

**Die neuronale Verschaltung
der thalamo-amygdalofugalen Projektion
zum cholinergen basalen Vorderhirn
(Substantia innominata)**

DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.),

genehmigt durch
die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplombiologe Eckbert Wilhelmi
geboren am 26. November 1966
in 58332 Schwelm

Gutachter: Prof. Dr. H.-C. Pape
Prof. Dr. G. Roth
Prof. Dr. H. Schwegler

eingereicht am: 26.06.2000

Verteidigung am: 06.12.2000

Danksagung

Herrn Professor Dr. Hans-Christian Pape danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die es mir ermöglichte meinen wissenschaftlichen Horizont zu erweitern und einen wichtigen Schritt für meinen weiteren Werdegang bedeutet. Seine Anregungen waren stets hilfreich und trugen zur Bereicherung dieser Arbeit bei.

Dank geht ebenfalls an meine Betreuerin Frau Dr. Ana de Lima. Ihre Expertise auf dem Gebiet der Histologie, Anatomie und Elektronenmikroskopie bildete die Grundlage zur Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. Rüdiger Linke gilt mein besonderer Dank. Seine Fachkompetenz und sein selbstloses Engagement trugen entscheidend zur Erstellung meiner Dissertation bei.

Frau Anja Reusch möchte ich danken für die Unterweisung in den durchgeführten histologischen Techniken und der sonstigen Laborarbeit. Ihre Hilfe bei den anfallenden „Routinearbeiten“ war eine Stütze bei der Sammlung und Auswertung der experimentellen Daten dieser Arbeit.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Brigitte Ketzler und Frau Sybille Röhl aus dem Institut für Anatomie danken, die mich ebenfalls zeitweilig bei meiner Laborarbeit unterstützten.

Dank gilt auch den Mitgliedern des Institutes für Physiologie, deren Hilfe, Kritik, und Anregung meine Arbeit unterstützte.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken, die die Auswirkungen meines „Doktorandendaseins“ ertragen mußte.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 426 „Limbische Strukturen und Funktionen“ Teilprojekt B4 finanziell unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....
1. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung emotional gefärbter Verhaltensreaktionen.....	1
1.2 Das limbische System als integrativer Bestandteil bei der Generierung emotional gefärbter Verhaltensreaktionen.....	2
1.3 Nomenklatur der Amygdala.....	6
1.4 Der Thalamus: subcorticale Station für die Vermittlung sensorischer Signale zur Amygdala.....	8
1.5 Das cholinerge basale Vorderhirn: Verbindungen mit der Amygdala.....	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Material und Methode.....	13
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	13
2.2 Substanzen	13
2.3 Versuchsdurchführung.....	14
2.3.1 Versuchsprotokoll eines neuroanatomischen Experimentes	14
2.3.2 Allgemeiner Versuchsablauf	14
2.4 In vivo Tracer-Injektion.....	16
2.4.1 Chirurgische Prozeduren	16
2.4.2 Farbstoffapplikation	17
2.5 Fixation mittels Perfusion.....	17
2.6 Entnahme und Sektionierung des Gehirns.....	18
2.6.1 Schneiden mit dem Gefriermikrotom.....	19
2.6.2 Schneiden mit dem Vibratom.....	19
2.7 Histochemie und Immunhistochemie	19
2.7.1 Nissl-Färbung	19
2.7.2 Methodik der Immunhistochemie	20
2.7.3 Anfärbung <i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin markierter Zellen.....	21
2.7.4 Anfärbung Fluoro-Gold markierter Zellen.....	22
2.7.5 Cholinacetyl-Transferase- (ChAT-)Immunhistochemie	22
2.7.6 -Aminobuttersäure- (GABA-)Immunhistochemie	23
2.8 Einbetten der Proben für die lichtmikroskopische Auswertung.....	23
2.9 Bearbeiten der Schnitte für die (Transmissions-)Elektronenmikroskopie.....	23
2.10 Ultramikrotomie.....	24
2.10.1 Herstellen von Glasmessern	24
2.10.2 Grids	24
2.10.3 Herstellung der Gewebsblöcke.....	24
2.10.4 Schneiden mit dem Ultramikrotom	25
2.11 Auswertung.....	25
2.11.1 Lichtmikroskopische Auswertung.....	25
2.11.2 Semiquantitative Auswertung der Markierungen	26
2.11.3 Elektronenmikroskopische Auswertung	27
3 Versuchsergebnisse.....	28
3.1 Injektionsorte	28
3.1.1 Injektionen mit <i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin.....	29
3.1.2 Injektionen mit Fluoro-Gold	32

3.2	Semiquantitative Auswertung der Markierungen	35
3.2.1	Auswertung der mit PHA-L markierten Kerngebiete	35
3.2.2	Auswertung der mit Fluoro-Gold markierten Kerngebiete	40
3.2.3	Auswertung der doppelt markierten Kerngebiete	43
3.2.4	Lichtmikroskopie	47
3.2.5	Elektronenmikroskopie	49
3.3	ChAT- und GABA-Immunreaktivität	50
4	Diskussion	53
4.1	Methodenkritik.....	53
4.1.1	Wahl der Methode	53
4.1.2	Wahl der Tracer.....	54
4.1.2.1	<i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin als Tracer	54
4.1.2.2	Fluoro-Gold als Tracer.....	54
4.1.3	Verbesserung des Signal- Rauschverhältnisses.....	55
4.1.3.1	Kreuzreaktionen	55
4.1.3.2	Methoden zur Reduzierung unspezifischer Färbungen.....	56
4.2	Die neuronale Verschaltung der Amygdala.....	58
4.2.1	Extrinsische Verbindungen der Amygdala	58
4.2.1.1	Afferente thalamische Verbindungen zur Amygdala.....	58
4.2.1.2	Efferenzen zur Substantia innominata	59
4.2.1.3	Die thalamo-amygdaläre Projektion zur Substantia innominata	61
4.2.1.4	Weitere relevante extrinsische Verbindungen	62
4.2.2	Intrinsische Verschaltungen der Amygdala	63
4.3	Die Rolle der Amygdala in der Signalverarbeitung und Kontrolle des cholinergen basalen Vorderhirns (Substantia innominata).....	66
4.3.1	Subcorticale Übermittlung sensorischer Informationen und emotionales Gedächtnis	66
4.3.1.1	Das Modell der sensorischen Verarbeitung in der Amygdala nach LEDOUX... ..	66
4.3.1.2	Signalübertragung akustischer Reize	67
4.3.1.3	Signalübertragung visueller Reize	67
4.3.1.4	Verarbeitung sensorischer Reize in der Amygdala.....	68
4.3.2	Amygdaläre Kontrolle des cholinergen basalen Vorderhirns	70
4.3.3	Schlußfolgerungen	72
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	76
A	ANHANG	I
A.1	Listen der verwendeten Substanzen.....	I
A.2	Zusammensetzung und Dosierung der Anästhetika.....	IV
A.2.1	Ketamin-Cocktail	IV
A.2.2	Natrium-Pentobarbital	IV
A.3	Pufferlösungen	V
A.3.1	Natrium-Phosphatpuffer (PB)	V
A.3.2	Immunpuffer (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, PBS)	VI
A.4	Fixative	VII
A.4.1	Paraformaldehyd-Fixativ in Phosphatpuffer	VII
A.4.2	Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-Fixativ in Phosphatpuffer	VIII
A.4.3	Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-Fixativ mit Pikrinsäure in Phosphatpuffer.....	IX

A.5	Kresylviolett-Lösung	X
A.6	Beschichtung der Objektträger.....	XI
A.7	Herstellung von Trägerfolien aus Formvar und Beschichtung der Grids	XII
A.8	Nissl-Färbung.....	XIII
A.9	Färbung von Semi-Dünnschnitten nach RICHARDSON.....	XIV
A.10	Reduzierung unspezifischen Hintergrundes.....	XV
A.10.1	Natriumborhydridbehandlung	XV
A.10.2	Blockierung endogener Peroxidasen	XV
A.10.3	Inkubation mit Proteinen	XVI
A.11	Anfärbung <i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin markierter Zellen.....	XVII
A.12	Anfärbung Fluoro-Gold markierter Zellen	XVIII
A.13	Cholinacetyl-Transferase-Immunhistochemie	XIX
A.14	GABA-Immunhistochemie	XX
A.15	Färbung mit Diaminobenzidin (DAB)	XXI
A.16	Herstellung lichtmikroskopischer Präparate	XXII
A.17	Herstellung von Präparaten für die (Transmissions-) Elektronenmikroskopie.....	XXIII
A.17.1	Nachfixierung der Schnitte mit Osmiumtetroxid (OsO ₄).....	XXIII
A.17.2	Kontrastierung mit Schwermetallionen.....	XXIII
A.17.3	Dehydrierung und Einbettung in synthetisches Harz	XXIV
A.18	Gliederung der Amygdala der Ratte	XXVII
A.19	Experimentelle Rohdaten: Intensität der Färbungen.....	XXVIII

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

ABC	avidin-biotin-peroxidase complex
AChE	Acetylcholin-Esterase
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
ChAT	Cholinacetyl-Transferase
DAB	Diaminobenzidin
EEG	Elektroencephalographie
FG	Fluoro-Gold™
GABA	gamma aminobutyric acid (γ -Aminobuttersäure)
GNS	goat normal serum (Ziegen-Normalserum)
IG	Immunglobulin
LISA	large-amplitude, irregular slow activity
LVFA	low voltage, fast activity
PAP	peroxidase anti-peroxidase complex
PB	phosphate buffer (Natriumphosphatpuffer)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin
RT	Raumtemperatur

Abkürzungen anatomischer Strukturen

AA	Area amygdaloidea anterior
AAD	Area amygdaloidea anterior, pars dorsalis
AAV	Area amygdaloidea anterior, pars ventralis
ACo	Nucleus corticalis amygdalae, pars anterior
AHi	Area amygdalohippocampalis
AHiPM	Area amygdalohippocampalis, pars (postero)medialis
AHiAL	Area amygdalohippocampalis, pars (antero)lateralis
APir	amygdalopiriforme Übergangszone
APT	Nucleus pretectalis anterior
AStr	amygdalostriatale Übergangszone
B	Nucleus basalis MEYNERT
BAOT	Bettkern der Stria olfactoria accessoria
BL	Nucleus basalis (basolateralis) amygdalae
BLA	Nucleus basolateralis amygdalae, pars anterior
BLP	Nucleus basolateralis amygdalae, pars posterior
BLV	Nucleus basolateralis amygdalae, pars ventralis
BM	Nucleus basalis accessorius (basomedialis) amygdalae
BMA	Nucleus basomedialis amygdalae, pars anterior
BMP	Nucleus basomedialis amygdalae, pars posterior
BSTIA	Bettkern der Stria terminalis, intraamygdaläre Division
CA3	Cornu ammonis (Feld CA3)
Ce	Nucleus centralis amygdalae
CeM	Nucleus centralis amygdalae, pars medialis

CeL	Nucleus centralis amygdalae, pars lateralis
CeC	Nucleus centralis amygdalae, pars capsularis
CPu	Caudate-Putamen
CxA	amygdalocorticale Übergangszone
DG	Gyrus dentatus
DpMe	Nucleus mesencephalicus (deep)
I	intercalierte Zellmassen
IM	intercalierte Zellmassen, Hauptzellgruppe (main)
I _{ps}	intercalierte Zellmassen, parakapsuläre Zellgruppe
ic	Capsula interna
La	Nucleus lateralis amygdalae
LaDL	Nucleus lateralis amygdalae, pars dorsolateralis
LaVL	Nucleus lateralis amygdalae, pars ventrolateralis
LaVM	Nucleus lateralis amygdalae, pars (ventro)medialis
LH	Area hypothalamica lateralis
LOT	Stria olfactoria lateralis (lateral olfaktorischer Trakt)
Me	Nucleus medialis amygdalae
MeAD	Nucleus medialis amygdalae, pars anterodorsalis
MeAV	Nucleus medialis amygdalae, pars anteroventralis
MePD	Nucleus medialis amygdalae, pars posterodorsalis
MePV	Nucleus medialis amygdalae, pars posteroventralis
MG	Corpus geniculatum mediale
MGM	Corpus geniculatum mediale, pars medialis
MGV	Corpus geniculatum mediale, pars ventralis
PIL	Nucleus intralaminaris posterior thalami
PLCo	Nucleus corticalis amygdalae, pars posterolateralis
PMCo	Nucleus corticalis amygdalae, pars posteromedialis
PoDG	Gyrus dentatus (polymorphe Schicht)
PP	Nucleus peripeduncularis
opt	Tractus opticus
SG	Nucleus suprageniculatus
SI	Substantia innominata
SN	Substantia nigra
SNR	Substantia nigra, pars reticularis
SO	Nucleus supraopticus

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung emotional gefärbter Verhaltensreaktionen

Die Reaktionsfähigkeit auf die Umgebung gehört zu den essentiellsten Eigenschaften aller Organismen. Reize - also Informationen aus der Umwelt - müssen erfaßt und verarbeitet werden, bevor sie in eine Reaktion umgesetzt werden können.

Im Verlauf der Evolution ging mit der Entwicklung des (zentralen) Nervensystems eine immer differenziertere Interaktion von Information und daraus resultierender Verhaltensreaktion hervor. Zunächst wurden äußere Reize in Form von Reflexen in Aktionen umgesetzt. Mit ihrer Weiterentwicklung wurden die Mechanismen komplizierter, arbeiteten aber prinzipiell nach dem gleichen Muster. Diese Verhaltensweisen werden unter dem Begriff Instinkte zusammengefaßt. Sie bestehen aus genetisch determinierten Programmen, die durch bestimmte Schlüsselreize aufgerufen werden und in verschiedener Intensität aber in unveränderbarer Struktur ablaufen. Mit der Entwicklung des Großhirns bei den Vertebraten kam es zu einer Flexibilisierung der Programme. Zu der starren Reaktion auf Schlüsselreize entwickelte sich die Befähigung, eine Beurteilung der Umweltsituation vorzunehmen. Diese Beurteilung erfolgt nach dem Prinzip, wichtige Reize oder Reaktionen mit Emotionen zu verknüpfen. Eine Emotion ist eine gefühlsbetonte Reaktion oder ein Erlebenseindruck, der mit physiologischen Veränderungen (motorisch, vegetativ, endokrin) gekoppelt ist. Dazu gehören z.B. Angst (objektunabhängig), Furcht (objektorientiert), Aggression, Trauer oder Freude. Inwieweit diese Gemütsbewegungen bei Mensch und Tier qualitativ gleichwertig sind, mag kontrovers diskutiert werden. Offensichtlich ist jedoch, daß es zumindest bei den höheren Vertebraten in physiologischen und Verhaltensantworten auf bestimmte Reize Parallelen zum Menschen gibt. So lösen Reize, die eine Gefahr vermitteln, einheitlich Körperreaktionen aus, die ein Flucht- oder Kampfverhalten begünstigen (z.B. erhöhter Herzschlag oder Muskeltonus der Haut- und Darmmuskulatur) (MIRAM, 1987; BIRBAUMER und JÄNIG, 1995; BAUER und KEIL, 1997).

1.2 Das limbische System als integrativer Bestandteil bei der Generierung emotional gefärbter Verhaltensreaktionen

Zur Aufklärung der Mechanismen emotional gefärbter Verhaltensreaktionen gehört die Kenntnis über die beteiligten anatomischen Strukturen und ihre neuronalen Verschaltungen. Bisherige Forschungsarbeiten zeigten, daß die Amygdala eine entscheidende Komponente bei der Verarbeitung sensorischer Reize in Verbindung mit Emotionen darstellt (Übersicht in: AGGLETON, 1992).

Die Amygdala (lat. Corpus amygdaloideum) ist benannt nach der Ähnlichkeit ihrer anatomischen Gestalt mit einer Mandel. Bereits im frühen 19. Jahrhundert entdeckte BURDACH (1822) bei der Untersuchung von Schnittpräparaten von humanen cerebralen Hemisphären eine mandelförmig geformte graue Masse, die er als „Mandelkern“ bezeichnete. Diese Struktur ist allen Vertebraten gemeinsam, wenn sie auch in Form und ihren Komponenten innerhalb der Systematik der Vertebraten variiert. Die Amygdala entwickelt sich während der Organogenese bilateral aus einer Ausdehnung des telencephalischen Vesikels innerhalb des Temporallappens. Sie liegt bei Primaten im anteromedialen Bereich des Temporallappens, ventromedial zum Striatum und vor dem ventralen Anteil der Formatio hippocampi. In Nichtprimaten, wie der Ratte oder der Katze, deren Temporallappen nicht so stark entwickelt sind, liegt die Amygdala in ähnlicher Position.

Aufgrund ihrer Komplexität soll in einem gesonderten Abschnitt (1.3) näher auf die Struktur der Amygdala eingegangen werden.

Die Amygdala ist eine wichtige Komponente des limbischen Systems. Anatomisch betrachtet besteht dieses System aus einer Gruppe corticaler und subcorticaler Strukturen, die einen Saum (lat. Limbus) um den Hirnstamm formen (siehe Tab. 1-1). Funktionell werden unter dem Begriff die Regionen im Gehirn zusammengefaßt, die das vegetative Nervensystem kontrollieren und viszerale Reaktionen mit Emotion und Motivation auf der einen Seite und kognitive Funktionen auf der anderen Seite koordinieren. Das daraus resultierende Verhalten wird als affektives Verhalten bezeichnet und umfaßt Angst, Wut, Aggression und Sexualität. Das limbische System steuert das neuroendokrine System und ist an Lernprozessen und dem Gedächtnis beteiligt.

Tabelle 1-1 Hauptstrukturen des limbischen Systems

Corticale Anteile	Subcorticale Anteile
<ul style="list-style-type: none">• Formatio hippocampi<ul style="list-style-type: none">Gyrus dentatusHippocampusSubiculum• Gyrus parahippocampalis<ul style="list-style-type: none">Area entorhinalisPresubiculum• Gyrus cinguli• Bulbus olfactorius• Tuberculum olfactorium	<ul style="list-style-type: none">• Corpus amygdaloideum• Nuclei septi<ul style="list-style-type: none">Nucleus accumbensBandeletta diagonalis BROCA• Nucleus anterior thalami• Hypothalamus• Corpora mamillaria• Regio preoptica

[nach NIEUWENHUYS *et al.*, 1991; BIRBAUMER und JÄNIG, 1995]

Die Aufklärung der funktionellen Bedeutung der Amygdala ist eng mit der Erforschung des limbischen Systems verknüpft.

Erste Hypothesen wurden bereits Anfang des letzten Jahrhunderts formuliert. TREVIRANUS (1820) sah den Hippocampus als die bedeutendste Hirnregion an, die in den Geruchssinn und höhere mentale Funktionen wie das Gedächtnis eingebunden sei. Etwa 50 Jahre später wurde von BROCA (1878, 1879) der Begriff „grand lobe limbique“ geprägt. Er faßte damit den sogenannten olfaktorischen Lobus, den Hippocampus und die cinguläre Region zu einer Einheit zusammen. Von dieser glaubte er, daß sie dem Geschmackssinn dienlich sei.

BARD (1929, 1934) beobachtete an Katzen, nachdem er bei den Tieren den gesamten cerebralen Cortex entfernt hatte, überschießendes aggressives Verhalten als Antwort auf verschiedene Stimuli. Offensichtlich konnten subcorticale Hirnregionen emotional gesteuerte Verhaltensweisen generieren. Eine Funktion des cerebralen Cortex war es demnach diese Verhaltensweisen auf die richtigen Ziele zu lenken und sie gegebenenfalls zu unterdrücken.

"Is emotion a magic product, or is it a physiological process which depends on an anatomic mechanism?" (PAPEZ, 1937)

Unter dieser Fragestellung beschrieb PAPEZ neurale Strukturen, von denen er glaubte, daß sie Verhalten und Emotionen steuern würden. Er formulierte die Hypothese, daß das „emotionale Gehirn“ aus einem Kreislauf besteht, in dem Informationen von den Corpora mamillaria des Hypothalamus über den Nucleus anterior thalami und dem Cingulum zum Hippocampus und zurück zu den Corpora mamillaria fließen (PAPEZ-Kreis). Auch von anderen Strukturen könnten Informationen in diesen Kreislauf integriert und zu Emotionen verarbeitet werden.

Diese Mutmaßung gewann an Bedeutung, nachdem KLÜVER und BUCY (1937, 1939) deutliche Veränderungen im Verhalten und der Wahrnehmung bei Affen mit Temporallappenectomien beschrieben. Nach der bilateralen Entfernung der vorderen Temporallappen einschließlich der amygdalären Komplexe zeigten die Tiere gravierende

Störungen des affektiven Verhaltens. KLÜVER und BUCY beschrieben Zustände von „emotionaler“ Blindheit (Eßbares und Nichteßbares kann nicht mehr unterschieden werden), Hyperoralität, und anormales forschendes und sexuelles Verhalten, sowie Hypoemotionalität (Mangel an Angst und affektiven Reaktionen) in lobectomierten Tieren (KLÜVER-BUCY-Syndrom).

Später erweiterte MCLEAN (1949) den ursprünglichen PAPEZ-Kreis um weitere umgebende corticale Strukturen und subcortical Kerne des Vorderhirns einschließlich der Amygdala. Bei den Mammalia ist die Größe des limbischen Systems relativ konstant, im Gegensatz zum Cortex, der stark in der Größe variiert. Daraus folgerte MCLEAN, daß das limbische System primitive Funktionen kontrolliert, die allen Säugetieren gemeinsam sind. Er faßte diese Strukturen, von denen angenommen wurde, daß sie das Gehirn mit den körperlichen Organen verbinden, unter dem Begriff „viszerales Gehirn“ (MCLEAN, 1949), und später mit „limbischem System“ (MCLEAN, 1952) zusammen. Obgleich MCLEANS limbisches System die Amygdala mit einschloß, galt zunächst der Hippocampus als die primäre Funktionsstruktur für das Gefühl (MCLEAN, 1952).

Später zeigte sich, daß das sogenannte KLÜVER-BUCY-Syndrom größtenteils allein durch eine bilaterale Läsion der Amygdala generiert werden kann (WEISKRANTZ, 1956). Aus seinen Forschungsergebnissen schloß WEISKRANTZ, daß „eine Entfernung der Amygdala den Effekt hat, daß verstärkende Stimuli, ob positive oder negative, nur schwer erzeugt oder erkannt werden können“. Viele Symptome des KLÜVER-BUCY-Syndroms können damit erklärt werden, daß die Amygdala keine sensorischen Informationen mehr aus dem temporalen Neocortex erhält. Folglich ist die Amygdala an der Verarbeitung sensorischer Reize in Bezug auf ihre emotionale Bedeutung beteiligt (GESCHWIND, 1965).

In neuerer Zeit stellte MISHKIN mit Hilfe von Experimenten an Primaten die Beteiligung der Amygdala an Prozessen der Gedächtnisbildung insbesondere bei sensorischen Zusammenhängen heraus (MISHKIN, 1978, 1982; MISHKIN und AGGLETON, 1981).

Eine der aktuell diskutierten, weiteren möglichen Funktionen der Amygdala ist die Beteiligung am neocorticalen „Arousal“. Darunter versteht man einen Zustand aus Alarmbereitschaft, Wachheit und Aktivität, der durch das Nervensystem z.B. bei Anwesenheit emotional relevanter Reize generiert wird. Seine Ausprägung wird entweder mit Begriffen der Elektroencephalographie (EEG) oder über das Verhalten definiert. Im EEG zeigt sich der Zustand der Wachheit an einer Kurve mit geringer Amplitude und hoher Frequenz (low voltage fast activity / LVFA) während geringe Aktivität durch eine niederfrequente Kurve mit großer Amplitude (large-amplitude, irregular slow activity / LISA) gekennzeichnet ist. Im

deutschen Sprachgebrauch wird der Begriff „arousal (reaction)“ unter anderem mit „Weckreaktion“ übersetzt (ZIMMERMANN, 1995; Roche Lexikon Medizin, 1999).

DRINGENBERG und VANDERWOLF (1996) zeigten, daß in anästhesierten Ratten nach elektrischer Stimulation der Amygdala im EEG sich die neocorticale elektrische Aktivität von LISA nach LVFA (dem Zustand der corticalen Wachheit) änderte. Identische Befunde erhielten bereits KAADA (1951) und GLOOR (1960), die ebenfalls die Amygdala anästhesierter Tiere stimulierten.

Am Tiermodell gewonnen Erkenntnisse konnten auch für den Menschen verifiziert werden. In Studien an Menschen mit kompletter bilateraler Läsion der Amygdala (URBACH-WIETHE-Krankheit) konnte gezeigt werden, daß die Amygdala für die Verarbeitung der emotionalen Stimuli und die Formung des emotionalen Gedächtnisses wichtig ist (ADOLPHS *et al.*, 1994). Weiterhin konnte eine Trennung zwischen der Rolle der Amygdala für Emotionen und der Funktion des Hippocampus für das deklarative Gedächtnis demonstriert werden (BECHARA *et al.*, 1995).

Als experimentelles Modell zur Erforschung der Rolle der Amygdala bei der Bildung des emotionalen Gedächtnisses wird insbesondere die auditorische Furchtkonditionierung, eine Form der klassischen Konditionierung, verwendet (MAREN und FANSELOW, 1996). Die klassische Konditionierung ist ein von PAWLOW entdecktes Prinzip der Steuerung von (Reflex-) Reaktionen durch ursprünglich neutrale äußere Reize. Wird ein neutraler Reiz mit einer angeborenen Verhaltensreaktion verknüpft, erfolgt nach einer Lernphase die bedingte Reaktion. Bei der auditorischen Furchtkonditionierung wird als neutraler Reiz das Versuchstier einem akustischen Stimulus ausgesetzt. Diesem folgt ein aversiver Reiz - häufig ein Elektroschock über den Käfigboden - der eine eindeutige physiologische und Verhaltensreaktion (angeborene Reaktion) hervorruft. Das Tier lernt dann in kurzer Zeit beide Reize miteinander zu verknüpfen, so daß das Verhalten, das ursprünglich nur durch den aversiven Reiz (unkonditionierter Reiz) ausgelöst werden konnte, nun auch allein durch den akustischen Stimulus (konditionierter Reiz) ausgelöst wird. Die Amygdala bzw. ihr basolateraler Komplex (Nuclei lateralis und basolateralis) wird als die Struktur angesehen, die maßgeblich in die Bildung, also der Assoziation von konditioniertem und unkonditioniertem Reiz, und die Speicherung des emotionalen Gedächtnisses bei der Furchtkonditionierung involviert ist (FANSELOW und LEDOUX, 1999). Während die Beteiligung an dieser Gedächtnisbildung allgemein anerkannt ist, wird die Funktion als Bildungs- und Speicherort jedoch kontrovers diskutiert. Einerseits wird die Akquisition und Speicherung der Informationen über furchtinduzierende Ereignisse sowie eine Modulation der Gedächtnisbildung in anderen Hirnregionen primär dem basolateralen Komplex

zugeschrieben (FANSELOW und LEDOUX, 1999). Andererseits könnte sich die Funktion dieser Struktur auch auf kurzzeitige modulierende Effekte beschränken (CAHILL *et al.*, 1999). Neben der Vielzahl der Experimente, die mit auditorischen Stimuli arbeiteten, wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen ein visueller Stimulus geboten wurde (DAVIS, 1992ab; LEDOUX, 1995).

1.3 Nomenklatur der Amygdala

“What is the amygdala?“ Mit dieser etwas provokanten Frage betitelten SWANSON und PETROVICH (1998) einen Übersichtsartikel, der anhand neuester entwicklungsbiologischer und funktioneller Daten sowie Ergebnissen von Neurotransmitter- und Tracer-Studien ein umfassendes architektonisches Modell der Amygdala vorstellte. Das Fazit der Arbeit lautete: „Der Begriff „Amygdala“ faßt verschiedene neuronale Zellgruppen relativ willkürlich zu einer gemeinsamen Struktur zusammen; die wenig den strukturellen und funktionellen Einheiten entspricht, zu denen die Zellgruppen zugeordnet werden sollten. Damit ist die Amygdala ein Konglomerat verschiedener „Systeme“ statt einer strukturellen oder funktionellen Einheit.“

Wenn diese Aussage auch keine Definition der Amygdala liefert, so verdeutlicht sie doch die Problematik, diese Struktur in einem einheitlichen Konzept zu erfassen und zu beschreiben. Auch der Versuch einer anatomischen Charakterisierung bleibt daher sehr allgemein:

„Die Amygdala besteht aus cytoarchitektonisch und histochemisch verschiedenen Kerngebieten und corticalen Strukturen, die mit unterschiedlichen Gehirnarealen verknüpft sind.“

Ähnlichen Aussagen findet man häufig dann, wenn versucht wird, die anatomische Struktur der Amygdala in einem Satz zu beschreiben.

Diese Schwierigkeit besteht bis auf den heutigen Tag und erklärt die bis dato kontrovers geführte Diskussion über die Homologiebeziehungen, die Begrenzung des amygdalären Komplexes sowie die Anzahl und die Abgrenzung seiner Untereinheiten.

Ein Teil des Problems resultiert sicherlich aus der Heterogenität und dem Fehlen klarer Grenzlinien zwischen einigen Unterstrukturen. Erschwerend kommt hinzu, daß die Lage und die Größe (bis hin zum Fehlen) dieser Strukturen bei den verschiedenen Arten divergiert. So ist verständlich, daß mit der Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden und ihrer Anwendung an verschiedenen Versuchstierarten, unterschiedliche Nomenklaturkonzepte konzipiert wurden (u.a. JOHNSTON, 1923; FOX, 1940; CROSBY und HUMPHREY, 1941, 1944; LAUER, 1945; BRODAL, 1947; [Nissl-Färbung] GIRGIS, 1968, 1969, 1980; HALL und

GENESER-JENSEN, 1971; TURNER und ZIMMER, 1984; [Acetylcholin-Esterase-Färbung] SCALIA und WINANS, 1975; KRETTEK und PRICE, 1978b; AMARAL *et al.*, 1992 [Aufklärung neuronaler Verbindungen]).

Bereits bei der vereinfachenden Zusammenfassung amygdalärer Komponenten gibt es verschiedene Auffassungen über die Anzahl und Benennung der Hauptgruppen (siehe Tab.1-2). Diese Unterschiede beruhen auf unterschiedlichen Gruppierungskriterien. Die klassische Zweiteilung basiert vor allem auf der Lage der Kerngebiete und einer Abgrenzung eher cortexähnlicher von kernförmigen Strukturen. Während die äußeren Regionen der Amygdala mehr oder weniger laminar aufgebaut sind - corticale Kerne (Nuclei corticalis anterior (ACo), posterolateralis (PLCo), posteromedialis (PMCo)), Stria olfactoria lateralis (LOT), Nuclei medialis (Me), und centralis (Ce) - bilden die tiefer liegenden Gebiete eher kompakte Kerne aus - Nuclei lateralis (La), basolateralis (BL) und basomedialis (BM) (JOHNSTON, 1923; HUMPHREY, 1936). Da diese Kriterien für einen Teil der amygdalären Komponenten nur schwierig zuzuordnen sind, findet man in der Literatur divergente Gruppierungen. Eher „funktionellen“ Gesichtspunkten entspringt eine Dreiteilung. Die corticomediale Gruppe (ACo, PLCo, PMCo, Me, LOT) ist direkt mit dem olfaktorischen und dem akzessorisch olfaktorischen System verbunden. Die basolaterale Gruppe (La, BL, BM) bildet wichtige Verbindungen mit dem Neocortex aus. Der Nucleus centralis amygdaloideum und die Area amygdaloidea anterior sind mit Regionen im lateralen Hypothalamus und dem Hirnstamm verbunden (PRICE *et al.*, 1987). Auch diese Einteilung ist nicht unumstritten. Da beide Klassifizierungen nicht zu einer eindeutigen Gruppierung führen, werden in neueren Arbeiten beide Systeme vermischt (ALHEID *et al.*, 1995; MCDONALD, 1998).

Tabelle 1-2 Konzepte der Nomenklatur der Amygdala (Hauptgruppen)

<ul style="list-style-type: none">• Corticomediale Komplex - basolaterale Komplex (JOHNSTON, 1923; HUMPHREY, 1936)• Corticomediale Kerngebiete - basolaterale Kerngebiete - Nucleus centralis amygdaloideum, Area amygdaloidea anterior (PRICE <i>et al.</i>, 1987)• Corticale, (baso)laterale, Kerngebiete (Formatio amygdaloidea corticobasolateralis) - centromediale Kerngebiete (Formatio amygdaloidea centromedialis) (STEPHAN und ANDY, 1977; MCDONALD, 1992; ZILLES und REHKÄMPER, 1993)• Cortexähnliche Strukturen - erweiterte Amygdala (ALHEID <i>et al.</i>, 1995)• Superficiale, cortexähnliche Gruppe - basolaterale Gruppe - centromediale Gruppe (MCDONALD, 1998)

In der vorliegenden Arbeit wurden, wenn nicht anders vermerkt, die Nomenklatur und die entsprechenden Abkürzungen nach dem Atlas von PAXINOS und WATSON (1998) verwendet.

Im Text sind, wenn möglich, die englischen Begriffe der anatomischen Strukturen durch die lateinischen Fachtermini (nach NIEUWENHUYS *et al.*, 1991) ersetzt. Bezeichnungen für übergeordnete Strukturen (*amygdalae*, *thalami*) wurden weggelassen, wenn sich die Zugehörigkeit des entsprechenden Kerngebietes aus dem Zusammenhang ergab. Die Entscheidung für diese Nomenklatur bedeutet keine Bewertung der Güte derselbigen, sondern entspringt allein pragmatischen Gründen. Aufgrund der großen Verbreitung des Atlas von PAXINOS und WATSON lassen sich so die Befunde der Arbeit besser einordnen und mit anderen vergleichen. Eine detaillierte Strukturierung der Amygdala, in der die Studien verschiedener Autoren integriert wurden, kann dem Anhang A.18 entnommen werden.

1.4 Der Thalamus: subcorticale Station für die Vermittlung sensorischer Signale zur Amygdala

Bei der funktionellen Betrachtung der Amygdala sind selbstverständlich auch die neuronalen Verschaltungen von Bedeutung.

Die Weiterleitung sensorischer Signale zur Amygdala erfolgt sowohl über subcorticale als auch über corticale Nervenbahnen, die jeweils unterschiedliche funktionelle Bedeutungen haben. Im Kontext der Furchtkonditionierung zum Beispiel vermittelt die thalamo-amygdaläre Projektion eine „schnelle Komponente“ emotional gefärbter Verhaltensreaktionen, die jedoch nicht in der Lage ist, sensorische Details zu differenzieren. Die „langsamere“ Verbindung vom Thalamus über den Cortex zur Amygdala liefert detailliertere sensorische Informationen (LEDOUX, 1993). Zunächst wurde diese Dichotomie nur für akustische Reize verifiziert (LEDOUX *et al.*, 1990ab). Kürzlich konnten LINKE *et al.* (1999) zeigen, daß auch anatomische Verbindungen existieren, über die visuelle Informationen die Amygdala über das Mesencephalon (*Colliculus superior*) und thalamische Kerngebiete erreichen können.

Eine wichtige Station in der Reizverarbeitung ist der Thalamus. Zwischen dem Thalamus und dem Cortex bestehen engste Wechselwirkungen, so daß besonders unter physiologischer Betrachtung häufig von einem „thalamo-corticalen System“ gesprochen wird. Die spezifischen thalamischen Kerne gehören unmittelbar zu den afferenten Informationsübertragungsleitungen und projizieren topographisch organisiert auf die zugehörigen corticalen Areale. Hier liegt die zentrale subcorticale Umschaltstelle für nahezu alle der Großhirnrinde zufließenden sensorischen Erregungen (mit Ausnahme der olfaktorischen) aus der Umwelt und dem Körperinneren. Andere thalamische Kerngebiete haben eher aktivierend regulierende Funktionen auf größere Hirnrindengebiete (unspezifische

Kerne). Des Weiteren ist der Thalamus in efferente corticale Kontrollsysteme motorischer und viszeraler Funktionen einbezogen.

Morphologisch wird der Thalamus in eine Vielzahl von Kerngebieten eingeteilt, wobei allerdings keine einheitliche Klassifizierung existiert. Das ist verständlich, da sie wie bei der Amygdala auf sehr unterschiedlichen Methoden basiert, die cytoarchitektonische Merkmale, Faserverbindungen, elektrophysiologische Ergebnisse u.a. berücksichtigen. Die Kerne im Bereich des Corpus geniculatum mediale, die sensorische Informationen vermitteln, können unter den Begriffen „caudale paralaminare Kerne“ (HERKENHAM, 1986) oder „sensorisch assoziierte Kerne“ (WINER und MOREST, 1983) zusammengefaßt werden. Hierzu zählen der Nucleus suprageniculatus (SG), der Nucleus intralaminaris posterior (PIL), das Corpus geniculatum mediale, pars medialis (MGM) sowie der Nucleus peripeduncularis (PP).

Die verwendeten Abkürzungen basieren auf dem anatomischen Atlas von PAXINOS und WATSON (1998), deren Nomenklatur seinerseits nach PRICE (1995) erfolgte.

1.5 Das cholinerge basale Vorderhirn: Verbindungen mit der Amygdala

Eine weitere wichtige Komponente bei der Formung von Verhaltensreaktionen ist das basale Vorderhirn. Dieser Begriff umfaßt eine Ansammlung heterogener Strukturen die nahe der medialen und ventralen Begrenzung der cerebralen Hemisphären lokalisiert sind. Unter anatomisch-funktionellen Gesichtspunkten läßt sich das basale Vorderhirn in drei anatomische Gruppierungen unterteilen:

Das ventrale striato-pallidale System liegt im mediobasalen Bereich des Vorderhirns und setzt sich aus dem ventralen Striatum (Tuberculum olfactorium, Nucleus accumbens, ventromediales Caudate-Putamen) und dem Pallidum ventrale zusammen (ALHEID und HEIMER, 1988; KURODA und PRICE, 1991; HEIMER *et al.*, 1995).

Die zweite Gruppierung ist die erweiterte Amygdala (ALHEID und HEIMER, 1988; ALHEID *et al.*, 1995) bzw. das diagonale ventrale Vorderhirn-Kontinuum (SCHWABER *et al.*, 1980; SCHMUED, 1994). Diese besteht ebenfalls aus zwei Untergruppen - dem Nucleus centralis amygdaloideum, der anterodorsalen sublenticularen Substantia innominata und dem lateralen Bettkern der Stria terminalis auf der einen Seite, sowie dem Nucleus medialis amygdaloideum, der posteroventralen sublenticularen Substantia innominata und dem medialen Bettkern der Stria terminalis andererseits (HEIMER und ALHEID, 1991; ALHEID *et al.*, 1995).

Schließlich läßt sich noch ein magnozellularer corticopetaler Komplex abgrenzen (HEIMER und ALHEID, 1991), der sich teilweise mit Strukturen des ventralen striato-pallidalen Systems

und der erweiterten Amygdala überschneidet. Dieser Komplex entspricht in etwa dem cholinergen basalen Vorderhirn (MESULAM *et al.*, 1983ab; GROVE, 1988ab; ZÁBORSZKY *et al.*, 1991).

Ein kleiner Teil der Neurone des magnozellularen corticopetalen Komplexes ist nicht cholinerg sondern verwendet andere Moleküle als Transmitter, wie z.B. Glutamat (KÖHLER *et al.*, 1984), Gelanin (MELANDER *et al.*, 1985), Somatostatin (VINCENT *et al.*, 1985), GABA (ZÁBORSZKY *et al.*, 1986ab; FISHER *et al.*, 1988), Vasopressin (CAFFÉ *et al.*, 1987; ULFIG *et al.*, 1990) und Oxytocin (CAFFÉ *et al.*, 1987).

