

2. Material und Methodik

2.1 Chemikalien und Substanzen

Für die Herstellung der verwendeten Lösungen wurde ausschließlich deionisiertes Wasser genutzt (Milli Q Purification System, Millipore-Milfort, UK), Chemikalien und Antikörper wurden, wenn nicht anderes angegeben, von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

2.2 Tracing-Experimente

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit internen Institutsvorschriften und in Anlehnung an die durch das „National Institute of Health“ veröffentlichte Richtlinie „*Guide of the Care and Use of Laboratory Animals*“ durchgeführt. Die Genehmigung der Experimente erfolgte durch die Ethikkommission des Berliner Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo No. G 0168/01).

In dieser Studie wurden 80 weibliche Wistar Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) verwendet. Nach Anlieferung der Tiere durch den Züchter wurden die Tiere im institutseigenem Tierstall zur Eingewöhnung mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in Standardkäfigen (H: 20 cm, B: 35 cm, T: 55 cm) geschlechtsgetrennt in Gruppen von drei bis vier Individuen gehalten. Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt und mit Sicht- und Geruchskontakt zu anderen Tieren getrennt gehalten. Futter und Wasser erhielten die Tiere ad libitum. Entsprechend den Vorgaben für die Versuchstierhaltung waren die Tiere bei einer Raumtemperatur von 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % untergebracht. Die Beleuchtung erfolgt in 12-stündlichen Intervallen im Hell-Dunkel-Rhythmus.

2.2.1 Anästhesie des Versuchstieres

Ratten mit einem Gewicht zwischen 220-280 g (einem Alter zwischen 3-4 Monaten entsprechend) wurden mit einer Mischung (Dosis 0,16 mg je 100 mg Körpergewicht) bestehend aus 45% Ketaminhydrochlorid (Ketamin-50-curamed®, CuraMED, Deutschland), 35% Xylazin (Rompun®, BayerVital, Deutschland) und 20% physiologischer Kochsalzlösung, die intraperitoneal injiziert wurde, tief narkotisiert.

Tabelle 2.1. Für unterschiedlich große Injektionsstellen wurden Applikationsdauer und Spitzendurchmesser variiert.

Tracersubstanzen	Applikationsdauer	Spitzendurchmesser
<i>kleine Injektionsstelle</i>		
CtB	10 - 15 Minuten	10 -15 μm
PhaL	15 Minuten	10 -15 μm
TMR-DA	12 - 15 Minuten	10 -15 μm
FG	10 Minuten	10 μm
<i>große Injektionsstelle</i>		
FG	15 Minuten	15 μm
TMR-DA	15 - 20 Minuten	15 - 25 μm
CtB	15 - 20 Minuten	15 - 20 μm
PhaL	20 Minuten	15 - 25 μm

Die Abkürzungen der Tracersubstanzen (linke Spalte) sind dem Text oder dem Anhang zu entnehmen.

2.2.2 Stereotaktischer Eingriff

Die anästhesierte Ratte wurde in einer stereotaktischen Apparatur (David Kopf Instruments, USA) fixiert. Die Körpertemperatur des Versuchstieres wurde während des operativen Eingriffs konstant bei 37 °C gehalten. Hierfür wurde ein rektaler Temperaturmessfühler verwendet, der mit einem Temperatur-Kontrollgerät (Fa. Omega, Stanford, CT, USA) und einer unter dem Tierkörper angebrachte Wärmeplatte gekoppelt war. Mit Dexpanthenol (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) wurden die Augen vor Austrocknung geschützt.

Nach Präparation und Freilegung des knöchernen Schädels wurden die Koordinaten für die Trepanation mit einem topografischen Atlas des Rattenhirns (Paxinos und Watson, 1998) über den Referenzpunkt Bregma kalkuliert und ein Bohrlochtrepanation vorgenommen. Im Bereich des Bohrloches wurden die Dura inzisiert und die mit der Tracer-Substanz gefüllte Glaskapillare von der Oberfläche des Gehirns in die Tiefe zur Zielregion abgesenkt. Nach Beendigung der Tracerapplikation wurde die Glaskapillare für weitere 15 Minuten bei ausgeschaltetem Strom im Gehirn belassen, um das Austreten der Tracer-Substanz entlang des Einstichkanals zu vermeiden.

