

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleichende Untersuchungen zur Verteilung von
Cholinacetyltransferase und Stickoxidsynthase in spinalen Systemen
von Vögeln

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Hauswedell
aus Bonn

Datum der Promotion: 12.09.2014

Inhaltsverzeichnis

1	ABSTRAKT	4
1.1	Abstrakt, deutsch	4
1.2	Abstrakt, englisch.....	5
2	EINLEITUNG	7
2.1	Stickoxid und Stickoxidsynthese	7
2.1.1	NADPH Diaphorase und NOS	9
2.1.2	Lokalisation von NOS im Nervensystem und Kolo- kalisierung mit anderen Neurotransmittern.....	11
2.2	Acetylcholin.....	13
2.2.1	Nachweismethodik für cholinerge Neurone in Gewebeschnitten	14
2.2.2	Lokalisation cholinergischer Strukturen im zentralen Nervensystem	15
2.2.3	Lokalisation cholinergischer Strukturen im peripheren Nervensystem	17
2.3	Problemstellung.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Versuchstiere	19
3.2	Schnitte.....	20
3.3	Inkubation.....	20
3.3.1	Fluoreszenzmarkierung	21
3.3.2	Peroxidasemarkierung	22
3.4	NADPH Diaphorase-Reaktion	23
3.5	Auswertung und Dokumentation.....	23
4	ERGEBNISSE	25
4.1	Allgemeine methodische Beobachtungen	25
4.2	Das Hühnerrückenmark.....	26
4.2.1	Die Verteilung von NOS im Hühnerrückenmark.....	28
4.2.2	Die Verteilung von ChAT im Hühnerrückenmark.....	35
4.3	Das Taubenrückenmark	45
4.3.1	Die Verteilung von NOS im Taubenrückenmark.....	47
4.3.2	Die Verteilung von ChAT im Taubenrückenmark.....	53

4.4	Kolokalisationsexperimente	59
4.4.1	Beispiele für gefundene Kolokalisation	60
4.5	Das embryonale Hühnerrückenmark.....	68
4.5.1	E8	68
4.5.2	E15	70
4.5.3	E18	72
4.5.4	E20	75
4.6	Spinalganglien	78
4.6.1	Huhn	79
4.6.2	Taube	80
5	DISKUSSION	82
5.1	Stickoxidbildende Systeme im Rückenmark von Huhn und Taube.....	82
5.2	Cholinerge Systeme im Rückenmark von Huhn und Taube.....	86
5.3	NADPH Diaphorase/NOS und ChAT im embryonalen Rückenmark des Huhnes	90
5.3.1	Entwicklung NADPH Diaphorase/NOS-reaktiver Strukturen	90
5.3.2	Entwicklung cholinergere Strukturen.....	91
5.4	Kolokalisation von NADPH Diaphorase und ChAT in spinalen Systemen von Huhn und Taube	92
5.5	Mögliche Kolokalisation von NOS mit anderen Transmittern im Rückenmark von Huhn und Taube	94
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	99
8	ANHANG	118
8.1	Eidesstattliche Versicherung.....	118
8.2	Lebenslauf.....	120
8.3	Publikationsliste	121
8.4	Danksagungen.....	122

1 Abstrakt

1.1 Abstrakt, deutsch

Die Expressionsmuster von Cholinacetyltransferase (ChAT) und Stickoxidsynthase (NOS) im Rückenmark von Säugetieren sind weitestgehend beschrieben. Die vorliegende Arbeit untersucht vergleichend die Verteilung von ChAT und NOS in spinalen Systemen von Vögeln, exemplarisch wurden Gewebe von Taube und Huhn analysiert. Um einen Überblick über die Entwicklung cholinergischer und NO-bildender Neurone zu gewinnen, wurden auch embryonale Hühner verschiedener Altersstufen untersucht. Das Rückenmark der adulten Vögel wurde mit Spinalganglien präpariert und geschnitten. Die Lokalisation von NOS wurde mit immunhistochemischen Methoden und mit NADPH Diaphorase-Histochemie an Rückenmarksschnitten studiert, für die Untersuchung von ChAT wurden lediglich immunhistochemische Methoden angewandt. Kolokalisation der beiden Substanzen wurde analysiert, indem zunächst ChAT durch Immunfluoreszenz markiert wurde und anschließend eine NADPH Diaphorase-Färbung erfolgte.

Das Verteilungsmuster von ChAT und NOS war in beiden Spezies ähnlich. Eine prominente ChAT-Aktivität war in den Motoneuronen des Vorderhorns erkennbar, des Weiteren stellte sich eine Gruppe von ChAT-positiven Zellen dorsomedial des Zentralkanales dar – die präganglionären autonomen Neurone. Beim Huhn lässt sich die Gruppe als sympathische Columna Terti von Zervikalsegment 15 bis Sakralsegment 2 ausmachen, im unteren Sakralmark befindet sich die parasympathische Neuronengruppe. In der Taube erstrecken sich die beiden Säulen von Zervikalsegment 13 bis Lumbalsegment 2 und im unteren Sakralmark. Im Bereich der Hinterhörner waren einzelne kleine Neurone ChAT-immunoreaktiv, innerhalb der Substantia intermedia einige Interneurone. Besonders auffällig waren in mehreren Experimenten deutlich ChAT-markierte Faserzüge in Hinterhorn sowie Hinterwurzel, diese könnten möglicherweise dorsal austretende Axone zervikaler Motoneurone darstellen. Innerhalb der Spinalganglien war ChAT ubiquitär vorhanden.

NOS-positive Neurone wurden in beiden Vogelarten vereinzelt über die graue Substanz verteilt gefunden, die meisten dieser Interneurone liegen nahe der Mittellinie und des

Zentralkanales, gelegentlich innerhalb der Gruppe der Motoneurone. Der größte Anteil der NOS-Aktivität lässt sich in den oberflächlichen Schichten des Hinterhornes ausmachen – hier befinden sich kleine NOS-positive Neurone und ein dichter, intensiv angefärbter Faserplexus. In den Spinalganglien des Huhnes war eine auffällige NOS-Markierung der Satellitenzellen sowie eines Teils der Ganglienzellen erkennbar.

Die Kolokalisationsexperimente konnten kaum Kolokalisation von ChAT und NOS darstellen, lediglich vereinzelte Neurone scheinen beide Substanzen zu exprimieren. Überraschend ist dieses Ergebnis insbesondere für die Gruppe der präganglionären autonomen Neurone, in der bei Säugetieren Ko-Expression der Neurotransmitter Stickoxid und Acetylcholin bekannt ist. Cholinerge und Stickoxid-enthaltende Transmissionsysteme scheinen bei Vögeln eventuell deutlich unabhängiger voneinander zu funktionieren. NO scheint keine wesentliche Rolle als Signalmolekül autonomer spinaler Neurone zu spielen, anzunehmen ist jedoch – wie auch bei anderen Spezies – eine Bedeutung in der somatosensorischen Transmission. Für ChAT ist bei Vögeln eine zentrale Rolle in der somatischen und autonomen Transmission zu postulieren.

1.2 Abstrakt, englisch

The expression pattern of choline acetyltransferase (ChAT) and nitric oxide synthase (NOS) within the spinal cord of mammalian species are well-known. The present study determines the distribution of ChAT and NOS in spinal systems of birds. We examined tissue from pigeons and chicken. To gain insight into the development of cholinergic and NO synthesizing neurons we also studied chick embryos at different embryonic stages. The spinal cord of the adult birds was dissected and cut with the spinal ganglia attached. The localization of NOS was studied with immunohistochemistry and NADPH Diaphorase activity. ChAT was localized by immunohistochemistry alone. Experiments for colocalization were performed by immunofluorescence detection of ChAT followed by NADPH diaphorase staining.

The distribution pattern of ChAT and NOS was similar in both species. Apart from prominent ChAT activity within motoneurons of the ventral horn there was a cluster of ChAT positive cells dorsomedial to the central canal corresponding with the preganglionic autonomic neurons. In the chicken the sympathetic Column of Terni extends from cervical segment 15 to synsacral segment 2, the parasympathetic column is found in the lower synsacral cord. In the

pigeon the two columns are present from cervical 13 to lumbar 2 and the lower sacral cord. The dorsal horn and the central grey substance showed few small ChAT reactive neurons. Of special interest were intensely ChAT stained processes in the dorsal horn and dorsal root of the cervical cord. These might correspond with axons of cervical motor neurones exiting via the dorsal horn. Within the chicken spinal ganglia we saw widespread ChAT reactivity.

NOS positive neurons were found scattered within the central grey substance in both birds. Most of these interneurons are located around the central canal and occasionally between motoneurons. The majority of NOS activity was found in the superficial layers of the dorsal horn consisting of small NOS reactive neurons and a plexus of intensely stained processes. The spinal ganglia showed clear NOS reactivity of satellite cells and a fraction of ganglionic cells.

Experiments failed to reveal substantial colocalization of ChAT and NOS. Only a small number of neurons seems to express both substances. Concerning the autonomic neurons this comes as a surprise since co-expression of the neurotransmitters nitric oxide and acetylcholine is a given fact in mammalian species. In birds cholinergic and nitrergic transmission may function more independently and NO does not seem to play a significant role as signal molecule of autonomic spinal neurons. However, a function in somatosensory transmission – as is known from other species – seems likely. A key role in somatic and autonomic spinal transmission has to be assumed for acetylcholine.

2 Einleitung

2.1 Stickoxid und Stickoxidsynthese

Das kleine radikalische Molekül Stickoxid (NO) ist im menschlichen und tierischen Organismus weit verbreitet. Die endogene Synthese von NO, seine Natur als körpereigene Substanz, wurde erst relativ spät, um das Jahr 1990 herum, entdeckt.

NO übt wichtige Funktionen als Botenstoff in verschiedenen Organsystemen aus. Ein Hauptzielort von Stickoxid als Signalmolekül ist die lösliche Guanylat-Zyklase. Seinen Effekt auf dieselbe entfaltet es durch Bindung an das Eisen der Häm-Komponente des Enzyms. Die dadurch erfolgende Konformationsänderung aktiviert die Guanylat-Zyklase und führt zur Synthese von cGMP aus GTP. Die intrazellulären cGMP-Spiegel steigen an und beeinflussen u.a. cGMP-abhängige Proteinkinasen und Kationenkanäle (Übersicht: (Dawson *et al.*, 1992)).

Die ersten Beobachtungen über die Rolle von Stickoxid im Säugetierorganismus entstanden bei Untersuchungen des Immunsystems und zeigten, dass NO ein Mediator der Zytotoxizität der Makrophagen ist. In Abwesenheit von Arginin, das für die Synthese des NO notwendig ist, verlieren Makrophagen ihre bakteriziden und zytotoxischen Fähigkeiten. In Makrophagen können von ihnen produzierte freie Radikale mit NO kombinieren und somit Substanzen produzieren, die eine stärker toxische Wirkung haben als NO allein (Übersicht: (Lowenstein & Snyder, 1992)).

Bald darauf wurden NO weitere Eigenschaften im Gefäßsystem zugeschrieben: eine muskelrelaxierende und somit gefäßerweiternde Wirkung. Bereits 1980 beschrieben Furchgott und Zawadzki die Notwendigkeit eines intakten Endothels zur Vermittlung einer Gefäßerweiterung durch Acetylcholin und propagierten die Existenz eines diffusiblen Faktors, der die Relaxierung der glatten Muskulatur bewirke (Furchgott & Zawadzki, 1980). Es gelang jedoch zunächst nicht, diesen Faktor zu identifizieren, und so wurde er in Ermangelung genauerer Kenntnisse EDRF (endothelium-derived relaxing factor) genannt. Noch vor der Identifizierung von EDRF als NO konnte gezeigt werden, dass es durch die Synthese des Faktors zu einem intrazellulären Anstieg von cGMP kommt (Rapoport *et al.*, 1983) und dass die Synthese Ca^{++} -abhängig ist (Griffith *et al.*, 1986). Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang

1987 der Nachweis, dass EDRF mit NO identisch ist (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Damit konnte auch die blutdrucksenkende pharmakologische Wirkung der Gruppe der Nitrovasodilatoren erklärt werden.

Stickoxid hat neben dieser muskelrelaxierenden noch andere Wirkungen im Gefäßsystem. So verhindert es die Thrombozytenaggregation und wirkt damit der Thrombenbildung entgegen (Übersicht: (Ignarro, 1989)).

Besonders interessant war die Entdeckung, dass Stickoxid auch in Nervenzellen zu finden ist und dort als Neurotransmitter fungiert. Der Nachweis einer Wirkung von NO im Gehirn gelang 1988 erstmals einer Gruppe um Garthwaite (Garthwaite *et al.*, 1988). Sie konnten zeigen, dass nach Stimulation von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat NO freigesetzt wird, was wiederum zu einer Aktivierung der Guanylatzyklase und damit einem Anstieg von cGMP führt. Auch Knowles und seine Arbeitsgruppe beschrieben NO im Zentralnervensystem sowie die Regulierung seiner Aktivität durch Ca^{++} /Calmodulin und die Abhängigkeit seiner Bildung von der Präsenz von Arginin (Knowles *et al.*, 1989). Somit war auch ersichtlich, dass es ein NO-synthetisierendes Enzym in Nervenzellen geben müsste.

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von NO im Nervensystem war es nötig, mehr über die Lokalisation der NO-enthaltenden Neurone zu erfahren. NO selber eignet sich jedoch nicht zur Untersuchung, da es ein extrem flüchtiges Molekül ist. Die Arbeiten konzentrierten sich auf die Isolation der Stickoxidsynthase (NOS), was Bredt und Snyder (1990) sowie Mayer, John *et al.* (1990) gelang. Im Anschluss konnte eine neuronale Lokalisation für NOS und damit eine wahrscheinliche Rolle im neuronalen Stoffwechsel nachgewiesen werden (Bredt *et al.*, 1990). Es folgten biochemische Studien über das Enzym sowie Klonierung und Sequenzierung verschiedener, das Enzym kodierender DNA-Sequenzen.

Es existieren mindestens drei verschiedene Formen der Stickoxidsynthase (NOS): eine neuronale (Typ I), eine endotheliale (Typ III) und eine Makrophagen-Form (Typ II). In den Makrophagen ist die Aktivität der NO Synthase unter normalen Umständen vernachlässigbar, ihre Synthese wird durch Stimulation mit z. B. Lipopolysacchariden, Interferon oder auch bakteriellen Toxinen induziert. Hingegen wird die NOS von Neuronen und Endothelzellen konstitutiv exprimiert. Die neuronale Stickoxidsynthase ist ebenso wie die endotheliale ein Enzym, dessen Aktivierung durch den Ca^{++} /Calmodulin-Komplex erfolgt. Für die Bildung von NO und Citrullin aus Arginin wird der Kofaktor NADPH benötigt. In Neuronen werden nach Stimulierung der NMDA-Rezeptoren durch Glutamat Calcium-Kanäle geöffnet und

somit der Einstrom von Ca^{++} ausgelöst und NOS aktiviert. In Endothelzellen ist der Anstieg des intrazellulären Ca^{++} ACh-vermittelt. Die Makrophagen-NO-Synthase agiert Calcium-unabhängig. Die drei Isoenzyme enthalten homologe Aminosäure-Sequenzen, sie entstammen jedoch verschiedenen Genen. Sie verfügen über verschiedene regulatorische Einheiten: Bindungsstellen für NADPH, Flavinadenindinukleotid und Flavinmononukleotid. Des Weiteren benötigt NOS Tetrahydrobiopterin. Die Sequenzanalyse legt eine Verwandtschaft von NOS mit den Cytochrom P450 Enzymen nahe (Bredt *et al.*, 1991).

Verschiedene Arbeiten ergaben, dass NO sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem weit verbreitet ist und auch verschiedene Funktionen in demselben erfüllt. NO erwies sich als ein atypischer Neurotransmitter, insofern als dass er verschiedene Kriterien, die bis zu seiner Entdeckung für Neurotransmitter postuliert waren, nicht erfüllt. Er wird nicht in synaptischen Vesikeln gespeichert, er wird enzymatisch quasi nach Bedarf produziert, und es existieren keine typischen membranständigen Rezeptorproteine – wie z.B. für die klassischen Neurotransmitter Acetylcholin oder Noradrenalin – an denen er seine Wirkung entfaltet (Dawson *et al.*, 1992). NO als Neurotransmitter wird eine Rolle bei den Vorgängen von Lernen und des Gedächtnisses (u.a. der Langzeitpotenzierung) zugeschrieben. Auch für die Schmerzverarbeitung im Rückenmark scheint NO bedeutsam zu sein (Meller & Gebhart, 1993). Es ist mittlerweile etabliert, dass NO auch an neuroendokrinen Vorgängen beteiligt ist und damit auch Einfluss auf das Immunsystem hat, z. B. beim septischen Schock (Bredt *et al.*, 1990; Carnio *et al.*, 2006). Im autonomen Nervensystem ist NO als ein inhibierender bzw. relaxierender Transmitter z. B. im Gastrointestinaltrakt identifiziert und als der wichtigste Neurotransmitter zur Regulierung der Erektion (Dawson *et al.*, 1992).

Stickoxidsynthase kann jedoch auch als Neurotoxin wirken. Unter Glutamat-Einfluss scheinen NOS enthaltende Neurone Calcium-vermittelt toxische Mengen an NO produzieren zu können, die sie an die umliegenden Nervenzellen abgeben und diese somit schädlichen und zerstörenden Einflüssen aussetzen (Dawson *et al.*, 1991b; Thippeswamy *et al.*, 2006).

2.1.1 NADPH Diaphorase und NOS

Lange vor der Entdeckung von NO stießen Thomas & Pearse (1961) in ihren Arbeiten zur Verteilung von Dehydrogenasen im Nervensystem auf eine Subpopulation von Neuronen im Gehirn und Rückenmark von Ratten, die durch eine besonders hohe Aktivität an NADPH

Diaphorase auffielen, einer histochemischen Aktivität, die Tetrazolium-Salze mit NADPH als Elektronendonator reduziert. Durch Verwendung von Nitroblau-Tetrazolium, eine Verbindung, die in wässriger Lösung gelblich ist und in reduziertem Zustand als blauer Farbstoff Formazan ausfällt, stellen sich die NADPH Diaphorase-enthaltenden Neurone nach der Reaktion intensiv blau gefärbt dar. Mit dieser Methode kann oft eine Golgi-ähnliche Färbung von Nervenzellen in ihrer Gesamtheit mit Somata sowie Dendriten und Axonen erzielt werden.

Erst sehr viel später wurde beschrieben, dass diese NADPH Diaphorase-Aktivität resistent gegenüber Formaldehyd-Fixierung ist (Scherer-Singler *et al.*, 1983). Des weiteren gelang der Arbeitsgruppe der Nachweis, dass NADPH Diaphorase-positive Neurone nicht als einzelne Neurone, sondern in Gruppen lokalisiert in bestimmten Kerngebieten des Gehirns vorkommen.

Nach der Isolierung von NOS konnte nachgewiesen werden, dass die neuronale NADPH Diaphorase mit Stickoxidsynthase (NOS) identisch und dass somit NOS verantwortlich für die neuronale NADPH-Aktivität ist (Hope *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1991a).

Vor dieser Entdeckung hatte es bereits vielfältige Untersuchungen zur Lokalisation von NADPH Diaphorase im Nervensystem verschiedener Spezies gegeben, so dass relativ viel über die Lokalisation von NOS bekannt war, obwohl NOS an sich erst vor kurzem entdeckt worden war. Es blieb jedoch herauszufinden, ob NADPH Diaphorase-positive Zellen tatsächlich auch immer mit NOS-immunoreaktiven Zellen übereinstimmen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Studien durchgeführt, die Formaldehyd fixiertes Gewebe sowohl auf NOS-Immunoreaktivität als auch mit der histochemischen Methode der NADPH Diaphorase-Reaktion untersuchten. Viele Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die beiden Markierungen im großen und ganzen gut übereinstimmten (Bredt *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1991a; Blottner & Baumgarten, 1992; Dun *et al.*, 1992; Vincent & Kimura, 1992). Es gab jedoch auch immer wieder abweichende Ergebnisse der beiden Methoden und Zweifel an der Reliabilität der NADPH Diaphorase-Färbung als Indikator für NOS-positive Neurone (Hope *et al.*, 1991; Valtschanoff *et al.*, 1993; Kharazia *et al.*, 1994; Doone *et al.*, 1999). Es scheint, dass NADPH Diaphorase-Aktivität nicht in allen Fällen bzw. Zellen spezifisch für die Stickoxidsynthase ist.

Die vorliegende Arbeit greift daher auf beide Methoden – die immunhistochemische und die enzymhistochemische – zurück, um NOS-positive Neurone im Rückenmark von Huhn und Taube zu identifizieren.

2.1.2 Lokalisation von NOS im Nervensystem und Kolokalisation mit anderen Neurotransmittern

Es existieren mittlerweile eine Vielzahl von Untersuchungen über die Verteilung von NOS und damit Stickoxid (NO) im Nervensystem verschiedener Gattungen. Bezogen sich diese Arbeiten zunächst vor allen Dingen auf einzelne Teilgebiete des Gehirns v.a. der Ratte, so weiteten sie sich zunehmend auch auf das Rückenmark sowie das periphere Nervensystem aus.

Detaillierte Untersuchungen zur Lokalisation von NADPH Diaphorase bzw. NOS im Zentralen Nervensystem (ZNS) existieren für Säugetiere (Katze: (Mizukawa *et al.*, 1989); Ratte: (Vincent & Kimura, 1992; Rodrigo *et al.*, 1994); Mensch: (Egberongbe *et al.*, 1994)), Vögel (Huhn: (Brüning, 1993); Wachtel: (Panzica *et al.*, 1994)), Reptilien (Eidechse: (Luebke *et al.*, 1992); (Smeets *et al.*, 1997); Schildkröte: (Brüning *et al.*, 1994)), Amphibien (Frosch: (Brüning & Mayer, 1996a; Munoz *et al.*, 1996); Molch: (Gonzalez *et al.*, 1996)), Fische ((Holmqvist *et al.*, 1994; Arevalo *et al.*, 1995; Brüning *et al.*, 1995; Villani & Guarnieri, 1995; Holmqvist *et al.*, 2000)) und das Neunauge (Schober *et al.*, 1994). Danach scheint NADPH Diaphorase bzw. NOS bei allen Spezies prinzipiell in allen Teilen des Nervensystems vorzukommen.

Die Verteilung der NADPH Diaphorase/NOS-enhaltenden Neurone innerhalb des ZNS der verschiedenen Spezies ergab ein sehr differenziertes und vollkommen neuartiges Verteilungsmuster. In den unterschiedlichen Hirngebieten fanden sich Kolokalisationen mit verschiedenen Neurotransmittern. So scheint NADPH Diaphorase/NOS in Neuronen exprimiert zu werden, die Neurotransmitter wie Acetylcholin und/oder Galanin (Vincent *et al.*, 1986a; Pasqualotto & Vincent, 1991; Kitchener & Diamond, 1993; Smeets *et al.*, 1997), Neuropeptide wie Neuropeptid Y, Somatostatin und/oder Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) (Vincent *et al.*, 1983a; Vincent, 1984; Vincent, 1986; Scott *et al.*, 1987; Gonzalez *et al.*, 2003; Kowianski *et al.*, 2004; Jinno & Kosaka, 2004) sowie Substanz P, Corticotropin releasing factor (CRP) oder Bombesin (Vincent *et al.*, 1986a) enthalten. Weiterhin ist NOS offenbar auch teilweise mit γ -Aminobuttersäure (GABA) (Valtschanoff *et al.*, 1993; Seidel & Bicker, 1997; Soares-Mota *et al.*, 2001; Jinno & Kosaka, 2002), Enkephalinen (Roberts & Difiglia, 1988), Vasopressin und Oxytozin (Sanchez *et al.*, 1994), Calcium-bindenden Proteinen (Gonzalez-Albo *et al.*, 2001; Kowianski *et al.*, 2004; Czeh *et al.*, 2005; Morona *et*

al., 2006) oder Monoaminen (Munoz *et al.*, 1996; Panzica *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2005) kolokalisiert.