Die cholinergen Projektionsneurone des basalen Vorderhirns können in Sektoren gruppiert werden. Die Bezeichnung der einzelnen Gruppen (Chx) steht für eine Subpopulation innerhalb eines Kerngebietes, wird jedoch auch für die Benennung des entsprechenden gesamten Kerngebietes verwendet. Bei Primaten lassen sich die vier Sektoren Ch1 bis Ch4 unterscheiden, wobei letzterer noch in die fünf Untergruppen Ch4am, Ch4al, Ch4id, Ch4iv und Ch4p unterteilt wird (MESULAM *et al.*, 1983a; AGGLETON *et al.*, 1987). Bei der Ratte können noch zwei zusätzliche Sektoren differenziert werden (Ch1-Ch6) (MESULAM *et al.*, 1983b).

Tabelle 1-3 Cholinerge Regionen des basalen Vorderhirns der Ratte

• Ch1	Nuclei septi medialis
• Ch2	Bandeletta diagonalis BROCA (vertikaler Flügel)
• Ch3	Bandeletta diagonalis BROCA (horizontaler Flügel), Nucleus preopticus magnocellularis
• Ch4	Nucleus basalis MEYNERT
Ch4al	anterior, lateral
Ch4id	intermedial, dorsal der Ansa peduncularis
Ch4iv	intermedial, ventral der Ansa peduncularis
Ch4p	Posterior
• Ch5	Nucleus tegmentalis pedunculopontinus
• Ch6	Nucleus tegmentalis laterodorsalis

[nach MESULAM *et al.*, 1983b]

Obwohl es in der genauen Lokalisation der cholinergen Projektionsneurone bei den verschiedenen Spezies der Vertebraten, die untersucht wurden, Unterschiede gibt, lassen sich gemeinsame organisatorische Prinzipien ableiten. Die Neurone innerhalb der Ch1- und Ch2-Region projizieren mehrheitlich zum Hippocampus. Die cholinergen Neurone der Ch3-Gruppe projizieren zum Bulbus olfactorius sowie dem Cortex piriformis und dem Cortex entorhinalis. Die cholinerge Innervation der Amygdala erfolgt vor allem durch Neurone der Ch4-Gruppe, die ebenfalls noch zum Neocortex projiziert (ZÁBORSZKY *et al.*, 1991).

Das cholinerge basale Vorderhirn wird mit der Steuerung der Wachheit in Verbindung gebracht. Neurone aus dem basalen Vorderhirn tragen zu der massiven cholinergen Innervation des cerebralen Cortex bei den Mammalia bei. Es gibt Hinweise, daß eine Erregung dieser Zellen eine intracorticale Ausschüttung von Acetylcholin bewirkt, die ihrerseits eine gesteigerte electrocorticale Aktivität hervorruft. So ist während der Beobachtung eines corticalen Wachzustandes im EEG (LVFA) die Ausschüttung endogenen Acetylcholins im Neocortex ebenfalls erhöht, derweil sie während der Periode der LISA niedrig ist (KANAI und SZERB, 1965; JASPER und TESSIER, 1971). Die Entladungsrate cholinergischer cortical projizierender Zellen des basalen Vorderhirns ist während der Perioden des LVFA höher als während der LISA (DETARI und VANDERWOLF, 1987). Elektrische Aktivierung cholinergischer Zellgruppen im basalen Vorderhirn erzeugt LVFA und erhöht die corticale Ausschüttung an Acetylcholin (BELARDETTI *et al.*, 1977; CASAMENTI *et al.*, 1986; METHERATE und ASHE, 1991). Diese und weitere Befunde lassen darauf schließen, daß die corticale Weckreaktion über das cholinerge basale Vorderhirn vermittelt wird (DRINGENBERG und VANDERWOLF, 1996). Neuere Arbeiten zeigen, daß das cholinerge basale Vorderhirn ebenfalls in Prozessen der Aufmerksamkeit involviert ist (ROBBINS *et al.*, 1989; MUIR *et al.*, 1992ab, 1993; ABDULLA *et al.*, 1994). Dieses steht im Widerspruch zu älteren Befunden, welche die Funktion des cholinergen basalen Vorderhirns eher mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung brachten (HEPLER *et al.*, 1985a-c; ARENDT *et al.*, 1989; ROBERTS *et al.*, 1992). Dieser Gegensatz relativiert sich jedoch mit den Ergebnissen weiterer Studien. Es konnte an Primaten gezeigt werden, daß die Substantia innominata bzw. der Nucleus basalis MEYNERT mehr bei Prozessen der Aufmerksamkeit eine Rolle spielt, während mediales Septum und die Bandeletta diagonalis BROCA eher in Prozessen von Gedächtnisleistungen involviert sind (VOYTKO, 1996; MASUDA *et al.*, 1997). Außerdem zeigten VNEK *et al.* (1996), daß das cholinerge basale Vorderhirn der Ratte für räumliche Gedächtnisleistungen nicht nötig ist, schlossen jedoch die Beteiligung an anderen Gedächtnisformen nicht aus.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anatomische Verbindungen darzustellen, über die sensorische thalamische Regionen über Vermittlung durch die Amygdala das cholinerge basale Vorderhirn erreichen, und die beteiligten Kerngebiete zu identifizieren. Der Schwerpunkt lag auf der Identifikation monosynaptischer Verbindungen vom Thalamus über die Amygdala zum cholinergen basalen Vorderhirn, insbesondere da diese ein geeignetes anatomisches Substrat für die schnelle Vermittlung corticaler Aktivierungen im Rahmen emotional bedeutsamer Verhaltensreaktionen darstellen. Zur Identifizierung der Verbindungen wurde eine *in vivo* Doppel-Tracer-Studie an Ratten durchgeführt, bei der eine anterograd transportierte Substanz (*Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin) in die caudalen paralaminaren thalamischen Kerne und ein retrograd transportierter Farbstoff (Fluoro-Gold™) in die Substantia innominata iontophoretisch injiziert wurde. Zur dauerhaften Visualisierung der Tracer (Anfärbung mit Diaminobenzidin) und zur Charakterisierung der beteiligten Neurone (Neurotransmitter: γ -Aminobuttersäure (GABA), Acetylcholin) wurden immunhistochemische Verfahren angewandt. Die Untersuchung der Verbindung erfolgte sowohl auf lichtmikroskopischer - Rekonstruktion von (doppelt) markierten amygdalären Kerngebieten - als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene - Nachweis direkter synaptischer Kontakte.

Die Auswahl der Injektionsorte ergab sich zum einen aus den Arbeiten zur Aufklärung subcorticaler Signalwege sensorischer Reize zur Amygdala. Sowohl die Studien von LEDOUX über die thalamo-amygdaläre Projektion für akustische Signale (LEDOUX *et al.*, 1990b), als auch die Arbeit von LINKE *et al.* (1999), die eine potentielle visuelle Verbindung beschreibt, verweisen auf die caudalen paralaminaren Kerne als Relaisstationen im Thalamus für den sensorische Informationsfluß zur Amygdala. Zum anderen existieren Befunde über Verbindungen der Substantia innominata, einem Bestandteil des cholinergen basalen Vorderhirns, und der Amygdala. Es konnten bereits sowohl amygdaläre Efferenzen (KRETTEK und PRICE, 1978a; RUSSCHEN *et al.*, 1985a; GROVE, 1988b; JOLKKONEN und PITKÄNEN, 1997) als auch afferente Verbindungen von der Substantia innominata (RUSSCHEN, 1982; NAGAI *et al.*, 1982; WOOLF und BUTCHER, 1982; CARLSEN *et al.*, 1985; GROVE, 1988a) nachgewiesen werden. Vor diesem Hintergrund erschienen die paralaminaren thalamischen Kerne und die Substantia innominata als geeignete Kandidaten für den Ausgangs- bzw. Zielbereich einer direkten thalamischen Verbindung zum cholinergen basalen Vorderhirn über die Amygdala.

2 Material und Methode

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten der Inzuchtstämme Long-Evans und Wistar verwendet, die von der Firma HARLAN-WINKELMANN (Borchen, D) bezogen wurden. Die Haltung der Tiere vom Zeitpunkt der Lieferung bis zur Tracer-Injektion und für den folgenden Zeitraum bis zu ihrer Tötung erfolgte unter den für Laborratten konventionellen Bedingungen im zentralen Tierstall der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Als Käfige dienten Plastikboxen (Bodenfläche 375 x 215 mm, Höhe 150 mm) mit Gitterdeckeln aus Edelstahl, in denen die Tiere paarweise oder selten einzeln auf Holzgranulat gehalten wurden.

In den klimatisierten Räumen betrug der Sollwert der Raumtemperatur 22 °C, die relative Luftfeuchte lag zwischen 45-55 %. Die Beleuchtung erfolgte in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Wechsel. Die Hellperiode dauerte von 06:00-18:00 Uhr (teilweise mit einer zweistündigen Dämmerungsphase zu Beginn und am Ende der Hellphase).

Die Tiere erhielten *ad libitum* pelletiertes Alleinfuttermittel ALTRUMIN (Lage, D), und es bestand freier Zugang zu Wasser (Plastikflaschen).

Zum Zeitpunkt der Tracer-Injektion wogen die Tiere zwischen 280-330 g, zum Zeitpunkt der Perfusion 290-370 g.

2.2 Substanzen

Die verwendeten Chemikalien, Antikörper und Substanzen für die Immunhistochemie sowie ihrer Bezugsquellen sind im Anhang A.1 aufgelistet.

Bei der Herstellung der Lösungen wurde stets entionisiertes Wasser verwendet, das mit Hilfe des „Milli Q Water Purification System“ der Firma MILLIPORE (Milford, UK) aufbereitet wurde. Der Begriff „Aqua destillata“ (Aqua dest.) steht in den Arbeitsvorschriften für derart gewonnenes Wasser, wenn es nicht anders vermerkt ist.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Versuchsprotokoll eines neuroanatomischen Experimentes

Bei neuroanatomischen Fragestellungen ist die Abfolge der durchgeführten Arbeitsschritte bis zum fertigen Präparat, das abschließend lichtmikroskopisch und / oder elektronenmikroskopisch untersucht werden soll, in der Regel sehr ähnlich (siehe Abb. 2-1). Natürlich können einzelne Arbeitsschritte bei speziellen Bedingungen entfallen, und die einzelnen Prozeduren müssen den experimentellen Gegebenheiten angepaßt werden.

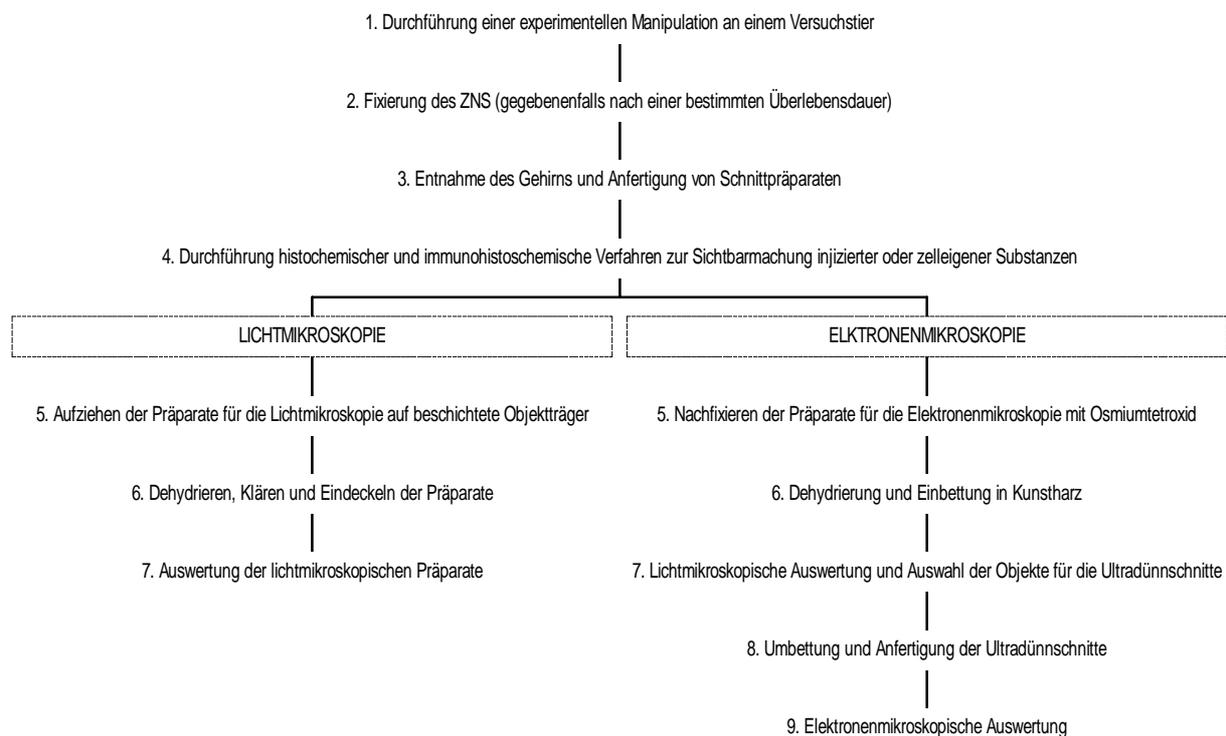


Abbildung 2-1 Allgemeiner Ablaufplan eines neuroanatomischen Experimentes [nach BOLAM, 1992]

2.3.2 Allgemeiner Versuchsablauf

In den hier durchgeführten Experimenten wurden Tracer gemäß stereotaktischer Koordinaten lokal in definierte Hirnregionen von Ratten injiziert. Der experimentelle Ansatz für *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin (PHA-L) und Fluoro-Gold™ (FG) kann den Tabellen 2-1 bzw. 2-2 am Ende dieses Abschnittes entnommen werden. Die folgende Abbildung (2-2) skizziert den Versuchsaufbau für die iontophoretische Applikation der Tracer.

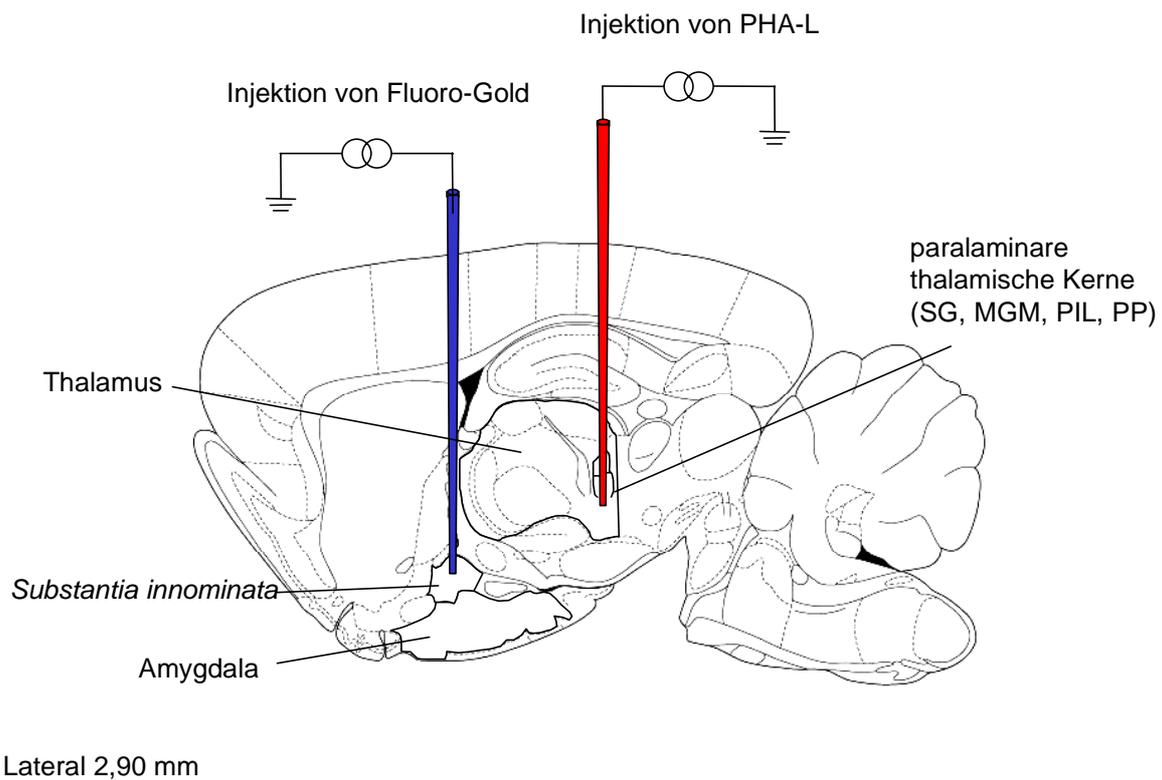


Abbildung 2-2 Schematisierter Versuchsaufbau der Tracer-Injektion [Hirnschnitt nach PAXINOS und WATSON, 1998; Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis]

Nach den Tracer-Injektionen betrug die Überlebenszeit der Tiere 10-13 Tage. Anschließend wurden die Ratten mit Fixationslösung perfundiert, das Gehirn entnommen und Schnittserien angefertigt. Mit den Schnitten wurden folgende histochemische und immunhistochemische Verfahren zur Sichtbarmachung injizierter oder zelleigener Substanzen durchgeführt:

- Nissl-Färbung
- Immunreaktion mit Anti-PHA-L, Avidin-Biotin-Komplex- (ABC)-Reaktion, Schwermetall intensivierte Diaminobenzidin- (DAB)-Reaktion
- Immunreaktion mit Anti-Fluoro-Gold, Peroxidase-Anti-Peroxidase- (PAP)-Reaktion, DAB-Reaktion
- Immunreaktion mit Anti-Cholinacetyl-Transferase, ABC-Reaktion, DAB-Reaktion
- Immunreaktion mit Anti- γ -Aminobuttersäure (GABA), PAP-Reaktion, DAB-Reaktion
- Abschließend erfolgte die Herstellung licht- und elektronenmikroskopischer Präparate und ihre Auswertung.

Tabelle 2-1 Experimenteller Ansatz für PHA-L

Präparation:	2,5 % PHA-L in 0,01 M Phosphatpuffer (PB) pH = 8,0
Injektion:	iontophoretisch, Gleichstrom +5 μ A, An/Aus-Zyklus 5 s für 10 min
Überlebenszeit:	10-13 Tage
Perfusionsfixation:	4 % Paraformaldehyd, 15 % gesättigte Pikrinsäure, 0,1 % Glutaraldehyd in 0,1 M PB pH = 7,2-7,4
Lokalisation:	ABC-Methode

Tabelle 2-2 Experimenteller Ansatz für Fluoro-Gold

Präparation:	4 % Fluoro-Gold in Aqua dest.
Injektion:	iontophoretisch, Gleichstrom +5 μ A, An/Aus-Zyklus 5 s für 10 min
Überlebenszeit:	10-13 Tage
Perfusionsfixation:	4 % Paraformaldehyd, 15 % gesättigte Pikrinsäure, 0,1 % Glutaraldehyd in 0,1 M PB pH = 7,2-7,4
Lokalisation:	PAP-Methode

2.4 In vivo Tracer-Injektion

2.4.1 Chirurgische Prozeduren

Anästhesie

Die Tiere wurden zunächst in tiefe Narkose versetzt. Dazu wurde eine intraperitoneale Injektion (30 mg / kg Körpergewicht) Pentobarbital-Natrium (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA) gefolgt von einer intramuskulären Injektion (1,5 ml / kg Körpergewicht) folgender Zusammensetzung: 23 mg / ml (S)-Ketaminhydrochlorid (Ketanest®; PARK-DAVIS, Berlin, D), 1,1 mg / ml Xylazinhydrochlorid (Rompum®; BAYER VITAL, Leverkusen, D) und 0,3 mg / ml Acepromazinmaleat (Ventranquil®; ALBRECHT, Aulendorf, D) (LINKE *et al.*, 1999). Details zur Zusammensetzung und Dosierung der Anästhetika können dem Anhang A.2 entnommen werden. Die Kontrolle der Narkosetiefe erfolgte mit einem Test auf Reaktionen nach Druckreiz (Ohr, Zehen).

Operativer Eingriff

Nach Entfernung der Schädelbehaarung wurden das narkotisierte Versuchstier in ein stereotaktisches Gerät (STOELTING, Wood Dale, IL, USA) eingespannt. Dann erfolgte die Durchtrennung der Kopfhaut durch einen Sagittalschnitt. Nach Freilegung der Schädelkalotte wurden anhand eines topographischen Atlas des Rattengehirns (PAXINOS und WATSON, 1998) mit dem Bregma als Referenzpunkt Trepanationsbohrungen in den Koordinaten über der Substantia innominata (anteroposterior, -1,1 mm; mediolateral, -2,6 mm) und definierter thalamischer Kerngebiete (anteroposterior, -5,6 mm; mediolateral, -3,1 mm) durchgeführt. Nach vorsichtiger Durchtrennung der Hirnhäute an den Orten der Bohrungen wurden mit Tracer gefüllten Glaskapillaren auf die Oberfläche des Gehirnes abgesenkt und anschließend

in die Tiefe der Substantia innominata (dorsoventral, -7,4 mm) bzw. der thalamischen Kerne (dorsoventral, -6,2 mm) vorgetrieben. Nach Abschluß der Farbstoffapplikation (siehe 2.4.2) erfolgte die Schließung der Operationswunde mit Wundklammern. Die Überlebenszeit der Tiere betrug 10-13 Tage.

2.4.2 Farbstoffapplikation

Die Glaskapillaren wurden aus Borsilicat-Kapillaren (1,5 mm OD x 1,17 mm ID mit Filament) der Firma CLARK Electromedical Instruments (Berkshire, UK) auf einem Ziehgerät (PP 83; NARISHIGE Scientific Instrument Lab, Tokyo, Japan) gezogen (Einstellung 1. 12 μ A, 2. 10 μ A). Die Elektroden wurden mit der Spitze in die Tracer-Lösungen getaucht, wobei sich die Spitze aufgrund der Kapillarkräfte füllte.

Die Applikation der Tracer erfolgte iontophoretisch mit Hilfe einer MIDGARD Präzisionsgleichstromquelle (STOELTING, Wood Dale, IL, USA). Angelegt wurde ein positiver Strom von 5 μ A in einem fünfsekündigen An-Aus-Zyklus für 10 min. Abschließend wurde die Glaskapillare für weitere fünf Minuten bei 0 μ A im Tier belassen, um das Austreten restlichen Tracers in den Einstichkanal zu minimieren.

2.5 Fixation mittels Perfusion

Zunächst erhielten die Versuchstiere eine intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis Pentobarbital-Natrium (120 mg / kg Körpergewicht). In tiefer Narkose wurde der Bauchraum eröffnet und das Diafragma freigelegt. Als nächstes wurde das Brustbein am untersten Rippenbogen durchtrennt und das Diafragma vom Brustkorb gelöst. Zugang zum Herzen wurde durch einen Schnitt entlang des Brustbeines in Richtung des Kopfes und Spreizung der Brustkorbhälften mit Hilfe einer Spreizklemme erreicht. Alternativ wurde beidseitig unterhalb der Rippenbögen entlang präpariert, die Rippen weit seitlich durchtrennt und der restliche Brustkorb abgehoben. Nachfolgend wurde die Injektionskanüle in die Spitze des linken Ventrikels eingeführt und vorsichtig in die aufsteigende Aorta vorgeschoben. Anschließend erfolgte ein Schnitt in das rechte Atrium um einen freien Abfluß des Blutes zu gewährleisten. Nach erfolgtem Zugang wurde zunächst für ein bis zwei Minuten eine Spüllösung (0,9 % NaCl) perfundiert, gefolgt von einer Fixierungslösung aus 4 % Paraformaldehyd (PFA; ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, Fort Washington, PA, USA) in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (PB) pH = 7,2-7,4 der optional 15 % gesättigte Pikrinsäure (FLUKA, Buchs, CH) und

0,1 % Glutaraldehyd (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES) zugesetzt wurden. Die Perfusionslösungen wurden entweder über eine Schlauchpumpe (MINI-S 860; ISMATEC Instruments, Zürich, CH mit dem Pumpenkopf (MASTERFLEX 7014-20; COLE-PARMER Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA) oder über einen gebräuchlichen Infusionsständer zugeführt.

Die Dauer und Durchflußraten entsprachen den Versuchserfordernissen und Größen der Tiere (siehe Tab. 2-3).

Tabelle 2-3 Perfusionbedingungen für eine Ratte

Anwendung	Gewicht	Dauer	Lösung	Rate
Fixation für rein histochemische Färbemethoden (z.B. Nissl, AChE) (intensive Fixation)	ca. 300 g	2 min 10 min 20 min	Spüllösung Fixativ Fixativ	40 ml/min 40 ml/min 20 ml/min
Fixation für Fluoreszenz-Färbung (leichte Fixation)	ca. 200 g	1 min 5 min 10 min	Spüllösung Fixativ Puffer	20 ml/min 20 ml/min 20 ml/min
Fixation für Immunhistochemie	ca. 300 g	2 min 15 min 2-12 h bei 4 °C	Spüllösung Fixativ Fixativ (ohne Glutaraldehyd)	20 ml/min 20 ml/min Nachfixierung

2.6 Entnahme und Sektionierung des Gehirns

Nach erfolgreicher Perfusion wurde der Kopf der Tiere vom Rumpf getrennt. Anschließend wurde die Haut über der Schädeldecke durchtrennt, durch Abtragung von Teilen der Schädelknochen das Gehirn freigelegt und dieses entnommen.

Um einen Gewebeblock mit definierten Hirnregionen zu erhalten, wurde der Kopf in ein stereotaktisches Gerät (STOELTING) eingespannt. Nach Entfernung der Schädeldecke konnten dann mit einer in einen Mikromanipulator eingespannten Rasierklinge definierte Schnitte ausgeführt werden.

Für die Lichtmikroskopie wurden die Schnittpräparate sowohl aus gefrorenem Gewebe mittels Gefriermikrotom (siehe 2.6.1), als auch aus ungefrorenem Gewebe mit Hilfe eines Vibratoms (siehe 2.6.2) hergestellt. Für die Elektronenmikroskopie wurde zur Anfertigung der Schnitte ausschließlich ein Vibratom verwendet, insbesondere da durch den Gefriervorgang die Ultrastruktur des Gewebes stark beeinträchtigt wird.

2.6.1 Schneiden mit dem Gefriermikrotom

Zum Schneiden mit dem Gefriermikrotom wurden die Präparate nach der Postfixation in eine 20-30 % Saccharoselösung gegeben und dort aufbewahrt, bis sie auf den Boden des Aufbewahrungsgefäßes abgesunken waren (18-24 h).

Das Schneiden erfolgte auf dem Gefriermikrotom Leica 1325 der Firma LEITZ (Wetzlar, D). Zunächst wurde auf dem Gefrierblock ein Sockel aus dem Gefriermittel gegossen, auf dem der Gewebeblock aufgesetzt wurde. Nach dem dieser vollständig durchgefroren war, wurden 48 µm dicke Schnitte erzeugt und in vier Serien in mit Natriumphosphatpuffer gefüllten Microwell-Platten gesammelt.

2.6.2 Schneiden mit dem Vibratom

Zunächst wurde der Gewebeblock mit lösungsmittelfreiem Sekundenkleber auf ein Metallblöckchen geklebt. Dieser wurde in die entsprechende Halterung des Vibratoms (Series 100; TED PELLA, Redding, CA, USA) eingespannt. Dann wurde das Gerät mit Phosphatpuffer oder Phosphat gepufferter Kochsalz-Lösung befüllt. Die Schnittdicke betrug 50 µm. Auch hier wurden vier Serien gesammelt.

2.7 Histochemie und Immunhistochemie

2.7.1 Nissl-Färbung

Neurone enthalten die Nisslsubstanz, die vor allem aus rauhem endoplasmatischem Reticulum besteht. Dessen Menge, Form und Verteilung variiert in den verschiedenen Neuronentypen. Wegen des Anteils an Ribonukleinsäuren ist die Nisslsubstanz sehr basophil und wird daher gut durch basische Anilinfarbstoffe angefärbt. Abhängig vom pH-Wert und dem Grad der Differenzierung werden entweder Nisslsubstanz und Kerne oder nur die Nisslsubstanz angefärbt. Nach der Färbung mit Kresylviolett wurden die Schnitte differenziert, geklärt und eingedeckt (detaillierte Methode mit einzelnen Schritten siehe Anhang A.5).

2.7.2 Methodik der Immunhistochemie

Der Ansatz der Immunhistochemie beruht auf der Tatsache, daß sich Antikörper gegen ein Epitop sehr spezifisch an dieses binden. Grundsätzlich wird seit der ersten Beschreibung dieser Technik durch COONS und KAPLAN (1950) noch immer wie folgt vorgegangen. Zunächst wird das Gewebe mit dem Antikörper gegen die nachzuweisende Substanz inkubiert. Die im Gewebe gebundenen Antikörper markieren nun die Verteilung dieser Substanz. Bei einer direkten Methode ist dieser sogenannte Primärantikörper seinerseits mit einem Marker z.B. einem fluoreszierenden Molekül versehen, der eine Visualisierung im Mikroskop ermöglicht. Ist der erste Antikörper unmarkiert, inkubiert man das Gewebe in einem weiteren Schritt mit einem Sekundärantikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Falls ein Sekundärantikörper benutzt wird, muß dieser gegen die Immunglobuline der Wirtsspezies für den Primärantikörper erzeugt werden. Dieses Verfahren wird als eine indirekte Methode bezeichnet. Der Vorteil der indirekten Methode besteht in der signalverstärkenden Wirkung des zusätzlichen Schrittes, da mehrere Moleküle des Sekundärantikörpers am Primärantikörper binden können. Neben direkter und indirekter Methode wird noch zwischen Methoden mit sogenannten „labeled“ (markierten) und „unlabeled“ unmarkiertem Antikörpern unterschieden. Bei einem markierten Antikörper ist an dem Antikörper chemisch ein Marker gebunden. Dieser kann z.B. ein fluoreszierendes, ein enzymatisch reaktives oder ein elektronendichtes Molekül sein. Im Gegensatz dazu ist bei einer Methode mit unmarkierten Antikörpern der Marker nicht chemisch an den Antikörper gebunden, sondern reagiert immunologisch über eine Antigen-Antikörper-Reaktion.

Zur Detektierung von Molekülen in Geweben haben sich vor allem zwei immunhistochemische Methoden etabliert: die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC) und die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP). Neben der Ausnutzung immunologischer Prinzipien ist beiden Methoden gemeinsam, daß die Visualisierung letztlich über die enzymatischen Eigenschaften der Peroxidase erfolgt. Beide Methoden fanden in der vorliegenden Arbeit ihre Verwendung und werden im folgenden beschrieben.

Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (HSU *et al.*, 1981; HSU und RAINE, 1981):

Diese Methode beruht auf der Tatsache, daß Biotin mit einer hohen Affinität an Avidin, einem Glycoprotein, bindet. Zunächst wird das Gewebe entweder mit einem biotinylierten Primärantikörper inkubiert (direkte Methode) oder der Sekundärantikörper ist biotinyliert (indirekte Methode). Da das Biotin chemisch an den Antikörper gebunden ist, handelt es sich in beiden Fällen um eine „labeled“ Antikörper Methode. Das Avidin wird in Form eines

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes hinzugefügt. Da das Avidin mehrere Bindungsstellen für Biotin aufweist, wird dieser Komplex an den biotinylierten Antikörper gebunden.

Die ABC-Reaktion fand Verwendung, um die Lokalisation von *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin (siehe 2.7.3) und der Cholinacetyl-Transferase (siehe 2.7.5) zu detektieren.

Die Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (STERNBERGER *et al.*, 1970):

Bei dieser Methode handelt es sich um eine indirekte Methode mit „unlabeled“ Antikörpern. Zunächst wird das Gewebe mit einem Antikörper gegen die nachzuweisende Substanz inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Zugabe eines weiteren Antikörpers, der gegen das Immunglobulin G der Tierart gerichtet ist, indem der erste Antikörper erzeugt wurde. Bietet man den Sekundärantikörper im Überschuß an, bleibt eine der beiden Bindungsstellen des Antikörpers unbesetzt. In einem dritten Schritt wird nun der Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex hinzugegeben, der aus der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen der Peroxidase und einen gegen diese gerichteten Antikörper hervorgeht. Da der Antikörper gegen die Peroxidase in der selben Spezies wie der Primärantikörper erzeugt wurde, ist der Sekundärantikörper in der Lage diesen Komplex an einer noch freien Bindungsstelle zu binden und so als Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Komplex zu fungieren.

Mit der PAP-Methode wurden Fluoro-Gold (siehe 2.7.4) und GABA (2.7.6) detektiert.

2.7.3 Anfärbung *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin markierter Zellen

Die Lectin markierten Zellen wurden nach einer Standardprozedur für die Detektion mit der ABC-Methode und anschließender Schwermetall intensivierter DAB-Reaktion (ADAMS, 1981) behandelt. Als erstes wurden Prozeduren zur Verminderung von Hintergrund- und unspezifischer Färbung durchgeführt (vergl. A.10). Dazu gehörte stets eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur Blockierung endogener Peroxidasen (A.10.2), der teilweise eine Reaktion mit Natriumborhydrid (A.10.1) voraus ging. Die immuncytochemische Detektion erfolgte mit biotinyliertem Anti-PHA-L (1:800; VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit 1 % Normalserum (Ziege) in PBS entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4 °C. Danach wurden die Schnitte für 90 bis 120 min mit ABC-Elite-Lösung (1:114; VECTOR Laboratories) inkubiert. Visualisiert wurde mit einer Schwermetall intensivierten (Kobaltchlorid, Nickelammoniumsulfat) DAB-Reaktion, die ein schwarzes Reaktionsprodukt erzeugt. Eine detaillierte Ausführung der einzelnen Schritte ist dem Anhang A.11 zu entnehmen.

2.7.4 Anfärbung Fluoro-Gold markierter Zellen

Fluoro-Gold ist ein fluoreszierender Farbstoff, dessen Anregung im ultravioletten Bereich (410 nm) erfolgt. Für die Rekonstruktion der Fasern und für die Elektronenmikroskopie war es jedoch nötig DAB gefärbte Dauerpräparate herzustellen. Zunächst wurde der Farbstoff mit einem Antikörper markiert (Anti-Fluoro-Gold, 1:10.000; CHEMICON International, Temecula, CA, USA). Die Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung (Anti-FG, 1 % Normalserum (Ziege) in PBS) erfolgte entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4 °C. Für die PAP-Methode wurden die Schnitte in Ziegen Anti-Kaninchen Immunglobulin G (1:100; DAKO, Glostrup, DK) in PBS für 90 min inkubiert. Es folgte die Reaktion mit Kaninchen-PAP (1:100; DAKO) in PBS für 60 min. Abschließend wurde die Visualisierung des PAP-Komplexes mit einer nicht intensivierten DAB-Reaktion durchgeführt, die ein braunes Reaktionsprodukt liefert. Eine detaillierte Ausführung der einzelnen Schritte ist dem Anhang A.12 zu entnehmen.

2.7.5 Cholinacetyl-Transferase- (ChAT-)Immunhistochemie

Die Verteilung der Cholinacetyl-Transferase wurde immunhistochemisch gezeigt. Die Visualisierung der mit dem gegen das Enzym gerichteten Antikörper markierten Zellen erfolgte mit der ABC-Methode. Die Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung (Anti-ChAT, 1:5; BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim, D) mit 20 % Normalserum (Ziege) (GNS), 2 % Rinderserum Albumin (BSA), 5 % Saccharose in PBS (additiv 0,3 % Triton-X (BOEHRINGER MANNHEIM) für Lichtmikroskopie) erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Für die ABC-Methode wurden die Schnitte zunächst für 90 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Ratte-Immunglobulin G, 1:200; DAKO, Glostrup, DK) mit 20 % GNS, 2 % BSA, 5 % Saccharose in PBS (additiv 0,3 % Triton-X für Lichtmikroskopie) inkubiert. Es folgte die Reaktion mit der ABC-Elite-Lösung (1:114; VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 90 min, die mit frischer ABC-Lösung wiederholt wurde. Abschließend wurde der ABC-Komplex mit einer nicht intensivierten DAB-Reaktion gefärbt. Eine detaillierte Ausführung der einzelnen Schritte kann dem Anhang A.13 entnommen werden.

2.7.6 γ -Aminobuttersäure- (GABA-)Immunhistochemie

Zum Nachweis GABAerger Zellen wurde mit einem Antikörper gegen GABA inkubiert (Anti-GABA, 1:1.000; SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Die Reaktion der Primärantikörper-Lösung (Anti-GABA, 10 % Normalserum (Ziege), 2 % Rinderserum Albumin, 5 % Saccharose in PBS) wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die PAP-Methode wurden die Schnitte zunächst für 90 min mit dem Sekundärantikörper Ziegen Anti-Kaninchen Immunglobulin G (1:100; DAKO, Glostrup, DK) in PBS inkubiert, gefolgt von der Reaktion mit Kaninchen-PAP (1:100; DAKO) in PBS für 60 min. Schließlich wurde die Färbung des PAP-Komplexes mit einer nicht intensivierten DAB-Reaktion durchgeführt. Eine detaillierte Ausführung der einzelnen Schritte ist dem Anhang A.14 zu entnehmen.

2.8 Einbetten der Proben für die lichtmikroskopische Auswertung

Die gefärbten Schnittpräparate wurden für die Lichtmikroskopie auf mit Chrom-Alaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, geklärt und in DePeX (BOEHRINGER INGELHEIM Bioproducts Partnership, Heidelberg, D) eingebettet. Die detaillierte Ausführung der einzelnen Schritte ist den Anhängen A.6 und A.16 zu entnehmen.

2.9 Bearbeiten der Schnitte für die (Transmissions-)Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Vibratomschnitte verwendet, bei denen die doppeltmarkierten Zellen, wie unter 2.7.3 und 2.7.4 beschrieben, angefärbt worden waren. Zunächst erfolgte eine Nachfixierung mit 1 % Osmiumtetroxid (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, Fort Washington, PA, USA) für 60 min und anschließend eine Kontrastierung mit 1 % wässriger Uranylacetat-Lösung für ebenfalls 60 min. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit dem Einbettmedium (Durcupan ACM[®]; FLUKA, Buchs, CH) einem Kunstharz auf Epoxid-Basis infiltriert und flach eingebettet. Nach der Aushärtung des Harzes erfolgte eine lichtmikroskopische Auswertung, bei der die Proben für die Ultramikrotomie ausgewählt wurden. Eine detaillierte Ausführung der einzelnen Schritte ist in Anhang A.17 beschrieben.

2.10 Ultramikrotomie

2.10.1 Herstellen von Glasmessern

Die Herstellung der Glasmesser erfolgte am Messerbrechgerät LKB 2178 Knife Maker II (REICHERT-JUNG Optische Werke, Wien, A). Als Ausgangsmaterial dienten Glasstreifen (400 mm x 25 mm x 6 mm) der Firma LKB-PRODUKTER AB (Bromma, S).

Zu Beginn wurden die benötigten Glasstreifen mit einem handelsüblichen Spülmittel gereinigt und getrocknet. Als nächstes wurden die Glasstreifen mit der markierten Seite nach unten (für Messerwinkel $\leq 45^\circ$) in das Messerbrechgerät eingelegt. Mit dessen Hilfe wurden dann Quadrate von dem Glasstreifen abgebrochen, die nach einer Diagonalritzung in die eigentlichen Messer ("Dreiecksklinge") halbiert wurden.