Anschließend wurden die Tiere wundchirurgisch versorgt und bis zum Erwachen aus der Narkose warm gehalten. Bis zur vollständigen Rekonvaleszenz wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten.

Tabelle 2.2: Die Koordinaten für die stereotaktische Tracer-Applikation wurden in Anlehnung an den Atlas von Painos und Watson (1986) kalkuliert.

	Entfernung von Bregma	Abstand vom Sinus sagitalis in der Mediolateralebene	Tiefe von der Hirnoberfläche
LPOA	-0.2 mm bis -1.4 mm	-0.9 mm bis -2.0 mm	-7.7 mm bis -8.5 mm
LHA	-1.4 mm bis -3.6 mm	-1.3 mm bis -2.0 mm	-8.0 mm bis -8.5 mm
EPN	-2.2 mm bis -2.3 mm	-2.6 mm bis -2.7 mm	-7.4 mm bis -7.6 mm
LDTg	-8.7 mm	-0.6 mm	-5.8 mm
LHb	-3.6 mm	-0.8 mm	-3.5 mm
LHbM	-3.6 mm	-0.6 mm	-4.5 mm
LHBL	-3.6 mm	-1.0 mm	-4.5 mm

Die linke Spalte gibt die Applikationsorte wieder, Abkürzungen siehe Anhang.

2.2.3 Iontophoretische Applikation der Tracer

Die Spitzen der Borsilikat-Glaskapillaren wurden mit einem Ziehgerät (Puller P97, Sutter-Instrument, USA) gefertigt und anschließend unter mikroskopischer Kontrolle an einem Glasblock auf verschiedenen Innendurchmesser gebrochen. Als retrograde Tracer fanden der Farbstoff *Fluorogold* (FG, 1% 2-hydroxy-4,4'-diamino-stilbene in 0,1 M Cacodylate Puffer; Fluorochrome, USA) und die *beta-Untereinheit des Cholera-toxins* (CtB, 1% in H₂O; List, Biological Lab., USA) Verwendung, während als anterograde Tracer das *Isolectin L (Leucoagglutinin) des Phaseolus vulgaris agglutinins* (PhaL, 2% in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4; Vector, USA) und ein *Tetramethylrhodamin-gekoppeltes Dextranamin* (TMR-DA [MW=10.000], 5% in H₂O; Molekular Probes, USA) benutzt wurden. Die Applikation der Tracer-Substanzen erfolgte iontophoretisch durch einen positiven Strom, der mit einer Präzisionsgleichstromquelle (MVVCS02, npi, Deutschland) erzeugt und in einem siebensekündigen An-Aus-Zyklus gepulst wurde (Master 8, A.M.P.I., Israel). Die Stromstärke für die Applikation der Tracer FG und CtB lag bei 1 µA, für PhaL und TMR-DA bei 4 µA. Unterschiedlich große Injektionsstellen wurden durch verschiedene Spitzendurchmesser der Glaskapillaren und durch die Variation der Applikationszeit erzeugt (Tab. 2.1).

2.2.3.1 Die retrograden Tracer

CtB und FG wurden an verschiedenen Stellen innerhalb des lateralen Habenularkomplexes appliziert (Tab. 2.2). Im Bereich der Injektionsstelle wird CtB durch die Bindung an Mono-Sialo-Ganglioside endozytotisch in die Synapsen aufgenommen. FG hingegen diffundiert als schwache Base passiv durch die Membran

an den Terminalen und wird dort im sauren Milieu der Lysosomen „eingefangen“. Für den Transport über das Mikrotubulussystems zum Mikrotubulusorganisationsszentrum in der Nähe des Zellkerns sind so genannte „Minusendmotoren“ wie Dynein verantwortlich. Von dort erfolgt der Transport weiter in die Dendriten. Nach immunhistologischer Visualisierung von FG und CtB entsteht ein filigranes Zellbild, ähnlich der Golgi-Markierung.

