewandt. Das *CACNA1C*-Gen wird als Risikogen für die Entwicklung vieler psychischer Störungen mit Defiziten in der sozialen Interaktion und Kommunikation sowie des affektiven Zustandes diskutiert (Dao et al., 2010; Green et al., 2010; Heyes et al., 2015). Zudem ist bekannt, dass Frauen stärker von der Mutation des *CACNA1C*-Gens betroffen sind als Männer (Takeuchi et al., 2018). Hier wurde der Schwerpunkt darauf gesetzt, inwieweit die *Cacna1c*-Haploinsuffizienz in Weibchen Verhaltensauffälligkeiten darstellen, die sich auf das Sign- und Goal-Paradigma auswirken. Beruhend auf bekannten Veränderungen im mesolimbischen DA-System bei genetischen Veränderungen in *Cacna1c* und behavioralen Abweichungen im Sozial- und Kommunikationsverhalten in *Cacna1c*^{+/-} Ratten wurde auch ein Effekt in diesem Paradigma erwartet. Da in Studie 1 die wildtyp Wurfgeschwister analysiert wurden, dienten diese untersuchten Wurfgeschwister in Studie 2 zum Vergleich der Phänotypen während des Sign- und Goal-Paradigmas und der Extinktion. Des Weiteren lag der Schwerpunkt auf die Prädiktion eines solchen Verhaltens aufgrund von Verhaltensmerkmalen wie den USV, die schon vorher in einem Screening gemessen wurden. Es wird prognostiziert eine geringere Anzahl der appetitiven Rufe im Gegensatz zu den zuvor getesteten *Cacna1c*^{+/+} Weibchen, begleitet von einem geringeren ST-Verhalten zu sehen.

VI. Publikationen

i. Zusammenfassung der Publikationen

Studie 1: Ultrasonic vocalizations and individual differences in rats performing a Pavlovian conditioned approach task

Sangarapillai, N., Ellenberger, M., Wöhr, M., Schwarting, R.K.W. (2021) Ultrasonic vocalizations and individual differences in rats performing a Pavlovian conditioned approach task. *Behavioural Brain Research*, 389, 112926. <https://doi.org/10.1016/j.brr.2020.112926>

Zusammenfassung

Ratten emittieren deutlich unterscheidbare Typen von USV, unter anderem 50-kHz Rufe, die vor allem in appetitiven Situationen auftreten. Es wird angenommen, dass solche 50-kHz USV einen positiven affektiven Zustand reflektieren, beispielsweise in Belohnungsantizipation und mit der Dopamin-Signalisierung zusammenhängen. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob Ratten während der pawlowschen Konditionierung 50-kHz USV aussenden, inwieweit diese auf ein Verhaltensmerkmal hinweisen und mit dem Sign- und Goal-Verhalten assoziiert werden können. Es wurde angenommen, dass die Individuen, die sich mehr mit dem Signal, welches die Belohnung ankündigt, beschäftigen, die sogenannten Sign-Tracker auch mehr 50-kHz Rufe von sich geben. Um dies zu untersuchen wurde bei 34 weiblichen Ratten die USV während der Ausführung des pawlowschen Paradigmas und der Extinktion aufgenommen. Es wurde eine starke subjektabhängige Variabilität bei der Rufrate von 50-kHz USV beobachtet. Diese waren über das Paradigma hinweg stabil und deuten somit auf keine Beeinflussung durch Zustandsunterschiede (engl. „state-differences“) hin. Im Allgemeinen zeigten die getesteten Ratten eine Verschiebung zum Goal-Tracking. Nichtsdestotrotz emittierten die Individuen, die eine höhere Interaktion mit dem Signal hatten, welches die Futterbelohnung annonciert, auch eine höhere Anzahl appetitiver 50-kHz Rufe.

Dies stützt die These, dass Sign-Tracking positiv mit der Emission von 50-kHz USV assoziiert ist. Es wird appelliert, der starken subjektabhängigen Variabilität in der Emission von 50-kHz Rufen spezielle Aufmerksamkeit in zukünftigen Studien zu widmen.



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Ultrasonic vocalizations and individual differences in rats performing a Pavlovian conditioned approach task

Nivethini Sangarapillai^{a,b}, Marek Ellenberger^{a,b}, Markus Wöhr^{a,b,c}, Rainer K. W. Schwarting^{a,b,c,*}

^a Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Faculty of Psychology, Philipps-Universität Marburg, Gutenbergstr. 18, D-35037 Marburg, Germany

^b Center for Mind, Brain, and Behavior (CMBB), Hans-Meerwein-Str. 6, D-35032, Marburg, Germany

^c Laboratory for Behavioral Neuroscience, Department of Biology, Faculty of Science, University of Southern Denmark, Campusvej 55, DK-5230, Odense M, Denmark

ARTICLE INFO

Keywords:

50-kHz ultrasonic vocalizations
Pavlovian conditioning
Incentive value
Sign-tracking
Goal-tracking
Dopamine

ABSTRACT

Rats emit distinct types of ultrasonic vocalizations (USV), including high-frequency 50-kHz USV, which occur in appetitive situations. Such 50-kHz USV are thought to reflect positive affective states, for example in case of reward anticipation, and are linked to dopamine signaling. The present study was conducted to investigate whether rats emit 50-kHz USV during a Pavlovian conditioned approach task and whether trait-like differences in 50-kHz USV emission are associated with sign- versus goal-tracking. We hypothesize that individuals engaging more with a cue predicting a food reward will also elicit more 50-kHz USV. In order to test this, we investigated 34 female rats and gauged USV while they underwent a Pavlovian conditioned approach training and extinction paradigm. For one, we found a high subject-dependent variability in the emission of 50-kHz calls. These were not largely affected by state differences, since these 50-kHz USV were observed throughout the task. During task progress and in most subjects, there was a rather complete shift toward goal-tracking, but subjects engaging more with the cue predicting a reward also emitted higher numbers of appetitive 50-kHz calls. This supports the hypothesis that sign-tracking is positively associated with the emission of 50-kHz USV. The high subject-dependent variability in the emission of 50-kHz calls warrants special attention in future appetitive studies.

1. Introduction

Through repeated pairing of a cue with an unconditioned rewarding stimulus, the cue [1] acquires rewarding properties itself, a process known as incentive salience [2]. This means that the presentation of the cue itself in absence of the reward is sufficient enough to evoke a response [3]. We used an established Pavlovian task, which allows dissociating the predictive value from the incentive motivational value of a reward cue. In this Pavlovian conditioned approach (PCA) task, rats show individual differences in the sensitivity to the conditional stimulus: So-called sign- and goal-trackers not only respond differently to cue vs. reward presentation, but also behave differently to expectation violations, i.e. concerning extinction or changes in response/outcome contingencies [3,4]. The classification in sign- and goal-trackers is based on rats' approach behavior, either to the sign (lever) predicting the reward or the goal (food cup) itself [1]. Previous studies have shown that sign-compared to goal-trackers can display enhanced impulsivity and deficits

in response inhibition [5–8] together with less attentional control [9], possibly due to lower levels of cortical acetylcholine [10]. In addition, sign-trackers have an increased activity of bottom-up subcortical control [11–13], especially in the mesolimbic dopamine system [14]. Further, sign-trackers show a higher tendency to develop addiction-like behavior by preferring a cocaine unconditioned stimulus over a food US [15]. This individual variation in their behavior, referred as the tendency to attribute incentive salience to reward cues, is discussed to reflect a personality trait.

Presentation of cues or rewards evokes different responses in rodents, including the production of ultrasonic vocalizations (USV). Gauging such USV may help us gaining insight into both, the current emotional state of a rat as well as the subjects' traits [16,17]. Adult USV can be classified into two categories based on their frequency: so-called 22- and 50-kHz USV [18–20]. Both serve a communicative function and may also represent the motivational and affective state of the individual [19,21,22]. While 22-kHz calls, also known as 'alarm', 'distress' or

* Corresponding author at: Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-Universität Marburg, Gutenbergstr. 18, 35037, Marburg, Germany.

E-mail address: schwarki@staff.uni-marburg.de (R.K.W. Schwarting).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112926>

Received 20 May 2020; Received in revised form 20 August 2020; Accepted 18 September 2020

Available online 10 October 2020

0166-4328/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

'threat' calls [23,24], are emitted in aversive situations [25–27] and are associated with fear and anxiety [28,29], 50-kHz calls are typical for situations with a positive emotional valence and are emitted in appetitive or reinforcing stimulus, e.g. mating [30], play [31]. In addition, 50-kHz calls have been proposed to reflect anticipation of reward, and reward-related cues [31–36]. At the neurobiological level, the emission of appetitive 50-kHz USV is associated with dopamine activity in reward-related brain areas, especially the nucleus accumbens [37,38].

Besides such state-related aspects, several studies have shown stable individual differences in the emission of 50-kHz USV in rats, often associated with dopaminergic signaling [16,17,39]. Previous studies have shown that the dopaminergic system is differentially involved in animals responding to cue vs. reward presentation [14]. Tripi et al. [40] have reported a relationship between sign-tracking and 50-kHz USV, showing that the vocalization response to cocaine differs strongly between animals depending on their behavior in the PCA task. To the best of our knowledge, however, 50-kHz USV have not yet been investigated in the PCA task itself and to fill this knowledge gap, the present study was performed.

In this study, rats underwent an initial USV screening procedure [41], in order to investigate whether possible traits seen in the PCA training can already be identified beforehand on the basis of USV and overt behavior in an activity box. We assumed to find a positive relationship, not only between USV and sign-tracking behavior, but also locomotion and rearing, since these are also related to the dopaminergic system [42]. Also, we were interested in gauging USV over the testing days. We hypothesized that if the dopaminergic reward pathway is more prominent in rats showing a higher tendency towards the cue and if 50-kHz calls are elicited in response to the activation of the mesolimbic dopamine neurons, then this behavior should also be accompanied by the emission of more dopamine-associated 50-kHz USV.

2. Method

2.1. Subjects

The rats of the present study were part of a larger project involving wildtype Sprague-Dawley and heterozygous *Cacna1c* rats [43]. Out of these, 34 wildtype female rats were used, which were the offspring of breeding wildtype females obtained from Charles River (Sulzfeld, Germany) with male heterozygous *Cacna1c* rats. Breeding was performed in our own facility. The rats were group-housed in polycarbonate Macrolon Type IV cages (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Germany), and kept under standard laboratory conditions (22 ± 2 °C and 40–70 % humidity) on a 12 h light/dark cycle with ad libitum access to water and food. The rats were handled for three consecutive days prior to testing.

2.2. Ethics approval

All procedures were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and the relevant local or national rules and regulations of Germany.

2.3. Activity box

Locomotor activity, rearing and center time were measured in an activity box (40 × 40 cm) on two consecutive days (10 min each, between postnatal days 40–45) using an automated infrared system (Tru Scan, Photobeam Sensor E63-22, Coulbourn Instruments, Allentown, PA, USA). Testing was performed under dim red light (5–6 Lux) and at least 3 days before PCA training.

2.4. Pavlovian conditioned approach (PCA) training

Sign- and goal-tracking behavior was analyzed using the PCA

training paradigm as previously described by Fitzpatrick and Morrow [1]. The rats, which were not food-deprived, were tested between postnatal days 45–60 in four conditioning chambers (MED Associates Inc., St Albans, VT; 20.5 × 24.1 cm floor area, 29.2 cm high). The floor was constructed from stainless steel rods. The center of one wall was equipped with a food magazine located 6 cm above the grid and connected to a pellet dispenser. An illuminated retractable lever was located 9 cm above the floor and 2.5 cm to the left of the pellet dispenser. An infrared photo-beam located inside the food magazine recorded head entries into the food cup. Head entries and lever presses were assessed using the MedAssociates software (version IV). Testing was performed under dim red light of 5–6 Lux.

Pre-training: Before starting PCA training, rats were familiarized with the later rewards, i.e. banana-flavored pellets (45 mg, Dustless Precision Pellets, BioServ) in their home cages. On the following day, they were exposed to the conditioning chamber with the lever retracted. In this pre-training session and after 5 min of habituation, 50 food pellets were delivered in a variable time interval of ~30 s, varying randomly between 1 s and 60 s. The pre-training session lasted approximately 25 min.

PCA Training: The PCA training was conducted on five consecutive days with 25 trials in each session. After one min of habituation, the 1st trial started, where the illuminated lever was presented into the chamber for eight s (CS) and immediately upon lever retraction, a food pellet (US) was delivered, independent of the rats' response to the lever. The inter-trial intervals occurred on a variable time window of ~90 s varying randomly between 30 s and 150 s. Each training session lasted approximately 40 min.

Extinction: Two days of extinction followed on the day after the 5th day of PCA training. The procedure was identical to that of PCA training except that no pellet was delivered after lever retraction.

2.5. Ultrasonic recording and analysis

USV were monitored with UltraSoundGate Condenser CM16 Microphones (Avisoft Bioacoustics). In the activity box, the microphone was mounted 45 cm above the floor, and in the conditioning chamber 18 cm above the grid. The microphone was connected via an UltraSoundGate 416H USB audio device (Avisoft Bioacoustics) to a personal computer. The acoustic data were recorded with a sampling rate of 250,000 Hz in 16-bit format (recording range: 0–125 kHz) by Avisoft RECORDER USGH. For later acoustical analysis, recordings were transferred to DeepSqueak (version 2.5), a deep learning based system for detection and analysis of USV [44]. There, the recorded file was converted to a spectrogram and was analyzed with the pretrained automated 'short rat call network V2'. The call detection setting was on "high recall" using an overlap of 0.01 s in order to also detect noise rather than miss calls. The automatically detected events were then denoised using a custom trained network and manually reviewed by an experienced observer accepting (USV) or rejecting (noise) events, while classifying USV into flat, step, trill or mixed calls. For the categorization of the 50-kHz calls into these four subtypes, we followed previously established [45] and repeatedly applied criteria [46,47].

2.6. Data analysis/ statistics

Activity box: We used the paired *t*-test to compare rats' behavior between both days.

PCA Training: The comparisons between testing days were done with a repeated measurement ANOVA. The test was corrected with Greenhouse and Geisser in case of significance in the Mauchly test. Further, the lever deflections and magazine entries were measured and used to calculate the index scores of response bias, latency to approach and probability difference as shown in equation C.1.

$$\text{Response bias} = \frac{[\text{lever presses} - \text{magazine entries}]}{[\text{lever presses} + \text{magazine entries}]}$$

$$\text{Latency score} = \frac{[\text{magazine entry latency} - \text{lever press latency}]}{8 s}$$

$$\text{Probability difference} = [\text{lever press probability} - \text{magazine entry probability}]$$

Equation C.1: Formula used to calculate the index scores of response bias, latency of approach and probability.

This index score ranges between -1 and 1 depending on their approach behavior to the pellet magazine (-1) or the lever (1). The PCA index was computed with the average of these three values [1]. The scorings on day four and five of PCA training were used to characterize rats based on their approach behavior, either to the lever (sign-trackers; PCA index = 1) or to the food cup (goal-tracker; PCA index = -1).

USV: To compare USV, we either used the paired *t*-test when comparing two testing days or calculated the ANOVA for repeated measurements over several days. The ANOVA was corrected with the Greenhouse and Geisser test, in case of significance with the Mauchly test.

Correlations: The Pearson correlation coefficient was calculated between given behavioral parameters in order to identify their relationship.

For all measurements, statistical significance was defined as $p < 0.05$. Data are expressed as means \pm SEM.

3. Results

3.1. PCA training

To investigate approach behavior either to the lever (sign) or to the pellet receptacle (goal) during the eight seconds of CS presentation, we quantified the numbers and latencies of lever presses and magazine entries over all PCA training and subsequent extinction sessions (Fig. A1). There was a significant increase in the number of lever presses over PCA training days ($F_{1,7} = 8.914$, $p = 0.001$). This was due to an increase especially from PCA 2 to PCA 3 ($T_{33} = -2.222$, $p = 0.033$) and PCA 4 to PCA 5 ($T_{33} = -3.76$, $p = 0.001$). The first extinction session did not affect the lever pressing rates compared to the preceding PCA session. An effect of extinction was seen on extinction 2 where the number of lever presses decreased compared to extinction 1 ($T_{33} = 2.331$, $p = 0.026$). Furthermore, the number of magazine entries changed over PCA testing days ($F_{3,427} = 6.986$, $p < 0.001$). There was an increase on the second day compared to PCA 1 ($T_{33} = -3.478$, $p = 0.001$) and a decrease on the fourth day compared to PCA 3 ($T_{33} = 2.456$, $p = 0.019$). In addition, a clear extinction effect, i.e., a decrease in magazine entries, was present already during the first extinction session ($T_{33} = 6.735$, $p < 0.001$), which was even more prominent in the second session ($T_{33} = 5.389$, $p < 0.001$).

Over the five PCA training sessions, rats approached the lever faster ($F_{2,401} = 11.106$, $p < 0.001$), with shorter latencies on PCA 3 ($T_{33} = 2.265$, $p = 0.03$) and PCA 5 ($T_{33} = 3.696$, $p = 0.004$) compared to the respective preceding days (Fig. A1). Similar to the number of lever presses, extinction had no effect in the first session, but on the second day ($T_{33} = -2.704$, $p = 0.011$; Fig. A1).

Compared to the previous training day, rats approached the magazine faster on PCA 2 ($T_{33} = 3.794$, $p = 0.001$) PCA 3 ($T_{33} = 2.185$, $p = 0.036$), which lead to a significant difference over the PCA training days ($F_{3,096} = 9.989$, $p < 0.001$). In addition, extinction had a greater effect on the latency of magazine entries than on the lever presses. Already in the first extinction session, rats approached the magazine later ($T_{33} = 7.361$, $p < 0.001$) than during PCA 5. This effect became even more prominent on the second extinction day ($T_{33} = 6.591$, $p < 0.001$; Fig. A1).

The frequencies of responses (response bias), the latencies of approach either to the lever or the pellet dispenser within the eight seconds of CS interval (latency score) and the probabilities of approach were calculated as an index score, varying between -1 and 1 (Fig. A2). This index score shows the subject's engagement with either the CS (sign-tracker), where the index score is closer to 1 or with the eventual reward itself (goal-tracker), indicated by an index score closer to -1. While the index score of the response bias increased over the PCA sessions ($F_{2,707} = 6.116$, $p = 0.001$), primarily from day four to five ($T_{33} = 3.452$, $p = 0.002$), there was no significant difference in the latency score and in the probability of approach behavior over the PCA training days. However, all three parameter showed an increase in the index score on the first extinction day (response bias: $T_{33} = -2.956$, $p = 0.006$; latency score: $T_{33} = -5.795$, $p < 0.001$; probability difference: $T_{33} = -5.706$, $p < 0.001$), indicating that animals approached the lever more than the magazine during extinction, as illustrated in Fig. A2.

The average of the aforementioned index scores of response bias, latency score and probability difference was used to further characterize rats' tendency of approach towards the cue or the reward (Fig. A3). This score can vary between -1 (absolute goal-tracker) and 1 (absolute sign-tracker) and was calculated over all sessions (Fig. A3). The index score did not differ significantly from each other over the PCA training days. The most prominent effect was seen during extinction, when the index values were the highest ($T_{33} = -5.118$, $p < 0.001$).

When looking more closely at the last two training sessions, i.e. PCA 4 and 5, which were used to finally characterize rats as sign- or goal-trackers, we noticed a shift towards goal-tracking behavior (Fig. A3). Previous studies [1,48,49] characterized subjects as sign-trackers, when scoring between 0.5 and 1, and as goal-trackers, when scoring between -0.5 and -1. Based on these criteria, only 2 out of the 34 rats showed sign-tracking behavior, 11 rats showed goal-tracking behavior, and 21 rats showed no clear tendency.

All PCA index scores of the five Pavlovian approach training sessions correlated with each other, except for day one with day two (Table B1). No correlations were detected between the index scores of the extinction days and the first two training days. However, the PCA index scores of the extinction tests correlated positively with the last three PCA scores and became stronger over days. Also, the score of extinction day one correlated strongly with that of extinction day two.

3.2. 50-kHz USV during PCA training

During testing, we only saw 50-kHz calls and no 22-kHz calls. Descriptively, call rates were highest in the initial phase of PCA training, but statistically there was no significant change over days (Fig. A4).

We further conducted a detailed spectrographic analysis and classified USV into flat, step, trill or mixed calls, as illustrated in the spectrogram in Fig. A4. Throughout testing, there was a significant difference between subtypes (Pretraining: $F_{1,038} = 19.776$, $p < 0.001$; PCA 1: $F_{1,04} = 10.454$, $p = 0.002$; PCA 2: $F_{1,018} = 15.777$, $p < 0.001$; PCA 3: $F_{1,039} = 17.934$, $p < 0.001$; PCA 4: $F_{1,041} = 20.028$, $p < 0.001$; PCA 5: $F_{1,094} = 22.903$, $p < 0.001$; Ext 1: $F_{1,098} = 24.961$, $p < 0.001$; Ext 2: $F_{1,016} = 14.226$, $p = 0.001$). In general, most were flat calls, followed by steps (Fig. A5).

In addition, there was no difference in the numbers of call subtypes emitted over the PCA training days one to five, except for the trills ($F_{2,425} = 3.119$, $p = 0.04$). This was due to a decrease of trills on day two ($T_{33} = 2.294$, $p = 0.028$) and increase on day three ($T_{33} = -2.637$, $p = 0.013$) (Fig. A5). When comparing the pre-training session with the first PCA training session, there was only a difference in the mixed calls ($T_{33} = 2.778$, $p = 0.009$). There was no difference in call type numbers between PCA day five and the extinction sessions. Again, we saw a change in mixed calls (Fig. A5), which were more frequent on extinction day two ($T_{33} = -2.331$, $p = 0.026$).

Moreover, we investigated USV during daily sessions (Fig. A6). Notably, rats always called more in the beginning of a given session and

the number of calls decreased over time independent of training day. While there was a higher fluctuation during the first days, the within-session patterns became more stable in the subsequent tests.

Finally, we asked whether calling might have been more prominent during specific test phases, for example during or after the CS presentation. In order to address this question, we counted the number of calls and their subtypes on the fourth and fifth testing day during three 8 s periods, namely either prior to (pre CS), during (CS), and finally, after CS presentation (post CS; Fig. A7). While we found no statistical differences in the number of calls and call subtypes on PCA 4, there was a difference in the number of emitted calls on day 5 ($F_{1,76} = 5.078$, $p = 0.012$), since call numbers were higher pre CS compared to CS ($T_{33} = 2.242$, $p = 0.032$) and post CS ($T_{33} = 2.771$, $p = 0.009$). The flat ($F_{1,962} = 3.313$, $p = 0.044$) and step ($F_{1,171} = 4.412$, $p = 0.037$) USV also differed between the three phases, because of higher pre CS levels compared to post CS (flat: $T_{33} = 2.455$, $p = 0.02$; step: $T_{33} = -2.42$, $p = 0.021$).

3.3. Correlational analyses of PCA training

The number of calls were highly correlated with each other over all eight testing days, except for extinction 1 and 2 with PCA 4 (Table B2). We further analyzed the relationship between the PCA index score and the vocalizations. Notably, a positive correlation between PCA index score and 50-kHz USV emerged over PCA training days. (Table B3). We found no relationship between the PCA index score and the number of calls emitted during pre CS, CS and post CS (data not shown).

3.4. Activity box

Since we found a relationship between 50-kHz calls during PCA training and the PCA index score, we next asked whether there is a situation-independent trait that can be already seen in the emission of 50-kHz USV or in overt behavior recorded in the activity box. There, rats traveled significantly less on the second day ($T_{33} = 4.119$, $p < 0.001$), while rearing and the time spent in the center did not differ between days (data not shown). The number of 50-kHz USV emitted in the activity box remained stable between the two testing days (data not shown). When correlating the overt behavioral measures with 50-kHz USV emission, there were no substantial correlations on the first day. On the second day, rearing behavior was positively correlated with 50-kHz ultrasonic calling ($r = 0.469$; data not shown).

3.5. Correlational analyses

Comparing USV rates in the activity box test with those during PCA training and extinction (Table B4) showed that the numbers of calls on day two in the activity box correlated positively with call numbers during pre-training ($r = 0.643$), PCA 1 ($r = 0.643$), PCA 5 ($r = 0.347$) and Extinction 1 ($r = 0.415$).

When further looking into the correlations between USV recorded during PCA training and behavior in the activity box, we found a positive relationship between the number of calls during the PCA training sessions with the time spent in the center on both days of the activity box (Table B5). Furthermore, a negative correlation between the distance traveled on day two and the number of emitted calls during extinction was noticeable. The more rats traveled on day two, the less they called during extinction. Only a few correlations were seen between rearing and the number of calls. These were only seen on day one of the testing in the activity box. The number of 50-kHz USV recorded in the activity box did not correlate with the PCA index score (data not shown).

4. Discussion

The present study was conducted to investigate whether rats emit 50-kHz USV during the PCA task and whether trait-like differences in 50-kHz

emission are associated with sign-versus goal-tracking. We expected to find a relationship between the emission of 50-kHz USV and the PCA index score, as both of them are linked to the dopamine system. In general, rats emitted "positive" 50-kHz USV but no "negative" 22-kHz USV throughout the PCA task. Also, the animals' behavior was more shifted towards goal- rather than sign-tracking, as displayed in low PCA index scores. We found that the 50-kHz USV were positively associated with a tendency towards sign-tracking, but negatively associated with goal-tracking. Importantly, there was a high inter-individual variability in the emission of 50-kHz calls. While the PCA index score stabilized over the sessions, 50-kHz USV emission was stable over the sessions and there were no prominent state differences in the emission of 50-kHz calls.

4.1. USV emission was stable over both testing days in the activity box

A driving reason for investigating the subjects individually was that there is a high inter-individual variability in 50-kHz USV emission [41], which might be due to subject-dependent dispositions or traits, related to differences in specific physiological variables, especially mesolimbic dopamine [39,50]. In our current experiment, call rates in the activity box did not habituate with repeated testing as reported before by Brudzynski and Pniak [51]. Instead, call rates differed substantially between rats and were highly and positively correlated between testing days. Such stability over sessions in 50-kHz USV emission was also reported in other test, especially play behavior, open field testing with different bedding conditions, and during several days of repeated cage exposure [52]. Thus, our results indicate that such 50-kHz call patterns were not a response to novelty but are an indicator of a trait.

Only rearing behavior in the activity box was positively correlated with call rate, which could mean that animals being more curious also emitted more calls. However, this effect was only seen on the second day. Possibly, the effect of novelty is too high on the first day to see correlations between overt behavior and 50-kHz USV.

4.2. The PCA index score showed a behavioral shift toward goal-tracking behavior

Previous studies had shown, that the trait of showing either sign-tracking, goal-tracking or no clear tendency at all is more or less equally distributed among groups of rats [48,49], meaning that 1/3rd of the tested samples should show one of these traits. Unexpectedly, these criteria do not fit to our sample, since there was no such 1/3rd distribution. In fact, we found a strong shift towards goal-tracking behavior over days. Differences in the test paradigm cannot account for this discrepancy, since we tried to strictly follow the protocol by Fitzpatrick and Morrow [1]. Also, our choice of females is an unlikely factor, since Pitchers et al. [53] have reported no sex differences in the expression of this trait in the PCA paradigm. However, there might be differences between strains, at least in case of inbred ones (i.e. Lewis and Fischer) [54]. In addition, Fitzpatrick et al. [55] reported variability in sign- and goal-tracking behavior dependent on vendors in outbred stocks. They showed that SD rats acquired from Charles River displayed more goal-tracking behavior than those acquired from Harlan. These dissimilarities between strains might be due to genetic differences, which lead to different phenotypes. Our SD rat line was initially obtained from Charles River and we continued to breed them in our own facility. One could therefore assume a genetic drift. However, males used for breeding were regularly back-crossed and mated with SD females obtained from Charles River. Therefore, we can exclude a genetic drift in our breeding. This said, male breeders were haploinsufficient for *Cacna1c* as part of another ongoing study [43]. Although only wildtype offspring was used in the present study, it is known that *Cacna1c* haploinsufficient rats display behavioral alterations and differ in their USV emission from wildtype rats [56–58]. While male *Cacna1c* haploinsufficient breeders had no contact with their offspring, *Cacna1c* haploinsufficient and wildtype offspring were kept in the same litters together and this might have affected the

wildtype animals as well. Further studies are needed to investigate possible littermate effects and to determine the degree of genetic or environmental variables that influence PCA behavior. In general, the present nature of the shift towards goal-tracking is unclear and requires further experimental consideration in the future.

4.3. Goal-directed behavior was more affected by extinction than cue-directed behavior

In the last two sessions, namely extinction, the usual food reward was withheld while the lever together with the tone cue were still presented. While this omission initially had no effect on lever approach, a significant decrease in magazine approach (numbers, latencies) was observed already in the first extinction session. This effect got even more prominent in the second extinction session. By then, reward withdrawal also had an effect on lever pressing behavior. As predicted, this led to an increase of the PCA index score in the extinction session, indicating more approach behavior to the lever and a decreased approach behavior towards the pellet magazine. This result is similar to previous findings showing that expectation violations mostly affect outcome- in comparison to cue-directed behavior [49,59,60].

4.4. USV during the PCA task

Compared to the rather common application of 22-kHz USV measures in aversive fear conditioning [29,41,61], 50-kHz calls have only rarely been studied in tasks of appetitive Pavlovian or instrumental conditioning. Our findings further underline the theory that 50-kHz calls are emitted in affective situations, since we have not seen any 22-kHz aversive calls during our PCA paradigm. Other studies have already shown that rats emit 50-kHz calls not only in response to a reward, but also to its anticipation [31,33,62,63]. Willey and Spear [64] reported increased 50-kHz USV production in anticipation of a rewarding stimulus. However, it is unclear if the 50-kHz USV seen in our study are due to reward anticipation. During a given session, the highest calling rate was always seen in the early phase and declined to zero towards the end of each training session, which is in line with other evidence [41,51]. Throughout the session, the lever cue was presented in an unpredictable time, since the inter-trial interval varied randomly between each CS. If the 50-kHz calls were produced in anticipation of an expecting reward, we would expect to observe these calls in the CS period throughout the complete session. Yet this was not the case, since most calls were emitted in the first minutes of a given session and ceased thereafter. Alternatively, there might be higher general excitement in the beginning of each daily session, which then habituates over its course, resulting in a decrease of 50-kHz calls over time.

Most of the calls we recorded were of the flat variety and not the frequency-modulated one. Previously, it was suggested that frequency-modulated calls may be 'positive social interaction calls' and that flat calls serve as 'non-affective contact calls', which are emitted in search for the conspecifics [30,65]. This would explain why we mainly saw flat calls, especially in the beginning of the session, when rats were taken from their group cages and placed in the testing environment. This would indicate that the 50-kHz calls were not specific to the testing situation. However, the conditioning chamber may also have served as a contextual stimulus that elicited USV in the beginning of each session. Previous studies have already reported more 50-kHz calls during reward-related cues [32] and more appetitive calls in animals showing a higher sign-tracking behavior in a different paradigm [33]. Although most of the calls we recorded appeared during the habituation phase in the beginning, we also found differences between the number of calls when investigating the pre CS, CS and post CS phases on training day 5. However, most calls were emitted during pre CS which gradually decreased over CS and post CS. One could argue that the subjects were distracted by the lever and magazine during the CS and by the pellet in the post CS phases, which led to a decreased number of calls.

4.5. The PCA index score developed over sessions, while USV rates remained stable

Overall, the correlations of the daily PCA index scores got stronger over training days indicating strengthening of the expression of the phenotype over time. Besides, there was a substantial stability in USV emission. This was already seen in our first screening test in the activity box. Previously, Schwarting et al. [41] have provided evidence for inter-individual variability and intra-individual stability in 50-kHz USV emission, which suggests a subject-dependent disposition or trait. Similar findings were found in this study. Overall, high calling animals stayed as such over training days. These findings provide evidence in support of our hypothesis that USV are a strong trait marker. Tripi et al. [40] have reported strong evidence, that 50-kHz USV in response to cocaine differ between subjects depending on their performance in the PCA task. Our study further presents more insights of the current affective states of the individual subjects while performing the PCA task. We reason that if the dopaminergic reward pathway is more prominent in rats showing less interaction with the goal and if 50-kHz calls are elicited in response to the activation of the mesolimbic dopamine neurons, then more interaction with the sign should be accompanied by the emission of more dopamine-associated 50-kHz USV. The results of this study confirm this prediction, since we found that the number of 50-kHz calls correlated with the PCA index score.

The trait argument is also supported by the USV correlations measured during PCA training with those on the second day in the activity box. Furthermore, we noticed, that USV during the PCA was negatively correlated with center time in the activity box. Such a measure of center time is often taken as index of anxiety [66]; therefore, one can assume that 50-kHz USV is more likely in rats with a lower disposition for anxiety, which is in line with evidence from other paradigms [67].

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first study investigating 50-kHz USV in an established PCA task to study sign- and goal-tracking behavior. Female rats emitted positive 50-kHz USV but no negative 22-kHz USV during a Pavlovian conditioned approach task. Such 50-kHz USV possibly reflect trait-like socio-affective phenotypes, previously associated with dopamine signalling. In general, subjects showed a higher tendency toward goal-tracking. The 50-kHz USV were positively associated with sign-tracking, and negatively with goal-tracking. Our results furthermore show that call likelihood seems to be less affected by specific features of the task, and more by aspects of the individual test subjects. We recommend that such subject-dependent factors should receive special attention when investigating 50-kHz USV in PCA, but also other, conditioning paradigms.

Author statement

N.S., M.W. and R.S. conceived the original idea and designed the framework. N.S. and M.E. carried out the experiment and analyzed the data. N.S. wrote the original and revised manuscript with support from M.E., M.W. and R.S.. R.S. supervised the project.

Acknowledgments

This work is part of the DFG-funded Research Training Group "Breaking Expectation" (GRK 2271) and the Forschergruppe "Neurobiology of affective disorders: Translational perspectives on brain structure and function" (FOR 2107) and was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to Rainer K. W. Schwarting (GRK2271/WP10) and Markus Wöhr (GRK2271/WP14 and WO 1732/4-2). The authors wish to thank Theresa M. Kisko for her help in this project. The authors report no conflict of interest.

Appendix A

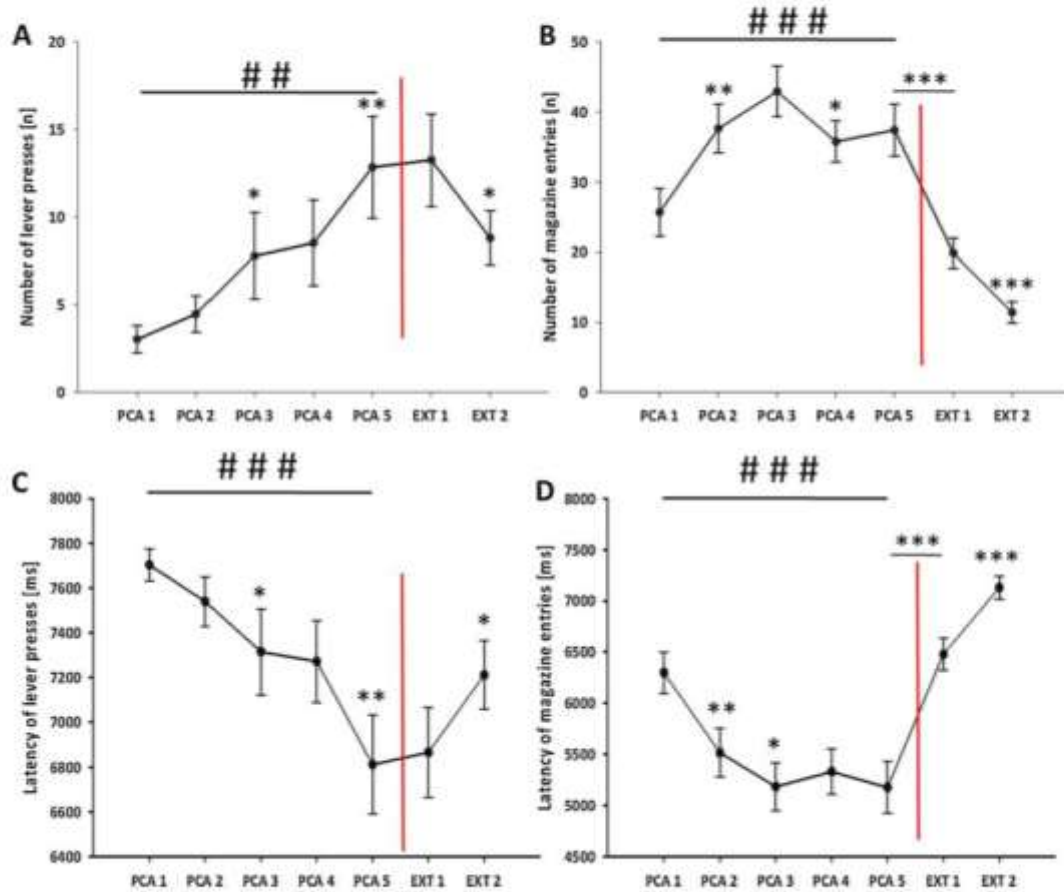


Fig. A1. Number of lever presses (A) and magazine entries (B) and latency of lever presses (C) and magazine entries (D) during the eight seconds of CS presentation. An ANOVA (## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$) was calculated over all five PCA training days and the *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phase (PCA and extinction).