Etliche Arbeiten befassten sich spezifisch mit dem Rückenmark und der Lokalisation von NADPH Diaphorase (Anderson, 1992; Blottner & Baumgarten, 1992; Brüning, 1992; Valtschanoff *et al.*, 1992a; Spike *et al.*, 1993; Vizzard *et al.*, 1994a; Radmilovich *et al.*, 1997; Vizzard *et al.*, 1997; Marsala *et al.*, 1998; Marsala *et al.*, 1999) bzw. NOS-Immunreaktivität (Dun *et al.*, 1992; Valtschanoff *et al.*, 1992b; Dun *et al.*, 1993; Terenghi *et al.*, 1993; Egberongbe *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1994; Vizzard *et al.*, 1994b; Doone *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2000) in spinalen Neuronen. Dabei zeigten sich für alle Spezies NADPH Diaphorase/NOS-positive Zellen über das gesamte Rückenmark verteilt. Auch Spinalganglienzellen wurden auf ihren Gehalt an NADPH Diaphorase- bzw. NOS-Immunreaktivität hin untersucht (Aimi *et al.*, 1991; Vizzard *et al.*, 1993a; Vizzard *et al.*, 1994a; Zhou *et al.*, 1998). Für alle untersuchten Säugetiere konnten markierte Spinalganglienneurone nachgewiesen werden.

Das Verteilungsmuster der NADPH Diaphorase/NOS-positiven Neurone im Rückenmark scheint von Spezies zu Spezies verschieden zu sein. Teilweise existieren auch Widersprüche in Ergebnissen, die durch unterschiedliche Methoden erzielt wurden. Es gibt jedoch auch wiederkehrende Muster. Bei den Säugetieren wurde der größte Anteil der markierten Neurone stets im oberflächlichen Hinterhorn und in den autonomen Kerngebieten entdeckt. Es wurden auch wiederholt positive Fasern im Lissauerschen Trakt – dem Fasciculus dorsolateralis – nachgewiesen (Dun *et al.*, 1993; Vizzard *et al.*, 1994a; Vizzard *et al.*, 1994b; Vizzard *et al.*, 1997; Marsala *et al.*, 1999). Die Verteilung der NADPH Diaphorase/NOS-positiven Neurone schien auch immer wieder Kolokalisation mit den cholinergen Neuronen der autonomen Zellgruppen des Rückenmarkes aufzuweisen (Anderson, 1992; Blottner & Baumgarten, 1992; Dun *et al.*, 1992; Spike *et al.*, 1993; Wetts & Vaughn, 1994; Vizzard *et al.*, 1994b; Kluchova *et al.*, 2000). Im Rückenmark ist NOS als Kotransmitter von GABA im Hinterhorn (Valtschanoff *et al.*, 1992b), in der Substantia intermedia und der Lamina X sowie von Glyzin bekannt (Spike *et al.*, 1993). Nach Aussagen fast aller Arbeiten kommt NOS unter physiologischen Bedingungen nicht in Motoneuronen vor.

Die Erkenntnisse führten zur Hypothese, dass NOS im Rückenmark von Säugetieren an somatosensorischen Prozessen und autonomer Transmission beteiligt ist. Weitere pharmakologische Studien ließen schon recht früh den Schluss zu, dass die Produktion von NO im Rückenmark an Mechanismen mitwirkt, die Einfluss auf Opiod-Rezeptoren nehmen

und somit Nozizeption, zentrale Sensibilisierung und Hyperanalgesie vermitteln (Meller *et al.*, 1992; Meller & Gebhart, 1993; Riedel & Neeck, 2001).

2.2 Acetylcholin

Acetylcholin war das erste Molekül, dessen Funktion als Neurotransmitter bereits vor mehr als einem halben Jahrhundert durch die bahnbrechenden Arbeiten von Otto Loewi und Henry Dale identifiziert wurde. Acetylcholin fungiert als Neurotransmitter an allen präganglionären vegetativen Nervenendigungen, an allen parasympathischen und einigen postganglionären sympathischen Nervenendigungen sowie bei der neuromuskulären Übertragung und an etlichen Synapsen des ZNS. Es wird in den Neuronen bzw. Nervenendigungen durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert und in Vesikeln gespeichert, die sich exozytotisch in den synaptischen Spalt entleeren. An den nikotinischen Rezeptoren der postsynaptischen Membran der Skelettmuskelfasern entfaltet es seine Wirkung durch Öffnung eines Kationenkanals und nachfolgendem Na^+ -Einstrom. Die postganglionäre Übertragung im autonomen Nervensystem erfolgt über metabotrope muskarinische Rezeptoren. Im ZNS wirkt Acetylcholin sowohl über ionotrope als auch metabotrope Rezeptoren. Im synaptischen Spalt wird Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase zu Cholin und Acetat hydrolysiert. Cholin unterliegt einer Wiederaufnahme in die Nervenendigung.

Den cholinergen Systemen des Zentralnervensystems wird eine Beteiligung an verschiedenen elementaren Hirnfunktionen zugeschrieben - dazu gehören: Lernen, Gedächtnis, Arousal, Schlaf und Bewegungen (Oda, 1999; Oda & Nakanishi, 2000).

In den letzten Jahren erhielten Studien zum zerebralen Acetylcholin wieder erhöhte Aufmerksamkeit, da Störungen im Gleichgewicht dieses Neurotransmitters eine große Rolle bei diversen Pathologien des Zentralnervensystems zu spielen scheinen. Dazu gehören die Demenz vom Typ Alzheimer, die Chorea Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose, die Demenz beim Morbus Parkinson, Poliomyelitis und eventuell auch Epilepsie, Dystonie, das Guillain-Barré-Syndrom, Schizophrenie und der plötzliche Kindstod (Mizukawa *et al.*, 1986; Oda, 1999).

2.2.1 Nachweismethodik für cholinerge Neurone in Gewebeschnitten

Trotz der frühzeitigen Entdeckung von Acetylcholin als Neurotransmitter fehlten lange Zeit Erkenntnisse über die Morphologie und Lokalisation zentraler cholinergischer Neurone, da keine Verfahren existierten, Acetylcholin *in situ* nachzuweisen. Im Gegensatz dazu konnten schon viel früher Catecholamin- oder Indolamin-produzierende Neurone durch Formaldehyd induzierte Fluoreszenz visualisiert werden, obwohl ihre Transmitter zu den sehr viel später entdeckten gehören. Man musste statt dessen auf andere Methoden zurückgreifen, um cholinerge Neurone zu markieren (Fibiger, 1982). Der erste Versuch bestand in einem histochemischen Verfahren zum Nachweis von Acetylcholinesterase (AChE), dem Transmitter-abbauenden Enzym. Es wurde zuerst von Koelle und Friedenwald (1949) beschrieben und etablierte sich als häufig angewandte Routinemethode, an deren Spezifität jedoch Zweifel aufkamen (Fibiger, 1982). Trotz allem steht fest, dass durch die AChE-Methode die ersten großen Fortschritte zum Verständnis cholinergischer Systeme erzielt wurden. Vor allen Dingen die Arbeiten von Shute und Lewis (1967) über die aufsteigenden cholinergen retikulären Bahnen sind in diesem Zusammenhang hervorzuheben.

Eine andere Methode, cholinerge Neurone sichtbar zu machen, besteht im Nachweis des Transmitter-synthetisierenden Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT), das als spezifisch für cholinerge Neurone angesehen werden kann. Die Technik beruht auf der Immunzytochemie, der Reaktion von im Gewebe fixierter ChAT mit einem für dieses Protein spezifischen Antikörper (McGeer *et al.*, 1974; Kan *et al.*, 1978). Mittlerweile hat sich dieses Enzym als ein zuverlässiger Marker für cholinerge Neurone behauptet. Die anfänglichen Methoden, das Protein darzustellen, erwiesen sich aber als unzuverlässig – es kamen Diskussionen über die Reinheit der ChAT-Aufbereitungen und über die Monospezifität der produzierten Antiseren auf (Fibiger, 1982). Die Schwierigkeiten beruhten darauf, dass ChAT nur in geringen Konzentrationen vorliegt und nur mühsam zu reinigen ist. Es ist außerdem offenbar ein recht schwaches Immunogen und produziert größtenteils heterogene Immunantworten (Levey *et al.*, 1981). Nach und nach gelang es jedoch, verlässliche monoklonale Antikörper gegen ChAT hauptsächlich aus dem Gehirn von Säugetieren herzustellen (Levey *et al.*, 1981; Crawford *et al.*, 1982; Eckenstein & Thoenen, 1982; Ichikawa *et al.*, 1983; Levey *et al.*, 1983; Nagai *et al.*, 1983). Nicht immer waren die jeweiligen Antikörper tauglich für die Untersuchung anderer Spezies. So gelang es erst Johnson und Epstein (1986), spezifische, für die

immunhistochemische Lokalisation der Cholinacetyltransferase im ZNS des Huhnes geeignete Antikörper zu produzieren.

Vergleichende Untersuchungen zur Markierung sowohl von ChAT als auch AChE kamen zu dem Ergebnis, dass etliche zentrale AChE-positive Neurone keine ChAT enthielten und somit höchstwahrscheinlich auch keine cholinergen Neurone sein konnten. Dies gilt z.B. für die Dopamin-enthaltenden Projektionsbahnen des Striatums, die eindeutig AChE-positiv sind (Butcher *et al.*, 1975; Lehmann & Fibiger, 1978). Nachweis von AChE alleine scheint also kein sicherer Hinweis auf cholinerge Neurone zu sein. Dies trifft auch auf die Weiterentwicklung der Methode zu: die Vorinkubation des Materials mit AchE-Inhibitoren, um die Neurone nach ihrer Rate an de-novo-Synthese von AChE zu differenzieren. AChE ist schlichtweg in zu vielen nicht-cholinergen Neuronen sowie verschiedenen nicht-neuronalen intra- und extrazellulären Strukturen vorhanden, um ein spezifisches Kriterium für die Identifizierung von cholinergen Neuronen darzustellen (Eckenstein & Sofroniew, 1983; Levey *et al.*, 1983).

Mit der Weiterentwicklung der Molekularbiologie gab es Versuche, die bestehenden Ergebnisse zur Lokalisation cholinergischer Neurone zu verifizieren und gegebenenfalls zu verbessern. Es wurden Methoden der *in situ* mRNA Hybridisierung eingeführt, die sich als größtenteils kongruent mit den bisher durch immunhistochemische Techniken erhaltenen Ergebnissen erwiesen (Oh *et al.*, 1992; Lauterborn *et al.*, 1993; Kasashima *et al.*, 1998).

2.2.2 Lokalisation cholinergischer Strukturen im zentralen Nervensystem

Es existieren mittlerweile für eine ganze Reihe von Spezies relativ umfassende Untersuchungen über die Lokalisation von cholinergen Neuronen im Gehirn, die auf dem Nachweis von Cholinacetyltransferase beruhen (Ratte: (Kimura *et al.*, 1980; Houser *et al.*, 1983); Meerschweinchen: (Kimura *et al.*, 1980); Katze: (Kimura *et al.*, 1981); Primat: (Mesulam *et al.*, 1984); Huhn: (Sorenson *et al.*, 1989); (von Bartheld & Bothwell, 1992); Taube: (Medina & Reiner, 1994); Eidechse: (Medina *et al.*, 1993)). Auch für das Rückenmark verschiedener Säugetierarten sind mit der immunhistochemischen Technik Ergebnisse gewonnen worden (Kaninchen: (McGeer *et al.*, 1974), (Kan *et al.*, 1978); Mensch: (Aquilonius *et al.*, 1981); Katze: (Kimura *et al.*, 1981); Ratte: (Barber *et al.*, 1984; Borges & Iversen, 1986).

Die Untersuchungen zeigen, dass etliche Gemeinsamkeiten für die cholinergen Systeme im ZNS verschiedener Spezies existieren. So wurden fünf Gruppen von Neuronen gefunden, die den Hauptteil der cholinergen Neurone ausmachen. Es handelt sich um: 1. die Kerngebiete der efferenten Hirnnerven und die Motoneurone des Rückenmarkes, 2. den parabrachialen Komplex, 3. den Komplex der retikulären Formation des Hirnstammes, 4. den Komplex des Neostriatums und 5. den Komplex des basalen Vorderhirns (Mesulam *et al.*, 1983;McGeer *et al.*, 1984;Semba & Fibiger, 1989). Weiterhin wurde ChAT-Immunoreaktivität für Neurone des adulten Hippocampus und des Neocortex nachgewiesen (Barber *et al.*, 1984). Gerade die neokortikale Lokalisation war zunächst umstritten, da widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden (Fibiger, 1982; Sofroniew *et al.*, 1982; Armstrong *et al.*, 1983). Mittlerweile sind die Befunde jedoch weithin akzeptiert (Houser *et al.*, 1985; Ichikawa & Hirata, 1986).

Im Rückenmark sind es vor allen Dingen zwei Neuronengruppen, von denen schon seit langem bekannt ist, dass sie Acetylcholin als Transmitter nutzen: die somatischen Motoneurone und die präganglionären autonomen Neurone. Dieses Wissen geht zurück auf Untersuchungen von Feldberg und Gaddum (1934), die zeigen konnten, dass nach Stimulation peripherer Axone der präganglionären sympathischen Neurone thorakaler Segmente die Freisetzung von Acetylcholin im oberen Zervikalganglion erfolgte. Aus Arbeiten der Arbeitsgruppe um Dale und Feldberg ging hervor, dass eine Stimulation von spinalen motorischen Nerven die Freisetzung von Acetylcholin an motorischen Endplatten und eine entsprechende Muskelkontraktion nach sich zog (Dale *et al.*, 1936).

Diese Arbeiten konnten mit den immunhistochemischen Methoden bestätigt werden – die Motoneurone sowie die präganglionären autonomen Neurone stellen sich nach Markierung als ChAT-positiv dar (Barber *et al.*, 1984). Darüber hinaus konnten im Rückenmark der adulten Ratte ChAT-reaktive „partition cells“ – eine Gruppe von Neuronen in der Substantia intermedia, deren Lokalisation die Grenze zwischen Hinter- und Vorderhorn markiert – sowie ChAT-positive Neurone in der Umgebung des Zentralkanales und in den Laminae III–V des Hinterhornes nachgewiesen werden (Phelps *et al.*, 1984).

Auch die Kolokalisation von ChAT mit verschiedenen Neurotransmittern ist untersucht worden. Häufig ist ChAT mit einem Neuropeptid kolokalisiert. Dies gilt im zerebralen Kortex für VIP, für Enkephaline in den olivochleären Efferenzen und präganglionären spinalen Neuronen, CGRP in den Kerngebieten der motorischen Hirnnerven und Substanz P im retikulären System (Vincent *et al.*, 1983b). Auch für die Kolokalisation mit Corticotropin

releasing factor (CRF) und Bombesin/Gastrin gibt es Belege (Cuello & Sofroniew, 1984; Vincent *et al.*, 1986b).

Einige Untersuchungen weisen auch auf Kolokalisation von NOS und ChAT im Rückenmark von Säugern hin. Dies betrifft vor allem die präganglionären autonomen Neurone, wo NOS-enthaltende Zellen als eine Subpopulation dieser Kerngebiete angesehen werden (Anderson, 1992; Blottner & Baumgarten, 1992; Brüning, 1992; Spike *et al.*, 1993; Wetts & Vaughn, 1994; Vizzard *et al.*, 1994a; Vizzard *et al.*, 1997; Kluchova *et al.*, 2000).

2.2.3 Lokalisation cholinergischer Strukturen im peripheren Nervensystem

Die histochemische Lokalisation cholinergischer Neurone im peripheren Nervensystem war lange Zeit dadurch erschwert, dass keine spezifisch gegen ChAT gerichtete Antiseren erhältlich waren. Aus zunächst nicht geklärten Gründen erwiesen sich die für den Nachweis cholinergischer Neurone im ZNS erprobten Antiserum als nicht reaktiv im peripheren Nervensystem. Nach neueren Befunden könnte hierfür die Existenz von Spleißvarianten für ChAT eine ursächliche Rolle gespielt haben (Bellier & Kimura, 2011). Die Gruppe von M. Schemann entwickelte schließlich als erste Antiseren, mit denen ChAT in verschiedenen Neuronen des peripheren Nervensystems immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte (Schemann *et al.*, 1993; Sann *et al.*, 1995).

2.3 Problemstellung

Die Expression von ChAT und NOS und ihre partielle Kolokalisation ist im Rückenmark von Säugern relativ gut untersucht worden. Um beurteilen zu können, welche Aspekte des Verteilungsmusters phylogenetische Konstanten darstellen und daher vermutlich auch funktionell konserviert sind, soll die vorliegende Arbeit die Kenntnisse über cholinerge und NO-bildende Neurone auf das Rückenmark einer weiteren großen Wirbeltierklasse, der Vögel, ausdehnen.

Die Verteilung von ChAT im Rückenmark von Vögeln wurde eher cursorisch (Bogan *et al.*, 1989), jedoch bislang offenbar in keiner umfassenden Darstellung beschrieben. Was NOS betrifft, war zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit die aus unserer Arbeitsgruppe stammende Dissertation von U. Funk die einzige, die einen Überblick über die Verteilung NOS-immunreaktiver und NADPH Diaphorase-positiver Strukturen im Rückenmark des Huhnes lieferte (Funk, 1997).

Es soll in dieser Arbeit sowohl das Rückenmark des Huhnes, *Gallus domesticus*, als auch der Taube, *Columba livia*, in seiner Gesamtheit – also alle Segmente umfassend – auf die Lokalisation von Stickoxidsynthase (NOS) und Cholinacetyltransferase (ChAT) hin untersucht werden. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Kolokalisation der beiden Neurotransmitter gerichtet werden.

Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, sollen außerdem in den Spinalganglien der einzelnen Segmente das Vorkommen und die Lokalisation von NOS- und/oder ChAT-enthaltenden Zellen dokumentiert werden. Dadurch sollen auch Aufschlüsse über Projektionen in das Hinterhorn erhalten werden.

Um einen Überblick über die Entwicklung von cholinergen und NO-bildenden Neuronen zu gewinnen, sollen einige embryonale Hühner verschiedener Altersstufen präpariert und das Rückenmark immun- und enzymhistochemisch untersucht werden.

Die Ergebnisse werden diskutiert unter besonderer Berücksichtigung der – unabhängig von der vorliegenden Arbeit – in anderen Laboren erzielten und publizierten Daten (Atoji *et al.*, 2001; Kluchova *et al.*, 2001; Milinski & Necker, 2001; Necker, 2004; Necker, 2005).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Es wurden Rückenmark und Spinalganglien von adulten und embryonalen Haushühnern sowie adulten Tauben untersucht.

Die 13 adulten weiblichen Haushühner, *Gallus domesticus*, stammten von einer lokalen Hühnerfarm. Die 11 embryonalen Haushühner wurden vom Institut für Geflügelkrankheiten des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um bebrütete Eier in verschiedenen Stadien – 3mal E8, 1mal E9, 2mal E11, 1mal E13, 1mal E15, 2mal E18 und 1mal E20. Die 4 adulten Tauben, *Columba livia*, wurden uns freundlicherweise von einem örtlichen Taubenzüchter überlassen.

Die adulten Vögel wurden durch eine intraperitoneale Injektion einer Überdosis Pentobarbital-Natrium getötet. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und die Tiere transkardial mit einer eiskalten Lösung aus 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumphosphat bei pH 7,4 perfundiert.

Nach Abschluss der Perfusion wurde das Rückenmark so weit als möglich mit Spinalganglien heraus präpariert und je nach Tier – und somit Größe des Präparates – als einzelne Segmente oder als Block in einer 20% Saccharose-Lösung mindestens 12 Stunden aufbewahrt, um Schäden bei der darauffolgenden Gefrierpräparation zu vermeiden. In den unteren Anteilen des Rückenmarkes von Huhn und Taube wurde ein Präparieren der einzelnen Segmente aufgrund der Feinheit der Strukturen zunehmend schwieriger, so dass Abschnitte des Lumbosakralmarks häufig in Blöcken von mehreren Segmenten weiterverarbeitet wurden – auch um stärkere Schädigung des Gewebes zu verhindern. Die höheren Segmente wurden jeweils einzeln geschnitten und auch einzeln untersucht.

Die embryonalen Hühner wurden bis zum Alter von einschließlich 11 Tagen im Ganzen eingelegt und danach aufgefroren, da eine Präparation des Rückenmarkes technisch fast unmöglich gewesen wäre. Ab dem Alter E12 wurden Rückenmarksstrukturen präpariert und in Blöcken nach Einteilung in zervikale, thorakale und lumbale Anteile weiterverarbeitet.

3.2 Schnitte

Nachdem die Präparate mindestens über Nacht bei 4°C in der Saccharose-Lösung zwischengelagert gewesen waren, wurden sie in dem Einbettungsmedium „Tissue-Tek“ (Fa. Miles) schnell eingefroren.

Die einzelnen Rückenmarkssegmente der Hühner und Tauben wurden am beweglichen Gefrierschneidegerät „Frigomobil“ (Fa. Reichert-Jung) mit einer Dicke von 20, 30, 40 oder 60 µm transversal geschnitten. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel von dem Messer entfernt und in Vertiefungen von Zellkulturschalen eingebracht, die mit Inkubationspuffer (PBS) gefüllt waren. So wurde mit den Abschnitten der Segmente verfahren, an denen sich keine Abgangsstellen von Spinalnerven befanden.

Von den Anteilen der Segmente, an denen sich die Spinalnervenabgänge befanden, wurden im Block am Kryostaten (Fa. Reichert-Jung) Serienschnitte von 20µm Dicke mit C-Messern angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und eingefroren. Die Objektträger waren vorher mit einer Lösung aus 20% poly-L-Lysin beschichtet und im Trockenschrank bei 37°C getrocknet worden, um eine bessere Haftung der Schnitte zu erreichen.

3.3 Inkubation

Vor der eigentlichen Inkubation mit Antikörperlösung wurden die Schnitte im Inkubationspuffer PBS bestehend aus 100 mM Natriumphosphat (pH 7,4) und 0,9% NaCl vorinkubiert. Dem Ganzen war noch ein Detergenz – 0,3% Triton X-100 – beigelegt worden (als „PBST“ bezeichnet), um anschließend eine bessere Diffusion des Antikörpers in die Schnitte zu gewährleisten. Schnitte, die für Markierung durch die Peroxidase-Reaktion vorgesehen waren, wurden zusätzlich 15 Minuten mit 0,5% H₂O₂ in PBS vorinkubiert und anschließend einmal gewaschen. Schnitte, die am Frigomobil angefertigt worden waren, befanden sich bereits zur Aufbewahrung in PBS, die Schnitte auf Objektträgern wurden nach dem Auftauen mit einem Fettstift (DAKO PEN) umrandet, um in späteren Arbeitsgängen das Abfließen von Antikörperlösung von den Objektträgern zu vermeiden, und 30 Minuten in PBS vorinkubiert.

Das gegen Stickoxidsynthase gerichtete Antiserum wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Bernd Mayer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich. Das Antiserum wurde aus Kaninchen gewonnen, das Enzym stammte von der Ratte.

Das für den Nachweis von ChAT im Rückenmark verwendete Antiserum wurde von Dr. Miles Epstein, University of Wisconsin (Johnson & Epstein, 1986) zur Verfügung gestellt. Es wurde ebenfalls aus Kaninchen gewonnen.

Das für den Nachweis von ChAT im peripheren Nervensystem – und somit auch in den Spinalganglien – zu benutzende, gegen Cholinacetyltransferase gerichtete Antiserum wurde von Dr. Michael Schemann, Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Auch bei diesem Antiserum erfolgte die Gewinnung aus Kaninchen (Schemann *et al.*, 1993).

Die Antiseren waren gefriergetrocknet verschickt und aufbewahrt worden und wurden durch die Zugabe entsprechender Menge destillierten Wassers rekonstruiert. Anschließend wurde das Antiserum mit PBS bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Zumeist wurde die Konzentration 1:1000 gewählt; Versuche mit höheren Verdünnungen von 1:2500, 1:5000 und 1:10000 ergaben ein schlechteres Ergebnis.