Abschließend wurden die Messer mit einem Trog (LKB-PRODUKTER AB) versehen. Die Tröge haben den Zweck, das Wasser aufzunehmen, auf dem die Schnitte aufflottieren. Dazu wurden die Kanten der Tröge, die später dem Messer aufliegen, mit flüssigen Modellierwachs (DITZEL, Meckesheim, D) bestrichen und dann der Trog mit der offenen Seite bündig mit der Klinge aufgesetzt.

2.10.2 Grids

Als Objektträger für elektronenmikroskopischen Präparate dienen feine Netzen (engl. Grids). In dieser Arbeit wurden Lochnetzen „single-slot“ mit einem Überzug aus Kupfer verwendet (PLANO, W. PLANNET, Wetzlar, D), die mit einer Trägerfolie aus Formvar beschichtet wurden. Die Formvar-Lösung bestand aus 0,35 % Formvar 15/95 (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, Fort Washington, PA, USA) in Dioxan (MERCK, Darmstadt, D). Die Herstellung der Trägerfolie ist im A.7 beschrieben.

2.10.3 Herstellung der Gewebsblöcke

Nach der Aushärtung des Kunstharzes erfolgte das Ausschneiden der interessierenden Bereiche der Schnittpräparate mit einer Rasierklinge und das „Aufkleben“ mit Kunstharz in der gewünschten Orientierung auf vorbereitete Kunstharzblöckchen.

Im Präparatbereich der Kunstharzblöcke wurden unter einem Stereomikroskop mit einer Rasierklinge abgestumpfte Pyramiden geschnitten. Für die Herstellung von Schnittbändern sind trapezförmige oder rechteckige Anschnittsflächen am geeignetsten (Länge der Schnittkanten 0,5-1,0 mm).

2.10.4 Schneiden mit dem Ultramikrotom

Das Herstellen von Semi- und Ultradünnschnitten erfolgte mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut E; REICHERT-JUNG Optische Werke, Wien, A). Um zu gewährleisten, daß das Gewebe wirklich an der Oberfläche lag und als Orientierungshilfe für die elektronenmikroskopische Auswertung, wurden vor dem Ultradünnschneiden Semidünnschnitte (0,5-1,0 μm) angefertigt und nach RICHARDSON (Azur II / Methylenblau (detaillierte Methode siehe A.9)); RICHARDSON *et al.*, 1960) gefärbt. Abschließend wurden die in den Trögen flottierenden Schnitte auf die unter 2.10.2 beschriebenen Grids übertragen. Die Schnittdicke der Ultradünnschnitte wurde aufgrund der Interferenzfarben der Schnitte beurteilt. Ideale Schnittstärken für die Ultradünnschnitte liegen im Bereich von grau bis silbern (etwa 0,05 μm).

2.11 Auswertung

2.11.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an dem Routinemikroskop Axioskop (CARL ZEISS JENA, Jena, D). In Verbindung hierzu war das computergestützte Bildanalyse-System Neurolucida™ (MICROBRIGHTFIELD Europe e.K., Magdeburg, D) installiert. Dieses besteht aus einem Softwarepaket und diversen teils optionalen Hardwarekomponenten. Die Konfiguration des Systems, das für diese Arbeit zur Verfügung stand kann, der folgenden Übersicht (Tab. 2-4) entnommen werden:

Tabelle 2-4 Konfiguration des NeuroLucida-Systems

<ul style="list-style-type: none">• NeuroLucida (Version 2.1), Programm zum Tracen von Neuronen und zur Rekonstruktion serieller Schnitte• Windows Neurotate (Version 0.09a), Programm zur dreidimensionalen Darstellung von getrackten Neuronen• Komponenten zum Video basierten Tracen:<ul style="list-style-type: none">CCD-Videokamera System (OPTRONICS Engineering, Goleta, CA, USA),Frame-grabber-card Ultra II (CORECO, St.-Laurent, Quebec, Ca), eine Bildbearbeitungskarte für den PC,Software gesteuerter Shutter• Motorisierter Mikroskopisch mit PC-Interface• PC Pentium 100 MHz mit 32 MB RAM, Betriebssystem Windows™ 95 (MICROSOFT Corporation, Redmond, WA, USA)• 17-Zoll Monitor Sync Master 17GLsi (SAMSUNG Co, Seoul, Korea)
--

Das Arbeiten mit diesem System ähnelt der Technik des klassischen Zeichnens mit der „Kamera Lucida“, aber es hat den bedeutenden Vorteil, daß alle Daten im Computer gespeichert werden. So hat man nach Beendigung des Tracing-Prozesses spezifische morphometrische Daten direkt zur Hand. Das von einer CCD-Kamera aufgenommene aktuelle Bild eines mikroskopischen Präparates wird über den PC auf einen Monitor ausgegeben. Dieses Bild wird durch Nachzeichnen der Strukturen mit Hilfe einer Maus kopiert.

Zusätzlich stand ein Lichtmikroskop Leica DMRB (LEICA, Wetzlar, D) zur Verfügung. Dieses war mit einer Photoausrüstung verbunden (Photoautomat WILD MPS 28/32; LEICA), die zur Dokumentation der Ergebnisse diente. Fotografiert wurde mit dem Schwarzweiß-Negativmaterial AGFAPAN APX 100 (AGFA, Leverkusen, D) und dem Dia-Film Fujichrome Sensia II 400 (FUJI Photo Film, Tokyo, Japan).

2.11.2 Semiquantitative Auswertung der Markierungen

Die Intensität PHA-L und Fluoro-Gold markierter Gebiete wurde in den Präparaten der Tiere ThaB1, ThaB2 und ThaB3 semiquantitativ ausgewertet. Die Einteilung der Intensität erfolgte in vier Kategorien: keine markierten Zellen nachweisbar (-), einzelne markierte Zellkörper oder Axone (+) moderate Anfärbung (++) und starke Anfärbung (+++).

Im ersten Schritt wurden die rekonstruierten Schnitte entsprechend dieser Einteilung tabellarisch erfaßt (Rohdaten, siehe A.19). Anschließend wurde für die einzelnen Kerngebiete bei gleichmäßiger bzw. diffuser Verteilung die Färbeintensität über alle Schnitte durch dieses Gebiet gemittelt. Bei erkennbarer Polarisierung, z.B. in rostralen versus caudalen Bereichen in einem Kerngebiet, wurden diese Regionen getrennt ausgewertet. Abschließend erfolgte die Einteilung für ein gesamtes Kerngebiet bzw. einen Unterbereich in die obigen Kategorien.

Die tabellarischen Auflistungen der Befunde in den Ergebnisteilen (3.2.1 bis 3.2.3) entsprechen diesem Schema. Zur Herausarbeitung genereller Tendenzen wurde darüber hinaus für alle Kerngebiete ein Färbeindex (= Index) berechnet. Dieser entspricht dem Mittelwert der Kategorien (Numerischer Wert der Anzahl der Pluszeichen, d.h. 0, 1, 2, 3) über alle Tiere, bei denen dieses Kerngebiet erfaßt werden konnte.

2.11.3 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Schnitte wurden an einem Transmissions-Elektronenmikroskop EM 900 (ZEISS, Oberkochen, D) bei 80 kV ausgewertet und auf dem Film Kodak SO-163 (EASTMAN KODAK Company, Rochester, NY, USA) dokumentiert.

3 Versuchsergebnisse

3.1 Injektionsorte

Gemäß der Zielsetzung dieser Arbeit sollten die Injektionen an folgenden Orten erfolgen: die Applikation des anterograden Tracers PHA-L in den posterioren paralaminaren Kernen des Thalamus (Nucleus suprageniculatus (SG), Corpus geniculatum medialis, pars medialis (MGM), Nucleus intralaminaris posterior (PIL)), die des retrograden Tracers Fluoro-Gold in das cholinerge basale Vorderhirn namentlich in die Substantia innominata. Die erforderlichen Koordinaten wurden dem Atlas von PAXINOS und WATSON (1998) entnommen. In Tabelle 3-1 sind Details zu den durchgeführten Injektionen aufgelistet. Es wurden alle Experimente erfaßt, bei denen nach Injektionen von Tracer in das basale Vorderhirn und / oder den Thalamus sowie erfolgreicher immunhistochemischer Behandlung Injektionsstellen in den Präparaten identifizierbar waren. Die Bedeutung der verwendeten anatomischen Abkürzungen kann dem Abkürzungsverzeichnis am Anfang dieser Arbeit entnommen werden.

Tabelle 3-1 Liste der Experimente: Injektionsorte, Überlebenszeiten und Innendurchmesser der Elektroden spitzen

Experiment	Injektionsort FG	Durchmesser [µm]	Injektionsort PHA-L	Durchmesser [µm]	Überlebenszeit [d]
LE 980528-1	--	--	MGV	30	11
LE 980528-2	--	--	SG, MGM	40	11
LE 980602-1	opt	--	--	50	13
LE 980602-2	opt	50	--	50	13
LE 980609-1	Me	--	PIL	60	13
LE 980609-2	opt	40	DpMe	40	13
LE 980616-1	LOT	--	SN	50	13
LE 980616-2	Me	60	PIL	40	13
LE 980623-1	SO / opt	--	SN	--	13
LE 980623-2	opt	40	SN	50	13
LE 980630-1	Me	50	--	--	13
LE 980630-2	SO / opt	60	SN / (MGM)	60	13
LE 980707-1 ThaB1	SI	60	PIL / PP	50	13
LE 980707-2	SI	--	--	50	13
LE 980714-1	B / SI	20	APT	45	13
LE 980714-2	B / LH	25	SG	30	13
LE 980721-1	B / SI	25	--	25	13
LE 980721-2 ThaB2	SI	30	MGM / PIL	25	13
WI 980728-1	LH	60	--	30	13
WI 980728-2	SI / LH	--	SN	50	13
WI 980804-1	--	30	SN	50	13
WI 980903-1 ThaB3	SI	50	PIL	30	11
WI 980903-2	LH	50	--	30	11
WI 980915-1 ThaB4	--	50	MGM / PIL	50	13
WI 980915-2	LH	--	SG, MGM	20	13

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 3-1 Fortsetzung

Experiment	Injektionsort FG	Durchmesser [µm]	Injektionsort PHA-L	Durchmesser [µm]	Überlebenszeit [d]
LE 980922-1	AAD	--	MGV / PP	30	13
LE 980922-2	--	40	MGV	40	13
LE 980929-1	SI	50	DG / PoDG	40	13
LE 980929-2	LH	30	PIL	40	13
LE 990202-2 ThaB7	SI	50	SG / MGM	30	10
LE 990210-2 ThaB8	SI	40	PIL	20	12
LE 990216-1	B	20	--	30	13
LE 990216-2	--	40	MGM / PIL	30	13
LE 990309-1	SI	30	DpMe	20	13
LE 990309-2 ThaB10	--	30	MGM / PIL	40	13

LE = Long-Evans, WI = Wistar

3.1.1 Injektionen mit *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin

Unter dem Lichtmikroskop war eine Injektionsstelle von PHA-L (visualisiert mit einer Schwermetall intensivierten DAB-Färbung) anhand folgender Charakteristika zu identifizieren. Die direkte Austrittsstelle war in der Regel durch einen dunkelbraunen ovoiden Bereich markiert, der unter den Versuchsbedingungen eine Längsausdehnung von 150-400 µm und eine Querausdehnung zwischen 100-300 µm aufwies. Umgeben war dieser zentrale durch einen helleren Bereich mit einer maximalen Länge zwischen 1000-2000 µm und einer maximalen Breite von 600-1000 µm. In den Präparaten mit Nissl-Färbung ließ sich der Injektionsort bzw. der Einstichkanal häufig anhand von nekrotischem Gewebe nachweisen, angezeigt durch eine starke Anhäufung tiefblau gefärbter Zellkerne. Die folgenden Abbildungen (3-1 bis 3-3) zeigen eine typische Injektionsstelle von PHA-L (Abb. 3-1) sowie deren Erscheinungsform nach Nissl-Färbung (Abb. 3-2). Der Abstand zwischen den beiden Schnitten beträgt 100 µm, wobei das Nissl-Bild die rostralere Ansicht zeigt. Die dritte Abbildung (Abb. 3-3) zeigt eine Übersicht aller nachgewiesenen PHA-L-Injektionen.

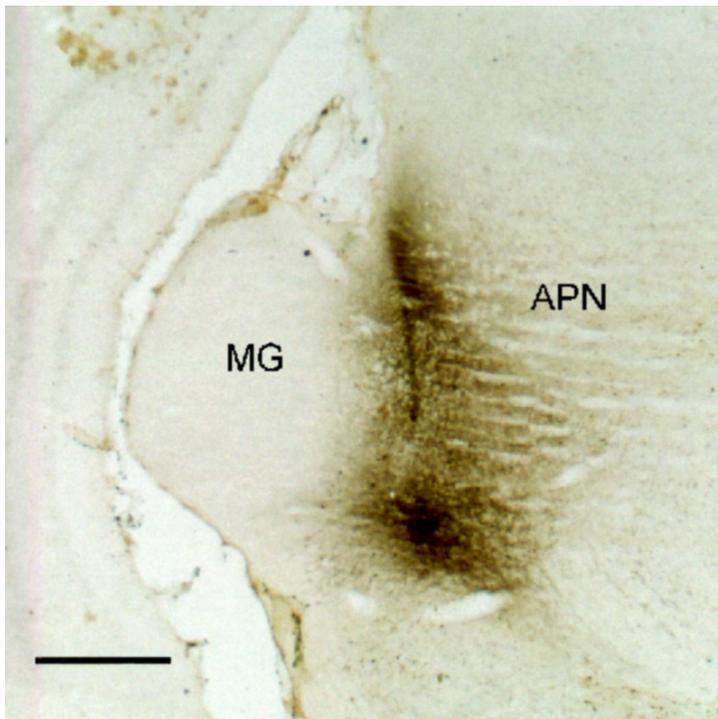


Abbildung 3-1 Mikrofotografie einer Injektionsstelle von PHA-L in die paralaminaeren thalamischen Kerne Corpus geniculatum mediale, pars medialis und Nucleus intralaminaris posterior (Maßstab = 500 µm).

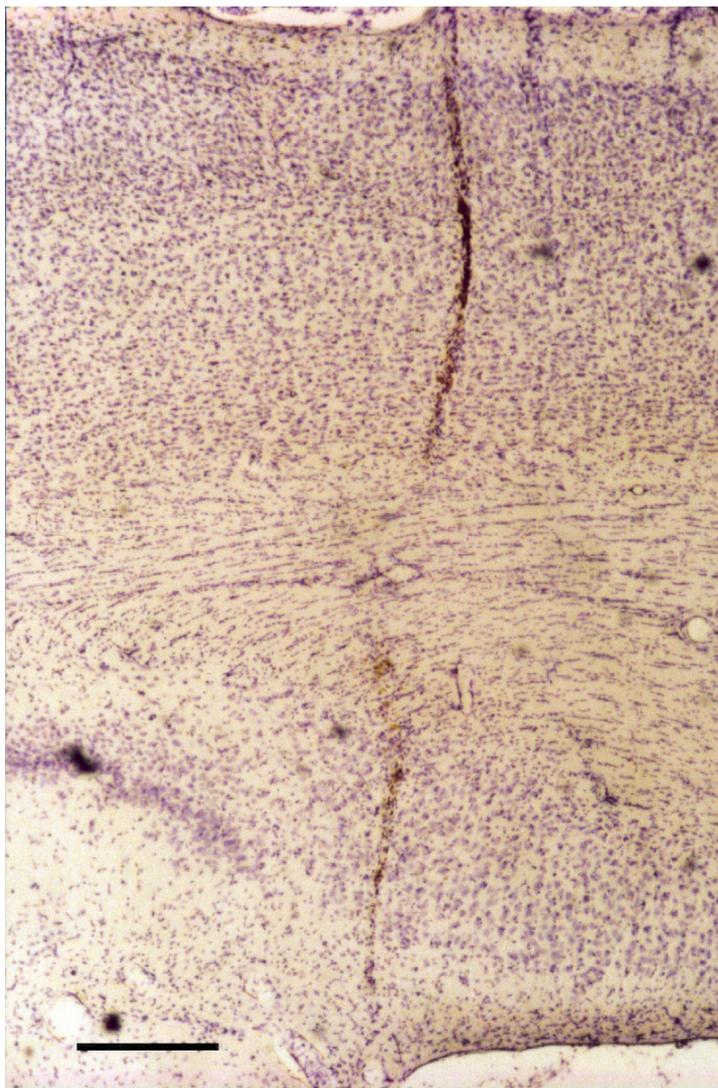


Abbildung 3-2 Mikrofotografie, die den Injektionskanal obiger Injektionsstelle (Abb. 3-1) in der Nissl-Färbung zeigt (Maßstab = 250 µm).

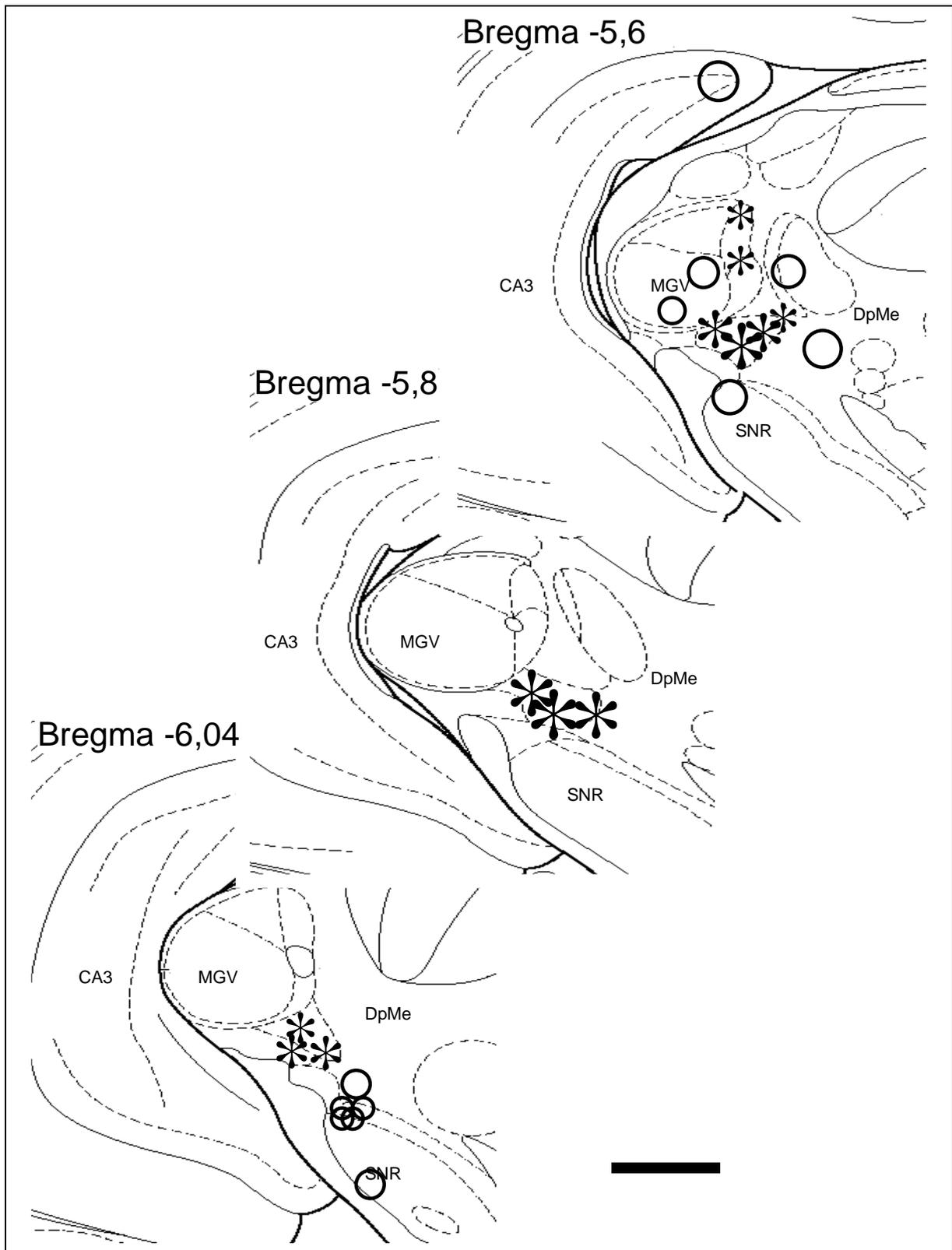


Abbildung 3-3 Zeichnung einer Abfolge von frontalen Schnitten im Bereich des Thalamus, welche die Lage und die Ausdehnung der Injektionsstellen von PHA-L zeigt. Die Markierungen (Sternchen, Kreise) symbolisieren den Durchmesser der Injektion (ungefähre Größe). Sternchen zeigen Injektionsorte an den gewünschten Koordinaten, Kreise markieren Fehl-injektionen (Maßstab = 1000 μ m) [modifiziert nach PAXINOS und WATSON, 1998].

3.1.2 Injektionen mit Fluoro-Gold

Der Injektionsort von Fluoro-Gold (visualisiert mit einer DAB-Färbung) stellte sich lichtmikroskopisch in der Regel durch einen bräunlichen, ovoiden Bereich mit einer maximalen Länge zwischen 1200-1500 μm und einer Breite von 1100-1200 μm dar. Teilweise zeigte sich auch hier ein etwas dunkler gefärbter Kernbereich, dessen Größe in etwa der des dunkel gefärbten Bereichs einer PHA-L-Injektion entsprach. Auch hier ließen sich Einstichkanal und / oder Injektionsort in Nisslgefärbten Präparaten nachweisen. Die drei folgenden Abbildungen (3-4 bis 3-6) zeigen eine typische Fluoro-Gold-Injektion (Abb. 3-4), das entsprechende Nissl-Bild (100 μm , anterior) (Abb. 3-5) sowie eine Übersichtszeichnung der nachgewiesenen Injektionsorte (Abb.3-6).

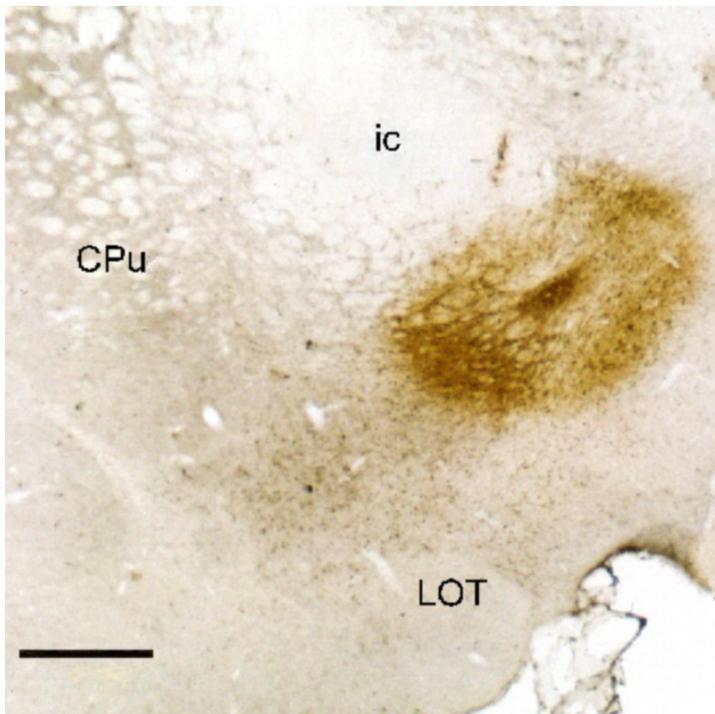


Abbildung 3-4 Mikrofotografie einer Injektion von Fluoro-Gold in die Substantia innominata (Maßstab = 500 μm).

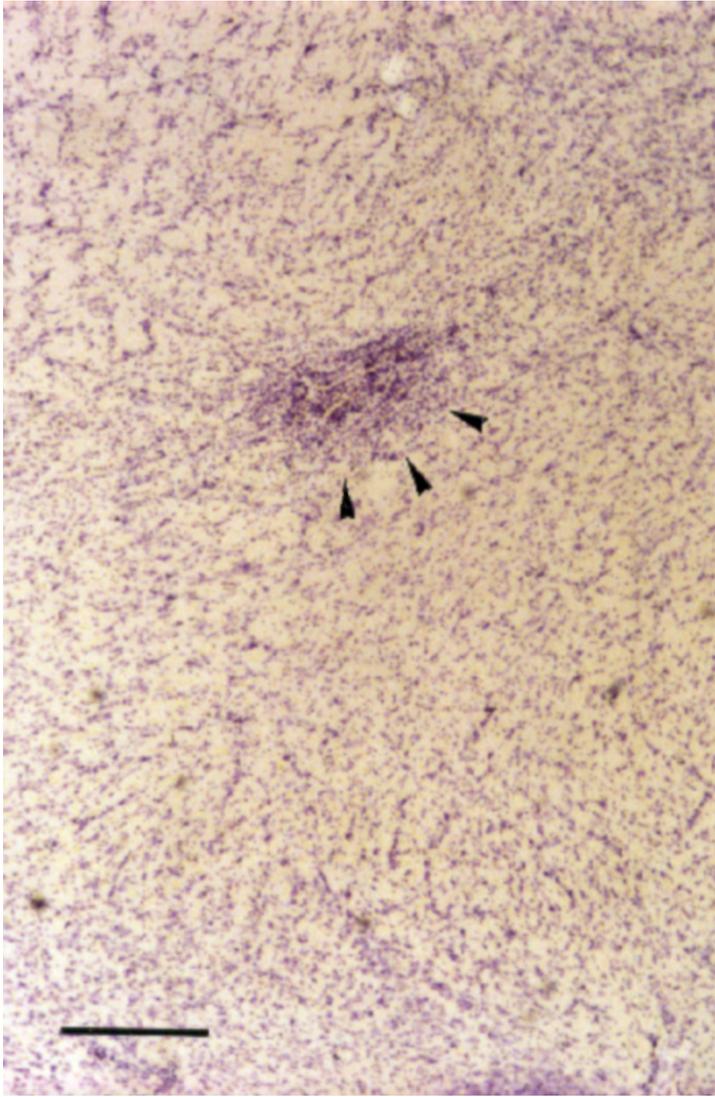


Abbildung 3-5 Mikrofotografie, die obige Injektionsstelle (Abb. 3-4) in der Nissl-Färbung zeigt. Zu sehen ist nekrotisches Gewebe im direkten Bereich des Injektionsortes (dunkel gefärbt) (Maßstab = 250 μm).

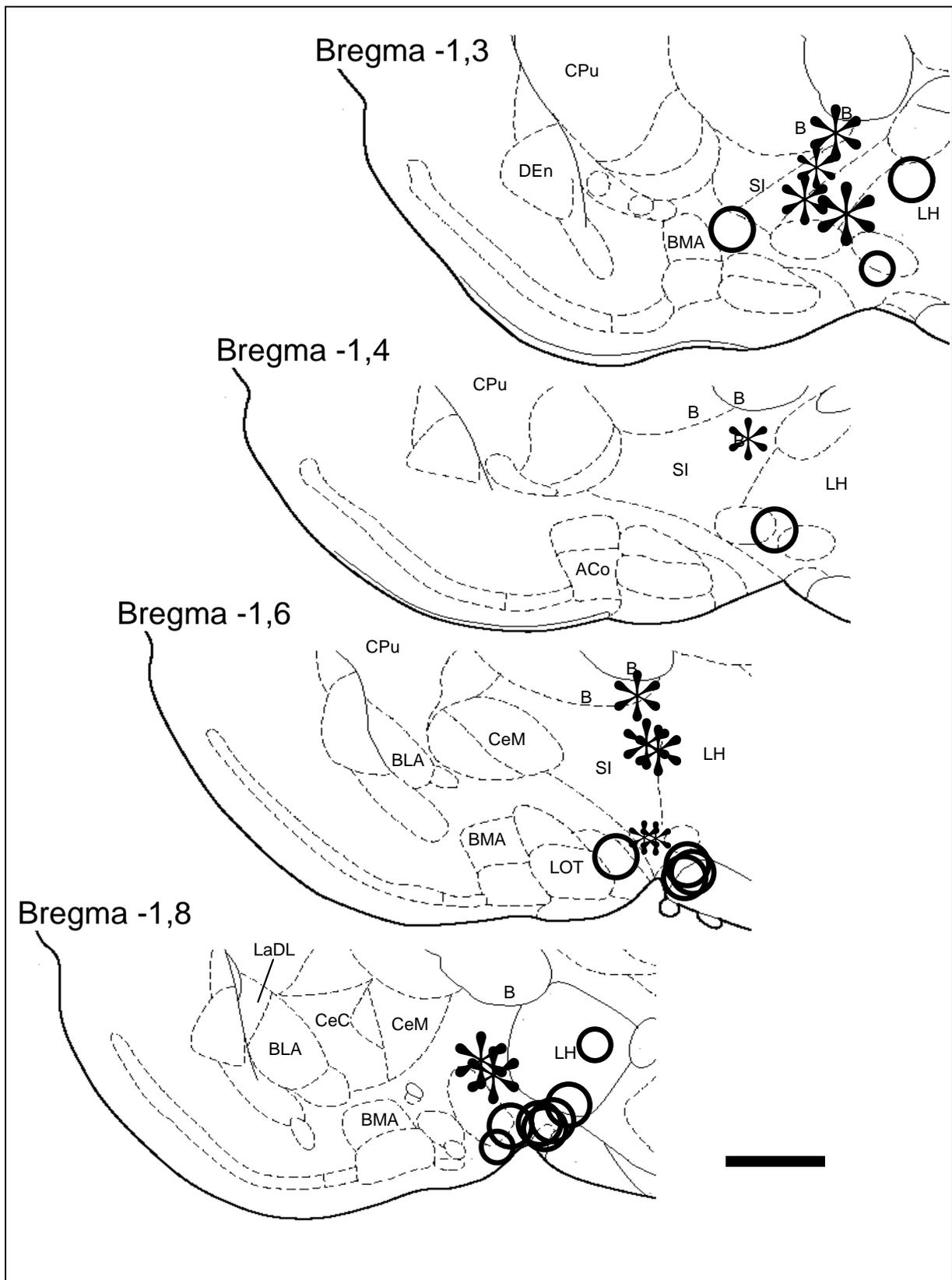


Abbildung 3-6 Zeichnung einer Abfolge von frontalen Schnitten im Bereich des basalen Vorderhirns, welche die Lage und die Ausdehnung der Injektionsstellen zeigt. Die Symbole markieren den FG-Spot. Sternchen zeigen Injektionen in die gewünschten Koordinaten, Kreise symbolisieren Fehlinjektionen (Maßstab = 1000 μ m) [modifiziert nach PAXINOS und WATSON, 1998].

3.2 Semiquantitative Auswertung der Markierungen

Um die Ausprägung der identifizierten Verbindungen zu quantifizieren, wurde eine semiquantitative Analyse der Färbintensität in den PHA-L und Fluoro-Gold markierten Kerngebieten durchgeführt. Das dabei angewendete Einteilungsschema mit den vier Kategorien (-), (+), (++) und (+++) wurde bereits im Methodenteil dieser Arbeit (2.11.2) vorgestellt.

3.2.1 Auswertung der mit PHA-L markierten Kerngebiete

Nach iontophoretischer Injektion von PHA-L in die paralaminaren Kerne des Thalamus zeigten sich anterograde Anfärbungen von Axonen in einer Vielzahl von amygdalären Kerngebieten. Dabei ist zu beachten, daß die Injektionen in den verschiedenen Versuchen überlappend in die thalamische Region des Nucleus suprageniculatus (SG), des Genuculatum mediale, pars medialis (MGM) und dem Nucleus intralaminaris posterior (PIL) erfolgte. Diese Kerngebiete weisen ein differenziertes Projektionsmuster zur Amygdala auf (LINKE *et al.*, 2000 eingereicht). Die folgenden Abbildungen (3-7 bis 3-9) zeigen exemplarisch die Färbintensität verschiedener mit PHA-L markierter Kerngebiete, die jeweils zur Einteilung in die entsprechenden Kategorien führte.

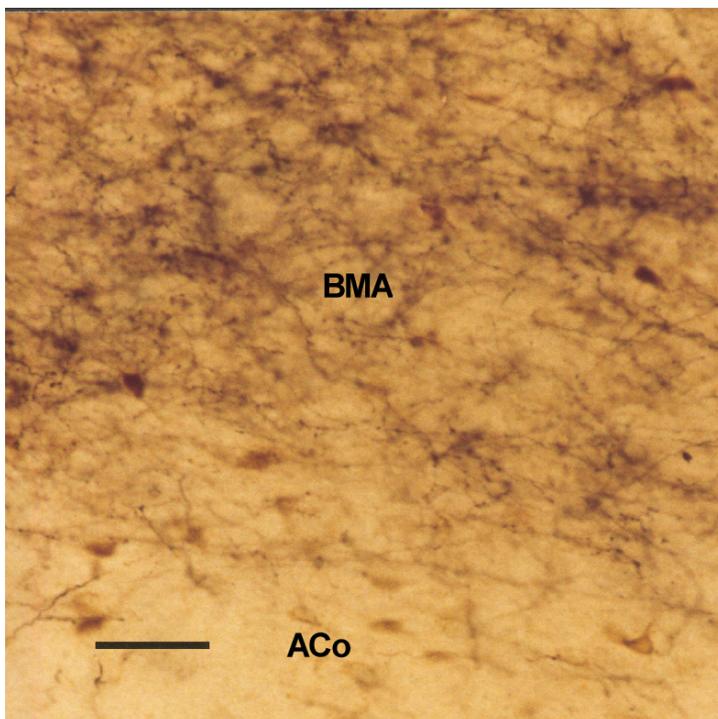


Abbildung 3-7 Mikrofotografie einer Region im Nucleus basomedialis anterior, mit einer hohen Dichte PHA-L markierter Strukturen (+++) (Maßstab = 100 µm).

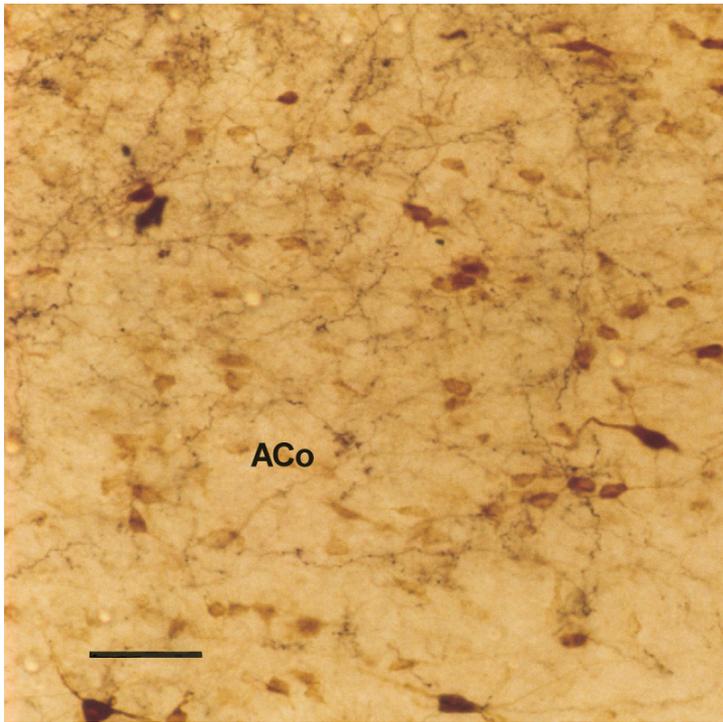


Abbildung 3-8 Mikrofotografie einer Region im Nucleus corticalis anterior, mit moderater Dichte PHA-L markierter Strukturen (++) (Maßstab = 100 µm).

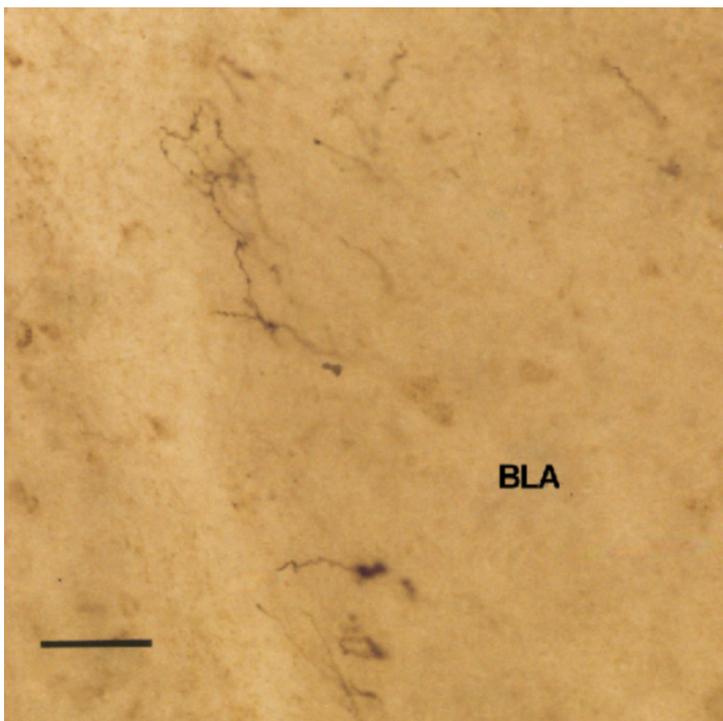


Abbildung 3-9 Mikrofotografie einer Region im Nucleus basolateralis anterior mit nur vereinzelt PHA-L-Anfärbungen (+) (Maßstab = 100 µm).

Tabelle 3-2 listet die Auswertung der Anfärbungen in den drei im Detail analysierten Tieren (ThaB1, ThaB2, ThaB3) (Referenztiere) auf.

Tabelle 3-2 Anfärbung mit PHA-L markierter Neurone in amygdalären Kerngebieten

Bregma	Kerngebiet	ThaB1	ThaB2	ThaB3	Index
-2,12	MeAV	n.b.	n.b.	++	2
-1,3 - -3,14	BMA	+	+	+++	1,7
-2,56 - -4,16	BMP	+	+	+++	1,7
-2,12 - -3,14	IM	+	n.b.	++	1,5
-1,3 - -2,8	ACo	+	+	++	1,3
-1,6 - -3,3	CeC	+	+	++	1,3
-1,6 - -2,8	CeM	+	+	++	1,3
-1,3 - -1,6	LOT2	+	+	++	1,3
-2,56 - -3,3	MePV	+	+	++	1,3
-3,6 - -3,8	AHiAL	+	+	n.b.	1
-3,14	AStr	n.b.	n.b.	+	1
-1,8 - -2,3	BAOT	+	+	+	1
-2,56 - -3,3	BLA	+	+	+	1
-2,3 - -3,14	BLP	+	+	+	1
-1,8 - -3,3	CeL	+	+	+	1
-2,56 - -4,16	LaVM	+	+	+	1
-1,3 - -1,6	LOT3	+	-	++	1
-1,3 - -2,8	MeAD	+	+	+	1
-3,14 - -3,8	MePD	+	+	+	1
-2,3 - -3,8	PLCo	+	+	+	1
-3,14 - -4,16	PMCo	+	+	+	1
-2,3 - -3,6	BLV	+	-	+	0,7
-1,8 - -3,8	LaDL	+	-	+	0,7
-2,56 - -3,6	LaVL	+	-	+	0,7
-1,3 - -1,6	LOT1	-	+	+	0,7
-1,6 - -2,3	BLA	-	-	+	0,3
-1,3 - -2,12	CxA	-	-	+	0,3
-1,6 - -1,8	IM	-	-	+	0,3
-4,16	AHiPM	n.b.	-	n.b.	0
-4,16	APir	n.b.	-	n.b.	0
-3,3 - -4,16	BLP	-	-	n.b.	0

- = keine Färbung nachweisbar, + = einzelne gefärbte Zellen, ++ = moderate Anfärbung, +++ = starke Anfärbung, n.b. Kerngebiet konnte nicht identifiziert werden

Betrachtet man die Auswertung der Anfärbung in den analysierten Tieren (Tab. 3-2), so zeigen sich die folgenden Tendenzen.