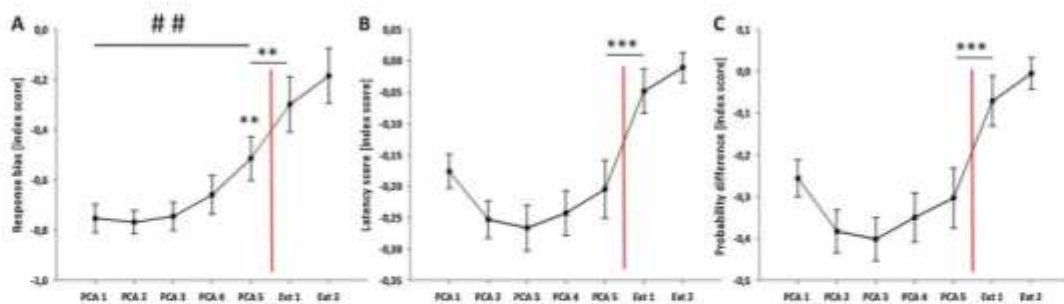


Fig. A2. The index scores of the response bias (A), latency score (B) and probability difference (C) over all testing days. An ANOVA (## $p < 0.01$) was calculated over all five PCA training days and the *t*-test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phase (PCA and extinction).

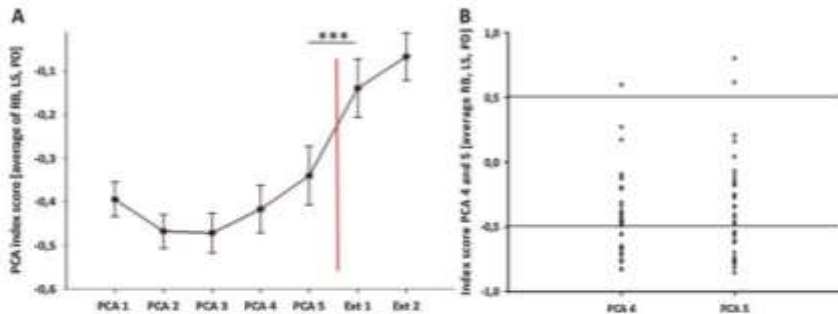


Fig. A3. The overall PCA index scores, calculated as the average of the response bias (RB), latency score (LS) and probability difference (PD), over all testing days (A). An ANOVA was calculated over all five PCA training days and the *t*-test ($*** p < 0.001$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phase (PCA and extinction). The index scores of the individual subjects, calculated as the average of the response bias, latency score and probability difference, on PCA training day four and five (B).

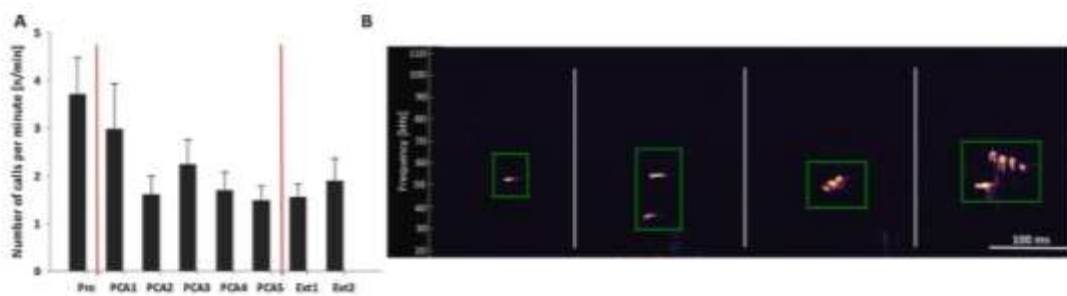


Fig. A4. Comparison between the number of 50-kHz calls during PCA training and extinction in female Sprague-Dawley rats ($N = 34$) (A). An ANOVA was calculated over all five PCA training days and the *t*-test was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phases (pretraining, PCA and extinction). A USV spectrogram showing flat, step, trill and mixed 50-kHz calls (from left to right) (B).

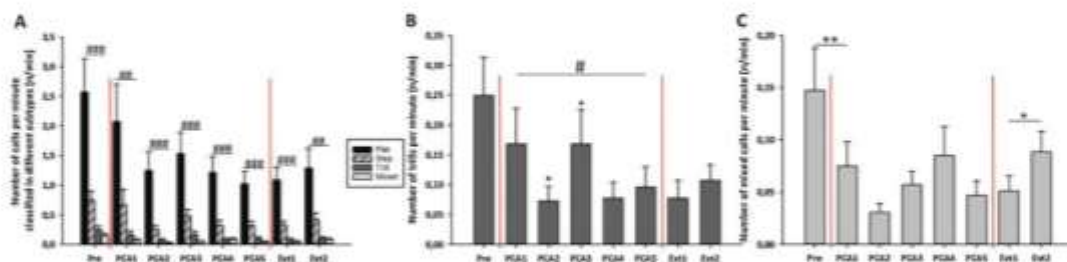


Fig. A5. Number of flat, step, trill and mixed calls in the PCA paradigm (A). An ANOVA ($\# p < 0.05$; $\#\# p < 0.01$; $\#\#\# p < 0.001$) was calculated between the call subtypes within each testing day. Number of trills (B) and mixed (C) calls over all training days. An ANOVA ($\# p < 0.05$) was calculated over all five PCA training days and the *t*-test ($* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phases (pretraining, PCA and extinction).

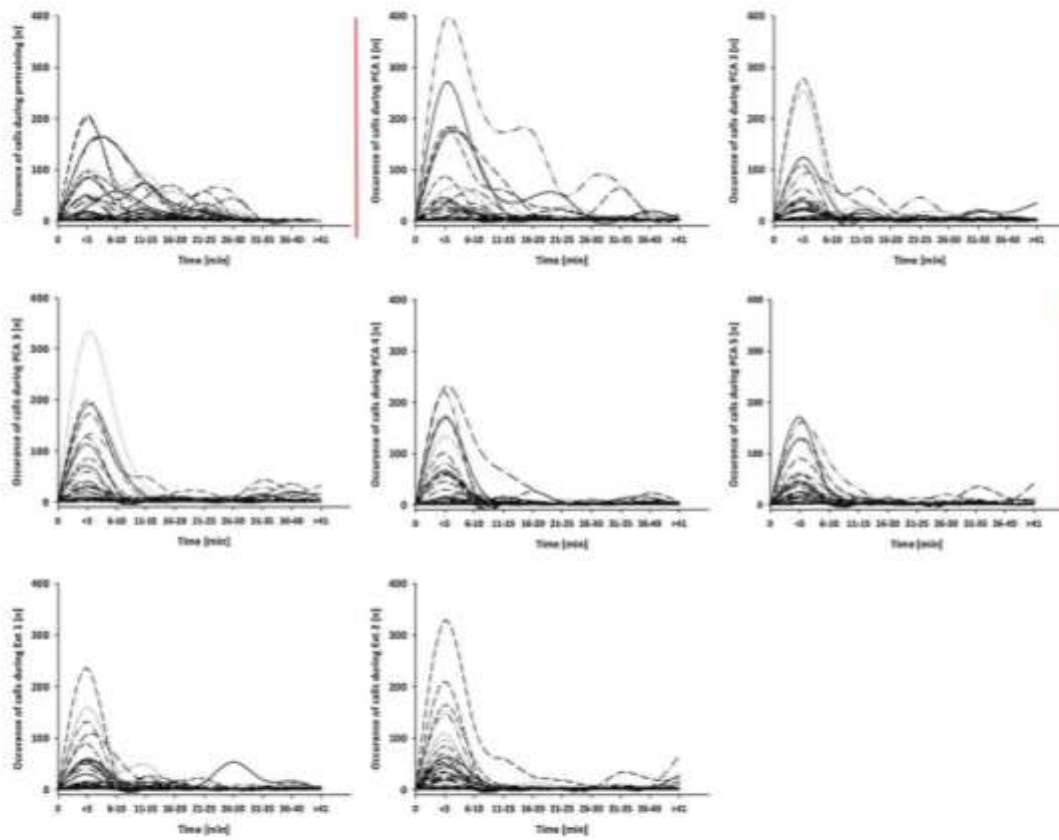


Fig. A6. USV occurrence over time in five-minute bins during the different days of PCA training and extinction. The red line indicates the change in the training phases (pretraining, PCA and extinction).

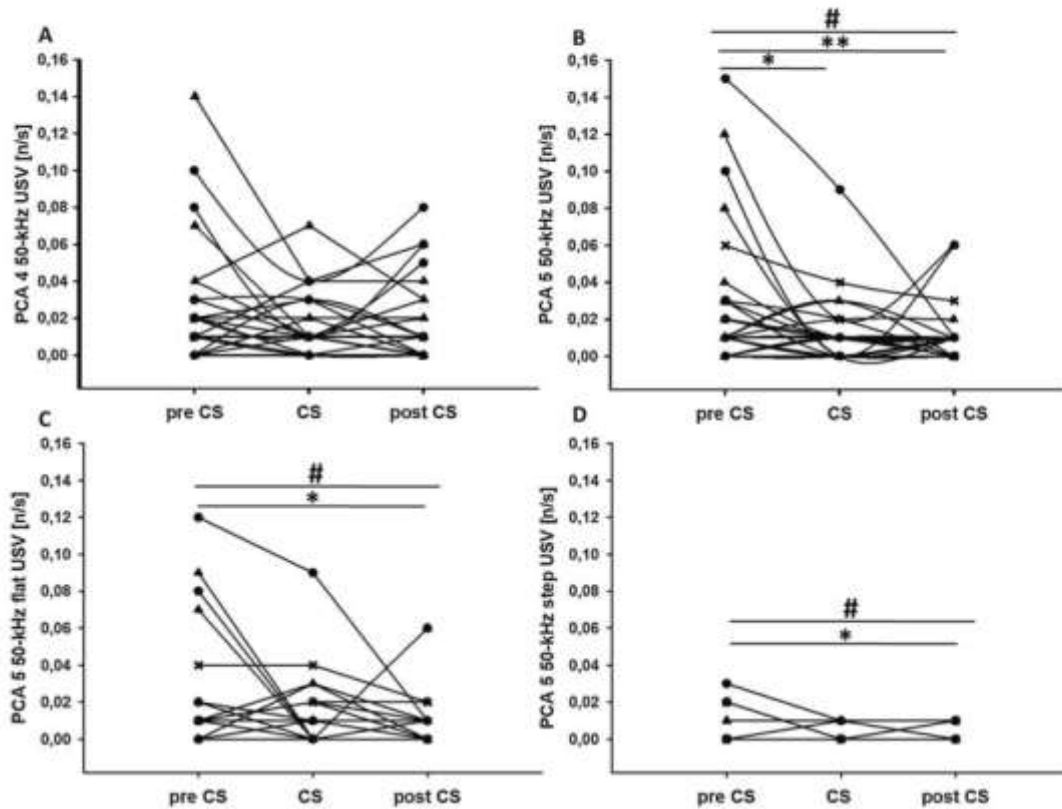


Fig. A7. Number of calls (per s) during 8 s pre CS, CS and 8 s post CS on PCA training day 4 (A) and 5 (B) and the number of flat (C) and step (D) USV on PCA 5 (● goal-tracker; ▲intermediate group; x sign-tracker). An ANOVA (# $p < 0.05$) was calculated between the three phases and t-tests were calculated for post-hoc analysis (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Appendix B

Table B1

Correlations between the index scores throughout the Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Paradigm and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Index scores	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	Ext 1
PCA 2	0.299					
PCA 3	0.350*	0.795**				
PCA 4	0.485**	0.631**	0.741**			
PCA 5	0.392*	0.484**	0.667**	0.863**		
Ext 1	0.160	0.259	0.480**	0.694**	0.827**	
Ext 2	0.113	0.254	0.489**	0.531**	0.726**	0.828**

r = 0 to 0.1

r = 0.1 to 0.2

r = 0.2 to 0.3

r = 0.3 to 0.4

r = 0.4 to 0.5

r = 0.5 to 0.6

r = 0.6 to 0.7

r = 0.7 to 0.8

r = 0.8 to 0.9

r = 0.9 to 1

Table B2
Correlations between number of emitted calls throughout Pretraining (Pre), Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Training and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Number of 50-kHz calls	Pre	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	Ext 1	Ext 2
PCA 1	0.837**							
PCA 2	0.717**	0.671**						
PCA 3	0.811**	0.635**	0.802**					
PCA 4	0.456**	0.443**	0.413*	0.484**				
PCA 5	0.666**	0.802**	0.743**	0.672**	0.423*			
Ext 1	0.780**	0.562**	0.814**	0.779**	0.287	0.668**		
Ext 2	0.638**	0.541**	0.825**	0.644**	0.295	0.708**	0.818**	

r = 0 to 0.1
 r = 0.1 to 0.2
 r = 0.2 to 0.3
 r = 0.3 to 0.4
 r = 0.4 to 0.5
 r = 0.5 to 0.6
 r = 0.6 to 0.7
 r = 0.7 to 0.8
 r = 0.8 to 0.9
 r = 0.9 to 1

Table B3
Correlations between index scores and number of calls during Pretraining (Pre), Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Training and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Index scores \ Number of 50-kHz calls	Pre	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	Ext 1	Ext 2
PCA 1	-0.019	-0.112	-0.288	-0.286	-0.406*	0.288	-0.027	-0.024
PCA 2	-0.230	-0.250	0.061	-0.116	-0.296	-0.199	-0.017	0.037
PCA 3	0.029	-0.084	0.364*	0.125	-0.217	-0.031	0.119	0.315
PCA 4	0.291	0.130	0.350*	0.193	-0.051	0.062	0.413*	0.266
PCA 5	0.359*	0.274	0.545**	0.320	0.155	0.246	0.459*	0.416*
Ext 1	0.461**	0.392*	0.573**	0.430*	0.345*	0.340*	0.416*	0.376*
Ext 2	0.420*	0.401*	0.560**	0.411*	0.337	0.361*	0.386*	0.416*

r = 0 to 0.1
 r = 0.1 to 0.2
 r = 0.2 to 0.3
 r = 0.3 to 0.4
 r = 0.4 to 0.5
 r = 0.5 to 0.6
 r = 0.6 to 0.7
 r = 0.7 to 0.8
 r = 0.8 to 0.9
 r = 0.9 to 1

Table B4

Correlations between the same USV parameter recorded during testing in the activity box and Pretraining (Pre), Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Training and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Number of 50-kHz calls	Activity Box		
	day 1	day 2	
Pre	0.068	0.643**	
PCA 1	0.052	0.643**	
PCA 2	0.046	0.256	r = 0 to 0.1
PCA 3	-0.031	0.338	r = 0.1 to 0.2
PCA 4	0.022	0.240	r = 0.2 to 0.3
PCA 5	0.069	0.347*	r = 0.3 to 0.4
Ext 1	0.089	0.415*	r = 0.4 to 0.5
Ext 2	0.102	0.258	r = 0.5 to 0.6

Table B5

Correlations between behavior during testing in the activity box and the number of calls emitted during Pretraining (Pre), Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Training and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Number of 50-kHz calls	Overt behavior	day 1			day 2			
		Distance traveled	Center time	Rearing	Distance traveled	Center time	Rearing	
Pre		-0.082	0.390*	0.228	-0.207	0.313	0.113	
PCA 1		0.174	0.359*	0.325	0.113	0.368*	0.294	
PCA 2		0.053	0.558**	0.189	-0.311	0.384*	-0.076	r = 0 to 0.1
PCA 3		-0.204	0.622**	0.038	-0.321	0.502**	-0.109	r = 0.1 to 0.2
PCA 4		0.121	0.555**	0.395*	-0.124	0.412*	0.238	r = 0.2 to 0.3
PCA 5		0.127	0.476**	0.221	-0.067	0.360*	0.095	r = 0.3 to 0.4
Ext 1		-0.249	0.112	-0.045	-0.446**	0.148	-0.190	r = 0.4 to 0.5
Ext 2		0.016	0.286	0.087	-0.410*	0.036	-0.200	r = 0.5 to 0.6

References

[1] G.J. Fitzpatrick, J.D. Morrow, Pavlovian conditioned approach training in rats, *JuVE (Journal of Virtualized Experiments)* 108 (2016) e03540.

[2] T.E. Robinson, K.C. Berridge, The neural basis of drug craving: an incentive-
 substitution theory of addiction, *Brain Res. Rev.* 18 (3) (1993) 247–291.

[3] S.B. Flagel, H. Akil, T.E. Robinson, Individual differences in the attribution of
 incentive salience to reward-related cues: implications for addiction, *Neuropharmacology* 56 (2009) 129–148.

[4] T.E. Robinson, S.B. Flagel, Dissociating the predictive and incentive motivational
 properties of reward-related cues through the study of individual differences, *Biol.
 Psychiatry* 65 (10) (2009) 869–872.

[5] A. Tomiic, Self-regulation and animal behavior, *Psychol. Rep.* 7 (1) (1996) 83–85.

[6] A. Tomiic, A.S. Aguado, L.A. Pohorecky, D. Benjamin, Ethanol induces impulsive-
 like responding in a delay-of-reward operant choice procedure: impulsivity
 predicts autoshaping, *Psychopharmacology* 139 (4) (1998) 376–382.

[7] V. Lovic, B.T. Saunders, L.M. Yager, T.E. Robinson, Rats prone to attribute
 incentive salience to reward cues are also prone to impulsive action, *Behav. Brain
 Res.* 223 (2) (2011) 255–261.

[8] C.P. King, A.A. Palmer, L.C.S. Woods, L.W. Hawk, J.B. Richards, P.J. Meyer,
 Premature responding is associated with approach to a food cue in male and female
 heterogeneous stock rats, *Psychopharmacology* 233 (13) (2016) 2593–2605.

[9] G. Paulsine, C.C. Angelides, P.J. Meyer, T.E. Robinson, M. Sartir, Cholinergic
 control over attention in rats prone to attribute incentive salience to reward cues,
J. Neurosci. 33 (19) (2013) 8321–8335.

[10] A.K. Chertan, A. Kucinski, K. Pichert, B. Yeglia, V. Puzikh, Y. Kim, M. Sarrar,
 Unresponsive choline transporter as a trait neuromarker and a causal mediator of
 bottom-up attentional biases, *J. Neurosci.* 37 (11) (2017) 2947–2959.

[11] S.B. Flagel, C.M. Cameron, K.N. Pickup, S.J. Watson, H. Akil, T.E. Robinson, A food
 predictive cue must be attributed with incentive salience for it to induce c-fos
 mRNA expression in cortico-ostial-thalamic brain regions, *Neuroscience* 196
 (2011) 80–96.

- [12] J.L. Haight, Z.L. Fuller, K.M. Fraces, S.B. Flagel, A food-predictive cue attributed with incentive salience engages subcortical afferents and efferents of the paraventricular nucleus of the thalamus, *Neuroscience* 340 (2017) 135–152.
- [13] M. Sarter, K.B. Phillips, The neuroscience of cognitive-motivational styles: signs and goal trackers as animal models, *Behav. Neurosci.* 132 (3) (2018) 1.
- [14] S.B. Flagel, S.J. Watson, T.E. Robinson, H. Ahn, Individual differences in the propensity to approach signals vs goals promote different adaptations in the dopamine system of rats, *Psychopharmacology* 191 (3) (2007) 599–607.
- [15] B.J. Tomsett, D.N. Keenan, Sign-tracking predicts increased choice of cocaine over food in rats, *Behav. Brain Res.* 261 (2013) 222–228.
- [16] A.M. Ahrens, C.W. Nobile, L.E. Page, E.V. Meier, C.L. Duvachelle, T. Schullert, Individual differences in the conditioned and unconditioned rat 50-kHz ultrasonic vocalizations elicited by repeated amphetamine exposure, *Psychopharmacology* 229 (4) (2013) 687–700.
- [17] E. Taracha, A. Hamod, P. Krzywicki, M. Lektor, A. Skorzewska, A. Ptasnik, S. J. Chrapusta, Inter-individual diversity and intra-individual stability of amphetamine-induced sensitization of frequency modulated 50 kHz vocalization in Sprague-Dawley rats, *Psychopharmacology* 222 (4) (2012) 619–632.
- [18] S.M. Brudzynski, Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats, *Curr. Opin. Neurobiol.* 23 (3) (2013) 310–317.
- [19] M. Wöhr, R.K. Schwarting, Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation, *Cell Tissue Res.* 354 (1) (2013) 81–97.
- [20] C.V. Pustiles, Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46 (1) (2007) 28–34.
- [21] J.S. Burgdorf, S.M. Brudzynski, J.R. Moskal, Using rat ultrasonic vocalization to study the neurobiology of emotion: from basic science to the development of novel therapeutics for affective disorders, *Curr. Opin. Neurobiol.* 66 (2020) 192–206.
- [22] B. Knutson, J. Burgdorf, J. Panksepp, Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats, *Psychol. Bull.* 128 (6) (2002) 961.
- [23] H.E. Covington III, K.A. Miczek, Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress, *Eur. J. Pharmacol.* 467 (1–3) (2003) 1–12.
- [24] Y. Ujino, D.C. Blanchard, R.J. Blanchard, Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries, *Behav. Brain Res.* 182 (2) (2007) 166–172.
- [25] D.J. Knapp, L.A. Fuboweky, An air-puff stimulus method for elicitation of ultrasonic vocalizations in rats, *J. Neurosci. Methods* 62 (1–2) (1995) 1–5.
- [26] G.D. Sates, Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals, *Anim. Behav.* 20 (1) (1972) 88–100.
- [27] A.M. Van der Ploeg, E.J.K. Noack, K.A. Miczek, Temporal patterning of ultrasonic distress calls in the adult rat: effects of morphine and benzodiazepines, *Psychopharmacology* 97 (2) (1989) 147–148.
- [28] A. Berta, M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, Rat ultrasonic vocalization in averively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior, *Behav. Brain Res.* 166 (2) (2006) 271–280.
- [29] M. Wöhr, A. Berta, R.K. Schwarting, Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat, *Neurobiol. Learn. Mem.* 84 (3) (2005) 228–240.
- [30] J. Burgdorf, R.A. Kross, J.R. Moskal, J.G. Plass, S.M. Brudzynski, J. Panksepp, Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback, *J. Comp. Psychol.* 122 (4) (2008) 357.
- [31] B. Knutson, J. Burgdorf, J. Panksepp, Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats, *J. Comp. Psychol.* 112 (1) (1998) 65.
- [32] J.C. Berman, R.E. Schwarting, Attribution and expression of incentive salience are differentially signaled by ultrasonic vocalizations in rats, *PLoS One* 9 (7) (2014).
- [33] J.C. Berman, R.K. Schwarting, Individual differences in anticipatory activity in food rewards predict cue-induced appetitive 50-kHz calls in rats, *Physiol. Behav.* 149 (2015) 107–118.
- [34] J. Burgdorf, B. Knutson, J. Panksepp, Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats, *Behav. Neurosci.* 114 (2) (2000) 320.
- [35] J. Panksepp, J. Burgdorf, 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables, *Behav. Brain Res.* 115 (1) (2000) 25–36.
- [36] J. Panksepp, J. Burgdorf, “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol. Behav.* 79 (3) (2003) 533–547.
- [37] J. Burgdorf, P.L. Wood, R.A. Kross, J.R. Moskal, J. Panksepp, Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies, *Behav. Brain Res.* 182 (2) (2007) 274–283.
- [38] J. Willuhn, A. Toss, M.J. Wauert, A.S. Hart, N.G. Hollen, F.E. Phillips, R. K. Schwarting, M. Wöhr, Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats, *J. Neurosci.* 34 (12) (2014) 10616–10623.
- [39] K.A. Engelhardt, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Mapping trait-like socio-affective phenotypes in rats through 50-kHz ultrasonic vocalizations, *Psychopharmacology* 235 (1) (2018) 83–96.
- [40] J.A. Tripf, M.L. Dent, P.J. Meyer, Individual differences in food cue reactivity are associated with acute and repeated cocaine-induced vocalizations, but not cue-induced vocalizations, *Psychopharmacology* 234 (3) (2017) 437–446.
- [41] R.K. Schwarting, N. Jegan, M. Wöhr, Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalization in male adult Wistar rats, *Behav. Brain Res.* 182 (2) (2007) 208–222.
- [42] P.W. Kalivas, C.B. Nemeroff, A.J. Frazer Jr, Neurotoxic microinjection into the nucleus accumbens antagonizes dopamine-induced increase in locomotion and rearing, *Neuroscience* 11 (4) (1984) 919–930.
- [43] T. Kircher, M. Wöhr, I. Nenadic, R. Schwarting, G. Schratz, J. Allertink, C. Calmes, H. Gern, T. Hahn, B. Müller-Mythak, A. Dimpfle, M. Hübmann, A. Jansen, P. Pfeifferle, H. Ritz, M. Ritschel, S.H. Witt, M. Nöthen, A. Krug, U. Dannowski, Neurobiology of the major psychoses: a translational perspective on brain structure and function - the FOR2107 consortium, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 269 (8) (2019) 949–962.
- [44] K.B. Gaffey, R.G. Marx, J.F. Neumaier, DeepSqueak: a deep learning based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations, *Neuropsychopharmacology* 44 (3) (2019) 859–866.
- [45] M. Perini, E. Andreatini, R.K. Schwarting, J.C. Berman, Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? *Psychopharmacology* 231 (1–3) (2014) 2567–2577.
- [46] K.A. Engelhardt, E. Fuchs, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: implications for mania models, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27 (3) (2017) 261–273.
- [47] M. Wöhr, H. Ripberger, R.K. Schwarting, M.M. van Guelen, Critical involvement of 5-HT2C receptor function in amphetamine-induced 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats, *Psychopharmacology* 232 (10) (2015) 1817–1829.
- [48] F.J. Meyer, V. Lovic, B.T. Saunders, L.M. Yager, S.B. Flagel, J.D. Morrow, T. E. Robinson, Quantifying individual variation in the propensity to attribute incentive salience to reward cues, *PLoS One* 7 (8) (2012).
- [49] A.M. Ahrens, R.F. Singer, C.J. Fitzpatrick, J.D. Morrow, T.E. Robinson, Rats that sign-track are resistant to Pavlovian but not instrumental extinction, *Behav. Brain Res.* 296 (2016) 418–430.
- [50] K.G. Mulvihill, S.M. Brudzynski, Effect of microinjections of dopamine into the nucleus accumbens shell on emission of 50 kHz USV: comparison with effects of δ -amphetamine, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 176 (2019) 23–32.
- [51] S.M. Brudzynski, A. Ptasnik, Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats, *J. Comp. Psychol.* 116 (1) (2002) 73.
- [52] C. Netusch, R.K.W. Schwarting, Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96 (2) (2010) 251–259.
- [53] R.K. Schwarting, S.B. Flagel, E.G. O'Donnell, L.C.S. Woods, M. Sarter, T.E. Robinson, Individual variation in the propensity to attribute incentive salience to a food cue: influence of sex, *Behav. Brain Res.* 279 (2015) 462–469.
- [54] D.N. Keenan, M.A. Gomez-Serrano, S.J. Weiss, A.L. Riley, A comparison of Lewis and Fischer rat strains on autoshaping (sign-tracking), discrimination reversal learning and negative autoshaping, *Behav. Brain Res.* 169 (2) (2006) 193–200.
- [55] C.J. Fitzpatrick, S. Gopalakrishnan, E.S. Cagan, L.M. Yager, P.J. Meyer, V. Lovic, S. B. Flagel, Variation in the form of Pavlovian conditioned approach behavior among outbred male Sprague-Dawley rats from different vendors and colonies: sign-tracking vs. Goal-tracking, *PLoS One* 8 (10) (2013).
- [56] T.M. Kisko, M.D. Berman, S. Michels, S.H. Witt, M. Ritschel, C. Calmes, M. Wöhr, Catechol haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz ultrasonic communication deficits in rats, *Dis. Model. Mech.* 11 (6) (2018).
- [57] T.M. Kisko, M.D. Berman, S. Michels, S.H. Witt, M. Ritschel, C. Calmes, R.K. W. Schwarting, M. Wöhr, Sex-dependent effects of Catechol haploinsufficiency on juvenile social play behavior and pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats, *Genes Brain Behav.* 19 (2) (2020).
- [58] T.M. Bedecker, T.M. Kisko, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Effects of Catechol haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats, *Behav. Brain Res.* 367 (2019) 35–52.
- [59] J.S. Beckmann, J.J. Chow, Isolating the incentive salience of reward-associated stimuli: value, choice, and persistence, *Learn. Mem.* 22 (2) (2015) 116–127.
- [60] S.J. Stringfield, C.A. Bortolter, D.L. Robinson, Nicotine-enhanced Pavlovian conditioned approach is resistant to omission of expected outcome, *Behav. Brain Res.* 343 (2018) 18–20.
- [61] N. Yee, R.K. Schwarting, E. Fuchs, M. Wöhr, Juvenile stress potentiates aversive 22 kHz ultrasonic vocalizations and freezing during auditory fear conditioning in adult male rats, *Stress* 15 (5) (2012) 533–544.
- [62] B. Knutson, J. Burgdorf, J. Panksepp, High-frequency ultrasonic vocalizations induce conditioned pharmacological reward in rats, *Physiol. Behav.* 66 (4) (1999) 639–643.
- [63] R.J. Barfield, P. Auerbach, L.A. Geyer, T.K. McIntosh, Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior, *Am. Zool.* 19 (2) (1979) 469–480.
- [64] A.R. Willey, L.P. Spear, The effects of pre-test social deprivation on a natural reward incentive test and concomitant 50 kHz ultrasonic vocalization production in adolescent and adult male Sprague-Dawley rats, *Behav. Brain Res.* 245 (2013) 107–112.
- [65] M. Wöhr, B. Hock, R.K. Schwarting, B. Spenzl, Effects of experience and context on 50 kHz vocalizations in rats, *Physiol. Behav.* 93 (4–5) (2008) 766–776.
- [66] L. Prut, C. Belzung, The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (1–3) (2003) 3–33.
- [67] M. Lukas, M. Wöhr, Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social play behavior in juvenile rats, *Psychoneuroendocrinology* 56 (2015) 35–44.

Studie 2: Appetitive 50-kHz calls in a Pavlovian conditioned approach task in *Cacna1c* haploinsufficient rats

Sangarapillai, N., Wöhr, M., & Schwarting, R.K.W. (2022) Appetitive 50 kHz calls in a pavlovian conditioned approach task in *Cacna1c* haploinsufficient rats. *Physiology & Behavior*, 250, 113795. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113795>

Zusammenfassung

Bei dem Sign- und Goal-Tracking Paradigma handelt es sich um eine pawlowsche Konditionierungsaufgabe. Individuen unterscheiden sich dabei in ihrem Annäherungsverhalten zum Hinweissignal, welches die Belohnung vorhersagt (Sign-Tracker) und zur Belohnung selbst (Goal-Tracker). Ratten senden 50-kHz USV während der pawlowschen Konditionierung im Sign- und Goal-Paradigma. Es gibt Indikationen dafür, dass diese Rufe mit dem positiven affektiven Zustand des Subjektes in Zusammenhang stehen und auf mesolimbische Dopamin-Funktionen zurückzuführen sind. Beim Menschen codiert das *CACNA1C*-Gen die $\alpha 1c$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanals $Cav1.2$, welches stark mit psychischen Erkrankungen, unter anderem affektiven Störungen, die mit einer veränderten Dopamin-Signalübertragung einhergehen, assoziiert wird. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit der Phänotyp eher Sign- oder Goal-Tracking Verhalten zu zeigen und die Emission von 50-kHz Rufen durch die *Cacna1c*-Haploinsuffizienz beeinflusst wird. Auf der Grundlage bereits etablierter Kriterien für die Charakterisierung der Sign- und Goal-Tracker konnte keine der *Cacna1c*-Ratte als Sign-Tracker identifiziert werden, während 42 % der getesteten Ratten Goal-Tracker waren und die restlichen 58 % in den mittleren Bereich fielen, die keine klare Präferenz zeigten. In Bezug auf die USV wurde festgestellt, dass die *Cacna1c*-Ratten 50-kHz Rufe mit einem klaren subjektabhängigen Muster emittieren; außerdem waren die meisten von ihnen von flach, nicht frequenzmoduliert und traten hauptsächlich während der anfänglichen Habituationsphase auf. Im Vergleich zu den bereits in Studie 1 veröffentlichten wildtyp Kontrollen zeigten *Cacna1c*-haploinsuffiziente Ratten eine geringere Anzahl appetitiver 50-kHz Rufe. Darüber hinaus war die Emission von 50-kHz Rufen bei *Cacna1c*-haploinsuffizienten Ratten ähnlich wie bei wildtyp Wurfgeschwistern intraindividuell über Trainingstage stabil und stand in negativem Zusammenhang zu dem Goal-Tracking.

Subsumiert belegen diese Ergebnisse, dass 50-kHz Rufe als stabiles und charakteristisches Merkmal dienen können. Der Befund, dass *Cacna1c*-haploinsuffiziente Ratten eine reduzierte 50-kHz Ruftrate zeigen, welches mit einem stärkeren Goal-Tracking einhergeht, steht im Einklang mit der Annahme einer veränderten Dopamin-Signalisierung bei diesen Ratten. Das ist ein Ergebnis, das ihre Anwendbarkeit in Modellen für psychische Störungen unterstützt.



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/physbeh

Full Length Article

Appetitive 50 kHz calls in a pavlovian conditioned approach task in *Cacna1c* haploinsufficient rats

Nivethini Sangarapillai^{a,b,*}, Markus Wöhr^{a,b,c,d}, Rainer K.W. Schwarting^{a,b}^a Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Faculty of Psychology, Philipps-Universität Marburg, Gutenbergstr. 18, Marburg D-35032, Germany^b Center for Mind, Brain, and Behavior (CMBB), Hans-Meerwein-Str. 6, Marburg D-35032, Germany^c KU Leuven, Faculty of Psychology and Educational Sciences, Research Unit Brain and Cognition, Laboratory of Biological Psychology, Social and Affective Neuroscience Research Group, Leuven B-3000, Belgium^d KU Leuven, Leuven Brain Institute, Leuven B-3000, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

50 kHz ultrasonic vocalizations

CACNA1C

Sign-tracking

Goal-tracking

Dopamine

ABSTRACT

We have previously shown that rats emit high-frequency 50 kHz ultrasonic vocalizations (USV) during sign- and goal-tracking in a common Pavlovian conditioned approach task. Such 50 kHz calls are probably related to positive affect and are associated with meso-limbic dopamine function. In humans, the *CACNA1C* gene, encoding for the α_{1C} subunit of the L-type voltage-gated calcium channel $Ca_v1.2$, is implicated in several mental disorders, including mood disorders associated with altered dopamine signaling. In the present study, we investigated sign- and goal-tracking behavior and the emission of 50 kHz USV in *Cacna1c* haploinsufficient rats in a task where food pellet delivery is signaled by an appearance of an otherwise inoperable lever. Over the course of this Pavlovian training, these rats not only increased their approach to the reward site, but also their rates of pressing the inoperable lever. During subsequent extinction tests, where reward delivery was omitted, extinction patterns differed between reward site (i.e. magazine entries) and lever, since magazine entries quickly declined whereas behavior towards the lever transiently increased. Based on established criteria to define sign- or goal-tracking individuals, no *CACNA1C* rat met a sign-tracking criterion, since around 42% of rats tested where goal-trackers and the other 58% fell into an intermediate range. Regarding USV, we found that the *CACNA1C* rats emitted 50 kHz calls with a clear subject-dependent pattern; also, most of them were of a flat subtype and occurred mainly during initial habituation phases without cues or rewards. Compared, in previously published wildtype controls, *Cacna1c* haploinsufficient rats displayed reduced numbers of appetitive 50 kHz calls. Moreover, similar to wildtype littermate controls, 50 kHz call emission in *Cacna1c* haploinsufficient rats was intrasubjectively stable over training days and was negatively associated with goal-tracking. Together, these findings provide evidence in support of 50 kHz calls as trait marker. The finding that *Cacna1c* haploinsufficient rats show reductions of 50 kHz calls accompanied with more goal-tracking, is consistent with the assumption of altered dopamine signaling in these rats, a finding which supports their applicability in models of mental disorders.