2.2.3.2 Die anterograden Tracer

Für die Visualisierung von Axonen und deren Endigungen wurden PhaL und TMR-DA verwendet. Die niedermolekularen Dextranskonjugaten werden bevorzugt anterograd, hochmolekularen (ab 70.000 Dalton) retrograd transportiert (Vercelli et al., 2000). Daher wurde ein TMR-konjugiertes Dextranamin mit Molekulargewicht von 10.000 Dalton gewählt. PhaL und TMR-DA wurden an verschiedenen Positionen innerhalb der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region, im Nucleus entopeduncularis und im Nucleus tegmentalis laterodorsalis platziert (Tab. 2.2). Im Bereich der Injektionsstelle werden sie von den Dendriten und an der Zellmembran der Somata über aktive Mechanismen (wie Bindung an N-azetyl-Glucosamin oder beta-D-Galactose) oder passiv durch Diffusion aufgenommen. Der Transport in die Axonendigungen erfolgt entlang des Mikrotubulussystems und wird durch „Plusendmotoren“ wie das axonale Kinesin vermittelt. In der Zielregion sind die markierten Terminalen durch das Auftreten von „*Boutons*“ gekennzeichnet. Diese imponieren als beachtliche Vergrößerungen oder Schwellungen entlang („*boutons en passant*“) oder am Ende („*boutons terminaux*“, Endknöpfchen) der Axone und deren Verzweigungen.

2.2.4 Gewebefixierung

Sieben bis zehn Tage (PhaL, TMR-DA) beziehungsweise drei bis fünf Tage (CtB, FG) nach dem stereotaktischen Eingriff wurden die Tiere erneut in eine tiefe Narkose versetzt. Darüber hinaus wurden zusätzlich zur Gerinnungshemmung 5000 I.E. Heparin (Heparin-Na-Ratiopharm® 25 000 Ratiopharm, Deutschland) subkutan verabreicht.

Die Bauchhöhle wurde in Richtung des Diaphragmas eröffnet und die einzelnen Gewebeschichten oberhalb des Brustkorbes entfernt. Durch einen parasternalen Schnitt wurde der Thorax eröffnet und mit einem Rippenspreizer erweitert. Die linke Herzkammer wurde eröffnet und eine Perfusionskanüle durch den linken Ventrikel über das linke Atrium in die Aorta ascendens vorgeschoben, wo sie mit einer Klemme fixiert wurde. Die Eröffnung des Auriculum dextrum ermöglichte den Abfluss der

Perfusionslösung. Eine hohe Gewebequalität wurde gesichert, indem die Hypoxiezeit (Zeit von der Eröffnung des Thorax bis zum Beginn der Perfusion) regelmäßig zwischen 25 und 60 Sekunden betrug.

Die Perfusionsfixierung erfolgte im Einzelnen transaortal mit:

- einer auf 37° Celsius vorgeheizten Plasmaersatzlösung (Longasteril 70, Fresenius, Deutschland) bei einem Druck von 210 Torr für zehn Sekunden,
- einer Fixierlösung (bestehend aus 4% Paraformaldehyd (Merck, Deutschland), 0,05% Glutaraldehyd (Baker, Deutschland) und 0,2% Pikrinsäure (Merck, Deutschland) in 100 mM Phosphatpuffer (0,01 M NaH₂PO₄ in H₂O) bei 210 Torr für 5 Minuten, anschließend für 25 Minuten bei 20 Torr, und
- einer Saccharose-haltigen Nachspüllösung (5% Saccharose in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) bei 100 Torr für 5 Minuten.

Die Rattengehirne wurden nach der Perfusion sofort sorgfältig aus der Kalotte präpariert, in einem Plexiglasrahmen justiert und in 4% Agarose (Serva, Deutschland) eingegossen. Der Rahmen wurde bis zur Verfestigung der Agarose in einem Eisbad gelagert. Der Agaroseblock wurde anschließend in sieben vordefinierte 1,0 bis 5,5 mm dicke koronare Blöckchen geschnitten, die über Nacht in zwei Schritten (0,4 M und 0,8 M Sucrose) kryoprotectiert, am nächsten Morgen bei -70° Celsius in Hexan Schock gefroren und bis zum Gebrauch bei -80° Celsius gelagert wurden.

2.2.5 Herstellung von Schnittserien am Gefriermikrotom

Mit einem Kryostaten wurden bei -20° Celsius 20 µm dicke Schnitte hergestellt und in PBS (**P**hosphate **B**uffer **S**aline; 140 mM Natriumchlorid und 40 mM Kaliumchlorid in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) gefüllte Gläschen zu je zehn Serien gesammelt. Es wurden ausschließlich frontale Serien angefertigt. Der Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Hirnschnitten in einer Serie beträgt 200 µm. Für die Visualisierung der Tracer, zum Nachweis neuroaktiver Substanzen und für die Färbungen nach Nissl oder Klüver-Barrera wurden jeweils komplette Serien genutzt. Nicht benötigtes Material wurde in eine Frostschutzlösung (2,2 M Sucrose in 100 mM Phosphatpuffer und 42% Ethylenglykol [Merck, Deutschland], pH 7,4) überführt und bei -20° Celsius eingelagert.