Die stärksten axonalen Färbungen waren im Nucleus basomedialis anterior (BMA), dem Nucleus basomedialis posterior (BMP), dem Nucleus corticalis anterior (ACo) dem medialen und kapsulären Teil des Nucleus centralis (CeM, CeC), sowie im lateralen olfaktorischen Trakt (besonders LOT2 und LOT3) zu sehen. Dabei war die Färbung im Experiment ThaB3 besonders ausgeprägt in den beiden anderen Tieren schwächer aber klar erkennbar.

Beim Nucleus medialis waren die ventralen Anteile (MeAV, MePV) bei ThaB3 mittelmäßig und sonst schwach gefärbt. Die dorsalen Anteile (MeAD, MePD) waren bei allen

Referenztieren einheitlich schwach angefärbt. Bei der Hauptgruppe der intercalierten Zellmassen (IM) war ähnliches zu beobachten. Hier waren die mehr caudal liegenden Anteile (Bregma -2,12 bis -3,14) deutlich gefärbt, während nach rostral (Bregma -1,6 bis -1,8) nur bei ThaB3 eine geringe Anzahl gefärbter Neurone nachweisbar war. Auch das basolaterale Kerngebiet zeigte teilweise eine differenzierte Anfärbung. Der caudale Anteil (Bregma -2,56 bis -3,3) des Nucleus basolateralis anterior (BLA) sowie der rostrale Teil (Bregma -2,3 bis -3,14) des Nucleus basolateralis posterior (BLP) zeigten eine einheitlich schwache Anfärbung, während die mehr peripher liegenden Anteile (BLA, rostral, Bregma -1,6 bis -2,3; BLP, caudal, Bregma -3,3 bis -4,16) faktisch keine Anfärbungen aufwiesen. Der Nucleus basolateralis ventralis war hingegen einheitlich schwach gefärbt. Ebenfalls konnten für die Subregionen des Nucleus lateralis tendenziell unterschiedliche Intensitäten der Anfärbung festgestellt werden. Der pars ventromedialis war durch eine schwache Anfärbung gekennzeichnet, die dorsolateralen und dorsoventralen Anteile tendierten zu einer noch geringeren Färbeintensität.

Einige Kerngebiete waren in allen drei Referenzexperimenten im gleichen Maße schwach angefärbt. Dabei handelte es sich im einzelnen um den anterolateralen Anteil des amygdalohippocampalen Areals (AHiAL), den Bettkern des akzessorischen olfaktorischen Traktes (BAOT), den Nucleus centralis lateralis (CeL) den Nucleus lateralis ventromedialis (LaVM), den Nucleus corticalis posterolateralis (PLCo) und den Nucleus corticalis posteromedialis (PMCo). Die amygdalo-striatalen Übergangszone (AStr) war ebenfalls erwartungsgemäß gefärbt (LINKE *et al.*, 1999), konnte aber nur in einem der Referenztiere (Thab3) nachgewiesen werden.

Verallgemeinert ist zu erkennen, daß eine Vielzahl amygdalärer Kerngebiete eine Projektion aus den paralaminaren Kernen des Thalamus erhält. Tendenziell scheinen jedoch die zentralen, inneren bzw. ventralen Regionen bevorzugt zu werden. Diese gilt sowohl für die Kerngebiete insgesamt (z.B. starke Anfärbung in den Nuclei centralis und medialis versus schwache Anfärbung im Nucleus lateralis), als auch für die Untereinheiten dieser Gebiete (stärkere Anfärbung in ventralen Anteilen des Nucleus medialis oder im caudalen Bereich des Nucleus basalis anterior bzw. im rostralen Bereich des Nucleus basalis posterior).

Die augenscheinlichen Abweichungen zwischen den Tieren sind möglicherweise dadurch zu erklären, daß Experiment ThaB1 bevorzugt durch Projektionen des Nucleus suprageniculatus bestimmt ist (deutliche Anfärbung im Injektionskanal in diesem Gebiet so wie eine relativ kleine Injektionsstelle im dorsomedialen Bereich des Nucleus intralaminaris posterior thalami (PIL)), während bei ThaB3 zentral in den PIL injiziert wurde. Auch die Injektion von ThaB2 lag in der dorsomedialen Peripherie des PIL.

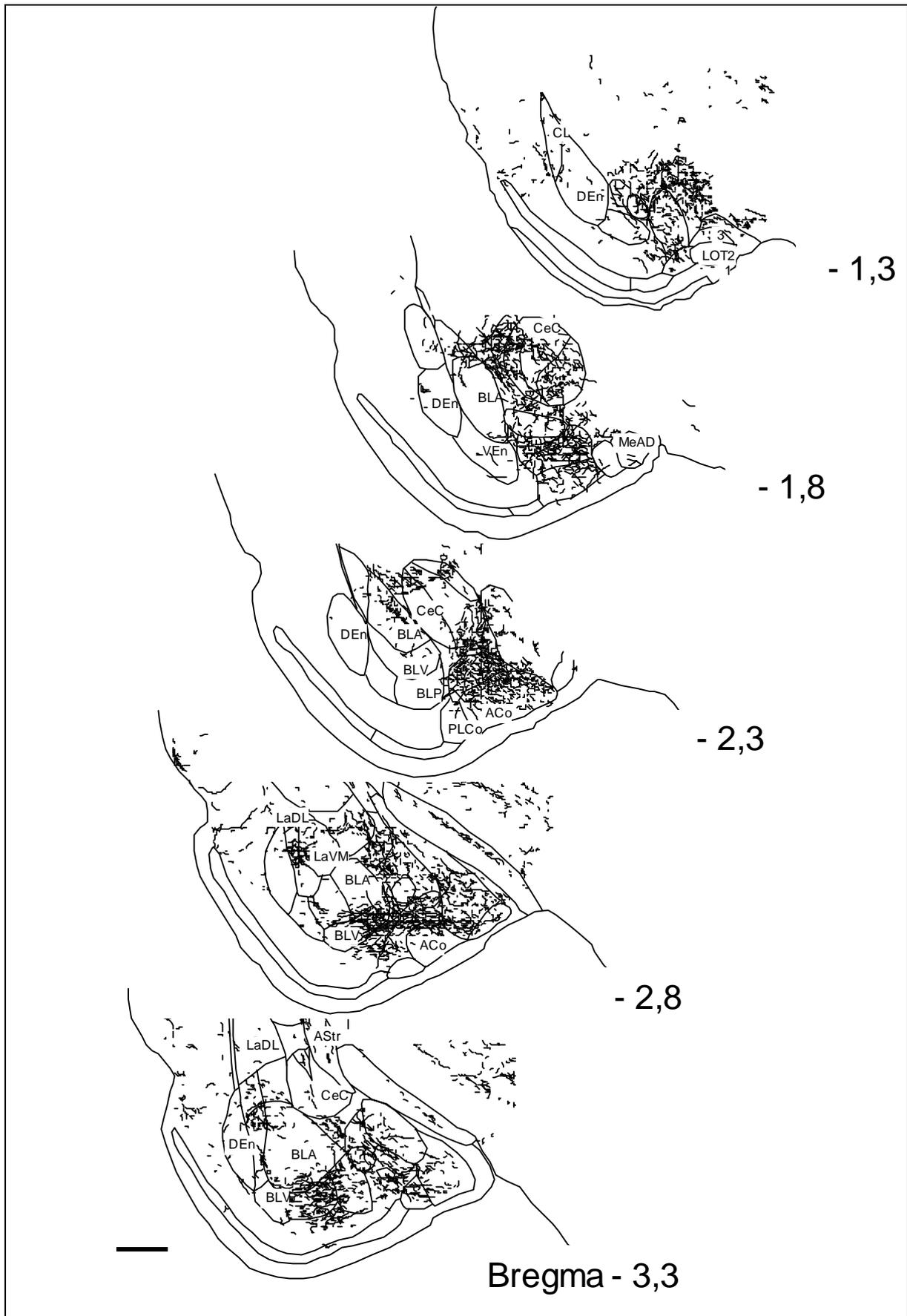


Abbildung 3-10 Rekonstruktionen frontaler Sektionen durch die Amygdala, welche die Verteilung mit PHA-L markierten Axonen zeigen (Maßstab = 1000 µm).

3.2.2 Auswertung der mit Fluoro-Gold markierten Kerngebiete.

Die Abbildungen 3-11 und 3-12 zeigen die Färbeintensität diverser Fluoro-Gold markierter Kerngebiete, die jeweils zur entsprechenden Einteilung in die obigen Kategorien führte.

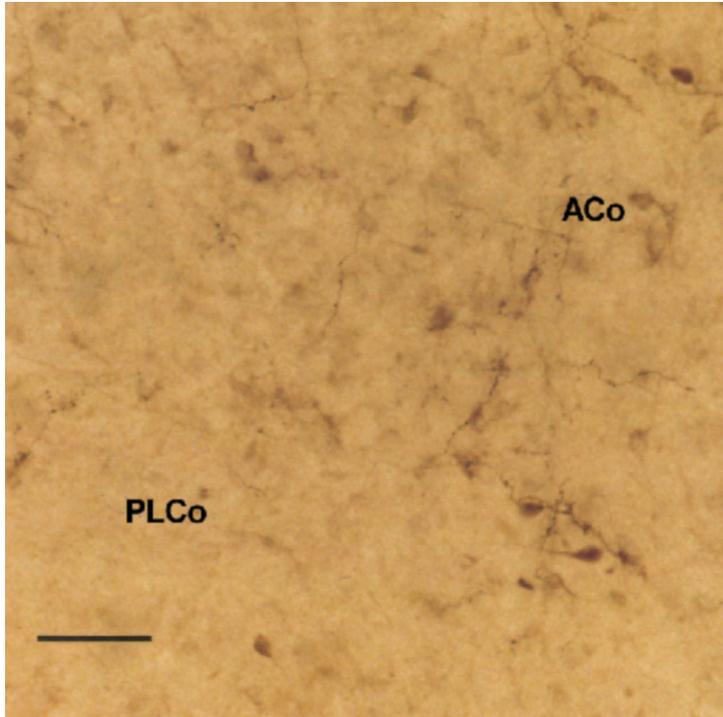


Abbildung 3-11 Mikrofotografie einer Region im Nucleus corticalis anterior mit moderater Fluoro-Gold-Markierung (++) (Maßstab = 100 µm).

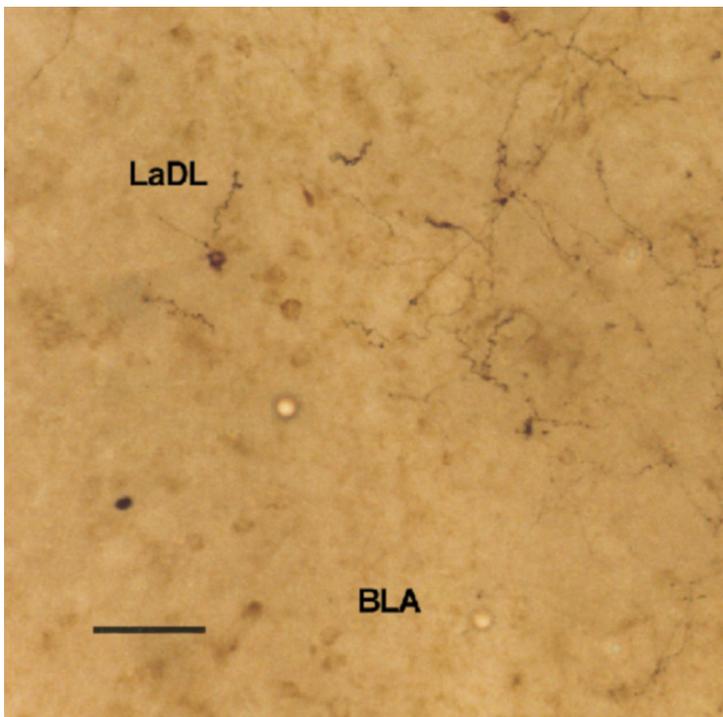


Abbildung 3-12 Mikrofotografie einer Region im Nucleus lateralis, pars dosolateralis, mit nur vereinzelter Fluoro-Gold-Anfärbung (+) (Maßstab = 100 µm).

Die Injektion von Fluoro-Gold in die Substantia innominata führte zur Anfärbung von Zellkörpern verschiedenster Kerngebiete in der Amygdala. Besonders deutlich waren hier der Nucleus basomedialis anterior, der Nucleus centralis, pars medialis und capsularis, die Stria olfactoria lateralis (LOT3), der Nucleus corticalis anterior, sowie der anterodorsale und der rostrale Bereich des posteroventralen Anteils des Nucleus medialis markiert. Auch der Nucleus medialis, pars posteroventralis tendierte zu einer etwas stärkeren Anfärbung. In den übrigen identifizierten Kerngebieten ließen sich nur vereinzelt angefärbte Zellen nachweisen. In der amygdalopiriformen Übergangszone konnten keine gefärbten Zellen nachgewiesen werden. Im folgenden sind die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der mit Fluoro-Gold markierten amygdalären Kerngebiete tabellarisch aufgelistet (Tab. 3-3). Abbildung 3-13 zeigt schließlich eine Rekonstruktion einer Serie von coronalen Schnitten, welche die Verteilung Fluoro-Gold markierter Zellkörper in der Amygdala zeigen.

Tabelle 3-3 Anfärbung mit Fluoro-Gold markierter Zellen in amygdalären Kerngebieten

Bregma	Kerngebiet	ThaB1	ThaB2	ThaB3	Index
-1,3 - -3,14	BMA	++	++	++	2
-1,6 - -2,8	CeM	++	++	++	2
-1,3 - -1,6	LOT3	++	++	++	2
-1,3 - -2,8	MeAD	++	++	++	2
-1,3 - -2,8	ACo	++	++	+	1,7
-1,6 - -3,3	CeC	++	++	+	1,7
-2,56 - -2,8	MePV	+	++	++	1,7
-3,14 - -3,8	MePD	++	+	+	1,3
-3,6 - -3,8	AHiAL	+	+	n.b.	1
-4,16	AHiPM	n.b.	+	n.b.	1
-3,14	AStr	n.b.	n.b.	+	1
-1,8 - -2,3	BAOT	+	+	+	1
-1,6 - -3,3	BLA	+	+	+	1
-2,3 - -4,16	BLP	+	+	+	1
-2,3 - -3,6	BLV	+	+	+	1
-2,56 - -4,16	BMP	+	+	+	1
-1,8 - -3,3	CeL	+	+	+	1
-1,3 - -2,12	CxA	+	+	+	1
-1,6 - -3,14	IM	+	+	+	1
-1,8 - -3,8	LaDL	+	+	+	1
-2,56 - -3,6	LaVL	+	+	+	1
-2,56 - -4,16	LaVM	+	+	+	1
-1,3 - -1,6	LOT1	+	+	+	1
-1,3 - -1,6	LOT2	+	+	+	1
-2,12	MeAV	n.b.	n.b.	+	1
-3,14 - -3,3	MePV	+	+	+	1
-2,3 - -3,8	PLCo	+	+	+	1
-3,14 - -4,16	PMCo	+	+	+	1
-4,16	APir	n.b.	-	n.b.	0

- = keine Färbung nachweisbar, + = einzelne angefärbte Zellen, ++ = moderate Anfärbung, +++ = starke Anfärbung, n.b. Kerngebiete konnte nicht identifiziert werden

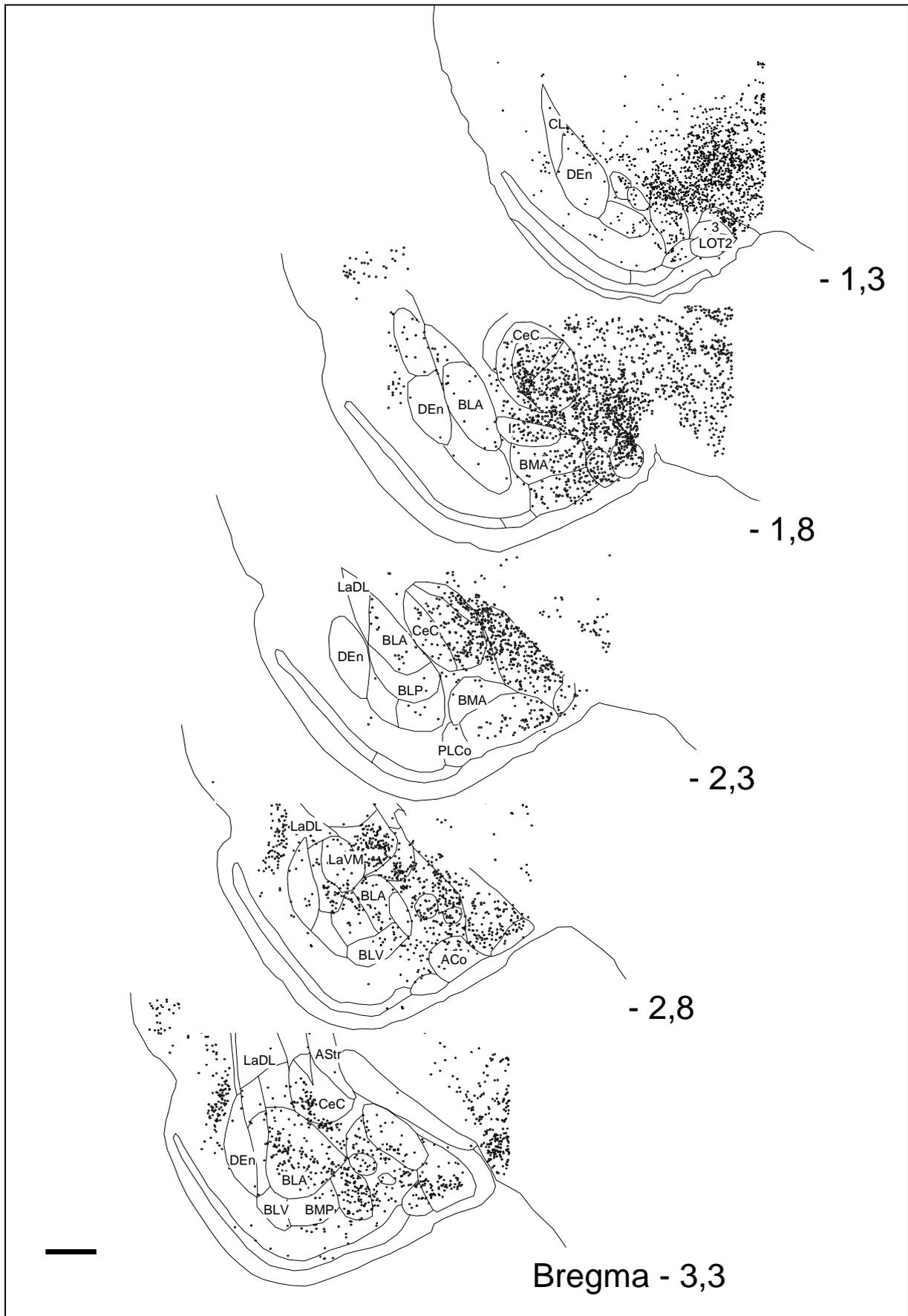


Abbildung 3-13 Rekonstruktionen frontaler Sektionen durch die Amygdala, welche die Verteilung Fluoro-Gold markierter Zellkörper zeigen (Maßstab = 1000 µm).

3.2.3 Auswertung der doppelt markierten Kerngebiete.

Die doppelt markierten Kerngebiete ließen sich nur bedingt mit dem Einteilungsschema erfassen, da hier keine Überlappungsgebiete mit hoher Dichte an markierten Zellen von solchen mit geringer Dichte zu unterscheiden waren. Allein die Größe des markierten Areals in Bezug zur Gesamtfläche des entsprechenden Kerngebietes gaben ein mögliches Unterscheidungskriterium. Da die Überlappungsgebiete mit wenigen Ausnahmen aber sehr klein waren, ist diese Einteilung recht subjektiv und entspricht eher einer Unterteilung ob ein Überlappungsgebiet vorhanden war oder nicht.

Die Doppelfärbungen zeigten eine Überlappung der Projektionsgebiete im Nucleus centralis und Nucleus basomedialis. Außerdem konnten überlappende Gebiete in den parakapsulären intercalierten Zellen (angesiedelt zwischen Nucleus lateralis, basolateralis und centralis, sowie zwischen dem Nucleus basolateralis und dem endopiriformen Cortex), dem Nucleus medialis, der Stria olfactoria lateralis, dem Nucleus corticalis anterior, der amygdalo-striatalen Übergangszone und im Nucleus lateralis, pars ventrolateralis nachgewiesen werden (vergl. Tab. 3-4). Die Abbildung 3-14 zeigt zwei Nissel gefärbte coronale Schnitte durch den vorderen Bereich der Amygdala. Auf der Mikrofotografie B ist in etwa der Bereich abgebildet, der in Abbildung 3-15 in der Zeichnung Bregma -2,3 rekonstruiert wurde. Abbildungen 3-15 zeigt schließlich eine Folge von Rekonstruktionen doppelt markierter Gebiete in der Amygdala.

Tabelle 3-4 Gebiete mit überlappender PHA-L und Fluoro-Gold Markierung in der Amygdala

Bregma	Kerngebiet	ThaB1	ThaB2	ThaB3	Index
-2,12	MeAV	n.b.	n.b.	++	2
-1,3 - -3,14	BMA	+	+	++	1,3
- 1,4 - -1,6	LOT3	+	-	+++	1,3
-1,3 - -2,8	ACo	+	+	+	1
-3,14	ASt	n.b.	n.b.	+	1
-2,56 - -4,16	BMP	+	+	+	1
-1,6 - -3,3	CeC	+	+	+	1
-1,8 - -3,3	CeL	+	+	+	1
-1,6 - -2,8	CeM	+	+	+	1
-2,56 - -3,6	LaVL	+	+	+	1
-1,6	LOT1	n.b.	+	+	1
-1,4 - -1,6	LOT2	+	+	+	1
-1,3 - -2,8	MeAD	+	+	+	1
-3,14 - -3,8	MePD	+	+	+	1
-2,56 - -3,3	MePV	+	+	+	1
-1,6 - -3,3	BLA*	-	+	+	0,7
-2,12 - -3,14	IM	+	-	+	0,7
-1,8 - -3,8	LaDL	+	-	+	0,7
-2,3 - -3,14	BLP*	-	-	+	0,3
-2,3 - -3,6	BLV*	-	-	+	0,3
-1,6 - -1,8	IM	-	-	+	0,3
-2,56	LaVM	+	-	-	0,3
-3,6 - -3,8	AHiAL	-	-	n.b.	0
-4,16	AHiPM	n.b.	-	n.b.	0
-4,16	APir	n.b.	-	n.b.	0
-1,8 - -2,3	BAOT	-	-	-	0
-3,3 - -4,16	BLP	-	-	-	0
-1,3 - -2,12	CxA	n.b.	n.b.	-	0
-2,8 - -4,16	LaVM	-	-	-	0
-1,3 - -1,4	LOT1	-	-	-	0
-1,3	LOT2	n.b.	-	-	0
-1,3	LOT3	n.b.	-	-	0
-2,3 - -3,8	PLCo	-	-	-	0
-3,14 - -4,16	PMCo	-	-	-	0

- = keine Färbung nachweisbar, + = einzelne angefärbte Zellen, ++ = moderate Anfärbung, +++ = starke Anfärbung, n.b. Kerngebiete konnte nicht identifiziert werden. Die mit einem * markierten Kerngebiete beinhalten in ihrer Peripherie die parakapsulären intercalierten Zellen.

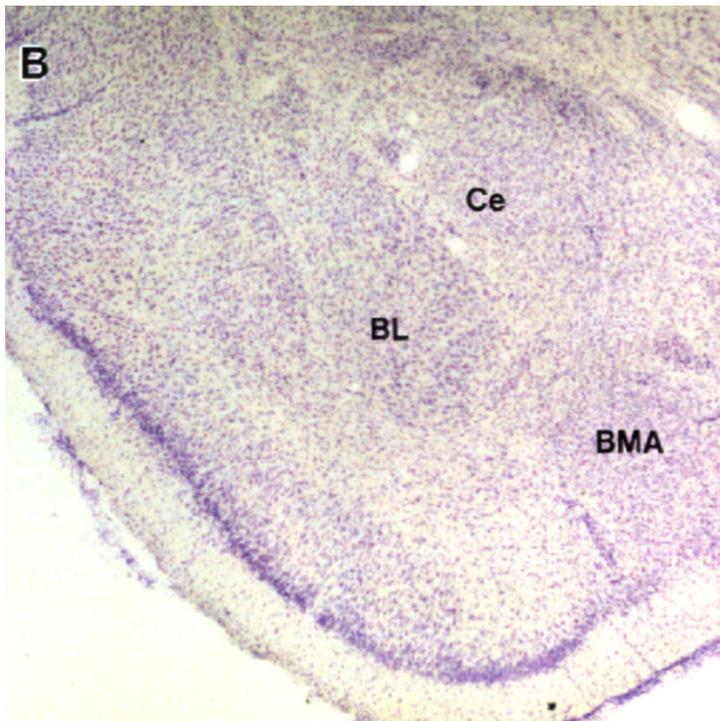
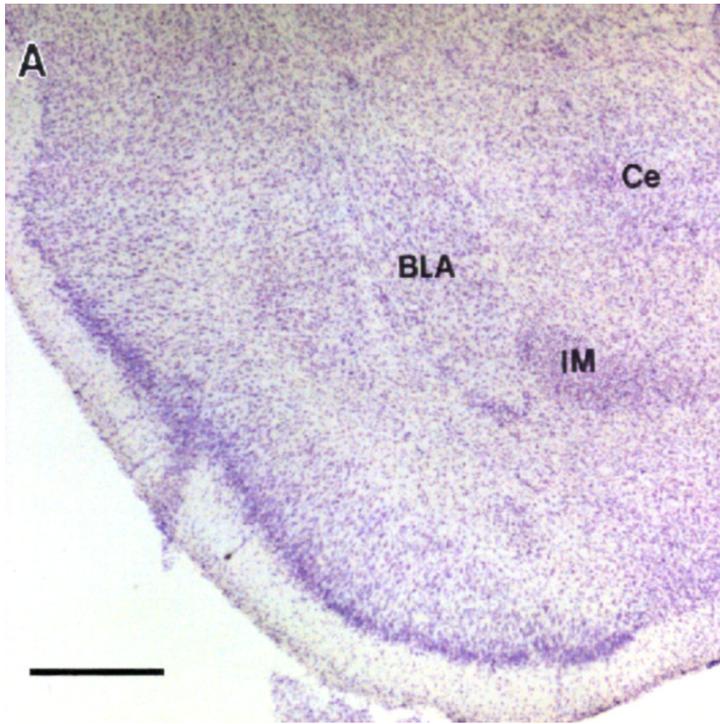


Abbildung 3-14 A, B: Nissl gefärbte Schnittpräparate aus dem vorderen Bereich der Amygdala. **(B)** entsprechendes Gebiet (Bregma -2,3), das in Abbildung 3-15. rekonstruiert wurde (Maßstab = 500 μ m).

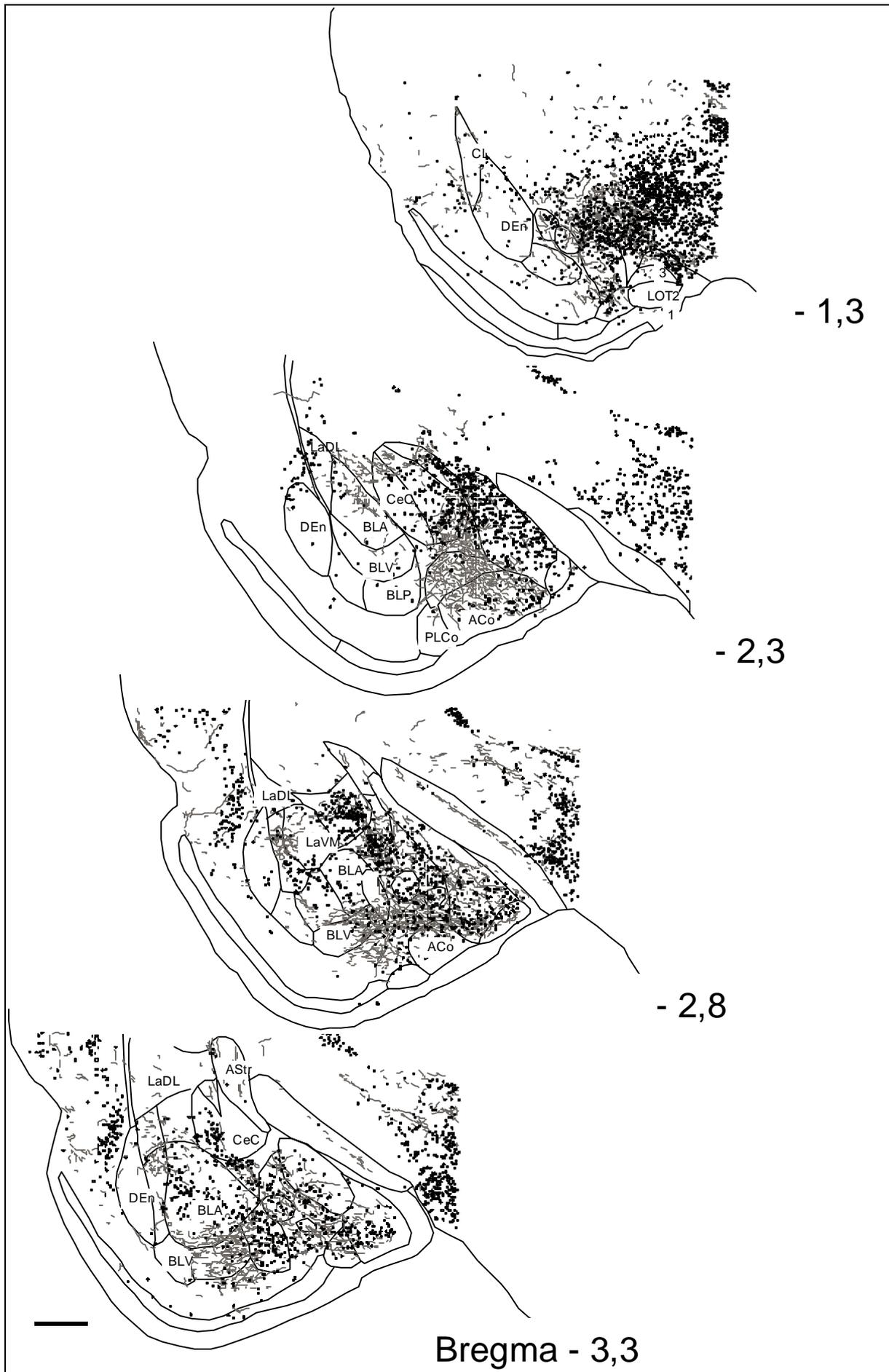


Abbildung 3-15 Rekonstruktion von doppelt markierten Gebieten in der Amygdala (Maßstab = 1000 µm).

3.2.4 Lichtmikroskopie

Die Mikrofotografien in Abbildung 3-16 zeigen lichtmikroskopische Beispiele doppelt markierte Regionen in der Amygdala

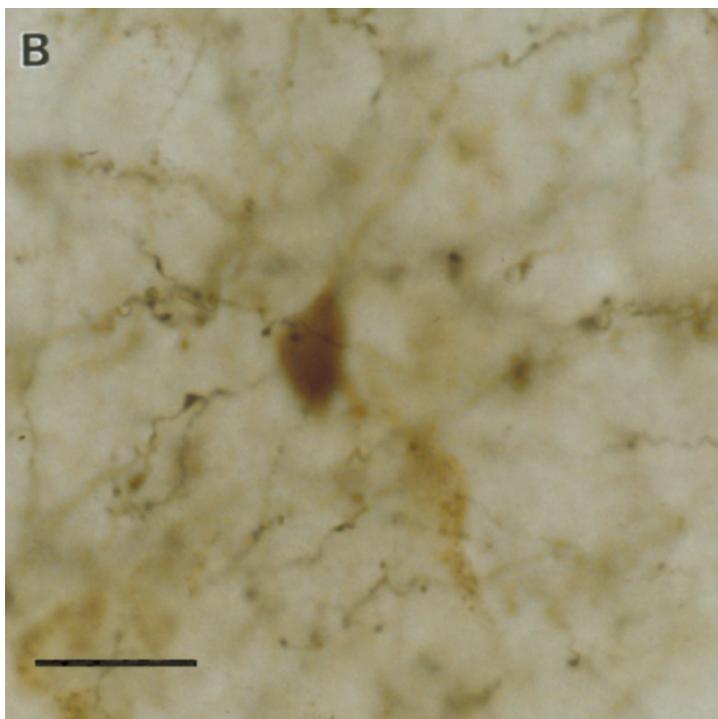
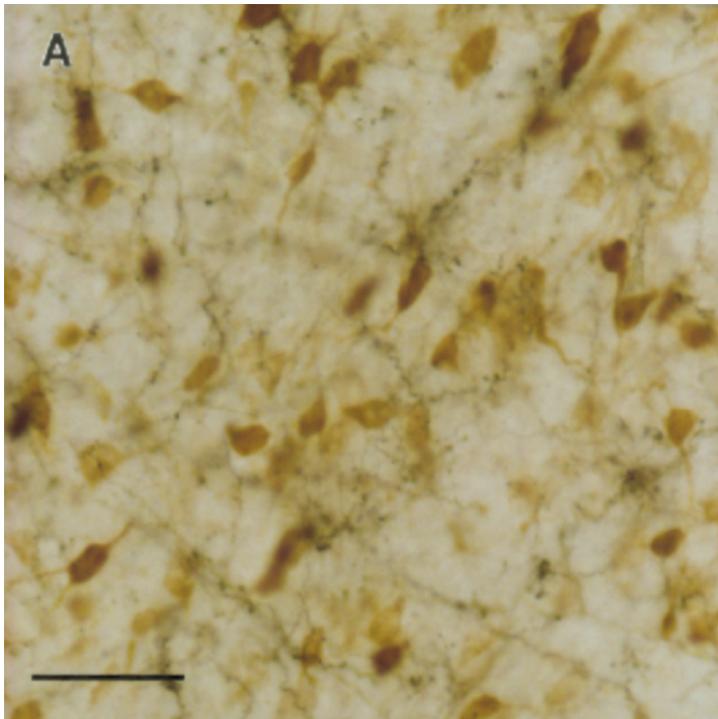


Abbildung 3-16 A-D: Regionen innerhalb der Amygdala, die eine Überlappung von retrograd markierten Neuronen (FG, Diaminobenzidin-(DAB) Reaktion, braunes Reaktionsprodukt) und anterograd markierten Axonen (PHA-L, Schwermetall intensivierte DAB Färbung, schwarzes Reaktionsprodukt) zeigen. (**A**, **B**) Nucleus basomedialis (Maßstab = 80 µm in **A**, 20 µm in **B**) (Fortsetzung nächste Seite).

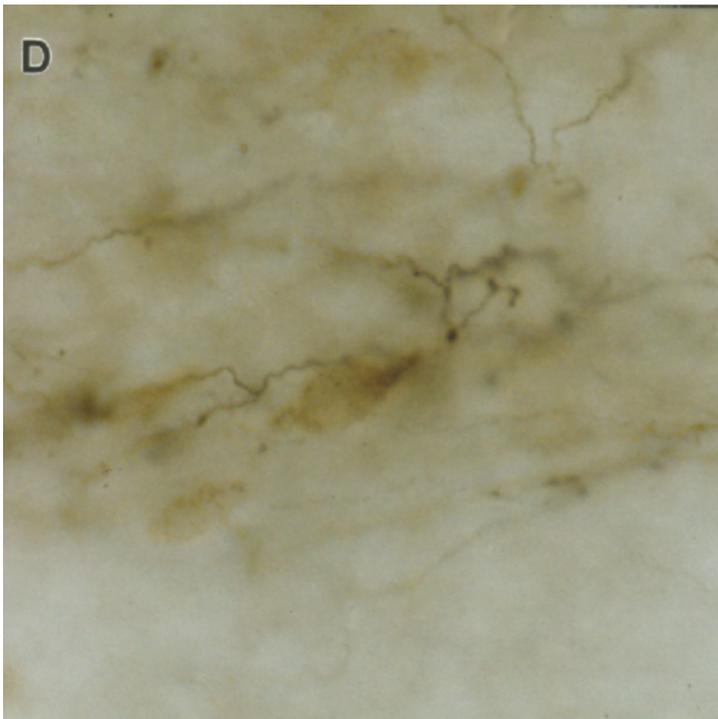
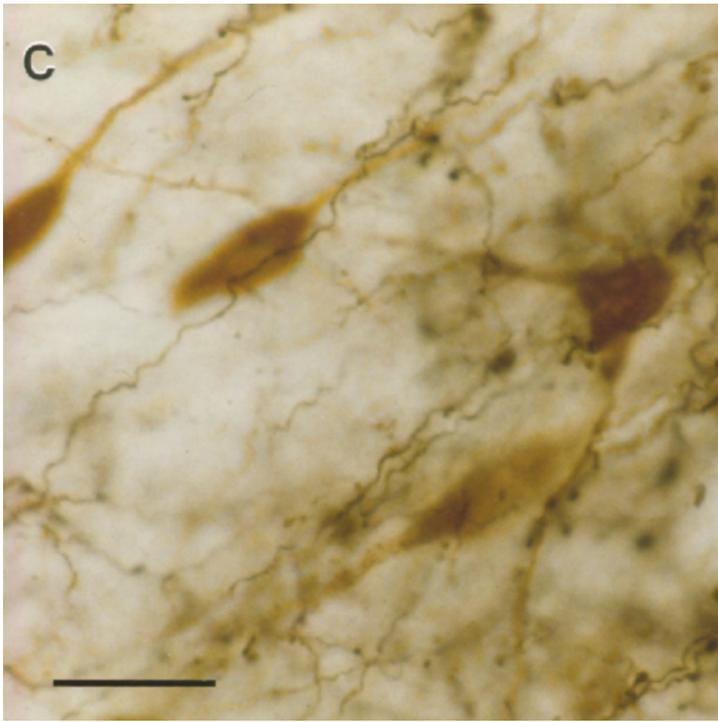


Abbildung 3-16 Fortsetzung (C) amygdalo-striatale Übergangszone und (D) intercalierte Zellen (Maßstab = 20 μm in C und D).

3.2.5 Elektronenmikroskopie

Die mögliche Existenz direkter synaptische Kontakte zwischen PHA-L markierten Axonen und Fluoro-Gold markierten Dendriten wurden mit Hilfe des Elektronenmikroskops in amygdalären Kerngebieten, die eine Doppelmarkierung aufwiesen, untersucht. Die anterograd markierten Axone waren durch eine dichte Anfärbung durch das DAB-Reaktionsprodukt der PHA-L-Immunreaktion gekennzeichnet. Die retrograd markierten Neurone waren anhand von dichtgepackten lysosomähnlichen Organellen oder locker verteiltem Reaktionsprodukt nach Visualisierung von Anti-Fluoro-Gold mit DAB zu identifizieren. Synapsen wurden in den parakapsulären intercalierten Zellmassen gefunden. Die folgende Abbildung (3-17) zeigt einen solchen synaptischen Kontakt. Die erhöhte Dichte (dunkle Anfärbung) auf der postsynaptischen Seite läßt vermuten, daß die Synapsen vom asymmetrischen Typus sind.