1. Introduction

In humans, the *CACNA1C* gene, located on chromosome 12p13.33 and encoding for the α_{1C} subunit of the L-type voltage-gated calcium channel $Ca_v1.2$, is considered as one of the best-replicated risk genes for several mental disorders, such as depression, bipolar disorder, schizophrenia, attention-deficit hyperactivity disorder (ADHS) and others [35, 38,62,75]. $Ca_v1.2$ accounts for the majority of all L-type calcium

channels in the brain. This channel mediates cell membrane depolarization by increasing membrane permeability for calcium ion influx [93]. This affects many downstream pathways, such as gene transcription and neurogenesis [34], and has an impact on synaptic plasticity [52].

In an extensive line of experiments, we recently applied a translational approach [42] and contributed to the behavioral characterization of *Cacna1c* haploinsufficient rats [for review see [89]]. On the one hand, these studies revealed moderate effects on learning and memory,

* Corresponding author at: Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Faculty of Psychology, Philipps-Universität Marburg, Gutenbergstr. 18, Marburg D-35032, Germany.

E-mail address: sangarap@staff.uni-marburg.de (N. Sangarapillai).

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113795>

Received 27 January 2022; Received in revised form 23 March 2022; Accepted 24 March 2022

Available online 26 March 2022

0031-9384/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

most notably reversal learning [6,7], extending findings obtained by other laboratories [55,76,80]. Particularly strong effects, however, were seen in studies focusing on social behavior and socio-affective communication through ultrasonic vocalizations (USV) in sender and receiver [43–45,67,91]. For example, juvenile *Cacna1c* haploinsufficient rats displayed alterations in rough-and-tumble play in a sex-dependent manner, with male *Cacna1c* haploinsufficient rats emitting fewer 50 kHz calls than wildtype littermate controls [43–45]. In adulthood, female *Cacna1c* haploinsufficient rats were found to emit fewer 50 kHz calls during direct reciprocal social interaction [67].

Such 50 kHz calls were previously shown to be related to positive affect and are associated with dopamine (DA) function. In fact, measuring these calls may help to gain insight into both, the current emotional state of a rat as well as the subjects' traits [1,77]. Previous studies have shown, that there is a high inter-individual variability in the emission of calls [70,73]. Based on their frequency, adult USV can be classified into 22- and 50 kHz USV [11,66,86]. They are suggested to reflect distinct motivational and affective states of the individual and serve important communicative functions [15,48]. While 22-kHz calls [22,53] are typical in aversive situations [46,69,82] and in fear and anxiety [5,87], 50 kHz calls are emitted in appetitive or reinforcing situations, e.g. play [47] and mating [18]. Indeed, social rewards were found to elicit a stronger 50 kHz USV response, as compared to non-social situations [20,57]. However, rats also emit 50 kHz calls in non-social appetitive reward tasks [8,9,38,70]. They can also be driven by anticipation of a reward or a reward-related cues, probably reflecting wanting [8,9,16,47,60,61]. Convergent evidence from optogenetics [72] and chemogenetics [51] support earlier evidence obtained with classical neuropharmacological techniques [79] indicating that DA activity in reward related meso-limbic areas is associated with 50 kHz USV emission in the sender [19]. Furthermore, studies show that high rates of 50 kHz calls can be elicited by systemic administration of DA-function enhancing drugs, i.e., d-amphetamine or cocaine [1,24,59,77,81,85].

The DAergic factor is particularly interesting in the present context because *Cacna1c* haploinsufficiency was reported to modulate dopamine signaling. For example, Dao et al. [23] found that locomotor activity typically seen following amphetamine administration is attenuated in *Cacna1c* haploinsufficient mice. Moreover, DA release in the NAcc in response to inhibiting the dopamine transporter was found to be reduced in *Cacna1c* haploinsufficient mice [78]. These results indicate that there is a strong connection between the DA system and the *Cacna1c* gene.

In our previous study [70], we found that wildtype female rats emit appetitive 50 kHz USV during a Pavlovian sign- and goal-tracking task. Such a paradigm allows to dissociate the predictive value from the incentive motivational value of a reward task. In the Pavlovian conditioned approach (PCA) task, rats show individual differences in the sensitivity towards a cue [30,68]. The classification into so-called sign- and goal-trackers is based on their approach behavior, either to the sign (lever) predicting the reward or the goal (food cup) itself [27]. This tendency to attribute incentive salience to reward cues is discussed to reflect a personality trait. Previous studies have shown that the DA system is differentially involved in animals responding to cue vs. reward presentation [31,32,36,71]. Tripi et al. [81] has shown that the USV response to cocaine differs strongly between animals depending on their behavior in the PCA task. Further, we found a positive relationship between the tendency of sign-tracking and the emission of 50 kHz USV in wildtype rats [70]. However, there was a high subject-dependent variability in call emission. Although the rats in general showed higher tendencies towards goal-tracking, the subjects emitting higher number of calls also engaged more with the cue, predicting the reward. We suggested that these appetitive 50 kHz USV profiles possibly reflect trait-like socio-affective phenotypes associated with DA signaling.

Based on these findings, we now investigated heterozygous *Cacna1c* rats in this particular PCA task and compared the outcomes with the previously published littermate controls in Sangarapillai et al. [70]. Given the fact that DA plays a central role in modulating 50 kHz USV

emission as aforementioned, it appears likely that 50 kHz USV emission during the Pavlovian conditioned approach (PCA) task is altered in *Cacna1c* haploinsufficient rats. Therefore, we predicted to find reduced number of appetitive calls accompanied by less sign-tracking in the haploinsufficient rats.

2. Method

2.1. Subjects and housing

The rats of the present study were bred as part of a larger project aimed at the behavioral characterization of *Cacna1c* haploinsufficient rats by comparing wildtype and heterozygous *Cacna1c* rats (animal project number: G19/2014; [42]). Specifically, we used a heterozygous breeding protocol to obtain *Cacna1c*^{+/-} offspring and *Cacna1c*^{+/+} littermate controls [43]. The heterozygous rats had a Sprague-Dawley background and were generated by using zinc finger technology by SAGE Labs (now Horizon Discovery Ltd, Cambridge, UK) [33]. The subjects were the offspring of breeding wildtype Sprague-Dawley females obtained from Charles River (Sulzfeld, Germany) with male heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats. The males were regularly backcrossed. Breeding was performed in our own facility (Faculty of Psychology, Philipps-University of Marburg, Germany). The pairs were put together approximately two weeks for breeding. Afterwards, females were kept in single cages over pregnancy until delivery. After weaning on postnatal day (PND) 21, same sex littermates, independent of their genotype, were socially group-housed in polycarbonate Macrolon Type IV cages (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissenberg, Germany), and kept under standard laboratory conditions (22 ± 2 °C and 40–70% humidity) on a 12 h light/dark cycle with ad libitum access to water and food. Subjects were identified by paw tattoo. The rats were handled for three consecutive days prior to testing.

In our previously published study [70], we investigated sign- versus goal-tracking behavior in the female wildtype *Cacna1c*^{+/+} offspring ($n = 34$). In the present study, we investigated female heterozygous *Cacna1c*^{+/-} littermates ($n = 38$) in the same paradigm. Wildtype *Cacna1c*^{+/+} and heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats were tested under identical conditions as part of the same behavioral study. In the present study, we used female rats because during social interaction particularly prominent 50 kHz USV emission rates were reported in heterozygous *Cacna1c*^{+/-} females [67]. The main focus of this study is to report the results of the heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats, but also to compare these findings to their previously published littermate controls [70].

2.2. Genotyping

The heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats carry a 4 base pair (bp) deletion at 460649–460652 bp in their genomic sequence, which leads to an early stop codon in exon 6. On PND 5 ± 1, tail snips were collected by dissecting ~0.3 cm of the tail. Genotyping was performed as described previously [43].

2.3. Baseline screening in the activity box

For initial screening of locomotor activity and 50 kHz USV (applied between postnatal days 40 and 45), we used an activity box (40 × 40 cm) on two consecutive days (10 min each), which measured locomotor activity, rearing and center time using an automated infrared system (Tru Scan, Photobeam Sensor E63-22, Coulbourn Instruments, Allentown, PA, USA). An ultrasonic microphone was mounted 45 cm above the floor to monitor USV. The rationale behind this screening is to identify differences between individuals in their emission of USV and basic behaviors (locomotion, rearing, center time), in order to create a baseline [73]. All testing was performed under dim red light (5–6 Lux). The procedures were identical to those reported in our previous study [70].

2.4. Pavlovian conditioned approach (PCA) training

Sign- and goal-tracking behavior (between postnatal days 45 and 60) was measured in non-deprived rats at least 3 days after screening in the activity box. Rats were tested in four conditioning chambers (MED Associates Inc., St Albans, VT; 20.5 × 24.1 cm floor area, 29.2 cm high), where the center of one wall was equipped with a food magazine located 6 cm above the grid and connected to a pellet dispenser. The floor was constructed from stainless steel rods. An illuminated retractable lever was located 9 cm above the floor and 2.5 cm to the left of the pellet dispenser. An infrared photo-beam located inside the food magazine recorded head entries into the food cup. Head entries and lever presses were assessed using the MedAssociates software (version IV). USV were measured using an ultrasonic microphone mounted on a rear wall 18 cm above the grid.

First, rats were familiarized with the later rewards, i.e. banana-flavored pellets (45 mg, Dustless Precision Pellets, BioServ) in their home cages. On the following day, they were exposed to the conditioning chamber with the lever retracted. In this pre-training session and after 5 min of habituation, 50 food pellets were delivered in a variable time interval of ~30 s, varying randomly between 1 s and 60 s. This session lasted approximately 25 min. PCA training was conducted on the following five days. Each session had 25 trials, where the 1st trial started after one min of habituation. The illuminated lever was inserted into the chamber for eight s (CS) and immediately upon subsequent lever retraction, a food pellet (US) was delivered, independent of the rat's response to the lever. The inter-trial intervals varied randomly between 30 s and 150 s. Each training session lasted approximately 40 min. After the 5th day of PCA training, there were two more days of extinction. There, the procedure was identical to that of PCA training except that no pellet was delivered after lever retraction. We strictly kept to the procedure described in the studies of Fitzpatrick and Morrow [27,28] and Fitzpatrick et al. [36].

2.5. Ultrasonic recording and analysis

USV were monitored with UltraSoundGate Condenser CM16 Microphones (Avisoft Bioacoustics), which were connected via an UltraSoundGate 416H USB audio device (Avisoft Bioacoustics) to a personal computer. The acoustic data were recorded with a sampling rate of 250,000 Hz in 16-bit format (recording range: 0–125 kHz) by Avisoft RECORDER USGH. Recordings were transferred to DeepSqueak (version 2.5) for later acoustical analysis. This deep learning-based system for detection and analysis of USV [21] converts the recorded file to a spectrogram and the files were analyzed with the pretrained automated 'short rat call network V2'. Call detection was set on "high recall" using an overlap of 0.01 s in order to also detect noise rather than miss calls. For de-noising the automatically detected events, a custom-trained network was used and an experienced observer manually reviewed the calls accepting (USV) or rejecting (noise) events, while classifying USV into flat, step, trill or mixed calls based on our previously established and repeatedly applied criteria [25,64,70,90].

2.6. Data analysis/statistics

The index scores of response bias ($[(\text{lever presses} - \text{magazine entries}) / (\text{lever presses} + \text{magazine entries})]$), latency ($[(\text{magazine entry latency} - \text{lever press latency}) / (8 \text{ s})]$) and probability difference ($(\text{lever press probability} - \text{magazine entry probability})$) were calculated. As reported before, the average of these three values was used to compute the PCA index score [27]. This index score ranges between -1 and 1 depending on approach behavior to the pellet magazine (-1) or the lever (1). The scores on day four and five of PCA training were used to finally characterize rats either as sign- (PCA index between 0.5 and 1) or goal-trackers (PCA index between -0.5 and -1).

The Pearson correlation coefficient was calculated between given

behavioral parameters in order to identify their relationship.

Either the paired t-test was used to compare behavior between two days or the analysis of variance for repeated measurement with the factor days was used over several days for analysis within one genotype. The core data of this study are those of the 38 heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats. However, our previously published data [70] of 34 wildtype *Cacna1c*^{+/+} rats were taken for comparative purposes. For between genotype comparison, the analysis of variance (ANOVA), with the between subject factor genotype was calculated. The test was corrected with Greenhouse and Geisser in case of significance with the Mauchly test. Where necessary, a more detailed comparison was performed by means of t-test.

A p-value of <.05 was considered as statistically significant. Data are expressed as means ± SEM.

3. Results

3.1. PCA Training

To investigate approach behavior either to the lever (sign) or to the pellet receptacle (goal) during the eight seconds of CS presentation, we quantified the numbers and latencies of lever presses and magazine entries in all PCA training and subsequent extinction sessions (Fig. 1).

Lever pressing: There was a significant increase in the number of lever presses over PCA training days ($F_{1,606} = 8.614, p = 0.001$; Fig. 1A). This was due to an increase especially from PCA 2 to PCA 3 ($t_{37} = -2.815, p = 0.008$) and PCA 3 to PCA 4 ($t_{37} = -2.217, p = 0.033$). The first extinction session led to increased lever pressing rates compared to the preceding PCA session ($t_{37} = -3.14, p = 0.003$). During the second extinction session, however, lever pressing markedly decreased and the number of lever presses was lower than during the first extinction session ($t_{37} = 3.357, p = 0.002$). An inverse pattern was obtained for the latency of lever presses (Fig. 1B). Over the five PCA training sessions, rats approached the lever faster ($F_{1,868} = 9.053, p < 0.001$), with shorter latencies on PCA 3 ($t_{37} = 2.633, p = 0.012$) compared to the preceding days. Similar to the number of lever presses, most prominent effects were seen during the first extinction session where rats were faster in approaching the lever than during the preceding PCA session ($t_{37} = 2.972, p = 0.005$). Approach latency was clearly lower during the second extinction session, as compared to the first extinction session ($t_{37} = -3.582, p = 0.001$).

Magazine entries: Furthermore, the number of magazine entries changed over PCA testing days ($F_{3,427} = 6.986, p < 0.001$; Fig. 1C). There was an increase on the second day compared to PCA 1 ($t_{37} = -2.45, p = 0.019$) and on the fifth day compared to PCA 4 ($t_{37} = -2.334, p = 0.025$). In addition, a clear extinction effect, i.e., a decrease in magazine entries, was present already during the first extinction session ($t_{37} = 5.853, p < 0.001$), which was even more prominent in the second one ($t_{37} = 3.298, p = 0.002$). Compared to the previous training day, rats approached the magazine faster on PCA 2 ($t_{37} = 2.932, p = 0.006$) and PCA 5 ($t_{37} = 2.823, p = 0.008$), which led to a significant difference over PCA training days ($F_{3,688} = 10.502, p < 0.001$; Fig. 1D). In addition, extinction had a greater effect on the latency of magazine entries than on the lever presses. Already in the first extinction session, rats approached the magazine later ($t_{37} = -8.409, p < 0.001$) than during PCA 5. This effect became even more prominent on the second extinction day ($t_{37} = -4.959, p < 0.001$).

Index scores: The frequencies of responses (response bias; Fig. 2A), the latencies of approach either to the lever or the pellet dispenser within the eight seconds of CS interval (latency score; Fig. 2B) and the probabilities of approach (Fig. 2C) were calculated as an index score, varying between -1 and 1. This index score shows the subject's engagement with either the CS (sign-tracker), where the index score is closer to 1, or with the eventual reward itself (goal-tracker), indicated by an index score closer to -1. While the index score of the response bias increased over the PCA sessions ($F_{2,248} = 3.990, p = 0.018$), primarily

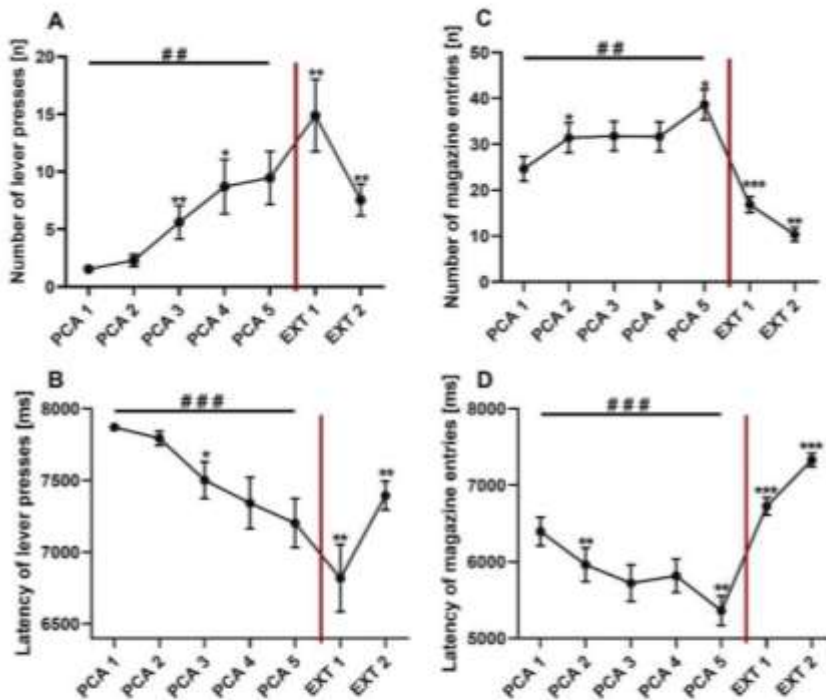


Fig. 1. Number of lever presses (A), latency of lever presses (B), number of magazine entries (C), and latency of magazine entries (D) during the eight seconds of CS presentation measured in female heterozygous *Cacna1c* Sprague-Dawley rats ($N = 38$). An ANOVA ($## p < 0.01$; $### p < 0.001$) was calculated over all five PCA training days and the t-test ($* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phase (PCA and extinction).

from PCA 3 to 4 ($t_{37} = -2.069, p = 0.046$), there was no overall significant difference in the latency score and in the probability of approach behavior over the PCA training days. There was a decrease on PCA 2 in the latency score ($t_{37} = 2.221, p = 0.033$) and PCA 5 in the probability difference ($t_{37} = 2.511, p = 0.017$), respective to the previous day. However, all three parameters showed an increase on the first extinction day (response bias: $t_{37} = -6.099, p < 0.001$; latency score: $t_{37} = -7.737, p < 0.001$; probability difference: $t_{37} = -8.140, p < 0.001$), indicating that animals approached the lever more than the magazine during extinction. This effect was even stronger on the second extinction day in the response bias ($t_{37} = -2.238, p = 0.031$).

The average of the index scores of response bias, latency score and probability difference was used to further characterize the rats' tendency of approach towards cue or reward (Fig. 2D). This score can vary between -1 (absolute goal-tracker) and 1 (absolute sign-tracker) and was calculated over all sessions. The index scores did not differ significantly from each other over the PCA training days. The most prominent effect was seen during extinction, when the index values were the highest ($t_{37} = -7.599, p < 0.001$), indicating that the subjects interacted more with the lever in absence of the reward.

When looking more closely at the last two training sessions, i.e. PCA 4 and 5, which were used to finally define rats as sign- or goal-trackers, we noticed a shift towards goal-tracking behavior (Fig. 3). Previous studies [2,27,54] characterized subjects as sign-trackers, when scoring between 0.5 and 1, and as goal-trackers, when scoring between -0.5 and -1 . Based on these criteria, none of the 38 rats showed sign-tracking behavior, but 16 rats showed goal-tracking behavior, and 22 rats belonged to the intermediate group showing no clear tendency.

PCA index scores of the five Pavlovian approach training sessions typically correlated with each other, with a few exceptions (Table 1). Especially the later index scores of the sessions correlated stronger with each other.

3.2. 50 kHz USV during PCA Training

Rats emitted USV during PCA training. While a substantial amount of 50 kHz calls occurred, no 22 kHz calls were detected. 50 kHz call rates were highest prior to training during pretraining (PRE) and differed from the subsequent PCA training session ($t_{37} = 2.862, p = 0.007$). Statistically, there was no further significant change over PCA and extinction training days (Fig. 4A). Reward omission during extinction had no effect on the USV calls.

Moreover, we investigated 50 kHz calling during daily sessions (data not shown). Notably, rats always called more in the beginning of a given session and the number of calls decreased over time independent of training day. While there was a higher fluctuation during the first days, the within-session patterns became more stable in the subsequent tests.

We further performed a detailed spectrographic analysis and classified 50 kHz calls into flat, step, trill or mixed calls. Throughout testing, there was a significant difference between subtypes (PRE: $F_{1,036} = 36.143, p < 0.001$; PCA 1: $F_{1,077} = 34.603, p < 0.001$; PCA 2: $F_{1,174} = 36.272, p < 0.001$; PCA 3: $F_{1,275} = 38.590, p < 0.001$; PCA 4: $F_{1,047} = 22.892, p < 0.001$; PCA 5: $F_{1,124} = 54.209, p < 0.001$; Ext 1: $F_{1,104} = 24.559, p < 0.001$; Ext 2: $F_{1,113} = 29.674, p < 0.001$). In general, most were flat calls, followed by steps (Fig. 4B).

In addition, there was no difference in the numbers of 50 kHz call subtypes emitted over PCA training days 1 to 5, except for the mixed calls ($F_{2,590} = 2.946, p = 0.044$; Fig. 5C). When comparing the pre-training session (PRE) with the first PCA training session, more flat and step calls were emitted during pre-training (Flat: $t_{37} = 2.906, p = 0.006$; Step: $t_{37} = 3.274, p = 0.002$; Fig. 5A,B). There was no difference in call type numbers between PCA 5 and the first extinction session and between both extinction sessions.

Finally, we asked whether rats called more during specific test phases. To address this issue, we counted the number of calls on the fourth and fifth testing day during the 1st min of habituation, and the 8 s periods prior, during or after CS presentation and finally during the

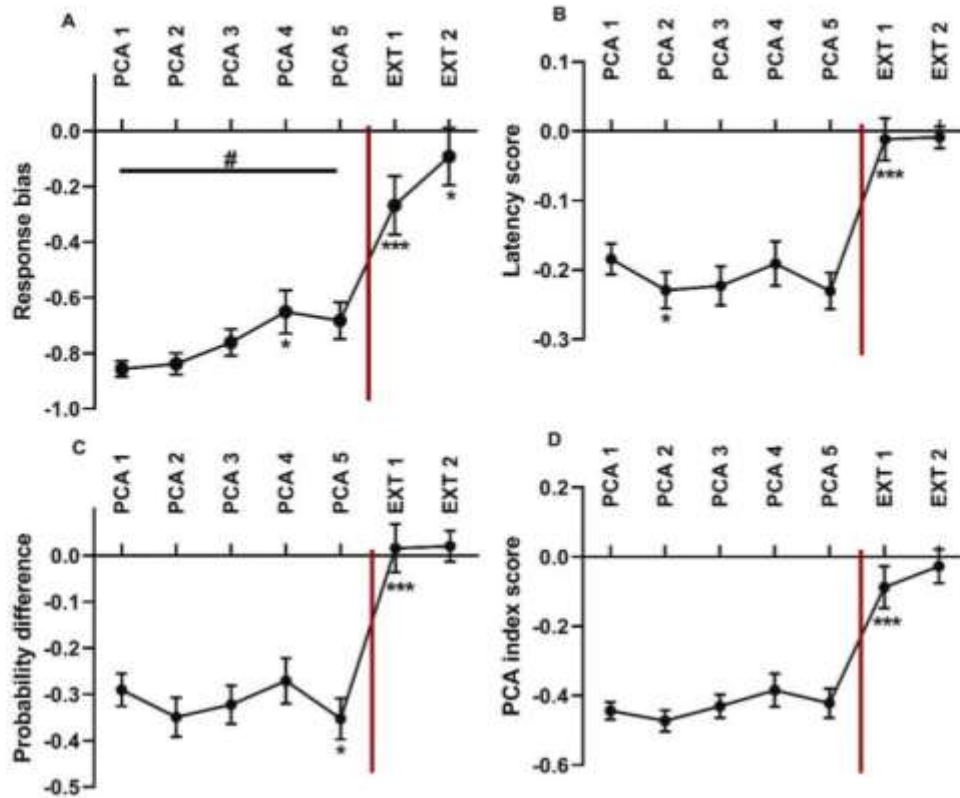


Fig. 2. The index scores of the response bias (A), latency score (B), probability difference (C) and the overall index score (D) over all testing days measured in female heterozygous *Cacna1c* Sprague-Dawley rats ($N = 38$). An ANOVA ($\# p < 0.05$) was calculated over all five PCA training days and the t-test ($* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phase (PCA and extinction).

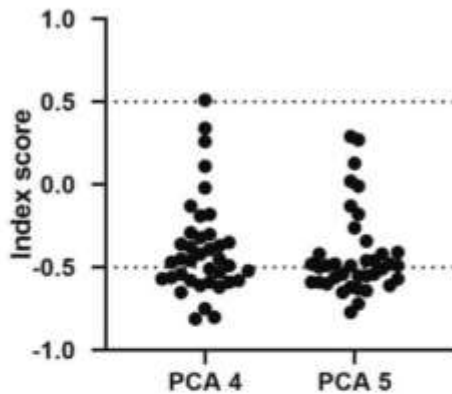


Fig. 3. The index scores of the individual subjects calculated as the average of the response bias (RB), latency score (LS) and probability difference (PD), on PCA training day four and five measured in female heterozygous *Cacna1c* Sprague-Dawley rats ($N = 38$).

inter-stimulus-interval. We found statistical differences in the number of calls on PCA 4 ($F_{1,109} = 8.087, p = 0.006$) and PCA 5 ($F_{1,106} = 13.78, p < 0.001$; data not shown), which were always highest during habituation.

3.3. Correlational analyses of PCA Training

In general, the daily numbers of 50 kHz calls were highly correlated with each other over all eight testing days (Table 2). Moreover, positive correlations between PCA index score and 50 kHz USV emerged over PCA training days (Table 3) indicating, that the PCA scores stabilize over training days, while the USV calls stay stable.

3.4. Activity box

Since we found a relationship between 50 kHz calls during PCA training and the PCA index score, we next asked whether there are alterations in behavior in the initial screening test, the activity box.

50 kHz USV rates in the activity box test did not correlate with those during PCA training and extinction (data not shown). The number of 50 kHz USV recorded in the activity box did not correlate with the PCA index score (data not shown). When further looking into the correlations between USV recorded during PCA training and behavior in the activity box, we found a positive relationship between the number of calls during the PCA training sessions with the time spent in the center on both days of the activity box (Table 4).

3.5. Comparison of rats with wildtype littermate controls from our previous study

Finally, we compared the results of this present study of 38 heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats to the results of 34 *Cacna1c*^{+/+} controls which were published in our previous study [70]. Such a comparison is

Table 1
Correlations between the index scores throughout the Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Paradigm and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation r .

Index scores	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	Ext 1
PCA 2	0.342*					
PCA 3	-0.087	0.385*				
PCA 4	-0.214	0.236	0.463**			
PCA 5	-0.195	0.111	0.480**	0.492**		
Ext 1	0.436**	-0.047	0.434**	0.495**	0.464**	
Ext 2	0.485**	-0.217	0.408*	0.545**	0.513**	0.722**

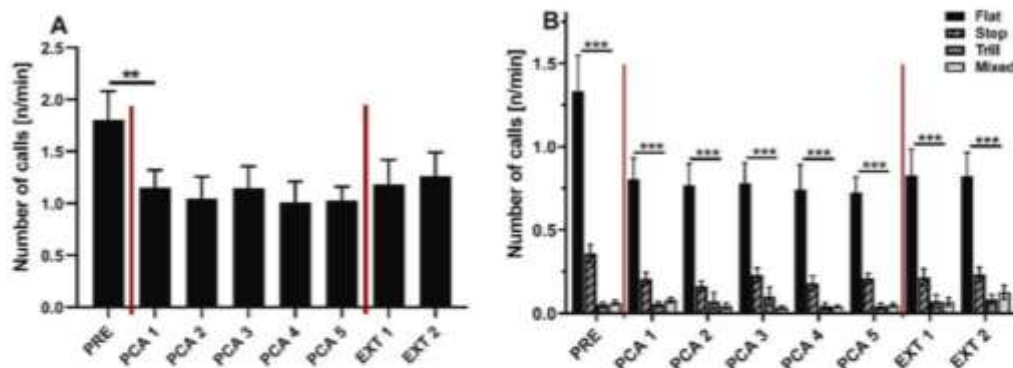
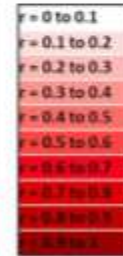


Fig. 4. Comparison between the number of 50 kHz calls during PCA training and extinction in female heterozygous *Cacna1c* Sprague-Dawley rats ($N = 38$) (A). An ANOVA was calculated over all five PCA training days and the t-test (** $p < 0.01$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phases (pretraining (PRE), PCA and extinction). Number of flat, step, trill and mixed calls in the PCA paradigm (B). An ANOVA was calculated between the call subtypes within each testing day (B).

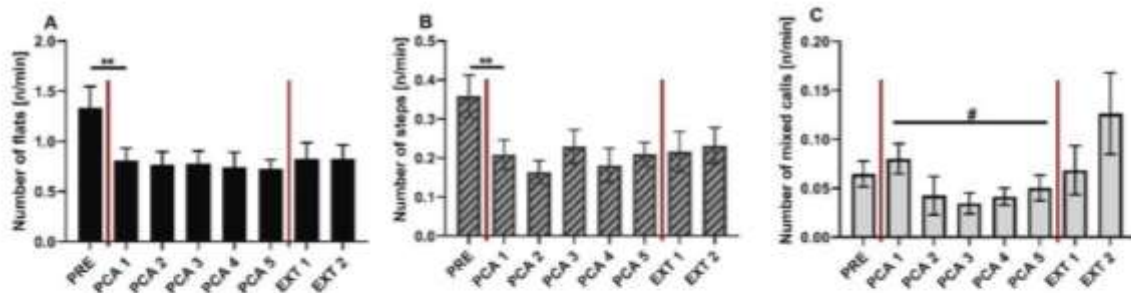


Fig. 5. Number of flats (A), steps (B) and mixed calls (C) calls over all training days measured in female heterozygous *Cacna1c* Sprague-Dawley rats ($N = 38$). An ANOVA (# $p < 0.05$) was calculated over all five PCA training days and the t-test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) was calculated to compare data to the respective previous day. The red line indicates the change in the training phases (pretraining (PRE), PCA and extinction).

justified, since the previously published subjects were littermate controls and were tested and analyzed under the same conditions.

PCA training: *Cacna1c*^{+/−} females displayed more goal- than sign-tracking phenotypes, similar to *Cacna1c*^{+/+} littermate controls [70]. While two out of 34 wildtype rats were sign-trackers, none of the *Cacna1c* haploinsufficient subjects showed sign-tracking behavior

according to the criteria used by previous studies to characterize subjects as sign- or goal-tracker [2,27,54]. Further, there was no genotype difference in sign- and goal-tracking behavior (number and latency of lever presses and magazine entries, response bias, latency score, probability difference and PCA index score; data not shown). In Sangarapillai et al. [70], we characterized 11 out of 34 *Cacna1c*^{+/+} and here 16 out of

Table 2
Correlations between numbers of emitted calls during Pretraining (Pre), Pavlovian Conditioned Approach (PCA), Training and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Number of 50-kHz calls	Pre	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	Ext 1	Ext 2
PCA 1	0.562**							
PCA 2	0.360*	0.732**						
PCA 3	0.405*	0.790**	0.886**					
PCA 4	0.452**	0.771**	0.761**	0.718**				
PCA 5	0.302	0.581**	0.538**	0.560**	0.577**			
Ext 1	0.336*	0.434**	0.331**	0.282**	0.408**	0.421**		
Ext 2	0.331*	0.431**	0.323**	0.272**	0.407**	0.406**	0.372**	

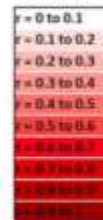
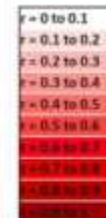


Table 3
Correlations between index scores and number of calls during Pretraining (Pre), Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Training and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Number of 50-kHz calls	Pre	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	Ext 1	Ext 2
PCA 1	-0.251	0.491**	-0.434**	-0.509**	-0.475**	-0.365*	0.495**	-0.297
PCA 2	-0.211	-0.364*	-0.211	-0.250	-0.157	-0.023	-0.150	-0.167
PCA 3	0.280	0.112	0.239	0.143	0.388*	0.224	0.346*	0.144
PCA 4	0.393*	0.097	0.133	0.131	0.221	0.067	0.197	0.082
PCA 5	0.335**	0.150	0.028	0.023	0.330*	0.186	0.222	0.066
Ext 1	0.549**	0.416**	0.288	0.393*	0.418**	0.237	0.317	0.149
Ext 2	0.439**	0.435**	0.432**	0.525**	0.449**	0.234	0.413**	0.262



38 *Cacna1c*^{+/-} rats as goal-trackers, when using the previously introduced scoring limits (scores between -0.5 and -1).

When only looking at these goal-trackers and comparing them between genotypes, there is a genotype difference over PCA training days ($F_{1,25} = 7.923, p = 0.009$), largely due to less prominent goal-tracking behavior in heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats on day 1 ($F_{1,25} = 5.299, p = 0.03$) and 5 ($F_{1,25} = 14.496, p = 0.001$). The same accounts for extinction ($F_{1,25} = 6.16, p = 0.020$), especially on extinction day 2 ($F_{1,25} = 6.827, p = 0.015$; Fig. 6).

When looking again into all rats, independent of their scoring in the Pavlovian approach task, there was a genotype difference in the number of 50 kHz calls emitted over the five PCA training days ($F_{1,70} = 4.459, p = 0.038$; Fig. 7A), with *Cacna1c*^{+/-} rats emitting fewer calls than littermate controls, particularly on day one ($F_{1,70} = 4.002, p = 0.049$) and three ($F_{1,70} = 4.255, p = 0.043$).

Also, *Cacna1c*^{+/-} emitted less flats (Fig. 7B) and steps (Fig. 7C) compared to the *Cacna1c*^{+/+} littermates from PCA 1 to 5 (flat: $F_{1,70} =$

4.659, $p = 0.034$; step: $F_{1,70} = 4.466, p = 0.038$). While the flat calls significantly differed on PCA 1 ($F_{1,70} = 4.321, p = 0.041$) and PCA 3 ($F_{1,70} = 4.377, p = 0.04$), the steps showed genotype differences on day 3 ($F_{1,70} = 5.379, p = 0.023$).