Zur Inkubation mit Antikörper wurde für die Schnitte in den Zellkulturschalen die Pufferlösung mit einer Pipette aus den Vertiefungen abgezogen und durch Antikörperlösung ersetzt. Anschließend wurden die Schalen in eine feuchte Kammer gebracht. Die Schnitte auf Objektträgern wurden aus der PBS-Lösung in eine feuchte Kammer transferiert und nach dem kurzen Antrocknen einzeln mit Antikörperlösung beträufelt. Die Inkubationszeit betrug 24 bis 36 Stunden bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit Antikörperlösung wurden die Schnitte dreimal jeweils 20 Minuten mit PBS ohne Triton gewaschen.

Die weitere Bearbeitung unterschied sich je nachdem, ob eine Fluoreszenz- oder eine Peroxidasemarkierung gewählt wurde. Zur Kontrolle wurden benachbarte Schnitte mitprozessiert, die nur in Puffer statt in Antiserum inkubiert wurden.

3.3.1 Fluoreszenzmarkierung

Für die Fluoreszenzmarkierung wurden die Schnitte nach dem Waschen für zwei Stunden in einer Lösung inkubiert, die einen aus Ziege gewonnenen und gegen Kaninchen-

Immunglobulin gerichteten Antikörper enthielt, der mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cyanin 3 beladen war (Anti Rabbit Cy-3, Fa. Jackson, USA). Dieser zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 (in PBS) eingesetzt.

Nach dieser zweiten Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal 20 Minuten in PBS gewaschen. Diejenigen Schnitte, die sich bis dahin frei flotierend in den Zellkulturschalen befanden, wurden anschließend mit Hilfe eines Pinsels auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet. Die bereits auf Objektträgern befindlichen Schnitte waren fertig zur Auswertung.

3.3.2 Peroxidasemarkierung

Die Peroxidasemarkierung wurde nach der Avidin-Biotin-Komplex Methode mit dem ABC-Elite Kit von Vector durchgeführt.

Dazu wurden die Schnitte nach dem Waschen mit einer PBST-Lösung, die einen gegen Kaninchen-Gewebe gerichteten biotinylierten Antikörper in der Konzentration 1:200 enthielt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Spülung, danach die Inkubation mit dem Avidin-Komplex 1:50 mit PBST verdünnt für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden erneut gewaschen – zweimal mit PBST, das dritte Waschen erfolgte als Vorbereitung auf die darauffolgende DAB-Reaktion mit Natriumacetat-Puffer (0,175 M, pH 7,2).

Zur Sichtbarmachung der immunhistochemisch markierten Strukturen wurde die Diaminobenzidin(DAB)-Reaktion mit Nickelsulfat-Verstärkung durchgeführt. Die vorgefertigten DAB-Tabletten von 10 mg (Kem-En-Tec, Kopenhagen) wurden zusammen mit 1,25 g NiSO₄ (FluKa) in 50 ml 0,175 M Natriumacetat-Puffer gelöst. Kurz vor der Reaktion wurden noch 4,2 µl 30%iges H₂O₂ hinzugefügt. Die DAB-Lösung wurde auf die Schnitte gegeben, die Reaktion wurde unter mikroskopischer Kontrolle nach 2 bis 10 Minuten beendet, indem die DAB-Lösung abgegossen wurde.

Die Schnitte wurden, soweit dies noch nicht geschehen war, auf beschichtete Objektträger aufgezogen, in der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und unter Zuhilfenahme von Entellan (Merck, Darmstadt) mit Deckgläsern versehen. Somit waren sie bereit für die Auswertung.

3.4 NADPH Diaphorase-Reaktion

Für die Untersuchung von Kolo-kalisation und auch als alleinige Methode zur Lokalisation von NOS wurde auch die NADPH Diaphorase-Reaktion als Nachweismethode gewählt (Hope *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1991a).

Für die Kolo-kalisationsexperimente wurde diese Methode nach der Inkubation mit ChAT-Antikörperlösung und Anti Rabbit Cy-3 und der vollständigen Auswertung der Schnitte durchgeführt.

Für die Reaktion wurde ein Natriumphosphatpuffer – 100 mM, pH 7,4, mit einem Zusatz von 0,3% Triton X-100 – angesetzt. In dem Puffer wurden 1 mg/ml NADPH (Biomol, Hamburg) und 0,1 mg/ml Nitroblau Tetrazolium (Serva, Heidelberg) aufgelöst. Diese Lösung wurde auf die Schnitte aufgebracht, die sich in einer feuchten Kammer befanden.

Die Inkubation dauerte ein bis drei Stunden und erfolgte in der feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C. Zur Weiterverarbeitung beziehungsweise Auswertung wurden die Schnitte anschließend noch einmal in PBS gewaschen.

Schnitte, die nicht für Kolo-kalisationsexperimente bestimmt und somit noch nicht immunzytochemisch vorbehandelt waren, wurden entwässert und eingedeckt (s.o.). Bei Schnitten, die vorher Fluoreszenz markiert worden waren, wurde darauf verzichtet, um die Fluoreszenzmarkierung möglichst lange zu erhalten und somit die Kolo-kalisation genauer untersuchen zu können. Sie wurden weiterhin in PBS bei 4°C aufbewahrt.

Die Ergebnisse der NADPH Diaphorase-Reaktion wurden anschließend am Mikroskop ausgewertet.

3.5 Auswertung und Dokumentation

Die Auswertung der immun- und enzymhistochemischen Methoden erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan).

Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurden von Schnitten der einzelnen Rückenmarkssegmente von Huhn und Taube, von verschiedenen Spinalganglien und den unterschiedlichen Entwicklungsstufen der embryonalen Hühner zusätzlich zu den immun-

oder enzymhistochemischen Markierungen auch Kresylviolett-färbungen angefertigt. Anhand derer wurde die Zytoarchitektur der jeweiligen Strukturen studiert.

Für die Kresylviolett-färbung wurde die Stammlösung Kresylviolett – bestehend aus 0,5 g Kresylechtviolett in 25ml aqua bidest. gelöst – im Verhältnis 1:100 mit Natriumacetatpuffer (0,175 M, pH 7,2) verdünnt. In die Färbelösung wurden die Schnitte für 10 Minuten gegeben, anschließend wurde etwa 30 Sekunden in 96%igem EtOH differenziert. Die Schnitte wurden 5 Minuten in 100%igem EtOH und Xylol entwässert und abschließend mit Deckgläsern versehen und mit Entellan eingedeckt.

Die fluoreszierenden Schnitte wurden fotografisch auf Ilford HP 5-Filmen festgehalten. Die Ergebnisse der NADPH Diaphorase Methode und der Peroxidase Reaktionen sowie die Kresylviolett-färbungen wurden mit Agfapan-Filmen fotografiert. Die Fotografien wurden nach der Entwicklung eingescannt und anschließend mit dem Bildbearbeitungs-Paket Correl Version 8.0 digital nachbearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine methodische Beobachtungen

Die einzelnen immun- und enzymhistochemischen Nachweismethoden erbrachten unterschiedliche Ergebnisse.

Der immunhistochemische Nachweis mittels der Peroxidase-Reaktion erwies sich als sehr unzuverlässig und lieferte häufig nur unspezifische Färbungen. Es wurde versucht, durch Veränderung der Bedingungen bessere Resultate zu erzielen. So wurde die Konzentration der Antikörperlösung von 1:1000 auf 1:2000, 1:5000, 1:7500 und 1:10000 verdünnt, es wurde das Fixiermittel Formaldehyd durch Glutaraldehyd ersetzt, es wurden die Präparate vor Inkubation bei -80°C eingefroren – ohne dass durch eine der Maßnahmen eine signifikante Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden konnte.

Der Nachweis mittels Immunfluoreszenz lieferte dagegen sehr gute Ergebnisse, war aber mit Nachteil versehen, dass die Schnitte bzw. die Markierungen nur begrenzte Zeit haltbar bzw. sichtbar waren.

Die NADPH Diaphorase-Methode wies einige Schwierigkeiten auf. Häufig kam es zu einem blauen Niederschlag auf dem gesamten Gewebe. Teilweise war dies auf eine zu lange Inkubationsdauer zurückzuführen, teilweise blieben die Ursachen jedoch im Dunkeln. Die mit dieser Methode dargestellten Strukturen stimmten jedoch im Wesentlichen mit denen überein, die sich mit Immunfluoreszenz als NOS-positiv dargestellt hatten. Die Möglichkeit, diese Methode als Nachweis für NOS-positive Strukturen im ZNS von Hühnern zu nutzen, stützt sich auch auf Voruntersuchungen von U. Funk (Brüning, 1993; Funk, 1997). Die Beurteilung von nur leicht durch NADPH Diaphorase gefärbten Strukturen war problematisch. Obwohl anzunehmen ist, dass die histochemische Methode auf Grund ihres enzymkatalytischen Charakters eine höhere Sensitivität als die Immunfluoreszenz besitzt, war die Spezifität dieser leichten, nur histochemisch sich darstellenden Markierungen nicht zu validieren und ist daher im Folgenden auch nicht als spezifisch für NOS aufgeführt.

4.2 Das Hühnerrückenmark

Makroskopisch wird das Hühnerrückenmark durch die Spinalnerven in makroskopisch abgrenzbare Segmente unterteilt. Es sind nach Goller (1959) 41 Segmente zu unterscheiden, die eingeteilt sind in: 15 zervikale [C1 bis C15], 7 thorakale [T1 bis T7], 14 sakrale [S1 bis S14] und 5 coccygeale [Co1 bis Co5] Segmente. An zwei Stellen sind Verbreiterungen des Rückenmarkes zu beobachten: die Intumescentia cervicalis und Intumescentia lumbosacralis. Aus diesen Bereichen entspringen die Nervenplexus, die Extremitäten versorgen. Die Intumescentia cervicalis befindet sich zwischen C12 und T1, die Intumescentia lumbosacralis zwischen S2 und S8. Des Weiteren ist im oberen Sakralmark dorsalseitig eine Spaltöffnung vorhanden. Der Sinus rhomboidalis genannte Spalt ist mit dem Glykogenkörper ausgefüllt – eine Masse Glykogen-haltiger Zellen neuralen Ursprungs (Lyser, 1973).

Am oberen Anteil des Sakralmarkes sind makroskopisch zwischen den Spinalnervenabgängen kleine Vorwölbungen der Vorderseitenstränge zu erkennen. Es handelt sich dabei um die Hofmannschen Großkerne (Nuclei majores Hofmann), eine besondere Zellgruppe außerhalb der grauen Substanz. Ähnliche Zellen in Form der Hofmannschen Kleinkerne (Nuclei minores Hofmann) sind im Zervikal- und unteren Sakralmark in der weißen Substanz der Seitenstränge zu finden (Matsushita, 1968).

Eine Übersicht ist in *Abbildung 1* dargestellt. Die Darstellung ist angelehnt an die Arbeiten von Goller (1959) sowie Brinkman und Martin (1973).

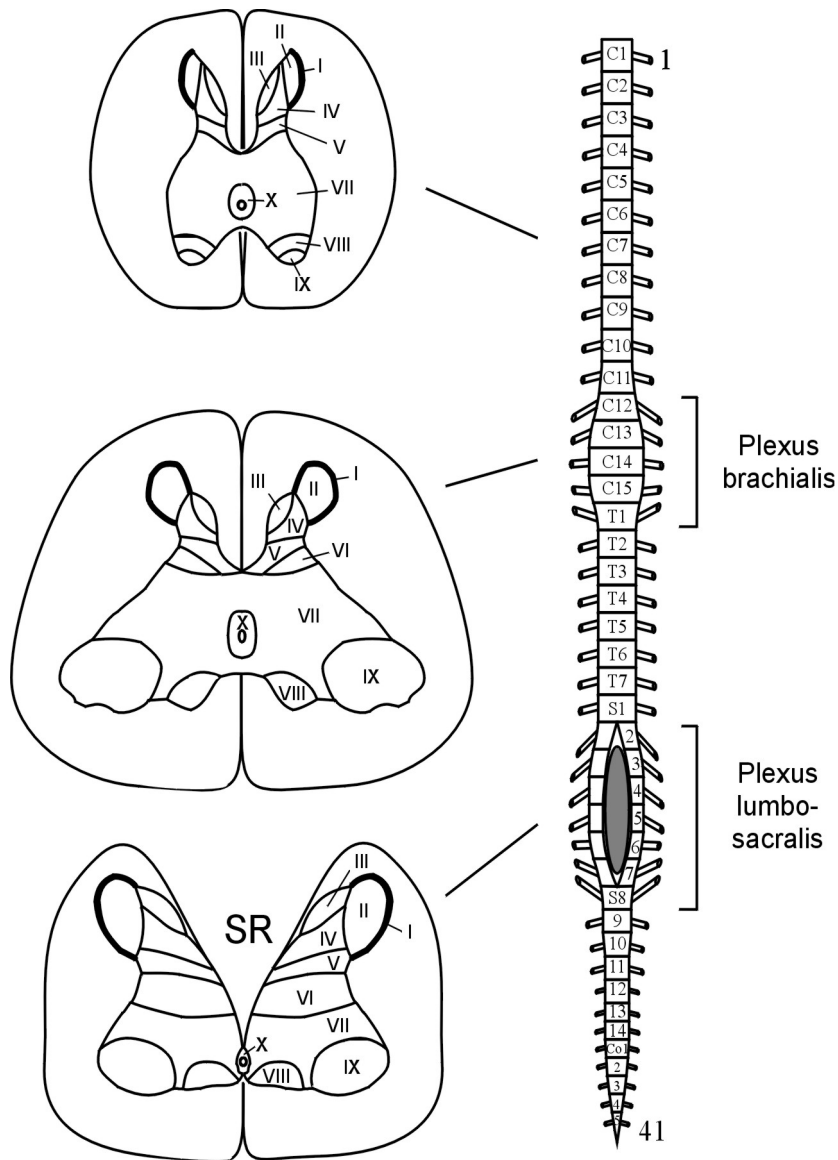


Abbildung 1: Schemazeichnung des Hühnerrückenmarkes im Längs- und Querschnitt – exemplarisch in Höhe des mittleren Zervikalmarks, des Plexus brachialis und des Plexus lumbosacralis. Dargestellt sind die Spinalnervenabgänge sowie die Lage und ungefähre Ausdehnung der Zellschichten (Laminae) I – X. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, SR: Sinus rhomboidalis.

Zur Beschreibung der Verteilung von ChAT und NOS soll hier das Hühnerrückenmark in folgende topografische Abschnitte unterteilt werden: Zervikalmark, Intumescentia cervicalis, Thorakalmark, Intumescentia lumbosacralis und Sakralmark. Insgesamt wurden in allen Segmenten sowohl ChAT- als auch NOS-positive Strukturen gefunden.

Die Zuordnung markierter Zellen zu verschiedenen Laminae orientiert sich an den Arbeiten von Martin und Brinkman zur laminären Organisation des Hühnerrückenmarkes (Martin & Brinkman, 1970; Brinkman & Martin, 1973; Martin, 1979). Dabei ist eine Besonderheit des Hühnerrückenmarkes hervorzuheben: im Bereich der Hinterhörner sind die unterschiedlichen

Zellschichten, die Laminae, nicht waagrecht sondern fast senkrecht und damit parallel zum Verlauf der Grenze zwischen grauer und weißer Substanz angeordnet.

4.2.1 Die Verteilung von NOS im Hühnerrückenmark

Die Arbeit von U. Funk gibt zu diesem Thema bereits einen Überblick (Funk, 1997), auf den sich die hier vorliegende Arbeit stützt. Es soll hier jedoch darüber hinaus eine detailliertere Beschreibung der Verteilung von NOS im Rückenmark von *Gallus domesticus* erfolgen.

Das obere Zervikalmark:

In den oberen Zervikalsegmenten des Hühnerrückenmarkes finden sich im Hinterhorn viele NOS-markierte Fasern und kleine runde Zellen in den Laminae I und – ganz besonders – II (s. *Abb. 2C*).

Des Weiteren sind an der Basis des Hinterhornes in der Lamina V NOS-positive Neurone sichtbar. Sie liegen vor allem an der Grenze zum dorsalen Funikulus. Es handelt sich dabei um etwas größere polygonale oder fusiforme Zellen (s. *Abb. 2B*).

In der Lamina VII oder auch Substantia intermedia sind vereinzelt Interneurone zu finden, die NOS-markiert sind. Die Mehrzahl davon sind kleine runde oder ovale Neurone, die im Zentrum der weißen Substanz zu finden sind, ober- und unterhalb des Zentralkanales und entlang der Mittellinie. Einzelne Zellen liegen auch exzentrisch an den Grenzen zu den lateralen Funiculi. Teilweise sind die Faserausläufer dieser Neurone ebenfalls stark NOS-positiv und somit deutlich zu erkennen (s. *Abb. 2A*).

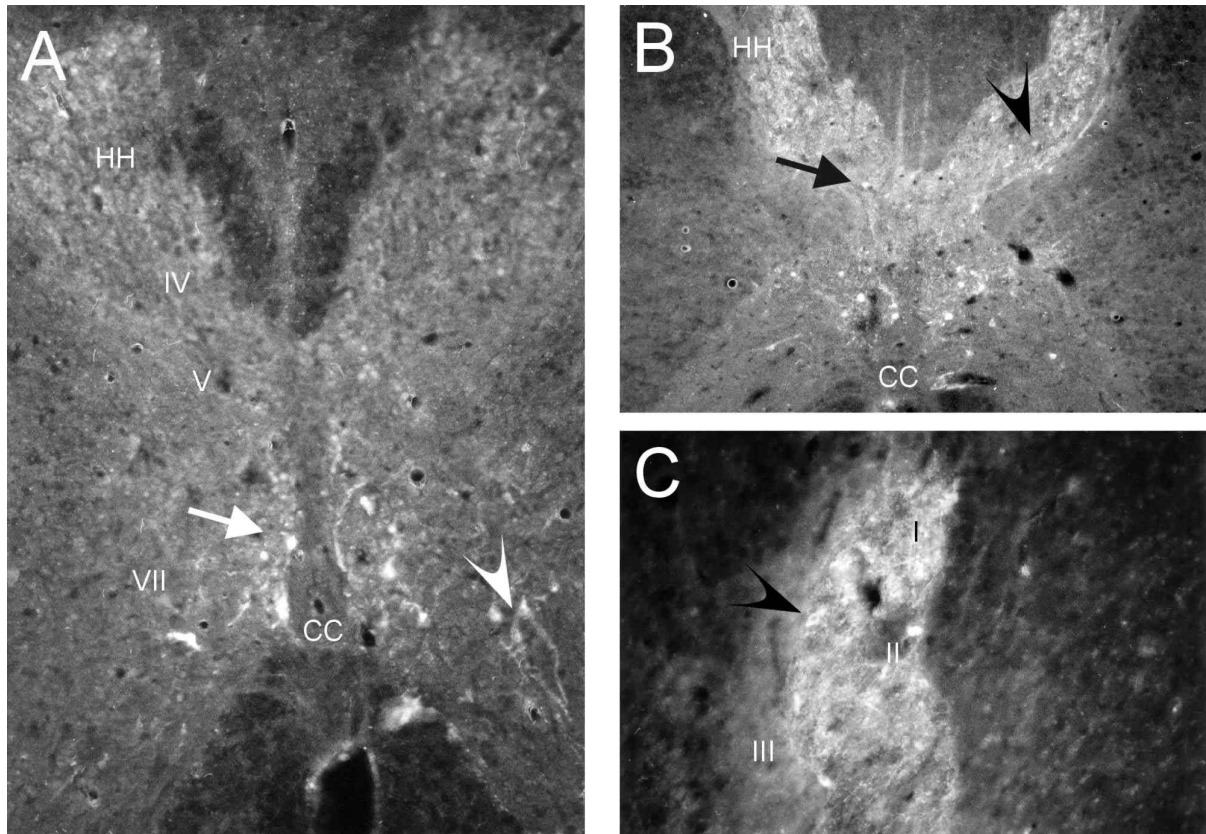


Abbildung 2: A: Segment C2 – Interneurone um den Zentralkanal herum (Pfeil) und exzentrisch in Lamina VII gelegen mit markierten Axonen (Pfeilspitze). B: Segment C3 – NOS-positive Neurone in Lamina V an der Basis der Hinterhörner (Pfeil) und im Hinterhorn, Lamina IV (Pfeilspitze). C: Segment C5 – Typische Verteilung von NOS im Hinterhorn mit markierten Zellkörpern in Lamina II sowie dichtem Faserplexus in Lamina I und II. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn

In einigen wenigen Schnitten aus Segmenten des Zervikalmarkes sieht man NOS-positive Neurone, die zwischen den Motoneuronen des Vorderhornes liegen. Diese stellen sich als mittelgroße fusiforme Zellen dar (s. Abb. 3A und 3B).

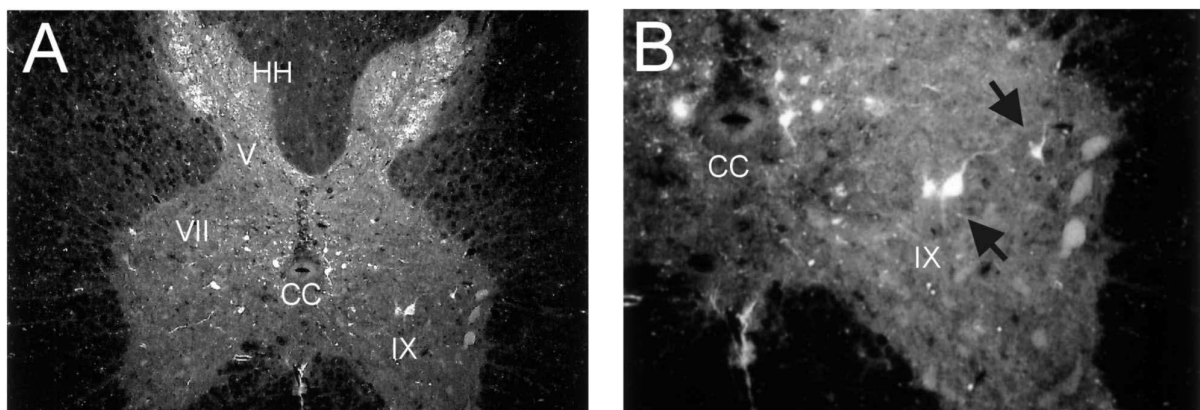


Abbildung 3: A und B (Ausschnittsvergrößerung): Segment C11 – NOS-positive Neurone (Pfeile) im Bereich der Vorderhörner zwischen den Motoneuronen. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn

Die Intumescentia cervicalis:

Das Bild der Hinterhörner in den Segmenten der Intumescentia cervicalis unterscheidet sich unwesentlich von den höheren Zervikalsegmenten. Sichtbar sind kleine runde bis ovale NOS-positive Neurone in der Lamina II, die von einem dichten Fasergeflecht umgeben sind. In Lamina I sind vor allen Dingen Fasern zu erkennen, die NOS-markiert sind. Die Basis der Hinterhörner (Lamina V) dieser Region ist relativ frei von NOS-positiven Neuronen, es ziehen jedoch markierte Fasern durch die hintere Kommissur (s. Abb. 4A und 4C).