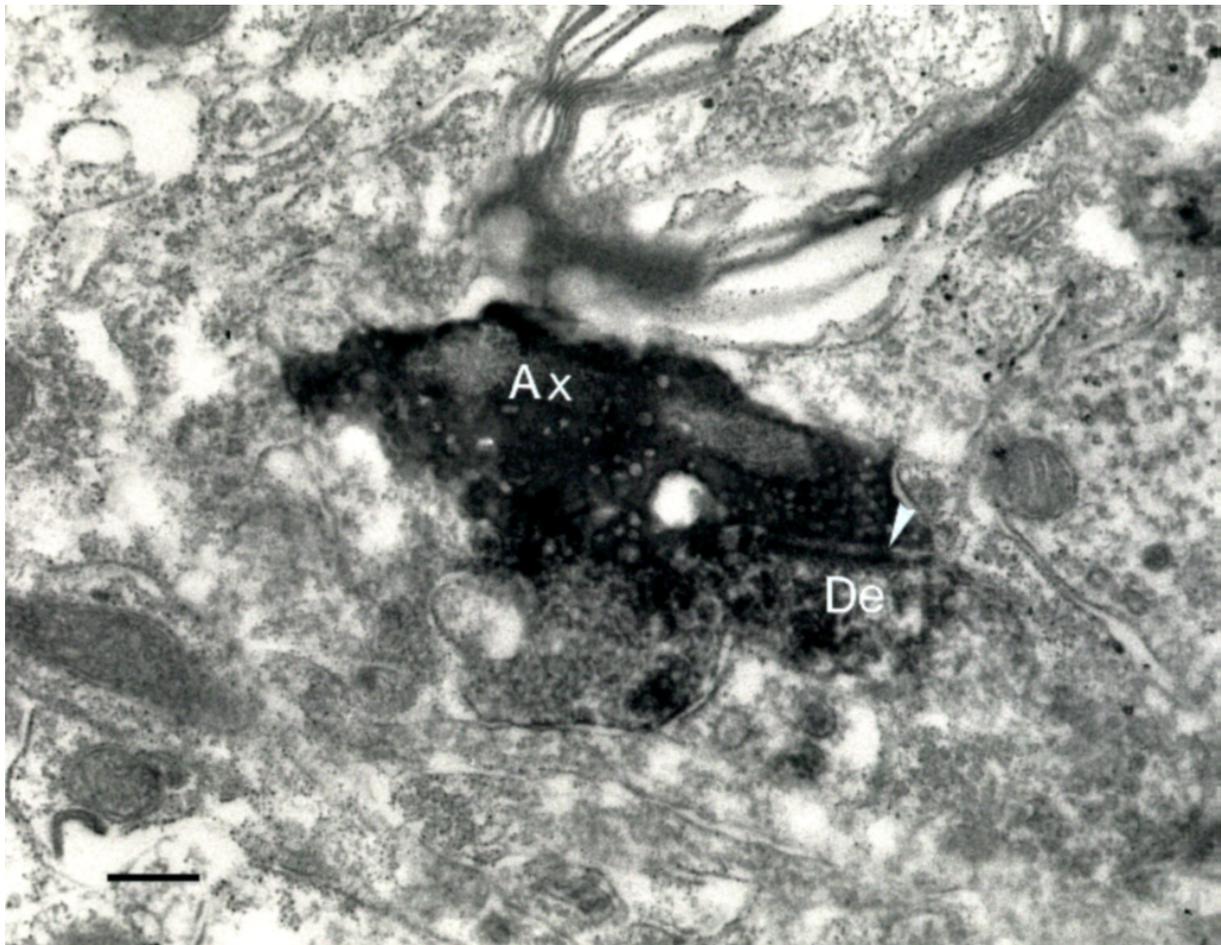


Abbildung 3-17 Elektronenmikroskopische Aufnahme markierter Neurone in der intercalierten Zellmasse zwischen den Nuclei centralis und lateralis. Ein PHA-L immunreaktives Axon (Ax) bildet eine (asymmetrische) Synapse (Pfeilspitze) mit einem Fluoro-Gold markiertem Dendriten (De) (Vergrößerung 48.000fach; Maßstab = 0,25 μ m).

3.3 ChAT- und GABA-Immunreaktivität

Zum Nachweis der Injektionsorte in den cholinergen Regionen der Substantia innominata wurde Cholinacetyl-Transferase- (ChAT-) Immunreaktivität in ausgewählten Schnittpräparaten aus dem Bereich der Injektionsstelle nachgewiesen. Ein Beispiel ChATpositiver Zellen im Injektionsbereich ist in Abbildung 3-18 dargestellt.

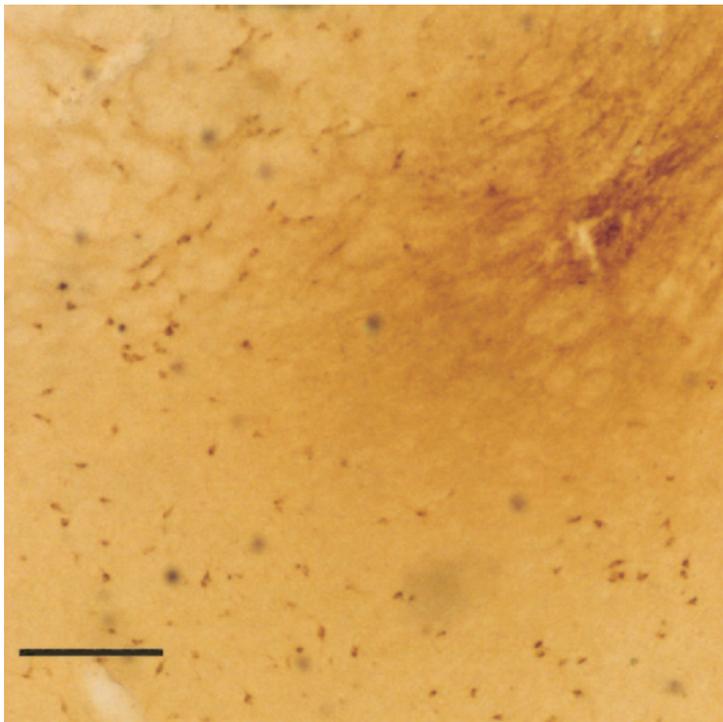
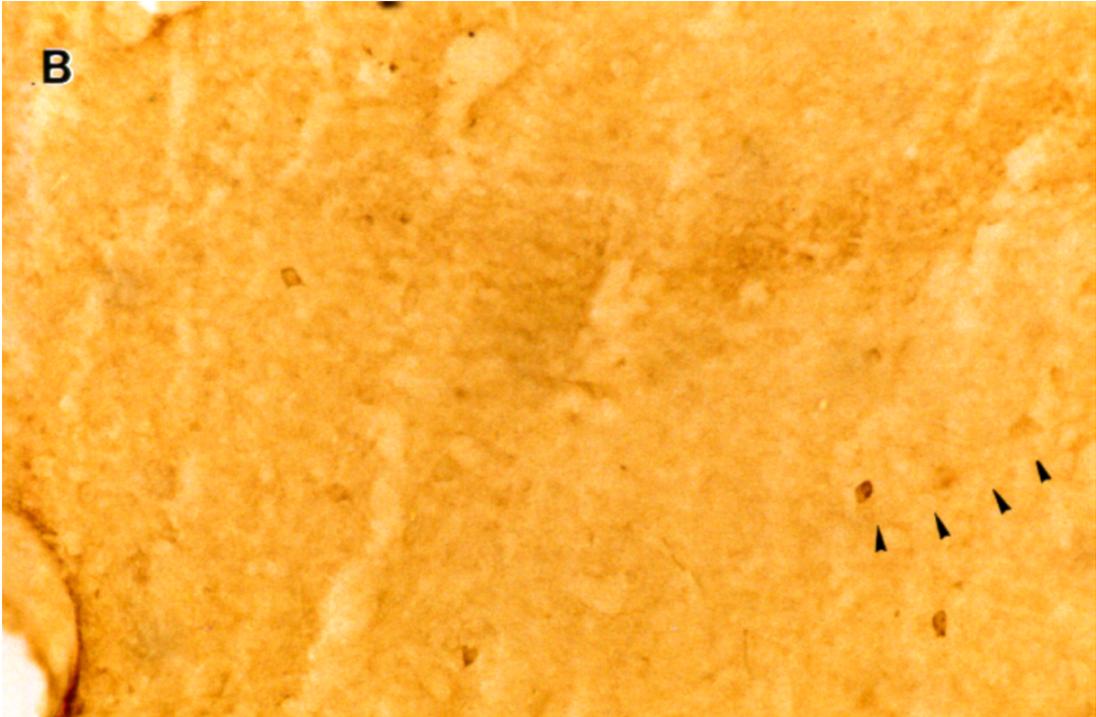
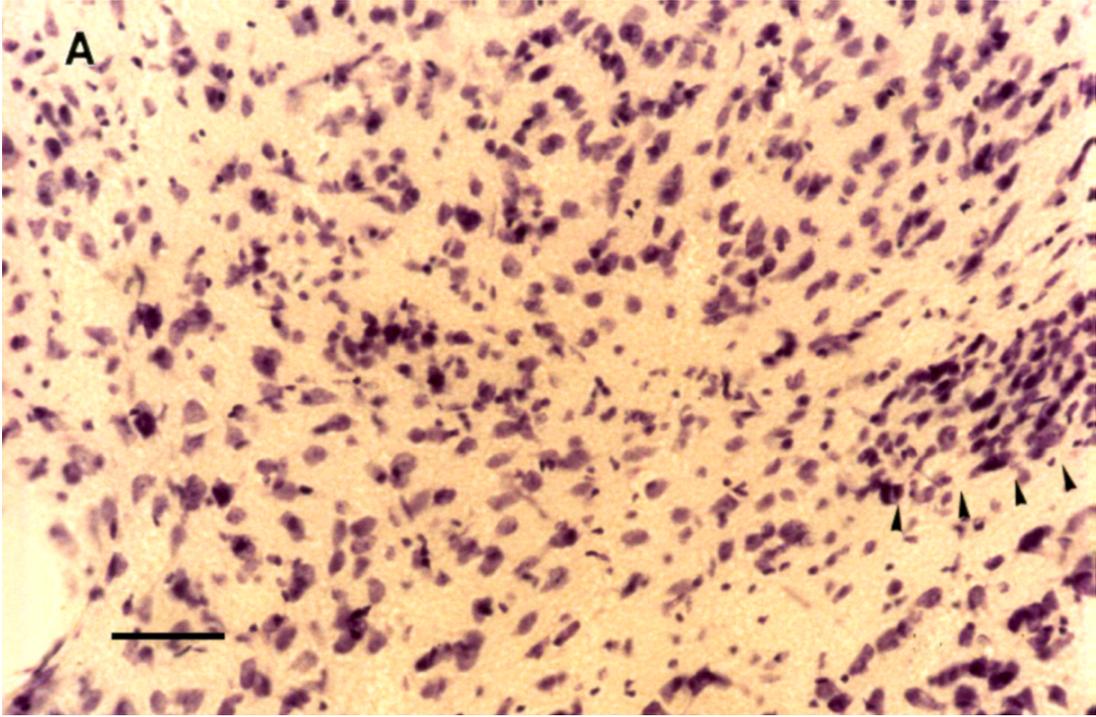


Abbildung 3-18 Mikrofotografie einer Injektionsstelle in der Substantia innominata mit Nachweis ChATpositiver Zellen im Injektionsbereich (Maßstab = 250 µm).

Die intercalierten Zellgruppen und die Stria olfactoria lateralis sowie die Nuclei centralis und medialis enthalten zum großen Teil Neurone, die den Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) enthalten (NITECKA und BEN-ARI, 1987; PARÉ und SMITH, 1994). Um mögliche GABAerge Projektionen in das cholinerge basale Vorderhirn zu erfassen, wurden ausgewählte Schnittpräparate mit doppelt markierten Kerngruppen alternierend GABA-immunhistochemisch untersucht. Tatsächlich zeigten Schnittpräparate im Bereich ausgewählter intercalierter Zellmassen mit Überlappungen von retrograd markierten Zellkörpern und anterograd markierten Axonen einerseits und Zellen mit GABA-Immunreaktivität andererseits eindeutige topographische Übereinstimmungen in der Lage der gefärbten Zellen. Abbildung 3-19 veranschaulicht solche Kongruenzen: A zeigt eine ausgewählte intercalierte Zellmasse im Grenzbereich zwischen den Nuclei centralis und

basolateralis im Nissl-Bild. In B ist der selbe Bereich mit GABA-Immunreaktivität dargestellt. C zeigt die Doppelmarkierung dieses Kerngebietes.



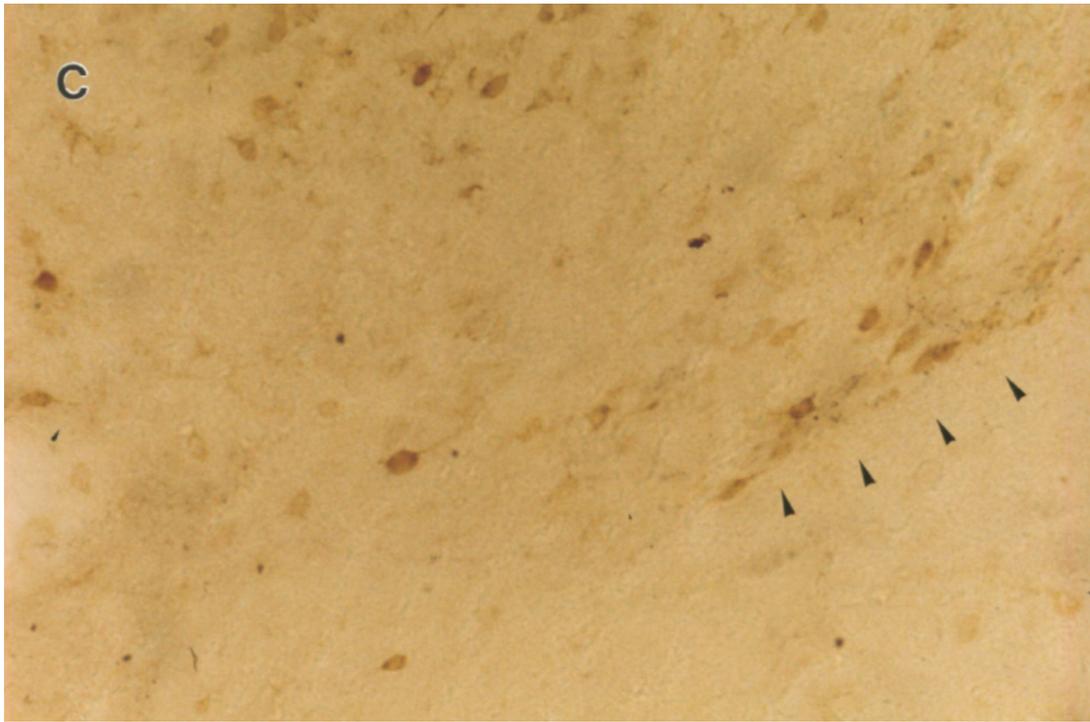


Abbildung 3-19 A-C: Mikrofotografien, welche die Doppelfärbung bzw. GABA-Immunreaktivität von intercalierten Zellmassen zeigen. (A) Nisslgefärbtes Präparat von intercalierter Zellmasse zwischen den Nuclei basolateralis und centralis. (B) GABA-Immunreaktivität des selben Gebietes. (C) Doppelfärbung der intercalierten Zellmasse (Maßstab = 100 μm in A-C). Der maximale Abstand zwischen A und B beträgt 50 μm zwischen B und C 150 μm .

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Wahl der Methode

Die neuronale Verschaltung der Amygdala wurde mittels Tracer-Injektionen in der Ratte *in vivo* untersucht. Die Methode, am lebenden Tier zu arbeiten, vereinigt einige Vorteile. Die Untersuchung erfolgt am vollständigen Organismus, was eine weitgehende Erfassung der Komponenten des Systems und die Aufrechterhaltung eines „natürlichen“ Zustandes gewährleistet. Die verwendeten Marker werden über zelleigene Stoffwechselprozesse aufgenommen und transportiert, so daß bevorzugt funktionell zusammengehörige Neurone markiert werden. Durch eine geeignete Wahl der Tracer kann sogar die „Richtung“ der Verbindungen bestimmt werden. Anterograde Tracer markieren efferente Projektionen vom Injektionsort, retrograde Tracer die afferenten Bahnen von diesem. Neben Anfangs- und Zielpunkt einer Projektion wird auch deren Verlauf demonstriert. Durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen sich eine Vielzahl von Erkenntnissen gewinnen: (1) Welche Regionen stehen mit dem injizierten Gebiet durch Afferenzen oder Efferenzen in Verbindung, (2) welchen Weg nehmen die Projektionen, (3) handelt es sich um eine ausgeprägte oder eher schwache Verbindung, (4) wie sieht die synaptische Verschaltung aus u.a.. Die Verwendung elektronenmikroskopischer Verfahren und der Anspruch einer Rekonstruktion limitieren jedoch auch die Möglichkeiten der Visualisierung der Tracer. Im Transmissionselektronenmikroskop sind die Kontraste nur aufgrund unterschiedlicher Elektronendichten wahrnehmbar. Auch die Rekonstruktion erfordert lichtbeständige Präparate, da eine relativ lange Beobachtungszeit am Mikroskop erforderlich ist. Die durchgeführte Visualisierung der markierten Neurone mit Diaminobenzidin erfüllte diese Anforderung. Die Produkte der DAB-Reaktion sind braun bzw. schwarz nach einer Intensivierung mit Schwermetallen. Somit können aber nur maximal zwei verschiedene Substanzen in einem Schnittpräparat sichtbar gemacht werden. Dieses kann dann zu Problemen führen, wenn doppeltmarkierte Areale auf eine weitere Substanz untersucht werden sollen, wie z.B. GABA-Immunreaktivität. Dann hat man nur noch die Möglichkeit alternierende Schnitte miteinander zu korrelieren. Während dieses auf der lichtmikroskopischen Ebene noch relativ gut durchzuführen ist, stellt das für die Elektronenmikroskopie eine hohe Anforderung dar.

4.1.2 Wahl der Tracer

Für Transportstudien spielen drei Punkte eine Rolle:

- a) Aufnahme der Substanz
- b) Transport der Substanz
- c) Mögliche Fehlerquellen

Zwei Fragen sind für c) grundsätzlich zu überprüfen: Wird der Tracer durch Fasern aufgenommen, die den Injektionsort durchqueren („fibers of passage“) bzw. durch die Applikation des Markers beschädigt wurden und erfolgt der Transport ausschließlich in die gewünschte Richtung?

4.1.2.1 *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin als Tracer

GERFEN und SAWCHENKO (1984) untersuchten umfassend die Eigenschaften von *Phaseolus vulgaris* Agglutinin (PHA) und insbesondere die Bedeutung des Isolectins PHA-L als Tracer für neuronale Projektionen. Nach der Injektion wird PHA-L hauptsächlich durch die Perikarya und die Dendriten der Neurone sowie durch Astrocyten in der Nachbarschaft des Injektionsortes aufgenommen. PHA-L wird in anterograder Richtung transportiert. Die Transportgeschwindigkeit im Axon liegt bei etwa 5-6 mm pro Tag. Das Problem unerwünschter Transportphänomene scheint bei PHA-L vernachlässigbar zu sein (SMITH, 1992), obwohl einzelne Arbeiten den Transport durch den Injektionsort durchziehende Fasern (SCHOFIELD, 1990) und geringen retrograden Transport (SMITH, 1992) beschrieben.

4.1.2.2 Fluoro-Gold als Tracer

WESSENDORF beschrieb 1991 mögliche Aufnahme- und Transportmechanismen von Fluoro-Gold:

Wahrscheinlich sind die basischen Eigenschaften für den Mechanismus des retrograden Transportes von Hydroxystilbamidin verantwortlich. Vermutlich gelangt das ungeladene Molekül zumindest teilweise passiv mittels Diffusion durch die Membran in das Innere der Zelle. Dort wird es dann in Kompartimenten, die ein saures Milieu aufweisen wie Lysosomen und Endosomen, protoniert. Diese Form ist dann nur noch schwer membrangängig. Dies wäre ein Beispiel für den gut verstandenen und in biologischen Systemen weit verbreiteten Mechanismus: Das „Einfangen“ schwacher Basen in Zellkompartimenten mit saurem pH-Wert. Nach Aufnahme der Substanz in die Lysosome erfolgt deren Transport mit Hilfe der

zelleigenen Transportmechanismen. Fluoro-Gold ist ein axonaler retrograder Tracer, d.h. er wird fast ausschließlich von den Endigungen der Zellfortsätze zum Soma der Zelle transportiert.

Für Fluoro-Gold sind die Literaturdaten über das Auftreten unerwünschter Anfärbungen widersprüchlich. Während SCHMUEDE und FALLON (1986) sowie PIERIBONE und ASTON-JONES (1988) keinen Transport durch intakte anliegende Fasern feststellen konnten, zeigten DADO *et al.* (1990), daß nach iontophoretischen Injektionen von Fluoro-Gold in die dorsalen Kolumnen der cervicalen Verlängerung der Ratte auch intakte benachbarte Fasern markiert wurden. Folglich kann zumindest bei bestimmten anatomischen Strukturen ein unerwünschter Transport nicht ausgeschlossen werden.

4.1.3 Verbesserung des Signal- Rauschverhältnisses

Ein Problem bei immunhistochemischen Verfahren, die auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, ist das Auftreten artifizieller Anfärbungen. Diese unspezifische Färbungen beruhen primär auf (1) unspezifischen Immunreaktionen (Kreuzreaktionen), (2) Interaktionen von Ladungen zwischen Proteinen in der zu untersuchenden Probe und Proteinen, die über die Inkubations-Lösung eingebracht werden und (3) weiteren physikalischen und chemischen Interaktionen wie z.B. hydrophoben oder elektrostatischen Wechselwirkungen oder Diffusion der Antigene.

Das Maß der Hintergrundfärbung ist vor allem von der Spezifität des Antikörpers, von der Reinheit des Antikörpers und von der Struktur des Gewebes abhängig. Auch die richtige Wahl der Verdünnung spielt eine Rolle. Ist der Antikörper zu konzentriert, kann sich die Hintergrundfärbung aufgrund der Zunahme unspezifischer Interaktionen erhöhen.

4.1.3.1 Kreuzreaktionen

Als Kreuzreaktion bezeichnet man die immunologische Reaktion spezifischer Antikörper nicht nur mit ihrem homologen Antigen, sondern auch mit Substanzen, die identische oder ähnliche antigene Determinanten besitzen. In der Immunologie werden kreuzreagierende Antikörper und kreuzreagierende Antigene unterschieden, die jeweils die Kreuzreaktion auslösen können. Als kreuzreagierenden Antikörper bezeichnet man einen gegen das Antigen A gebildeten Antikörper, der auch mit einem nur partiell verwandten Antigen B reagiert. Ein kreuzreagierendes Antigen ist ein Antigen A, das aufgrund gemeinsamer oder ähnlicher

Determinanten mit dem Antigen B, mit einem gegen B gerichteten Antikörper reagiert. Diese Unterscheidung hat für immunhistochemische Untersuchungen durchaus praktische Konsequenzen. Die Auswahl der verwendeten Antikörper und Reagenzien und die Zusammensetzung der Inkubations-Lösungen spielt eine wichtige Rolle. Die Kreuzreaktivität der Antikörper tritt besonders bei polyklonalen Antikörpern auf. Monoklonale Antikörper - wie z.B. der verwendete Antikörper gegen die Cholinacetyl-Transferase (ChAT) - kreuzreagieren in der Regel deutlich weniger als polyklonale. Zu ungewollten Kreuzreaktionen kann es ebenfalls zwischen den eingesetzten Antikörpern und anderen Immunglobulinen, die entweder im experimentellen System vorhanden oder diesem ebenfalls zugeführt worden sind, kommen. Auch das Auftreten von Antikörpern, die um die Bindungsstellen des Antigens konkurrieren, ist zu vermeiden. Nicht nur Antikörper sondern auch endogene oder zugeführte Antigene können zu Kreuzreaktionen führen. Endogenes Biotin führt bei der ABC-Methode zu Problemen, da sich der ABC-Komplex nun nicht mehr spezifisch an die biotinylierten Antikörper, sondern alternativ auch an das im Gewebe befindliche Biotin binden kann. Bei der Verwendung von Eiweißprodukten, z.B. zur Beschichtung von Objektträgern oder als Blockierungsagens, kann für die ABC-Methode eine weitere Fehlerquelle eine Rolle spielen. Spuren von Avidin können vorhanden sein, die an das Gewebe binden. Biotinylierte Sekundärantikörper können nun ihrerseits an dieses Avidin binden, was zu ungewollten Anfärbungen führt. Hintergrundfärbung durch exogenes Avidin läßt sich durch den Verzicht der fraglichen Eiweißprodukte und den Einsatz alternativer Verfahren vermeiden.

4.1.3.2 Methoden zur Reduzierung unspezifischer Färbungen

a) Behandlung mit Natriumborhydrid

Für die durchgeführten immunocytochemischen Studien und insbesondere für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen war es erforderlich Fixative mit Glutaraldehyd zu verwenden. Der Vorteil der hervorragenden Konservierung der Ultrastruktur des Gewebes wird aber bei einer Anzahl von Antikörpern durch eine verminderte Penetration der Immunreagenzien und durch erhöhte Hintergrundfärbung zunichte gemacht. Die zwei Aldehydgruppen des Glutaraldehyds können Verbindungen mit freien Aminosäuren eingehen (SCHIFFSche Basen), welche die Tertiärstruktur der Proteine ungünstig beeinflussen. Die Verwendung von Natriumborhydrid macht diese Reaktion wieder rückgängig, indem die Doppelbindungen der Aldehydgruppen reduziert werden (Methode siehe A.10.1).

b) Blockieren der Aktivität endogener Peroxidasen

Ein anderer Grund für Hintergrundfärbung ist die Aktivität endogener Peroxidasen (z.B. Katalase), die vor allem in schwach bzw. unvollständig fixiertem Gewebe auftritt. Diese Peroxidasen reagieren ebenfalls mit dem Chromogen und erzeugen somit neben den immunologisch gebundenen Peroxidase-Komplexen ein Reaktionsprodukt. Die standardmäßig durchgeführte Hemmung endogener Peroxidase-Aktivität erfolgte, wie allgemein üblich, durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid oder eines Gemisches aus Wasserstoffperoxid und Methanol (Methode siehe A.10.2).

c) Inkubation mit zusätzlichen Proteinen

Dieser methodische Schritt kann dadurch die Hintergrundfärbung reduzieren, daß er nicht spezifische Interaktionen des Antikörpers mit der Zelloberfläche oder anderen intrazellulären Strukturen blockiert. Das geschieht vor allem dadurch, daß die Bindungsstellen des Präparates, die aufgrund der Proteinstruktur der Antikörper mit diesen reagieren würden, nun mit anderen Proteinen abgedeckt werden.

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper können die Präparate mit einem Überschuß an Proteinen wie Rinderserumalbumin, nichtfetter Trockenmilch oder Normalserum aus der selben Wirtsspezies, wie der Sekundärantikörper, inkubiert werden. Das letzte Verfahren hat den Vorteil, daß zusätzlich die Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers vermindert wird. Das Serum enthält u.a. auch noch den gelösten Anteil der Immunglobuline. Da das Normalserum aus der selben Spezies wie der Sekundärantikörper stammt, konkurrieren diese Immunglobuline mit dem Sekundärantikörper um die unspezifischen Bindungsstellen und vermindern so die Hintergrundfärbung. Es ist möglich statt einer eigenständigen Inkubation mit Normalserum diesen Schritt zu umgehen, indem man das Normalserum direkt in die Sekundärantikörper-Lösung gibt. Dieses funktioniert in vielen Fällen gut und wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewendet (Methode siehe Anhang A.10.3). Es kann aber vereinzelt zur ungewollten Ausbildung von Immunkomplexen zwischen Sekundärantikörper und Immunglobulinen im Normalserum kommen. Diese Komplexe binden bevorzugt an einzelne zelluläre Strukturen oder führen zu einem Verlust der gewünschten Antikörperaktivität.

4.2 Die neuronale Verschaltung der Amygdala

In diesem Kapitel sollen primär die extrinsischen und intrinsischen Verbindungen der Amygdala und ihre für die Fragestellung relevanten Eigenschaften diskutiert werden. Eine funktionelle Betrachtung dagegen soll erst in Kapitel 4.3 erfolgen.

4.2.1 Extrinsische Verbindungen der Amygdala

4.2.1.1 Afferente thalamische Verbindungen zur Amygdala

Die Amygdala erhält parallele Afferenzen aus den caudalen paralaminaren thalamischen Kernen. Bevorzugte Zielgebiete in dieser Arbeit waren die Nuclei basomedialis anterior und posterior, der Nucleus centralis, pars capsularis und pars medialis, der Nucleus medialis, die intercalierten Zellmassen (im posterioren Bereich), der Nucleus corticalis anterior und die Stria olfactoria lateralis (LOT2). Diese Ergebnisse wurden durch die Befunde einer von LINKE *et al.* (2000, eingereicht) durchgeführten Studie, in der die amygdalopetalen Projektionen der paralaminaren thalamischen Kerne im einzelnen untersucht wurden, insgesamt bestätigt:

Injektionen mit anterograden Tracern in den Nucleus suprageniculatus führten dort zu Anfärbungen im gesamten amygdalären Komplex mit Ausnahme des Nucleus basalis und dem Nucleus centralis, pars lateralis. Besonders auffällig war die Anfärbung des Nucleus lateralis. Anterogrades Markieren von Neuronen des Nucleus paralaminaris posterior demonstrierten die ausgeprägten Projektionen zum Nucleus basomedialis anterior, dem Nucleus centralis, pars medialis, und der amygdalo-striatalen Übergangszone. Auch der Nucleus lateralis so wie der Nucleus centralis, pars medialis und pars capsularis wurden deutlich gefärbt. Einzelne gefärbte Fasern fand man unter anderem auch in der vorderen amygdalären Area, den intercalierten Zellmassen, dem Nucleus medialis und dem Nucleus basomedialis posterior. Auch hier wiesen der Nucleus basalis und der Nucleus centralis, pars lateralis keine gefärbten Neurone auf. Der Corpus geniculatum mediale, pars medialis projizierte vor allem zum Nucleus lateralis und der amygdalo-striatalen Übergangszone. Projektionen zu anderen amygdalären Kerngebieten waren schwach oder fehlten. Der Nucleus peripeduncularis besitzt Efferenzen zum Nucleus lateralis sowie zur amygdalo-striatalen Übergangszone, einzelne anterograd markierte Neurone fand man auch im Nucleus medialis und dem Nucleus basomedialis anterior.

Unterschiede zwischen beiden Studien in der Ausprägung der Färbungen in verschiedenen amygdalären Kerngebieten lassen sich unter anderem dadurch erklären, daß diese Kerngebiete konvergent innerviert werden. Da es sich bei den Projektionen in der vorliegenden Arbeit häufig um Mischprojektionen aus mehreren paralaminaren Kernen handelt, kann durch Addition weniger Fasern aus unterschiedlichen thalamischen Kerngebieten der Eindruck einer stärkeren Anfärbung in einem Zielgebiet entstehen. Darüber hinaus zeigten LINKE *et al.* (2000, eingereicht), daß die Intensität der Anfärbung abhängig von der Position der Injektion innerhalb der Kerngebiete sein kann. Eine im Vergleich geringere Anzahl gefärbter Neurone innerhalb bestimmter amygdalärer Kerngebiete kann auch auf diesen Umstand zurückgeführt werden. Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die caudalen paralaminaren Kerne bevorzugt zu den Kerngebieten projizieren, die eher zu den Ausgangsstationen der Amygdala bzw. zu den integrativen Elementen dorthin zählen. Weitere Einzelheiten werden im Kapitel 4.3 diskutiert.

4.2.1.2 Efferenzen zur Substantia innominata

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen amygdalären Efferenzen zur Substantia innominata hatten ihren Ursprung besonders in den cortexähnlichen Strukturen Nucleus corticalis anterior, Stria olfactoria lateralis (LOT3), den Kernen des centromedianen Komplexes (Nuclei centralis und medialis) und dem Nucleus basomedialis anterior. Einen Teil dieser Projektionen konnten bereits JOLKKONEN und PITKÄNEN (1997) in einer Arbeit zeigen, in der sie den anterograden Tracer PHA-L in verschiedene Untereinheiten der Nuclei lateralis, basolateralis, basomedialis und centralis amygdaloideum injizierten. Alle Projektionen zum basalen Vorderhirn lagen in der Substantia innominata. In der vorliegenden Arbeit wurde der umgekehrte Weg beschritten und ein retrograder Tracer in die Substantia innominata injiziert. Aufgrund der retrograden Markierung konnten jedoch - neben den bereits von JOLKKONEN und PITKÄNEN identifizierten - weitere Verbindungen von der Amygdala zur Substantia innominata demonstriert werden, die bei dem anterograden Ansatz nicht berücksichtigt wurden. Das sind vor allem die deutlich ausgeprägten Efferenzen des Nucleus medialis und der Stria olfactoria lateralis so wie die wenn auch nur schwachen Projektionen aus den Subdivisionen des Nucleus corticalis, den intercalierten Zellen und diversen amygdalären Übergangszonen.

Kombiniert man die Ergebnisse beider Studien, so folgt daraus, daß die Neurone des Nucleus centralis ausgeprägte Verbindungen mit der Substantia innominata ausbilden. Unterschiede in den Befunden der beiden Arbeiten gibt es bezüglich des lateralen Anteils des Nucleus

centralis. Während JOLKKONEN und PITKÄNEN in allen Untereinheiten eine starke Anfärbung fanden, ist in der vorliegenden Studie diese Region schwächer gefärbt. JOLKKONEN und PITKÄNEN fanden darüber hinaus eine ausgeprägte Efferenz des Nucleus basolateralis posterior zur Substantia innominata. Projektionen zu den Nuclei basomedialis, lateralis, und basolateralis anterior waren dagegen schwach ausgebildet. Der eigene retrograde Ansatz zeigte allerdings im Nucleus basomedialis - zumindest für den pars anterior - eine sehr deutliche Anfärbung, vergleichbar der des Nucleus centralis. Umgekehrt war in der vorliegenden Studie im gesamten Nucleus basolateralis nur eine geringe Anzahl gefärbter Neurone sichtbar. Die Ergebnisse einer Studie mit isotopmarkierten Aminosäuren (^3H -Leucin und ^3H -Prolin) (KRETTEK und PRICE, 1978a) wiederum entsprechen teils denen dieser Arbeit, teils denen der Studie von JOLKKONEN und PITKÄNEN. Hier waren nach Injektionen in den Nucleus basolateralis und den Nucleus basomedialis jeweils deutliche Anfärbungen in der Substantia innominata zu sehen. Auch wurde eine unterschiedlich starke Färbung zwischen den Nuclei basolateralis anterior und posterior gefunden. Diese war jedoch wieder genau entgegengesetzt, wie JOLKKONEN und PITKÄNEN sie beschrieben. RUSSCHEN *et al.* (1985a) dagegen bestimmten die Nuclei basolateralis posterior, basomedialis anterior und centralis als primäre Ursprungsorte für efferente Projektionen zur Substantia innominata.

Ein möglicher Grund für die nicht deckungsgleichen Befunde der Studien ist die Verwendung verschiedener Spezies. So bestimmten RUSSCHEN *et al.* (1985a) die Verbindungen an Primaten, KRETTEK und PRICE (1978a) verwendeten Katzen und Ratten, JOLKKONEN und PITKÄNEN (1997) arbeiteten an der Ratte.

Eine weitere mögliche Erklärung liegt in der topographischen Differenzierung der Projektionen zwischen amygdalären Kerngebieten und der Substantia innominata. So beschrieb GROVE (1988ab) eine Zweiteilung der Substantia innominata. Während der dorsale Anteil u.a. reziprok mit den Nuclei centralis und basolateralis verbunden ist, ist der ventrale Anteil u.a. reziprok mit den vorderen 2/3 des Nucleus medialis verbunden. Darüber hinaus zeigte sich in der Studie von KRETTEK und PRICE, daß nach Injektion in den Nucleus basolateralis markierte Zellen bevorzugt im caudalen Anteil der Substantia innominata zu finden sind. Im retrograden Ansatz dieser Arbeit liegt hier eine potentielle Fehlerquelle, da durch ungewollte Bevorzugung von Injektionen in eines der Teilgebiete der Substantia innominata Unstimmigkeiten bei einer quantitativen Aussage und im ungünstigsten Fall auch einer qualitativen Aussage auftreten können. Andererseits wurden in der vorliegenden Studie sowohl der Nucleus centralis als auch der Nucleus medialis als bevorzugte Ursprungsorte für Efferenzen zur Substantia innominata identifiziert. Ebenfalls wurde im Nucleus medialis eine Abnahme der Anzahl gefärbter Zellen von rostral nach caudal beobachtet, was den

Beobachtungen von GROVE entspricht. Auch decken sich die Befunde, abgesehen vom Nucleus basolateralis, mit den Ergebnissen von RUSSCHEN *et al.* (1985a).

Ein weiterer Aspekt ist, daß die ausgeprägte Verbindung von der Amygdala zur Substantia innominata als ventrale amygdalofugale Bahn auch weitere Gehirnareale innerviert (PRICE *et al.*, 1987; ZÁBORSZKY *et al.*, 1991). Zwar konnte gezeigt werden, daß die amygdalofugalen Fasern auf ihrem Weg durch die Substantia innominata Varicositäten ausbilden (RUSSCHEN und PRICE, 1984; RUSSCHEN *et al.*, 1985a) und synaptische Kontakte zwischen den Fasern der amygdalofugalen Bahn und Neuronen der Substantia innominata existieren (ZÁBORSZKY *et al.*, 1984). Inwieweit aber die Projektion von der Amygdala zur Substantia innominata mit Fluoro-Gold als retrograden Tracer vollständig erfaßt werden kann, bleibt offen.

Schließlich konnte für die parakapsulären intercalierten Zellmassen gezeigt werden, daß wahrscheinlich die von hier ausgehenden Projektionen zur Substantia innominata zumindest teilweise GABAerg sind. Das zeigten alternierende Schnittpräparate im Bereich ausgewählter intercalierter Zellmassen mit Überlappungen von retrograd markierten Zellkörpern und anterograd markierten Axonen einerseits und Zellen mit GABA-Immunreaktivität andererseits. Somit kann auch für die Ratte eine GABAerge Verbindung von den intercalierten Zellen zum cholinergen basalen Vorderhirn angenommen werden, wie sie von PARÉ und SMITH (1994) für die Katze bereits beschrieben wurde.