The decrease from pretraining to PCA 1 differed significantly between the genotypes in the number of calls ($F_{1,70} = 5.320, p = 0.024$), flats ($F_{1,70} = 5.011, p = 0.028$), steps ($F_{1,70} = 4.822, p = 0.031$) and trills ($F_{1,70} = 7.792, p = 0.007$; Fig. 7D), always showing a genotype difference also during pretraining (number of calls: ($F_{1,70} = 5.788, p = 0.019$), flats: ($F_{1,70} = 4.587, p = 0.036$), steps: ($F_{1,70} = 6.187, p = 0.015$), trills: ($F_{1,70} = 10.153, p = 0.002$). There was no difference from PCA 5 to extinction day 1.

Similar to the previously published results [70], the number of calls were always the highest in the beginning of the sessions and decreased over time. In addition, there were no differences between the training days.

Activity box: Similar to PCA training, there was a genotype

Table 4
Correlations between behavior during testing in the activity box and the number of calls emitted during Pretraining (Pre), Pavlovian Conditioned Approach (PCA) Training and Extinction (Ext). The intensity of the color indicates the strength of the correlation 'r'.

Overt behavior Number of 50-kHz calls	Behavior					
	Distance traveled day 1	Center time day 1	Rearing day 1	Distance traveled day 2	Center time day 2	Rearing day 2
Pre	-0.151	0.138	-0.057	-0.140	0.070	-0.062
PCA 1	-0.110	0.483**	-0.028	-0.096	0.390*	-0.102
PCA 2	-0.068	0.811**	-0.041	0.016	0.593**	0.017
PCA 3	-0.015	0.622**	-0.060	-0.110	0.898**	0.062
PCA 4	0.031	0.386*	-0.163	0.049	0.328*	-0.047
PCA 5	-0.060	0.119	-0.160	-0.051	0.050	-0.165
Ext 1	0.026	0.375*	-0.182	0.039	0.255	0.040
Ext 2	0.068	0.387*	0.111	0.185	0.366*	0.244

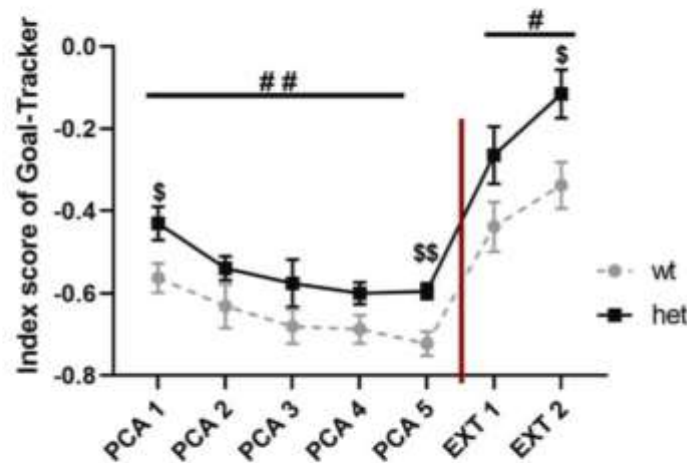


Fig. 6. Comparison between female Sprague-Dawley heterozygous *Cacna1c* ($N = 16$) and wildtype *Cacna1c* ($N = 11$) goal-tracker in the PCA index score during PCA training and extinction. An ANOVA was calculated over all five PCA training days ($\# p < 0.05$; $\#\# p < 0.01$) and between the genotypes ($S p < 0.05$; $SS p < 0.01$). The red line indicates the change in the training phases (pretraining, PCA and extinction).

difference between the *Cacna1c* haploinsufficient females and their littermate controls in the number of 50 kHz calls emitted in the activity box. While genotypes did not differ on the first day, *Cacna1c*^{+/-} rats emitted significantly fewer 50 kHz USV on the second day compared to littermate controls ($F_{1,70} = 4.232, p = 0.043$; data not shown).

4. Discussion

The present study was conducted in order to investigate how heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats behave in the sign- and goal-tracking paradigm. We were especially interested to see whether there are trait-like differences in the emission of 50 kHz calls and if these are associated with sign- versus goal-tracking. None of the tested rats met the sign-tracking criterion, while 42% of rats showed goal-tracking behavior and 58% were intermediates. The 50 kHz calls were intra-individually stable and there were no prominent state differences. However, call rates differed substantially between subjects. Calls were not CS specific, occurring mainly during pretraining and in the beginning of each session. Importantly, the call rates were negatively associated with goal-

tracking. Interestingly, subsequent reward omission was not reflected in the number of calls. Compared to our previously published data of the littermate controls heterozygous rats called less during habituation and five days of PCA training. Independent of the genotype, call emission was subject-dependent and negatively associated with goal-tracking. Together, these findings provide evidence in support of 50 kHz calls as a trait marker.

4.1. PCA index score is stable over sessions; however, there is an overall shift towards goal-tracking in behavior

Although there was no significant difference in the PCA index score of rats over the PCA training days, the strength of the correlation of the index score with each other over the testing days increased over the training days. This indicates that the expression of the phenotype strengthens over time. In addition, 42% of the analyzed subjects showed goal-tracking behavior and the 58% intermediates had no preference, while none of the rats showed sign-tracking behavior. Previous studies had reported almost equal portions of sign-trackers, goal-trackers and

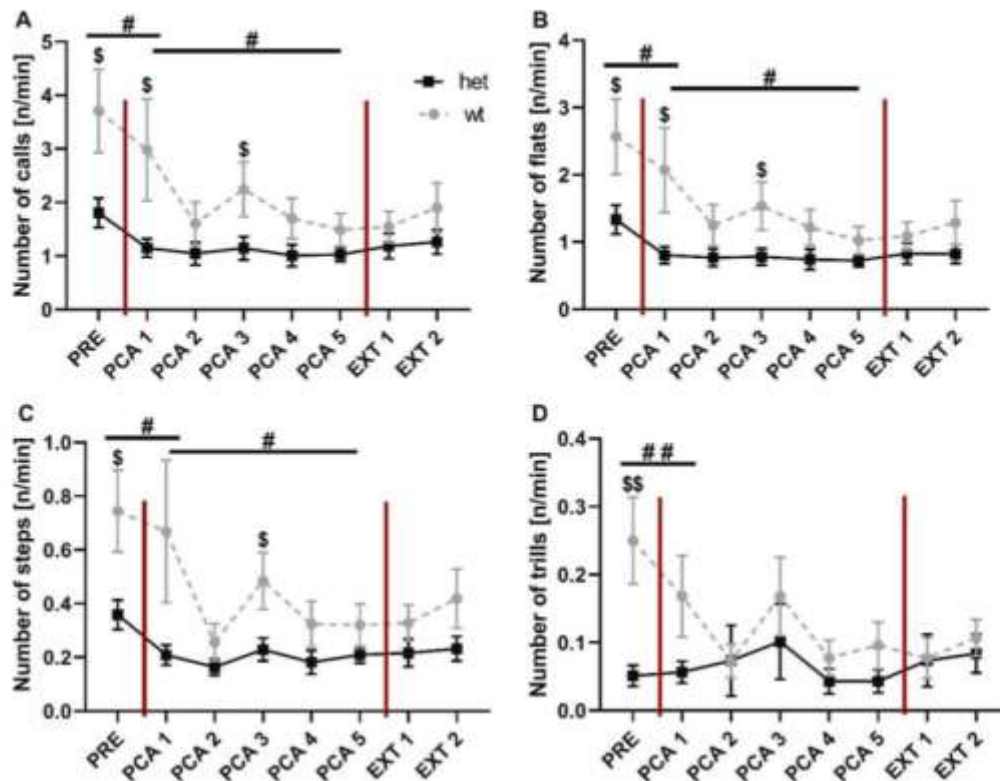


Fig. 7. Comparison between female Sprague-Dawley heterozygous *Cacna1c* ($N = 38$) and wildtype *Cacna1c* ($N = 34$) in the number of 50 kHz calls in the PCA paradigm (A) and number of flats (B), steps (C) and trills (D) over all training days and extinction. An ANOVA was calculated over all five PCA training days ($\# p < 0.05$; $\#\# p < 0.01$) and between the genotypes ($\$ p < 0.05$; $$$ p < 0.01$). The red line indicates the change in the training phases (pretraining, PCA and extinction).

intermediates [2,54]. This discrepancy cannot be due to differences in the test paradigm, as we strictly followed the protocol of Fitzpatrick and Morrow [27]. Also, Pitchers et al. [65] have reported no sex differences in the expression of this trait. However, previous studies have reported to see dissimilarities between strains due to genetic differences ([29,41]; for further discussion see [70]). Surprisingly, their littermate controls described in our previous study [70] showed this clear tendency toward goal-tracking as well. It needs to be pointed out, that siblings were kept together from both studies independent of their genotype. Therefore, we need to consider that they might have affected each other, as rats are highly social animals and interact a lot with each other. It is known that the heterozygous rats show alterations in their behavior, including the emission of USV [43,44,67]. One could argue, that *Cacna1c* haploinsufficiency may have led to more goal-tracking and that this phenotype has affected the littermate controls due to the housing condition. However, this is not coherent with our findings when looking closer to the goal-tracker only (animals scoring between -0.5 and -1 in the PCA index score), as goal-tracking was more prominent in the littermate controls. The index score of the goal-tracker differed significantly between the genotypes/littermates although more heterozygous rats showed goal-tracking behavior. Additional studies are needed to investigate if and how the ‘housing together’ might influence the subjects. In summary, the nature of the shift toward goal-tracking is unclear and requires further consideration in future.

4.2. The number of 50 kHz USV are stable over all testing phases

One of the main reasons for the individual investigation of subjects is

the high inter-individual variability in the emission of 50 kHz calls [73]. This is discussed to be due to subject-dependent dispositions or traits having their origin in physiological differences of mesolimbic dopamine [25,58]. We found that rats emitted 50 kHz USV during the PCA paradigm with substantial inter-individual variability together with individual stability over PCA training days. In general, this confirms similar outcomes obtained in Wistar rats tested in different test paradigms [59, 73]. In addition, we found similar results in wildtype Sprague-Dawley rats [70], indicating USV to be a strong individual trait, independent of the genotype. In our previous paper, we suggested that the 50 kHz USV possibly reflect trait-like socio-affective phenotypes associated with DA signaling, which we further support with the findings presented here. In addition, this further supports that this outcome is a less state like, but more trait like effect in the individuals.

4.3. 50 kHz calls were not CS specific

Several studies have reported 50 kHz calls not only in rewarding situations but also in anticipation of reward [4,8,47,84]. However, the calls seen here were not CS specific, as they did not primarily occur during the CS. One could argue that the lever during the CS and the pellet during the post CS distracted the subjects and that this might have eventually led to decreased number of 50 kHz calls (for further discussion see [70]). But independent of testing day, calls were always highest at the beginning of a given test and decreased over time. Furthermore, calls were highest during the pretraining day compared to the other days, which might be due to novelty. This is in line with other evidence, which have reported highest calling rates in the early phases [12,73].

This result indicates that the subjects did not necessarily call in anticipation of reward or the reward itself. The calls might rather signal arousal/excitement in the beginning, which habituates over time. In addition, the prevalence of call subtypes differed strongly with flat calls being the most frequent. Wöhr et al. [88] suggested that such flat calls might serve as 'non-affective contact calls'. This would suggest that the subjects always called more especially in the beginning of a session to re-establish contact with their conspecifics when taken out from their group cages.

4.4. USV were negatively correlated with PCA index score

Around 42% of the tested rats displayed goal-tracking. The 50 kHz calls, however, were negatively associated with goal-tracking and positively with sign-tracking. Notably a strong positive correlation between the PCA index score and 50 kHz USV emerged over PCA training days, as the PCA index stabilized over training. Other studies have shown, that the bottom-up subcortical control [31,36,71], especially the activity of the mesolimbic DA system, is more pronounced in sign-trackers [32]. Further, it is known that the emission of 50 kHz USV is positively associated with DA activity in reward-related brain areas [19]. Therefore, we reasoned that more interaction with the sign should be accompanied by the emission of more dopamine-associated 50 kHz USV. Since the number of calls correlated with the PCA index score, our results confirm this prediction.

4.5. Extinction in overt behavior, but no extinction in 50 kHz USV emission

There was a clear extinction effect. Upon reward omission, the number of magazine entries decreased and the latencies increased strongly while animals started to interact more and faster with the cue during the CS phase. In contrast to that, reward omission was not mirrored in the emission of 50 kHz USV. Browning et al. [10] reported a reduction in the number of 50 kHz calls during extinction in a cocaine self-administration task. In the same study, however, this effect was not seen during extinction to sucrose self-administration. The L-type calcium channels in this region are reported to play a crucial role in learning and memory [14,56]. DA signaling via D1 receptors play a key role in extinction learning [74]. Burgdorf et al. [14] reported that deleting *Ca_v1.2* in D1 receptor-expressing cells in the hippocampus results in impairments in extinction of cocaine conditioned place preference task. These findings show that DA and *Ca_v1.2* channels are linked with each other and at least to some extent mediate extinction learning. But, the comparison of the findings of our previous study [70] to the present results do not clearly indicate impairments in extinction learning in *Cacna1c*^{+/-} rats, as the number of 50 kHz USV were stable over the training days and extinction in the littermate controls [70]. While *Cacna1c*^{+/-} rats called significantly less compared to their littermate controls during habituation and PCA training, they called at similar rates during extinction. Regardless of that, extinction does not affect the emission of USV, which further underlines 50 kHz calls as an independent and very stable trait marker.

4.6. *Cacna1c* haploinsufficient rats call less compared to littermate controls during PCA

The comparison of the present *Cacna1c*^{+/-} rats with their *Cacna1c*^{+/+} littermate controls showed that heterozygous *Cacna1c*^{+/-} rats called less than *Cacna1c*^{+/+} rats. In particular, flat and step calls were reduced. This pattern was not context-dependent, as the heterozygous females also called less in the activity box, a context rather different to that used for the Pavlovian paradigm. This suggests that independent of the context, *Cacna1c*^{+/-} rats call less, which is possibly due to genetic effects on brain circuits relevant for reward processing or due to vocal changes caused by changes to the production mechanisms. Compared to other

studies [43], however, we recorded low vocal rates. This is not surprising because low 50 kHz USV emission rates are typically seen in non-social situations. Indeed, when explicitly comparing social reward tasks to non-social situations, social rewards elicit a stronger 50 kHz USV response [20,57]. Importantly, however, although the absolute values appear to be very low, the response patterns are consistent with previous social findings that heterozygous females vocalize less than wildtype females [67]. Other findings with male rats of the same genotype show similar results as subjects not only emitted fewer calls during rough-and-tumble-play, but also that call subtypes differed, since flat and mixed calls were reduced [43]. Together, this indicates that 50 kHz USV emission in *Cacna1c* haploinsufficient rats is reduced not only in social but also non-social conditions. Several studies have reported sex-dependent differences in the emission of 50 kHz calls in *Cacna1c* haploinsufficient rats [44,45,89], which ideally also needs to be taken into account. However, we only analyzed female rats. Given that 50 kHz calling is largely dependent on meso-limbic DA function, one can speculate that such activity is less pronounced in *Cacna1c*^{+/-} rats, a hypothesis which has to be tested in the future.

4.7. Neurobiology

Although neural mechanisms were no subject of this study, one can speculate that DAergic mechanisms might have played a role in the emission of appetitive 50 kHz calls and in the reward responsiveness of *Cacna1c* rats. Considering USV emission, previous studies have reported that D-amphetamine injection not only leads to exaggerated emission of 50 kHz USV (e.g. [64]), but also to increased DA activity [37,92]. The key brain structure that is discussed to be involved in drug-induced production of 50 kHz USV is the NAcc shell [13,17]. This evidence indicates that at least partly the 50 kHz calls are regulated by the mesolimbic reward pathway, especially dopaminergic neurons.

Further studies have identified an association between altered reward processing with multiple psychological disorders [63,83]. One of the key modulators of reward and motivation is the NAcc which integrates among others dopaminergic inputs from the VTA within the mesolimbic reward circuitry [40,49]. Lancaster et al. [50] found in a human study, that *Cacna1c* risk allele carrier displayed a blunted behavioral response in a reward-based task (reduced reward responsiveness and impairments in reward-based learning). This suggests that if reward responsiveness may serve as a trait marker, there is an association between *Cacna1c* and reward circuitry at least to some extent [39].

These findings imply that DA is the link between the used reward paradigm, the recorded appetitive 50 kHz calls and the *Cacna1c* gene. Measuring DA activity would give more insights and should be considered in future studies.

5. Conclusion

50 kHz calls reflect positive affect and are linked with meso-limbic DA functions. The *Cacna1c* gene in humans is associated with several mental disorders, among others mood disorders, partly probably due to altered DA signaling. *Cacna1c* haploinsufficiency in rats leads to less sign-tracking behavior accompanied by reduced number of appetitive 50 kHz calls. Further, there was a high intra-individual variability and inter-individual stability in the emission of USV, which we recommend should receive more attention in other paradigms. These findings provide evidence that USV are a strong trait marker and that there is a less state-like and more trait-like effect in individuals.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work is part of the DFG-funded Research Training Group "Breaking Expectation" (GRK 2271) and the Forschergruppe "Neurobiology of affective disorders: Translational perspectives on brain structure and function" (FOR 2107) and was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to Rainer K. W. Schwarting (GRK2271/WP10) and Markus Wöhr (GRK2271/WP14 and WO 1732/4-2). The authors wish to thank Theresa M. Kisko and Marek Ellenberger for her help in this project. The authors report no conflict of interest.

Appendices

None.

References

- [1] A.M. Ahrens, C.W. Noble, L.E. Page, E.V. Maier, C.L. Dornathelle, T. Schollert, Individual differences in the conditioned and unconditioned rat 50 kHz ultrasonic vocalizations elicited by repeated amphetamine exposure, *Psychopharmacology* 229 (4) (2013) 667–700 (Berl.).
- [2] A.M. Ahrens, R.F. Singer, C.J. Fitzpatrick, J.D. Morrow, T.E. Robinson, Rats that sign-track are resistant to Pavlovian but not instrumental extinction, *Behav. Brain Res.* 296 (2016) 418–430.
- [3] R.J. Barfield, P. Auerbach, L.A. Geyer, T.R. McInosh, Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior, *Am. Zool.* 19 (2) (1979) 469–480.
- [4] A. Borta, M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, Rat ultrasonic vocalization is aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior, *Behav. Brain Res.* 166 (2) (2006) 271–280.
- [5] M.D. Braun, T.M. Kisko, D. Dalla Vecchia, B. Andreantini, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Sex-specific effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on object recognition, spatial memory, and reversal learning capabilities in rats, *Neurobiol. Learn. Mem.* 155 (2018) 543–555.
- [6] M.D. Braun, T.M. Kisko, S.H. Witt, M. Rietschel, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Long-term environmental impact on object recognition, spatial memory and reversal learning capabilities in *Cacna1c*-haploinsufficient rats, *Hum. Mol. Genet.* 28 (24) (2019) 4113–4131.
- [7] J.C. Brems, R.K. Schwarting, Attribution and expression of incentive salience are differentially signaled by ultrasonic vocalizations in rats, *PLoS One* 9 (7) (2014), e102414.
- [8] J.C. Brems, R.K. Schwarting, Individual differences in anticipatory activity to food rewards predict cue-induced appetite 50 kHz calls in rats, *Physiol. Behav.* 149 (2015) 107–118.
- [9] J.R. Browning, D.A. Browning, A.O. Maxwell, Y. Ding, H.T. Jansen, J. Panksepp, R.A. Sieg, Positive affective vocalizations during cocaine and sucrose self-administration: a model for spontaneous drug desire in rats, *Neuropharmacology* 61 (1–2) (2011) 268–275.
- [10] S.M. Brudzynski, Intra-communication: Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats, *Curr. Opin. Neurobiol.* 23 (3) (2013) 310–317.
- [11] S.M. Brudzynski, A. Piosik, Social contacts and production of 50 kHz short ultrasonic calls in adult rats, *J. Comp. Psychol.* 116 (1) (2002) 73–82.
- [12] S.M. Brudzynski, M. Salkisnu, M. Komadoski, K. Scullion, S. Duffin, J. Burgdorf, B. A. Kroes, J.R. Moskal, J. Panksepp, Effects of intracranial amphetamine on production of 50 kHz vocalizations in three lines of selectively bred Long-Evans rats, *Behav. Brain Res.* 217 (1) (2011) 32–40.
- [13] C.E. Burgdorf, K.C. Schierhuber, A.S. Lee, D.K. Fischer, T.A. Van Kempen, V. Mudragel, R.L. Huganir, T.A. Milner, M.J. Glass, A.M. Rajadhyaksha, Extinction of contextual cocaine memories requires *Cox1-2* within D1R-expressing cells and recruits hippocampal *Cav1.2*-dependent signaling mechanisms, *J. Neurosci.* 27 (49) (2007) 11894–11911.
- [14] J.S. Burgdorf, S.M. Brudzynski, J.R. Moskal, Using rat ultrasonic vocalization to study the neurobiology of emotion: from basic science to the development of novel therapeutics for affective disorders, *Curr. Opin. Neurobiol.* 60 (2020) 192–200.
- [15] J. Burgdorf, B. Kingston, J. Panksepp, Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats, *Behav. Neurosci.* 114 (2) (2000) 320–327.
- [16] J. Burgdorf, B. Kingston, J. Panksepp, S. Ikemoto, Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats, *Behav. Neurosci.* 115 (4) (2001) 940–944.
- [17] J. Burgdorf, R.A. Eason, J.R. Moskal, J.G. Pfau, S.M. Brudzynski, J. Panksepp, Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during wating, play, and aggression: behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback, *J. Comp. Psychol.* 122 (4) (2008) 357–367.
- [18] J. Burgdorf, P.L. Wood, R.A. Kroes, J.R. Moskal, J. Panksepp, Neurobiology of 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies, *Behav. Brain Res.* 182 (2) (2007) 274–283.
- [19] C.J. Burke, M. Markovina, S.M. Pellis, D.R. Essino, Rat 50 kHz call calls are tied to the expectation of social interaction, *Brain Sci.* 11 (9) (2021) 1142.
- [20] E.R. Cuffey, R.G. Marx, J.F. Neumaier, DeepFusio: a deep learning based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations, *Neuropsychopharmacology* 44 (5) (2019) 859–868.
- [21] H.E. Covington III, K.A. Miczek, Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress, *Eur. J. Pharmacol.* 467 (1–3) (2003) 1–13.
- [22] D.T. Dao, F.B. Mahon, X. Cai, C.E. Kevarates, R.A. Blackwell, M. Arnd, J. Shi, P. P. Zandi, P. O'Donnell, J.A. Knowles, M.M. Weisman, W. Coryell, W.A. Scheffer, W.R. Lawson, D.F. Levinson, S.M. Thompson, J.E. Potash, T.D. Gould, Bipolar Genome Study (BIGS) Consortium, Mood disorder susceptibility gene *CACNA1C* modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans, *Biol. Psychiatry* 68 (9) (2010) 801–810.
- [23] K.A. Engelhardt, E. Fuchs, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: implications for mania models, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27 (3) (2017) 261–273.
- [24] K.A. Engelhardt, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Mapping trait-like socio-affective phenotypes in rats through 50 kHz ultrasonic vocalizations, *Psychopharmacology* 235 (1) (2018) 83–98 (Berl.).
- [25] C.J. Fitzpatrick, T. Geary, J.F. Creeden, J.D. Morrow, Sign-tracking behavior is difficult to extinguish and resistant to multiple cognitive enhancers, *Neurobiol. Learn. Mem.* 163 (2019), 107045.
- [26] C.J. Fitzpatrick, J.D. Morrow, Pavlovian conditional approach training in rats, *JOVE, J. Vis. Exp.* (106) (2016) e52580.
- [27] C.J. Fitzpatrick, J.D. Morrow, Subanesthetic ketamine decreases the incentive-motivational value of reward-related cues, *J. Psychopharmacol.* 31 (1) (2017) 67–74.
- [28] C.J. Fitzpatrick, S. Gopalakrishnan, E.S. Cogan, L.M. Yager, P.J. Meyer, V. Lovic, S. B. Flagel, Variation in the form of Pavlovian conditioned approach behavior among outbred male Sprague-Dawley rats from different vendors and colonies: sign-tracking vs. goal-tracking, *PLoS One* 8 (10) (2013) e79042.
- [29] S.B. Flagel, H. Akil, T.E. Robinson, Individual differences in the attribution of incentive salience to reward-related cues: Implications for addiction, *Neuropharmacology* 56 (2009) 139–148.
- [30] S.B. Flagel, C.M. Cameron, K.N. Pickup, S.J. Watson, H. Akil, T.E. Robinson, A food predictive cue must be attributed with incentive salience for it to induce c-fos mRNA expression in cortico-striatal-thalamic brain regions, *Neuroscience* 196 (2011) 80–96.
- [31] S.B. Flagel, S.J. Watson, T.E. Robinson, H. Akil, Individual differences in the propensity to approach signals vs. goals promote different adaptations in the dopamine system of rats, *Psychopharmacology* 191 (3) (2007) 599–607 (Berl.).
- [32] A.M. Geuru, G.J. Cox, Y. Freyvert, B. Zeller, J.C. Miller, V.M. Choi, S.S. Jenkins, A. Wood, X. Cui, X. Meng, A. Vincent, S. Lam, M. Michalkiewicz, R. Schilling, J. Foerster, S. Kalibow, H. Weiler, S. Minoret, I. Anegón, G.D. Druis, L. Zhang, E. J. Behar, P.D. Gregory, P.D. Urnov, H.J. Jacob, R. Buchow, Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases, *Science* 325 (5939) (2008) 433–433.
- [33] A. Ghosh, J. Camahan, M.E. Greenberg, Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons, *Science* 263 (5155) (1994) 1618–1623.
- [34] E.K. Green, D. Gonzalez, I. Jones, L. Jones, G. Kirov, S. Cairns, K. Gordon-Smith, C. Fraser, L. Furt, E. Russell, M.L. Hamshere, V. Moikivins, I. Nikulin, A. Farmer, P. McGuffin, P.A. Holmans, M.J. Owen, M.C. O'Donovan, N. Craddock, Wellcome Trust Case Control Consortium, The bipolar disorder risk allele at *CACNA1C* also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia, *Mol. Psychiatry* 15 (10) (2010) 1016–1022.
- [35] J.L. Haight, Z.L. Fuller, K.M. Fraser, S.B. Flagel, A food-predictive cue attributed with incentive salience engages subcortical afferents and efferents of the paraventricular nucleus of the thalamus, *Neuroscience* 340 (2017) 135–152.
- [36] D.J. Hird, S.L. Smith, J. Gosden, D.J. Nutt, Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective, *J. Psychopharmacol.* 27 (6) (2013) 479–496.
- [37] S. Heyes, W.S. Pratt, E. Rees, S. Dakinens, L. Ferron, M.J. Owen, A.C. Dolphin, Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders, *Prog. Neurobiol.* 134 (2015) 36–54.
- [38] Z.D. Kabir, A.S. Lee, A.M. Rajadhyaksha, L-type Ca^{2+} channels in mood, cognition and addiction: integrating human and rodent studies with a focus on behavioural endophenotypes, *J. Physiol.* 594 (20) (2016) 5823–5837.
- [39] P.W. Kalivas, N.D. Volkow, The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice, *Am. J. Psychiatry* 162 (6) (2005) 1405–1413.
- [40] D.N. Kearns, M.A. Gomez-Serrano, S.J. Weiss, A.L. Biles, A comparison of Lewis and Fischer rat strains on autoshaping (sign-tracking), discrimination reversal learning and negative autoshaping, *Behav. Brain Res.* 169 (2) (2006) 193–200.
- [41] T. Kirschner, M. Wöhr, I. Nematik, R. Schwarting, G. Schiratt, J. Allerisk, C. Calmes, H. Gorn, T. Hahn, B. Müller-Myhok, A. Dempfle, M. Hahnemann, A. Jansen, P. Pfefferle, H. Remt, M. Rietschel, S.H. Witt, M. Nöthen, A. Krug, U. Dannowski, Neurobiology of the major psychoses: a translational perspective on brain structure and function - the FOR2107 consortium, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 269 (3) (2019) 949–962.
- [42] T.M. Kisko, M.D. Braun, S. Michels, S.H. Witt, M. Rietschel, C. Calmes, R. Schwarting, M. Wöhr, *Cacna1c* haploinsufficiency leads to pro-social 50 kHz ultrasonic communication deficits in rats, *Dis. Model Mech.* 11 (6) (2018), dms024118.
- [43] T.M. Kisko, M.D. Braun, S. Michels, S.H. Witt, M. Rietschel, C. Calmes, R. Schwarting, M. Wöhr, Sex-dependent effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on juvenile social play behavior and pro-social 50 kHz ultrasonic communication in rats, *Genes Brain Behav.* 19 (2) (2020) e12552.

- [45] T.M. Kisko, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Sex differences in the acoustic features of social play-induced 50 kHz ultrasonic vocalizations: a detailed spectrographic analysis in wild-type Sprague-Dawley and *Cacna1c* haploinsufficient rats. *Dev. Psychobiol.* 63 (2) (2021) 262–276.
- [46] D.J. Klapp, L.A. Pihorecky, An air-puff stimulus method for elicitation of ultrasonic vocalizations in rats. *J. Neurosci. Methods* 62 (1–2) (1995) 1–5.
- [47] B. Knutson, J. Burgdorf, J. Panksepp, Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J. Comp. Psychol.* 112 (1) (1998) 65–73.
- [48] B. Knutson, J. Burgdorf, J. Panksepp, Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol. Bull.* 128 (6) (2002) 961–977.
- [49] G.F. Koob, N.D. Volkow, Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35 (1) (2010) 217–238.
- [50] T.M. Lancaster, E.A. Heery, R. Mantripragada, D.F.J. Linden, *CACNA1C* risk variant affects reward responsiveness in healthy individuals. *Transl. Psychiatry* 4 (10) (2014) e461–e461.
- [51] K.A. Lawson, A.Y. Flores, R.E. Huttenloer, C.M. Ruiz, S.V. Mahler, Nucleus accumbens chemo-genetic inhibition suppresses amphetamine-induced ultrasonic vocalizations in male and female rats. *Brain Sci.* 11 (10) (2021) e1255.
- [52] A.S. Lee, H. De Jesús-García, Z.D. Kabir, W. Knobbe, M. Orr, C. Burgdorf, P. Huntington, L. McDaniel, J.K. Britt, F. Hoffmann, D.J. Brac, A.M. Rajadhyaksha, A.A. Pieper, The neuropsychiatric disease-associated gene *Cacna1c* mediates survival of young hippocampal neurons. *eNeuro* 3 (2) (2016). ENURO.0006-16.2016.
- [53] V. Litvin, D.C. Blanchard, R.J. Blanchard, Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behav. Brain Res.* 182 (2) (2007) 166–172.
- [54] P.J. Meyer, V. Lovic, B.T. Saunders, L.M. Yager, S.B. Flagel, J.D. Murray, T. E. Robinson, Quantifying individual variation in the propensity to attribute incentive salience to reward cues. *PLoS One* 7 (6) (2012) e38987.
- [55] A.L. Moon, K.M. Brydges, L.S. Wilkinson, J. Hall, K.L. Thomas, *Cacna1c* hemizygosity results in aberrant fear conditioning to neutral stimuli. *Schizophr. Bull.* 46 (5) (2020) 1231–1239.
- [56] S. Moosmann, N. Haider, N. Klugbauer, H. Adelsberger, N. Langewieser, J. Müller, M. Stiens, E. Marais, V. Schulz, L. Lantsov, S. Goebels, K.A. Nave, D.R. Storm, F. Hofmann, T. Kleppisch, Role of hippocampal *Ca_v1.2* Ca^{2+} channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J. Neurosci.* 25 (43) (2005) 9883–9892.
- [57] K.G. Mulvihill, S.M. Brudzynski, Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. *Physiol. Behav.* 196 (2018) 200–207.
- [58] K.G. Mulvihill, S.M. Brudzynski, Effect of microinjections of dopamine into the nucleus accumbens shell on emission of 50 kHz USV: comparison with effects of *D*-amphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 176 (2019) 23–32.
- [59] C. Natusch, R.K.W. Schwarting, Using bedding in a test environment critically affects 50 kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96 (3) (2010) 251–259.
- [60] J. Panksepp, J. Burgdorf, 50 kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav. Brain Res.* 115 (1) (2000) 25–38.
- [61] J. Panksepp, J. Burgdorf, “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol. Behav.* 79 (3) (2003) 533–547.
- [62] H.Y. Park, K. Cahn, B. Rindtowa, R. Altschuler, K. Wurringer, M. Sadaghiani, Functional characterization of psychiatric disease-associated *Cacna1c* variants through genetic, molecular and cellular approaches. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 29 (2019) 81004.
- [63] P. Pechtel, S.J. Dutra, E.L. Goetz, D.A. Pizzagalli, Blunted reward responsiveness in remitted depression. *J. Psychiatr. Res.* 47 (12) (2013) 1864–1869.
- [64] M. Pereira, R. Andreatini, R.K. Schwarting, J.C. Brenes, Amphetamine-induced appetitive 50 kHz calls in rats: a marker of affect in mutants? *Psychopharmacology* 231 (13) (2014) 2567–2577 (Berl.).
- [65] R.K. Pichers, S.B. Flagel, E.G. O'Donnell, L.C.S. Woods, M. Sarter, T.E. Robinson, Individual variation in the propensity to attribute incentive salience to a food cue: influence of sex. *Behav. Brain Res.* 278 (2015) 462–468.
- [66] C.V. Portfors, Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46 (1) (2007) 28–34.
- [67] T.M. Redeker, T.M. Kisko, R.K. Schwarting, M. Wöhr, Effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats. *Behav. Brain Res.* 367 (2019) 35–52.
- [68] T.E. Robinson, S.B. Flagel, Dissociating the predictive and incentive motivational properties of reward-related cues through the study of individual differences. *Biol. Psychiatry* 65 (10) (2009) 869–873.
- [69] G.D. Sides, Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim. Behav.* 20 (1) (1972) 88–100.
- [70] N. Sangarapillai, M. Eisenberger, M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, Ultrasonic vocalizations and individual differences in rats performing a pavlovian conditioned approach task. *Behav. Brain Res.* 398 (2021). 112926.
- [71] M. Sarter, R.B. Phillips, The neurocircuitry of cognitive-motivational style: Sign- and goal-trackers as animal models. *Behav. Neurosci.* 132 (1) (2018) 1–12.
- [72] T. Scariochio, I. Trujillo-Peñate, E. Conover, P. Shizgal, P.B. Clarke, The effects of electrical and optical stimulation of midbrain dopaminergic neurons on rat 50 kHz ultrasonic vocalizations. *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) e131.
- [73] R.K. Schwarting, N. Jegan, M. Wöhr, Situational factors, emotions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 182 (2) (2007) 238–222.
- [74] N. Stagemann, C. Schmuckermair, N. Whittle, A. Hülmes, E.J. Resner, Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacol. Ther.* 149 (2015) 150–190.
- [75] P. Sklar, J.W. Smoller, J. Fan, M.A.B. Ferreira, R.H. Perlis, K. Chambert, S. M. Purcell, Whole-genome association study of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 13 (6) (2008) 558–565.
- [76] L. Sykes, J. Haddon, T.M. Lancaster, A. Sykes, R. Arzoum, N. Iman, A.L. Moon, T. E. Lin, D.E. Lindren, M.J. Owen, M.C. O'Donovan, T. Humby, L.S. Wilkinson, E. L. Thomas, J. Hall, Genetic variation in the psychiatric risk gene *CACNA1C* modulates reversal learning across species. *Schizophr. Bull.* 45 (5) (2019) 1024–1032.
- [77] E. Taracha, A. Hamed, P. Krawczyk, M. Lehner, A. Skorzewska, A. Ptasnik, S. J. Chrapusta, Inter-individual diversity and intra-individual stability of amphetamine-induced sensitization of frequency-modulated 50 kHz vocalization in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology* 222 (4) (2012) 619–632 (Berl.).
- [78] C.E. Terrillon, D.T. Dao, R. Gachupé, M.K. Lobo, A.C. Fuchs, J.F. Chouin, T. D. Gould, Reduced levels of *Cacna1c* attenuate mesolimbic dopamine system function. *Genes Brain Behav.* 16 (3) (2017) 495–505.
- [79] B. Thompson, K. Leonard, S.M. Brudzynski, Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behav. Brain Res.* 168 (2006) 64–73.
- [80] C.M. Tigaret, T.E. Lin, E.R. Morrell, L. Sykes, A.L. Moon, M.C. O'Donovan, M. J. Owen, L.S. Wilkinson, M.W. Jones, K.L. Thomas, J. Hall, Neurotrophin receptor activation rescues cognitive and synaptic abnormalities caused by hemizygosity of the psychiatric risk gene *Cacna1c*. *Mol. Psychiatry* 26 (6) (2021) 1748–1760. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-01003-6>.
- [81] J.A. Tripoli, M.L. Dent, P.J. Meyer, Individual differences in food cue reactivity are associated with acute and repeated cocaine-induced vocalizations, but not cocaine-induced vocalizations. *Psychopharmacology* 234 (3) (2017) 437–446 (Berl.).
- [82] A.M. Van der Poel, E.J.K. Nouch, K.A. Miczek, Temporal patterning of ultrasonic distress calls in the adult rat: effects of morphine and benzodiazepines. *Psychopharmacology* 97 (2) (1989) 147–148 (Berl.).
- [83] A.E. Whitton, M.T. Treadway, D.A. Pizzagalli, Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Curr. Opin. Psychiatry* 28 (1) (2015) 7–12.
- [84] A.R. Willey, L.P. Spear, The effects of pre-test social deprivation on a natural reward incentive test and concomitant 50 kHz ultrasonic vocalization production in adolescent and adult male Sprague-Dawley rats. *Behav. Brain Res.* 245 (2013) 107–112.
- [85] M. Wöhr, Measuring mania-like elevated mood through amphetamine-induced 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Br. J. Pharmacol.* (2021).
- [86] M. Wöhr, R.K. Schwarting, Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res.* 354 (1) (2013) 81–97.
- [87] M. Wöhr, A. Borta, R.K. Schwarting, Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84 (3) (2005) 228–240.
- [88] M. Wöhr, B. Houx, R.K. Schwarting, B. Spruijt, Effects of experience and context on 50 kHz vocalizations in rats. *Physiol. Behav.* 93 (4–5) (2008) 766–776.
- [89] M. Wöhr, T.M. Kisko, R.K. Schwarting, Social behavior and ultrasonic vocalizations in a genetic rat model haploinsufficient for the cross-disorder risk gene *Cacna1c*. *Brain Sci.* 11 (6) (2021) e724.
- [90] M. Wöhr, H. Rippberger, R.K. Schwarting, M.M. van Goolen, Critical involvement of 5-HT_{2C} receptor function in amphetamine-induced 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Psychopharmacology* 222 (10) (2015) 1817–1829 (Berl.).
- [91] M. Wöhr, M. Willadum, T.M. Kisko, R.K. Schwarting, M. Fendt, Sex-dependent effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on behavioral inhibition evoked by cuespecific alarm signals in rats. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 99 (2020). 109649.
- [92] J.M. Wright, M.B. Dobosiewicz, P.B. Clarke, The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in amphetamine-induced rat ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology* 225 (4) (2013) 853–869 (Berl.).
- [93] G.W. Zamponi, Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (1) (2016) 19–34.