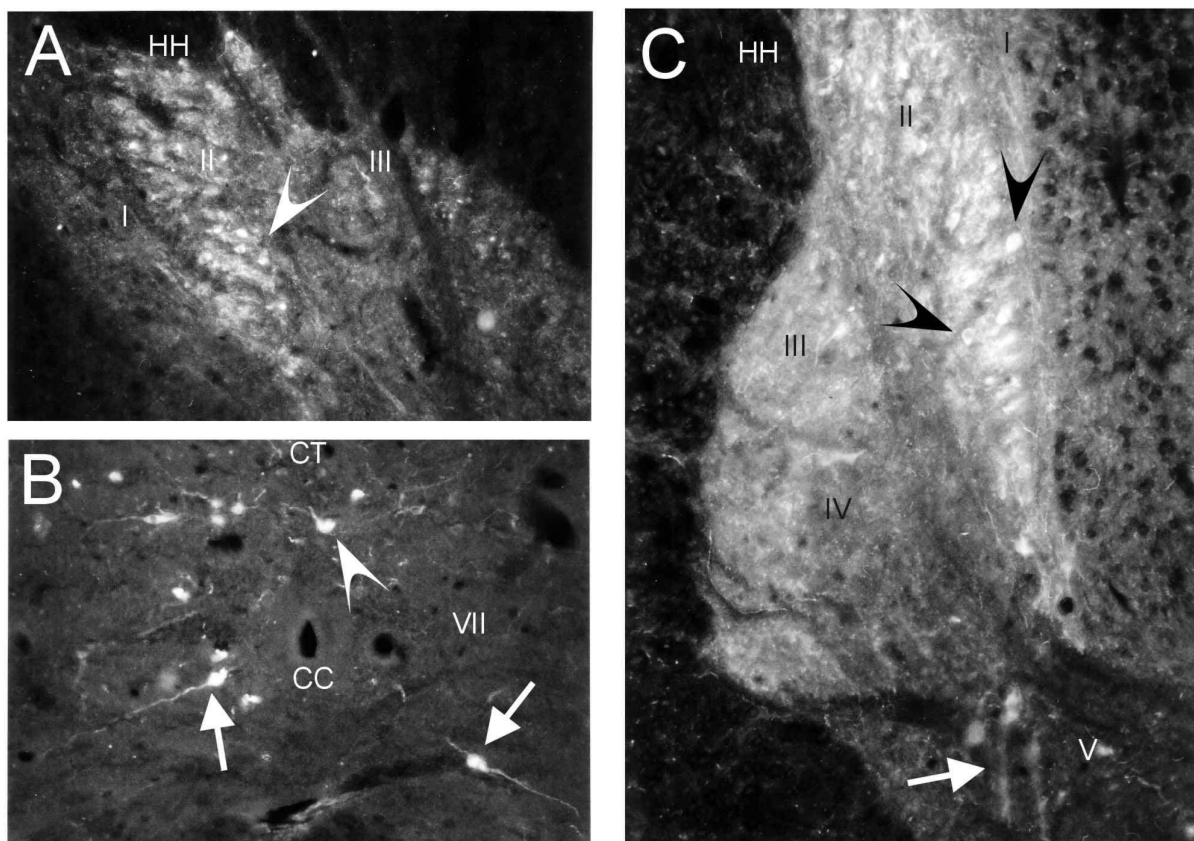


Abbildung 4: A: Segment C15 – Typische NOS-Verteilung im Hinterhorn mit positiven Zellkörpern (Pfeilspitze) in Lamina II. B: Segment C15 – NOS-markierte Neurone im Bereich der Columna Terni (Pfeilspitze) und unterhalb des Zentralkanales mit deutlichen Faserausläufern (Pfeile). C: Segment T1 – Zellkörper in Lamina II (Pfeilspitzen) und NOS-positive Neurone in Lamina V mit Axonausläufern in Richtung hintere Kommissur (Pfeil). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, HH: Hinterhorn

Die Substantia intermedia weist wieder verschiedene Zellarten auf, die NOS-markiert sind. Insgesamt finden sich jedoch in dieser Region weniger NOS-markierte Strukturen auf dieser Höhe des Rückenmarkes. Größtenteils handelt es sich um mittelgroße runde Neurone, die an der Nähe des Zentralkanales und der Mittellinie – also in den zentralen Anteilen der Lamina VII – lokalisiert sind. Ab ungefähr C14 sind auf allen Schnitten präganglionäre Zellen der Columna Terni (Terni, 1923) zu erkennen, die in einer Gruppe dorsal des Zentralkanales liegen. Unter diesen finden sich einige sehr wenige, die schwach NOS-positiv sind. Ein

größerer Anteil an NOS-markierten Neuronen liegt jedoch in diesen Segmenten ventral des Zentralkanals, diese Zellen sind zumeist fusiforme Interneurone mit starken Faserausläufern, die teilweise durch die vordere Kommissur führen (s. *Abb. 4B*).

Es finden sich ebenfalls exzentrisch gelegene Interneurone, vor allen Dingen kleine fusiforme Zellen, die in zipfeligen Ausbuchtungen der grauen Substanz liegen. In Lamina VII sind vereinzelt größere polygonale Zellen mit stark markierten Faserausläufern zu erkennen.

In Lamina IX zwischen den Motoneuronen sieht man gelegentlich mittelgroße fusiforme Interneurone, die NOS-positiv sind.

Das Thorakalmark:

Auch in den thorakalen Segmenten liegt der Großteil der NOS-positiven Strukturen der Hinterhörner wieder in der Lamina II. Es sind dort kleine runde Neurone erkennbar, sie werden von einem Faserplexus umgeben, der nicht mehr ganz so dicht ist wie in den höheren Segmenten. An der Basis der Hinterhörner sind mehr Zellen markiert als in den zervikalen Abschnitten. Es handelt sich um mittelgroße ovale Neurone in der Lamina V. In den unteren thorakalen Segmenten sind mehrfach durch die hintere Kommissur ziehende Faserstränge mit perlschnurartigen Verdickungen sichtbar.

Die Columna Terni ist in allen thorakalen Segmenten dorsal des Zentralkanales erkennbar. Es finden sich jedoch nur wenige NOS-markierte Neurone in dieser Zellgruppe (s. *Abb. 5A und 5C*). Einige wenige der kleinen runden Neurone zeigen eine deutliche Anfärbung für NADPH Diaphorase oder teilweise auch mit immunhistochemischen Methoden, mehrere Zellen färben sich nur schwach und sind somit nicht eindeutig als NOS-positiv zu beurteilen.

Über die restliche Substantia intermedia verteilt sind in Lamina VII in fast allen Schnitten einige kleine runde Interneurone sichtbar, die NOS-markiert sind. Die meisten von ihnen liegen in den zentralen Abschnitten in der Nähe des Zentralkanales (s. *Abb. 5A*). Es finden sich auch etliche fusiforme Zellen, die bei der vorderen Kommissur liegen. Ansonsten sind noch wenige größere runde oder polygonale NOS-positive Neurone sichtbar, die meistens exzentrisch nahe der grauen Substanz liegen (s. *Abb. 4B*).

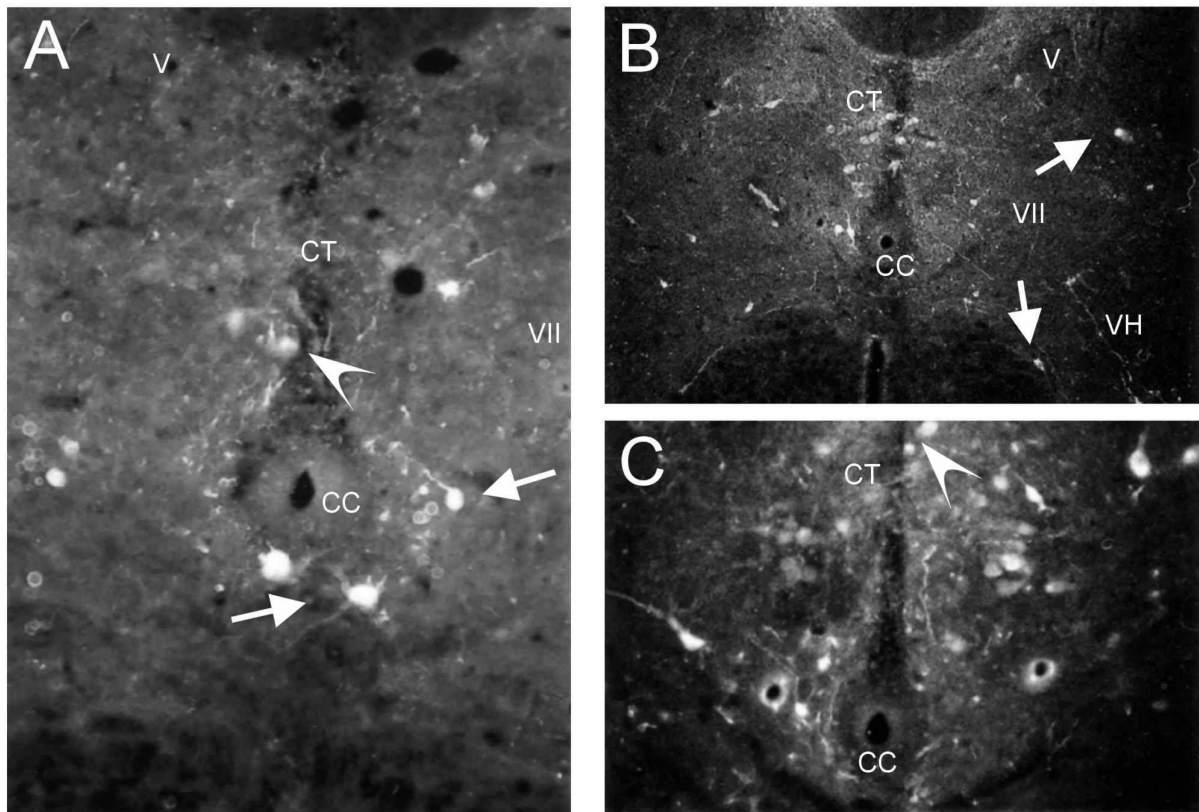


Abbildung 5: A: Segment T2 – NOS-positive Neurone innerhalb der Columna Terni (Pfeilspitze) und Interneurone nahe des Zentralkanales (Pfeile). B: Segment T5 – Exzentrisch gelegene Interneurone in Lamina VII (Pfeile). C: Segment T6 – NOS-markierte Zellkörper in der Columna Terni (Pfeilspitze). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, VH: Vorderhorn

In Lamina VIII und IX zwischen den Motoneuronen der Vorderhörner erkennt man in den thorakalen Abschnitten relativ häufig größere fusiforme Neurone, die deutlich NOS-markiert sind.

Die Intumescentia lumbosacralis:

In der Intumescentia lumbosacralis finden sich im Hinterhorn die meisten NOS-positiven Neurone wiederum in der Lamina II, es sind jedoch auch einige in Lamina III sichtbar. Die kleinen runden Zellen werden in der Lamina II von ebenfalls markierten Faserstrukturen umgeben. Die Basen der Hinterhörner sind frei (s. Abb. 6A).

In der Substantia intermedia sind insgesamt weniger NOS-markierte Strukturen zu erkennen als in den höheren Segmenten. Die markierten Interneurone finden sich vor allen Dingen an der Grenze zum Glykogenkörper und entsenden auch teilweise Fasern in und durch diesen sowie durch die vordere Kommissur. Diese Zellen sind von sehr kleiner, runder Gestalt (s. Abb. 6B und 6C). Ein paar NOS-positive Interneurone sind auch an anderen Stellen der

Lamina VII mehr in der Nähe der lateralen Funiculi zu finden, dabei handelt es sich um größere fusiforme Interneurone.

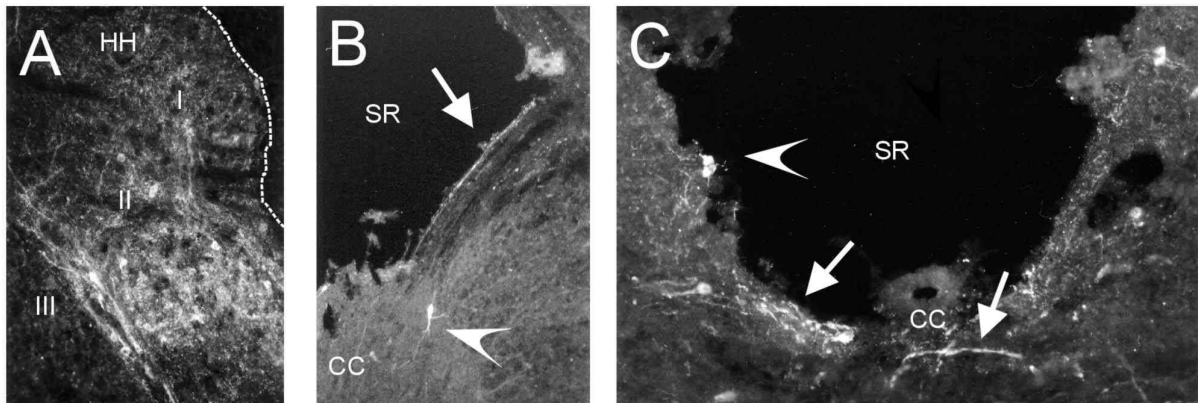


Abbildung 6: A: Segment S2 – Typische NOS-Verteilung im Hinterhorn mit markierten Neuronen und Fasern vorwiegend in Lamina II. B und C: Segmente S5 und S2 – NOS-positive Zellkörper (Pfeilspitzen) und Fasern (Pfeile) an der Grenze zum Sinus rhomboidalis und in der vorderen Kommissur. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, SR: Sinus rhomboidalis

Auch auf dieser Höhe des Hühner Rückenmarkes sind zwischen den Motoneuronen der Laminae VIII und IX wieder mittelgroße fusiforme, NOS-positive Zellen zu erkennen.

Die Nuclei majores Hofmann, die als Anhangsgebilde des Rückenmarkes in diesen Segmenten sichtbar sind, zeigen keine NOS-positiven Strukturen, weder nach Behandlung mit enzymhistochemischen noch mit immunhistochemischen Methoden (*s. Abb. 7A*). Das gleiche gilt für die innerhalb der weißen Substanz als Nuclei minores Hofmann sichtbaren paragrisealen Zellen, wo sich allenfalls fraglich positive Zellen finden lassen (*s. Abb. 7B*).

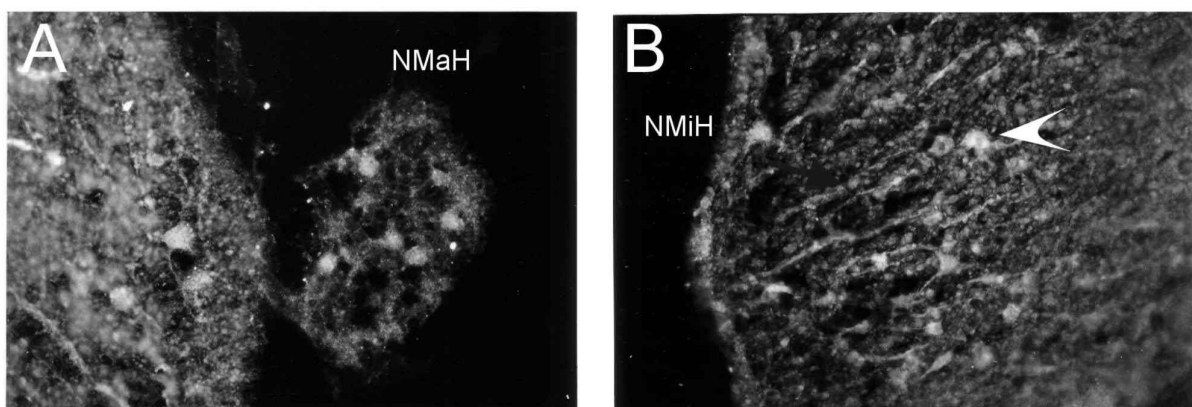


Abbildung 7: A: Segment S2-5 – Hofmannscher Großkern ohne eindeutige NOS-Markierung. B: Segment S6-8 Hofmannscher Kleinkern innerhalb der weißen Substanz mit einem fraglich NOS-positiven Neuron (Pfeilspitze). *NmaH: Nucleus Majoris Hofmann, NmiH: Nucleus Minoris Hofmann*

Das Sakralmark:

Die Segmente der sakralen Abschnitte sind aufgrund ihrer geringen Größe und der daraus resultierenden Anfälligkeit gegenüber Schädigung durch mechanische Einflüsse bei der Präparation, beim Ein- und Auffrieren sowie beim Schneiden relativ schwer beurteilbar. Dennoch können auch einige Aussagen zu diesem Abschnitt getroffen werden.

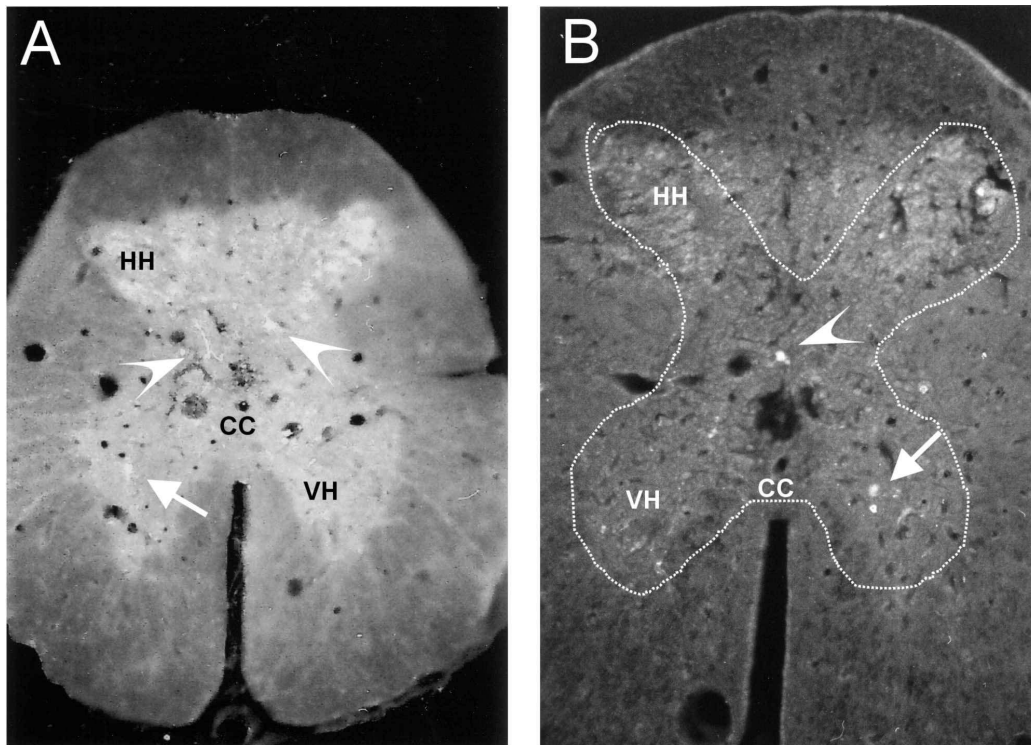


Abbildung 8: A: Segment S11-14 – NOS-positive Interneurone (Pfeilspitzen) und markiertes Neuron innerhalb des Vorderhornes (Pfeil). B: Segment Co1-5 – NOS-markierter Zellkörper innerhalb der präganglionären parasympathischen Neurone (Pfeilspitze) und im Vorderhorn (Pfeil). CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, gepunktete Linie: Grenze zur grauen Substanz

In den sakralen Segmenten kurz unterhalb der Intumescentia lumbosacralis sind noch viele Zellen und auch Fasern in der Lamina II der Hinterhörner sichtbar, die sich NOS-positiv darstellen. Die Anzahl dieser kleinen runden Neurone nimmt zugunsten des Fasergehaltes ab. In den unteren sakralen und den coccygealen Segmenten ist die Schichtung der Laminae kaum noch erkennbar, NOS-markierte Neurone und Fasern scheinen hier diffus über das Hinterhorn verteilt.

Von S9/S10 an erscheint dorsal des Zentralkanales wieder die Gruppe der präganglionären autonomen Neurone, die in dieser Höhe dem Parasympathicus zuzuordnen ist. Innerhalb der Zellsäule finden sich in einigen Schnitten wieder NOS-markierte kleine runde Neurone (s. Abb. 8B).

In der restlichen Substantia intermedia sind in den zentralen Abschnitten kleinere fusiforme Interneurone mit deutlichen Faserausläufern zu erkennen, die sich NOS-positiv darstellen (s. Abb. 8A). In den unteren sakralen und den coccygealen Segmenten finden sich die vereinzelt erkennbaren Interneurone in Form von kleinen ovalen Zellen nahe der Vorderhörner.

Innerhalb der Gruppe der Motoneurone liegen in den Vorderhörnern ebenfalls NOS-markierte fusiforme Neurone (s. Abb. 8A und 8B).

4.2.2 Die Verteilung von ChAT im Hühnerrückenmark

Das obere Zervikalmark:

Die Hinterhörner des Hühnerrückenmarkes zeigen vor allen Dingen in den Laminae III und IV eine deutliche Markierung nach Inkubation gegen ChAT. Der Großteil der sehr kleinen runden Neurone, die sich ChAT-positiv darstellen, liegt in der Lamina IV. Neben den Zellen findet sich auch ein dichter Faserplexus in beiden Laminae (s. Abb. 9B). In einigen wenigen Schnitten finden sich auch in Lamina II ChAT-positiv Strukturen, dabei handelt es sich um markierte Fasern. An der Basis der Hinterhörner in Lamina V sind vereinzelt ChAT-markierte größere polygonale oder ovale Neurone sichtbar, die auch Fasern durch die hintere Kommissur entsenden.

In der Substantia intermedia zeigen sich nur sehr wenige Zellen als ChAT-markiert. In der Lamina VII sind dies zumeist exzentrisch liegende mittelgroße spindelförmige oder polygonale Neurone, pro Schnitt ist durchschnittlich ein solches Interneuron zu sehen (s. Abb. 9A). Teilweise kommen auch kleine runde Neurone vor, die ChAT-positiv sind. Diese sind größtenteils in der Nähe des Vorderhornes und der Motoneurone zu finden.

Die Markierung in den Vorderhörnern wird, wie zu erwarten, von den ChAT-positiven Motoneuronen dominiert (s. Abb. 9A). Die Größe und die Anzahl der Motoneurone nimmt dabei mit den nach unten hin absteigenden zervikalen Segmenten zu, die morphologische Gestalt verändert sich jedoch nicht, das typische Bild der relativ großen polygonalen Zellen bleibt erhalten. Zunächst existiert nur eine Gruppe von Motoneuronen ventrolateral an der Spitze des Vorderhornes, diese dehnt sich langsam nach ventromedial aus. Ab circa C7 wird auch noch eine weitere Gruppe von Motoneuronen sichtbar, die sich an dorsolateraler Position

befindet (s. Abb. 9C und 10C). Die multipolaren Zellen senden Faserzüge in die Vorderwurzel und durch die vordere Kommissur (s. Abb. 9A und 9C).

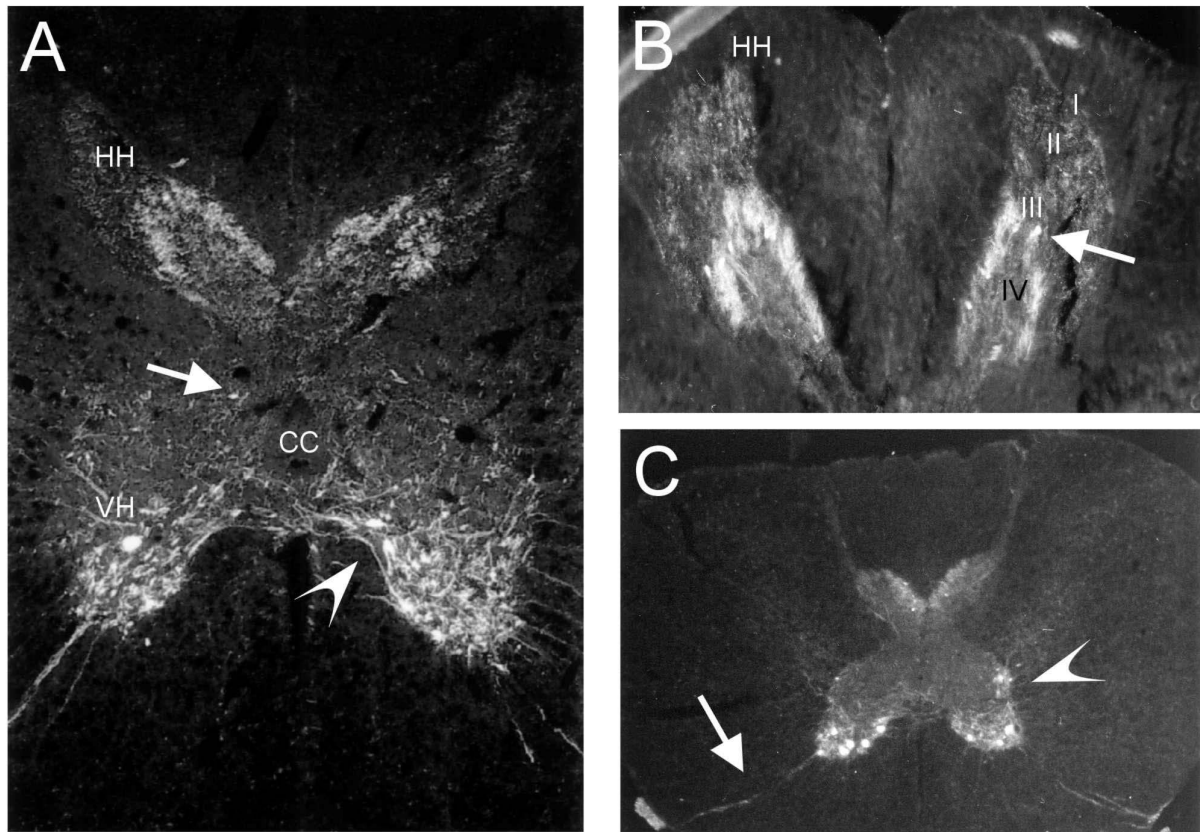


Abbildung 9: A: Segment C4 – Typische ChAT-Markierung der zervikalen Segmente mit ventrolateraler bis -medialer Ausdehnung der Motoneurone (Pfeilspitze) und ChAT-positiven Interneuronen (Pfeil). B: Segment C2 – ChAT-Markierung des Hinterhorns mit Zellkörpern in Lamina III und IV (Pfeil). C: Segment C7 – Weitere Gruppe von Motoneuronen an dorsolateraler Position (Pfeilspitze), daneben ChAT-positiv Axone in Richtung Vorderwurzel. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn

Besonders auffällig sind ChAT-positive Faserzüge durch die Hinterwurzel, die hauptsächlich in Höhe der unteren zervikalen Segmente bei fast allen untersuchten Tieren erkennbar sind (s. Abb. 10A und 10B). Einige Experimente lassen solche Faserzüge auch in höheren zervikalen Segmenten erkennen (s. Abb. 10C und 10D).