Tabelle 2.3: Hersteller und geeignete Konzentrationen der Erstantikörper.

Erstantikörper	Hersteller	Konzentration
Ga- Cholera toxin-Untereinheit beta	Sigma, Deutschland	1:5000
Ga- vesikulärer Azetylcholintransporter	Chemicon, USA	1:1000
Gpa- GABA-B Rezeptor	Chemicon, USA	1:2000
Gpa- Neurotensin	Sigma, Deutschland	1:5000
Ma- Neurofilament H	Affinity Research Products, UK	1:10000
Ma- Parvalbumin	Sigma, Deutschland	1:10000
Ma- Thyrosinhydroxylase	Chemicon, USA	1:1000
Ra- 5-Hydroxytryptophan	Sigma, Deutschland	1:5000
Ra- Arginin-Vasopressin	Peninsula Lab., USA	1:500
Ra- Calbindin	Chemicon, USA	1:2000
Ra- Calretinin	Chemicon, USA	1:8000
Ra- Fluorogold	Chemicon, USA	1:4000
Ra- Galanin	Peninsula Laboratories, USA	1:1000
Ra- Glutamat-Decarboxylase 65	Chemicon, USA	1:2000
Ra- Glutamat-Decarboxylase 67	Chemicon, USA	1:2000
Ra- Kaliumanal-Untereinheit Kir3.2	AG Prof R.W. Veh	1:1000
Ra- Leu-Enkephalin	Peninsula Laboratories, USA	1:2000
Ra- Met-Enkephalin	Peninsula Laboratories, USA	1:5000
Ra- Neuropeptide Y	Peninsula Laboratories, USA	1:2000
Ra- Orexin A	Sigma, Deutschland	1:2000
Ra- Orexin B	Sigma, Deutschland	1:2000
Ra- Phaseolus vulgaris leucoagglutinin	Vector Laboratories, USA	1:5000
Ra- Somatostatin	Vector Laboratories Deutschland	1:5000
Ra- Substanz P	AG Gramsch	1:500
Ra- Tetramethylrhodamin-Dextranamin	Molekular Probes, USA	1:4000
Ra- vesikulärer Azetylcholintransporter	Molekular Probes, USA	1:2000
Ra- vesikulärer Glutamattransporter I	San Francisco UCSF Neurology, USA	1:500
Ra- vesikulärer Glutamattransporter II	San Francisco UCSF Neurology, USA	1:2000
Ra- μ -Opiat Rezeptor	PharMingen, Deutschland	1:2000

Abkürzungen: Ra-, Kaninchen-anti; Ma-, Maus-anti; Ga-, Ziege-anti; Gp-, Meerschwein-anti.

2.3 Immunzytochemische Aufarbeitung der Hirnschnitte

2.3.1 Vorbehandlung

Frisch geschnittene Serien wurden mehrfach in PBS gewaschen (3x15 Minuten). Da die Aldehydgruppen, der verwendeten Fixierlösung mit freien Aminosäuren im Gewebe Schiffsche Basen bilden, die die tertiäre Proteinstruktur beeinflussen und sich ungünstig auf die Antikörperbindung auswirken, wurden diese Doppelbindungen mit 1% Natriumborhydrid in PBS 15 Minuten lang bei Raumtemperatur reduziert. Im Anschluss wurden die Hirnschnitte nochmals gründlich in PBS gewaschen und zur Inaktivierung

Tabelle 2.4: Hersteller und geeignete Konzentrationen der Zweitantikörper.