VII. Allgemeine Diskussion

Bei dem PCA-Paradigma handelt es sich um eine Belohnungsaufgabe mit dem individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem CS gemessen werden können (Flagel et al., 2009; Robinson & Flagel, 2009). Die Aufnahme von USV während der Performance in dieser Aufgabe kann Aufschluss über den affektiven Zustand geben (Wöhr & Schwarting, 2013). Veränderungen des Affektzustandes und die Performance in Belohnungsaufgaben stehen im engen Zusammenhang zu psychischen Störungen (Dao et al., 2010; Green et al., 2010; Heyes et al., 2015; Lancaster, 2014). Die Kenntnisse aus diesen Konzepten und Erforschung des Verhaltens und der grundlegenden Mechanismen kann helfen Risikofaktoren der Störungen und ihre Komorbidität zu verstehen.

Studie 1 wurde durchgeführt, um zu analysieren, ob Ratten während der PCA-Aufgabe 50-kHz USV aussenden und ob eigenschaftsbedingte Unterschiede in der 50-kHz Emission mit dem Sign- und Goal-Verhalten verbunden sind. Die Kernbefunde der ersten Studie sind, dass wildtyp weibliche *Cacna1c*^{+/+} Ratten während der PCA-Aufgabe positive 50-kHz USV aber keine negativen 22-kHz USV emittierten. Zudem ist das Verhalten der Tiere eher auf GT ausgerichtet, was sich in niedrigen PCA-Indexwerten zeigte. Dennoch ergab die individuelle Untersuchung, dass die 50-kHz USV positiv mit einer Tendenz zum ST, aber negativ mit GT verbunden ist. Wichtig ist anzumerken, dass es eine hohe interindividuelle Variabilität bei der Emission von 50-kHz Rufen gab. Während sich der PCA-Indexwert über die Sitzungen hinweg stabilisierte, war die Emission von 50-kHz USV über die Sitzungen hinweg stabil und es gab bei der Emission keine auffälligen Zustandsunterschiede (engl. „state differences“). Daher wird angenommen, dass diese appetitiven 50-kHz USV-Profile möglicherweise eigenschaftsähnliche sozio-affektive Phänotypen widerspiegeln, die mit der DA-Signalgebung zusammenhängen.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde in der zweiten Studie untersucht, wie die heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} Wurfgeschwister in dieser speziellen PCA-Aufgabe sich verhalten. Mithilfe von GWAS (engl. „genome-wide association studies“) wurde das *CACNA1C* Gen als Risikogen für die Entwicklung von mentalen Störungen identifiziert (Heyes et al., 2015; Moon et al., 2018). Da haploinsuffiziente *Cacna1c*-Ratten, bekanntermaßen weniger 50-kHz USV ausstoßen, Veränderungen in ihrem Sozialverhalten, z. B. beim Spielen (Kisko et al., 2018, 2020; Redecker et al., 2019) und in der DA-Signalgebung (Terrillion et al., 2017) zeigen, wurde Veränderungen im Sign- und Goal-Verhalten erwartet. Es wird prognostiziert eine geringere Anzahl der appetitiven Rufe im Gegensatz zu den zuvor getesteten *Cacna1c*^{+/+} Weibchen, begleitet von einem geringeren ST-Verhalten zu sehen.

Die heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} zeigten eine Verschiebung in Richtung GT. Kontraintuitiv erfüllten keine der getesteten Ratten das Kriterium des STs, während 42 % der Ratten GT zeigten und 58 % der Kategorie der "Intermediates" fielen, die keine klare Tendenz zeigen. Die 50-kHz Rufe sind

intraindividuell stabil und es gab keine auffälligen Zustandsunterschiede. Nichtsdestotrotz unterschied sich die Ruftrate erheblich zwischen den Subjekten. Die Rufe waren nicht CS-spezifisch und traten hauptsächlich während des Pretrainings und zu Beginn jeder Sitzung auf. Des Weiteren korrelierten die Rufraten negativ mit dem GT. Interessanterweise beeinflusst die Extinktion das PCA-Verhalten, spiegelt sich jedoch nicht in der USV-Emission wider.

Der Vergleich zwischen den Wurfgeschwistern aus Studie 1 (*Cacna1c^{+/+}*) und Studie 2 (*Cacna1c^{+/-}*) ergab, dass heterozygote Ratten während des Pretrainings und des fünftägigen PCA-Trainings weniger emittieren. Unabhängig vom Genotyp ist die Ruftrate subjektabhängig stabil und stand im negativen Zusammenhang mit dem GT. Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse, dass 50-kHz Rufe stabile Persönlichkeitsindikatoren sind, welche zukünftig berücksichtigt werden sollten.

i. 50-kHz USV im PCA-Paradigma

Im Allgemeinen können durch die Messung der Vokalisation im Ultraschallbereich wesentliche Informationen über den aktuellen emotionalen und motivationalen Zustand der Nagetiere gewonnen werden (Brudzynski, 2021; Wöhr & Schwarting, 2013). Im Vergleich zu der recht häufigen Anwendung von 22-kHz USV-Messungen bei aversiver Furchtkonditionierung (Schwarting et al., 2007; Wöhr et al., 2005; Yee et al., 2012) wurden 50-kHz Rufe nur selten in Aufgaben der appetitiven pawlowschen oder instrumentellen Konditionierung untersucht. Soziale Belohnungen lösen in der Regel eine stärkere 50-kHz USV-Reaktion aus als nicht-soziale Situationen (Burke et al., 2021; Mulvihill & Brudzynski, 2018). Allerdings senden Ratten auch 50-kHz Rufe bei nicht-sozialen appetitiven Belohnungsaufgaben aus (Brenes & Schwarting, 2014, 2015; Heyes et al., 2015). Während des PCA-Paradigmas wurden keine aversiven 22-kHz Rufe protokolliert. Die Ergebnisse beider Studien unterstreichen somit die These, dass 50-kHz Rufe in affektiven Situationen ausgestoßen werden. 50-kHz Rufe wurden nicht nur als Reaktion auf die Belohnung, sondern bereits in Antizipation der Erwartung von Belohnungen beobachtet (Barfield et al., 1979; Brenes & Schwarting, 2014; Knutson et al., 1998; Willey & Spear, 2013).

Willey und Spear (2013) berichteten über eine erhöhte 50-kHz USV-Produktion in Erwartung eines Belohnungsreizes. Es ist jedoch unklar, ob die in diesen Studien beobachteten 50-kHz USV auf die Erwartung einer Belohnung zurückzuführen sind. Unabhängig vom Testtag und Genotyp war die höchste Ruftrate immer zu Beginn der Testung zu sehen und ging gegen Ende jeder Sitzung nahezu auf null zurück. Während der gesamten Sitzung wurde der Hebel zu einem nicht vorhersehbaren Zeitpunkt präsentiert, da das Intervall zwischen den einzelnen CS zufällig variierte. Wenn die 50-kHz Rufe in

Erwartung einer Belohnung erzeugt wurden, würden diese Rufe in der CS-Periode während der gesamten Sitzung zu beobachten sein. Dies war jedoch nicht der Fall, da die meisten Rufe innerhalb der ersten Minuten einer Sitzung ausgestoßen wurden und danach endeten. Man könnte argumentieren, dass der Hebel während des CS und das Pellet während des Post-CS die Individuen ablenkten und dass dies schließlich zu einer geringeren Anzahl von 50-kHz Rufen geführt haben könnte. Jedoch spricht der Befund mit der höchsten Rufrate während des Pretrainings eher für eine Reaktion auf etwas Neuartiges. Die Konditionierungskammer selbst könnte auch als kontextueller Stimulus gedient haben, der die USV zu Beginn jeder Sitzung auslöste. Dies steht im Einklang mit anderen Untersuchungen, bei denen die höchsten Raten in den Anfangsphasen festgestellt wurden (Brudzynski & Pniak, 2002; Schwarting et al., 2007). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Ratten nicht unbedingt in Erwartung einer Belohnung oder der Belohnung selbst riefen. Die Rufe könnten möglicherweise viel mehr eine Erregung anfangs signalisieren, welches im Laufe der Testung zu einer Gewöhnung führte, sodass die Rufe mit der Zeit abnahmen.

Darüber hinaus war die Prävalenz der Ruf-Subtypen sehr unterschiedlich, wobei flache, nicht frequenzmodulierte Rufe am häufigsten vorkamen. Wöhr et al. (2008) schlugen vor, dass solche flachen Rufe als "nicht-affektive Kontaktrufe" dienen könnten, die auf der Suche nach Artgenossen ausgestoßen werden, während die frequenzmodulierten Rufe „positive, soziale Interaktionsrufe“ sind (Burgdorf et al., 2008; Wöhr et al., 2008). Dies würde die Beobachtung von den Rufen zu Beginn jeder Testung konkretisieren. Demnach waren die Rufe nicht spezifisch auf die Testsituation, sondern eher ein Versuch, den Kontakt zu ihren Artgenossen wiederherzustellen, wenn sie aus ihren Gruppenkäfigen herausgenommen wurden.

ii. USV als stabiler Merkmalsträger

Ein entscheidender Grund für die individuelle Untersuchung der Subjekte ist die bereits in vorherigen Studien berichtete hohe interindividuelle Variabilität bei der Emission von 50-kHz Rufen (Schwarting et al., 2007). Es wird diskutiert, dass dies auf subjektabhängige Dispositionen oder Eigenschaften zurückzuführen ist, die ihren Ursprung in physiologischen Unterschieden des mesolimbischen DA haben (Engelhardt et al., 2018; Mulvihill & Brudzynski, 2019). Die Befunde der hier durchgeführten Studien weisen deutlich darauf hin, dass die USV ein sehr stabiler Merkmalsträger ist.

Brudzynski und Pniak berichten (2002) von einem Habituationseffekt bei wiederholter Testung in der 50-kHz Rufrate. Hier wird dieser Effekt lediglich nur bei wiederholten Testen im Offenfeld bei den heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} Tieren beobachtet. Jedoch sehen wir dieses Ergebnis der Habituation in der

Ruftrate weder in der Offenfeldtestung der *Cacna1c*^{+/-} wildtyp Ratten in Studie 1, noch über die Testtage im PCA-Paradigma beider Studien. Stattdessen unterscheidet sich die Ruftrate zwar erheblich zwischen den Individuen, ist jedoch über die Versuchstage stabil. Insgesamt blieben mehr rufende Tiere über die Trainingstage hinweg als solche erhalten. Eine derartige Stabilität der 50-kHz USV-Emissionen über mehrere Sitzungen hinweg wurde auch bei anderen Tests festgestellt, insbesondere beim Spielverhalten, bei Freilandversuchen mit unterschiedlichen Einstreubedingungen und bei mehrtägiger wiederholter Käfig-Exposition (Natusch und Schwarting, 2010; Schwarting et al., 2007). Im Allgemeinen bestätigt dies ähnliche Ergebnisse bei Wistar-Ratten, die in verschiedenen Testparadigmen getestet wurden (Natusch und Schwarting, 2010; Schwarting et al., 2007).

In den letzten beiden Sitzungen, d. h. bei der Extinktion, wurde die übliche Futterbelohnung zurückgehalten, während der Hebel weiterhin präsentiert wurde. Während diese Unterlassung zunächst keine Auswirkungen auf die Annäherung an den Hebel hatte, wurde bereits in der ersten Extinktionssitzung ein signifikanter Rückgang der Annäherung an das Magazin (Anzahl, Latenzzeiten) beobachtet. Dieser Effekt wurde in der zweiten Extinktionssitzung noch deutlicher. Zu diesem Zeitpunkt wirkte sich der Belohnungsentzug auch auf das Hebeldruckverhalten aus. Wie vorhergesagt, führte dies zu einem Anstieg des PCA-Indexwertes in der Extinktionssitzung, was auf ein stärkeres Annäherungsverhalten an den Hebel und ein geringeres Annäherungsverhalten an das Pellet-Magazin hindeutet. Dieses Ergebnis ähnelt früheren Erkenntnissen, die zeigen, dass Erwartungsverletzungen vor allem das Ergebnis im Vergleich zum Signal-gesteuerten Verhalten beeinflussen (Ahrens et al., 2016a; Beckmann & Chow, 2015; Stringfield et al., 2018). Bemerkenswert ist diese interindividuelle Variabilität zusammen mit intraindividuellem Stabilität bei der USV Ruftrate nicht nur über die PCA-Trainingsstage, sondern auch über die Extinktion zu sehen. Der Wegfall der Belohnung spiegelt sich weder in Studie 1 noch in Studie 2 in der Emission der Rufe wider. Browning et al. (2011) berichteten eine Verringerung der Anzahl von 50-kHz Rufen während der Extinktion in einer Aufgabe zur Selbstverabreichung von Kokain. In der gleichen Studie wurde dieser Effekt jedoch nicht während der Extinktion bei der Selbstverabreichung von Saccharose beobachtet.

Die Dysfunktion des Hippocampus wird mit der Pathogenese von Stimmungsstörungen und Schizophrenie in Verbindung gebracht und könnten für die emotionale Instabilität, die bei beiden Störungen beobachtet werden, von Bedeutung sein (Small et al., 2011). Ein regionsspezifischer Knock-out von *Cacna1c* im Hippocampus und Neocortex von Mäusen führt zu einem Verlust der CA1-Langzeitpotenzierung (Moosmang et al., 2005). Ca_v1.2-Kanäle regulieren die Erregbarkeit und wurden mit einer verminderten Aktivierung der Transkription in CA1-Pyramidenneuronen in Verbindung gebracht (Lacinova et al., 2008, Moosmang et al., 2005). Die bedingte Deletion von *Cacna1c* im Hippocampus und im Kortex führt zu hippocampusabhängigen Verhaltensänderungen, wie z. B. einer

Beeinträchtigung des räumlichen Erinnerungsvermögens im Morris-Wasserlabyrinth-Test (Moosmang et al., 2005, White et al., 2008). Den L-Typ-Kalziumkanälen in dieser Region wird eine entscheidende Rolle beim Lernen und Gedächtnis zugeschrieben (Burgdorf et al., 2017; Moosmang et al., 2005). Die DA-Signalisierung über D1-Rezeptoren spielt eine Schlüsselrolle beim Extinktionslernen (Singewald et al., 2015). Burgdorf et al. (2017) berichteten, dass die Deletion von Cav1.2 in D1-Rezeptor-exprimierenden Zellen im Hippocampus zu einer Beeinträchtigung der Extinktion von kokainbedingten Ortspräferenz-Aufgabe. Diese Ergebnisse zeigen, dass DA- und Cav1.2-Kanäle miteinander verbunden sind und zumindest in gewissem Maße das Extinktionslernen vermitteln. Daher könnte man bei den *Cacna1c*-haploinsuffizienten Ratten vermuten, keinen Extinktionseffekt aufgrund von genetischen Beeinträchtigungen zu sehen. Der Vergleich zu den *Cacna1c*^{+/+} Ratten deutet jedoch nicht eindeutig auf eine Beeinträchtigung des Extinktionslernens aufgrund des Genotypen hin, da die Anzahl der 50-kHz USV über die Trainingstage und die Extinktion bei den *Cacna1c*^{+/+} Wurfgeschwistern auch stabil war. Während *Cacna1c*^{+/+} Ratten während des Gewöhnungs- und PCA-Trainings signifikant weniger riefen als ihre Wurfgeschwister, riefen sie während der Extinktion ähnlich häufig. Unabhängig davon hat der Belohnungsausfall keinen Einfluss auf die Emission von USV.

Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass solche 50-kHz Rufmuster keine Reaktion auf eine Neuheit sind. Vielmehr untermauern sie die Hypothese, dass sie unabhängig vom Genotyp ein Indikator für ein sehr stabiles charakteristisches Merkmal sind. Möglicherweise spiegeln die 50-kHz USV merkmalsähnliche sozio-affektive Phänotypen wider, die mit der DA-Signalisierung in Verbindung stehen. Darüber hinaus unterstützt dies die Annahme, dass dieses Ergebnis weniger ein zustandsbezogener, sondern vielmehr ein eigenschaftsbezogener-charakteristischer Effekt bei den Individuen ist. Aus diesen Befunden kristallisiert sich die Frage heraus, inwiefern die Aufnahme der USV dazu genutzt werden kann, bestimmte Verhaltensweisen in anderen Paradigmen vorherzusagen.

iii. USV als Prädiktor im Sign- und Goal-Paradigma

Insgesamt nahmen die Korrelationen der täglichen PCA-Indexwerte im Laufe der Trainingstage zu, was auf eine Verstärkung der Ausprägung des Phänotyps im Laufe der Zeit hindeutet. Etwa 42 % der untersuchten heterozygoten *Cacna1c*^{+/+} Ratten und 32 % der *Cacna1c*^{+/+} Wurfgeschwister waren Goal-Tracker. Die 50-kHz Rufe waren negativ mit dem GT und positiv mit dem ST assoziiert. Zuvor wurde USV als individueller Merkmalsträger diskutiert. Auch das Sign- und Goal-Verhalten wird als eine solche charakteristische Eigenschaft der Individuen diskutiert (Flagel et al., 2009; Robinson & Flagel, 2009). Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrer Tendenz, den Belohnungsreizen eine Anreizsalienz zuzuschreiben. Das ST wird häufig als Verhaltensmarker für die Anfälligkeit für Drogenabhängigkeit

angesehen (Flagel et al., 2009; Flagel & Robinson, 2017) oder steht in Verbindung mit impulsiven Verhalten (Flagel et al., 2010; Lovic et al., 2011). Tripi et al. (2017) haben gezeigt, dass sich die USV-Reaktion auf Kokain zwischen den Tieren in Abhängigkeit von ihrem Verhalten in der PCA-Aufgabe stark unterscheidet. Darüber hinaus berichteten die durchgeführten Studien über eine positive Beziehung zwischen der Tendenz zum ST und der Emission von 50-kHz USV. Die Subjekte weisen individuelle Unterschiede in den USV auf und dies wurde als Merkmal diskutiert. In früheren Studien wurden bereits mehr 50-kHz Rufe bei Tieren berichtet, die in einem anderen Paradigma ein höheres ST-Verhalten zeigten (Brenes & Schwarting, 2014, 2015). Darüber hinaus werden hier weitere Erkenntnisse über die aktuellen affektiven Zustände der einzelnen Subjekte während der Durchführung der PCA-Aufgabe geliefert. Andere Studien haben gezeigt, dass die subkortikale bottom-up-Kontrolle (Flagel et al., 2011; Haight et al., 2017; Sarter & Phillips, 2018) insbesondere die Aktivität des mesolimbischen DA-Systems bei ST stärker ausgeprägt ist (Flagel et al., 2007). Außerdem ist bekannt, dass die Emission von 50-kHz USV positiv mit der DA-Aktivität in belohnungsbezogenen Hirnarealen verbunden ist (Burgdorf et al., 2007).

Es wird geschlussfolgert, dass, wenn der DAerge Belohnungsweg bei Ratten, die weniger Interaktion mit dem Ziel zeigen, stärker ausgeprägt ist und wenn 50-kHz Rufe als Reaktion auf die Aktivierung der mesolimbischen DA-Neuronen ausgelöst werden, dann sollte eine stärkere Interaktion mit dem Hinweissignal mit der Emission von mehr DA-assoziierten 50-kHz USV einhergehen. Die Ergebnisse dieser beiden Studien bestätigen diese Annahme, da festgestellt wurde, dass die Anzahl der 50-kHz Rufe mit dem PCA-Indexwert korrelieren. Sie lassen darauf schließen, dass anhand des ST- und GT-Verhaltens, bzw. der Performance im PCA-Paradigma über die individuelle USV Ruftrate vorhergesagt werden kann und vice versa und dies auf neurobiologische Parallelen in Hirnstrukturen hinweisen kann. Dies deutet auf die Vorhersehbarkeit dieser Persönlichkeitsdispositionen hin.

iv. Effekte durch die *Cacna1c*-Haploinsuffizienz

Bisherige Studien hatten gezeigt, dass das Merkmal, entweder ST, GT oder keine klare Tendenz (engl. „Intermediates“) zu zeigen, mehr oder weniger gleichmäßig unter den Individuen verteilt ist (Ahrens et al., 2016a; Meyer et al., 2012). Demnach sollten je ein Drittel der getesteten Subjekte eines dieser Merkmale zeigen. Entgegen der Erwartung treffen diese Kriterien einer 1/3-Verteilung nicht auf die Stichprobe der hiesigen Studien zu. In beiden Studien gab es eine starke Verschiebung hin zum GT, wobei es bei den *Cacna1c*^{+/-} Tieren gar keine ST gab. Unterschiede im Testparadigma können diese Diskrepanz nicht erklären, da das von Fitzpatrick und Morrow (2016) beschriebene Protokoll streng befolgt wurde. Auch die Wahl von weiblichen Tieren ist eine unwahrscheinliche Erklärung, da Pitchers

et al. (2015) keine Geschlechtsunterschiede in der Ausprägung dieses Merkmals im PCA-Paradigma festgestellt haben. Allerdings könnte es Unterschiede zwischen den Stämmen geben, zumindest bei Inzuchttieren von Lewis- und Fischer-Ratten (Kearns et al., 2006). Darüber hinaus berichteten Fitzpatrick et al. (2013) eine Variabilität im Sign- und Goal-Verhalten in Abhängigkeit von den Lieferanten der Tierbestellung. Sie zeigten, dass Sprague-Dawley (SD) Ratten von Charles River im Vergleich zu denen von Harlan erworbenen, ein stärkeres GT-Verhalten zeigten. Diese Unterschiede in den Phänotypen könnten auf genetische Unterschiede zurückzuführen sein. Die in dieser Dissertation verwendete SD-Rattenlinie wurde ursprünglich von Charles River bezogen und wurden in der eigenen Einrichtung weitergezüchtet. Man könnte daher von einem genetischen Drift ausgehen. Die zur Zucht verwendeten Männchen wurden jedoch regelmäßig mit SD-Weibchen von Charles River rückgekreuzt und verpaart. Daher ist ein genetischer Drift in der Zucht auszuschließen. Während 32 % der *Cacna1c*^{+/-} Ratten GT waren, zeigten 42 % der *Cacna1c*^{-/-} Ratten GT-Verhalten. Zudem waren 6 % der getesteten wildtyp Subjekte ST und 62 % fielen in die Kategorie der Intermediates, die keine Präferenz zeigen. Bei den heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} waren keine ST zu sehen und die restlichen 58 % fielen in die Kategorie der Intermediates. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Wurfgeschwister beider Studien unabhängig von ihrem Genotyp zusammengehalten wurden. Daher muss in Betracht gezogen werden, dass sie sich gegenseitig beeinflusst haben könnten, da Ratten sehr soziale Tiere sind und viel miteinander interagieren (Ellenbroek & Youn, 2016; Homberg et al., 2017). Es ist bekannt, dass die heterozygoten Ratten Veränderungen in ihrem Verhalten zeigen, einschließlich der Emission von USV (Kisko et al., 2018, 2020; Redecker et al., 2019) und dass sich das Sign- und Goal-Verhalten durch die Umgebung wie einer Anreicherung oder Isolation beeinflussen lässt (Beckmann & Brado, 2012; Lomanowska et al., 2011). Man könnte argumentieren, dass die *Cacna1c*-Haploinsuffizienz zu einem stärkeren GT geführt hat und dass dieser Phänotyp die *Cacna1c*^{+/-} Wurfgeschwister aufgrund der Haltungsbedingungen beeinflusst hat. Die nähere Betrachtung der GT widerspricht jedoch der Annahme, da das GT bei den *Cacna1c*^{+/-} stärker ausgeprägt war. Der Indexwert der GT unterscheidet sich signifikant zwischen den Genotypen, obwohl mehr heterozygote Ratten GT-Verhalten zeigten. Trotz dieser Umstände, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass ohne die gemeinsame Haltungsbedingung der Genotypen eine gleichmäßige Verteilung stattgefunden hätte, aufgrund der Annahme, dass der Indexwert sich bei allen Individuen Richtung GT durch die haploinsuffizienten Subjekte hat beeinflussen lassen. Demnach würden die wildtyp *Cacna1c*-GT ein noch stärkeres GT-Verhalten zeigen. Zudem ist festzustellen, dass die Spanne der Indexwerte bei den *Cacna1c*^{+/-} Tieren weiter ist als die der heterozygoten Subjekte, welches eventuell auf einen genetischen Effekt hinweisen könnte. Weitere Studien sind jedoch erforderlich, um das Ausmaß der genetischen und umgebungsbedingten Variablen wie die gemeinsame Unterbringung der Genotypen zu bestimmen, die

das PCA-Verhalten beeinflussen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gegenwärtige Art der Verschiebung hin zum GT unklar ist und in Zukunft weiter untersucht werden muss.

Im Gegensatz zu der Verschiebung zum GT ist ein klarer Genotyp-Effekt in der USV Ruftrate zu sehen. Der Vergleich der vorliegenden *Cacna1c*^{+/-} Ratten mit ihren *Cacna1c*^{+/+} Wurfgeschwistern zeigt, dass die heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} Ratten, im Vergleich zu den *Cacna1c*^{+/+} Ratten weniger riefen. Insbesondere zeigten sie weniger „Flat“- und „Step“-Rufe. Dieses Muster war nicht kontextabhängig, da die heterozygoten Weibchen auch im Offenfeld weniger riefen, einem Kontext, der sich von dem für das pawlowsche Paradigma verwendeten, variiert. Dies deutet darauf hin, dass *Cacna1c*^{+/-} Ratten unabhängig vom Kontext weniger rufen, was wahrscheinlich auf den genetischen Effekt oder möglicherweise auf stimmliche Veränderungen der Produktionsmechanismen zurückzuführen ist. Im Vergleich zu anderen Studien (Kisko et al., 2018) wurden hier niedrigere Vokalraten verzeichnet. Wenn soziale Belohnungsaufgaben explizit mit nicht-sozialen Situationen verglichen werden, lösen soziale Belohnungen stärkere 50-kHz Antworten aus (Burke et al., 2021; Mulvihill & Brudzynski, 2018). Da eine appetitive Belohnungsaufgabe verwendet wurde, wurde angenommen 50-kHz Rufe zu sehen. Diese Annahme ist auch eingetreten. Obwohl die absoluten Werte sehr gering zu sein scheinen, stimmen die Reaktionsmuster mit früheren sozialen Befunden überein, dass heterozygote Weibchen weniger vokalisieren als wildtyp Weibchen (Redecker et al., 2019). Andere Befunde mit männlichen Ratten desselben Genotyps zeigen ähnliche Ergebnisse, da die Individuen nicht nur weniger Rufe während des Rough-and-Tumble-Spiels ausstießen, sondern auch, dass sich die Rufsubtypen unterschieden, da flache und gemischte Rufe reduziert waren (Kisko et al., 2018). Insgesamt deutet dies darauf hin, dass die 50-kHz USV-Emission bei *Cacna1c*-haploinsuffizienten Ratten nicht nur unter sozialen, sondern auch unter nicht-sozialen Bedingungen reduziert ist. Mehrere Studien haben geschlechtsabhängige Unterschiede in der Emission von 50-kHz Rufen bei *Cacna1c*-haploinsuffizienten Ratten berichtet (Kisko et al., 2020, 2021; Wöhr et al., 2021), was idealerweise ebenfalls berücksichtigt werden muss. In dieser Studie wurden jedoch nur weibliche Ratten untersucht. Da das 50-kHz Rufen weitgehend von der mesolimbischen DA-Funktion abhängt, kann angenommen werden, dass diese Aktivität bei *Cacna1c*^{+/-} Ratten weniger stark ausgeprägt ist. Das ist eine Hypothese, die in Zukunft getestet werden muss.

v. Neurobiologische Zusammenhänge zwischen dem PCA-Paradigma, den 50-kHz USV und der *Cacna1c*-Haploinsuffizienz

Sowohl dem Sign- und Goal-Verhalten als auch der Emission von appetitiven USV und der Manipulation durch das *Cacna1c*-Gen liegen komplexe und nicht ausreichend aufgeklärte Mechanismen zugrunde.

Eine Veränderung, die bei allen drei Parametern diskutiert wird und so alle miteinander verbindet, sind unter anderem Alterationen im mesolimbischen DA-System. Obwohl neuronale Mechanismen nicht Gegenstand dieser Studien waren, werden im Folgenden die neurologischen Zusammenhänge betrachtet, da es weitreichende Hinweise gibt, dass die hier untersuchten Komponenten durch DAerge Mechanismen miteinander verbunden sind und sich so mutual beeinflussen können.

Im einleitenden Kapitel „Neurobiologie des Sign und Goal-Verhaltens“ wurde der Einfluss des bottom-up DA-Systems auf das ST- und GT-Verhalten beschrieben. Man geht davon aus, dass das Verhalten von GT durch kognitive Kontrollprozesse von top-down vermittelt wird, während das Verhalten von ST durch subkortikale Prozesse von bottom-up gesteuert wird (Flagel et al., 2007; Flagel et al., 2011; Haight et al., 2017; Paolone et al., 2013; Sarter & Phillips, 2018). Ein Ungleichgewicht zwischen den ACh top-down- und DA bottom-up-Prozessen trägt zu der Ausprägung der Phänotypen bei (Sarter & Phillips, 2018). Zudem gibt es Grund zu der Annahme, dass das DAerge System auch eine Rolle bei der Emission von appetitiven 50-kHz Rufen und bei der Belohnungsbereitschaft gespielt haben könnten. In Bezug auf die USV-Emission haben frühere Studien aufgezeigt, dass die Injektion von d-Amphetamin nicht nur zu einer Zunahme der 50-kHz USV führt (Pereira et al., 2014), sondern auch zu einer erhöhten DA-Aktivität (Heal et al., 2013; Wright et al., 2013). Die wichtigste Hirnstruktur, von der diskutiert wird, dass sie an der drogeninduzierten Erzeugung von 50-kHz USV beteiligt ist, ist die NAc-Hülle (Burgdorf et al., 2001; Brudzynski et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass die 50-kHz Rufe zumindest teilweise durch den mesolimbischen Belohnungsweg, insbesondere durch DAerge-Neuronen, reguliert werden. Die nachfolgende Abbildung 4 zeigt eine schematische Zusammenfassung der beteiligten Hirnareale und Signalwege, die bei dem Sign- und Goal-Verhalten und bei der Produktion der appetitiven USV eine Rolle spielen. Wie deutlich zu erkennen ist, überlappt der DAerge Projektionsweg vom VTA zum NAc, welches bei der Vermittlung beider Verhalten involviert ist. Auch wenn die Produktionsmechanismen relativ komplex sind, deutet diese Überlappung und die Studienergebnisse über den Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalsträgern der interindividuellen Stabilität und intraindividuellen Variabilität der USV-Emission und der Ausprägung der Tendenz zur Attribution von Anreizsalienz jedoch darauf hin, dass dies eventuell die Hirnregion bzw. der Signalweg ist, welcher beide verbindet und für den Phänotyp der Merkmale mitverantwortlich ist.