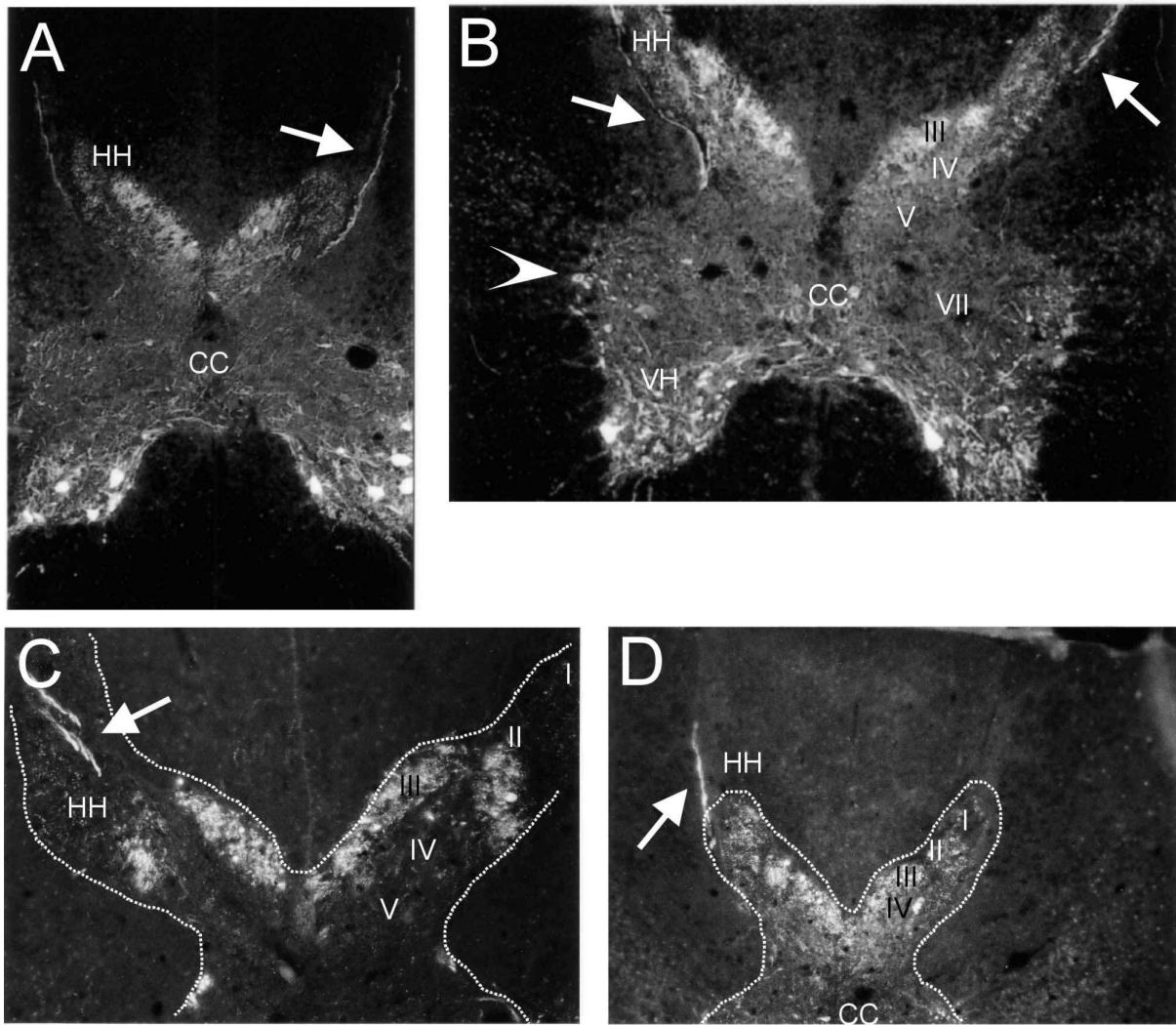


Abbildung 10: A: Segment C8, B: Segment C10, C: Segment C4, D: Segment C6 – Verschiedene Beispiele für ChAT-positive Faserzüge (Pfeile) durch die Hinterwurzel, in B daneben auch noch einmal die zusätzliche dorsolateral lokalisierte Gruppe von Motoneuronen (Pfeilspitze). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, Gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

Die Intumescentia cervicalis:

Im Hinterhorn der Intumescentia cervicalis sind wieder in Lamina III deutlich kleine runde Neurone sowie ein dichter Faserplexus ChAT-markiert (s. Abb. 11C und 12A). Die Lamina IV zeigt ebenfalls eine derartige Färbung, auch wenn diese nicht ganz so stark ist (s. Abb. 12A). Die restlichen Anteile des Hinterhornes sind frei von ChAT-positiven Strukturen bis auf die bereits erwähnten Faserzüge durch die Hinterwurzel, die in einigen Experimenten auch in Segmenten der zervikalen Intumeszenz eindeutig zu identifizieren sind (s. Abb. 11A). Die Basis der Hinterhörner beinhaltet in Lamina V wieder einzelne ChAT-positive Interneurone (s. Abb. 12A).

Auch in der Substantia intermedia sieht man wieder ChAT-positive Neurone. Die kleinen runden oder dreieckigen Zellen sind hier zahlreicher als in den höher gelegenen zervikalen Segmenten und liegen über die Lamina VII verstreut teilweise exzentrisch an der Grenze zu den lateralen Funiculi und teilweise in der Nähe des Zentralkanals (s. Abb. 11B).

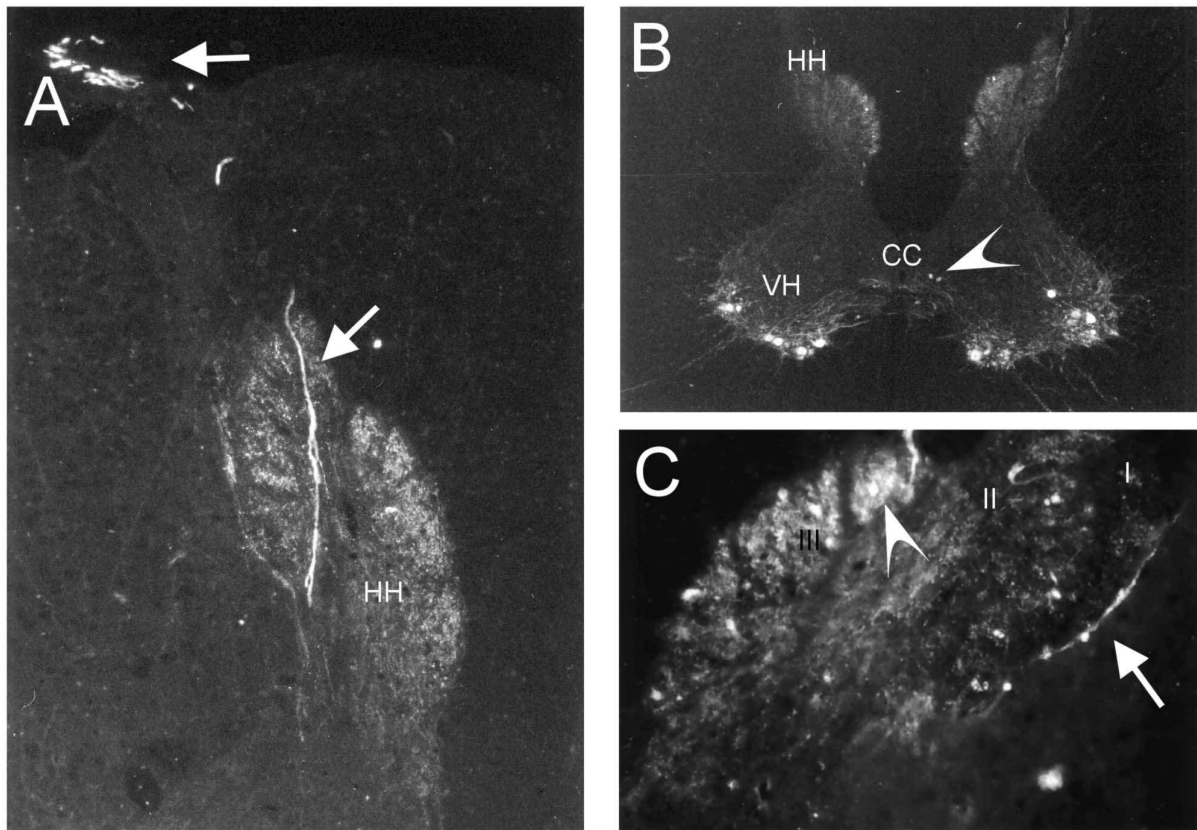


Abbildung 11: A: Segment C14 – In Hinterwurzel und Hinterhorn sichtbar ChAT-markierte Fasern (Pfeile). B: Segment C12 – Typische ChAT-Verteilung mit einigen Interneuronen in Lamina VII (Pfeilspitze). C: Segment C14 – ChAT-positive Zellkörper in Lamina III (Pfeilspitze), daneben Neuropil und Faser (Pfeil). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn

Ab C15 lassen sich eindeutig die präganglionären Neurone der Columna Terni ausmachen, die stark ChAT-markiert sind. Sie sind als Gruppe dorsal und auf Höhe des Zentralkanales lokalisiert, es handelt sich um mittelgroße zumeist runde oder ovale aber auch fusiforme Zellen (s. Abb. 12B).

Im Vorderhorn sind weiterhin die ChAT-positiven Motoneurone zu erkennen, die in den Segmenten der Intumescentia cervicalis in verschiedene Gruppen – in ventromedialer, ventrolateraler und dorsolateraler Lage – unterteilt sind. Die Motoneurone der ventrolateralen Gruppe sind dabei am zahlreichsten und am größten. Die Gruppen schicken ebenfalls markierte Fasern in die Vorderwurzel und durch die vordere Kommissur (s. Abb. 12C). Angesichts ihrer funktionellen Bedeutung als Motoneurone, die die Muskulatur der Flügel versorgen, ist die Zunahme von Anzahl und Größe der Zellen folgerichtig.

In einigen Schnitten sind paragriseale Zellen der zervikalen Hofmannschen Kleinkerne zu erkennen, die sich jedoch nicht als ChAT-positiv darstellen.

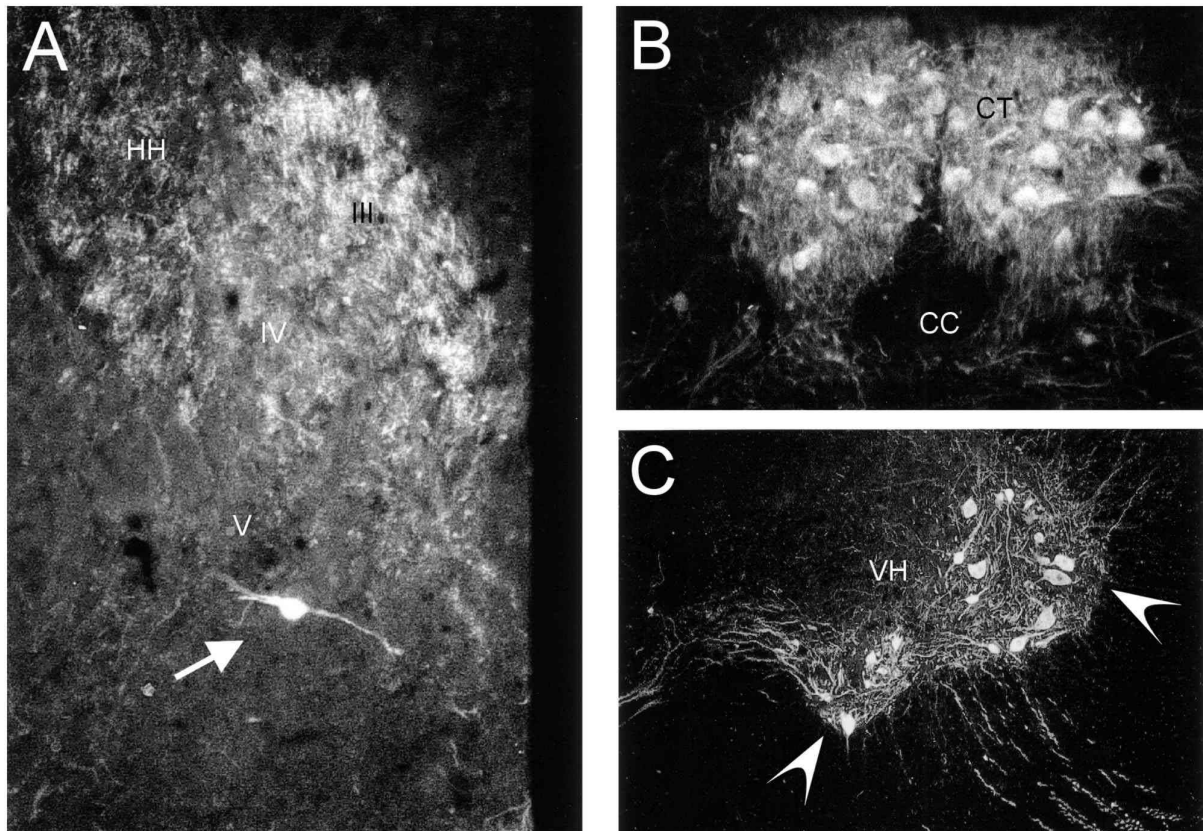


Abbildung 12: A: Segment C15 – ChAT-positives Interneuron an der Basis des Hinterhorns (Pfeil). B: Segment C15 – Columna Terni mit deutlich ChAT-positiven präganglionären Somata sowie Neuropil. C: Segment C13 – Ventrolaterale und ventromediale Motoneuron-Ansammlung (Pfeilspitzen) mit markierten Axonen zur Vorderwurzel. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn

Das Thorakalmark:

In den thorakalen Segmenten des Hühnerrückenmarkes sind in der Lamina III ebenfalls deutlich ChAT-positiv kleine runde Neurone sowie ein Fasergeflecht zu sehen, das etwas weniger dicht ist als das der zervikalen Segmente. Auch die Lamina VI zeigt ähnliche ChAT-markierte Strukturen (s. Abb. 14B).

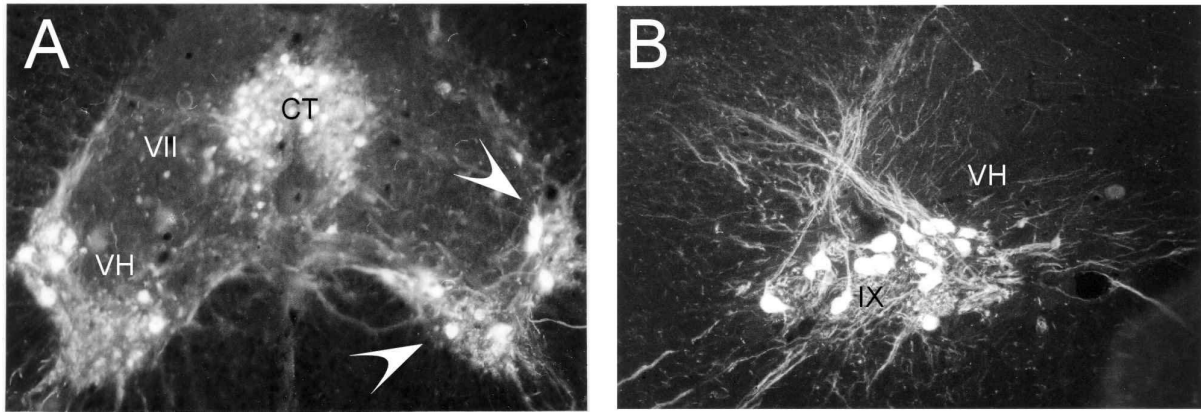


Abbildung 13: A: Segment T2 – Weiterhin zwei Gruppen von Motoneuronen (Pfeilspitzen), präganglionäre Neurone deutlich ChAT-markiert. B: Segment T7 – In Lamina IX auf dieser Höhe nur noch eine Motoneuron-Lokalisation mit kräftigen Axonen. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CT: Columna Terni, VH: Vorderhorn

Im gesamten thorakalen Bereich ist in der Substantia intermedia dorsal des Zentralkanales die Zellgruppe der Columna Terni zu erkennen. Die mittelgroßen, in ihrer Form leicht von rund über polygonal bis fusiform variierenden, präganglionären Neurone weisen stets eine deutliche Markierung nach Inkubation mit dem ChAT-Antikörper auf (s. Abb. 13 A und 14C).

Außerhalb dieser Zellgruppe sind in der Substantia intermedia in Lamina VII nur relativ wenige ChAT-positive Interneurone sichtbar. Es finden sich einige fusiforme Zellen, die exzentrisch am Rand der weißen Substanz gelegen sind und starke Faserausläufer aufweisen. Des Weiteren lassen sich teilweise kleinere runde Zellen ventral des Zentralkanales liegend erkennen, diese ähneln morphologisch den präganglionären sympathischen Neuronen (s. Abb. 14A und 14C).

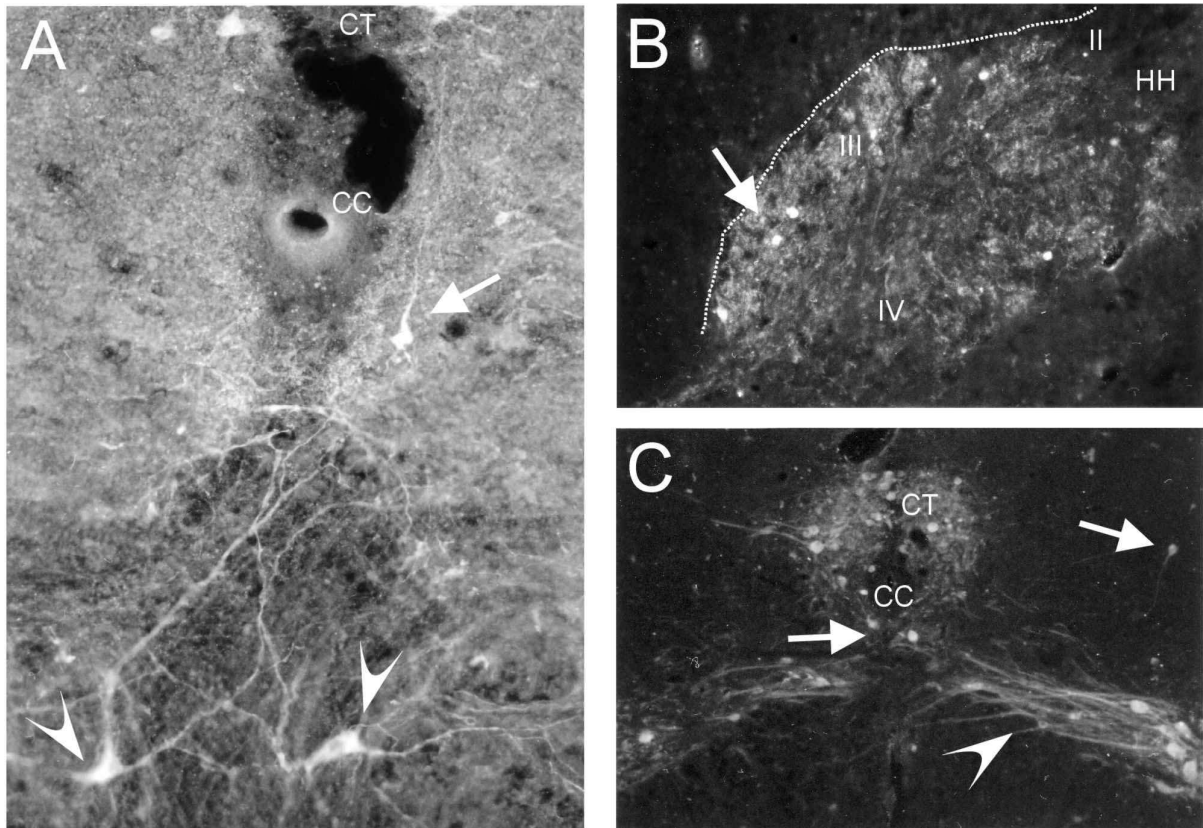


Abbildung 14: A: Segment S1 – Neben einem ChAT-positiven Interneuron um den Zentralkanal (Pfeil) finden sich hier medial gelegene Motoneurone (Pfeilspitzen). B: Segment T7 – ChAT-markierte Neurone (Pfeil) in Lamina III des Hinterhorns. C: Segment T7 – Neben der Gruppe der präganglionären Neurone sind Interneurone (Pfeile) erkennbar, daneben die Axone der Motoneurone, die durch die vordere Kommissur ziehen (Pfeilspitze). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, Gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

Sowohl die Anzahl als auch die Größe der Motoneurone in den Laminae VIII und IX der Vorderhörner liegt im thorakalen Abschnitt – wie zu erwarten – deutlich unter der der zervikalen Intumeszenz. Die drei Gruppen von Motoneuronen (ventromedial, ventrolateral und ventrodorsal) schmelzen langsam wieder auf eine Gruppe zusammen, diese befindet sich an der Spitze des Vorderhorns (s. Abb. 13A und 13B). Die Gesamtheit der typischen polygonalen Zellen ist ChAT-markiert, ebenso wie die zur Vorderwurzel und durch die vordere Kommissur ziehenden Fasern (s. Abb. 14A und 14C).

Die Intumescentia lumbosacralis:

In Höhe der lumbosakralen Intumeszenz sind die Hinterhörner insgesamt weniger deutlich ChAT-markiert als in den darüber liegenden Abschnitten. Dennoch sind eindeutig positive kleine runde Neurone, die von einem Faserplexus umgeben sind, in der Lamina III zu

erkennen. Die restlichen Bereiche der Hinterhörner sind von Ausnahmen abgesehen weitgehend frei von ChAT-markierten Strukturen (*s. Abb. 15B*).

Ab S2 ist keine Columna Terni mehr sichtbar, somit beschränkt sich das Bild ChAT-positiver Strukturen in der Substantia intermedia auf wenige Interneurone, die vor allem in Lamina VI und VII am Rand der weißen Substanz lokalisiert sind. Etliche davon liegen am Übergang zum Glykogenkörper des Sinus rhomboidalis. Diese Interneurone sind zumeist von kleiner runder oder fusiformer Gestalt (*s. Abb. 15A*). Der Sinus rhomboidalis schließt sich sakralwärts hin zunehmend (*s. Abb. 16A*). Auch am anderen Rand der weißen Substanz – am Übergang zu den lateralen Funiculi – finden sich derartige ChAT-markierte Zellen.