4.2.1.3 Die thalamo-amygdaläre Projektion zur Substantia innominata

Die Einzelbefunde zu den thalamischen Efferenzen zur Amygdala bzw. den amygdalären Afferenzen der Substantia innominata lassen sich unter Berücksichtigung der identifizierten Überlappungsgebiete und der Ergebnisse der durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen wie folgt zusammen fassen. Es existiert eine parallele Verschaltung von den caudalen paralaminaren Kernen des Thalamus über verschiedene amygdaläre Kerngebiete (Nuclei basomedialis, centralis, medialis, corticalis anterior, Stria olfactoria lateralis, parakapsuläre intercalierte Zellen, Nucleus lateralis, pars ventrolateralis) zur Substantia innominata, einem Teilgebiet des cholinergen basalen Vorderhirns. Die eigenen Untersuchungen und Befunde aus der Literatur zeigen, daß ein Teil der identifizierten Projektionen zur Substantia innominata GABAerg sein muß. Dieses betrifft vor allem die (parakapsulären) intercalierten Zellmassen (3.6; sowie NITECKA und BEN-ARI, 1987; McDONALD und AUGUSTINE, 1993; PARÉ und SMITH, 1994) und die Stria olfactoria lateralis (NITECKA und BEN-ARI, 1987) die eine hohe GABA-Immunreaktivität aufweisen. Der Nucleus centralis und etwas schwächer der Nucleus medialis sind dagegen die

Hauptzielgebiete GABAerger Neurone in der Amygdala. Hier findet man die höchste Anzahl von Zellendigungen mit Glutamat-Decarboxylase-(GAD-)Immunreaktivität (NITECKA und FROTSCHER, 1989b; McDONALD und AUGUSTINE, 1993; PITKÄNEN und AMARAL, 1994). GAD ist das GABA-synthetisierende Enzym. Auch in diesen beiden Kerngebieten konnte eine Doppelmarkierung nachgewiesen werden.

In den parakapsulären intercalierten Zellmassen wurden zudem elektronenmikroskopisch synaptische Kontakte zwischen anterograd markierten Axonen aus dem Thalamus und retrograd markierten Dendriten aus der Substantia innominata identifiziert. Das bedeutet, daß wenigstens in Teilen die Projektion vom Thalamus zum basalen Vorderhirn monosynaptisch verschaltet ist.

4.2.1.4 Weitere relevante extrinsische Verbindungen

An dieser Stelle sollen kurz Literaturbefunde zu den extrinsischen Afferenzen der amygdalären Kerngebiete aufgeführt werden, die Überlappungsgebiete beider Tracer aufwiesen (siehe Ergebnisteil 3.2.3) und die bisher noch nicht diskutiert wurden. Diese Verbindungen können funktionell interessant sein, da sie potentielle Kontrollstrukturen darstellen. Eine Diskussion der Funktionen dieser neuronalen Bahnen im einzelnen würde hier zu weit führen, ihre Auflistung soll jedoch verdeutlichen, in welcher Vielfalt die Verarbeitung sensorischer Reize in der Amygdala moduliert werden kann.

Die Kerngebiete wurden entsprechend ihrer gemeinsamen Projektionsgebiete nach PRICE *et al.* (1987) gruppiert:

(1) Die corticomediale Kerngruppe steht vor allem mit dem olfaktorischen und dem akzessorisch olfaktorischen System in Verbindung.

Die Stria olfactoria lateralis (LOT) und der Nucleus corticalis anterior erhalten Afferenzen aus dem Bulbus olfactorius (PRICE, 1973; SCALIA und WINANS, 1975; DEOLMOS *et al.*, 1978, 1985). Außerdem projizieren der Cortex piriformis und der Cortex entorhinalis hierher (PRICE, 1973; KRETTEK und PRICE, 1978b). Darüber hinaus erhalten diese Kerngebiete Projektionen aus medialen Thalamuskernen (Nucleus parataenialis, Nucleus reuniens, Nucleus paraventricularis). Der Nucleus medialis erhält Projektionen aus Strukturen entlang der gesamten Neuraxis so aus Gebieten der Medulla oblongata (Nucleus parabrachialis, Nucleus solitarius), aus dem Mesencephalon (Substantia nigra), aus dem Diencephalon (sensorische Relaiskerne des Thalamus [Ventrobasalkomplex, Genuculatum mediale] und dem lateralen und ventralen Hypothalamus) sowie dem basalen Vorderhirn, dem Subiculum und dem agranulären insulärem Cortex (PRICE *et al.*, 1987).

(2) Der basolaterale Komplex weist insbesondere Verbindungen mit dem Cortex auf.

Der Nucleus lateralis besitzt Afferenzen aus dem prä- und infralimbischen Cortex, dem posterioren insulären Cortex, dem ventralen lateralen entorhinalen Cortex, dem ventralen Subiculum sowie der CA1-Region des Hippocampus. Einige wenige Projektionen kommen aus subcorticalen Regionen (Pallidum ventrale, Nucleus interanteromedialis thalami) (PRICE *et al.*, 1987).

(3) Nucleus centralis

Der Nucleus centralis weist ähnliche Afferenzen wie der Nucleus medialis auf. Es fehlen jedoch die Projektionen aus dem dorsalen Thalamus. Eine starke und topographisch geordnete Projektion kommt aus dem Nucleus parabrachialis (Tegmentum pontis). Weitere Verbindungen stammen aus dem Locus coeruleus (Tegmentum pontis), dem Nucleus solitarius (Formatio reticularis myelencephali), Gebieten des Tegmentum mesencephali (Nuclei raphe dorsales, Nucleus peripeduncularis, Area tegmentalis ventralis). Außerdem bestehen afferente Verbindungen aus der Substantia nigra sowie den prä- und den infralimbischen Regionen (PRICE *et al.*, 1987).

Die intercalierten Zellen besitzen Afferenzen von der Substantia nigra, der Area tegmentalis ventralis und dem ventralen Subiculum (FALLON *et al.*, 1978; CANTERAS und SWANSON, 1992).

4.2.2 Intrinsische Verschaltungen der Amygdala

Die intrinsischen Verbindungen sind die Elemente der potentiellen Kontrollmechanismen der Amygdala. Im Rahmen der Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist zum einen die Integration der Kerngebiete zu untersuchen, in denen eine Überlappung der injizierten Tracer nachweisbar ist. Amygdaläre Kerne, die mit diesen in Verbindung stehen, können regulierend in den Signalfluß eingreifen. Andererseits ist auch von Interesse, ob die Zielgebiete der thalamischen Efferenzen und die Ausgangsgebiete für amygdaläre Efferenzen zur Substantia innominata intrinsisch verschaltet sind.

Eine Übersicht über die bislang beschriebenen intrinsischen Hauptwege gibt die Tabelle 4-1.

Es gilt als gesichert, daß die hauptsächlichen intrinsischen Verbindungen im Nucleus lateralis und im Nucleus basolateralis entspringen. Sie enden bevorzugt in den mehr medialen Kerngebieten wie den Nuclei basomedialis (PITKÄNEN und AMARAL, 1991; STEFANACCI *et al.*, 1992; PITKÄNEN *et al.*, 1995), medialis und corticalis, der Area amygdalohippocampalis (PITKÄNEN *et al.*, 1995) und insbesondere im Nucleus centralis (CAMPEAU und DAVIS, 1995).

Die prinzipiellen Verbindungen zwischen den Nuclei lateralis und centralis verlaufen über direkte Bahnen sowie indirekt über die Nuclei basolateralis und basomedialis (PITKÄNEN und AMARAL, 1991; STEFANACCI *et al.*, 1992; SMITH und PARÉ, 1994). Auch der Nucleus basomedialis projiziert zu den Nuclei centralis, medialis und corticalis und der Area amygdalohippocampalis. In umgekehrter Richtung gibt es nur schwache Verbindungen zurück zu den Nuclei lateralis und basolateralis. Somit ergibt sich innerhalb der Amygdala eine bevorzugte unidirektionale Richtung für den Informationsfluß von lateralen zu medialen Kerngebieten der Amygdala (PRICE *et al.*, 1987; AMARAL *et al.*, 1992).

Dieser Hypothese wurde in neuerer Zeit von PITKÄNEN *et al.* (1997) widersprochen. Sie betonten den reziproken Informationsfluß in der Amygdala mit Ausnahme der unidirektionalen Einbindung des Nucleus centralis und der Area amygdalohippocampalis. Letztendlich steht ihre Aussage jedoch nur im geringen Widerspruch zu den bisherigen Erkenntnissen. Zum einen wird ein Großteil der zurückführenden Projektionen in der Arbeit von PRICE *et al.* (1987) bereits beschrieben, ihre Bedeutung aber wohl aufgrund ihrer schwachen Ausprägung unterschätzt. Andererseits wird auch in der Arbeit von PITKÄNEN *et al.* (1997) eingeräumt, daß die reziproken Verbindungen in ihrer Ausprägung schwächer sind. Somit verschiebt ihre Hypothese lediglich die Gewichtung der Richtung des Informationsflusses von primär unidirektional auf primär reziprok.

Von besonderer Bedeutung sind die intrinsischen Verbindungen der Nuclei lateralis, basolateralis und corticalis posterior zu den Nuclei medialis und centralis. Ihr hoher Gehalt an GABA-Immunreaktivität (NITECKA und BEN-ARI, 1987) bildet eine Quelle für GABAerge Projektionen die ihrerseits funktionell wichtig sind (vergl. 4.3).

Tabelle 4-1 Intrinsische Verbindungen der Amygdala

Ursprung	Zielgebiet	Autor
Nucleus lateralis	Nucleus basolateralis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus basomedialis	KRETTEK und PRICE, 1978b
	Nucleus corticalis posterolateralis	OTTERSEN, 1982; SAVANDER <i>et al.</i> , 1996b
	Nucleus corticalis anterior	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus corticalis posteromedialis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus medialis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Area amygdalohippocampalis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus centralis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
Nucleus basolateralis	Nucleus lateralis	NITECKA <i>et al.</i> , 1981; SAVANDER <i>et al.</i> , 1996a, 1997
	anteriore und posteriore Untereinheit reziprok miteinander verknüpft	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus basomedialis	KRETTEK und PRICE, 1978b
	Nucleus corticalis posterolateralis	OTTERSEN, 1982

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 4-1 Fortsetzung

Ursprung	Zielgebiet	Autor
Nucleus basolateralis	Nucleus corticalis anterior	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus corticalis posteromedialis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus medialis	KRETTEK und PRICE, 1978b; NITECKA <i>et al.</i> , 1981
	Area amygdalohippocampalis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Stria olfactoria lateralis	KRETTEK und PRICE, 1978b; OTTERSEN, 1982
	Nucleus centralis	NITECKA <i>et al.</i> , 1981; PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
Nucleus basomedialis	Nucleus lateralis	SAVANDER <i>et al.</i> , 1996a, 1997
	anteriore und posteriore Untereinheit reziprok miteinander verknüpft	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus corticalis posterolateralis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus corticalis posteromedialis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Nucleus medialis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
	Area amygdalohippocampalis	PITKÄNEN <i>et al.</i> , 1997
Nucleus basomedialis	Nucleus centralis	OTTERSEN, 1982
Nucleus corticalis posterolateralis	Nucleus lateralis	OTTERSEN, 1982; SAVANDER <i>et al.</i> , 1996b
	Nucleus basolateralis	OTTERSEN, 1982
	Nucleus medialis	NITECKA <i>et al.</i> , 1981; OTTERSEN, 1982
	Nucleus centralis	OTTERSEN, 1982
Nucleus corticalis anterior	Nucleus corticalis posterolateralis	KRETTEK und PRICE, 1978b
	Stria olfactoria lateralis	KRETTEK und PRICE, 1978b
	Nucleus medialis	OTTERSEN, 1982
	Nucleus centralis	OTTERSEN, 1982
Nucleus corticalis posteromedialis	Nucleus medialis	OTTERSEN, 1982
Intercalierte Zellen	Nucleus lateralis	ASAN, 1997
	Nucleus basolateralis	DEOLMOS und INGRAM, 1972; KAMAL und TÖMBÖL, 1975; MILLHOUSE, 1986
	Nucleus medialis (bevorzugt von der Hauptgruppe)	DEOLMOS und INGRAM, 1972; KAMAL und TÖMBÖL, 1975; MILLHOUSE, 1986, ALHEID <i>et al.</i> , 1995
	Nucleus centralis (bevorzugt von den parakapsulären Anteilen)	DEOLMOS und INGRAM, 1972; KAMAL und TÖMBÖL, 1975; MILLHOUSE, 1986; ALHEID <i>et al.</i> , 1995
Stria olfactoria lateralis	Nucleus medialis	NITECKA <i>et al.</i> , 1981
Nucleus medialis	Nucleus lateralis	CANTERAS <i>et al.</i> , 1995
	Nucleus corticalis posteromedialis	KRETTEK und PRICE, 1978b; NITECKA <i>et al.</i> , 1981; OTTERSEN, 1982
	Nucleus corticalis posterolateralis	OTTERSEN, 1982

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, daß die Überlappungsgebiete der anterograd bzw. retrograd markierten Zellen sich fast ausnahmslos in amygdalären Kerngebieten mit integrativem Charakter, d.h. Gebieten mit ausgeprägter afferenter intrinsischer Einbindung wie der Nucleus medialis oder die Stria olfactoria lateralis, bzw. in der Hauptausgangsstation

der Amygdala dem Nucleus centralis befanden. Auch die Hauptprojektionsgebiete aus den paralaminaren thalamischen Kernen bzw. zur Substantia innominata lagen hier.

Trotz großer Übereinstimmung dieser Gebiete waren die Überlappungsareale relativ schwach ausgeprägt. Dies lag vor allem daran, daß anterograd markierte Axone und retrograd markierte Zellkörper prinzipiell zwar im selben Kerngebiet lagen, jedoch teilweise in unterschiedlichen Bereichen.

4.3 Die Rolle der Amygdala in der Signalverarbeitung und Kontrolle des cholinergen basalen Vorderhirns (Substantia innominata)

4.3.1 Subcorticale Übermittlung sensorischer Informationen und emotionales Gedächtnis

Es ist bekannt, daß die Amygdala bei der Analyse sensorischer Reize in bezug auf ihre emotionale Bedeutung eine wichtige Rolle spielt. Sie ist eine entscheidende Komponente für das „emotionale Gedächtnis“, das unter anderem Informationen über die emotionale Bedeutung von Ereignissen aufnimmt und speichert. Dabei kann sowohl angeborenes (BLANCHARD und BLANCHARD, 1972) als auch erlerntes Verhalten (SPIEGLER und MISHKIN, 1981) emotional moduliert werden. Die Verknüpfung zwischen erlerntem Verhalten und Emotion konnte mit dem Modell der auditorischen Furchtkonditionierung (vergl. Einleitung 1.2) besonders detailliert demonstriert werden.

4.3.1.1 Das Modell der sensorischen Verarbeitung in der Amygdala nach LEDOUX

Auf der Basis der auditorischen Furchtkonditionierung entwickelte LEDOUX (1993) ein Modell für die Einbindung der Amygdala in die Verknüpfung von akustischen Informationen mit emotionalem Inhalt. Dabei unterschied er vier amygdalopetale Bahnen. Eine direkte thalamo-amygdaläre Bahn („schneller“ Weg) vermittelt undiskriminierte modalitätsspezifische Informationen. Eine thalamo-cortico-amygdaläre Verbindung („langsamer“ Weg) wird für die Konditionierung von Stimuli benötigt, die auf Basis ihrer Perzeption analysiert werden müssen. Eine hippocampale Verbindung über das Subiculum ist beteiligt an der kontextuellen Konditionierung. Schließlich kann eine Verbindung zu den Assoziationscortices die Einbindung komplexer Denkleistungen ermöglichen. Dieses Modell ist wahrscheinlich auch auf die Verarbeitung anderer Modalitäten sensorischer Reize anwendbar (LINKE *et al.*, 1999).

4.3.1.2 Signalübertragung akustischer Reize

Mit Hilfe von gezielten Läsionen entlang der Hörbahn konnten die einzelnen Stationen der Signalübertragung für den bedingten akustischen Reiz bestimmt werden. Läsionen des auditorischen Cortex bewirkten keine Unterdrückung der Konditionierung, Läsionen der auditorischen Region des Thalamus (Corpus geniculatum mediale) (LEDOUX *et al.*, 1986) und der Colliculi inferior machten jedoch eine Konditionierung unmöglich (LEDOUX, 1994).

thalamo-amygdaläre Projektionen

Die auditorischen (multisensorischen) thalamischen Efferenzen zur Amygdala entstammen aus dem Corpus geniculatum mediale, pars medialis und dem Nucleus suprageniculatus, pars mediolateralis. Ihre Existenz konnte für die Ratte (OTTERSEN und BEN-ARI, 1979; TURNER und HERKENHAM, 1991), die Katze (OTTERSEN und BEN-ARI, 1979; RUSSCHEN, 1982) und Primaten (AMARAL *et al.*, 1992) nachgewiesen werden.

Als Eingangsstelle der Amygdala für auditorische Signale wurde der Nucleus lateralis erkannt. LEDOUX *et al.* (1990a) konnten zeigen, daß allein die vollständige Zerstörung des Nucleus lateralis die Konditionierung verhindert. Ob dieser Effekt jedoch darauf beruht, daß dadurch der Ort der Generierung und Speicherung (FANSELOW und LEDOUX, 1999) oder eher ein wichtiges Zwischenglied bei der Konsolidierung des emotionalen Gedächtnisses (CAHILL *et al.*, 1999) ausgeschaltet wird, bleibt umstritten.

4.3.1.3 Signalübertragung visueller Reize

Die Einbindung der Amygdala in die Verarbeitung visueller Reize sollte im Prinzip der von akustischen Reizen entsprechen.

Während für die thalamischen Kerne der retino-thalamo-corticalen Sehbahn (Corpora geniculata laterale) bisher keine Efferenzen zur Amygdala identifiziert wurden (LINKE *et al.*, 1999), konnten Bahnen aus den visuellen (tiefen) Schichten des Colliculus superior über thalamischen Kerngebieten (Nucleus suprageniculatus, Corpus geniculatum mediale, pars medialis, Nucleus intralaminaris posterior, Nucleus peripeduncularis) in die Amygdala demonstriert werden. Obwohl diese Projektionen in Teilen schon länger bekannt waren (ABRAMSON und CHALUPA, 1988; OTTERSEN und BEN-ARI, 1979; LEDOUX *et al.*, 1985ab; TURNER und HERKENHAM, 1991), wurde anatomisch die direkte Verbindung in ihrer Gänze erst kürzlich durch LINKE *et al.* (1999) nachgewiesen.

Ähnlich der auditorischen thalamischen Afferenzen ist der Nucleus lateralis auch für diese putativen visuellen Bahnen aus dem Thalamus das rezeptive Kerngebiet. Alle oben beschriebenen Afferenzen enden primär in den Nuclei lateralis und basolateralis.

4.3.1.4 Verarbeitung sensorischer Reize in der Amygdala

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zu einem verbesserten Verständnis der thalamo-amygdalofugalen Strukturen bei, die an der Verarbeitung sensorische Reize beteiligt sind. In der Amygdala wurden Überlappungsbereiche und synaptische Kontakte von Afferenzen aus dem Thalamus mit Projektionsneuronen zum cholinergen basalen Vorderhirn nachgewiesen. Die beteiligten amygdalären Kerngebiete waren die Nuclei centralis, basomedialis, medialis, corticalis anterior, die Stria olfactoria lateralis, parakapsuläre intercalierte Zellmassen (angesiedelt zwischen den Nuclei lateralis, basolateralis und centralis) und der Nucleus lateralis, pars ventrolateralis. Im folgenden werden mögliche Funktionen der ausgeprägten Projektionen mit Hilfe von Befunden aus der Literatur erörtert. Weitere Regionen mit nur sehr schwach ausgeprägten oder fehlenden Überlappungsarealen sind zwar im Ergebnisteil beschrieben, sollen hier jedoch nicht weiter behandelt werden.

Der Nucleus centralis und der Nucleus lateralis sind nachweislich in die Furchtkonditionierung eingebunden (Übersicht in LEDOUX, 1994).

Hauptausgangsstation der Amygdala für die Auslösung affektiver Reaktionen ist der Nucleus centralis. Dieser projiziert insbesondere zu den autonomen Bereichen des Hypothalamus und des Stammhirns (DAVIS, 1992ab; GALLAGHER und CHIBA 1996). KAPP *et al.* (1979, 1994) demonstrierten an Kaninchen, daß die Erhöhung der Pulsfrequenz auf einen bedingten akustischen Reiz vermindert wird, wenn nach einer Furchtkonditionierung der Nucleus centralis zerstört wird. LEDOUX (1994) zeigte mit dem gleichen experimentellen Ansatz für Ratten einen geringeren Blutdruckanstieg und eine verminderte Schreckstarre. Der direkte thalamo-amygdaläre Faserverlauf über diesen Kern zum basalen Vorderhirn ist der schnellste Weg, um die Amygdala in die Steuerung einer unbewußten Körperreaktion (Blutdruck, Herzschlagrate, Muskeltonus) mit einzubeziehen, die durch einen sensorischen Reiz ausgelöst wird. Gleichzeitig enden in diesem Kerngebiet eine Vielzahl intrinsischer amygdalärer Verbindungen, so daß das gesamte Potential der Beeinflussungsmöglichkeiten durch die Amygdala ausgeschöpft werden kann. Auffällig ist dabei die hohe Anzahl GABAerger Zellendigungen im Nucleus centralis (MCDONALD und AUGUSTINE, 1993; PITKÄNEN und AMARAL, 1994). Somit scheint dieses Kerngebiet vor allem hemmende Einflüsse

weiterzuvermitteln - ohne diese jedoch selbst zu generieren, da hier nur geringe GABA-Immunreaktivität nachgewiesen wurde.

Da der Nucleus lateralis auffällig viele Eingangsneurone von corticalen sensorischen und assoziativen Feldern, sowie von einigen thalamischen Kerngebieten aufweist, wird angenommen, daß dieser Kern als die sensorische Haupteingangsstelle der Amygdala fungiert (AMARAL *et al.*, 1992; LEDOUX, 1992). Allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit nur schwach ausgeprägte Überlappungsgebiete in diesem Kerngebiet nachgewiesen werden. Legt man jedoch die Auffassung von PRICE *et al.* (1987) zugrunde, daß der intraamygdaläre Informationsfluß bevorzugt von lateralen zu centromedianen Arealen verläuft, ist dies durchaus verständlich. Eine Einbindung dieses Kerns in den direkten Faserverlauf würde nur eine marginale Einflußnahme durch die Amygdala erlauben. Darüber hinaus ist von Bedeutung, daß der ventrolaterale Anteil des Nucleus lateralis, der als einziges Gebiet dieses Kernes eine etwas ausgeprägtere Doppelmarkierung aufweist, eine Projektion vom Nucleus corticalis posterolateralis erhält, die ein potentiell anatomisches Substrat für die Weiterleitung olfaktorischer Informationen ist (SAVANDER *et al.*, 1996b).

Der Nucleus basomedialis ist ein integratives Element im intraamygdalären Netzwerk (PITKÄNEN *et al.*, 1997). Informationen werden hier an verschiedenste Kerngebiete der Amygdala weitergegeben und gesammelt. Der Nucleus medialis stellt ein eher extrinsisches Integrationselement mit einer Vielzahl von Verbindungen zu anderen Hirnarealen dar. Es bestehen aber auch ausgeprägte intrinsische Verbindungen.

Die Neurone der intercalierten Zellmassen und der Stria olfactoria lateralis weisen den höchsten Grad an GABA-Immunreaktivität auf (NITECKA und BEN-ARI, 1987). GABA ist ein inhibitorischer Transmitter, so daß die gezeigte Einbindung dieser amygdalären Komponenten ein hemmendes Steuerungselement darstellt.

Bemerkenswert ist die Verarbeitung olfaktorischer Reize in der Amygdala. Der Nucleus corticalis anterior und die Stria olfactoria lateralis gehören zu den Kerngebieten mit prominenten Verbindungen zum olfaktorischen System. Die ausgeprägten Efferenzen dieser Kerne zur Substantia innominata sind geeignet, um physiologische Reaktionen auszulösen. Über die Stria olfactoria lateralis werden die Informationen über eine potentiell hemmende Verbindung weitergeleitet. Über den Nucleus lateralis (pars ventrolateralis) - via Nucleus corticalis posterolateralis - könnten sie in die Bildung des „emotionalen Gedächtnisses“ eingebunden sein. Über die Funktion dieser parallelen Verarbeitung kann nur spekuliert werden. Wie die vorliegende Arbeit zeigte, sind beide Kerngebiete in eine direkte Verbindung vom Thalamus zur Substantia innominata eingebunden, die eine wichtige Rolle in der

Regulation der corticalen Weckreaktion spielt (siehe 4.3.2). Daher soll eine funktionelle Betrachtung im Zusammenhang mit der Kontrolle der corticalen Aktivierung erfolgen.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Amygdala parallelen Input aus sensorischen Regionen des Thalamus erhält. Die Umschaltung der Signale zum cholinergen basalen Vorderhirn bzw. der Substantia innominata erfolgt an amygdalären Kerngebieten mit hohem integrativen Charakter für extrinsische und intrinsische Verbindungen bzw. an der Hauptausgangsstelle.

4.3.2 Amygdaläre Kontrolle des cholinergen basalen Vorderhirns

Das cholinerge Projektionssystem des basalen Vorderhirns zum Neocortex spielt eine entscheidende Rolle für die corticale Aktivierung z.B. bei Wachheit oder gesteigerter Aufmerksamkeit (vergl. 1.5). Die vorliegende Arbeit zeigt ein neuroanatomisches Substrat, über das die Amygdala in die Kontrolle der corticalen Aktivität eingebunden sein könnte. Es gelang der Nachweis einer direkten thalamo-amygdalären Verbindung zur Substantia innominata. Diese verläuft über verschiedene amygdaläre Kerngebiete, so daß eine Vielzahl modulierender Effekte ermöglicht wird. Da die Amygdala tatsächlich diese Funktion innehat, konnte bereits mit EEG-Ableitungen nach elektrischer Stimulation der Amygdala demonstriert werden (DRINGENBERG und VANDERWOLF, 1996).

Die eigenen Befunde lassen den Schluß zu, daß zumindest ein Teil der gefundenen Projektionen bei der Ratte GABAerg ist. Es wurden doppelt markierte Bereiche in den parakapsulären intercalierten Zellmassen gefunden. Darüber hinaus konnte anhand alternierender Schnittpräparate in den selben Bereichen GABAerge Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden von NITECKA und BEN-ARI (1987), die eine hohe GABA-Immunreaktivität in den intercalierten Zellen zeigten. Eine GABAerge Projektion zur Substantia innominata wurde bereits auch für die Katze beschrieben (PARÉ und SMITH, 1994). Die Stria olfactoria lateralis weist ebenfalls eine hohe Anti-GABA-Immunreaktivität auf (NITECKA und BEN-ARI, 1987) und gehört in dieser Arbeit zu den Gebieten mit der ausgeprägtesten Doppelmarkierung. Darüber hinaus soll nicht unerwähnt bleiben, daß sowohl bei der Ratte (NITECKA und BEN-ARI, 1987; NITECKA und FROTSCHER, 1989ab), der Katze (PARÉ und SMITH, 1993) als auch beim Affen (MCDONALD und AUGUSTINE, 1993; PITKÄNEN und AMARAL, 1994) ein intrinsisches amygdaläres GABAerges System existiert, das sämtliche Kerngebiete der Amygdala zu erfassen scheint, auch wenn es unterschiedlich stark ausgeprägt ist. So ständen letztendlich alle Projektionen zur Substantia innominata unter möglicher GABAerger Beeinflussung. Da dieser Neurotransmitter

inhibitorisch wirkt, könnte die Funktion der Amygdala sein, das cortical aktivierende System des cholinergen basalen Vorderhirns zu hemmen.

Bemerkenswert ist dabei die parallele Verschaltung olfaktorischer Reize (4.3.1.4), die sowohl direkt - via Stria olfactoria lateralis - über eine potentiell hemmende, als auch über amygdaläre Strukturen, die an der Bildung des „emotionalen Gedächtnisses“ beteiligt sind, zum cholinergen basalen Vorderhirn weitergeleitet werden können. Es erscheint durchaus zweckmäßig, die corticale Aktivität umgekehrt proportional zur Intensität eines Reizes zu koppeln und dann möglicherweise über das „emotionale Gedächtnis“ regulierend einzuwirken. Somit kann zunächst einer „Reizüberflutung“ vor allem bei Tieren mit einem ausgeprägten Geruchssinn vorgebeugt werden, gleichzeitig jedoch bestimmte Informationen z.B. als Warnsignal herausgefiltert werden. Vermutlich handelt es sich hier um ein entwicklungsgeschichtlich altes Regulationsprinzip, da sich das Telencephalon aus einem „primitiven“ Riechhirn (Rhencephalon) entwickelte, und der olfaktorische Sinn somit ein sehr ursprünglicher Sinn ist. Dieser Mechanismus scheint auch für andere sensorische Reize zweckmäßig zu sein.

Allerdings ist des weiteren festzustellen, daß wahrscheinlich auch cholinerge Projektionen aus der Amygdala zum cholinergen basalen Vorderhirn existieren. Teilweise sind die in der Literatur beschriebenen Gebiete mit hohem oder mittlerem Anteil cholinacetyl-transferase-positiver Zellen (ChAT) und die in dieser Arbeit nachgewiesenen Gebiete mit doppelter Markierung identisch (Stria olfactoria lateralis, Nucleus corticalis anterior, Nucleus basomedialis, parakapsuläre intercalierte Zellen), teilweise liegen die Überlappungsgebiete jedoch auch in amygdalären Kerngebieten mit geringer Anzahl ChATgefärbter Neurone (Nuclei medialis und centralis) (HECKER und MESULAM, 1994; ALHEID *et al.*, 1995).

Das könnte bedeuten, daß die amygdaläre Verarbeitung sensorischer Reize und ihre Weiterleitung an das cholinerge basale Vorderhirn in drei Stufen ablaufen kann. Über eine cholinerge Projektion wird die sensorische Information direkt weitergeleitet. Diese Projektion kann durch das intrinsische GABAerge System inhibiert werden. Zusätzlich gibt es GABAerge Efferenzen, die innerhalb der Substantia innominata hemmend auf die corticale Weckreaktion einwirken. Eine besondere Rolle könnten dabei die Stria olfactoria lateralis und die parakapsulären intercalierten Zellen spielen. Beide weisen den höchsten Anteil GABAerger Zellen in der Amygdala auf und zeigen gleichzeitig ein hohes Maß an cholinenger Immunreaktivität.

4.3.3 Schlußfolgerungen

Mit der Integration von Reiz, emotionalem Gedächtnis und Kontrolle der corticalen Aktivierung ist die Amygdala in der Lage eine Vielzahl komplexerer Gehirnleistungen auf der subcorticalen Ebene zu kontrollieren und zu generieren. So können mit der Verknüpfung von Reiz und Emotionen bestimmte Stimuli einen besonderen Bedeutungsinhalt bekommen und dadurch zu einer „erlernbaren“ Verhaltensreaktion führen. Auch die Kopplung von Reiz und Weckreaktion auf subcorticaler Ebene ist offensichtlich von Vorteil. So können innerhalb kurzer Zeit (über)lebenswichtige Mechanismen aktiviert werden. Eine besonders rasche Weiterleitung erfolgt dabei über die monosynaptischen Verschaltungen, wie sie in den parakapsulären intercalierten Zellmassen nachgewiesen werden konnten. Die zusätzliche Einbindung von Emotionen bewirkt eine weitere qualitative Verbesserung. Ohne diese läßt sich die Stärke der Aktivierung nur über die Intensität der Reizstärke regulieren. In Verbindung mit einer entsprechenden Emotion können jedoch schon schwache Reize ein hohes Maß an corticaler Aktivität auslösen. Auch die Umkehrung, daß nur eine schwache Weckreaktion erfolgt, obwohl ein starker Stimulus einwirkt, ist von Bedeutung. Dieses ermöglicht ein diskriminiertes Verhalten in Situationen mit vielfältiger Reizeinwirkung und so z.B. ein Unterscheiden von tatsächlichen von vermeintlichen Gefahrensituationen. Möglicherweise ist dieses sogar die Hauptaufgabe der Modulation der corticalen Aufmerksamkeit durch die Amygdala, die aufgrund der zumindest teilweisen GABAergen Projektionen hemmend wirken kann. Betrachtet man die Symptomatik des KLÜVER-BUCY-Syndroms bzw. das Verhalten von Affen nach bilateraler Läsion der Amygdala finden sich aufgrund der entstehenden Verhaltensänderungen Hinweise die diese Überlegungen stützen. Unter der Voraussetzung, daß ein hoher Level an corticaler Aktivität mit hoher Motivation und Aufmerksamkeit gekoppelt ist, lassen sich ungehemmte und undifferenzierte Triebhaftigkeit (wie ausgeprägte orale Tendenzen und Hypersexualität) durch das Fehlen der inhibitorischen Modulation der Amygdala erklären. Die Kopplung von corticaler Aktivität und „emotionalem Gedächtnis“ erlaubt jedoch nicht nur eine Modulation der Wachreaktion durch emotionale Tönung von Signalen aus der Umwelt. Umgekehrt ist auch eine Beeinflussung der Gedächtnisbildung aufgrund (emotionaler) corticaler Aufmerksamkeit denkbar.

5 Zusammenfassung

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung einer neuronalen Verbindung vom Thalamus über die Amygdala zum cholinergen basalen Vorderhirn bei der Ratte.

Um Aufschluß über die anatomische Struktur zu erhalten, wurde eine *in vivo* Doppel-Tracer-Studie durchgeführt. Die thalamischen Efferenzen wurden durch iontophoretische Injektionen des anterograden Tracers *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin (PHA-L) markiert. Die Identifizierung der neuronalen Verbindung zwischen Amygdala und cholinergem basalen Vorderhirn erfolgte durch iontophoretische Injektionen des retrograden Tracers Fluoro-Gold in die Substantia innominata. Das Lectin und der Farbstoff wurden mit immunhistochemischen Verfahren visualisiert. Mit einem Lichtmikroskop konnten dann die Zielgebiete der gefärbten Neurone in der Amygdala identifiziert werden. Die Überlappungsbereiche beider Färbungen wurden zum Nachweis synaptischer Verbindungen mit Hilfe eines Elektronenmikroskops untersucht. Um die Neurone näher zu charakterisieren, wurden zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von GABA und dem Acetylcholin synthetisierenden Enzym Cholinacetyl-Transferase durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen:

1. Mit PHA-L markierte Axone aus dem Thalamus (Corpus geniculatum mediale, pars medialis (MGM), Nucleus intralaminaris posterior (PIL), Nucleus peripeduncularis (PP)) wurden in der Amygdala nachgewiesen. Deutliche Anfärbungen waren in folgenden Kerngebieten zu finden: im Nucleus basomedialis (BM), dem caudaleren Bereich der Hauptgruppe der intercalierten Zellen (IM), dem Nucleus corticalis anterior (ACo) dem medialen und kapsulären Teil des Nucleus centralis (CeM, CeC), der Stria olfactoria lateralis (LOT2), sowie ventralen Anteilen des Nucleus medialis.
2. Nach Injektionen von Fluoro-Gold in die Substantia innominata wurden angefarbte Zellkörper besonders ausgeprägt in folgenden amygdalären Kerngebieten gefunden: in den cortexähnlichen Strukturen Nucleus corticalis anterior (ACo), der Stria olfactoria lateralis (LOT), dem Bettkern des Tractus olfactorius (BAOT), den Kernen des centromedianen Komplexes (Nuclei centralis und medialis) den intercalierten Zellmassen und dem Nucleus basomedialis, pars anterior (BMA).

3. Die Doppelfärbungen zeigten eine Überlappung der Projektionsgebiete im Nucleus centralis und Nucleus basomedialis. Außerdem konnten überlappende Gebiete in den intercalierten Zellmassen (angesiedelt zwischen den Nuclei lateralis, basolateralis und centralis), dem Nucleus medialis, dem Nucleus corticalis anterior und einige wenige im Nucleus lateralis, pars ventrolateralis nachgewiesen werden.
4. Alternierende Schnitte konnten zeigen, daß sich in Überlappungsgebieten, die sich mittels Nisslfärbungen als intercalierte Zellmasse identifizieren ließen, GABA-Immunreaktivität nachweisen läßt. Aus dieser Beobachtung ist zu folgern, daß die Signalverarbeitung in der Amygdala wenigstens in Teilen über GABAerge Neurone erfolgt.
5. Schnittpräparate aus dem Bereich der Injektionsorte im basalen Vorderhirn wurden immunhistochemisch untersucht. Der Nachweis von Cholinacetyl-Transferase positiven Zellen im Bereich des Injektionsortes lassen den Schluß zu, daß zumindest ein Teil der amygdalären Efferenzen tatsächlich zum cholinergen basalen Vorderhirn zieht.
6. Die Analyse der Ultrastruktur mit dem Elektronenmikroskop zeigte, daß in den Überlappungsgebieten der Amygdala anterograd markierte Axone aus dem Thalamus mit retrograd markierten Dendriten aus der Substantia innominata synaptische Kontakte ausbilden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine mögliche anatomische Grundlage für die intraamygdaläre Verarbeitung der sensorischen Informationen, die über subcorticale Afferenzen vermittelt an das cholinerge basale Vorderhirn übermittelt werden. Unter funktionellen Gesichtspunkten lassen sich die Ergebnisse folgendermaßen deuten:

Die Verbindung von sensorischen Informationen, Emotion und corticaler Aktivierung in der Amygdala ermöglicht die Kontrolle und Generierung vielfältiger komplexer Gehirnleistungen auf subcorticaler Ebene. Die Verknüpfung von Reiz und Emotionen können einem Stimulus einen besonderen Bedeutungsinhalt verleihen und so zu einer „erlernbaren“ Verhaltensreaktion führen. Mit der Kopplung von Reiz und corticaler Aktivität auf subcorticaler Ebene können innerhalb kurzer Zeit lebenswichtige Mechanismen aktiviert werden. Die Modulation der corticalen Weckreaktion mit einem emotional gefärbten Reiz ist eine weitere Verbesserung der amygdalären Kontrollfunktion. Ohne die emotionale Komponente läßt sich die Stärke der Aktivierung nur über die Intensität der Reizstärke regulieren. Mit einer entsprechenden Emotion gekoppelte können jedoch schon schwache Reize eine starke Weckreaktion hervorrufen. Aufgrund der Möglichkeit Informationen über GABAerge also inhibitorische Neurone weiterzuleiten ist auch der umgekehrte Fall denkbar: eine schwache corticale Aktivierung, infolge eines starken Stimulus. Dieses ermöglicht ein

diskriminiertes Verhalten in Situationen mit mannigfacher Reizeinwirkung. Möglicherweise ist dieses sogar die Hauptaufgabe der Kontrolle der corticalen Aktivität durch die Amygdala. Die Kopplung von corticaler Aktivität und „emotionalem Gedächtnis“ ermöglicht jedoch nicht nur eine Modulation der Wachreaktion durch emotional gefärbte Reize sondern im Gegenzug auch eine Beeinflussung der Gedächtnisbildung entsprechend der (emotionalen) corticalen Aufmerksamkeit. Die Aufklärung der detaillierten Funktionen der Afferenzen von den thalamischen paralaminaren Kernen und den verschiedenen Efferenzen zum cholinergen basalen Vorderhirn bleibt jedoch Verhaltensexperimenten vorbehalten, die nicht Gegenstand dieser neuroanatomischen Arbeit waren.