Zweitantikörper	Hersteller	Konzentration
B-GaR	Vector Laboratories, Deutschland	1:2000
B-HaM	Vector Laboratories, Deutschland	1:2000
B-HaGp	Vector Laboratories, Deutschland	1:2000
B-HaG	Vector Laboratories, Deutschland	1:2000

Abkürzungen: B-GaR, biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin G (IgG); B-HaM, biotinyliertes Pferd-anti-Maus IgG; B-HaG, biotinyliertes Pferd-anti-Ziege IgG.

der endogenen Peroxidaseaktivität 30 Minuten mit Phenylhydrazin (1:2000, Merck, Deutschland) in 10%-igem Ziege-Normal-Serum (**Normal Goat Serum**, 10% NGS in PBS) oder Pferde-Normal-Serum (**Normal Horse Serum**, 10% NHS in PBS) inkubiert. Eine bessere Membranpermeabilität wurde durch Zusatz von 0,3% Triton-Lösung (10% Triton X-100 in H₂O) erreicht. NHS wurde verwendet, wenn der Erstantikörper in der Ziege erzeugt wurde.

2.3.2 Erstantikörperreaktion

Das Konzentrationsoptimum der verwendeten Primärantikörper wurde in Vorversuchen ermittelt (Tab. 2.3). Das Hirngewebe wurden direkt in die geeignet konzentrierte Lösung des Primärantikörpers in 10% NGS oder 10% NHS mit 0,3% Triton-X100, 0,1% Natriumazid- (10% Natriumazid in H₂O) und 0,1% Thimerosal- (1% Thimerosal in H₂O) Lösung überführt und für 36 Stunden bei 8° Celsius im Kühlraum inkubiert. Die Verwendung eines Normalserums vermindert die Hintergrundfärbung, da es mit dem verwendeten Antikörper um die unspezifische Bindungsstellen in der Gewebeprobe konkurriert.

2.3.3 Zweitantikörperreaktion

Die Schnitte wurden nach erneutem zweimaligen Waschen (PBS) und einer 60 minütigen Vorinkubation in 1%-iger PBS-A Lösung (2 mg Rinderserumalbumin in 1 ml PBS) für 24 Stunden bei 8° Celsius in der entsprechenden Lösung aus geeignet konzentriertem Sekundärantikörper (Tab. 2.4) in PBS-A, 0,3% Triton-X100 und 0,1% Natriumazid-Lösung inkubiert.

2.3.4 Visualisierung des Sekundärantikörpers

Bei der ABC-Methode (**A**vidin/**B**iotinyl-Peroxidase-**C**omplex) reagiert der biotinylierte Sekundärantikörper mit dem Avidin der ABC-Lösung und bildet einen stabilen Biotin-Avidin-Enzymkomplex. Das Enzym, eine Peroxidase, setzt das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) unter Zugabe von Wasserstoffperoxid zu einem bräunlichen Farbstoff um. Das Signal verstärkt sich (schwarzer Niederschlag), durch den Zusatz von Ammoniumnickelsulfat. Die Gewebeschnitte wurden hierzu erneut dreimal (je 15 Minuten) in PBS gewaschen und 60 Minuten in PBS-A vorinkubiert. Die Schnitte wurden danach 12 Stunden in 1:1000 Elite-ABC Lösung (10 µl Elite A [Avidin] und 10 µl Elite B [biotinylierte Peroxidase] in PBS-A; Vector Laboratories, USA) überführt. Nach erneutem Waschen in PBS (3x15 Minuten) wurden die Schnitte 15 Minuten in einer DAB-Lösung (DAB [1:100], Tris-Puffer [1:20, 12,2 g Tris(-hydroxymethylaminomethan) in 100 ml H₂O; pH 7,6] und Imidazol [1:100, 681 mg Imidazol in 10 ml H₂O, pH 7,6] in H₂O) inkubiert. Die DAB-Lösung wurde ausgetauscht und die gebundene Peroxidase anschließend 15 Minuten lang unter Zugabe von 0,3% Ammoniumnickelsulfat und 0,03% H₂O₂ dargestellt.

Nach erneutem zweimaligen Waschen in PBS (je 15 Minuten) wurden die Schnitte auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und 30 Minuten getrocknet, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70% zwei Minuten; 96%,100%, 100% je fünf Minuten) in Xylol (zweimal fünf Minuten) überführt und in Entellan® (Merck, Deutschland) eingedeckt.