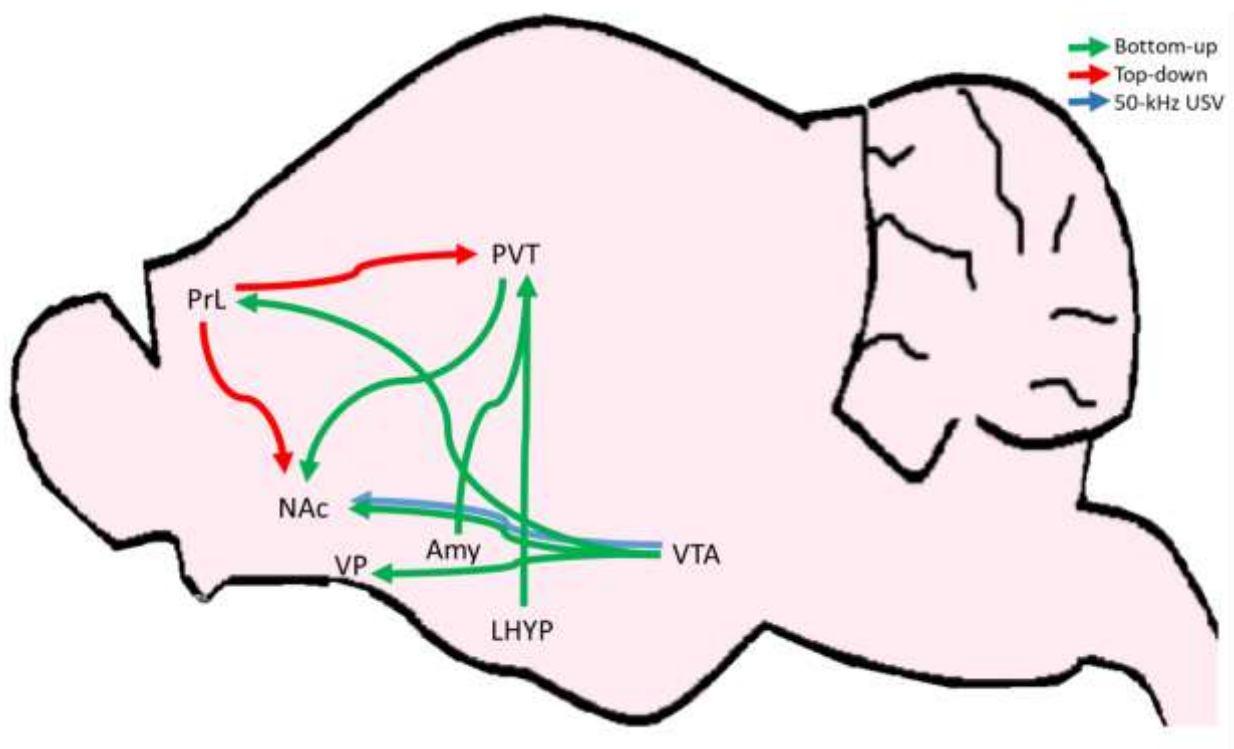


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hirnareale, die beim dopaminergen bottom-up und acetylcholinergen top-down Kontrolle im Sign- und Goal-Verhalten und bei der Emission von 50-kHz USV beteiligt sind. Die Abkürzungen stehen für folgende Areale: Amy-Amygdala, NAc-Nucleus accumbens, VP-Ventrales Pallidum, VTA-Ventrales tegmentales Areal, PrL-Prelimbischer Kortex, PVT-Paraventricular Nucleus vom Thalamus, LHYP-Lateraler Hypothalamus. (Eigene Illustration; Dargestellte Signalwege basieren auf: Ahrens et al., 2016b; Chang et al., 2012; Danna et al., 2013; DiFeliceantonio & Berridge, 2016; Fitzpatrick et al., 2016; Flagel et al., 2011; Haight et al., 2017; Stringfield et al., 2017; Yager et al., 2015)

Während einige neurobiologische Befunde für die Ausprägung des ST- und GT-Verhaltens und für die USV-Emission existieren, ist nicht viel über die neurobiologischen Korrelate bei Veränderungen durch das *Cacna1c*-Gen in Tiermodellen bekannt. Die Modulation der Funktion des mesolimbischen DA-Systems durch $Ca_v1.2$ könnte mit der Pathophysiologie psychiatrischer Erkrankungen zusammenhängen, die mit genetischen Veränderungen in *CACNA1C* verbunden sind. Eine Dysregulation des mesolimbischen DA-Systems wird mit der Ausprägung von Endophänotypen der bipolaren Manie und Schizophrenie sowie der Depression in Verbindung gebracht (Basar et al., 2010; Grace, 2016; Nestler & Carlezon, 2006; Ryding et al., 2008; Salamone et al., 2016; Whitton et al., 2015). Medikamente, die akut die Freisetzung von DA erhöhen oder die Wiederaufnahme von DA verringern, führen beim Menschen zu Manie- und psychotischen Erscheinungen (Anand et al., 2000; Drevets et al., 2001; Leyton et al., 2002; Lieberman et al., 1987; Murphy et al., 1971). Antipsychotika sowie andere Behandlungen, die die DAergische Neurotransmission hemmen, vermindern Manie und Psychose-Symptome beim Menschen (Creese et al., 1996; McTavish et al., 2001; Perlis et al., 2006). Neben ihren Auswirkungen auf das Sozialverhalten und die Kommunikation können sich Stimmungsstörungen auch

auf die Motivation, den Substanzmissbrauch und die Belohnungsverarbeitung auswirken (Kabir et al., 2016; Moon et al., 2018). Aufgrund von Befunden aus humanen Studien wird vermutet, dass sich überlappende neurologische Schaltkreise und gemeinsame genetische Risikofaktoren der hohen Komorbidität von Stimmungsstörungen und Drogenmissbrauch zugrunde liegen (Kabir et al., 2016; Luthi & Luscher, 2014; Nestler & Carlezon, 2006). Viele Studien zeigen, dass neuronale Schaltkreise und molekulare Mechanismen, die an Stimmungsstörungen und Belohnungssystemen beteiligt sind, zusammenwirken (Luthi & Luscher, 2014; Pechtel et al., 2013; Peters & Buchel, 2009; Russo & Nestler, 2013; Whitton et al., 2015). So wird eine gestörte Belohnungsverarbeitung häufig mit verschiedenen psychischen Störungen in Verbindung gebracht (Pechtel et al., 2013; Whitton et al., 2015), was letztendlich zu einer erhöhten Anfälligkeit für Substanzmissbrauch führen kann bzw. häufig komorbid auftauchen (Lai et al., 2015; Luthi & Luscher, 2014; Post & Kalivas, 2013; Tang et al., 2004). Lancaster et al. (2014) fanden in einer Humanstudie heraus, dass Träger des *CACNA1C*-Risikoallels eine abgestumpfte Verhaltensreaktion bei einer belohnungsbasierten Aufgabe zeigten (verminderte Belohnungsreaktion und Beeinträchtigungen beim belohnungsbasierten Lernen). Zudem ist bekannt, dass die LTCCs eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität im Zusammenhang mit neuronaler Entwicklung, Lernen und Gedächtnis, Drogenabhängigkeit und neuropsychiatrischen Erkrankungen spielen (Berger & Bartsch, 2014; Bhat et al., 2012; Casamassima et al., 2010; Kabir et al., 2016). Darüber hinaus stehen L-Typ-aktivierte Signaltransduktionswege in Wechselwirkung mit DA-Signalwegen (Rajadhyaksha & Kosofsky, 2005). Es wurde festgestellt, dass LTCCs eine Rolle bei Verhaltensweisen spielen, die durch den mesolimbischen Signalweg vermittelt werden (Terrillion et al., 2017). Dieser Weg definiert die Verbindung zwischen dem VTA und dem NAc, die durch Interaktionen mit dem Hippocampus, dem medialen präfrontalen Kortex und der Amygdala moduliert wird (Pierce & Kumaresan, 2006). Es wird angenommen, dass dieser Weg maßgeblich für Belohnung und Motivation ist, die bei Stimmungsstörungen und Schizophrenie verändert sein können (Juckel et al., 2003, Nestler & Carlezon, 2006).

Es gibt Hinweise darauf, dass *Cacna1c* an der Regulierung von durch das mesolimbische DA-System vermittelten Verhaltensweisen bei Nagetieren beteiligt ist, einschließlich der erneuten Aufnahme des Kokainkonsums nach LTCC-Aktivierung im NAc (Anderson et al., 2008) und LTCC-vermittelten Veränderungen der Kalziumströme im NAc nach wiederholter Kokainverabreichung (Zhang et al., 2002). Wiederholte Stimulationen des LTCC im VTA von Ratten führten zu einer verstärkten Verhaltensreaktion auf Kokain (Licata et al., 2000), und die Stimulation der LTCCs im Caudate putamen erhöht den extrazellulären DA-Spiegel (Okita et al., 2000). Zudem wird diskutiert, ob $Ca_v1.2$ -Kanäle für die verhaltensbezogene Ausprägung der Sensibilisierung wichtig sind (Giordano et al., 2010, Schierberl et al., 2011). Passend zu diesen Befunden wurde gezeigt, dass heterozygote *Cacna1c*-Mäuse eine

verstärkte Belohnungsreaktion auf Kokain haben (Schierberl et al., 2011). $Ca_v1.2$ -Kanäle spielen auch bei der Sensibilisierung auf Stimulanzien eine wichtige Rolle, ein Verhalten, das zum Teil durch den Weg vom VTA zum NAc vermittelt wird. Bei Ratten ist die Sensibilisierung auf Amphetamin mit einem Anstieg der *Cacna1c*-mRNA und des Proteins im VTA verbunden (Rajadhyaksha et al., 2004). Obwohl es immer mehr Belege dafür gibt, dass eine normale $Ca_v1.2$ -Funktion bei mesolimbisch-DA-System-vermittelten Verhaltensweisen wichtig ist, sind die spezifischen neuronalen Substrate, über die sie wirkt, weitgehend unbekannt.

Die hier implementierte Belohnungsaufgabe wird häufig im Rahmen von Suchtstudien verwendet (Tripi et al., 2017). Einer der wichtigsten Modulatoren von Belohnung und Motivation ist der Nucleus accumbens, der unter anderem DAerge Inputs aus dem VTA in den mesolimbischen Belohnungskreislauf integriert (Kalivas & Volkow, 2005; Koob & Volkow, 2010). Es ist zu anmerken, dass dieser Prozess nicht alleine auf das DAerge System zurückzuführen ist, sondern viel komplexer ist. Unter anderem wurde gezeigt, dass auch das glutamaterge System Signale von der Amygdala, dem prefrontalen Kortex und vom Hippocampus an den NAc senden (Koob & Volkow, 2010).

Frühere Studien haben gezeigt, dass heterozygote Ratten weniger rufen (Kisko et al., 2018). Dao et al. (2010) haben dargelegt, dass die Amphetamin-induzierte Hyperlokomotion bei heterozygoten Weibchen abgeschwächt ist. Sie vermuten Beeinträchtigungen im DA-System, die auf die Abnahme der $Ca_v1.2$ -Expression zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse werden durch eine weitere Studie gestützt, in der Mäuse mit nur einer Kopie des *Cacna1c*-Gens eine verminderte lokomotorische Reaktion auf Psychostimulanzien zeigten (Dao et al., 2010). Das deutet darauf hin, dass dieses Gen an der Modulation des mesolimbischen DA-abhängigen Verhaltens beteiligt ist (Terrillion et al., 2017). Des Weiteren zeigt Terrillion et al. (2017), dass *Cacna1c* die DA-Wiederaufnahme moduliert und seine Funktion im VTA für die Entwicklung der Stimulanzien-induzierte Sensibilisierung notwendig ist. Insgesamt deuten die Daten dieser Studie darauf hin, dass *Cacna1c* das mesolimbisch-DA-abhängige Verhalten und die Dynamik am synaptischen DA-Terminal moduliert, möglicherweise durch eine veränderte DA-Wiederaufnahme durch VTA-Neuronen (Terrillion et al., 2017).

Diese Ergebnisse implizieren, dass DA die Verbindung zwischen dem verwendeten Belohnungsparadigma, den aufgezeichneten appetitiven 50-kHz Rufen und dem *Cacna1c*-Gen ist. Die Messung der DA-Aktivität würde weitere Erkenntnisse liefern und sollte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

vi. Sign- und Goal-Tracking in *Cacna1c*-haploinsuffizienten Ratten als translationale Studie

Das Vorkommen des *Cacna1c*-Gens in unterschiedlichen neuropsychischen Störungen zeigt, dass das Gen nicht spezifisch für eine Erkrankung ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass noch weitere Faktoren den Phänotyp dieser Erkrankungen beeinflussen, welches die Komplexität aufzeigt.

Nichtsdestotrotz wurde das *CACNA1C*-Gen als Risikogen vor allem für BD, SCZ, MDD und ASD identifiziert (Bhat et al., 2012; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomic Consortium, 2013; Heyes et al., 2015). Vom klinischen Aspekt weisen diese psychologischen Erkrankungen ähnliche phänotypische Merkmale auf, die höchstwahrscheinlich auf die überschneidenden neurologischen Schaltkreise und molekulare Mechanismen zurückzuführen sind (Kabir et al., 2016; Luthi & Luscher, 2014; Millan et al., 2012). Für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie ist die Nutzung von Modellorganismen maßgeblich. Die Validität und der translationale Effekt auf die humanen pathologischen und phänotypischen Mechanismen hängt von bestimmten Kriterien ab. Laut der Konstruktvalidität müssen die biologischen Veränderungen, die im Tiermodell untersucht werden, vergleichbar zu den in den Menschen gesehenen sein. Bei dem *Cacna1c*-Gen ist dies der Fall. SNPs in *CACNA1C* sind mit dem Risiko der Entwicklung verschiedener DSM-5 definierter Störungen verbunden, darunter BD, MDD und SCZ (Gottesman & Gould, 2003, Meyer-Lindenberg & Weinberger, 2006). Dieses bereits in Humanstudien untersuchte Gen wird nun in einem Tiermodell untersucht, um biologische und phänotypische Merkmale besser in einer kontrollierten Umgebung manipulieren und untersuchen zu können. Es wurden bereits zur Unterstützung der Daten von Nagetieren, die $Ca_v1.2$ in grundlegende Hirnfunktionen beschreiben, einer Reihe von Studien der SNP in *CACNA1C*, rs1006737, mit Variationen in der menschlichen Hirnfunktion und -struktur bei Probanden in Verbindung gebracht (Erk et al., 2010; Jogia et al., 2011; Perrier et al., 2011). Zudem ist im Vergleich zu der Verwendung von spezifischen Knock-out-Modellen von *Cacna1c* ein heterozygoten *Cacna1c*^{+/-} Modell von Vorteil, da bei Menschen die Veränderung auf dem *CACNA1C*-Gen das gesamte Organsystem betreffen und so eine gesteigerte Übertragbarkeit gewährleistet ist. Nicht nur das Verständnis der Ätiologie ist für die Entwicklung eines guten Modells wichtig. Auch sollten die Symptome, die bei den Erkrankungen beobachtet werden, sich im Modell widerspiegeln. Wie bereits in anderen Studien berichtet, wurden auch hier Kommunikationsdefizite in dem heterozygoten *Cacna1c*-Modell aufgezeigt. Störungen in den sozialen Interaktionen, unter anderem Kommunikation, sind wichtige Bestandteile, welche oft als Symptomatik bei den Störungsbildern beobachtet werden (Kennedy & Adolphs, 2012; Meyer-Lindenberg & Tost, 2012). Ratten zeigen ein stärkeres Sozialverhalten als Mäuse und zeigen daher für diese Art von Untersuchungen eine höhere translationale Validität (Ellenbroek & Youn, 2016;

Homberg et al., 2017). Unterstützend zur translationalen Ebene wurden bereits in vorherigen Studien Veränderungen im Sozialverhalten als auch im Affektzustand bei Nagetiermodellen gefunden (Kabir et al., 2017b; Moon et al., 2018). Neben anderen Tests zur Untersuchung von sozialer Interaktion kann auch die Analyse von USV den Affektzustand vermitteln und so Aufschluss über Sozial- und Kommunikationsverhalten geben. In dieser Studie wurden Beeinträchtigungen in der Ruftrate gefunden, welche auf einen Kommunikationsdefizit hinweisen. Zudem werden oft Defizite in Belohnungs- und Suchtverhalten als Begleiterscheinung bei Menschen berichtet (Lai et al., 2015; Luthi & Luscher, 2014; Post & Kalivas, 2013; Tang et al., 2004). Eine solche Verschiebung im Belohnungsparadigma wurde auch hier gesehen, allerdings ist unklar, ob diese Verschiebung spezifisch für die heterozygoten Tiere ist oder diese auch ihre Wurfgeschwister durch ihr Verhalten und der gemeinsamen Haltung verändern. Das würde dann eher auf einen Umgebungs-Haltungseinfluss bei den Wurfgeschwistern als zum speziell genotypischen Effekt hindeuten. Das Verständnis der Ätiologie der Störung und das Entwickeln von Modellen dient letztendlich dazu, neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, die nicht nur die Symptomatik aufzeigen, sondern die Ursachen bekämpfen. Demnach sollte ein gutes Tiermodell auch eine bestimmte prädiktive Validität haben, sodass man eine analoge Reaktion auf Substanzen im Modell und bei Menschen sieht. Nur durch das gründliche Verständnis der Anfälligkeitsfaktoren können neue Behandlungsmethoden entstehen (Insel & Scolnick, 2006). Mit der Steigerung dieser Validitäten erhöht sich die transnationale Validität des Modellorganismus.

Basierend auf diesem Hintergrund erfüllt das verwendete Modell die Validitätskriterien. Die Untersuchungen der hier durchgeführten Studien zu den Ultraschallvokalisationen im Sign- und Goal-Paradigma und dem Einfluss der *Cacna1c*-Haploinsuffizienz sind ein wichtiger Schritt in diesem Forschungsgebiet um Veränderungen im affektiven Zustand, die Komorbidität vieler Erkrankungen und den Einfluss von Risikogenen zu verstehen.

vii. ViolEx-Modell

Erwartungen beeinflussen die Wahrnehmung, den affektiven Zustand und die Kognition in einem bestimmten Kontext (Rief et al., 2015). Die daraus resultierenden Verhaltensweisen und Reaktionen basieren auf früheren bestätigten oder verletzten Erfahrungen. Mit neuen Erkenntnissen können diese Erwartungen beibehalten oder angepasst werden (Panitz et al., 2021). Im Rahmen des Graduiertenkolleg 2271 „Expectation Violation“ arbeiten verschiedene Disziplinen der Psychologie und Neurowissenschaften zusammen an der interdisziplinären Erforschung von Mechanismen der Erwartungsaufrechterhaltung und -Verletzung. Die hier durchgeführten Dissertationsstudien sind Teil

dieser Forschung. Im Folgenden wird das hier durchgeführte Projekt in das in Panitz et al. (2021) vorgestellte ViolEx 2.0-Modell, eingeordnet (Abbildung 4).

In dem ViolEx 2.0-Modell werden soziale und persönliche Charaktereigenschaften dem Zyklus der Erwartungshaltung und -Veränderung durch Ereignisse übergeordnet, da diese sich individuell unterscheiden (Panitz et al., 2021). In diesem Sign- und Goal-Paradigma fallen unter soziale und individuelle Eigenschaften, die Persönlichkeitsdisposition bei der Emission von USV und des Sign- und Goal-Verhaltens, welche auf neurobiologische Mechanismen basieren. Des Weiteren wurden hier wildtyp *Cacna1c^{+/+}* mit den heterozygoten *Cacna1c^{+/-}* Weibchen verglichen. Die Manipulation des Genotyps kann auch einen Einfluss auf ein solches Verhalten haben. Es ist nicht sicher, ob die gemischte Haltung beider Genotypen auch einen Einfluss auf das Verhalten hat, wovon aufgrund der Verschiebung im Sign- und Goal-Verhalten ausgegangen werden kann.

Der Zyklus im ViolEx 2.0-Modell beschreibt wie aufgrund von Erfahrungen, Erwartungshaltungen beibehalten, verstärkt oder verändert werden (Panitz et al., 2021). Im Folgenden werden die hier durchgeführten Studien anhand dieses Modells diskutiert und in Abbildung 4 eingeordnet. Ein sonst inoperabler Hebel signalisiert in diesem Paradigma die Lieferung von Futterpellets. Demnach ist die allgemeine Erwartung, sobald der Hebel erscheint, dass demnächst ein Pellet im Magazin geliefert werden wird. Daraus folgt die antizipatorische Reaktion, dass die Individuen sich dem Futtermagazin nähern, um die Belohnung anzunehmen. Hierbei ist anzumerken, dass diese antizipatorische Reaktion in den Aufmerksamkeitsbereich fällt und so durch kognitiv-gesteuerte Prozesse gesteuert wird. Daher zeigen hier im Idealfall die GT ein Annäherungsverhalten zum Pelletmagazin. Während bei den GT die das Ziel verfolgen die ACh top-down Kontrolle gut ausgeprägt ist, schneiden die ST nicht ganz so hoch in Aufmerksamkeitsaufgaben ab (Paolone et al., 2013) und interagieren mehr mit dem Hinweissignal, welches das Ziel, in diesem Fall die Belohnung vorhersagt. Wie bereits in der Einleitung und in dem neurobiologischen Diskussionsteil erwähnt, liegen dem neurobiologische Mechanismen zu Grunde. Im nächsten Schritt des ViolEx-Modells wird die Erwartung, ein Pellet zu bekommen, nach Ankündigung durch den Hebel in den 5 Tagen des PCA Trainings erfüllt. Bei jeder Pelletlieferung nach Ankündigung durch den Hebel findet eine Assimilation statt, wobei die Erwartungshaltung bestätigt wird. Sobald jedoch die zweitägige Extinktion folgt, wird die situationsspezifische Erwartung, ein Pellet zu erhalten umgestellt, aufgrund der Erwartungsverletzung. Hier findet eine Akkommodation der Erwartung statt, wobei die Erwartung, ein Futterpellet nach dem Hebelsignal zu erhalten, verändert wird. Dieser Prozess der Akkommodation findet vergleichsweise stärker bei den GT statt als bei den ST, da deren Aufmerksamkeit auf das Ziel gerichtet war, während die ST mehr mit dem Hebel interagieren. Demnach findet eine schnellere Extinktion bei den GT statt. Dennoch findet eine Aktualisierung in der

Erwartungshaltung bei beiden Gruppen statt unabhängig von Ihrer Präferenz zum Hinweissignal oder zur Belohnung selbst.

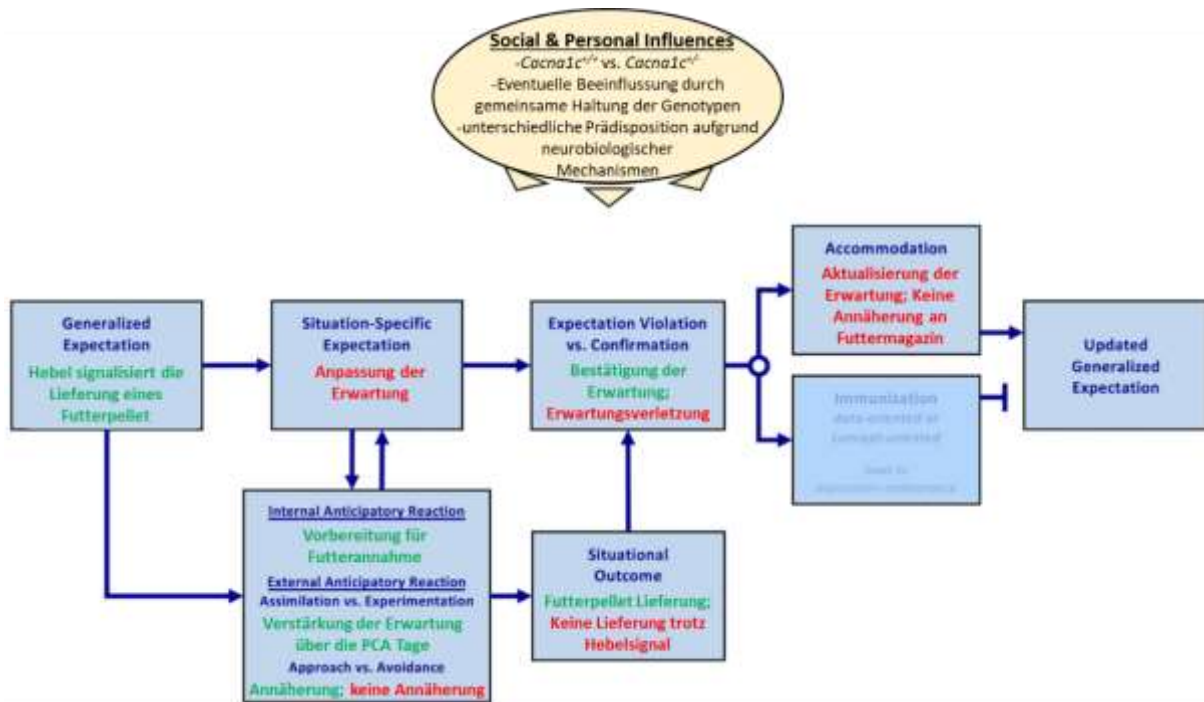


Abbildung 5: Modifiziertes ViolEx 2.0-Modell von Panitz et al. (2021); Anpassung an das hier verwendete Sign- und Goal-Paradigma mit Kennzeichnung des Erwartungsprozesses während der fünftägigen PCA-Aufgabe (grün), der anschließenden zweitägigen Extinktion (rot) und der Beschreibung der individuellen Einflüsse in dem verwendeten Modell.

viii. Fazit

Unseres Wissens nach ist dies die erste Studie, in der 50-kHz USV in dem Sign- und Goal-Paradigma untersucht wurde. 50-kHz Rufe spiegeln einen positiven Affekt wider und sind mit mesolimbischen DA-Funktionen verbunden. Das *CACNA1C*-Gen wird beim Menschen mit verschiedenen psychischen Störungen in Verbindung gebracht, unter anderem mit Stimmungsstörungen, die zum Teil wahrscheinlich auf eine veränderte DA-Signalgebung zurückzuführen sind.

Weibliche Ratten emittierten positive 50-kHz USV, aber keine negativen 22-kHz USV während einer pawlowschen-konditionierten Annäherungsaufgabe. Solche 50-kHz USV spiegeln möglicherweise eigenschaftsähnliche sozio-affektive Phänotypen wider, die zuvor mit der DA-Signalisierung in Verbindung gebracht wurden. Die 50-kHz USV waren positiv mit dem ST und negativ mit dem GT verbunden. Die Haploinsuffizienz des *Cacna1c*-Gens bei Ratten führt zu einem verminderten ST-Verhalten, begleitet von einer geringeren Anzahl appetitiver 50-kHz Rufe. Darüber hinaus zeigte sich eine hohe intraindividuelle Variabilität und interindividuelle Stabilität bei der Emission von USV, was auf Basis dieser Daten in anderen Paradigmen mehr Beachtung finden sollte.

VIII. Zukunftsperspektiven

Studien haben bereits gezeigt, dass das Sign- und Goal-Verhalten durch Umwelteinflüsse manipuliert werden kann (Beckmann & Brado, 2012; Lomanowska et al., 2011). Zudem ist bekannt, dass *Cacna1c*^{+/-} Veränderungen im Kommunikations- und Sozialverhalten zeigen (Kircher et al., 2019; Kisko et al., 2018, 2020; Redecker et al., 2019; Wöhr et al., 2021). Der gegenwärtige Befund der Verschiebung zum GT ist nicht ganz klar. Es wurde diskutiert, dass es einen Effekt durch die gemeinsame Haltung der Genotypen geben kann, welches zu dieser Verschiebung geführt haben könnte. In Zukunft wäre eine Analyse mit getrennter Gruppenhaltung wünschenswert.

Hier wurden weibliche *Cacna1c*^{+/-} in dem Sign- und Goal-Paradigma untersucht. Aufgrund der bekannten Geschlechtsunterschiede (Braun et al., 2018; Kisko et al., 2020; Redecker et al., 2019; Takeuchi et al., 2018; Witt et al., 2014) und Altersunterschiede (Kisko et al., 2020) in dem heterozygoten Modell sollte in zukünftigen Studien auch dies berücksichtigt werden.

Darüber hinaus wurden das Sign- und Goal-Verhalten und die Emission von USV als stabiler Merkmalsträger diskutiert, welche aufgrund überlappender neurobiologischer Schaltkreise zusammenhängen könnten. Vor allem ist hierbei die individuelle Untersuchung der Subjekte notwendig. Eine Limitation dieser Studie ist, dass DA-Prozesse, die als Verknüpfung des Verhaltens diskutiert werden, nicht direkt gemessen wurden. Eine Messung der DA-Levels während der Performance oder die Expressionsanalyse danach könnten Aufschluss hierüber geben. Zudem kann beispielsweise die Verwendung eines zusätzlichen Latent-State-Trade-Modells mehr Informationen über stabile Persönlichkeitsdispositionen und die gemeinsame Beeinflussung durch verschiedene Faktoren geben.

Über die neurobiologische Auswirkungen der *Cacna1c*-Mutation in Rattenmodellen besteht noch viel Forschungsbedarf. Auch muss beachtet werden, dass es sich hierbei nur um eines von vielen Risikogenen handelt, welches zu der Entwicklung von psychischen Störungen führen kann. Dies zeigt auch die Komplexität dieser Erkrankungen. Daher ist es auch interessant Modelle mit mehreren genetischen Faktoren zu berücksichtigen, da dies den translationalen Wert steigern würde.

IX. Abschlussbemerkung

Das hier verwendete PCA-Paradigma erlaubt es, den prädiktiven Wert vom motivierenden Wert einer Belohnungsaufgabe zu unterscheiden und so die individuelle Anreizsalienz zu erfassen. Die Ergebnisse dieses Dissertationsprojektes belegen, dass die 50-kHz USV ein starker Merkmalsmarker ist und dass es bei Individuen weniger einen zustandsbezogenen als vielmehr einen merkmalsbezogenen Effekt gibt. Zudem dient dieses charakterische Merkmal als stabiler Prädiktor des Sign- und Goal-Verhaltens. Daher wird empfohlen, dass solche subjektabhängigen Faktoren bei der Untersuchung von 50-kHz USV in PCA, aber auch in anderen Konditionierungsparadigmen, besondere Aufmerksamkeit erhalten sollten. Zudem konnte unter Verwendung des *Cacna1c*^{+/-} Rattenmodells gezeigt werden, dass eine Verringerung des Ca_v1.2 zu behavioralen Alterationen des Affektzustandes und der der Kommunikation führt, welche mit den krankheitsbedingten Phänotypen in Menschen in Einklang sind. Dies spricht für eine hohe Augenscheinvalidität. Daher kann dieses Modell für zukünftige Forschungen als bedeutende Messgröße für die Erforschung neuer Therapieansätze dienen, um so die Lebensqualität Erkrankter zu erhöhen.

X. Literaturverzeichnis

- Abel K. M., Drake R., Goldstein J. (2010). Sex differences in schizophrenia. *International Journal of Social Psychiatry* 22 (5), 417–428. doi:10.3109/09540261.2010.515205.
- Ahrens, A. M., Nobile, C. W., Page, L. E., Maier, E. Y., Duvauchelle, C. L., & Schallert, T. (2013). Individual differences in the conditioned and unconditioned rat 50-kHz ultrasonic vocalizations elicited by repeated amphetamine exposure. *Psychopharmacology*, 229(4), 687-700. doi:10.1007/s00213-013-3130-9.
- Ahrens, A. M., Singer, B. F., Fitzpatrick, C. J., Morrow, J. D., & Robinson, T. E. (2016a). Rats that sign-track are resistant to Pavlovian but not instrumental extinction. *Behavioural Brain Research*, 296, 418-430. doi:10.1016/j.bbr.2015.07.055.
- Ahrens, A. M., Meyer, P. J., Ferguson, L. M., Robinson, T. E., & Aldridge, J. W. (2016b). Neural activity in the ventral pallidum encodes variation in the incentive value of a reward cue. *Journal of Neuroscience*, 36(30), 7957–7970. doi:10.1523/JNEUROSCI.0736–16.2016.
- Alonso, J., Angermeyer, M. C., Bernert, S., Bruffaerts, R., Brugha, T. S., Bryson, H., Girolamo, G. de, Graaf, R., Demyttenaere, K., Gasquet, I., Haro, J. M., Katz, S. J., Kessler, R. C., Kovess, V., Lépine, J. P., Ormel, J., Polidori, G., Russo, L. J., Vilagut, G., . . . Vollebergh, W. A. M. (2004). Prevalence of mental disorders in Europe: Results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. *Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum* 109(420), 21– 27. doi:10.1111/j.1600-0047.2004.00327.x.
- Amado-Boccaro, I., Donnet, D., & Olié, J. P. (1993). La notion d'humeur en psychologie ("The concept of mood in psychology"). *L'Encephale*, 19(2), 117–122.
- Anand, A., Verhoeff, P., Seneca, N., Zoghbi, S.S., Seibyl, J.P., Charney, D.S. & Innis, R.B. (2000). Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *American Journal of Psychiatry* 157(7), 1108 – 1114. doi:10.1176/appi.ajp.157.7.1108.
- Anderson, S. M., Famous, K. R., Sadri-Vakili, G., Kumaresan, V., Schmidt, H. D., Bass, C. E., Terwilliger, E. F., Cha, J.-H. & Pierce, R. C. (2008). CaMKII: a biochemical bridge linking accumbens dopamine and glutamate systems in cocaine seeking. *Nature Neuroscience* 11(3), 344–353. doi:10.1038/nn2054.

- Armani, F., Andersen, M. L., & Galduróz, J. C. F. (2014). Tamoxifen use for the management of mania: a review of current preclinical evidence. *Psychopharmacology*, *231*(4), 639-649. doi:10.1007/s00213-013-3397-x.
- Asplund, C. L., Todd, J. J., Snyder, A. P., & Marois, R. (2010). A central role for the lateral prefrontal cortex in goal-directed and stimulus-driven attention. *Nature Neuroscience*, *13*(4), 507–512. doi:10.1038/nn.2509.
- Bader, P. L., Faizi, M., Kim, L. H., Owen, S. F., Tadross, M. R., Alfa, R. W., ... Shamloo, M. (2011). Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(37), 15432–15437. doi:10.1073/pnas.1112667108.
- Bai, D., Yip, B. H. K., Windham, G. C., Sourander, A., Francis, R., Yoffe, R., Glasson, E., Mahjani, B., Suominen, A., Leonard, H., Gissler, M., Buxbaum, J. D., Wong, K., Schendel, D., Kodesh, A., Breshnahan, M., Levine, S. Z., Parner, E. T., Hansen, S. N., . . . Sandin, S. (2019). Association of genetic and environmental factors with autism in a 5-country cohort. *JAMA Psychiatry*, *76*(10), 1035-1043. doi:10.1001/jamapsychiatry.2019.1411.
- Bardo, M., Klebaur, J., Valone, J., & Deaton, C. (2001). Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology*, *155*(3), 278-284. doi:10.1007/s002130100720.
- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., & McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *American Zoologist*, *19*(2), 469-480. doi:10.1016/0031-9384(89)90123-6.
- Basar, K., Sesia, T., Groenewegen, H., Steinbusch, H.W.M., Visser-Vandewalle, V. & Temel, Y. (2010) Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in Neurobiology* *92*(4), 533–557. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.08.007.
- Bauer, E. P., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2002). NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *The Journal of Neuroscience*, *22*(12), 5239–5249. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-12-05239.2002.
- Baxter, M. G., & Murray, E. A. (2002). The amygdala and reward. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(7), 563–573. doi:10.1038/nrn875.
- Beckmann, J. S., & Bardo, M. T. (2012). Environmental enrichment reduces attribution of incentive salience to a food associated stimulus. *Behavioural Brain Research*, *226*(1), 331–334. doi:10.1016/j.bbr.2011.09.021.

- Beckmann, J. S., & Chow, J. J. (2015). Isolating the incentive salience of reward-associated stimuli: value, choice, and persistence. *Learning & Memory*, *22*(2), 116-127. doi:10.1101/lm.037382.114.
- Beery, A.K., Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* *35*(3), 565–572. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.07.002.
- Berger, S. M., & Bartsch, D. (2014). The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Research* *357*(2), 463–476. doi:10.1007/s00441-014-1936-3.
- Berridge, K. C. (2001). Reward learning: Reinforcement, incentives, and expectations. *The Psychology of Learning and Motivation* *40*, 223–278. doi:10.1016/S0079-7421(00)80022-5.
- Berridge, K. C. (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, *191*(3), 391–431. doi:10.1007/s00213-006-0578-x.
- Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., ... & Jaber, M. (2003). Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *Journal of Neuroscience*, *23*(35), 10999-11007. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-35-10999.2003.
- Bhat, S., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Arad, M., Smith, R. J., Soldatov, N. M., & Gould, T. D. (2012). Cacna1c (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Progress in Neurobiology*, *99*(1), 1–14. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.06.001.
- Bindra, D. (1978). How adaptive behavior is produced: a perceptual motivation alternative to response reinforcement. *Behavior and Brain Sciences* *1*(1), 41–91. doi:10.1017/S0140525X00059380.
- Borta, A., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research*, *166*(2), 271-280. doi:10.1016/j.bbr.2005.08.009.
- Bowling, S. L., Rowlett, J. K., & Bardo, M. T. (1993). The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. *Neuropharmacology*, *32*(9), 885-893. doi:10.1016/0028-3908(93)90144-r.
- Braun, M. D., Kisko, T. M., Dalla Vecchia, D., Andreatini, R., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2018). Sex-specific effects of Cacna1c haploinsufficiency on object recognition, spatial memory, and reversal learning capabilities in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *155*, 543-555. doi:10.1016/j.nlm.2018.05.012.