6 Literaturverzeichnis

- (1985) Lehrbuch der Zoologie. Siewing R. (Hrsg.), Band 2 Systematik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (1986) Brockhaus-Enzyklopädie in vierundzwanzig Bänden. F. A. Brockhaus, Mannheim.
- (1990) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch: mit klinischen Syndromen und Nomina Anatomica. de Gruyter, Berlin, New York.
- (1992) The Amygdala: Neurobiological Aspects Of Emotion, Memory, And Mental Dysfunction. Aggleton J. P. (ed). Wiley-Liss, New York [u.a.].
- (1999) Roche Lexikon Medizin. Urban und Fischer, München.
- Abdulla F. A., Calaminici M. R., Raevsky V. V., Sinden J. D., Gray J. A., Stephenson J. D. (1994) An iontophoretic study of the effects of alpha-amino-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis on cholinergic and GABAergic influences on frontal cortex neurones of rats. *Exp Brain Res* 98 (3):441-456.
- Abramson B. P., Chalupa L. M. (1988) Multiple pathways from the superior colliculus to the extrageniculate visual thalamus of the cat. *J Comp Neurol* 271 (3):397-418.
- Adams J. C. (1981) Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product [letter]. *J Histochem Cytochem* 29 (6):775.
- Adolphs R., Tranel D., Damasio H., Damasio A. R. (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala [see comments] . *Nature* 372 (6507):669-672.
- Aggleton J. P., Friedman D. P., Mishkin M. (1987) A comparison between the connections of the amygdala and hippocampus with the basal forebrain in the macaque. *Exp Brain Res* 67 (3):556-568.
- Alheid G. F., Heimer L. (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27 (1):1-39.
- Alheid G. F., DeOlmos J. S., Beltramino C. A. (1995) Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G. (ed) *The Rat Nervous System*, chapt. 22. Academic Press, San Diego, pp. 495-578.
- Amaral D. G., Price J. L., Pitkänen A., Carmichael S. T. (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: Aggleton J. P. (ed) *The Amygdala: Neurobiological Aspects Of Emotion, Memory, And Mental Dysfunction*, chapt. 1. Wiley-Liss, New York [u.a.], pp. 1-66.
- Arendt T., Allen Y., Marchbanks R. M., Schugens M. M., Sinden J. D., Lantos P. L., Gray J. A. (1989) Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain brain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projection system. *Neuroscience* 33 (3):435-462.
- Asan E. (1997) Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. *Cell Tissue Res* 288 (3):449-469.
- Bard P. (1929) The neuro-humoral basis of emotional reactions. In: Munchison C. A. (ed) *Foundations Of Experimental Psychology*. Clark University Press, Worcester, Mass., pp. 449-487.
- Bard P. (1934) On emotional expression after decortication with some remarks on certain theoretical views. Part II. *Psychol Rev* 41:424-449.
- Bauer T. W., Keil M. (1997) Informationsverarbeitung und Verhaltensbiologie. In: Buselmeier W. (Hrsg.) *Weltbild Kolleg Abiturwissen Biologie, Kapitel 5. Weltbild, Augsburg*, S. 305-431.
- Bechara A., Tranel D., Damasio H., Adolphs R., Rockland C., Damasio A. R. (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans . *Science* 269 (5227):1115-1118.

- Belardetti F., Borgia R., Mancina M. (1977) Prosencephalic mechanisms of ECoG desynchronization in cerveau isole cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 42 (2):213-225.
- Birbaumer N., Jänig W. (1995) Motivation und Emotion. In: Schmidt R. F., Thews G. (Hrsg.) *Physiologie des Menschen, Kapitel 9*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 167-183.
- Blanchard D. C., Blanchard R. J. (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* 81 (2):281-290.
- Bolam J. P. (1992) Preparation of central nervous system tissue for light and electron microscopy. In: Bolam J. P. (ed) *Experimental Neuroanatomy: A Practical Approach*, chapt. 1. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp. 1-29.
- Broca P. P. (1878) Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales. Le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série des mammifères. *Rev Anthropol* 1:385-498.
- Broca P. P. (1879) Recherches sur les centres olfactifs. *Rev Anthropol* 2:385-455.
- Brodal A. (1947) The amygdaloid nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 87:1-16.
- Burdach K. F. (1819-1822) *Vom Baue und Leben des Gehirns.*, Leipzig.
- Caffé A. R., van Leeuwen F. W., Luiten P. G. (1987) Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J Comp Neurol* 261 (2):237-252.
- Cahill L., Weinberger N. M., Roozendaal B., McGaugh J. L. (1999) Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questiones and caveats. *Neuron* 23:227-228.
- Campeau S., Davis M. (1995) Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci* 15 (3 Pt 2):2301-2311.
- Canteras N. S., Swanson L. W. (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324 (2):180-194.
- Canteras N. S., Simerly R. B., Swanson L. W. (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360 (2):213-245.
- Carlsen J., Záborszky L., Heimer L. (1985) Cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral amygdaloid complex: a combined retrograde fluorescent and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 234 (2):155-167.
- Casamenti F., Deffenu G., Abbamondi A. L., Pepeu G. (1986) Changes in cortical acetylcholine output induced by modulation of the nucleus basalis. *Brain Res Bull* 16 (5):689-695.
- Coons A. H., Kaplan M. H. (1950) Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for or the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exper Med* 91:1-13.
- Crosby E. C., Humphrey T. (1941) Studies of the vertebrate telencephalon: II. The nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus tuberculum olfactorium and the amygdaloid complex in adult man. *J Comp Neurol* 74:309-352.
- Crosby E. C., Humphrey T. (1944) Studies of the vertebrate telencephalon: III. The amygdaloid complex in the shrew (*Blarina brevicauda*). *J Comp Neurol* 81:285-305.
- Dado R. J., Burstein R., Cliffer K. D., Giesler Jr. G. J. (1990) Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage. *Brain Res* 533 (2):329-333.
- Davis M. (1992a) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- Davis M. (1992b) The role of the amygdala in fear potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13:35-41.
- DeOlmos J. S., Ingram W. R. (1972) The projection field of the stria terminalis in the rat brain. An experimental study. *J Comp Neurol* 146 (3):303-334.

- DeOlmos J. S., Hardy H., Heimer L. (1978) The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol* 181 (2):213-244.
- DeOlmos J. S., Alheid G. F., Beltramino C. A. (1985) Amygdala. In: Paxinos G. (ed) *The Rat Nervous System*, vol. 1. Academic Press, San Diego, pp. 223-334.
- Detari L., Vanderwolf C. H. (1987) Activity of identified cortically projecting and other basal forebrain neurones during large slow waves and cortical activation in anaesthetized rats. *Brain Res* 437 (1):1-8.
- Dringenberg H. C., Vanderwolf C. H. (1996) Cholinergic activation of the electrocorticogram: an amygdaloid activating system. *Exp Brain Res* 108 (2):285-296.
- Fallon J. H., Koziell D. A., Moore R. Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 180 (3):509-532.
- Fisher R. S., Buchwald N. A., Hull C. D., Levine M. S. (1988) GABAergic basal forebrain neurons project to the neocortex: the localization of glutamic acid decarboxylase and choline acetyltransferase in feline corticopetal neurons. *J Comp Neurol* 272 (4):489-502.
- Fox C. A. (1940) Certain basal telencephalic centers in the cat. *J Comp Neurol* 72:1-62.
- Gallagher M., Chiba A. A. (1996) The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol* 6 (2):221-227.
- Gerfen C. R., Sawchenko P. E. (1984) An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* 290 (2):219-238.
- Geschwind N. (1965) Disconnexion syndromes in animals and man. I. *Brain* 88 (2):237-294.
- Girgis M. (1968a) Distribution of cholinesterase in the basal rhinencephalic structures of the Grivet monkey (*Cercopithecus aethiops aethiops*). *Acta Anat Basel* 70 (4):568-576.
- Girgis M. (1968b) Histochemical localization of cholinesterase in a rodent, a sub-primate and a primate brain. *Histochemie* 16 (4):307-314.
- Girgis M. (1969a) The amygdala and the sense of smell. *Acta Anat Basel* 72 (4):502-519.
- Girgis M. (1969b) Distribution of cholinesterase in the basal rhinencephalic structures of the Senegal bush baby (*Galago senegalensis senegalensis*). *Acta Anat Basel* 72 (1):94-100.
- Girgis M. (1980) Acetylcholinesterase enzyme localization in the amygdala: a comparative histochemical and ultrastructural study. *Acta Anat Basel* 106 (2):192-202.
- Gloor P. (1960) Amygdala. In: Field J., Magoun H. W., Hall V. E. (eds) *Handbook Of Physiology*, Sect 1, Neurophysiology. American Physiological Society, Washington DC, pp. 1395-1420.
- Grove E. A. (1988a) Efferent connections of the substantia innominata in the rat. *J Comp Neurol* 277 (3):347-364.
- Grove E. A. (1988b) Neural associations of the substantia innominata in the rat: afferent connections. *J Comp Neurol* 277 (3):315-346.
- Hall E., Geneser-Jensen F. A. (1971) Distribution of acetylcholinesterase and monoamine oxidase in the amygdala of the guinea pig. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 120 (2):204-221.
- Hecker S., Mesulam M. M. (1994) Two types of cholinergic projections to the rat amygdala. *Neuroscience* 60 (2):383-397.
- Heimer L., Alheid G. F. (1991) Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. In: Napier T. C., Kalivas P. W., Hanin I. (eds) *Advances In Experimental Medicine And Biology*, vol. 295 *The Basal Forebrain: Anatomy to Function*. Plenum Press, New York, pp. 1-42.
- Heimer L., Zahm D. S., Alheid G. F. (1995) Basal ganglia. In: Paxinos G. (ed) *The Rat Nervous System*, chapt. 23. Academic Press, San Diego pp. 579-628.

- Hepler D. J., Wenk G. L., Olton D. S., Coyle J. T. (1985a) Lesions in nucleus basalis magnocellularis and medial septal area of rats produce similar memory impairments in appetitive and non-appetitive behavioral tasks. *Ann N Y Acad Sci* 444:518-519.
- Hepler D. J., Wenk G. L., Cribbs B. L., Olton D. S., Coyle J. T. (1985b) Memory impairments following basal forebrain lesions. *Brain Res* 346 (1):8-14.
- Hepler D. J., Olton D. S., Wenk G. L., Coyle J. T. (1985c) Lesions in nucleus basalis magnocellularis and medial septal area of rats produce qualitatively similar memory impairments. *J Neurosci* 5 (4):866-873.
- Herkenham M. (1986) New perspectives in the organization and evolution of nonspecific thalamocortical projections. In: Jones E. G., Peters A. (eds) *Cerebral Cortex*, vol. 5 Sensory-Motor Areas and Aspects of Cortical Connectivity. Plenum Press, New York, pp. 403-445.
- Hsu S. M., Raine L. (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29 (11):1349-1353.
- Hsu S. M., Raine L., Fanger H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 (4):577-580.
- Humphrey T. (1936) The telencephalon of the bat. I. The non-cortical nuclear masses and certain pertinent fiber connections. *J Comp Neurol* 65:603-711.
- Jasper H. H., Tessier J. (1971) Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science* 172 (983):601-602.
- Johnston J. B. (1923) Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol* 35:337-481.
- Jolkkonen E., Pitkänen A. (1997) Projections from the amygdaloid complex to the basal forebrain cholinergic system. *Soc Neurosci Abstr.* 23:2101.
- Kaada B. R. (1951) Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of "rhinencephalic" and other structures in primates, cat and dog. *Acta Physiol Scand* [Suppl 83] 24:1-285.
- Kamal A. M., Tömböl T. (1975) Golgi studies on the amygdaloid nuclei of the cat. *J Hirnforsch* 16 (3):175-201.
- Kanai T., Szerb J. C. (1965) Mesencephalic reticular activating system and cortical acetylcholine output. *Nature* 205:80-82.
- Kapp B. S., Frysinger R. C., Gallagher M., Haselton J. R. (1979) Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. *Physiol Behav* 23 (6):1109-1117.
- Kapp B. S., Supple Jr. W. F., Whalen P. J. (1994) Effects of electrical stimulation of the amygdaloid central nucleus on neocortical arousal in the rabbit. *Behav Neurosci* 108 (1):81-93.
- Klüver H., Bucy P. C. (1937) "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 119:352-353.
- Klüver H., Bucy P. C. (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry* 42:979-1000.
- Köhler C., Haglund L., Swanson L. W. (1984) A diffuse alpha MSH-immunoreactive projection to the hippocampus and spinal cord from individual neurons in the lateral hypothalamic area and zona incerta. *J Comp Neurol* 223 (4):501-514.
- Krettek J. E., Price J. L. (1978a) Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol* 178 (2):225-253.
- Krettek J. E., Price J. L. (1978b) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178 (2):255-280.
- Kuroda M., Price J. L. (1991) Synaptic organization of projections from basal forebrain structures to the mediodorsal thalamic nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 303 (4):513-533.

- Lauer E. W. (1945) The nuclear pattern and fiber connections of certain basal telencephalic centers in the macaque. *J Comp Neurol* 183:785-816.
- LeDoux J. E. (1992) Emotion and the amygdala. In: Aggleton J. P. (ed) *The Amygdala: Neurobiological Aspects Of Emotion, Memory, And Mental Dysfunction*. Wiley-Liss, New York [u.a.], pp. 339-351.
- LeDoux J. E. (1993) Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res* 58 (1-2):69-79.
- LeDoux J. E. (1994) Das Gedächtnis für Angst. *Spektrum Wiss* (August):76-83.
- LeDoux J. E. (1995) Emotion: Clues from the brain. *Annu Rev Psychol*:209-235.
- LeDoux J. E., Ruggiero D. A., Reis D. J. (1985a) Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. *J Comp Neurol* 242 (2):182-213.
- LeDoux J. E., Sakaguchi A., Iwata J., Reis D. J. (1985b) Auditory emotional memories: establishment by projections from the medial geniculate nucleus to the posterior neostriatum and/or dorsal amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 444:463-464.
- LeDoux J. E., Sakaguchi A., Iwata J., Reis D. J. (1986) Interruption of projections from the medial geniculate body to an archi- neostriatal field disrupts the classical conditioning of emotional responses to acoustic stimuli. *Neuroscience* 17 (3):615-627.
- LeDoux J. E., Cicchetti P., Xagoraris A., Romanski L. M. (1990a) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10 (4):1062-1069.
- LeDoux J. E., Farb C. R., Ruggiero D. A. (1990b) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci* 10 (4):1043-1054.
- Linke R., DeLima A. D., Schwegler H., Pape H.-C. (1999) Direct synaptic connections of axons from superior colliculus with identified thalamo-amygdaloid projection neurons in the rat: possible substrates of a subcortical visual pathway to the amygdala. *J Comp Neurol* 403 (2):158-170.
- Linke R., Braune G., Schwegler H. (2000) Differential projection of the posterior paralaminar nuclei to the amygdaloid complex in the rat. eingereicht.
- Maren S., Fanselow M. S. (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked?. *Neuron* 16 (2):237-240.
- Masuda R., Fukuda M., Ono T., Endo S. (1997) Neuronal responses at the sight of objects in monkey basal forebrain subregions during operant visual tasks. *Neurobiol Learn Mem* 67 (3):181-196.
- McDonald A. J. (1992) Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In: Aggleton J. P. (ed) *The Amygdala : Neurobiological Aspects Of Emotion, Memory, And Mental Dysfunction*, chapt. 2. Wiley-Liss, New York [u.a.], pp. 67-96.
- McDonald A. J. (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55 (3):257-332.
- McDonald A. J., Augustine J. R. (1993) Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience* 52 (2):281-294.
- McLean P. D. (1949) Psychosomatic disease and the "visceral brain": recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med* 11:338-353.
- McLean P. D. (1952) Some psychiatric implications of physiological studies of frontotemporal portion of the limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 4:407-418.
- Melander T., Staines W. A., Hokfelt T., Rokaeus A., Eckenstein F., Salvaterra P. M., Wainer B. H. (1985) Galanin-like immunoreactivity in cholinergic neurons of the septum-basal forebrain complex projecting to the hippocampus of the rat. *Brain Res* 360 (1-2):130-138.
- Mesulam M. M., Mufson E. J., Levey A. I., Wainer B. H. (1983a) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214 (2):170-197.

- Mesulam M. M., Mufson E. J., Wainer B. H., Levey A. I. (1983b) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10 (4):1185-1201.
- Metherate R., Ashe J. H. (1991) Basal forebrain stimulation modifies auditory cortex responsiveness by an action at muscarinic receptors. *Brain Res* 559 (1):163-167.
- Millhouse O. E. (1986) The intercalated cells of the amygdala. *J Comp Neurol* 247 (2):246-271.
- Miram W. (1987) Informationsverarbeitung: Reizphysiologie, Sinnesphysiologie, Neurophysiologie, Kybernetik. In: Miram W. (Hrsg.) *Materialien für die Sekundarstufe II Biologie*. Schroedel Schulbuchverlag, Hannover.
- Mishkin M. (1978) Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 273 (5660):297-298.
- Mishkin M. (1982) A memory system in the monkey. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 298 (1089):83-95.
- Mishkin M., Aggleton J. P. (1981) Multiple functional contributions of the amygdala in the monkey. In: Ben-Ari Y. (ed) *The Amygdaloid Complex*. Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 409-422.
- Muir J. L., Robbins T. W., Everitt B. J. (1992a) Disruptive effects of muscimol infused into the basal forebrain on conditional discrimination and visual attention: differential interactions with cholinergic mechanisms. *Psychopharmacology Berl* 107 (4):541-550.
- Muir J. L., Dunnett S. B., Robbins T. W., Everitt B. J. (1992b) Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task. *Exp Brain Res* 89 (3):611-622.
- Muir J. L., Page K. J., Sirinathsinghji D. J., Robbins T. W., Everitt B. J. (1993) Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention. *Behav Brain Res* 57 (2):123-131.
- Nagai T., Kimura H., Maeda T., McGeer P. L., Peng F., McGeer E. G. (1982) Cholinergic projections from the basal forebrain of rat to the amygdala. *J Neurosci* 2 (4):513-520.
- Nieuwenhuys R., Voogd J., van Huijzen C. (1991) *Das Zentralnervensystem des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Nitecka L., Ben-Ari Y. (1987) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 266 (1):45-55 .
- Nitecka L., Frotscher M. (1989a) Cholinergic-GABAergic synaptic interconnections in the rat amygdaloid complex: an electron microscopic double immunostaining study . *EXS* 57:42-49.
- Nitecka L., Frotscher M. (1989b) Organization and synaptic interconnections of GABAergic and cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: single- and double-immunolabeling studies. *J Comp Neurol* 279 (3):470-488.
- Nitecka L., Amerski L., Narkiewicz O. (1981) The organization of intraamygdaloid connections; an HRP study. *J Hirnforsch* 22 (1):3-7.
- Ottersen O. P. (1982) Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 205 (1):30-48.
- Ottersen O. P., Ben-Ari Y. (1979) Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. I. Projections from the thalamus. *J Comp Neurol* 187 (2):401-424.
- Papez J. W. (1937) A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry* 79:217-224.
- Paré D., Smith Y. (1993) Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. *Neuroscience* 57 (4):1061-1076.

- Paré D., Smith Y. (1994) GABAergic projection from the intercalated cell masses of the amygdala to the basal forebrain in cats. *J Comp Neurol* 344 (1):33-49.
- Paxinos G., Watson C. (1998) *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego [u.a.].
- Pieribone V. A., Aston Jones G. (1988) The iontophoretic application of Fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei. *Brain Res* 475 (2):259-271.
- Pitkänen A., Amaral D. G. (1991) Demonstration of projections from the lateral nucleus to the basal nucleus of the amygdala: a PHA-L study in the monkey. *Exp Brain Res* 83 (3):465-470.
- Pitkänen A., Amaral D. G. (1994) The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci* 14 (4):2200-2224.
- Pitkänen A., Stefanacci L., Farb C. R., Go G.-G., LeDoux J. E., Amaral D. G. (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neurol* 356:288-310.
- Pitkänen A., Savander V., LeDoux J. E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20 (11):517-523.
- Price J. L. (1973) An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *J Comp Neurol* 150 (1):87-108.
- Price J. L. (1995) Thalamus. In: Paxinos G. (ed) *The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego, pp. 629-648.
- Price J. L., Russchen F. T., Amaral D. G. (1987) The limbic region. II: The amygdaloid complex. In: Björklund A., Hökfelt T., Swanson L. W. (eds) *Handbook Of Chemical Neuroanatomy, vol. 5 Integrated Systems Of The CNS, Part 1*, chapt. 3. Elsevier, Amsterdam, pp. 279-388.
- Renner M. (1984) *Kükenthal's Leitfaden für das zoologische Praktikum*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Richardson K. C., Jarett L., Finke E. H. (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35: 313-325.
- Robbins T. W., Everitt B. J., Marston H. M., Wilkinson J., Jones G. H., Page K. J. (1989) Comparative effects of ibotenic acid- and quisqualic acid-induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat: further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis in cognitive processes. *Behav Brain Res* 35 (3):221-240.
- Roberts A. C., Robbins T. W., Everitt B. J., Muir J. L. (1992) A specific form of cognitive rigidity following excitotoxic lesions of the basal forebrain in marmosets. *Neuroscience* 47 (2):251-264.
- Russchen F. T. (1982) Amygdalopetal projections in the cat. II. Subcortical afferent connections. A study with retrograde tracing techniques. *J Comp Neurol* 207 (2):157-176.
- Russchen F. T., Price J. L. (1984) Amygdalostriatal projections in the rat. Topographical organization and fiber morphology shown using the lectin PHA-L as an anterograde tracer. *Neurosci Lett* 47 (1):15-22.
- Russchen F. T., Amaral D. G., Price J. L. (1985a) The afferent connections of the substantia innominata in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 242 (1):1-27.
- Russchen F. T., Bakst I., Amaral D. G., Price J. L. (1985b) The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Res* 329 (1-2):241-257.
- Savander V., Go C. G., LeDoux J. E., Pitkänen A. (1996a) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the accessory basal nucleus. *J Comp Neurol* 374 (2):291-313.
- Savander V., LeDoux J. E., Pitkänen A. (1996b) Topographic projections from the periamygdaloid cortex to select subregions of the lateral nucleus of the amygdala in the rat. *Neurosci Lett* 211 (3):167-170.

- Savander V., Miettinen R., LeDoux J. E., Pitkänen A. (1997) Lateral nucleus of the rat amygdala is reciprocally connected with basal and accessory basal nuclei: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 77 (3):767-781.
- Scalia F., Winans S. S. (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161 (1):31-55.
- Schmued L. C. (1994) Diagonal ventral forebrain continuum has overlapping telencephalic inputs and brainstem outputs which may represent loci for limbic/autonomic integration. *Brain Res* 667 (2):175-191.
- Schmued L. C., Fallon J. H. (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377 (1):147-154.
- Schofield B. R. (1990) Uptake of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) by axons of passage. *J Neurosci Meth* 35: 47-56.
- Schwaber J. S., Kapp B. S., Higgins G. (1980) The origin and extent of direct amygdala projections to the region of the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 20 (1):15-20.
- Smith Y. (1992) Anterograde tracing with PHA-L and biocytin at the electron microscopic level. In: Bolam J. P. (ed) *Experimental Neuroanatomy: A Practical Approach*, chapt. 3. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp. 61-79.
- Smith Y., Paré D. (1994) Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 342 (2):232-248.
- Spiegler B. J., Mishkin M. (1981) Evidence for the sequential participation of inferior temporal cortex and amygdala in the acquisition of stimulus-reward associations. *Behav Brain Res* 3 (3):303-317.
- Stefanacci L., Farb C. R., Pitkänen A., Go G.-G., LeDoux J. E., Amaral D. G. (1992) Projections from the lateral nucleus to the basal nucleus of the amygdala: a light and electron microscopic PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 323 (4):586-601.
- Stephan H., Andy O. J. (1977) Quantitative comparison of the amygdala in insectivores and primates. *Acta Anat Basel* 98 (2):130-153.
- Sternberger L. A., Hardy Jr. P. H., Cuculis J. J., Meyer H. G. (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18 (5):315-333.
- Swanson L. W., Petrovich G. D. (1998) What is the amygdala? . *Trends Neurosci* 21 (8):323-331.
- Treviranus G. R. (1820) *Vermischte Schriften*. Barth, Bremen.
- Turner B. H., Herkenham M. (1991) Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *J Comp Neurol* 313 (2):295-325.
- Turner B. H., Zimmer J. (1984) The architecture and some of the interconnections of the rat's amygdala and lateral periallocortex. *J Comp Neurol* 227 (4):540-557.
- Ulfing N., Braak E., Ohm T. G., Pool C. W. (1990) Vasopressinergic neurons in the magnocellular nuclei of the human basal forebrain. *Brain Res* 530 (1):176-180.
- Vincent S. R., McIntosh C. H., Buchan A. M., Brown J. C. (1985) Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J Comp Neurol* 238 (2):169-186.
- Vnek N., Kromer L. F., Wiley R. G., Rothblat L. A. (1996) The basal forebrain cholinergic system and object memory in the rat. *Brain Res* 710 (1-2):265-270.
- Voytko M. L. (1996) Cognitive functions of the basal forebrain cholinergic system in monkeys: memory or attention?. *Behav Brain Res* 75 (1-2):13-25.
- Weiskrantz L. (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 49:381-391.

- Wessendorf M. W. (1991) Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res* 553 (1):135-148.
- Winer J. A., Morest D. K. (1983) The medial division of the medial geniculate body of the cat: implications for thalamic organization. *J Neurosci* 3 (12):2629-2651.
- Woolf N. J., Butcher L. L. (1982) Cholinergic projections to the basolateral amygdala: a combined Evans Blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull* 8 (6):751-763.
- Záborszky L., Leranth C., Heimer L. (1984) Ultrastructural evidence of amygdalofugal axons terminating on cholinergic cells of the rostral forebrain. *Neurosci Lett* 52 (3):219-225.
- Záborszky L., Carlsen J., Brashear H. R., Heimer L. (1986a) Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *J Comp Neurol* 243 (4):488-509.
- Záborszky L., Heimer L., Eckenstein F., Leranth C. (1986b) GABAergic input to cholinergic forebrain neurons: an ultrastructural study using retrograde tracing of HRP and double immunolabeling. *J Comp Neurol* 250 (3):282-295.
- Záborszky L., Cullinan W. E., Braun A. (1991) Afferents to basal forebrain cholinergic projection neurons: an update. In: Napier T. C., Kalivas P. W., Hanin I. (eds) *Advances In Experimental Medicine And Biology*, vol. 295 *The Basal Forebrain: Anatomy to Function*. Plenum Press, pp. 42-100.
- Zimmermann M. (1995) Das somatoviszzerale sensorische System. In: Schmidt R. F., Thews G. (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*, Kapitel 12. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 216-235.

A ANHANG

A.1 Listen der verwendeten Substanzen

Tabelle A-1 Chemikalien

Name	Summenformel	Masse [g/mol]	Bezugsquelle	Bemerkungen
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) 3,3'-Diamino-biphenyl	$C_{12}H_{14}N_4$	214,3	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	
Ammoniumnickel(II)-sulfat-hexahydrat	$(NH_4)_2Ni(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	395,00	Aldrich-Chemie (Steinheim, D)	
Azur II			Aldrich-Chemie (Steinheim, D)	1:1 Gemisch aus Azur B und Methylenblau
Chrom(III)-kaliumsulfat-dodekahydrat	$CrK(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$	499,4	Aldrich Chemical (Gillingham, Dorset, GB)	
Cobalt(II)-chlorid-hexahydrat	$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	237,93	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	
DePeX			SERVA Electrophoresis (Heidelberg, D)	
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	174,18	Merck (Darmstadt, D)	
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	177,99	Merck (Darmstadt, D)	
Dinatriumtetraborat	$Na_2B_4O_7$	201,22	Merck (Darmstadt, D)	
Dioxan	$C_4H_8O_2$	88,12	Merck (Darmstadt, D)	
Essigsäure (rein: Eisessig) Ethansäure	CH_3COOH	60,05	J. T. Baker B. V. (Deventer, NL)	99-100 % z.A.
Ethanol	C_2H_5OH	46,07	Zentralapotheke (Magdeburg, D)	
Gelatine			Merck (Darmstadt, D)	gepulvert
Glutaraldehyd 1,5-Pentandial	$C_5H_8O_2$	100,1	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	25% ige wäßrige Lösung

Fortsetzung der Tabelle nächste Seite

Tabelle A-1 Fortsetzung

Name	Summenformel	Masse [g/mol]	Bezugsquelle	Bemerkungen
Isopropanol 2-Propanol	C_3H_7OH	60,10	Zentralapotheke (Magdeburg, D)	
Kresylviolettacetat 9-Amino-5-imino-5H-benzo[a]phenoxazinacetat	$C_{16}H_{11}NO_3 \bullet C_2H_4O$	321,3	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	
Methanol	CH_3OH	32,04	Zentralapotheke (Magdeburg, D)	
Methylenblau		319,86	Aldrich-Chemie (Steinheim, D)	
Natriumacetat	CH_3OONa	82,03	Merck (Darmstadt, D)	
Natriumborhydrid	$NaBH_4$	37,83	Merck (Darmstadt, D)	
Natriumchlorid	$NaCl$	58,44	Merck (Darmstadt, D)	z.A.
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	$NaH_2PO_4 \bullet H_2O$	137,99	Merck (Darmstadt, D)	
Natriumhydroxid	$NaOH$	40,00	Merck (Darmstadt, D)	
Natriumhypochlorid	$NaOCl$	74,44	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig, D)	12%ige Lösung
Natriumnitrit	$NaNO_2$	69,00	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	
Osmiumtetroxid	OsO_4	254,2	Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA, USA)	4%ige wäßrige Lösung
Paraformaldehyd	$HO(CH_2O)_nH$ n = 10-30	~ 600	Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA, USA)	

Fortsetzung der Tabelle nächste Seite

Tabelle A-1 Fortsetzung

Name	Summenformel	Masse [g/mol]	Bezugsquelle	Bemerkungen
Pikrinsäure 2,4,6-Trinitrophenol	$C_6H_2(NO_2)_3OH$	229,11	Fluka (Buchs, CH)	gesättigte Lösung (~13 g in 1 l Wasser)
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,30	Merck (Darmstadt, D)	
Thimerosal Quecksilber-[(o-Carboxyphenyl)thio]-ethyl-natriumsalz	$C_9H_9HgO_2SNa$	404,8	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	
Triton-X			Boehringer Mannheim (Mannheim, D)	
Wasserstoffperoxid	H_2O_2		Merck (Darmstadt, D)	30%ige Lösung
Xylol Dimethylbenzene	$C_6H_4(CH_3)_2$	106,17	Carl Roth (Karlsruhe, D)	3 Isomere

Tabelle A-2 Antikörper und Immunreagenzien

Name	Tier	Anbieter	Spezifizierung
Albumin	Rind	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	Fraktion V
Anti-Cholinacetyl-Transferase	Ratte / Maus	Boehringer Mannheim (Mannheim, D)	monoclonal
Anti-Fluoro-Gold	Kaninchen	Chemicon International (Temecula, CA, USA)	polyclonal
Anti-GABA	Kaninchen	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	polyclonal
Anti-Kaninchen-Immunglobulin G	Ziege	DAKO (Glostrup, DK)	polyclonal
Anti-Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin	Ziege	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)	biotinyliert
Anti-Ratte-Immunglobulin G	Ziege	DAKO (Glostrup, DK)	biotinyliert
Kaninchen PAP	Kaninchen	DAKO (Glostrup, DK)	
Normalserum	Ziege	SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)	

A.2 Zusammensetzung und Dosierung der Anästhetika

A.2.1 Ketamin-Cocktail

Konzentration		[mg]	[ml]	pro [ml] Ansatz
	(S)-Ketaminhydrochlorid (Ketanest©)	50	2,00	2,175 (Ansatz einer Ampulle Ketanest)
	Xylazinhydrochlorid (Rompum©)	2,5	0,125	
	Acepromazinmaleat (Ventranquil©)	0,5	0,05	
	NaCl	7,5		
Dosis		[ml]		pro [g] Körpergewicht
	<i>in vivo</i>	3		1000
bei Zugabe von Natrium-Pentobarbital (Menge dort) Dosis halbieren				

Tracer-Injektion in vivo

Gewicht [g]	Menge Narkotikum	
	[ml]	[mg]
10	0,030	entfällt
50	0,150	entfällt
100	0,300	entfällt
150	0,450	entfällt
200	0,600	entfällt
250	0,750	entfällt
300	0,900	entfällt
350	1,050	entfällt

A.2.2 Natrium-Pentobarbital

Konzentration		[g]	pro [ml]	
	Natrium-Pentobarbital in 0,9 % NaCl-Lsg.	6	100	
Dosis		[mg]	[ml]	pro [g] Körpergewicht
	<i>in vivo</i>	30	0,5	1000
	letal	120	2	1000

Tracer-Injektion in vivo:

Gewicht [g]	Menge Narkotikum	
	[ml]	[mg]
10	0,005	0,3
50	0,025	1,5
100	0,050	3,0
150	0,075	4,5
200	0,100	6,0
250	0,125	7,5
300	0,150	9,0
350	0,175	10,5

Perfusion:

Gewicht [g]	Menge Narkotikum	
	[ml]	[mg]
10	0,020	1,2
50	0,100	6,0
100	0,200	12,0
150	0,300	18,0
200	0,400	24,0
250	0,500	30,0
300	0,600	36,0
350	0,700	42,0

A.3 Pufferlösungen

A.3.1 Natrium-Phosphatpuffer (PB)

Material:

- Aqua dest.
- Dinatriumhydrogenphosphat
- Natriumdihydrogenphosphat

Methode:

für 1 l einer 0,2 M Stammlösung Phosphatpuffer mit pH = 7,2-7,4

1. 5,24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ^a

8,83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

unter Rühren in Aqua dest. lösen (Flüssigkeitsmenge etwas geringer als endgültige Menge).

2. pH-Wert bestimmen und gegebenenfalls mit NaOH einstellen.
3. auf endgültige Menge mit Aqua dest. auffüllen.

Bei 4 °C ist eine Lagerung über einige Wochen möglich, falls erforderlich, Puffer vor Gebrauch erwärmen, um ausgefallene Kristalle in Lösung zu bringen.

^a Da die Natriumphosphate in verschiedenen Hydratisierungsstufen vorliegen können, gibt es alternative Lösungsansätze mit jeweils einem Natriumdihydrogen- und einem Dinatriumhydrogenphosphat.

	Hydrat	[g / l]
Natriumdihydrogenphosphat	- monohydrat (• H_2O)	5,24
	- dihydrat (• $2 \text{H}_2\text{O}$)	5,93
Dinatriumhydrogenphosphat	- monohydrat (• H_2O)	35,60
	- dihydrat (• $2 \text{H}_2\text{O}$)	28,83
	- heptahydrat (• $7 \text{H}_2\text{O}$)	43,46
	- dodekahydrat (• $12 \text{H}_2\text{O}$)	58,03

Für eine 0,1 M Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:1 mit Aqua dest. verdünnt.

A.3.2 Immunpuffer (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, PBS)

Material:

- Aqua dest.
- Dikaliumhydrogenphosphat
- Natriumchlorid
- Natriumdihydrogenphosphat
- Thimerosal

Methode:

für 2 l Immunpuffer mit pH = 7,4

1. 14,03 g NaCl

2.2,76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,88 g K_2HPO_4

0,04 g Thimerosal (gegen Verpilzung)

unter Rühren in Aqua dest. lösen (Flüssigkeitsmenge etwas geringer als endgültige Menge).

2. pH-Wert bestimmen und gegebenenfalls mit NaOH einstellen.

3. auf endgültige Menge mit Aqua dest. auffüllen.

Bei 4 °C ist eine Lagerung über einige Wochen möglich.

A.4 Fixative

Sicherheitshinweise:

Paraformaldehyd und Glutaraldehyd sind extrem toxisch, Berührung mit der Haut, Einatmen und Verschlucken sind zu vermeiden. Folgende Punkte sind deshalb unbedingt zu befolgen:

- bei Ansetzen der Lösung Handschuhe und entsprechende Schutzkleidung tragen, um das Einatmen der Substanzen zu vermeiden, gegebenenfalls geeigneten Mundschutz benutzen
- unter dem Abzug arbeiten
- Reste entsprechend entsorgen, verschüttete Lösung mit viel Wasser entfernen

A.4.1 Paraformaldehyd-Fixativ in Phosphatpuffer

Material:

- 0,2 M Natriumphosphatpuffer (PB)
- 5 N Natriumhydroxid (NaOH)
- Aqua dest.
- Paraformaldehyd (PFA)

Methode:

1. PFA abwiegen, in Aqua dest. lösen (etwas weniger als die Hälfte des gewünschten Endvolumen des Fixativs) und unter ständigem Rühren auf 65-70 °C erwärmen.
2. NaOH tropfenweise zugeben bis die Lösung klar ist, dabei beachten, daß die Aufklärung mit einer kleinen Verzögerung eintritt (die Zugabe von NaOH ist optional).
3. Filtrieren der Paraformaldehydlösung.
4. Puffer hinzugeben (Hälfte des Endvolumens).
5. auf gewünschtes Endvolumen mit Aqua dest. auffüllen.
6. pH-Wert bestimmen.

Beispiel:

für 1000 ml 4%ige PFA-Lösung

- 40 g PFA in
- 400 ml Aqua dest. lösen
- 500 ml 0,2 M PB hinzufügen
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Die PFA-Lösung möglichst frisch ansetzen, für Perfusion max. 3 Tage lagern bei 4 °C; zur Fixierung von Schnitten mind. 4 Wochen lagerfähig.

A.4.2 Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-Fixativ in Phosphatpuffer

Material:

- 0,2 M Natriumphosphatpuffer (PB)
- 5N Natriumhydroxid (NaOH)
- Aqua dest.
- Glutaraldehyd (GA, 25%ige wäßrige Lösung als fertige Lösung erhältlich)
- Paraformaldehyd (PFA)

Methode:

1. Herstellung der PFA-Lösung gemäß den Arbeitsschritten 1. bis 4. für PFA-Fixativ unter Berücksichtigung des Volumens des benötigten Glutaraldehyds.
2. Zugabe der entsprechenden Menge Glutaraldehyd (vergl. Tab. 1).
3. auf gewünschtes Endvolumen mit Aqua dest. auffüllen.
4. pH-Wert bestimmen.
5. gegebenenfalls Lösung auf Gebrauchstemperatur herunterkühlen.

Beispiel:

für 1000 ml Fixativ 4 % PFA, 0,1 % GA

- 40 g PFA in
- 400 ml Aqua dest. lösen
- 500 ml 0,2M PB hinzufügen
- 4 ml GA
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Tabelle A-3 Erforderliche Volumina einer 25%igen Glutaraldehyd-Lösung zur Herstellung von Fixativen

Gewünschte GA Konzentration	Gewünschte Menge an Fixativ [ml]						
	100	200	300	400	500	750	1000
0,01 %	0,04	0,08	0,12	0,16	0,2	0,3	0,4
0,05 %	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5	2,0
0,1 %	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	3,0	4,0
0,5 %	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	15,0	20,0
1,0 %	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	30,0	40,0
2,5 %	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	75,0	100,0
5,0 %	20,0	40,0	60,0	80,0	100,0	150,0	200,0

Glutaraldehydhaltiges Fixativ nur zum sofortigen Gebrauch ansetzen.

A.4.3 Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-Fixativ mit Pikrinsäure in Phosphatpuffer

Material:

- 0,2 M Natriumphosphatpuffer (PB)
- 5 N Natriumhydroxid (NaOH)
- Aqua dest.
- gesättigte Pikrinsäure
- Glutaraldehyd (GA, 25%ige wäßrige Lösung als fertige Lösung erhältlich)
- Paraformaldehyd (PFA)

Methode:

1. Herstellung der PFA-Lösung gemäß den Arbeitsschritten 1. und 2. für PFA-Fixativ. Dabei das Volumen in dem das PFA gelöst wird entsprechend kleiner wählen.
2. Zugabe der gesättigten Pikrinsäure.
3. Filtrieren der Lösung.
4. Zugabe des 0,2 M PB.
5. Zugabe der entsprechenden Menge Glutaraldehyd (vergl. Tab. 1).
6. auf gewünschtes Endvolumen mit Aqua dest. auffüllen.
7. pH-Wert bestimmen.
8. gegebenenfalls Lösung auf Gebrauchstemperatur herunterkühlen.