2.3.5 Beschreibung verwendeter Antikörper

Die Antikörper gegen Fluorogold (Chemicon International Inc; Katalognummer AB153, lot 21081641) wurden ursprünglich im Kaninchen gegen Hydroxystilbamidin erzeugt. Als Trägerprotein wurden Rinderalbumin und Hämocytein (keyhole limpet hemocyanin) verwendet (Chang et al, 1990). Die IgG-Fraktion des Antikörpers gegen Tetramethylrhodamine (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; Katalognummer A-6397, lot 7051-1) stammt aus einem Antiserum das im Kaninchen gegen 5-Carboxy-Tetramethylrhodamine erzeugt wurde und über eine Aktivierung seiner Carboxylgruppe an Rinderalbumin gekoppelt wurde (Kaneko et al, 1996). Der affinitäts-gereinigte Antikörper gegen Phaseolus vulgaris agglutinin E+L (Vector laboratories, Burlingame, California, USA; Katalognummer AS-2300, lot K0616) wurde aus Kaninchen-Antiseren gegen gereinigtes Phaseolus vulgaris agglutinin hergestellt.

Der monoklonale Antikörper gegen Neurofilament H (Affinity Research Products, Ilkeston, UK; Katalognummer NA 1217, Catalog number NA 1217, batch N341; clone SMI-32 from Sternberger monoclonals) ist einer Mäuse-Aszitesprobe entnommen, die IgG1 enthielt, dass gegen das nicht phosphorylierte Epitop des Neurofilaments H gerichtet war (Campbell and Morrison, 1989).

Antiseren gegen das Protein Kir3.2 wurde im Kaninchen erzeugt, indem diese mit einem rekombinanten Protein bestehend aus einer Kir-Aminosäuresequenz (365-423) und GST-Fusionsabschnitt (Glutathion-S-Transferase) immunisiert wurden. Die Antikörper wurden über eine Festphasenabsorption und durch eine anschließende Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im ELISA-Assay erkannten die anti-Kir3.2 Antikörper ausschließlich das dazugehörige Antigen und im Westernblot mit nativem Hirngewebe zeigte sich eine einzelne dem Molekulargewicht entsprechende Bande. Ferner konnte die Immunreaktivität durch die Zugabe des entsprechenden Antigens regelmäßig geblockt werden (Eulitz et al, 2007).

Die darüber hinaus verwendeten Antikörper sind hinreichend auf ihre Spezifität und Sensivität untersucht worden, diesbezüglich sei auf die Literatur und Herstellerinformation verwiesen.

2.4 Herstellung Gelatine-beschichteter Objektträger

15 g Gelatine und 1,76 g Kaliumchromsulfat-12-hydratin wurden bei 70° Celsius in 630 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde dann, nach Zusatz von 300 ml Ethanol und 70 ml Eisessig, filtriert. Die gründlich gewaschenen (Geschirrspülmaschine) Glas-Objektträger wurden für drei Minuten in die noch warme Gelatinelösung getaucht, drei Stunden in staubfreier Umgebung und über Nacht im Wärmeschrank bei 60° Celsius getrocknet.

2.5 Kresylviolett-Färbung

Mit Kresylviolettazetat, einem basischen Farbstoff aus der Oxazinfamilie färben sich vorwiegend Nissl'schollen (endoplasmatischen Retikulum) und Zellkerne. Die Nissl' Substanz zeigt dabei eine typische violette Färbung, während die Zellkerne eher blau erscheinen. Die Fasersysteme bleiben hell, da sie sich kaum anfärben und beim Auswaschen des Farbstoffüberschusses schnell entfärben.

Die Hirnschnitte wurden in phosphatgepufferter Lösung (0,01 M NaH₂PO₄ in H₂O) zehn Minuten gewaschen, auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger wurden in eine 70%ige

Ethanollösung transferiert, in der sie zur Lipidextraktion über Nacht belassen wurden. Am nächsten Morgen wurden sie zwei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und in einer frisch gefilterten Kresylviolett-Lösung (0,2% Kresylviolett in 20 mM Acetat-Puffer [1,2 g Essigsäure in 1000 ml H₂O], pH 3,5) 30 Minuten gefärbt. Nach einmaligem Waschen in destilliertem Wasser und anschließender Dehydrierung (70% Ethanol eine Minute, 80%, 96%, 100%-1, 100%-2 je zwei Minuten, Xylol-1, Xylol-2 je fünf Minuten) wurden die Schnitte mit Entellan® eingedeckt.