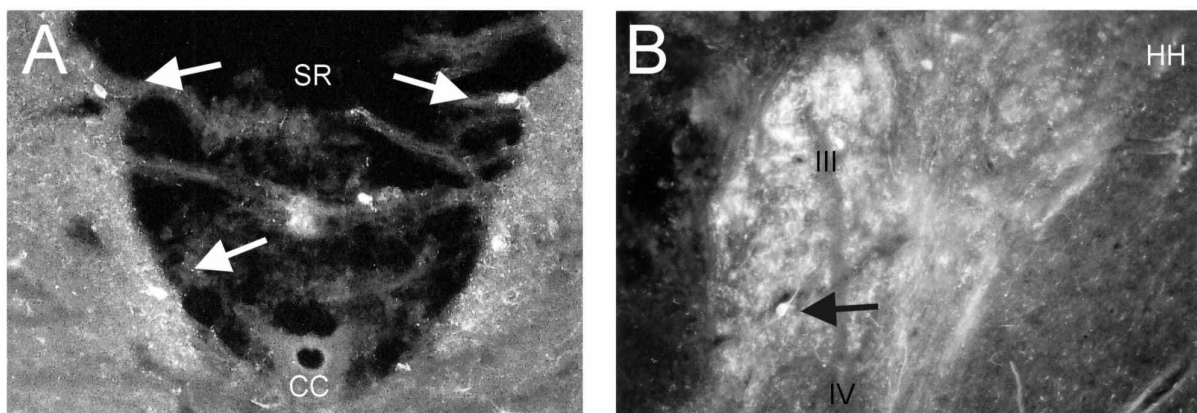


Abbildung 15: A: Segment S2 – ChAT-markierte Interneurone (Pfeile) an der Grenze zum Glykogenkörper. B: Segment S6 – ChAT-positives Neuron (Pfeil) in Lamina IV des Hinterhorns. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, SR: Sinus rhomboidalis

Die Vorderhörner weisen Motoneurone unterschiedlicher Größe auf – etliche sind jedoch sehr groß, die sich alle ChAT-positiv darstellen. Sie liegen dicht zusammen an der Spitze des Vorderhorns, die Aufteilung in verschiedene Gruppen von ventrolateraler, ventromedialer und dorsolateraler Lokalisation ist nur angedeutet. Ausgehend von den Motoneuronen sind starke Faserzüge zur Vorderwurzel und durch die vordere Kommissur sichtbar, die ebenfalls ChAT-markiert sind.

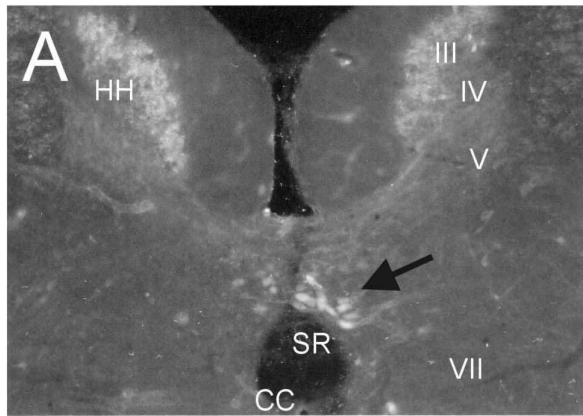


Abbildung 16: A: Segment S7 – Der Sinus rhomboidalis schließt sich zusehends, die ersten präganglionären autonomen Neurone sind sichtbar (Pfeil). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, SR: Sinus rhomboidalis

Innerhalb der weißen Substanz sind in der Höhe der Intumescentia lumbosacralis wieder deutlich paragriseale Zellen sichtbar. Diese kleinen, polygonalen Neurone weisen aber keine ChAT-Markierung auf. Sie liegen in den ventrolateralen Gebieten des Rückenmarkes und sind durch Faserausläufer netzartig verbunden.

Das Sakralmark:

Auch in den Segmenten des Sakralmarkes sind in der Lamina III des Hinterhornes wieder Neurone und Neuropil ChAT-markiert. Dabei nimmt die Dichte der markierten Strukturen tendenziell etwas gegenüber den höheren Segmenten ab. Die Zellen sind sehr klein und rund, einige wenige sind auch vereinzelt in Lamina IV sichtbar.

Ab ca. S9, die Höhe, in der sich auch der Sinus rhomboidalis geschlossen hat, sind präganglionäre Neurone des autonomen Nervensystems sichtbar, die sich ChAT-positiv darstellen. Die kleinen runden bis ovalen Neurone sind als Gruppe dorsal des Zentralkanales lokalisiert. Die Zellsäule reicht bis an den Beginn des Coccygealmarkes, also bis S14 (s. Abb. 17A und 17B sowie 18A, 18B und 18C).

Über die Laminae VI und VII verteilt finden sich in den sakralen Segmenten weitere verschiedene ChAT-markierte Interneurone. Oberhalb von S9 liegen viele sehr kleine fusiforme Zellen an der Grenze zum Glykogenkörper und an der vorderen Kommissur. Unterhalb von S9 nimmt die Zahl der Interneurone etwas ab, man findet die ChAT-positiven Zellen dann als mittelgroße polygonale Zellen größtenteils in Lamina VII (s. Abb. 17B).

Gelegentlich sind besonders große ChAT-positive Neurone mit polygonalem Soma – sogenannte „Giant Cells“ – innerhalb der Substantia intermedia erkennbar (s. Abb. 18B und 18C)

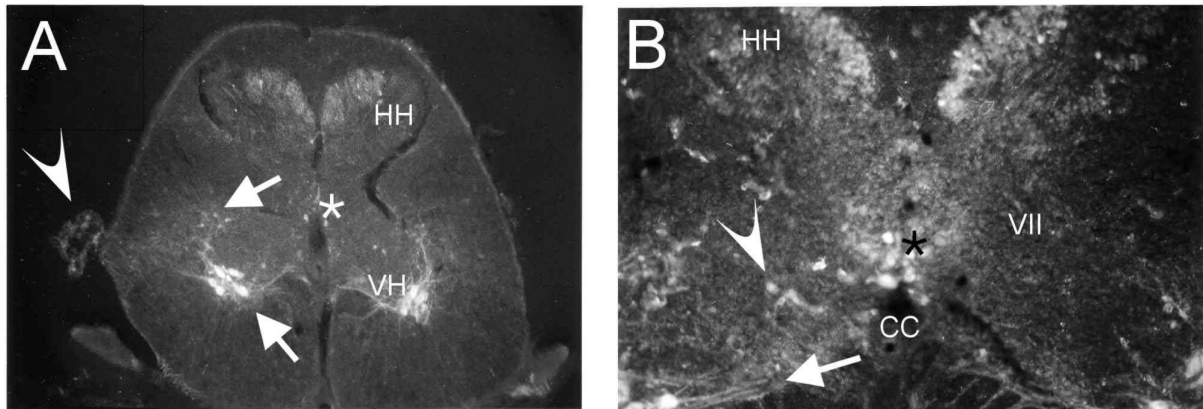


Abbildung 17: A: Segment S9 – Cholinerge Neurone sind in dorsolateraler und ventraler Lokalisation erkennbar (Pfeile), daneben zeigt sich hier ein Nucleus majoris Hofmann als spinales Anhangsgebilde (Pfeilspitze) mit möglicher ChAT-Markierung. B: Segment S9 – ChAT-markierte Interneurone (Pfeilspitze) neben den parasympathischen präganglionären Neuronen sowie Axonausläufern der Motoneurone durch die vordere Kommissur (Pfeil). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, *: Zellsäule der präganglionären autonomen Neurone

Innerhalb der ChAT-markierten Motoneurone der Vorderhörner lassen sich auch in den sakralen Segmenten noch zwei Gruppen ausmachen (s. Abb. 17A). Diese Zweiteilung verschwindet in den unteren sakralen Segmenten zunehmend, und ist in den coccygealen Abschnitten nicht mehr erkennbar. Die Gesamtzahl der Motoneurone ist deutlich rückläufig, ebenso ihre Größe. Es sind wieder Faserzüge zur Vorderwurzel ChAT-markiert (s. Abb. 17B sowie 18A und 18C).

Paragriseale Zellen, die sich in den sakralen Segmenten finden, sind ebenfalls als nicht ChAT-positiv dargestellt. Hingegen zeigen die kleinen runden Neurone der Hofmannschen Großkerne wiederholt Hinweise auf ChAT-Aktivität in Form einer zumindest suspekten Markierung (s. Abb. 17A).

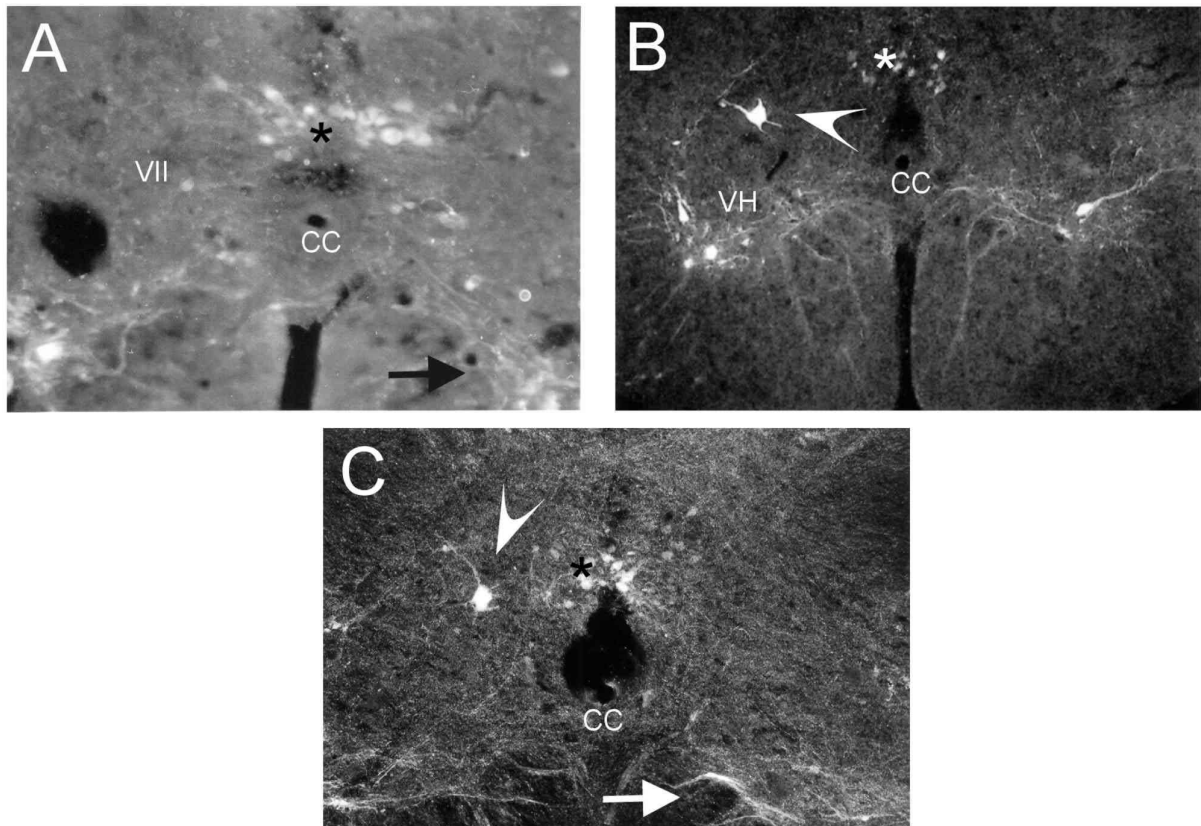


Abbildung 18: A: Segment S11-14 – ChAT-Aktivität in den präganglionären autonomen Neuronen und in den Axonausläufern (Pfeil) der Motoneurone. B und C: Segmente S12-14 und S9 – Giant Cells (Pfeilspitzen) als Interneurone, daneben Axonausläufer (Pfeil). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, *: Zellsäule der präganglionären autonomen Neurone

4.3 Das Taubenrückensmark

Makroskopisch wird das Rückenmark der Taube durch 39 Spinalnerven in Segmente gegliedert, der Einteilung nach Huber (1936) folgend in 14 zervikale [C1 bis C14], 6 thorakale [T1 bis T6], 4 lumbale [L1 bis L4] und 15 sakro-coccygeale [SC1 bis SC15] Segmente. Die Intumescentia cervicalis erstreckt sich von C11 bis T1, die Spinalnerven in dieser Höhe bilden den Plexus brachialis. Die Intumescentia lumbosacralis besteht von L1 bis SC2, von den Spinalnerven dieser Segmente wird der Plexus lumbosacralis gebildet. Makroskopisch auffällig ist außerdem der Sinus rhomboidalis, der von dem Glykogenkörper ausgefüllt wird. Er liegt zwischen L3 und SC2. Die Lobi accessorii oder Hofmannschen Großkerne imponieren als Anhangsgebilde des Rückenmarkes, die in der lumbosakralen Region zwischen den Spinalnervenabgängen liegen. Makroskopisch nicht sichtbar sind hingegen die paragriseal gelegenen Hofmannschen Kleinkerne. Sie sind in zervikalen, thorakalen und unteren sakralen Abschnitten zu finden (Huber, 1936).

Eine Übersicht ist in *Abbildung 19* dargestellt. Die Darstellung ist angelehnt an die Arbeiten von Huber (1936) sowie Leonard und Cohen (1975a).

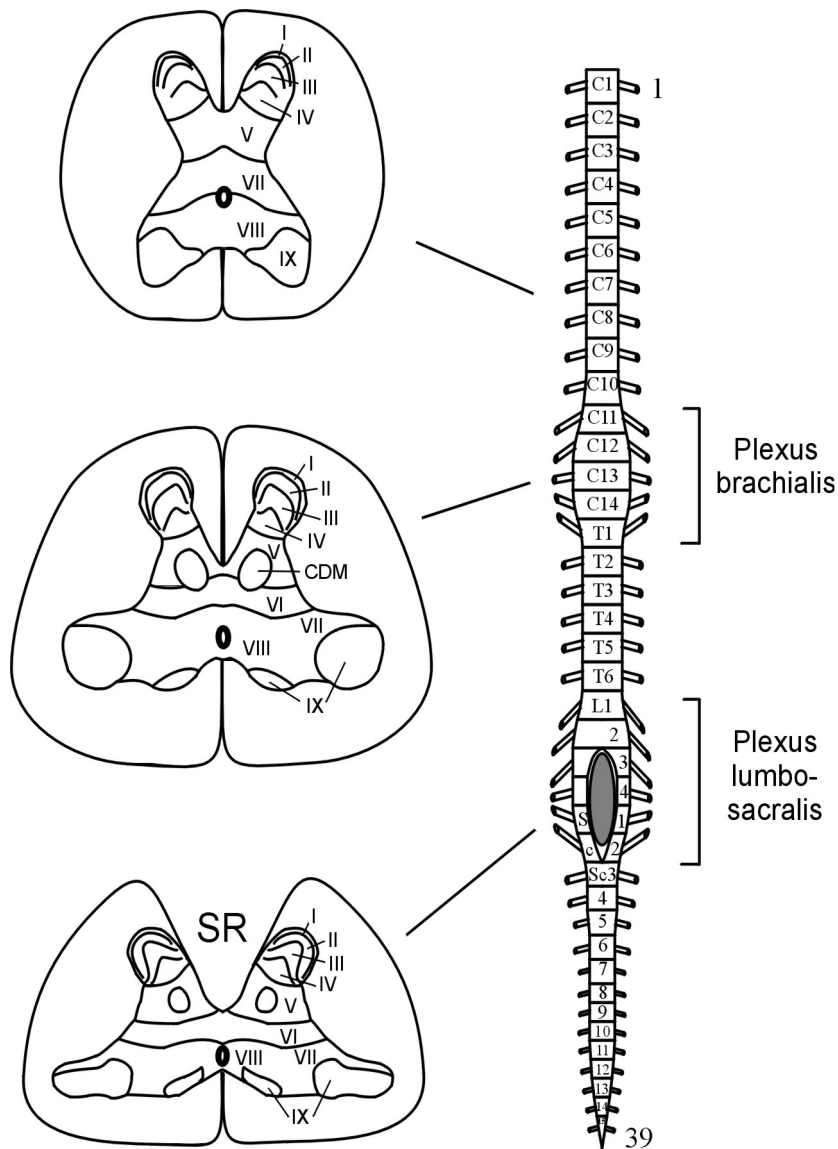


Abbildung 19: Schemazeichnung des Taubenrückenmarkes in der makroskopischen Ansicht sowie im Querschnitt – exemplarisch in Höhe des mittleren Zervikalmarks, des Plexus brachialis und des Plexus lumbosacralis. Dargestellt sind die Spinalnervenabgänge sowie die Lage und ungefähre Ausdehnung der Zellschichten (Laminae) I – X. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, SR: Sinus rhomboidalis.

Zur Besprechung der Verteilung von ChAT und NOS soll hier das Taubenrückenmark in funktionelle Abschnitte unterteilt werden: Zervikalmark, Intumescentia cervicalis, Thorakalmark, Intumescentia lumbosacralis und Sakralmark. Insgesamt wurde in allen Segmenten sowohl ChAT- als auch NOS-Aktivität gesehen.

Die laminäre Einteilung der Zellen orientiert sich an den Arbeiten von Leonard und Cohen zur Zytoarchitektur des Taubenrückenmarkes (Leonard & Cohen, 1975a).

4.3.1 Die Verteilung von NOS im Taubenrückenmark

Das obere Zervikalmark:

Das Hinterhorn des oberen Zervikalmarkes zeigt eine starke Anfärbung NOS-positiver Neurone und Fasern. Die Neurone – typischerweise mit kleinen runden Zellkörpern – liegen vor allem in Lamina II, während die Faserflechte sich auch auf die Lamina I erstrecken (*s. Abb. 20B*). Die Laminae des Hinterhornes sind bei der Taube im Gegensatz zu denen des Huhnes eher quer als längst angeordnet. Die Dichte des Neuropil und die Anzahl der NOS-positiven Neurone nimmt zum unteren Zervikalmark hin leicht ab.

An der Basis des Hinterhornes finden sich vereinzelte kleine fusiforme Zellen in Lamina V – vor allem an der Grenze zum dorsalen Funikulus gelegen (*s. Abb. 20B*).

In der Substantia intermedia liegen verstreut NOS-positive Neurone in den Laminae VII und VIII, allerdings sind sie eher abseits der Mittellinie und des Zentralkanals zu finden. Es gibt verschiedene Typen – sowohl größere fusiforme bis polygonale als auch kleinere runde (*s. Abb. 20A und 20C*).

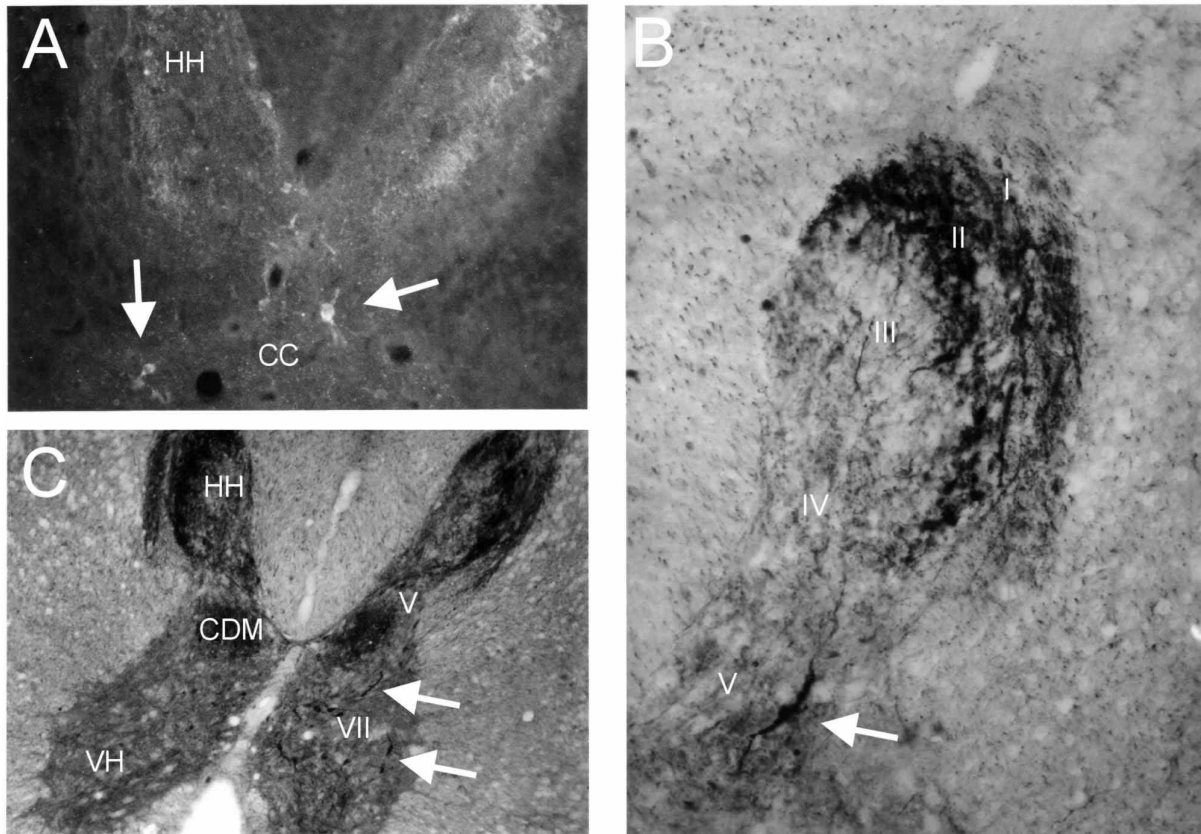


Abbildung 20: A: Segment C4 – Morphologisch verschiedene Interneurone (Pfeile) innerhalb der Lamina VII. B: Segment C10 – Das Hinterhorn mit typischer NOS-Markierung von Neuropil in Lamina I und Somata in Lamina II, des weiteren ein NOS-positives Neuron an der Basis des Hinterhorns (Pfeil). C: Segment C10 – Anfärbung im Bereich der Columna dorsalis magnocellularis, daneben kleine, exzentrisch gelegene Interneurone (Pfeile). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CDM: Columna dorsalis magnocellularis, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn

Im Bereich der unteren Zervikalsegmente entwickelt sich die Columna dorsalis magnocellularis, die ab C10 sichtbar und ab der zervikalen Intumeszenz vollständig ausgebildet ist. Innerhalb dieser Zellsäule stellt sich vor allem in der Färbung mit NADPH Diaphorase ein dichter Faserplexus dar (s. Abb. 20C).

Die Intumescentia cervicalis:

Das Bild des Hinterhorns in der Intumescentia cervicalis ähnelt dem des oberen Zervikalmarkes, es findet sich ein etwas stärkerer Plexus in Lamina I. Insgesamt ist jedoch die Zell- und Faserdichte NOS-positiver Strukturen nicht ganz so hoch (s. Abb. 22A).

Im Bereich der Columna dorsalis magnocellularis am Fuße des Hinterhorns sind stark NADPH Diaphorase-positive Fasern sichtbar, die jedoch kaum NOS-immunreaktiv sind. Es fallen mehr Fasern als gefärbte Zellkerne auf, dennoch sind auch immer wieder eindeutig positiv markierte Neurone innerhalb der Struktur auszumachen (s. Abb. 21D).