Beispiel:

für 1000 ml Fixativ 4 % PFA, 15 % ges. Pikrinsäure, 0,1 % GA

- 40 g PFA in
- 300 ml Aqua dest. lösen
- 150 ml gesättigte Pikrinsäure hinzufügen
- 500 ml 0,2 M PB hinzufügen
- 4 ml GA hinzufügen
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

A.5 Kresylviolett-Lösung

Material:

- Aqua dest.
- Essigsäure (99-100 %)
- Kresylviolettacetat
- Natriumacetat

Methode:

für 1 l Kresylviolett-Lösung

1. 1 g Kresylviolettacetat in 50 ml Aqua dest. lösen.
2. Ansatz in Wärmeschrank bei 37 °C stellen.
3. 400 ml Aqua dest. zugeben.
4. 0,25 g Natriumacetat in etwas Aqua dest. lösen und zur übrigen Lösung geben.
5. 3,1 ml Essigsäure zugeben.
6. Lösung mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen.
7. Lösung unter ständigem Rühren auf 60 °C erwärmen, bis sich der Farbstoff gut gelöst hat.
8. Kresylviolett-Lösung filtrieren.

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei Raumtemperatur haltbar.

A.6 Beschichtung der Objektträger

Material:

für Chrom-Alaun-Gelatine:

- Aqua dest.
- Chrom(III)-kaliumsulfat
- Gelatine

Methode:

1. Substanzen abwiegen und in Aqua dest. bei 60 °C unter ständigem Rühren lösen. Die fertige Lösung ist klar und schwach grünlich gefärbt.
2. Objektträger zwischen Zeigefinger und Daumen fassen und in die abgekühlte Lösung tauchen.
3. zum Trocknen Objektträger aufrecht in einen entsprechenden Ständer stellen und entweder über Nacht im Brutschrank bei 37 °C oder ca. 1 h im Brutschrank bei 60 °C trocknen lassen.

Beispiel:

für Chrom-Alaun-Gelatine: 60 ml

- 0,3 g Gelatine
- 0,03 g Chrom(III)-kaliumsulfat
- in 60 ml Aqua dest. lösen.

A.7 Herstellung von Trägerfolien aus Formvar und Beschichtung der Grids

Material:

- Aqua dest.
- Dioxan
- Formvar

Methode:

1. Herstellung der Formvar-Lösung:
0,35 % Formvar in Dioxan lösen.
2. ein gründlichst gereinigter Objektträger wird zu etwa zwei Drittel für 2-3 s in die Formvar-Lösung getaucht.
3. der so beschichtete Objektträger wird auf Filterpapier abtropfen gelassen und für 1-10 min in staubfreier Atmosphäre bei Raumtemperatur getrocknet.
4. um die fertige Folie abzulösen, wird der Objektträger in ein bis zum Rand mit Aqua dest. befüllten Gefäß getaucht. Die Ablösung erfolgt durch die Penetration des Wassers zwischen Film und Glasoberfläche. Um diesen Prozeß zu unterstützen wird der Film zunächst entlang der Kanten mit einer Rasierklinge durchtrennt.
5. die Folie wird auf der Wasseroberfläche schwimmen gelassen und mit den Grids (matte Seite auf die Folie) belegt.
6. mit einem Streifen Parafilm® werden die Trägernetzchen zusammen mit der ganzen Folie von der Oberfläche des Wassers abgenommen.
7. mit einer Pinzette können die nun beschichteten Grids einzeln aus der Folie herausgelöst werden.

A.8 Nissl-Färbung

Material:

- Aqua dest.
- DePeX
- Ethanol 70 %
- Ethanol 96 %
- Ethanol 100 %
- Isopropanol
- Kresylviolett-Lösung
- NaCl-Lsg. 0,9 %
- Xylol

Methode:

Der Färbeporgang sollte unter dem Abzug durchgeführt werden, da das Inhalieren der leicht flüchtigen Alkohole gesundheitsgefährdend ist.

1. Die Objektträger mit den darauf getrockneten Schnittpräparaten wurden in einem Objektglasständer plaziert und diese anschließend nacheinander in die vorbereiteten Färbegefäße getaucht.
2. Zunächst erfolgte die Entfettung der Präparate. Beim Wechseln zwischen den einzelnen Medien, sollten die Objektglasständer durch Aufsetzen auf absorbierendes Papier von anhaftender Flüssigkeit befreit werden, um ein Übertragen in das nächste Medium zu verhindern:

100 % Ethanol	3 min	2x
Isopropanol	3 min	
Xylol	3 min	3x
Isopropanol	3 min	
100 % Ethanol	3 min	2 x

3. Dann wurden die Präparate hydriert, da der Farbstoff Kresylviolett nicht in Alkohol lösbar ist.

70 % Ethanol	3 min
Aqua dest.	3 min

4. Die Färbung in Kresylviolett-Lösung dauerte 3-4 min je nach Farbintensität und Alter der Lösung.
5. Als nächster Schritt erfolgte das Auswaschen von überflüssigem Farbstoff und die Differenzierung. Die Alkohollösungen bewirken dabei, daß der Farbstoff aus dem Myelin und anderen Zellkomponenten wieder ausgewaschen wird, während die Perikaryen ihre Farbe behalten. Des weiteren werden die Präparate wieder dehydriert, da die meisten Einbettmedien nicht mischbar mit Wasser sind.

Aqua dest.	1 min	
70 % Ethanol	1 min	
96 % Ethanol	1 min	2 x
Isopropanol	1 min	

6. Nun wurden die Präparate geklärt. Hier zu wurden die Objektträger für 2 min in Xylol getaucht, wo sie bis zur Einbettung verblieben.
7. Abschließend erfolgte die Einbettung der Präparate in DePeX. Getrocknet wurden die Objektträger entweder über Nacht bei RT unter dem Abzug oder für mindestens 10 min im Brutschrank bei 37 °C.

A.9 Färbung von Semi-Dünnschnitten nach RICHARDSON

Material:

- Aqua dest.
- Azur II
- Methylenblau
- Natriumtetraborat

Methode:

1. Herstellung der Färbelösung:
1 % Azur II in Aqua dest. und 1 % Methylenblau in 1 % Natriumtetraborat-Lösung 1:1 mischen.
2. Semidünnschnitte mit Aqua dest. auf einen Objektträger aufziehen und bei 60-70 °C auf einer Heizplatte trocknen lassen.
3. Objektträger mit Aqua dest. abspülen und Gebiete um die Präparate trocknen.
4. einige Tropfen der Färbelösung auftropfen und für etwa 5 min bei 80 °C auf der Heizplatte oder 15 min bei 60 °C im Wärmeschrank trocknen lassen.
5. Objektträger erneut mit Aqua dest. abspülen und trocknen lassen
6. Objektträger eindecken.

A.10 Reduzierung unspezifischen Hintergrundes

A.10.1 Natriumborhydridbehandlung

Material:

- Natriumborhydrid
- Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)

Methode:

Wegen der Gasentwicklung sollte diese Reaktion unter dem Abzug durchgeführt werden. Die Schnitte werden durch die Gasbläschen an die Oberfläche des Reaktionsmediums getrieben. Um ein mögliches Austrocknen der Schnitte zu verhindern, ist es deshalb empfehlenswert die Reaktion zu beobachten und die Schnitte bei Bedarf wieder in die Lösung zu bringen.

Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

1. Die Schnitte wurden in 1 % Natriumborhydrid in PBS für 30 min gewaschen.
2. Anschließend wurde sechsmal für 10 min mit PBS gewaschen bis keine Bläschen mehr aufstiegen.

A.10.2 Blockierung endogener Peroxidasen

Material:

- Methanol
- Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)
- Wasserstoffperoxid

Methode:

Diese Reaktion sollte auf dem Taumler durchgeführt werden.

Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

1. Die Schnitte wurden in 0,3 % H_2O_2 in PBS oder 0,3 % H_2O_2 und 5 % Methanol in PBS für 10 min inkubiert.
2. Anschließend wurde dreimal für 10 min mit PBS gewaschen bis keine Bläschen mehr aufstiegen.

A.10.3 Inkubation mit Proteinen

Material:

- Normalserum
- Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)
- Rinderserumalbumin (BSA)

Methode:

In der Regel wurden der Primär- sowie der Sekundärantikörper-Lösung 2 % oder 10 % Normalserum und 1 % oder 2 % BSA zugesetzt.

Die Vorinkubation sollte auf dem Taumler durchgeführt werden.

Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

1. Die Schnitte wurden in 10 % Normalserum für 60 min inkubiert.
2. Anschließend wurde dreimal für 10 min mit PBS gewaschen.

A.11 Anfärbung *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin markierter Zellen

Material:

- Anti-*Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin, biotinyliert
- Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)
- VECTASTAIN ELITE ABC Standard-Kit
- Ziegen-Normalserum (GNS)

Methode:

Die Inkubationen der Schritte 1. bis 4. und 6. wurden im „free-floating Verfahren“ durchgeführt.

Nach der Durchführung von Prozeduren zur Verminderung von Hintergrund- und unspezifischer Färbung wurden die Schnitte

1. mit der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4 °C inkubiert:

Primärantikörper-Lösung: biotinyliertes Anti-PHA-L 1:800, 1 % GNS in PBS.

2. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
3. Die Lösung für die ABC-Reaktion ist mindestens 30 min vor dem Gebrauch anzusetzen und bei Raumtemperatur stehen zu lassen. Die Schnitte wurden mit der gebrauchsfertigen ABC-Lösung für 90 bis 120 min behandelt:

ABC-Lösung: jeweils 8,8 µl Lösung A und B pro 1000 µl PBS aus dem Kit hinzuzufügen

4. Erneut wurden die Schnitte 3x für jeweils 10min in PBS gewaschen. Empfehlenswert ist es, die DAB-Reaktion in gesonderten Reaktionsgefäßen ablaufen zu lassen. Dabei kann der letzte Waschgang dazu verwendet werden die Schnittpräparate in diese zu überführen.
5. Abschließend wurde eine Schwermetall intensivierte DAB-Färbung gemäß der Arbeitsvorschrift A.15 durchgeführt.

A.12 Anfärbung Fluoro-Gold markierter Zellen

Material:

- Anti-Fluoro-Gold
- Anti-Kaninchen Immunglobulin
- Kaninchen PAP
- Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)
- Ziegen-Normalserum

Methode:

Auch hier erfolgte die Inkubationen der Schritte 1. bis 6. und 8. im „free-floating Verfahren“. Im vorliegenden Fall konnte auf eine Vorbehandlung der Schnitte wie Auswaschen von negativ beeinflussenden Substanzen oder Blockade exogener Peroxidasen verzichtet werden, da diese bereits in der vorausgegangenen Färbung der PHA-L markierten Zellen durchgeführt worden war.

1. Die Schnitte wurden mit der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4 °C inkubiert
Primärantikörper-Lösung: Anti-Fluoro-Gold 1:10.000 und 1 % GNS in PBS.
2. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
3. Dann wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 90 min inkubiert
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Kaninchen IG 1:100 in PBS.
4. Erneut wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
5. Es folgte eine sogenannte PAP-Reaktion mit einer Inkubationszeit von 60 min
PAP-Lösung: Kaninchen PAP 1:100 in PBS.
6. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen. Dabei wurde der letzte Waschgang dazu verwendet, die Schnittpräparate in die Reaktionsgefäße für die DAB-Färbung zu überführen.
7. Abschließend wurde eine DAB-Färbung gemäß der gesondert aufgeführten Arbeitsanweisung (A.15) durchgeführt.

A.13 Cholinacetyl-Transferase-Immunhistochemie

Material:

- Anti-Cholinacetyl-Transferase
- Anti-Ratte-Immunglobulin, biotinyliert
- Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)
- Rinderserumalbumin (BSA)
- Saccharose
- Triton X-100
- VECTASTAIN ELITE ABC-Standard-Kit
- Ziegen-Normalserum (GNS)

Methode:

Die Inkubationsschritte 1. bis 8. und 10. wurden im „free-floating Verfahren“ durchgeführt. Alle Schritte fanden, wenn nicht anderes vermerkt, bei Raumtemperatur statt.

1. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper über Nacht bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4 °C inkubiert:
Primärantikörper-Lösung: Anti-ChAT 1:5 in 20 % GNS, 2 % BSA, 5 % Saccharose in PBS (für Lichtmikroskopie, Additiv 0,3 % Triton X-100).
2. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
3. Dann wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 90 min inkubiert:
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Ratte-Immunglobulin 1:200 in 20 % GNS, 2 % BSA, 5 % Saccharose in PBS (für Lichtmikroskopie, Additiv 0,3 % Triton X-100).
4. Erneut wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
5. Die Lösung für die ABC-Reaktion ist mindestens 30 min vor dem Gebrauch anzusetzen und bei Raumtemperatur stehen zu lassen. Die Schnitte wurden mit der gebrauchsfertigen ABC-Lösung für 90 min behandelt:
ABC-Lösung: jeweils 8,8 µl Lösung A und B pro 1000 µl PBS aus dem Kit hinzuzufügen.
6. Wieder wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
7. Dann wurde die ABC-Reaktion (Schritt 5.) mit frischen Lösungen wiederholt.
8. Erneut wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
9. Abschließend wurde eine DAB-Färbung ohne Intensivierung gemäß der Arbeitsanweisung A.15 durchgeführt.

A.14 GABA-Immunhistochemie

Material:

- Anti-GABA
- Anti-Kaninchen-Immunglobulin
- Kaninchen PAP
- Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)
- Rinderserumalbumin (BSA)
- Saccharose
- Ziegen-Normalserum (GNS)

Methode:

Auch hier wurden die Inkubationen der Schritte 1. bis 6. und 8. im „free-floating Verfahren“ durchgeführt.

1. Die Schnitte wurden mit der Primärantikörper-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur oder für 48 h bei 4 °C inkubiert
Primärantikörper-Lösung: Anti-GABA 1:1000, 10 % GNS, 2 % BSA und 5 % Saccharose in PBS.
2. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
3. Dann wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 90 min inkubiert.
Sekundärantikörper-Lösung: Anti-Kaninchen-IG 1:100 in PBS
4. Erneut wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
5. Es folgte eine sogenannte PAP-Reaktion mit einer Inkubationszeit von 90 min.
PAP-Lösung: Kaninchen PAP 1:100 in PBS
6. Wieder wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen.
7. Zuletzt wurde eine DAB-Färbung ohne Intensivierung gemäß Arbeitsanweisung durchgeführt.

A.15 Färbung mit Diaminobenzidin (DAB)

Material:

- 1 % Kobaltchlorid-Lösung
- 1 % Nickelammoniumsulfat-Lösung
- Diaminobenzidin (DAB)
- Wasserstoffperoxid

Methode:

1. Zunächst werden die DAB-Lösungen mit einem Spitzenfilter filtriert.
 - a) nicht intensiviert:
 - DAB-Lösung: 0,05 % DAB in PBS (0,5 mg DAB pro 1000 µl Lösung)
 - b) Schwermetall intensiviert:

Schwermetall-Lösungen tropfenweise unter Rühren zu der DAB-Lösung hinzugeben und den gesamten Lösungsansatz anschließend filtrieren

 - DAB-Lösung: 0,05 % DAB in PBS (0,5 mg DAB pro 1000 µl Lösung)
 - 20 µl Nickelammoniumsulfat-Lösung und 25 µl Kobaltchlorid Lösung pro 1000 µl DAB-Lösung
2. Die gesamte Reaktions-Lösung wird direkt vor dem Färbeprozess mit 0,3 % Wasserstoffperoxid versetzt, so daß sich eine Wasserstoffperoxid-Konzentration von 0,01 µl/ml ergibt (34 µl 0,3 % H₂O₂ pro 1000 µl)
3. Die Reaktionszeit kann zwischen 4 min bis 15 min betragen. Eine lichtmikroskopische Kontrolle ab der dritten Minute ist zu empfehlen.
4. Abschließend werden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS waschen.

A.16 Herstellung lichtmikroskopischer Präparate

Material:

- 0,9 % NaCl-Lösung
- 100 % Ethanol
- Aqua dest.
- beschichtete Objektträger
- Deckgläser
- Einbettmedium (z.B. DePeX)
- Isopropanol
- Xylol

Aufziehen:

Die gefärbten Schnittpräparate wurden zunächst dreimal in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) für etwa 10 min gewaschen. Dann wurden sie nacheinander in eine Lösung Aqua dest. / 0,9 % NaCl-Lösung (1:1) überführt und mit einem feinen Haarpinsel auf beschichteten Objektträger aufgelegt. Abschließend erfolgte die Trocknung der Präparate über Nacht bei Raumtemperatur oder für mindestens 10 min im Brutschrank bei 37 °C.

Dehydrieren und Klären:

Für die Untersuchung von Präparaten im Lichtmikroskop ist es nötig, sie mit einem Medium zu infiltrieren, welches alle Hohlräume im Gewebe ausfüllt, um einen konstanten Brechungsindex zu erzeugen. Diesen Vorgang bezeichnet man mit „Klären“. Da die meisten Medien nicht mit Wasser mischbar sind, muß zunächst das Gewebe entwässert werden. Nach der Dehydrierung mit Ethanol wird das Präparat in eine Verbindungsreagenz (z.B. Xylene) überführt, in der sowohl Ethanol als auch das Einbettmedium löslich sind. Dehydrierung und Infiltrierung erfolgten nach folgendem Schema:

1. 100 % Ethanol 3 min 2x
2. Isopropanol 3 min
3. Xylol 3 min 2x

Einbettung:

Für die Einbettung wurde mit einem Glasstab etwas Einbettmedium (DePeX) auf ein Deckglas gestrichen. Dann wurde dieses mit einer Kante vorsichtig auf den Objektträger gesetzt und langsam abgesenkt. Auf diese Weise kann sich das Medium gleichmäßig unter dem Deckglas verteilen. Entstandene Luftblasen lassen sich zumeist durch leichten Druck auf das Deckglas entfernen.

A.17 Herstellung von Präparaten für die (Transmissions-) Elektronenmikroskopie

A.17.1 Nachfixierung der Schnitte mit Osmiumtetroxid (OsO_4)

Osmiumtetroxid wird heute mehr als Fixiermittel für Elektronenmikroskopie denn als Farbstoff verwendet, aber es ist noch eine der besten Methoden für das Aufdecken von Lipiden. Es bindet an den Doppelbindungen der ungesättigten Lipide und färbt diese intensiv bräunlich oder schwarz an. So wird auch die lipidreiche Myelinhülle der Neurone stark gefärbt. Gleichzeitig erfolgt bei diesem Prozeß die Stabilisierung der Struktur der Zellmembranen. Osmiumtetroxid fixiert teilweise auch Proteine, bestimmte proteinhaltige Strukturen wie Mikrotubuli oder Mikrofilamente werden aber nicht erhalten.

Osmierung in 1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer mit 4 % Saccharose

Fixierungsdauer: 1 h, lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT)

Nach der Fixierung werden die Fixiermittel gründlich mit Puffer oder Wasser ausgewaschen.

Waschen 5 x 10 min in Wasser, gründlich bei RT

Beachte: Osmiumsäure ist äußerst giftig, Arbeiten nur unter entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen (Augenschutz, Pipettierhilfen, Abzug!).

A.17.2 Kontrastierung mit Schwermetallionen

Bei der Kontrastierung durch Schwermetallionen werden die Präparate mit Uranylacetat- oder Bleicitratlösung behandelt. Die Objekte absorbieren die Salze unterschiedlich stark, so daß später im elektronenmikroskopischen Bild unterschiedlich intensiv markierte Strukturen erscheinen. Man spricht von Positivkontrastierung (positive staining), wenn eine Struktur das Kontrastierungsmittel absorbiert hat oder wenn es von ihm eingelagert wird. Dem steht die Negativkontrastierung (negative staining) gegenüber, bei dem sich die Metallionen (Phosphorwolframsäure, Uranylacetat, Uranylformiat u.a.) um die eigentlichen Strukturen herum anlagern. Im Elektronenmikroskop ist demnach nicht die Struktur selbst, sondern die Umgebung durch hohen Kontrast gekennzeichnet. Negativkontrastierung wird in der Regel zur Sichtbarmachung von Makromolekülen und Molekülkomplexen (Ribosomen, Viren u.a.) eingesetzt. Die Behandlung mit Schwermetall-Lösungen ist ohne größeren Aufwand

durchzuführen und kann sowohl zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Ultramikrotomie als auch nach dieser stattfinden.

In dieser Arbeit wurde nach der Osmierung mit Uranylacetat gegengefärbt. Die Uranyl-Gruppe (UO_2^{++}) wird von Phosphat- und Carboxyl-Gruppen gebunden.

Kontrastierung mit 1 % wäßriger Uranylacetat-Lösung

Dauer: 1h bei RT

A.17.3 Dehydrierung und Einbettung in synthetisches Harz

Vor der Untersuchung der Präparate im Elektronenmikroskop erfolgt eine Einbettung in Kunstharz (meist auf Epoxid-Basis). Durch diese Imprägnierung werden die zellulären Strukturen stabilisiert. Ohne diese Verfestigung würden sie im Vakuum des Elektronenmikroskops kollabieren.

Einbettungsmedium:

Bei den unter dem Namen Durcupan ACM® verkauften Produkten handelt es sich um Einbettungsmittel für die Elektronenmikroskopie. Diese Kits bestehen aus einer Epoxyharz-Komponente (A), einem Härter (B), einem Beschleuniger (C) und einem Weichmacher (D). Die dem Polyepoxyharz zugrunde liegende Stammverbindung ist Bisphenol A, das durch Anhängen eines bifunktionellen Epoxids polymerisiert und durch Zugabe eines Amins schließlich aushärtet. Bei dem Weichmacher handelt es sich um Dibutylphthalat.

Tabelle A-4 Rezeptur der verwendeten Einbettmedien

Komponente	Durcupan I	Durcupan II
A (Epoxyharz)	10,8 g	21,6 g
B (Härter)	8,9 g	17,8 g
C (Beschleuniger)	-	1,0 g
D (Weichmacher)	1,6 g	3,2 g
Zusatz		
Molekularer Alkohol	20 ml	-

Dehydrierung (Entwässern):

Die Einbettungsmittel sind in den meisten Fällen nicht wasserlöslich, dagegen gut mischbar mit Alkohol. Die Dehydrierung der fixierten Gewebeproben erfolgt stufenweise nach folgendem Schema:

- | | | | |
|----|--------------------------|-------|----|
| 1. | 50 % Ethanol | 10min | RT |
| 2. | 70 % Ethanol | 10min | RT |
| 3. | 95 % Ethanol | 10min | RT |
| 4. | 100 % Ethanol | 15min | RT |
| 5. | 100 % Ethanol entwässert | 15min | RT |
| 6. | 100 % Ethanol entwässert | 15min | RT |

Infiltration:

Das Ziel dieser Prozedur ist die allmähliche Ersetzung des Ethanols im Präparat durch den Kunstharz:

- | | | | | |
|----|---|------------|-------|-------|
| 1. | 100 % Ethanol entwässert / Durcupan I (1:1) | über Nacht | RT | offen |
| 2. | Durcupan I | 5h | RT | |
| 3. | Durcupan II | 30min | 50 °C | |

Einbettung:

Das für die Flacheinbettung verwendete Durcupan II wurde zunächst mit Hilfe eines Exiccators entlüftet. Anschließend wurden die Schnittpräparate zwischen zwei zurechtgeschnittenen Plastikstreifen (1, 3), die durch einen dritten in der Mitte ausgesparten Plastikstreifen (2) getrennt sind, flach eingebettet. Dabei bilden Streifen (1) und (2) eine flache Wanne, in die das infiltrierte Präparat vorsichtig zu überführen ist. Danach wurde das Präparat mit etwas Durcupan II übergossen. Der übrige Plastikstreifen (3) wurde als Deckel aufgelegt, und ein Gewicht beschwert den Aufbau.

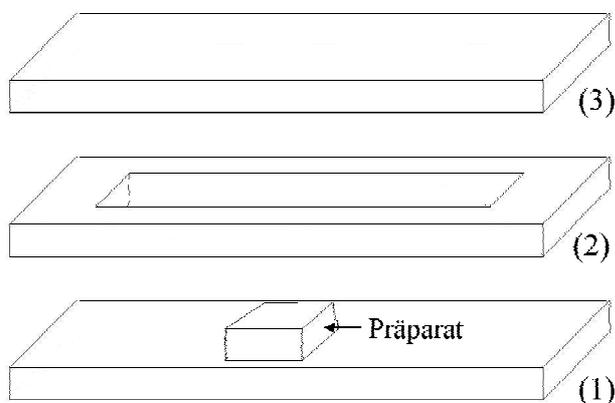


Abbildung A-1 Schematische Darstellung der Flacheinbettung

Bei Bedarf sollten zu diesem Zeitpunkt nummerierte Blocks für die spätere Verwendung hergestellt werden.

Die Polymerisation erfolgte für 48-96 h bei 60 °C.

Als nächster Schritt folgte die lichtmikroskopische Auswertung der Färbung und Auswahl der Proben für das Schneiden.

Die ausgewählten Proben wurden danach auf die vorbereiteten Kunstharzblöcke aufgebracht. Nach dem Auftropfen von Durcupan auf den Block wurde die Probe aufgelegt. Ein kleines Stück dickerer Plastikfolie über der Probe gewährleistet eine flache Einbettung.

Die Präparate polymerisierten dann für 48 h bei 60 °C.

A.18 Gliederung der Amygdala der Ratte

1. Superficiale cortexähnliche Kerngruppe		
I.	Nucleus corticalis anterior	[ACo] / [COa]
II.	Stria olfactoria lateralis	[LOT] / [NLOT]
III.	Bettkern der Stria olfactoria accessoria	[BAOT]
IV.	Nucleus corticalis posterolateralis (= Cortex periamygdaloideus Cortex periamygdaloideus mediale Subdivision sulcale Subdivision (= amygdalopiriforme Übergangszone	[PLCo] [PAC]) [PAC] [PAC _m] [PAC _s] [APir])
V.	Nucleus corticalis posteromedialis (= Nucleus corticalis posterior	[PMCo] [COp])
VI.	Area amygdaloidea anterior pars dorsalis pars ventralis	[AA] / [AAA] [AAD] [AAV]
2. Centromediale Kerngruppe		
I.	Nucleus medialis rostrale Subdivision pars anterodorsalis pars anteroventralis caudale Subdivision pars posterodorsalis pars posteroventralis	[Me] / [M] [M _r] [MeAD] [MeAV] [M _c] [MePD] [MePV]
II.	Bettkern der Stria terminalis, intraamygdaläre Division	[BSTIA]
III.	Nucleus centralis pars medialis pars lateralis pars (lateral) capsularis (= amygdalostriatale Übergangszone	[Ce] / [CE] [CeM] / [CE _m] [CeL] / [CE _l] [CeC] / [CE _c] [AStr])
IV.	Area amygdalohippocampalis pars (postero)medialis pars (antero)lateralis	[AHi] / [AHA] [AHiPM] [AHiAL]
3. Basolaterale Kerngruppe		
I.	Nucleus basomedialis (= Nucleus basalis accessorius Nucleus basomedialis anterior (= magnocellulare (dorsolaterale) Subdivision Nucleus basomedialis posterior (= superficiale (mediale) Subdivision parvocellulare (ventromediale) Subdivision	[BM] [AB]) [BMA] [AB _{mc}] [BMP] [AB _s] und [AB _{pc}])
II.	Nucleus basolateralis (= Nucleus basalis Nucleus basolateralis anterior (= magnocellulare Subdivision Nucleus basolateralis posterior (= parvocellulare Subdivision Nucleus basolateralis ventralis	[BL] [B]) [BLA] [B _{mc}] / [Bmg]) [BLP] [B _{pc}] / [Bpc]) [BLV]
III.	Nucleus lateralis pars dorsolateralis pars ventrolateralis pars (ventro)medialis	[La] / [L] [LaDL] / [L _{dl}] [LaVL] / [L _{vl}] [LaVM] / [L _m]
IV.	Paralaminarer Kern	[PL]
4. Unklassifizierte Kerngebiete		
I.	intercalierte Zellmassen Hauptzellgruppe parakapsuläre Zellgruppe	[I] [IM] / [I _m] [I _{ps}]

[nach PRICE *et al.*, 1987; ALHEID *et al.*, 1995; PITKÄNEN *et al.*, 1997; McDONALD, 1998; PAXINOS und WATSON, 1999]

A.19 Experimentelle Rohdaten: Intensität der Färbungen

Bregma	Kerngebiet	PHA-L			FG			Doppelt		
		ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3
-1,3	ACo	n.b.	+	++	n.b.	++	+	n.b.	+	+
-1,4	ACo	+	n.b.	++	++	n.b.	+	+	n.b.	+
-1,6	ACo	+	+	++	++	+	+	+	-	+
-1,8	ACo	+	-	++	++	++	++	+	-	+
-2,12	ACo	-	+	++	+	++	++	-	+	++
-2,3	ACo	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-
-2,56	ACo	+	+	++	++	+	+	-	+	+
-2,8	ACo	-	+	++	+	+	+	-	+	+
-3,6	AHiAL	+	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,8	AHiAL	+	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-4,16	AHiPM	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-	n.b.
-4,16	APir	n.b.	-	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	-	n.b.
-3,14	AStr	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	+
-1,8	BAOT	-	-	+	+	+	++	-	-	-
-2,12	BAOT	+	+	+	+	++	+	-	-	+
-2,3	BAOT	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-
-1,6	BLA*	-	-	+	+	+	+	-	-	+
-1,8	BLA*	-	-	+	+	+	+	+	-	+
-2,12	BLA*	-	-	+	+	+	+	+	-	+
-2,3	BLA*	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-
-2,56	BLA*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-2,8	BLA*	-	-	+	+	+	+	-	+	+
-3,14	BLA*	-	+	+	+	+	+	-	+	+
-3,3	BLA*	-	+	+	+	+	+	-	+	n.b.
-2,3	BLP*	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-
-2,56	BLP*	+	+	+	+	+	+	-	-	+
-2,8	BLP*	-	+	++	+	+	+	-	-	+
-3,14	BLP*	-	-	++	+	+	+	-	-	+
-3,3	BLP*	-	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,6	BLP*	-	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,8	BLP*	-	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-4,16	BLP*	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-	n.b.

Bregma	Kerngebiet	PHA-L			FG			Doppelt		
		ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3
-2,3	BLV*	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-
-2,56	BLV*	+	-	++	+	+	+	+	-	+
-2,8	BLV*	-	-	++	+	+	+	-	-	+
-3,14	BLV*	-	n.b.	+	+	n.b.	+	-	n.b.	+
-3,3	BLV*	-	-	n.b.	+	+	+	-	-	n.b.
-3,6	BLV*	+	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-1,3	BMA	n.b.	-	+++	n.b.	++	++	n.b.	-	++
-1,4	BMA	+	n.b.	+++	++	n.b.	+	+	n.b.	++
-1,6	BMA	+	+	+++	++	++	++	+	+	++
-1,8	BMA	++	+	+++	++	++	+	+	+	++
-2,12	BMA	+	+	+++	++	++	++	+	+	++
-2,3	BMA	n.b.	n.b.	++	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	+
-2,56	BMA	-	+	+++	++	++	++	-	+	++
-2,8	BMA	+	-	n.b.	++	++	n.b.	+	-	n.b.
-3,14	BMA	++	n.b.	++	+	n.b.	++	+	n.b.	+
-2,56	BMP	+	-	+++	+	+	+	+	-	++
-2,8	BMP	+	+	n.b.	+	+	n.b.	+	+	n.b.
-3,14	BMP	-	+	+++	+	+	+	-	-	+
-3,3	BMP	+	+	n.b.	+	+	+	+	+	n.b.
-3,6	BMP	-	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,8	BMP	-	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-4,16	BMP	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-	n.b.
-1,6	CeC	+	-	+++	++	+	++	+	-	++
-1,8	CeC	+	+	++	++	+	+	+	+	+
-2,12	CeC	+	+	++	++	++	+	+	+	+
-2,3	CeC	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-
-2,56	CeC	+	+	+	+	++	+	+	+	+
-2,8	CeC	-	+	++	+	++	+	-	+	+
-3,14	CeC	+	+	+	+	++	+	+	+	+
-3,3	CeC	n.b.	+	n.b.	n.b.	+	+	n.b.	+	n.b.

Bregma	Kerngebiet	PHA-L			FG			Doppelt		
		ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3
-1,8	CeL	-	n.b.	++	++	n.b.	++	-	n.b.	+
-2,12	CeL	+	+	++	++	++	++	+	+	+
-2,3	CeL	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	++	n.b.	n.b.	+
-2,56	CeL	-	+	+	++	++	++	-	+	+
-2,8	CeL	+	+	+	+	++	+	+	+	+
-3,14	CeL	-	+	+	+	+	-	-	+	-
-3,3	CeL	n.b.	+	n.b.	n.b.	+	-	n.b.	+	n.b.
-1,6	CeM	+	-	++	+++	+	++	+	-	+
-1,8	CeM	+	+	++	+++	+	++	+	+	++
-2,12	CeM	+	+	+	+++	++	+	+	+	+
-2,3	CeM	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	++	n.b.	n.b.	-
-2,56	CeM	+	+	+++	++	++	++	+	+	++
-2,8	CeM	+	+	n.b.	+	++	n.b.	+	+	n.b.
-1,3	CxA	n.b.	-	-	n.b.	+	+	n.b.	n.b.	-
-1,4	CxA	-	n.b.	+	+	n.b.	+	-	n.b.	+
-1,6	CxA	-	-	+	-	+	+	-	-	+
-1,8	CxA	-	-	-	+	+	-	-	-	-
-2,12	CxA	-	-	+	+	+	+	-	n.b.	+
-1,6	IM	-	-	+	+	+	+	-	-	+
-1,8	IM	-	-	+	+	+	+	-	-	+
-2,12	IM	+	-	++	+	+	++	+	-	+
-2,56	IM	+	n.b.	++	+	n.b.	+	+	n.b.	+
-2,8	IM	-	-	++	+	+	+	-	-	+
-3,14	IM	-	n.b.	++	+	n.b.	+	-	-	+
-1,8	LaDL	-	n.b.	++	-	n.b.	+	-	n.b.	+
-2,12	LaDL	+	-	++	+	+	+	-	-	-
-2,3	LaDL	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	-	+	n.b.	-
-2,56	LaDL	+	-	++	+	-	+	+	-	+
-2,8	LaDL	-	-	+	+	+	+	-	-	+
-3,14	LaDL	-	-	+	+	-	+	-	-	-
-3,3	LaDL	-	-	n.b.	+	+	+	-	-	n.b.
-3,6	LaDL	+	-	n.b.	+	+	n.b.	+	-	n.b.
-3,8	LaDL	+	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.

Bregma	Kerngebiet	PHA-L			FG			Doppelt		
		ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3
-2,56	LaVL	+	-	+	+	+	+	+	-	+
-2,8	LaVL	-	-	++	+	+	+	-	-	+
-3,14	LaVL	-	n.b.	+	+	n.b.	+	-	n.b.	-
-3,3	LaVL	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	+	-	n.b.	n.b.
-3,6	LaVL	+	+	n.b.	+	+	n.b.	+	+	n.b.
-2,56	LaVM	++	-	+	+	+	+	+	-	-
-2,8	LaVM	+	-	++	+	+	+	-	-	-
-3,14	LaVM	+	n.b.	+	+	n.b.	+	-	n.b.	-
-3,3	LaVM	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	+	-	n.b.	n.b.
-3,6	LaVM	-	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,8	LaVM	-	+	n.b.	+	-	n.b.	-	-	n.b.
-4,16	LaVM	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-	n.b.
-1,3	LOT1	n.b.	-	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-
-1,4	LOT1	-	n.b.	+	+	n.b.	+	-	n.b.	-
-1,6	LOT1	n.b.	+	+	n.b.	+	+	n.b.	+	+
-1,3	LOT2	n.b.	-	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-
-1,4	LOT2	+	n.b.	++	+	n.b.	+	+	n.b.	+
-1,6	LOT2	+	+	+	n.b.	++	+	n.b.	+	+
-1,3	LOT3	n.b.	-	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-
-1,4	LOT3	+	n.b.	+++	++	n.b.	++	+	n.b.	+++
-1,6	LOT3	n.b.	-	++	n.b.	++	++	+	-	+++
-1,3	MeAD	n.b.	+	+	n.b.	++	++	n.b.	+	+
-1,4	MeAD	+	n.b.	++	n.b.	n.b.	++	+	n.b.	+
-1,6	MeAD	+	+	++	++	++	++	-	+	+
-1,8	MeAD	-	+	+	+	++	++	-	+	+
-2,12	MeAD	+	+	+	++	++	++	+	+	+
-2,3	MeAD	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	++	n.b.	n.b.	-
-2,56	MeAD	-	+	++	++	++	++	-	+	+
-2,8	MeAD	-	+	++	++	++	+	-	+	+
-2,12	MeAV	n.b.	n.b.	++	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	++
-3,14	MePD	+	+	++	++	+	+	+	-	+
-3,3	MePD	+	+	n.b.	+	+	+	+	+	n.b.
-3,6	MePD	+	+	n.b.	+	+	n.b.	-	+	n.b.
-3,8	MePD	-	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.

Bregma	Kerngebiet	PHA-L			FG			Doppelt		
		ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3	ThaB1	ThaB2	ThaB3
-2,56	MePV	+	n.b.	++	++	n.b.	++	+	n.b.	+
-2,8	MePV	-	+	++	-	++	+	-	+	+
-3,14	MePV	+	-	++	+	+	+	+	-	+
-3,3	MePV	-	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-2,3	PLCo	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-
-2,56	PLCo	+	-	+	+	+	+	-	-	+
-2,8	PLCo	-	-	-	+	+	+	-	-	-
-3,14	PLCo	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.
-3,3	PLCo	+	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,6	PLCo	+	+	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,8	PLCo	-	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-3,14	PMCo	+	n.b.	++	+	n.b.	+	-	n.b.	+
-3,3	PMCo	+	+	n.b.	+	+	+	-	-	n.b.
-3,6	PMCo	+	-	n.b.	+	-	n.b.	-	-	n.b.
-3,8	PMCo	-	-	n.b.	+	+	n.b.	-	-	n.b.
-4,16	PMCo	n.b.	+	n.b.	n.b.	+	n.b.	n.b.	-	n.b.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Eckbert Wilhelmi
Vor dem Kirchtore 14a
39167 Hohendodeleben

geboren am 26.11.1966
in 58332 Schwelm,
deutsch, verheiratet

SCHULAU SBILDUNG

1973-1977	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Linderhausen / Schwelm
1977-1986	Märkisches Gymnasium Schwelm
Juni 1986	Abschluß: Abitur

WEHRDIENST

Juli 1986 - Sept. 1987 Grundwehrdienst in Nienburg / Weser

HOCHSCHULAU SBILDUNG

1987-1995	Studium der Biologie (Diplom) an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Dez. 1995	Abschluß: Diplom
Dez. 2000	Verteidigung zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. an der Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

Nov. 1992 - Juli 1995	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Nov. 1994 - Dez. 1994	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Dez. 1992 - Juni 1996	Freier Mitarbeiter am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

BERUFSWEG

Juli 1996 - Jan. 1997	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Feb. 1997 - Juni 1997	Freier Mitarbeiter am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Juli 1997 - Dez. 1999	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Jan. 2000 - Juni 2000	Freier Mitarbeiter am Institut für Physiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Seit Juli 2000	Wissenschaftlicher Angestellter bei der FAN GmbH Magdeburg (Forschungsinstitut für angewandte Neurowissenschaften)