2.6 Färbung nach Klüver-Barrera

Bei der Färbung nach Klüver-Barrera (KB-Färbung) handelt es sich um eine kombinierte Zell- und Markscheidenfärbung, mit der die Markscheiden mit Luxolechtblau (=Luxolfastblue), einem basischen Farbstoff aus der Phthalocyanin-Familie, die Somata anschließend mit Kresylviolett eingefärbt werden. Die Markscheiden erscheinen im Lichtmikroskop leuchtend blau, Nissl-Substanz und Zellkerne violett, das Zytosol schwach blau und die Gliazellen in verschiedenen Blautönen.

Die Gewebeschnitte einer Serie wurden für 10 Minuten in PBS gewaschen und im Anschluss im Kühlraum über Nacht zur Lipidextraktion in 70%-igem Ethanol gelagert. Am nächsten Morgen wurden sie in vorgewärmte Luxolechtblau-Lösung (100 mg Solvent 38 in 100ml Ethanol [96%] und 0,5 ml Azetatpuffer [10%]) transferiert und über Nacht bei 56° Celsius im Wärmeschrank inkubiert. Die Schnitte wurden am folgenden Tag auf Raumtemperatur abgekühlt und mit destilliertem Wasser und PBS jeweils drei Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Lithiumkarbonatlösung (0.01% Lithiumkarbonat in H₂O) drei Minuten differenziert. Die Schnitte wurden drei Minuten in 70% Ethanol gebracht und zweimalig in PBS gewaschen. Dann wurden sie auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, zwei Minuten in destilliertem Wasser gespült und mit einer frisch gefilterten Kresylviolett-Lösung für 30 Minuten gegengefärbt. Abschließend wurden die Proben erneut zwei Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Entellan® eingedeckt.

2.7 Histochemischer Nachweis der Azetylcholinesterase

Die Azetylcholinesterase (AChE) hydrolysiert den Transmitter Azetylcholin zu Azetat und Cholin. Der Nachweis dieses Enzyms identifiziert Neurone, die Azetylcholin als Transmitter verwenden.

Der Versuch wurde im Eisbad durchgeführt. Die Frontalschnitte einer Serie wurden mehrfach mit Maleat-Puffer (1,16 g Maleat in 100 ml H₂O, pH 6,3) gewaschen und für 30 Minuten in eine AChE-Vorinkubationslösung (10 ml Vorinkubationsbasislösung mit 100 µl Zyanoferratstock, *siehe unten*) transferiert. Für die Enzym-Substrat-Reaktion wurden die Schnitte eine Stunde in der AChE-Inkubationslösung (*s. u.*) inkubiert. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit Maleat-Puffer (je fünf Minuten) gestoppt. Die Schnitte wurden dann auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen, 30 Minuten getrocknet, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Entellan® eingedeckt.

Verwendete Lösungen:

- Vorinkubationsbasislösung: 75 mg Kobaltchlorid und 147 mg tri-Natriumzitat in 100 ml Maleat-Puffer, pH 7,25
- Cyanoferratstock: 823 mg Kaliumhexacyanoferrat-III in 10 ml H₂O, pH 7,25
- AChE-Inhibitorlösung: 36,3 mg Acetylcholinchlorid in 1 ml H₂O
- AChE-Substratlösung: 39,5 mg Acetylthiocholinchlorid in 1 ml H₂O
- AChE-Substratgemisch: 20 µl AChE-Substratlösung in 80 µl AChE-Inhibitorlösung
- AChE-Inkubationslösung: 100 µl AChE-Substratgemisch in 10 ml AChE-Vorinkubationsbasislösung mit 100 µl Zyanoferratstock

2.8 Dokumentation und Fotografien

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Leica DMRB Mikroskop (Leica, Germany). Fotografien für die Abbildungen wurden mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera (Olympus Camedia 4040; optische Auflösung: 3504 x 2336) aufgenommen. Zeichnungen ausgewählter Ergebnisse wurden an einem Leica DMLS Mikroskop mit einem Zeichentubus (Leica, Germany) erstellt und dann mit einem Scanner (Hewlett-Packard, PSC 1250; Auflösung: 1220x720) digitalisiert. Für Justierungen von Kontrast und Helligkeit, die Zusammenstellung der Bildserien und die Zeichnungen wurde Adobe Photoshop CS 2.0 verwendet.