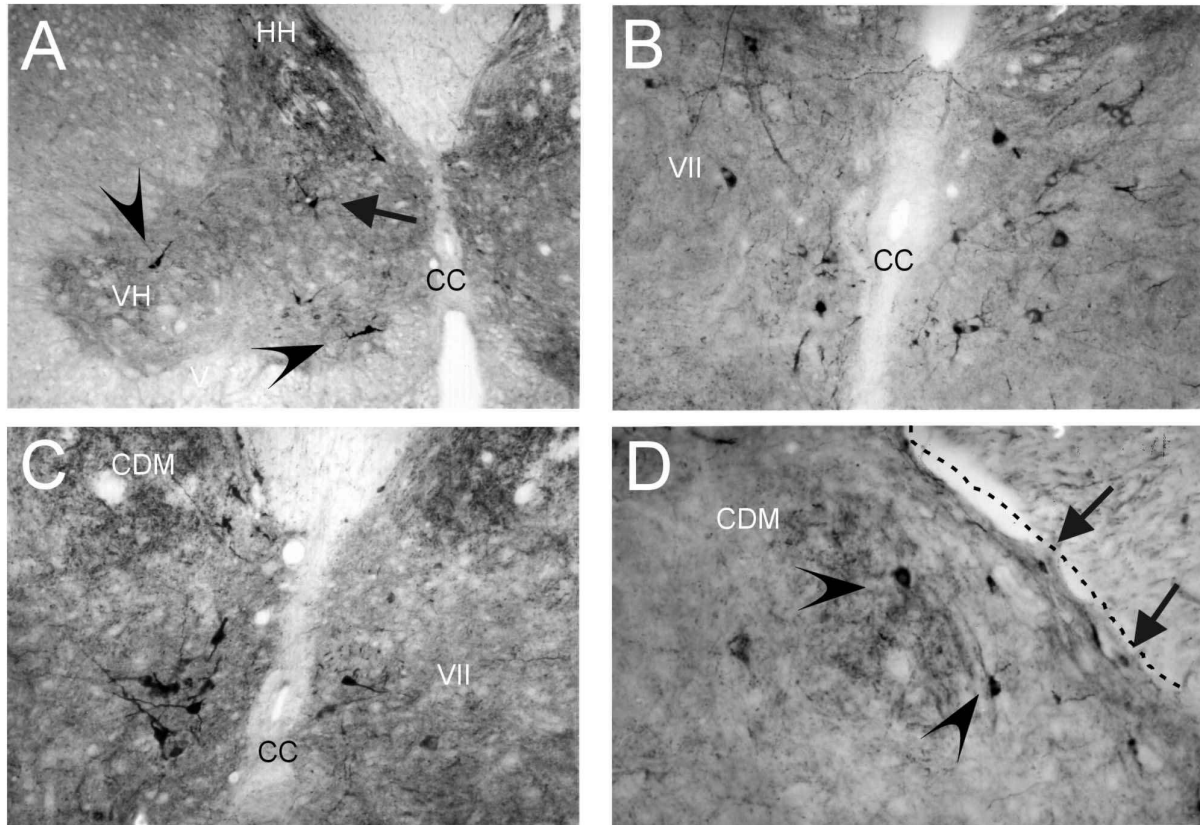


Abbildung 21: A: Segment C11 – NADPH-markierte Neurone innerhalb der zwei Gruppen der Motoneurone (Pfeilspitzen) sowie Interneurone in Lamina VII (Pfeil). B und C: Segmente C13 und C11 – NADPH-markierte Neurone um den Zentralkanal. D: Segment C13 – Positive Neurone innerhalb der Columna dorsalis magnocellularis (Pfeilspitzen) und an der Grenze zur weißen Substanz lokalisierte Zellen mit Ausläufern (Pfeile). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CDM: Columna dorsalis magnocellularis, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, Gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

In den Laminae V und VI finden sich wieder einzelne NOS-markierte Zellkörper am Übergang zum dorsalen Funikulus (*s. Abb. 21D und 22B*) und unterhalb der Columna dorsalis magnocellularis. Das Aussehen dieser Zellen variiert von großen fusiformen und dreieckigen bis zu kleinen runden.

Die Substantia intermedia zeigt gefärbte Interneurone im Bereich der Laminae VI, VII und VIII, es dominiert allerdings die Lokalisation ventral und dorsal des Canalis centralis entlang der Mittellinie (*s. Abb. 21B und 21C*). Hier sind auch NOS-positive Fasergeflechte zu sehen, die sich auch über die vordere oder hintere Kommissur erstrecken. Die Form der Zellkörper ist überwiegend klein und rund.

Ab C14 ist die Columna Terni präsent, teilweise sind auch im Segment C 13 schon einzelne Zellkörper erkennbar. In dieser Region finden sich auch vereinzelt NOS-markierte Neurone (*s. Abb. 22A*).

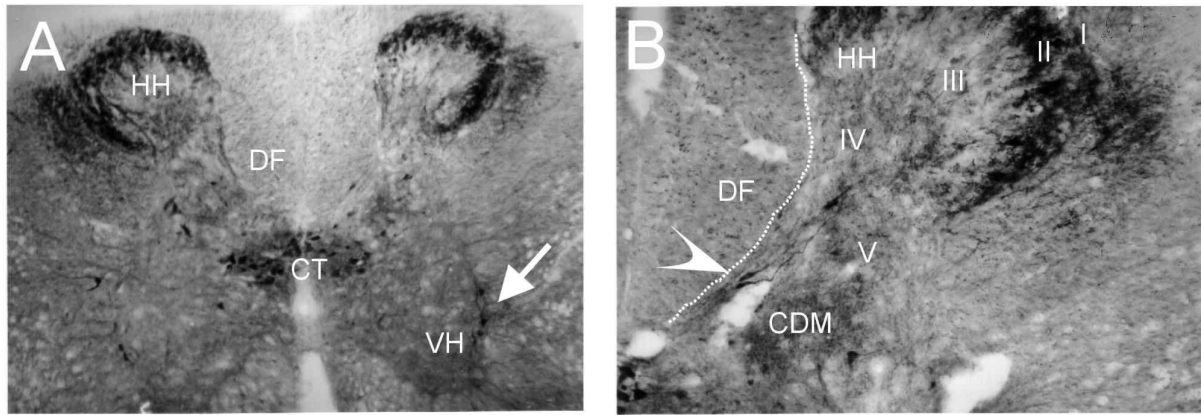


Abbildung 22: A: Segment T1 – NADPH-Markierung innerhalb der Columna Terni sowie im Bereich der Lamina IX des Vorderhornes (Pfeil). B: Segment T1 – NADPH-Markierung dominiert in Lamina I und II des Hinterhornes, des weiteren zeigen sich markierte Neurone (Pfeilspitze) am Übergang zum dorsalen Funikulus der weißen Substanz. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CDM: Columna dorsalis magnocellularis, DF: Dorsaler Funikulus, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, Gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

Zwischen den Motoneuronen des Vorderhornes finden sich ebenfalls NOS-positive Neurone. Ihre Gestalt weicht deutlich von den großen polygonalen Motoneuronen ab. Sie fallen als große fusiforme Zellen auf (s. Abb. 21A).

Das Thorakalmark:

Auch in den thorakalen Segmenten findet sich im Hinterhorn ein dichter NOS-positiver Faserplexus in den Laminae I und II sowie NOS-markierte kleine runde Zellkörper in der Lamina II (s. Abb. 24A).

In Lamina V sind wieder kleinere runde und fusiforme Zellkörper am Rande zum dorsalen und auch lateralen Funikulus markiert.

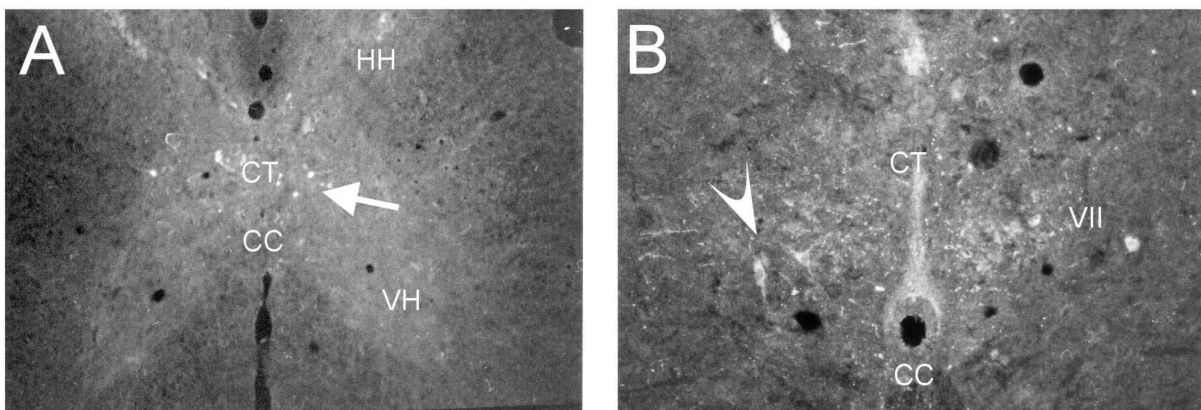


Abbildung 23: A und B: Segmente T2 und T6 – NOS-Aktivität um den Zentralkanal, zum einen innerhalb der Columna Terni (Pfeil), zum anderen außerhalb davon als Interneuron (Pfeilspitze) in Lamina VII. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn

Wieder finden sich einzelne markierte Neurone in der Region der Columna Terni. Es handelt sich um kleinere runde Zellen dorsal des Canalis centralis (s. *Abb. 23A und 24A*).

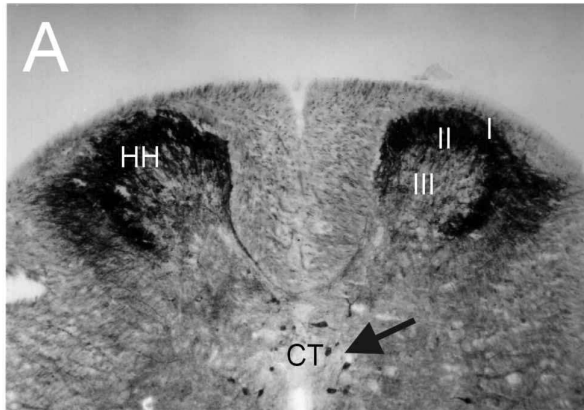


Abbildung 24: A: Segment T4 – NADPH-markierte Neurone innerhalb der Columna Terni (Pfeil). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CT: Columna Terni, HH: Hinterhorn

Weitere NOS-positive Interneurone sind in den Laminae VII und VIII als größere fusiforme Zellen sichtbar (s. *Abb. 23B*). Ähnliche Neurone finden sich auch zwischen den Motoneuronen des Vorderhornes.

Die Intumescentia lumbosacralis:

Das NOS-positive Bild der Hinterhörner weicht in den lumbalen Segmenten wenig von dem der bisher besprochenen Segmente ab. Allerdings ist die Färbung insgesamt etwas weniger deutlich, und die Zellkörper in Lamina II erscheinen noch etwas kleiner als in den höheren Segmenten.

In Lamina V am Übergang zum Funiculus dorsalis bzw. in tiefer gelegenen Segmenten am Übergang zum Sinus rhomboidalis sind einzelne kleine fusiformer Zellen markiert (s. *Abb. 25B*).

Dorsal des Canalis centralis zeigen sich in Segment L 1 und teilweise auch noch in L 2 Zellen der Columna Terni. Von diesen weisen wieder einige kleinere polygonale Zellen NOS-Markierung auf (s. *Abb. 25A*). Des weiteren fallen NOS-positive exzentrisch gelegene, fusiforme Neurone in den Laminae VII und VIII auf.

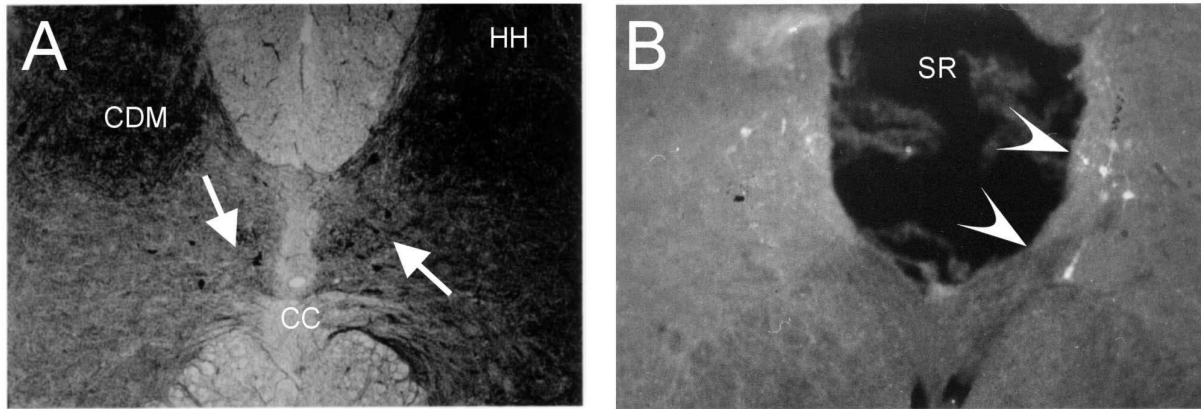


Abbildung 25: A: Segment L1 – Vereinzelt Interneurone nahe des Zentralkanales (Pfeile). B: Segment L4 – NOS-positive Neurone (Pfeilspitzen) an der Grenze zum mit dem Glykogenkörper angefüllten Sinus rhomboidalis. CC: Zentralkanal, CDM: Columna dorsalis magnocellularis, HH: Hinterhorn, SR: Sinus rhomboidalis

Nur in den lumbalen Segmenten sind die marginalen paragrisealen Zellen als Hofmannsche Großkerne und somit als Protrusion des Taubenrückemarks zu sehen. In zervikalen, thorakalen und sakralen Segmenten liegen die Neurone am Rande der weißen Substanz als Columna marginalis paragrisealis. Innerhalb dieser Hofmannschen Kerne finden sich vereinzelt NOS-markierte Neurone. Deutlicher markiert sind aber teilweise paragriseale Neurone, die sich zwischen den Vorderhörnern und den Hofmannschen Kernen finden.

Das Sakralmark:

Die Untersuchung des Sakralmarkes gestaltete sich wie schon eingangs erwähnt als etwas schwierig, da die kleinen Schnitte anfälliger sind und durch die Inkubations- und Färbeprozesse stärker in Mitleidenschaft gezogen werden.

Auffälligste makroskopische Eigenschaft ist der Sinus rhomboidalis mit dem Glykogenkörper am Übergang von Lumbal- zu Sakralmark.

Im Hinterhorn sind wieder Fasern in Lamina I und II NOS-markiert sowie kleine runde Neurone in Lamina II.

An der Grenze zum Sinus rhomboidalis sind kleine fusiforme Zellen sichtbar, die teilweise auch NOS-positive Fasern in oder durch den Glykogenkörper entsenden. Am Übergang zum dorsalen Funikulus sind wieder kleine polygonale Neurone NOS-markiert.

Innerhalb der Substantia intermedia zeigen sich insgesamt weniger NOS-positive Neurone als in den höheren Segmenten, vereinzelt sind jedoch einige dorsal des Canalis centralis und innerhalb der Laminae VII und VIII sichtbar.

Auffällig sind auch wieder NOS-markierte paragriseale Zellen, die exzentrisch in der weißen Substanz vor den Vorderhörnern liegen. Es sind kleine, dreieckige Neurone.

4.3.2 Die Verteilung von ChAT im Taubenrückenmark

Das obere Zervikalmark:

Die immunhistochemisch als ChAT-positiv markierten Zellen und Fasern des Hinterhornes liegen im Zervikalmark vor allen Dingen in der Lamina III. Es handelt sich dabei um kleine runde bis ovale Neurone und stark verzweigte Fasergeflechte. Einige dieser Faserausläufer erstrecken sich auch in tiefere Schichten des Hinterhornes bis in die Lamina IV, hier sind ebenfalls einige Zellen markiert, wenn auch nur sehr vereinzelt. Morphologisch sind diese etwas größer als die der Lamina III und ebenfalls rund (s. Abb. 26A). Die Basen der Hinterhörner sind in den oberen zervikalen Segmenten frei von ChAT-markierten Zellen. Ab C11 jedoch sind vereinzelt größere fusiforme Zellen – hauptsächlich an der Grenze zum lateralen Funiculus – zu erkennen (s. Abb. 27A und 27B).

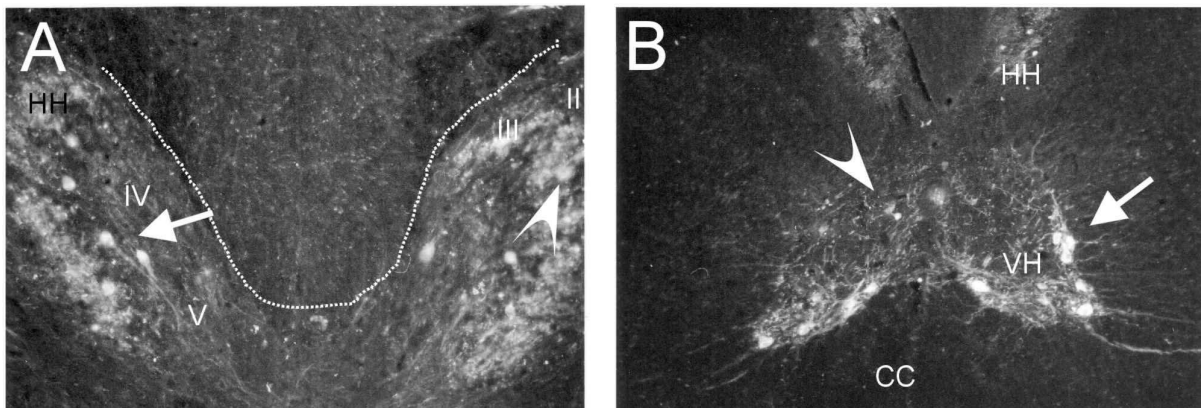


Abbildung 26: A: Segment C2 – ChAT-positive Zellkörper und Neuropil in Lamina III (Pfeilspitze) und vereinzelt auch in Lamina IV (Pfeil) des Hinterhornes. B: Segment C4 – Dorsolaterale Gruppe von Motoneuronen (Pfeil, außerdem Interneurone der Lamina VII (Pfeilspitze)). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CDM: Columna dorsalis magnocellularis, DF: Dorsaler Funiculus, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, Gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

In Höhe von C10 und C11 sind in einigen Schnitten deutlich positive Faserzüge in der Hinterwurzel und im Hinterhorn sichtbar.

In der Substantia intermedia finden sich verstreut über die gesamte Lamina VII einzeln liegende Interneurone von kleiner polygonaler Gestalt mit stark markierten Zellfortsätzen. Im

unteren Teil des Zervikalmarkes sind diese Interneurone tendenziell eher an der Mittellinie und in der Nähe des Zentralkanals lokalisiert (s. Abb. 27B).

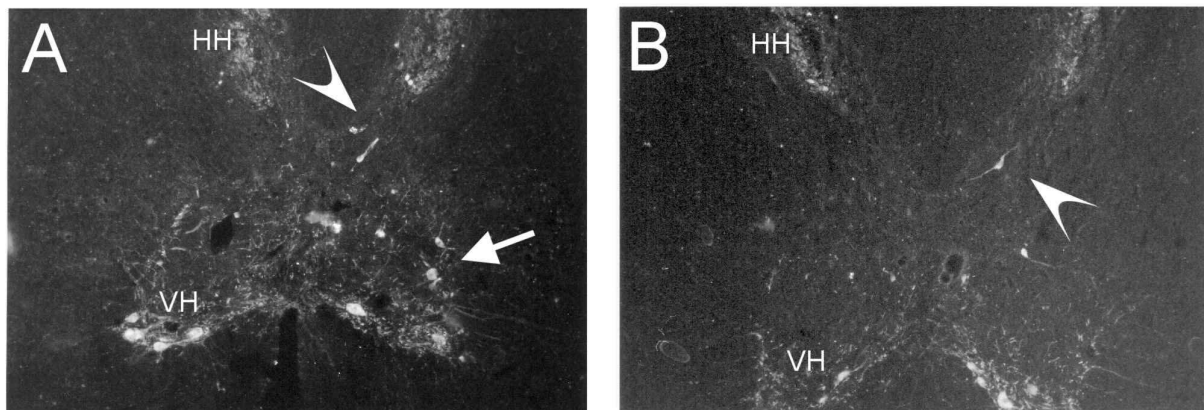


Abbildung 27: A und B: Segmente C7 und C9 – Einzelne ChAT-positive Interneurone am Fuß der Hinterhörner (Pfeilspitzen), Motoneurone auch in dorsolateraler Position (Pfeil). Einzelne markierte Interneurone nahe des Zentralkanals. HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn

Das Bild der Vorderhörner wird stark geprägt von den deutlich ChAT-positiven Motoneuronen, deren Lokalisation und Morphologie sich im Verlauf des Zervikalmarkes teilweise ändert. In oberen zervikalen Segmenten befinden sich die Motoneurone mit ihrer typischen großen, polygonalen Form vor allen Dingen im ventrolateralen Bereich der Vorderhörner. Die ebenfalls stark markierten Faserausläufer ziehen teilweise in die Vorderwurzel und teilweise durch die vordere Kommissur. In höheren zervikalen Segmenten ist im dorsolateralen Teil des Vorderhorns noch eine weitere Motoneuronengruppe sichtbar (s. Abb. 27A). Ab C11 ist eine deutliche Teilung in zwei Gruppen von Motoneuronen zu erkennen – eine dorsomedial, die andere dorsolateral. Die Letztere enthält deutlich größere und mehr Motoneurone.

Die Intumescentia cervicalis:

Auch in der Intumescentia cervicalis sind die ChAT-markierten Neurone in den Hinterhörnern wieder hauptsächlich in der Lamina III zu finden. Es handelt sich wieder um kleine runde Zellen, von denen man auch einige markierte in der Lamina IV erkennen kann. Des Weiteren werden die beiden Laminae von einem dichten Plexus ChAT-markierter Fasern durchzogen (s. Abb. 28A). Der Fasergehalt schwankt leicht mit den verschiedenen Segmenten. Bis C13 nimmt er stetig ab, danach hat er wieder eine Tendenz, mehr zu werden. Am Fuß des Hinterhorns in Lamina V zeigen sich vereinzelt ebenfalls ChAT-positive Neurone, allerdings sind diese etwas größer und von polygonaler Gestalt. Sie liegen hauptsächlich exzentrisch an

den Grenzen zur weißen Substanz. Um oder in der Umgebung der Columna dorsalis magnocellularis finden sich keine ChAT-markierten Strukturen.

Die Substantia intermedia weist in den Laminae VI und VIII etliche kleine ChAT-positive, einzeln gelegene Interneurone auf, die vorwiegend in der Nähe der Mittellinie und des Zentralkanals sichtbar sind. Sie imponieren als fusiforme oder ovale Zellen. Lamina VII ist hingegen weitestgehend ausgespart von ChAT-markierten Neuronen (s. Abb. 28A). Dies ist das typische Bild der Segmente C12 und C13.

Spätestens ab C14 erkennt man eindeutig die präganglionären sympathischen Zellen der Columna Terni, die stark ChAT-markiert sind. Sie liegen dorsal des Zentralkanals und reichen teilweise sogar bis an diesen heran. Es sind mittelgroße runde oder ovale Neurone, deren morphologisches Bild innerhalb der Zellgruppe relativ einheitlich ist (s. Abb. 28A und 28B). Auch in Höhe von C14 bis T1 finden sich außerhalb der Columna Terni noch einzelne markierte fusiforme Interneurone in den Laminae VII und VIII – sie liegen mehrheitlich exzentrisch.

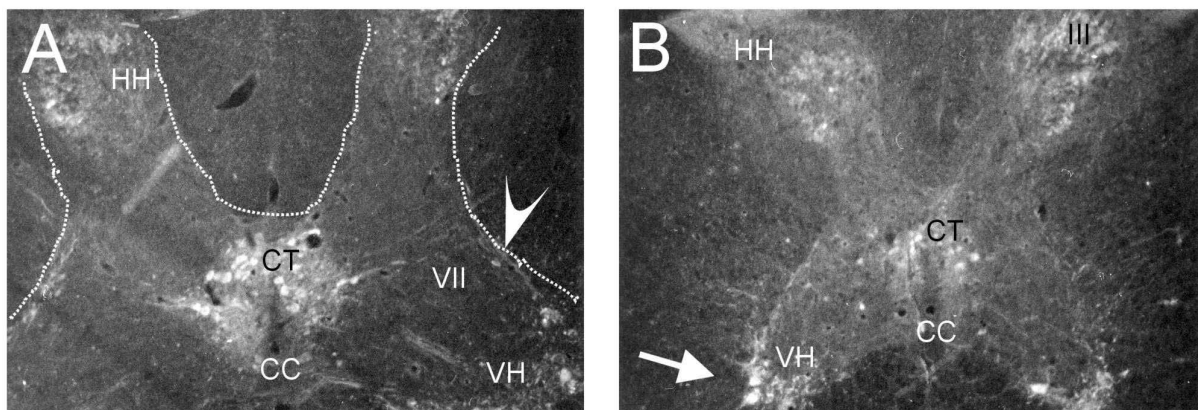


Abbildung 28 A: Segment C13 – Neben den ChAT-positiven präganglionären Neuronen der Columna Terni sind vereinzelt exzentrisch gelegene Interneurone in der Lamina VII auszumachen (Pfeilspitze). B: Segment T1 – Die Motoneurone sind nur noch in einer Lokalisation nachweisbar (Pfeil). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

Die Vorderhörner sind in der Intumescentia cervicalis stark ausgeprägt, es zeigt sich deutlich eine Zweiteilung der Gruppe der Motoneurone, beide sind klar ChAT-positiv. Die eine Gruppe befindet sich im ventrolateralen Teil des Vorderhornes. Die Motoneurone sind sehr groß und polygonal, ihre Faserausläufer ziehen hauptsächlich durch die Vorderwurzel. Ventromedial liegt eine kleinere Gruppe von Motoneuronen – sowohl von ihrer Anzahl als auch von ihrer Form her. Ein Großteil ihrer Zellfortsätze zieht durch die Commissura anterior.