- Braun, M. D., Kisko, T. M., Witt, S. H., Rietschel, M., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2019). Long-term environmental impact on object recognition, spatial memory and reversal learning capabilities in *Cacna1c*-haploinsufficient rats. *Human Molecular Genetics*, *28*(24), 4113-4131. doi:10.1093/hmg/ddz235.
- Brenes, J. C., & Schwarting, R. K. (2014). Attribution and expression of incentive salience are differentially signaled by ultrasonic vocalizations in rats. *PLoS One*, *9*(7), e102414. doi:10.1371/journal.pone.0102414.
- Brenes, J. C., & Schwarting, R. K. (2015). Individual differences in anticipatory activity to food rewards predict cue-induced appetitive 50-kHz calls in rats. *Physiology & Behavior*, *149*, 107-118. doi:10.1016/j.physbeh.2015.05.012.
- Browning, J. R., Browning, D. A., Maxwell, A. O., Dong, Y., Jansen, H. T., Panksepp, J., & Sorg, B. A. (2011). Positive affective vocalizations during cocaine and sucrose self-administration: a model for spontaneous drug desire in rats. *Neuropharmacology*, *61*(1-2), 268-275. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.04.012.
- Brudzynski, S. M. (2007). Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behavioural Brain Research*, *182*(2), 261-273. doi:10.1016/j.bbr.2007.03.004.
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(3), 310-317. doi:10.1016/j.conb.2013.01.014.
- Brudzynski, S. M. (2014). Social origin of vocal communication in rodents. In *Biocommunication of Animals* (pp. 63-79). doi:10.1007/978-94-007-7414-8_5.
- Brudzynski, S. M. (2015). Pharmacology of ultrasonic vocalizations in adult rats: significance, call classification and neural substrate. *Current Neuropharmacology*, *13*(2), 180-192. doi:10.2174/1570159x13999150210141444.
- Brudzynski, S. M. (2021). Biological functions of rat ultrasonic vocalizations, arousal mechanisms, and call initiation. *Brain Sciences*, *11*(5), 605. doi:10.3390/brainsci11050605.
- Brudzynski, S. M., & Pniak, A. (2002). Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *Journal of Comparative Psychology*, *116*(1), 73-82. doi:10.1037/07357036.116.1.73.
- Brudzynski, S. M., Silkstone, M., Komadoski, M., Scullion, K., Duffus, S., Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., & Panksepp, J. (2011). Effects of intraaccumbens amphetamine on production of

- 50 kHz vocalizations in three lines of selectively bred Long-Evans rats. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 32–40. doi:10.1016/j.bbr.2010.10.006.
- Burgdorf, C. E., Schierberl, K. C., Lee, A. S., Fischer, D. K., Van Kempen, T. A., Mudragel, V., Haganir, R. L., Milner, T. A., Glass, M. J., & Rajadhyaksha, A. M. (2017). Extinction of contextual cocaine memories requires Ca_v1.2 within D1R-expressing cells and recruits hippocampal Ca_v1.2-dependent signaling mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 37(49), 11894–11911. doi:10.1523/JNEUROSCI.2397-17.2017.
- Burgdorf, J. S., Brudzynski, S. M., & Moskal, J. R. (2020). Using rat ultrasonic vocalization to study the neurobiology of emotion: from basic science to the development of novel therapeutics for affective disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 60, 192-200. doi:10.1016/j.conb.2019.12.008.
- Burgdorf, J., Knutson, B., & Panksepp, J. (2000). Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(2), 320-327. doi:10.1037/0735-7044.114.2.320
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfaus, J. G., Brudzynski, S. M., & Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of Comparative Psychology*, 122(4), 357-367. doi:10.1037/a0012889.
- Burgdorf, J., Wood, P. L., Kroes, R. A., Moskal, J. R., & Panksepp, J. (2007). Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behavioural Brain Research*, 182(2), 274-283. doi:10.1016/j.bbr.2007.03.010.
- Burke, C. J., Markovina, M., Pellis, S. M., & Euston, D. R. (2021). Rat 50 kHz Trill Calls Are Tied to the Expectation of Social Interaction. *Brain Sciences*, 11(9), 1142. doi:10.3390/brainsci11091142.
- Busquet, P., Hetzenauer, A., Sinnegger-Brauns, M. J., Striessnig, J., & Singewald, N. (2008). Role of L-type Ca²⁺ channel isoforms in the extinction of conditioned fear. *Learning & Memory*, 15(5), 378-386. doi:10.1101/lm.886208.
- Cannon, T. D., Kaprio, J., Lönnqvist, J., Huttunen, M., & Koskenvuo, M. (1998). The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort: a population-based modeling study. *Archives of General Psychiatry*, 55(1), 67-74. doi:10.1001/archpsyc.55.1.67.

- Cardno, A. G., & Gottesman, I. I. (2000). Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *American Journal of Medical Genetics*, *97*(1), 12-17. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(200021)97:1<12::AID-AJMG3>3.0.CO;2-U
- Casamassima, F., Hay, A. C., Benedetti, A., Lattanzi, L., Cassano, G. B., & Perlis, R. H. (2010). L-type calcium channels and psychiatric disorders: A brief review. *American Journal of Medical Genetics*, *153B*(8), 1373–1390. doi:10.1002/ajmg.b.31122.
- Cattane, N., Richetto, J., & Cattaneo, A. (2018). Prenatal exposure to environmental insults and enhanced risk of developing Schizophrenia and Autism Spectrum Disorder: Focus on biological pathways and epigenetic mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* *117*, 253-278. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.07.001.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(8), a003947. doi:10.1101/cshperspect.a003947.
- Chang, S. E., Wheeler, D. S., & Holland, P. C. (2012). Roles of nucleus accumbens and basolateral amygdala in autoshaped lever pressing. *Neurobiology of Learning and Memory*, *97*(4), 441–451. doi:10.1016/j.nlm.2012.03.008.
- Chesney, E., Goodwin, G. M., & Fazel, S. (2014). Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: A meta-review. *World Psychiatry*, *13*(2), 153–160. doi:10.1002/wps.20128.
- Childress, A. R., Ehrman, R. N., Wang, Z., Li, Y., Sciortino, N., Hakun, J., Jens, W., Suh, J., Listerud, J., Marquez, K., Franklin, T., Langleben, D., Detre, J., & O'Brien, C. P. (2008). Prelude to passion: Limbic activation by “unseen” drug and sexual cues. *PLoS One* *3*(1), e1506. doi:10.1371/journal.pone.0001506.
- Conradi, H. J., Bos, E. H., Kamphuis, J. H., & Jonge, P. (2017). The ten-year course of depression in primary care and long-term effects of psychoeducation, psychiatric consultation and cognitive behavioral therapy. *Journal of Affective Disorders*, *217*, 174–182. doi:10.1016/j.jad.2017.03.064.
- Covington III, H. E., & Miczek, K. A. (2003). Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: Possible expressions of affective distress. *European Journal of Pharmacology*, *467*(1-3), 1-13. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01558-9.
- Creese, I., Burt, D. R., & Snyder, S. H. (1996). Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *8*(2), 223–226. doi:10.1176/jnp.8.2.223.

- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2013). Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* 381 (9875), 1371–1379. doi:10.1016/S0140-6736(12)62129-1.
- Danna, C. L., Shepard, P. D., & Elmer, G. I. (2013). The habenula governs the attribution of incentive salience to reward predictive cues. *Frontier Human Neuroscience*, 7, 781. doi:10.3389/fnhum.2013.00781.
- Dao, D. T., Mahon, P. B., Cai, X., Kovacsics, C. E., Blackwell, R. A., Arad, M., Shi, J., Zandi, P. P., O'Donnell, P., Bipolar Genome Study (BiGS) Consortium, Knowles, J. A., Weissman, M. M., Coryell, W., Scheftner, W. A., Lawson, W. B., Levinson, D. F., Thompson, S. M., Potash, J. B., & Gould, T. D. (2010). Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biological Psychiatry*, 68(9), 801–810. doi:10.1016/j.biopsych.2010.06.019.
- Dedic, N., Pöhlmann, M. L., Richter, J. S., Mehta, D., Czamara, D., Metzger, M. W., Dine, J., Bedenk, B. T., Hartmann, J., Wagner, K. V., Jurik, A., Almlı, L. M., Lori, A., Moosmang, S., Hofmann, F., Wotjak, C. T., Rammes, G., Eder, M., Chen, A., Ressler, K. J., ... Deussing, J. M. (2018). Cross-disorder risk gene CACNA1C differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood. *Molecular Psychiatry*, 23(3), 533–543. doi:10.1038/mp.2017.133.
- Del Arco, A., Segovia, G., Canales, J. J., Garrido, P., de Blas, M., García-Verdugo, J. M., & Mora, F. (2007). Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neural Transmission*, 114(1), 43–48. doi:10.1007/s00702-006-0565-8.
- Dietsche, B., Backes, H., Laneri, D., Weikert, T., Witt, S. H., Rietschel, M., ... Krug, A. (2014). The impact of a CACNA1C gene polymorphism on learning and hippocampal formation in healthy individuals: A diffusion tensor imaging study. *NeuroImage*, 89, 256–261. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.11.030.
- DiFeliceantonio, A. G., & Berridge, K. C. (2016). Dorsolateral neostriatum contribution to incentive salience: opioid or dopamine stimulation makes one reward cue more motivationally attractive than another. *European Journal of Neuroscience*, 43(9), 1203–1218. doi:10.1111/ejn.13220.
- DiLalla, L. F., McCrary, M., & Diaz, E. (2017). A review of endophenotypes in schizophrenia and autism: the next phase for understanding genetic etiologies. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 175(3), 354-361. doi: 10.1002/ajmg.c.31566.

- Domjan, M., Lyons, R., North, N. C., & Bruell, J. (1986). Sexual Pavlovian conditioned approach behavior in male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Comparative Psychology*, *100*(4), 413-421. doi:10.1037/0735-7036.100.4.413.
- Drevets, W. C., Gautier, C., Price, J. C., Kupfer, D. J., Kinahan, P. E., Grace, A. A., Price, J. L. & Mathis, C. A. (2001). Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biological Psychiatry* *49*(2), 81–96. doi:10.1016/s0006-3223(00)01038-6.
- Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G., & Benzer, S. (1976). Dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(5), 1684–1688. doi: 10.1073/pnas.73.5.1684.
- Eaton, N. R., Keyes, K. M., Krueger, R. F., Balsis, S., Skodol, A. E., Markon, K. E., Grant, B. F., Hasin, D. S. (2012). An invariant dimensional liability model of gender differences in mental disorder prevalence: Evidence from a national sample. *Journal of Abnormal Psychology*, *121*(1), 282–288. doi:10.1037/a0024780.
- Eckart, N., Song, Q., Yang, R., Wang, R., Zhu, H., McCallion, A. S., Avramopoulos, D. (2016). Functional Characterization of Schizophrenia-Associated Variation in CACNA1C. *PLoS One*, *11*(6), e0157086. doi:10.1371/journal.pone.0157086.
- Ehret, G. (1987). Left hemisphere advantage in the mouse brain for recognizing ultrasonic communication calls. *Nature*, *325*(6101), 249-251. doi:10.1038/325249a0.
- Ehret, G., & Haack, B. (1981). Categorical perception of mouse pup ultrasound by lactating females. *Naturwissenschaften*, *68*(4), 208-209. doi:10.1007/BF01047208.
- Ellenbroek, B., Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease Model Mechanism* *9*(10), 1079–1087. doi:10.1242/dmm.026120.
- Engelhardt, K. A., Fuchs, E., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2017). Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: Implications for mania models. *European Neuropsychopharmacology*, *27*(3), 261-273. doi:10.1016/j.euroneuro.2017.01.003.
- Engelhardt, K. A., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2018). Mapping trait-like socio-affective phenotypes in rats through 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology*, *235*(1), 83-98. doi:10.1007/s00213-017-4746-y.

- Erk, S., Meyer-Lindenberg, A., Linden, D., Lancaster, T., Mohnke, S., Grimm, O., Degenhardt, F., Holmans, P., Pocklington, A., Schmierer, P., Haddad, L., Mühleisen, T. W., Mattheisen, M., Witt, S. H., Romanczuk-Seiferth, N., Tost, H., Schott, B. H., Cichon, S., Nöthen, M. M., Rietschel, M., ... Walter, H. (2014). Replication of brain function effects of a genome-wide supported psychiatric risk variant in the CACNA1C gene and new multi-locus effects. *NeuroImage, 94*, 147–154. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.03.007.
- Erk, S., Meyer-Lindenberg, A., Schnell, K., Opitz von Boberfeld, C., Esslinger, C., Kirsch, P., ... Walter, H. (2010). Brain function in carriers of a genome-wide supported bipolar disorder variant. *Archives of General Psychiatry, 67(8)*, 803–811. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.94.
- Estes, W. K., & Skinner, B. F. (1941). Some quantitative properties of anxiety. *Journal of Experimental Psychology, 29(5)*, 390-400. doi:10.1037/h0062283.
- Fajutrao, L., Locklear, J., Prialux, J., & Heyes, A. (2009). A systematic review of the evidence of the burden of bipolar disorder in Europe. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health: CP & EMH, 5*, 3. doi:10.1186/1745-0179-5-3.
- Ferrari, A. J., Stockings, E., Khoo, J.-P., Erskine, H. E., Degenhardt, L., Vos, T., & Whiteford, H. A. (2016). The prevalence and burden of bipolar disorder: Findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Bipolar Disorders, 18(5)*, 440–450. doi:10.1111/bdi.12423.
- Ferreira, M. A., O'Donovan, M. C., Meng, Y. A., Jones, I. R., Ruderfer, D. M., Jones, L., ... Gill, M. (2008). Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nature Genetics, 40(9)*, 1056-1058. doi:10.1038/ng.209.
- Fitzpatrick, C. J., Creeden, J. F., Perrine, S. A., & Morrow, J. D. (2016). Lesions of the ventral hippocampus attenuate the acquisition but not expression of sign-tracking behavior in rats. *Hippocampus, 26(11)*, 1424–1434. doi:10.1002/hipo.22619.
- Fitzpatrick, C. J., & Morrow, J. D. (2016). Pavlovian conditioned approach training in rats. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (108), e53580. doi:10.3791/53580.
- Fitzpatrick, C. J., Gopalakrishnan, S., Cogan, E. S., Yager, L. M., Meyer, P. J., Lovic, V., & Flagel, S. B. (2013). Variation in the form of Pavlovian conditioned approach behavior among outbred male Sprague-Dawley rats from different vendors and colonies: Sign-tracking vs. goal-tracking. *PLoS One, 8(10)*, e75042. doi:10.1371/journal.pone.0075042.

- Flagel, S. B., & Robinson, T. E. (2017). Neurobiological basis of individual variation in stimulus-reward learning. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 13, 178–185. doi:10.1016/j.cobeha.2016.12.004.
- Flagel, S. B., Akil, H., & Robinson, T. E. (2009). Individual differences in the attribution of incentive salience to reward-related cues: Implications for addiction. *Neuropharmacology*, 56(1), 139–148. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.027.
- Flagel, S. B., Cameron, C. M., Pickup, K. N., Watson, S. J., Akil, H., & Robinson, T. E. (2011). A food predictive cue must be attributed with incentive salience for it to induce c-fos mRNA expression in cortico-striatal-thalamic brain regions. *Neuroscience*, 196, 80-96. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.09.004.
- Flagel, S. B., Robinson, T. E., Clark, J. J., Clinton, S. M., Watson, S. J., Seeman, P., Phillips, P. E. M., & Akil, H. (2010). An animal model of genetic vulnerability to behavioral disinhibition and responsiveness to reward-related cues: Implications for addiction. *Neuropsychopharmacology* 35(2), 388–400. doi:10.1038/npp.2009.142.
- Flagel, S. B., Watson, S. J., Robinson, T. E., & Akil, H. (2007). Individual differences in the propensity to approach signals vs goals promote different adaptations in the dopamine system of rats. *Psychopharmacology*, 191(3), 599-607. doi:10.1007/s00213-006-0535-8.
- Gershon, E.S., Grennan, K., Busnello, J., Badner, J.A., Ovsiew, F., Memon, S., Alliey-Rodriguez, N., Cooper, J., Romanos, B., Liu, C. (2014). A rare mutation of CACNA1C in a patient with bipolar disorder, and decreased gene expression associated with a bipolar-associated common SNP of CACNA1C in brain. *Molecular Psychiatry* 19(8), 890–894. doi:10.1038/mp.2013.107.
- Geurts, A. M., Cost, G. J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J. C., Choi, V. M., Jenkins, S. S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegon, I., Davis, G. D., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D., Jacob, H. J., Buelow, R. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 325(5939), 433-433. doi:10.1126/science.1172447.
- Ghosh, A., Carnahan, J., & Greenberg, M. E. (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, 263(5153), 1618-1623. doi:10.1126/science.7907431.
- Gillis, Z. S., & Morrison, S. E. (2019). Sign Tracking and Goal Tracking Are Characterized by Distinct Patterns of Nucleus Accumbens Activity. *eNeuro*, 6(2), ENEURO.0414-18.2019. doi:10.1523/ENEURO.0414-18.2019.

- Giordano, T. P., Tropea, T. F., Satpute, S. S., Sinnegger-Brauns, M. J., Striessnig, J., Kosofsky, B. E., & Rajadhyaksha, A. M. (2010). Molecular switch from L-type Cav1.3 to Cav1.2 Ca²⁺ channel signaling underlies long-term psychostimulant-induced behavioral and molecular plasticity. *Journal of Neuroscience*, *30*(50), 17051-17062. doi:10.1523/JNEUROSCI.2255-10.2010.
- Gipson, C. D., Beckmann, J. S., El-Maraghi, S., Marusich, J. A., & Bardo, M. T. (2011). Effect of environmental enrichment on escalation of cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, *214*(2), 557-566. doi:10.1007/s00213-010-2060-z.
- Goldberg, J. F., & Ernst, C. L. (2002). The Economic and Social Burden of Bipolar Disorder. In M. Maj (Ed.), *WPA series evidence and experience in psychiatry: v. 5. Bipolar Disorder* (pp. 441–501). Wiley. doi:10.1002/047084650X.ch6.
- Gottesman, I. I., & Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *American Journal of Psychiatry*, *160*(4), 636-645. doi:10.1176/appi.ajp.160.4.636.
- Grace, A. A. (2016). Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nature Review Neuroscience* *17*(8), 524–532. doi:10.1038/nrn.2016.57.
- Green, E. K., Grozeva, D., Jones, I., Jones, L., Kirov, G., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Forty, L., Russell, E., Hamshere, M. L., Moskvina, V., Nikolov, I., Farmer, A., McGuffin, P., Wellcome Trust Case Control Consortium, Holmans, P. A., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., & Craddock, N. (2010). The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *15*(10), 1016–1022. doi:10.1038/mp.2009.49.
- Green, T., Gehrke, B., & Bardo, M. (2002). Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed-and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology*, *162*(4), 373-378. doi: 10.1007/s00213-002-1134-y.
- Gunnar, M. R., Frenn, K., Wewerka, S. S., & Van Ryzin, M. J. (2009). Moderate versus severe early life stress: Associations with stress reactivity and regulation in 10–12-year-old children. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(1), 62–75.
- Haight, J. L., Fuller, Z. L., Fraser, K. M., & Flagel, S. B. (2017). A food-predictive cue attributed with incentive salience engages subcortical afferents and efferents of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Neuroscience*, *340*, 135-152. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.043.

- Halladay, A. K., Bishop, S., Constantino, J. N., Daniels, A. M., Koenig, K., Palmer, K., Messinger, D., Pelphrey, K., Sanders, S. J., Singer, A. T., Taylor, J. L., Szatmari, P. (2015). Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. *Molecular Autism* 6, 36. doi:10.1186/s13229-015-0019-y.
- Harvey, P. D. (2014). Assessing disability in schizophrenia: Tools and contributors. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 75(10), e27. doi:10.4088/JCP.13049tx5c.
- Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J., & Nutt, D. J. (2013). Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. *Journal of Psychopharmacology*, 27(6), 479-496. doi:10.1177/0269881113482532.
- Heyes, S., Pratt, W. S., Rees, E., Dahimene, S., Ferron, L., Owen, M. J., & Dolphin, A. C. (2015). Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Progress in Neurobiology*, 134, 36–54. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.09.002.
- Hirschfeld, R. M. A., Montgomery, S. A., Keller, M. B., Kasper, S., Schatzberg, A. F., Moller, H.-J., ... Bourgeois, M. (2000). Social Functioning in Depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61(4), 268–275. doi:10.4088/JCP.v61n0405.
- Homberg, J. R., Wöhr, M., & Alenina, N. (2017). Comeback of the Rat in Biomedical Research. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(5), 900–903. doi:10.1021/acscemneuro.6b00415.
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens—olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 27-78. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.004.
- Insel, T. R., & Scolnick, E. M. (2006). Cure therapeutics and strategic prevention: raising the bar for mental health research. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 11-17. doi:10.1038/sj.mp.4001777.
- Jeon, D., Kim, S., Chetana, M., Jo, D., Ruley, H. E., Lin, S. Y., Rabah, D., Kinet, J. P., Shin, H. S. (2010). Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nature Neuroscience* 13(4), 482–488. doi:10.1038/nn.2504.
- Jogia, J., Ruberto, G., Lelli-Chiesa, G., Vassos, E., Maierú, M., Tatarelli, R., Girardi, P., Collier, D., & Frangou, S. (2011). The impact of the CACNA1C gene polymorphism on frontolimbic function in bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 16(11), 1070–1071. doi:10.1038/mp.2011.49.
- Johansson, P., Hall, L., Sikström, S., Tärning, B., & Lind, A. (2006). How something can be said about telling more than we can know: On choice blindness and introspection. *Conscious Cognition* 15(4), 673–692. doi:10.1016/j.concog.2006.09.004.

- Juckel, G., Sass, L., & Heinz, A. (2003). Anhedonia, self-experience in schizophrenia, and implications for treatment. *Pharmacopsychiatry*, *36*(3), 176-180. doi:10.1055/s-2003-45127.
- Kabir, Z. D., Che, A., Fischer, D. K., Rice, R. C., Rizzo, B. K., Byrne, M., Glass, M. J., De Marco Garcia, N. V., Rajadhyaksha, A.M. (2017a). Rescue of impaired sociability and anxiety-like behavior in adult *cacna1c*-deficient mice by pharmacologically targeting eIF2 α . *Molecular Psychiatry* *22*(8), 1096–1109. doi:10.1038/mp.2017.124.
- Kabir, Z. D., Lee, A. S., & Rajadhyaksha, A. M. (2016). L-type Ca²⁺ channels in mood, cognition and addiction: integrating human and rodent studies with a focus on behavioural endophenotypes. *The Journal of Physiology*, *594*(20), 5823–5837. doi:10.1113/JP270673.
- Kabir, Z. D., Lee, A. S., Burgdorf, C. E., Fischer, D. K., Rajadhyaksha, A. M., Mok, E., Rizzo, B., Rice, R. C., Singh, K., Ota, K. T., Gerhard, D. M., Schierberl, K. C., Glass, M. J., Duman, R. S., Rajadhyaksha, A. M. (2017b). *Cacna1c* in the Prefrontal Cortex Regulates Depression-Related Behaviors via REDD1. *Neuropsychopharmacology* *42*(10), 2032–2042. doi:10.1038/npp.2016.271.
- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, *162*(8), 1403-1413. doi:10.1176/appi.ajp.162.8.1403.
- Karst, H., Nair, S., Velzing, E., Rumpff-van Essen, L., Slagter, E., Shinnick-Gallagher, P., & Joëls, M. (2002). Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. *European Journal of Neuroscience*, *16*(6), 1083–1089. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02172.x.
- Kearns, D. N., Gomez-Serrano, M. A., Weiss, S. J., & Riley, A. L. (2006). A comparison of Lewis and Fischer rat strains on autoshaping (sign-tracking), discrimination reversal learning and negative automaintenance. *Behavioural Brain Research*, *169*(2), 193-200. doi:10.1016/j.bbr.2006.01.005.
- Kempton, M. J., Ruberto, G., Vassos, E., Tatarelli, R., Giradi, P., Collier, D., Frangou, S. (2009). Effects of the CACNA1C Risk Allele for Bipolar Disorder on Cerebral Gray Matter Volume in Healthy Individuals. *American Journal of Psychiatry* *166*(12), 1413–1414. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09050680.
- Kendler, K. S., & Prescott, C. A. (1999). A Population-Based Twin Study of Lifetime Major Depression in Men and Women. *Archives of General Psychiatry*, *56*(1), 39-44. doi:10.1001/archpsyc.56.1.39.

- Kennedy, D. P., Adolphs, R. (2012). The social brain in psychiatric and neurological disorders. *Trends of Cognitive Science* 16(11), 559–572. doi:10.1016/j.tics.2012.09.006.
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, 62(6), 593–602. doi:10.1001/archpsyc.62.6.593.
- Kieseppä, T., Partonen, T., Haukka, J., Kaprio, J., & Lönnqvist, J. (2004). High concordance of bipolar disorder in a nationwide sample of twins. *American Journal of Psychiatry*, 161(10), 1814–1821. doi: 10.1176/ajp.161.10.1814.
- Kim, Y., Rivet, C., Lustig, C., & Sarter, M. (2016). Poor attentional control as a trait in sign-tracking rats: Cortical cholinergic-GABAergic mechanisms. In *Society for Neuroscience Annual Meeting, San Diego, CA*.
- Kircher, T., Wöhr, M., Nenadic, I., Schwarting, R., Schratt, G., Alferink, J., Culmsee, C., Garn, H., Hahn, T., Müller-Myhsok, B., Dempfle, A., Hahmann, M., Jansen, A., Pfefferle, P., Renz, H., Rietschel, M., Witt, S.H., Nöthen, M., Krug, A., Dannlowski, U. (2019). Neurobiology of the major psychoses: A translational perspective on brain structure and function - the FOR2107 consortium. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 269(8), 949-962. doi:10.1007/s00406-018-0943-x.
- Kisko T.M., Braun, M.D., Michels, S., Witt, S.H., Rietschel, M., Culmsee, C., Schwarting, R.K.W., Wöhr, M. (2020). Sex-dependent effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on juvenile social play behavior and pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats. *Genes, Brain Behavior*, 19(2), e12552. doi:10.1111/gbb.12552.
- Kisko, T. M., Braun, M. D., Michels, S., Witt, S. H., Rietschel, M., Culmsee, C., Schwarting, R., & Wöhr, M. (2018). *Cacna1c* haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz ultrasonic communication deficits in rats. *Disease Models & Mechanisms*, 11(6), dmm034116. doi:10.1242/dmm.034116.
- Kisko, T. M., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2021). Sex differences in the acoustic features of social play-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations: A detailed spectrographic analysis in wild-type Sprague–Dawley and *Cacna1c* haploinsufficient rats. *Developmental Psychobiology*, 63(2), 262-276. doi:10.1002/dev.21998.

- Knapp, D. J., & Pohorecky, L. A. (1995). An air-puff stimulus method for elicitation of ultrasonic vocalizations in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *62*(1-2), 1-5. doi:10.1016/0165-0270(95)00044-5.
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *Journal of Comparative Psychology*, *112*(1), 65-73. doi:10.1037/0735-7036.112.1.65.
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological Bulletin*, *128*(6), 961-977. doi:10.1037/0033-2909.128.6.961.
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 217-238. doi:10.1038/npp.2009.110.
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2010). Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *American Journal of Psychiatry*, *167*(11), 1305-1320. doi:10.1176/appi.ajp.2009.10030434.
- Lacinova, L., Moosmang, S., Langwieser, N., Hofmann, F., & Kleppisch, T. (2008). Cav1.2 calcium channels modulate the spiking pattern of hippocampal pyramidal cells. *Life Sciences*, *82*(1-2), 41-49. doi:10.1016/j.lfs.2007.10.009.
- Lai, H.M., Cleary, M., Sitharthan, T. & Hunt, G.E. (2015). Prevalence of comorbid substance use, anxiety and mood disorders in epidemiological surveys, 1990–2014: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* *154*, 1–13. doi:10.1016/j.drugalcdep.2015.05.031.
- Lajoie, J., & Bindra, D. (1976) An interpretation of autoshaping and related phenomena in terms of stimulus-incentive contingencies alone. *Canadian Journal of Psychology*, *30*, 157–173.
- Lambert, M., Karow, A., Leucht, S., Schimmelmann, B. G., & Naber, D. (2010). Remission in schizophrenia: Validity, frequency, predictors, and patients' perspective 5 years later. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *12*(3), 393–407. doi:10.31887/DCNS.2010.12.3/mlambert.
- Lancaster, T. M., Heerey, E. A., Mantripragada, K., & Linden, D. E. J. (2014). CACNA1C risk variant affects reward responsiveness in healthy individuals. *Translational Psychiatry*, *4*(10), e461-e461. doi:10.1038/tp.2014.100.
- Langwieser, N., Christel, C.J., Kleppisch, T., Hofmann, F., Wotjak, C.T. & Moosmang, S. (2010). Homeostatic switch in Hebbian plasticity and fear learning after sustained loss of Cav1.2 calcium channels. *Journal of Neuroscience* *30*(25), 8367–8375. doi:10.1523/JNEUROSCI.4164-08.2010.

- Lee, A. S., De Jesús-Cortés, H., Kabir, Z. D., Knobbe, W., Orr, M., Burgdorf, C., Huntington, P., McDaniel, L., Britt, J. K., Hoffmann, F., Brat, D. J., Rajadhyaksha, A. M., & Pieper, A. A. (2016). The neuropsychiatric disease-associated gene *Cacna1c* mediates survival of young hippocampal neurons. *eNeuro*, *3*(2), ENEURO.0006-16.2016. doi:10.1523/ENEURO.0006-16.2016.
- Lee, A. S., Ra, S., Rajadhyaksha, A. M., Britt, J. K., De Jesus-Cortes, H., Gonzales, K. L., Lee, A., Moosmang, S., Hofmann, F. & Pieper, A.A. (2012). Forebrain elimination of *CACNA1C* mediates anxiety-like behavior in mice. *Molecular Psychiatry*, *17*(11), 1054–1055. doi:10.1038/mp.2012.71.
- Leyton, M., Boileau, I., Benkelfat, C., Diksic, M., Baker, G. & Dagher, A. (2002). Amphetamine-induced increases in extracellular dopamine, drug wanting, and novelty seeking: a PET/[¹¹C]raclopride study in healthy men. *Neuropsychopharmacology* *27*(6), 1027–1035. doi:10.1016/S0893-133X(02)00366-4.
- Li, J., Zhao, L., You, Y., Lu, T., Jia, M., Yu, H., ... Wang, L. (2015). Schizophrenia related variants in *CACNA1C* also confer risk of autism. *PLoS ONE*, *10*(7), e0133247. doi:10.1371/journal.pone.0133247.
- Liao, P., Soong, T. W. (2010). CaV1.2 channelopathies: From arrhythmias to autism, bipolar disorder, and immunodeficiency. *Pflugers Arch Eur J Physiol* *460*(2), 353–359. doi:10.1007/s00424-009-0753-0.
- Licata, S. C., Freeman, A. Y., Pierce-Bancroft, A. F., & Pierce, R. C. (2000). Repeated stimulation of L-type calcium channels in the rat ventral tegmental area mimics the initiation of behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacology*, *152*(1), 110-118. doi:10.1007/s002130000518.
- Lieberman, J. A., Kane, J. M. & Alvir, J. (1987). Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology* *91*(4), 415–433. doi:10.1007/BF00216006.
- Litvin, Y., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2007). Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behavioural Brain Research*, *182*(2), 166-172. doi:10.1016/j.bbr.2006.11.038.
- Lomanowska, A. M., Lovic, V., Rankine, M. J., Mooney, S. J., Robinson, T. E., & Kraemer, G. W. (2011). Inadequate early social experience increases the incentive salience of reward-related cues in adulthood. *Behavioral Brain Research* *220*(1), 91–99. doi:10.1016/j.bbr.2011.01.033.
- Lovic, V., Saunders, B. T., Yager, L. M., & Robinson, T. E. (2011). Rats prone to attribute incentive salience to reward cues are also prone to impulsive action. *Behavioural Brain Research*, *223*(2), 255-261. doi:10.1016/j.bbr.2011.04.006.

- Luthi, A. & Luscher, C. (2014). Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders. *Nature Neuroscience* 17(12), 1635–1643. doi:10.1038/nn.3849.
- Mallas, E.-J., Carletti, F., Chaddock, C. a, Woolley, J., Picchioni, M. M., Shergill, S. S., ... Prata, D. P. (2016). Genome-wide discovered psychosis-risk gene ZNF804A impacts on white matter microstructure in health, schizophrenia and bipolar disorder. *PeerJ*, 4, e1570. doi:10.7717/peerj.1570.
- McGrath, J., Saha, S., Chant, D., & Welham, J. (2008). Schizophrenia: A concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiologic Reviews*, 30, 67–76. doi:10.1093/epirev/mxn001.
- McGuffin, P., Katz, R., Watkins, S., & Rutherford, J. (1996). A hospital-based twin register of the heritability of DSM-IV unipolar depression. *Archives of General Psychiatry*, 53(2), 129-136. doi:10.1001/archpsyc.1996.01830020047006.
- McGuffin, P., Rijdsdijk, F., Andrew, M., Sham, P., Katz, R., & Cardno, A. (2003). The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Archives of General Psychiatry*, 60(5), 497–502. doi:10.1001/archpsyc.60.5.497.
- McTavish, S., McPherson, M., Harmer, C., Clark, L., Sharp, T., Good-win, G. & Cowen, P. (2001) Antidopaminergic effects of dietary tyrosine depletion in healthy subjects and patients with manic illness. *British Journal of Psychiatry* 179, 356–360. doi:10.1192/bjp.179.4.356.
- Melendez, R. I., Lee Gregory, M., Bardo, M. T., & Kalivas, P. W. (2004). Impoverished rearing environment alters metabotropic glutamate receptor expression and function in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 29(11), 1980-1987. doi:10.1038/sj.npp.1300507.
- Meotti, F. C., Luiz, A. P., Pizzolatti, M. G., Kassuya, C. A., Calixto, J. B., & Santos, A. R. (2006). Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 789-796. doi:10.1124/jpet.105.092825.
- Meyer, P. J., Lovic, V., Saunders, B. T., Yager, L. M., Flagel, S. B., Morrow, J. D., & Robinson, T. E. (2012). Quantifying individual variation in the propensity to attribute incentive salience to reward cues. *PLoS One*, 7(6), e38987. doi:10.1371/journal.pone.0038987.
- Meyer-Lindenberg, A., & Weinberger, D. R. (2006). Intermediate phenotypes and genetic mechanisms of psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(10), 818-827. doi:10.1038/nrn1993.

- Meyer-Lindenberg, A., Tost, H. (2012). Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 15(5), 663–668. doi:10.1038/nrn.3083.
- Millan, M.J., Agid, Y., Brune, M., Bullmore, E.T., Carter, C.S., Clayton, N.S., Connor, R., Davis, S., Deakin, B., DeRubeis, R.J., Dubois, B., Geyer, M.A., Goodwin, G.M., Gorwood, P., Jay, T.M., Joels, M., Mansuy, I.M., Meyer-Lindenberg, A., Murphy, D., Rolls, E., Saletu, B., Spedding, M., Sweeney, J., Whittington, M. & Young, L.J. (2012). Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nature Review of Drug Discovery* 11(2), 141–168. doi:10.1038/nrd3628.
- Miró, X., Meier, S., Dreisow, M. L., Frank, J., Strohmaier, J., Breuer, R., ... & Zimmer, A. (2012). Studies in humans and mice implicate neurocan in the etiology of mania. *American Journal of Psychiatry*, 169(9), 982-990. doi:10.1176/appi.ajp.2012.11101585.
- Mogil, J. S. (2019). Mice are people too: Increasing evidence for cognitive, emotional and social capabilities in laboratory rodents. *Canadian Psychology/Psychologie Canadienne*, 60(1), 14–20. doi:10.1037/cap000016.
- Möller, H.-J., Jäger, M., Riedel, M., Obermeier, M., Strauss, A., & Bottlender, R. (2011). The Munich 15-year follow-up study (MUFUSSAD) on first-hospitalized patients with schizophrenic or affective disorders: Assessing courses, types and time stability of diagnostic classification. *The Journal of the Association of European Psychiatrists*, 26(4), 231–243. doi:10.1016/j.eurpsy.2010.04.012.
- Moon, A.L., Haan, N., Wilkinson, L.S., Thomas, K.L., Hall, J. (2018) CACNA1C: Association With Psychiatric Disorders, Behavior, and Neurogenesis. *Schizophrenia Bulletin* 44(5), 958–965. doi:10.1093/schbul/sby096.
- Moosmang, S., Haider, N., Klugbauer, N., Adelsberger, H., Langwieser, N., Müller, J., Stuessi, M., Marais, E., Schulla, V., Lacinova, L., Goebbels, S., Nave, K. A., Storm, D. R., Hofmann, F., & Kleppisch, T. (2005). Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *The Journal of Neuroscience*, 25(43), 9883–9892. doi:10.1523/JNEUROSCI.1531-05.2005.
- Moskvina, V., Craddock, N., Holmans, P., Nikolov, I., Pahwa, J.S., Green, E., Owen, M.J., O'Donovan, M.C. (2009). Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Molecular Psychiatry* 14(3), 252–260. doi:10.1038/mp.2008.133.