2.9 Histologische Analyse

Für die morphologische Untersuchung der Struktur der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region (LPOA/LHA) wurden über 50 Nissl und Klüver-Barrera gefärbte Serien mit nicht weniger als 1000 einzelnen Frontalschnitten genutzt. Zusätzlich standen für die Auswertung zwei kontinuierliche koronare Paraffinserien

(Schnittdicke 10 µm) durch das Dienzephalon mit mehr als 800 Einzelschnitten zur Verfügung (AG Prof. R.W. Veh). Die Zellgruppen der LPOA/LHA wurden in Anlehnung an Niewenhuys und Kollegen (Niewenhuys et al., 1982; Veening et al., 1982; Geeratds et al., 1990a+b) identifiziert. Für die benachbarten Strukturen und deren Nomenklatur wurden die Atlanten von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1998) und Swanson (Swanson, 1992 und 2006) benutzt.

Eine repräsentative Klüver-Barrera gefärbte Serie wurde zur weiteren digitalen Verarbeitung bei einer Auflösung von 3072 x 2304 Pixeln bei 72 DPI mikrofotografiert. Im Photoshop wurden die Fotografien mit einer zweiten Bildebene versehen, in die die neuroanatomische Strukturen mit einem Grafiktablett (Intuos3 A4 oversize, Wacom Europe GmbH) eingezeichnet wurden. Parallel dazu wurde mikroskopisch bei hoher Vergrößerung die Morphologie der Zellgruppen analysiert. In dem so erstellten Atlas verwendete Abkürzungen von Nomenklaturbegriffen orientieren sich an folgenden Regeln:

„Areale“ sind mit dem Suffix „A“ abgekürzt (**präoptische Area = POA**), bei „Zonen“ wurde ein „Z“ vorangestellt (**Zona incerta = ZI**).

Bei Kerngebieten wurde auf das „N“ für Nucleus verzichtet (**Nucleus supraopticus = SO**). Eine Ausnahme bilden etablierte Abkürzungen wie STN (= **Subthalamic nucleus**).

Lagebeziehungen innerhalb von Strukturen sind mit den Suffixen „r“ für rostral, „c“ für kaudal, „l“ für lateral, „m“ für medial, „mn“ für median, „p“ für posterior, „a“ für anterior, „v“ für ventral, „t“ für tuberal oder „d“ für dorsal versehen, auch in Kombination (**anterolaterale Zellgruppe der LHA = LHAal**). Als vorangestellte Großbuchstaben bezeichnen sie eigenständige Hirnstrukturen (**LPOA = laterale präoptische Area**).

2.10 Hodologische Analyse

Die Zellkörper von retrograd markierten Neuronen wurden jeweils in einer Serie gezählt. Der Abstand zweier aufeinander folgender Schnitte einer Serie beträgt 250 µm. Um die Größenordnung von eventuell doppelt-gezählten Neuronen abschätzen zu können (für Details siehe Guillery, 2002), benutzten wir die von Abercrombie beschriebene Korrekturtechnik (Abercrombie, 1946). Die effektive Schnittdicke (z-Axis) wurde an fünf verschiedenen Positionen von zwei Schnitten unterschiedlicher nomineller Dicke von 20 µm beziehungsweise 30 µm mit einem 63x Öl-Immersionobjektiv gemessen (Williams et al, 2003). An fünf Positionen wurde Fokus-kontrolliert die relative Dicke eines Deckgläschens bestimmt und durch Messung der realen Dicke mit Hilfe einer

Schiebelehre das System kalibriert (Williams et al, 2003). So konnte eine Schnittdicke für die nominell 20 μm Schnitte von 11 μm und von 18 μm für die nominell 30 μm dicken Kryostatschnitte festgestellt werden. Die mittlere Größe der retrograd markierten Zellen (Somata) wurde in den nominell 20 und 30 μm Schnitten mit Hilfe des Objektivmikrometers bestimmt. Für die Zelldurchmesser ergeben sich beinahe identische Werte von 15.5 +/- 4.1 μm beziehungsweise 16.7 +/- 4.3 μm . Kombiniert man dieses Ergebnis mit der Formel von Abercrombie lässt sich ein Korrekturfaktor von 0.467 bestimmen, so dass von einem Fehler („overcount“) von 117% bei 25 μm Schnitten ausgegangen werden muss.