- Mulvihill, K. G., & Brudzynski, S. M. (2018). Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: Social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. *Physiology & Behavior*, *196*, 200–207. doi:10.1016/j.physbeh.2018.09.005.
- Mulvihill, K. G., & Brudzynski, S. M. (2019). Effect of microinjections of dopamine into the nucleus accumbens shell on emission of 50 kHz USV: Comparison with effects of d-amphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *176*, 23-32. doi:10.1016/j.pbb.2018.11.006.
- Murphy, D.L., Brodie, H.K., Goodwin, F.K. & Bunney, W.E. Jr. (1971). Regular induction of hypomania by L-dopa in "bipolar" manic-depressive patients. *Nature* *229(5280)*, 135–136. doi:10.1038/229135a0.
- Natusch, C., & Schwarting, R. K. W. (2010). Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *96(3)*, 251-259. doi:10.1016/j.pbb.2010.05.013.
- Nestler, E.J. & Carlezon, W.A. Jr. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry* *59(12)*, 1151–1159. doi:10.1016/j.biopsych.2005.09.018.
- Niikura, Y., Abe, K., & Misawa, M. (2004). Involvement of L-type Ca²⁺ channels in the induction of long-term potentiation in the basolateral amygdala-dentate gyrus pathway of anesthetized rats. *Brain Research*, *1017(1-2)*, 218-221. doi:10.1016/j.brainres.2004.04.064.
- Nyegaard, M., Demontis, D., Foldager, L., Hedemand, A., Flint, T.J., Sørensen, K.M., Andersen, P.S., Nordentoft, M., Werge, T., Pedersen, C.B., Hougaard, D.M., Mortensen, P.B., Mors, O., Børglum, A.D. (2010). CACNA1C (rs1006737) is associated with schizophrenia. *Molecular Psychiatry* *15(2)*, 119–121. doi:10.1038/mp.2009.69.
- Obermair, G. J., Tuluc, P., & Flucher, B. E. (2008). Auxiliary Ca(2+) channel subunits: Lessons learned from muscle. *Current Opinion in Pharmacology*, *8(3)*, 311–318. doi:10.1016/j.coph.2008.01.008.
- O'Donovan, M. C., & Owen, M. J. (2016). The implications of the shared genetics of psychiatric disorders. *Nature Medicine*, *22(11)*, 1214-1219. doi:10.1038/nm.4196.
- Okita, M., Watanabe, Y., Taya, K., Utsumi, H., & Hayashi, T. (2000). Presynaptic L-type Ca²⁺ channels on excessive dopamine release from rat caudate putamen. *Physiology & Behavior*, *68(5)*, 641-649. doi:10.1016/s0031-9384(99)00227-9.

- Otte, C., Gold, S. M., Penninx, B. W. J. H., Pariante, C. M., Etkin, A., Fava, M., Mohr, D. C., & Schatzberg, A. F. (2016). Major depressive disorder. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16065. doi:10.1038/nrdp.2016.65
- Panitz, C., Endres, D. M., Buchholz, M., Khosrowtaj, Z., Sperl, M. F., Mueller, E. M., ... & Pinquart, M. (2021). A revised framework for the investigation of expectation update versus maintenance in the context of expectation violations: the ViolEx 2.0 model. *Frontiers in Psychology* 12, 726432. doi:10.3389/fpsyg.2021.726432.
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behavioural Brain Research*, 115(1), 25-38. doi:10.1016/s0166-4328(00)00238-2.
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2003). "Laughing" rats and the evolutionary antecedents of human joy?. *Physiology & Behavior*, 79(3), 533-547. doi:10.1016/s0031-9384(03)00159-8.
- Paolone, G., Angelakos, C. C., Meyer, P. J., Robinson, T. E., & Sarter, M. (2013). Cholinergic control over attention in rats prone to attribute incentive salience to reward cues. *Journal of Neuroscience*, 33(19), 8321–8335. doi:10.1523/JNEUROSCI.0709–13.2013.
- Parker, G., McCraw, S., Tavella, G., & Hadzi-Pavlovic, D. (2018). Measuring the consequences of a bipolar or unipolar mood disorder and the immediate and ongoing impacts. *Psychiatry Research*, 269, 70–74. doi:10.
- Pechtel, P., Dutra, S. J., Goetz, E. L., & Pizzagalli, D. A. (2013). Blunted reward responsiveness in remitted depression. *Journal of Psychiatric Research*, 47(12), 1864-1869. doi:10.1016/j.jpsychires.2013.08.011.
- Pereira, M., Andreatini, R., Schwarting, R. K., & Brenes, J. C. (2014). Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: A marker of affect in mania?. *Psychopharmacology*, 231(13), 2567-2577. doi:10.1007/s00213-013-3413-1.
- Perlis, R.H., Welge, J.A., Vornik, L.A., Hirschfeld, R.M. & Keck, P.E.Jr. (2006). Atypical antipsychotics in the treatment of mania: ameta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Journal of Clinical Psychiatry* 67(4), 509–516. doi:10.4088/jcp.v67n0401.
- Perrier, E., Pompei, F., Ruberto, G., Vassos, E., Collier, D., & Frangou, S. (2011). Initial evidence for the role of CACNA1C on subcortical brain morphology in patients with bipolar disorder. *European Psychiatry*, 26(3), 135–137. doi:10.1016/j.eurpsy.2010.10.004.

- Peters, J. & Buchel, C. (2009). Overlapping and distinct neural systems code for subjective value during intertemporal and risky decision making. *Journal of Neuroscience* 29(50), 15727–15734. doi:10.1523/JNEUROSCI.3489-09.2009.
- Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(2), 215-238. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.04.016.
- Pitchers, K. K., Flagel, S. B., O'Donnell, E. G., Woods, L. C. S., Sarter, M., & Robinson, T. E. (2015). Individual variation in the propensity to attribute incentive salience to a food cue: Influence of sex. *Behavioural Brain Research*, 278, 462-469. doi:10.1016/j.bbr.2014.10.036.
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(1), 28-34.
- Portfors, C. V., & Perkel, D. J. (2014). The role of ultrasonic vocalizations in mouse communication. *Current Opinion in Neurobiology*, 28, 115-120. doi:10.1016/j.conb.2014.07.002.
- Post, R. M., & Kalivas, P. (2013). Bipolar disorder and substance misuse: pathological and therapeutic implications of their comorbidity and cross-sensitisation. *The British Journal of Psychiatry*, 202(3), 172-176. doi:10.1192/bjp.bp.112.116855.
- Rahman, S., & Bardo, M.T. (2008). Environmental enrichment increases amphetamine-induced glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens: A neurochemical study. *Brain Research*, 1197, 40-46. doi:10.1016/j.brainres.2007.12.052.
- Rajadhyaksha, A., Husson, I., Satpute, S.S., Kuppenbender, K.D., Ren, J.Q., Guerriero, R.M., Standaert, D.G. & Kosofsky, B.E. (2004). L-type Ca²⁺ channels mediate adaptation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in the ventral tegmental area after chronic amphetamine treatment. *Journal of Neuroscience* 24(34), 7464–7476. doi:10.1523/JNEUROSCI.0612-04.2004.
- Rajadhyaksha, A.M. & Kosofsky, B.E. (2005). Psychostimulants, L-type calcium channels, kinases, and phosphatases. *Neuroscientist* 11(5), 494–502. doi:10.1177/1073858405278236.
- Rakofsky, J., & Rapaport, M. (2018). Mood disorders. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 24(3), 804-827. doi:10.1212/CON.0000000000000604.

- Redecker, T. M., Kisko, T. M., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2019). Effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats. *Behavioural Brain Research*, *367*, 35-52. doi:10.1016/j.bbr.2019.03.032.
- Rescorla, R. A. (1988). Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. *American Psychology* *43*(3), 151–160. doi:10.1037//0003-066x.43.3.151.
- Richards, D. (2011). Prevalence and clinical course of depression: A review. *Clinical Psychology Review*, *31*(7), 1117-1125. doi:10.1016/j.cpr.2011.07.004.
- Ridderinkhof, K. R., van den Wildenberg, W. P., Segalowitz, S. J., & Carter, C. S. (2004). Neurocognitive mechanisms of cognitive control: the role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain Cognition*, *56*(2), 129–140. doi:10.1016/j.bandc.2004.09.016.
- Rief, W., Glombiewski, J. A., Gollwitzer, M., Schubö, A., Schwarting, R., & Thorwart, A. (2015). Expectancies as core features of mental disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, *28*(5), 378–385. doi:10.1097/YCO.0000000000000184.
- Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium (2011). Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature Genetics*, *43*(10), 969–976. doi:10.1038/ng.940.
- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T. R., Farh, K.-H., Holmans, P. a., ... O'Donovan, M. C. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, *511*, 421-427. doi:10.1038/nature13595.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain research. Brain Research Reviews*, *18*(3), 247–291. doi:10.1016/0165-0173(93)90013-p.
- Robinson, T. E., & Flagel, S. B. (2009). Dissociating the predictive and incentive motivational properties of reward-related cues through the study of individual differences. *Biological Psychiatry*, *65*(10), 869-873. doi:10.1016/j.biopsych.2008.09.006.
- Robinson, T. E., Yager, L. M., Cogan, E. S., & Saunders, B. T. (2014). On the motivational properties of reward cues: Individual differences. *Neuropharmacology*, *76 Pt B*, 450–459. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.05.040.
- Roussos, P., Mitchell, A. C., Voloudakis, G., Fullard, J. F., Pothula, V. M., Tsang, J., Stahl, E. A., Georgakopoulos, A., Ruderfer, D. M., Charney, A., Okada, Y., Siminovitch, K. A., Worthington,

- J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Plenge, R. M., Raychaudhuri, S., Fromer, M., Purcell, S. M., ... Sklar, P. (2014). A role for noncoding variation in schizophrenia. *Cell Reports*, *9*(4), 1417–1429. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.015.
- Russo, S.J. & Nestler, E.J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Review Neuroscience* *14*(9),609–625. doi:10.1038/nrn3381.
- Ryding, E., Lindström, M. & Träskman-Bendz, L. (2008). The role of dopamine and serotonin in suicidal behaviour and aggression. *Progress in Brain Research* *172*, 307–315. doi:10.1016/S0079-6123(08)00915-1.
- Salamone, J.D., Pardo, M., Yohn, S.E., Lopez-Cruz, L., SanMiguel, N. & Correa, M. (2016). Mesolimbic dopamine and the regulation of motivated behavior. *Current Topics in Behavioral Neuroscience* *27*, 231–257. doi:10.1007/7854_2015_383.
- Sales, G. D. (1972). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Animal Behaviour*, *20*(1), 88-100. doi:10.1016/s0003-3472(72)80177-5.
- Sanchez-Moreno, J., Martinez-Aran, A., Tabarés-Seisdedos, R., Torrent, C., Vieta, E., & Ayuso-Mateos, J. L. (2009). Functioning and Disability in Bipolar Disorder: An Extensive Review. *Psychotherapy and Psychosomatics*, *78*(5), 285–297. doi:10.1159/000228249.
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Hultman, C., Larsson, H., Reichenberg, A. (2017). The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA* *318*(12), 1182-1184. doi:10.1001/jama.2017.12141.
- Sarter, M., & Phillips, K. B. (2018). The neuroscience of cognitive-motivational styles: Sign- and goal-trackers as animal models. *Behavioral Neuroscience*, *132*(1), 1–12. doi:10.1037/bne0000226.
- Saunders, B. T., & Robinson, T. E. (2011). Individual variation in the motivational properties of cocaine. *Neuropsychopharmacology*, *36*(8), 1668–1676. doi:10.1038/npp.2011.48.
- Saunders, B. T., & Robinson, T. E. (2012). The role of dopamine in the accumbens core in the expression of Pavlovian-conditioned responses. *European Journal of Neuroscience*, *36*(4), 2521–2532. doi:10.1111/j.1460–9568.2012.08217.x.
- Saunders, B. T., & Robinson, T. E. (2013). Individual variation in resisting temptation: Implications for addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Review* *37*(9), 1955–1975. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.02.008.

- Schierberl KC, Lee AS, Moosmang S, Hofmann F, Striessnig J & Rajadhyaksha AM (2011). Cav1.2 L-type Ca²⁺ channels regulate cocaine reward via epigenetic regulation of BDNF. *Program No. 909.09. Neuroscience 2011 Meeting Planner. Society for Neuroscience, Washington, DC, USA. Online.*
- Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. (2011). Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature Genetics, 43*, 969-976. doi:10.1038/ng.940.
- Schlick, B., Flucher, B.E., Obermair, G.J. (2010). Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience 167(3)*, 786–798. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.037.
- Schwarting, R. K., Jegan, N., & Wöhr, M. (2007). Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behavioural Brain Research, 182(2)*, 208-222. doi:10.1016/j.bbr.2007.01.029.
- Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R.K.W., Wöhr, M. (2015). Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments—phenotypic rescue by re-socialization. *Frontiers Behavioral Neuroscience 9*, 102. doi:10.3389/fnbeh.2015.00102.
- Seffer, D., Schwarting, R.K.W., Wöhr, M. (2014). Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *Journal of Neuroscience Methods 234*, 73–81. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.01.023.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kühbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., Hofmann, F. (2000). Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type $\alpha 1C$ (Cav1.2) Calcium Channel Gene in the Mouse. *Journal of Biological Chemistry 275(50)*, 39193–39199. doi:10.1074/jbc.M006467200.
- Sekhon, S., & Gupta, V. (2022). Mood Disorder. *In StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Sewell, G. D. (1970). Ultrasonic communication in rodents. *Nature, 227(5256)*, 410-410. doi:10.1038/227410a0
- Shin, L. M., & Liberzon, I. (2010). The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology, 35(1)*, 169–191. doi:10.1038/npp.2009.83.

- Shinnick-Gallagher, P., McKernan, M. G., Xie, J., & Zinebi, F. (2003). L-type voltage-gated calcium channels are involved in the in vivo and in vitro expression of fear conditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *985*, 135–149. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07078.x.
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 490–502. doi:10.1038/nrn2851.
- Simon, G. E. (2003). Social and economic burden of mood disorders. *Biological Psychiatry*, *54*(3), 208–215. doi:10.1016/S0006-3223(03)00420-7 1016/j.psychres.2018.08.022.
- Singewald, N., Schmuckermair, C., Whittle, N., Holmes, A., & Ressler, K. J. (2015). Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, *149*, 150-190. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.12.004.
- Sinnesger-Brauns, M. J., Huber, I. G., Koschak, A., Wild, C., Obermair, G. J., Einzinger, U., ... Striessnig, J. (2009). Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Molecular Pharmacology*, *75*(2), 407–414. doi:10.1124/mol.108.049981.
- Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature Genetics*, *43*(10), 977–983. doi:10.1038/ng.943.
- Sklar, P., Smoller, J. W., Fan, J., Ferreira, M. A. R., Perlis, R. H., Chambert, K., ... & Purcell, S. M. (2008). Whole-genome association study of bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, *13*(6), 558-569. doi:10.1038/sj.mp.4002151.
- Small, S. A., Schobel, S. A., Buxton, R. B., Witter, M. P., & Barnes, C. A. (2011). A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(10), 585-601. doi:10.1038/nrn3085.
- Smoller, J. W., & Finn, C. T. (2003). Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics*, *123C*(1), 48–58. doi:10.1002/ajmg.c.20013.
- Somers, L. A., Beyene, M., Carelli, R. M., & Wightman, R. M. (2009). Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*, *29*(6), 1735-1742. doi:10.1523/JNEUROSCI.5562-08.2009.

- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., ... Keating, M. T. (2004). CaV1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell*, *119*(1), 19–31. doi:10.1016/j.cell.2004.09.011.
- Splawski, I., Timothy, K. W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F. B., Beggs, A. H., Sanguinetti, M. C., & Keating, M. T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(23), 8089–8096. doi:0.1073/pnas.0502506102.
- Stairs, D. J., & Bardo, M. T. (2009). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *92*(3), 377-382. doi:10.1016/j.pbb.2009.01.016.
- Steel, Z., Marnane, C., Iranpour, C., Chey, T., Jackson, J.W., Patel, V., Silove, D. (2014). The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980– 2013. *International Journal of Epidemiology* *43*(2), 476–493. doi:10.1093/ije/dyu038.
- Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., & Tuluc, P. (2014). L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane Transport and Signaling*, *3*(2), 15–38. doi:10.1002/wmts.102.
- Stringfield, S. J., Boettiger, C. A., & Robinson, D. L. (2018). Nicotine-enhanced Pavlovian conditioned approach is resistant to omission of expected outcome. *Behavioural Brain Research*, *343*, 16-20. doi:10.1016/j.bbr.2018.01.023.
- Stringfield, S. J., Palmatier, M. I., Boettiger, C. A., & Robinson, D. L. (2017). Orbitofrontal participation in sign- and goal-tracking conditioned responses: Effects of nicotine. *Neuropharmacology*, *116*, 208–223. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.12.020.
- Sullivan, P. F., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *The American Journal of Psychiatry*, *157*(10), 1552–1562. doi:10.1176/appi.ajp.157.10.1552.
- Sykes, L., Haddon, J., Lancaster, T. M., Sykes, A., Azzouni, K., Ihssen, N., Moon, A. L., Lin, T. E., Linden, D. E., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Humby, T., Wilkinson, L. S., Thomas, K. L., & Hall, J. (2019). Genetic variation in the psychiatric risk gene CACNA1C modulates reversal learning across species. *Schizophrenia Bulletin*, *45*(5), 1024–1032. doi:10.1093/schbul/sby146.
- Takeuchi, H., Tomita, H., Taki, Y., Kikuchi, Y., Ono, C., Yu, Z., Nouchi, R., Yokoyama, R., Kotozaki, Y., Nakagawa, S., Sekiguchi, A., Iizuka, K., Hanawa, S., Araki, T., Miyauchi, C. M., Sakaki, K., Nozawa,

- T., Ikeda, S., Yokota, S., Magistro, D., ... Kawashima, R. (2019). A Common CACNA1C Gene Risk Variant has Sex-Dependent Effects on Behavioral Traits and Brain Functional Activity. *Cerebral Cortex*, *29*(8), 3211–3219. doi:10.1093/cercor/bhy189.
- Tang, Z. Z., Liang, M. C., Lu, S., Yu, D., Yu, C. Y., Yue, D. T., & Soong, T. W. (2004). Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human L-type voltage-gated calcium channel, Cav1.2 α 1 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 44335-44343. doi:10.1074/jbc.M407023200.
- Taracha, E., Hamed, A., Krząścik, P., Lehner, M., Skórzewska, A., Płaźnik, A., & Chrapusta, S. J. (2012). Inter-individual diversity and intra-individual stability of amphetamine-induced sensitization of frequency-modulated 50-kHz vocalization in Sprague–Dawley rats. *Psychopharmacology*, *222*(4), 619-632. doi:10.1007/s00213-012-2658-4.
- Terrillion, C. E., Dao, D. T., Cachope, R., Lobo, M. K., Puche, A. C., Cheer, J. F., & Gould, T. D. (2017). Reduced levels of Cacna1c attenuate mesolimbic dopamine system function. *Genes, Brain and Behavior*, *16*(5), 495-505. doi:10.1111/gbb.12371.
- Thompson, B., Leonard, K., & Brudzyński, S.M. (2006). Amphetamine-induced 50-kHz calls from rat nucleus accumbens: A quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behavioural Brain Research*, *168*(1), 64-73. doi:10.1016/j.bbr.2005.10.012.
- Tomie, A., Grimes, K. L., & Pohorecky, L. A. (2008). Behavioral characteristics and neurobiological substrates shared by Pavlovian sign-tracking and drug abuse. *Brain Research Reviews* *58*(1), 121–135. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.12.003.
- Tomie, A., Tirado, A. D., Yu, L., & Pohorecky, L. A. (2004). Pavlovian autoshaping procedures increase plasma corticosterone and levels of norepinephrine and serotonin in prefrontal cortex in rats. *Behavioral Brain Research*, *153*(1), 97–105. doi:10.1016/j.bbr.2003.11.006.
- Tripi, J. A., Dent, M. L., & Meyer, P. J. (2017). Individual differences in food cue responsivity are associated with acute and repeated cocaine-induced vocalizations, but not cue-induced vocalizations. *Psychopharmacology*, *234*(3), 437-446. doi:10.1007/s00213-016-4476-6.
- Uitterlinden, A. G. (2016). An Introduction to Genome-Wide Association Studies: Gwas for Dummies. *Seminars in Reproductive Medicine*, *34*(4), 196–204. doi:10.1055/s-0036-1585406.
- Van der Poel, A. M., Noach, E. J. K., & Miczek, K. A. (1989). Temporal patterning of ultrasonic distress calls in the adult rat: Effects of morphine and benzodiazepines. *Psychopharmacology*, *97*(2), 147-148. doi:10.1007/BF00442236.

- Wang, F., McIntosh, A. M., He, Y., Gelernter, J., & Blumberg, H. P. (2011). The association of genetic variation in CACNA1C with structure and function of a frontotemporal system. *Bipolar Disorders*, *13*(7–8), 696–700. doi:10.1111/j.1399-5618.2011.00963.x.
- White, J.A., McKinney, B.C., John, M.C., Powers, P., Kamp, T.J., Murphy, G.G. (2008). Conditional forebrain deletion of the L-type calcium channel Ca V 1.2 disrupts remote spatial memories in mice. *Learning and Memory* *15*(1), 1–5. doi:10.1101/lm.773208.
- Whitton, A. E., Treadway, M. T., & Pizzagalli, D. A. (2015). Reward processing dysfunction in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*, *28*(1), 7-12. doi:10.1097/YCO.0000000000000122.
- Willey, A. R., & Spear, L. P. (2013). The effects of pre-test social deprivation on a natural reward incentive test and concomitant 50 kHz ultrasonic vocalization production in adolescent and adult male Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, *245*, 107-112. doi:10.1016/j.bbr.2013.02.020.
- Willuhn, I., Tose, A., Wanat, M. J., Hart, A. S., Hollon, N. G., Phillips, P. E., Schwarting R. K., & Wöhr, M. (2014). Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Journal of Neuroscience*, *34*(32), 10616-10623. doi:10.1523/JNEUROSCI.1060-14.2014.
- Witt, S. H., Kleindienst, N., Frank, J., Treutlein, J., Mühleisen, T., Degenhardt, F., Jungkunz, M., Krumm, B., Cichon, S., Tadic, A., Dahmen, N., Schwarze, C. E., Schott, B., Dietl, L., Nöthen, M. M., Mobascher, A., Lieb, K., Roepke, S., Rujescu, D., Rietschel, M., ... Bohus, M. (2014). Analysis of genome-wide significant bipolar disorder genes in borderline personality disorder. *Psychiatric Genetics*, *24*(6), 262–265. doi:10.1097/YPG.0000000000000060.
- Wöhr, M. (2021). Measuring mania-like elevated mood through amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *British Journal of Pharmacology*, 10.1111/bph.15487. doi:10.1111/bph.15487.
- Wöhr, M., & Scattoni, M. L. (2013). Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: Current standards and new developments. *Behavioural Brain Research*, *251*, 5–17. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.047.
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2013). Affective communication in rodents: Ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell and Tissue Research*, *354*(1), 81-97. doi:10.1007/s00441-013-1607-9.

- Wöhr, M., Borta, A., & Schwarting, R. K. (2005). Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose–response study in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*(3), 228-240. doi:10.1016/j.nlm.2005.07.004.
- Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K., & Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology & Behavior*, *93*(4-5), 766-776. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.031.
- Wöhr, M., Kisko, T. M., & Schwarting, R. K. (2021). Social behavior and ultrasonic vocalizations in a genetic rat model haploinsufficient for the cross-disorder risk gene *Cacna1c*. *Brain Sciences*, *11*(6), e724. doi:10.3390/brainsci11060724.
- Wöhr, M., Rippberger, H., Schwarting, R. K., & van Gaalen, M. M. (2015). Critical involvement of 5-HT_{2C} receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Psychopharmacology*, *232*(10), 1817-1829. doi:10.1007/s00213-014-3814-9.
- Wöhr, M., Schwarting, R.K.W. (2007). Ultrasonic Communication in Rats: Can Playback of 50- kHz Calls Induce Approach Behavior?. *PLoS One* *2*(12), e1365. doi:10.1371/journal.pone.0001365.
- Wright, J. M., Dobosiewicz, M. R., & Clarke, P. (2013). The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in amphetamine-induced rat ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology*, *225*(4), 853-868. doi:10.1007/s00213-012-2871-1.
- Wright, J.M., Gourdon, J.C., Clarke, P.B.S. (2010). Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology* *211*(1), 1–13. doi:10.1007/s00213-010-1859-y.
- Yager, L. M., Pitchers, K. K., Flagel, S. B., & Robinson, T. E. (2015). Individual variation in the motivational and neurobiological effects of an opioid cue. *Neuropsychopharmacology*, *40*(5), 1269–1277. doi:10.1038/npp.2014.314.
- Yager, L. M., & Robinson, T. E. (2010). Cue-induced reinstatement of food seeking in rats that differ in their propensity to attribute incentive salience to food cues. *Behavioral Brain Research* *214*(1), 30–34. doi:10.1016/j.bbr.2010.04.021.
- Yee, N., Schwarting, R. K., Fuchs, E., & Wöhr, M. (2012). Juvenile stress potentiates aversive 22-kHz ultrasonic vocalizations and freezing during auditory fear conditioning in adult male rats. *Stress*, *15*(5), 533-544. doi:10.3109/10253890.2011.646348.

- Zakharova, E., Miller, J., Unterwald, E., Wade, D., & Izenwasser, S. (2009). Social and physical environment alter cocaine conditioned place preference and dopaminergic markers in adolescent male rats. *Neuroscience*, *163*(3), 890-897. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.06.068. Epub 2009 Jul 4.
- Zamponi, G. W. (2016). Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *15*(1), 19–34. doi:10.1038/nrd.2015.5.
- Zanos, P., Bhat, S., Terrillion, C.E., Smith, R.J., Tonelli, L.H., Gould, T.D. (2015). Sex-dependent modulation of age-related cognitive decline by the L-type calcium channel gene *Cacna1c* (*Cav1.2*). *European Journal of Neuroscience* *42*(8), 2499–2507. doi:10.1111/ejn.12952.
- Zarate, C. A., & Manji, H. K. (2009). Protein kinase C inhibitors. *CNS drugs*, *23*(7), 569-582. doi:10.1016/j.drudis.2014.05.008.
- Zhang, X.F., Cooper, D.C. & White, F.J. (2002). Repeated cocaine treatment decreases whole-cell calcium current in rat nucleus accumbens neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* *301*(3), 1119–1125. doi:10.1124/jpet.301.3.1119.
- Zhu, J., Apparsundaram, S., Bardo, M. T., & Dwoskin, L. P. (2005). Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry*, *93*(6), 1434-1443. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03130.x.
- Zhu, J., Green, T., Bardo, M. T., & Dwoskin, L. P. (2004). Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, *148*(1-2), 107-117. doi:10.1016/s0166-4328(03)00190-6.
- Zuccotti, A., Clementi, S., Reinbothe, T., Torrente, A., Vandael, D. H., & Pirone, A. (2011). Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting. *Trends in Pharmacological Sciences*, *32*(6), 366-375. doi:10.1016/j.tips.2011.02.012.

XI. Anhang

i. Nomenklatur

<i>CACNA1C</i>	Symbol für das Gen in Menschen
<i>Cacna1c</i>	Symbol für das Gen bei Tiermodellen
<i>Cacna1c^{+/+}</i>	Wildtyp Tier mit vollständiger Kopie des <i>Cacna1c</i> auf beiden Allelen
<i>Cacna1c^{+/-}</i>	Heterozygotes Tier mit <i>Cacna1c</i> -Deletion auf einem Allel

ii. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung und/oder Übersetzung
ACh	Acetylcholine
Amy	Amygdala
Bp	Basenpaar
BPD	Bipolare Störung (engl. „bipolar disorder“)
ASD	Autismus-Spektrum-Störung (engl. „autism spectrum disorder“)
Ca _v 1.2	Spannungs-gesteuerter Calciumkanal 1.2
CS	Konditionierter Stimulus (engl. „conditioned stimulus“)
DA	Dopamin
DAT	Dopamin Transporter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „desoxyribonucleic acid“)
DOPAC	3,4,-Dihydroxyphenylelessigsäure
DSM-5	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen 5 (engl. „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5“)
FM	Frequenzmoduliert
GT	Goal-Tracker; Goal-Tracking
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie

HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
LHYP	Lateraler Hypothalamus
LTCC	L-Typ spannungs-gesteuerter Kalziumkanal (engl. „L-type voltage-gated calcium channel“)
MDD	Majore Depression (engl. „major depressive disorder“)
mPFC	Medialer präfrontaler Kortex
mRNA	Boten-RNA (engl. „messenger RNA“)
NAc	Nucleus accumbens
PCA	Pawlowsche Annäherungskonditionierung (engl. „pavlovian conditioned approach task“)
PFC	Präfrontaler Kortex
PND	Postnatal Tag (engl. „postnatal day“)
PrL	Prelimbischer Kortex
PVT	Paraventrikular Nucleus vom Thalamus
SAT	Aufmerksamkeitsaufgabe (engl. „sustained attention task“)
SCZ	Schizophrenie
SD	Sprague-Dawley
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. „single nucleotid polymorphism“)
ST	Sign-Tracker; Sign-Tracking
TS	Timothy-Syndrom
US	Unkonditionierter Stimulus (engl. „unconditioned stimulus“)
USV	Ultraschallvokalisation
VP	Ventrales Pallidum
VTA	Ventrales tegmentales Areal
ZNS	Zentrales Nervensystem

iii. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sign- (links) und Goal-Tracker (rechts) während der Ankündigung einer Futterlieferung durch einen sonst inoperablen Hebel (übernommen von Fligel et al., 2009).	8
Abbildung 2: Subtypen der 50-kHz Ultraschallvokalisationen. Spektrogramm mit repräsentativen Flat, Step, Trill und Mixed-Rufe von weiblichen <i>Cacna1c^{+/-}</i> Ratten während des Sign- und Goal-Paradigmas. (Eigene Illustration)	14
Abbildung 3: Studiendesign. Flow Chart mit der Darstellung der Vorgehensweise.	25
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hirnareale, die beim dopaminergen bottom- up und acetylcholinergen top-down Kontrolle im Sign- und Goal-Verhalten und bei der Emission von 50-kHz USV beteiligt sind. Die Abkürzungen stehen für folgende Areale: Amy-Amygdala, NAc-Nucleus accumbens, VP-Ventrales Pallidum, VTA-Ventrales tegmentales Areal, PrL-Prelimbischer Kortex, PVT-Paraventricular Nucleus vom Thalamus, LHYP-Lateraler Hypothalamus. (Eigene Illustration; Dargestellte Signalwege basieren auf: Ahrens et al., 2016b; Chang et al., 2012; Danna et al., 2013; DiFeliceantonio & Berridge, 2016; Fitzpatrick et al., 2016; Fligel et al., 2011; Haight et al., 2017; Stringfield et al., 2017; Yager et al., 2015)	62
Abbildung 5: Modifiziertes ViolEx 2.0-Modell von Panitz et al. (2021); Anpassung an das hier verwendete Sign- und Goal-Paradigma mit Kennzeichnung des Erwartungsprozesses während der fünftägigen PCA-Aufgabe (grün), der anschließenden zweitägigen Extinktion (rot) und der Beschreibung der individuellen Einflüsse in dem verwendeten Modell.	68

Danksagung

Ich möchte mich hier bei all denen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet, motiviert und unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Rainer Schwarting bedanken, der mir eine lehrreiche Zeit in der Verhaltensneurowissenschaft ermöglicht und mich in der akademischen Laufbahn stets unterstützt und motiviert hat. Ich hatte eine ausgezeichnete Betreuung und unsere Diskussionen haben meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich geprägt.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Markus Wöhr für seinen wissenschaftlichen Rat bei der Überwindung diverser Hürden und Mitbetreuung des Projekts.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Kollegen Dr. Theresa Kisko, Dr. Özge Sungur für Ihre wertvollen Ideen und Einarbeitung in Laborprozesse und Mitstreitern Annuska Berz, Maria Willadsen und Zahra Khosrowtaj für Ihren Austausch und Ermutigung bei Problemen. Sie alle und die ehemaligen und jetzigen Mitglieder der AG Schwarting haben die gesamte Zeit in Marburg einzigartig und unvergesslich-schön gestaltet.

Ebenfalls richte ich den studentischen Hilfskräften, vor allem Marek Ellenberger für seine Unterstützung bei der Datenanalyse und tatkräftige Unterstützung im Labor ein großes Dankeschön aus.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Dr. Metin Üngör für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Die wichtigsten Personen, die der Grund für das Überstehen der Höhen und Tiefen während des PhDs waren, sind meine Eltern Kamalathevy und Sriranjana Sangarapillai. Ohne Ihre ausnahmslose Unterstützung wäre all dies nicht möglich gewesen.

Erklärungen

Eigene Beiträge der Veröffentlichungen

Entsprechend §9 (1) der Promotionsordnung der Philipps-Universität Marburg werden im Folgenden die Anteile an den einzelnen Publikationen erläutert.

Studie 1: Ultrasonic vocalizations and individual differences in rats performing a Pavlovian conditioned approach task

Sangarapillai, N., Ellenberger, M., Wöhr, M., Schwarting, R.K.W. (2021) Ultrasonic vocalizations and individual differences in rats performing a Pavlovian conditioned approach task. *Behavioural Brain Research*, 389, 112926. <https://doi.org/10.1016/j.brr.2020.112926>

Verteilung der prozentualen Anteile:

- | | |
|----------------------------|------|
| ▪ Nivethini Sangarapillai: | 70 % |
| ▪ Marek Ellenberger: | 5 % |
| ▪ Markus Wöhr: | 10 % |
| ▪ Rainer Schwarting: | 15 % |

Studie 2: Appetitive 50-kHz calls in a Pavlovian conditioned approach task in Cacna1c haploinsufficient rats

Sangarapillai, N., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2022) Appetitive 50 kHz calls in a pavlovian conditioned approach task in Cacna1c haploinsufficient rats. *Physiology & Behavior*, 250, 113795. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113795>

Verteilung der prozentualen Anteile:

- | | |
|----------------------------|------|
| ▪ Nivethini Sangarapillai: | 80 % |
| ▪ Markus Wöhr: | 10 % |
| ▪ Rainer Schwarting: | 10 % |

Unterzeichnung des ersten Gutachters und der Verfasserin:

Prof. Dr. Rainer K.W. Schwarting

Nivethini Sangarapillai

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation:

„Ultraschallvokalisationen im Sign- und Goal-Paradigma und der Einfluss der *Cacna1c*-Haploinsuffizienz“

Selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, _____