Ab T1 vereinigen sich die beiden Gruppen wieder zu einer, die Gesamtzahl der Motoneurone nimmt deutlich ab (s. *Abb. 28B*).

Das Thorakalmark:

In den thorakalen Segmenten finden sich ChAT-positive Strukturen im Hinterhorn hauptsächlich in der Lamina III. Lamina IV und V sind tendenziell eher ausgespart. Es handelt sich wieder um die typischen kleinen runden Neurone und das umgebende dichte Fasergeflecht (s. *Abb. 29B*).

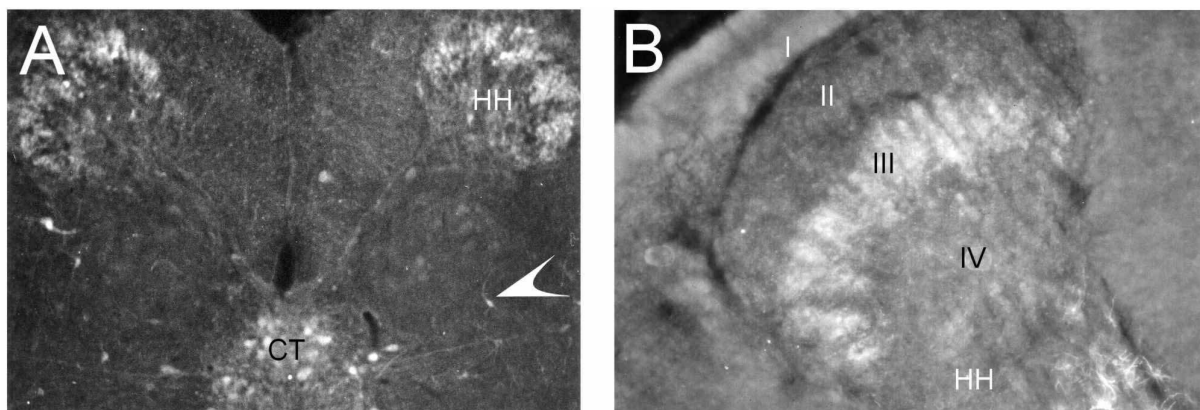


Abbildung 29: A: Segment T6 – Kleines, exzentrisch gelegenes ChAT-positives Interneuron (Pfeilspitze) in Lamina VI und ChAT-markierte Neurone der Columna Terni. B: Segment T6 – Laminäre Organisation des Hinterhorns mit ChAT-Aktivität auf Lamina III konzentriert. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, HH: Hinterhorn

In der Substantia intermedia beherrschen die ChAT-markierten Neurone der Columna Terni dorsal des Zentralkanales das Bild. Sie unterscheiden sich morphologisch nicht von den Zellen der oberen Segmente, es sind kleine runde bis ovale Neurone, die alle deutlich markiert sind (s. *Abb. 30A und 30B*). Außerhalb der Columna Terni sind innerhalb der Lamina VI und VII vereinzelte fusiforme oder polygonale Interneurone sichtbar, die ChAT-positiv sind. Sie liegen meistens exzentrisch am Rande der weißen Substanz (s. *Abb. 29A*).

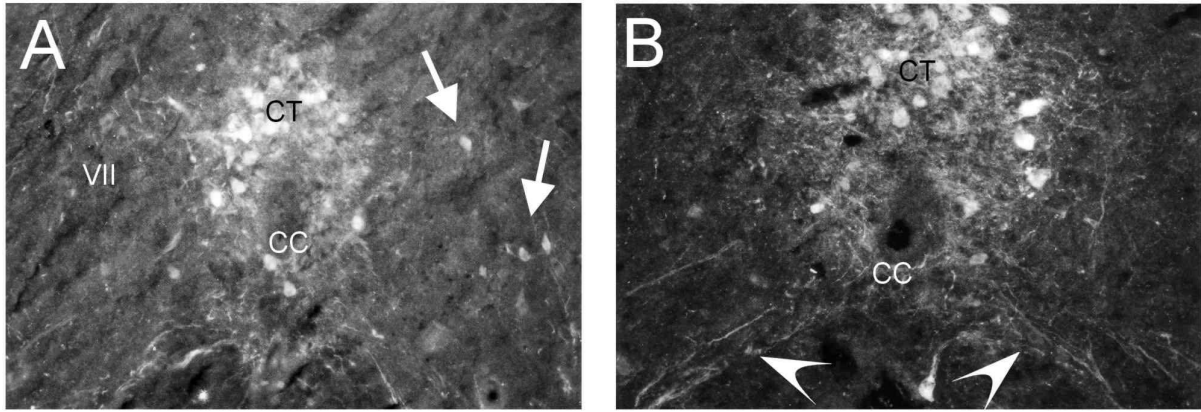


Abbildung 30: A und B: Segmente T2 und T5 – Deutliche ChAT-Aktivität innerhalb der Columna Terni, daneben kleine Interneurone (Pfeile) und durch die vordere Kommissur ziehende Axone der Motoneurone (Pfeilspitzen). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni

Im Vorderhorn nimmt die Zahl und die Größe der Motoneurone, die alle stark ChAT-markiert sind, in den thorakalen Segmenten deutlich ab. Es findet sich nur noch eine Gruppe von Motoneuronen, die an der Spitze der Vorderhörner lokalisiert ist.

Intumescentia lumbosacralis:

Auch in Höhe der Intumescentia lumbosacralis sieht man in der Lamina III des Hinterhorns wieder kleine runde Neurone und Faserplexus mit ChAT-markiert. Des weiteren finden sich vereinzelte Zellen in den tieferen Schichten der Hinterhörner – in Lamina IV und V. Diese sind aber nicht so zahlreich wie in den zervikalen Segmenten (s. Abb. 31A).

Die präganglionären Zellen der Columna Terni sind bis L 2 oder L3 anzutreffen, in der Intumescentia sind somit keine mehr sichtbar. Statt dessen finden sich wieder in der Nähe des Zentralkanals mittelgroße fusiforme Interneurone, die jetzt auch häufig ventral des Kanals liegen.

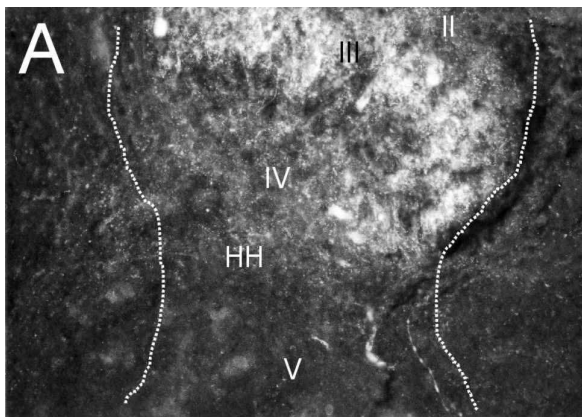


Abbildung 31: A: Segment L1 – Einzelne ChAT-positive Zellen in Laminae IV und V des Hinterhorns neben der typischen Aktivität in Lamina III. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, HH: Hinterhorn, gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

Im Vorderhorn ist wieder eine Aufteilung der ChAT-positiven Motoneurone in zwei Gruppen sichtbar, die eine ventromedial, die andere ventrolateral. Die Größe der Motoneurone nimmt im Vergleich mit den thorakalen Segmenten deutlich zu, ihre typische polygonale Gestalt bleibt unverändert. Die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen ist jedoch weiterhin relativ gering und bleibt unter der der Intumescentia cervicalis. Von den Motoneuronen aus ziehen ChAT-markierte Fasern in die Vorderwurzel und durch die Commissura anterior.

Sakralmark:

Das Sakralmark ist auch für die Markierung mit ChAT wieder nur schwer zu beurteilen, da es sowohl durch die Herausforderung der Präparation als auch durch die langwierigen Inkubationsprozeduren oftmals relativ zerstört ist.

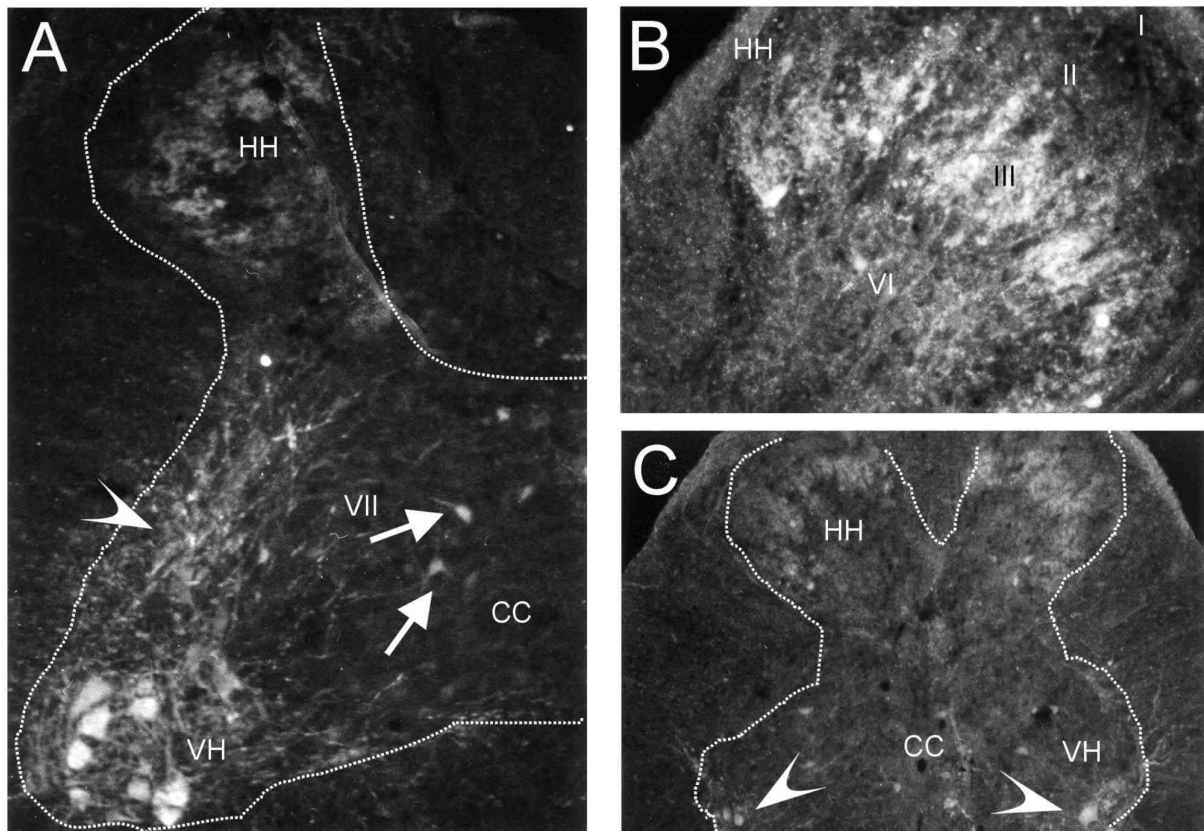


Abbildung 32: A: Segment SC4 – Übersicht über ChAT-Markierung im Sakralmark mit kleineren Motoneuronen auch an dorsolateraler Position (Pfeilspitze) und Interneuronen in Lamina VII (Pfeile). B: Segment SC7 – Neuropil und Somata sind nur noch schwer zu differenzieren. C: SC5 – Anzahl und Größe der Motoneurone nehmen ab. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, CC: Zentralkanal, HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn, gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz.

In den Hinterhörnern lassen sich einzelne Neurone oder Fasern kaum noch ausmachen, insgesamt ist aber auch hier wieder die Lamina III diejenige, die deutlich ChAT-markierte

Strukturen enthält (s. Abb. 32B). Die Zellsäule mit präganglionären parasymphatischen Neuronen ist meist ab SC6/ SC7 zu erkennen, die Zellen liegen wie die der Columna Terni dorsal des Zentralkanales.

In den Vorderhörnern finden sich weiterhin ChAT-positive Motoneurone mit deutlichen Faserausläufern zur Vorderwurzel aber auch zur anterioren Kommissur und dorsalwärts gerichtet. Die Anzahl und Größe der Motoneurone nimmt stetig ab – ebenso wie die Gesamtgröße des Rückenmarkquerschnittes (s. Abb. 32A und 32C). Daneben finden sich auch in diesem Abschnitt des Taubenrückenmarkes regelmäßig ChAT-markierte Interneurone in der Lamina VII (s. Abb. 32A).

4.4 Kolokalisationsexperimente

Insgesamt ist festzuhalten, dass im Rückenmark sowohl von Huhn als auch von Taube die beiden Neurotransmitter Cholinacetyltransferase und Stickoxidsynthase kaum kolokalisiert zu sein scheinen. Es konnten im Rahmen der Kolokalisationsexperimente einige wenige Schnitte gefunden werden, die eindeutig doppelt markierte Zellen aufwiesen. Die Anzahl dieser Zellen beschränkte sich aber auf circa 15–20 Neurone pro untersuchtes Rückenmark, die sich sowohl durch die immunhistochemischen Methode mit der Fluoreszenzmarkierung als ChAT-positiv als auch durch die enzymhistochemische Methode der NADPH Diaphorase als NOS-positiv darstellten.

Schon der erste Blick erzeugte den Eindruck, dass die beiden Neurotransmitter in unterschiedlichen Neuronengruppen des jeweiligen Rückenmarkes vorhanden sind.

In den Hinterhörnern sind ChAT-markierte Strukturen vor allen Dingen in den tieferen Laminae III und IV zu finden, während NOS-positive Neurone und Fasern hauptsächlich in den Laminae I und II sichtbar sind.

In der Substantia intermedia ist die ChAT-Markierung am auffälligsten in den präganglionären Neuronen der Columna Terni und der parasymphatischen Zellgruppe. In diesen Neuronengruppen erscheinen kaum NOS-markierte Zellen. Bei den wenigen, die vorhanden sind, ist die Markierung teilweise schwach und somit nur fraglich positiv.

Die Laminae VI und VII der Substantia intermedia weisen für beide Neurotransmitter als positiv markierte vereinzelte Interneurone auf. Diese Interneurone sind aber so gut wie nie

identisch, auch wenn sie sich morphologisch durchaus als ähnliche Neurone präsentieren und man somit von einer Kodistribution der beiden Neurotransmitter ausgehen könnte. ChAT-positive Zellen liegen in dieser Region anscheinend häufiger exzentrisch und am Rande der weißen Substanz, wohingegen für die NOS-markierten Zellen eine Tendenz auszumachen ist, in Nähe der Mittellinie und des Zentralkanals lokalisiert zu sein. Die Anhäufung von ChAT-markierten Neuronen um den Zentralkanal ist weniger auffällig als die der NOS-positiven, jedoch ist dies die Region in der verhältnismäßig häufig doppelt markierte Neurone auszumachen sind.

Die Vorderhörner werden hauptsächlich von den ChAT-positiven Motoneuronen beherrscht. NOS Markierungen kommen in dieser Region in sehr viel geringerem Umfang vor. Die Neurone, die sich als NOS-positiv darstellen, haben in der Regel eine von den Motoneuronen deutlich abweichende Morphologie: Sie sind häufig klein und fusiform im Gegensatz zu den großen polygonalen Motoneuronen.

Somit ergeben sich wenig eindeutige Möglichkeiten für eine Kolokalisation. Dennoch ist diese vereinzelt anzutreffen, auf die Beispiele soll jetzt eingegangen werden.

4.4.1 Beispiele für gefundene Kolokalisation

Huhn:

In einigen Experimenten stellen sich Zellen im Rückenmark des Huhnes als doppelt markiert für Cholinacetyltransferase und Stickoxidsynthase dar.

Im Zervikalmark finden sich in Lamina III des Hinterhornes wenige kleine für NOS und ChAT-positive Neurone. Vereinzelt sind auch durch das Hinterhorn ziehende Faserstränge doppelt markiert. In Lamina VII sind – wenn auch sehr selten – Interneurone sowohl NOS- als auch ChAT-positiv. Ansonsten gibt es in der Substantia intermedia in der Nähe des Zentralkanales kleine runde oder auch fusiforme Neurone, in denen NOS und ChAT kolokalisiert ist.

In den thorakalen Segmenten stellen sich einige wenige mittelgroße runde Zellen der präganglionären Columna Ternti neben ihrer eindeutigen ChAT-Markierung als NOS-positiv dar (s. Abb. 35, 36 und 37). Ebenso kommt unter den nicht zur Gruppe der präganglionären

Neurone gehörenden Zellen in der Nähe des Zentralkanales eine Doppelmarkierung für ChAT und NOS vor (s. Abb. 33 und 34).

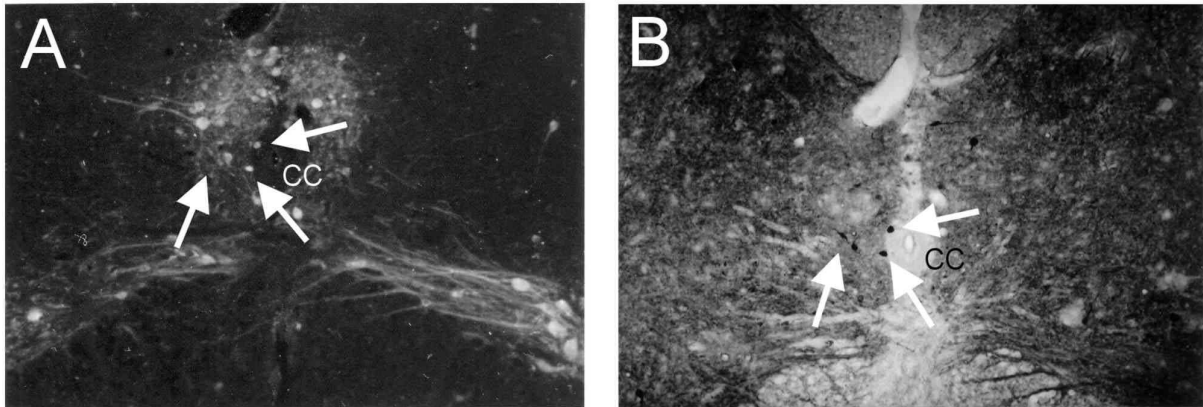


Abbildung 33: A und B: Segment T7 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Neurone um den Zentralkanal (Pfeile). CC: Zentralkanal

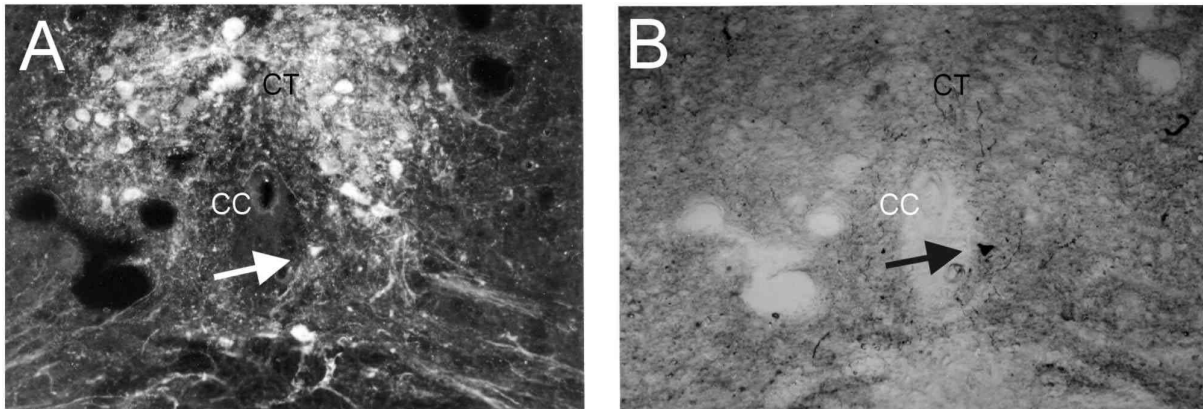


Abbildung 34: A und B: Segment T7 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markiertes Neuron ventral des Zentralkanales (Pfeil). CC: Zentralkanal

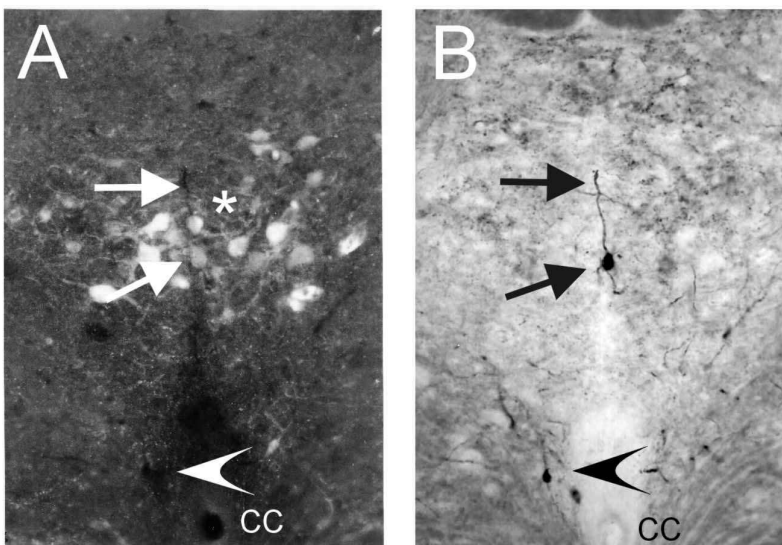


Abbildung 35: A und B: Segment S5 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markiertes Neuron (Pfeile, Soma und Axon) innerhalb der Zellsäule der präganglionären autonomen Neurone, um Zentralkanal lediglich NADPH-positive Neurone (Pfeilspitze). CC: Zentralkanal, *: Zellsäule der präganglionären autonomen Neurone

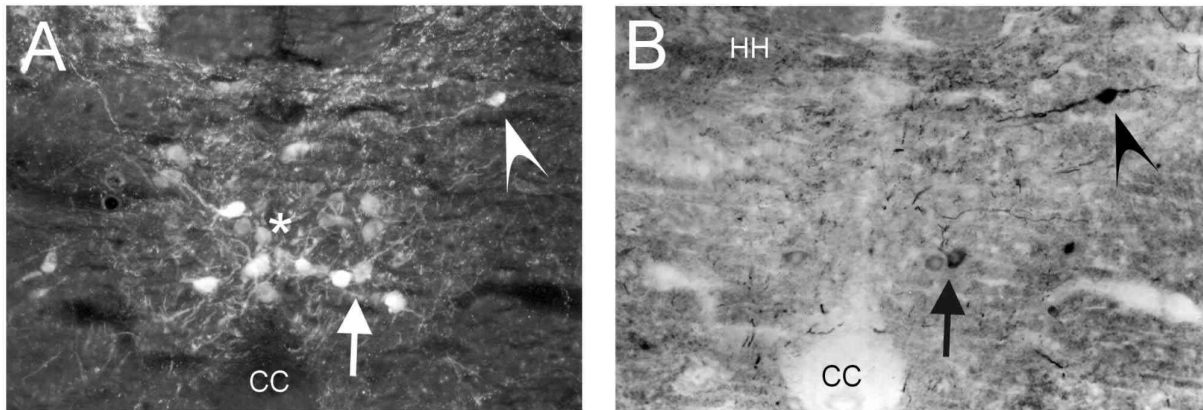


Abbildung 36: A und B: Segment S9 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppel markierte Neurone (Pfeil) innerhalb der Zellsäule der präganglionären autonomen Neurone und in Lamina VI (Pfeilspitze). CC: Zentralkanal, *: Zellsäule der präganglionären autonomen Neurone

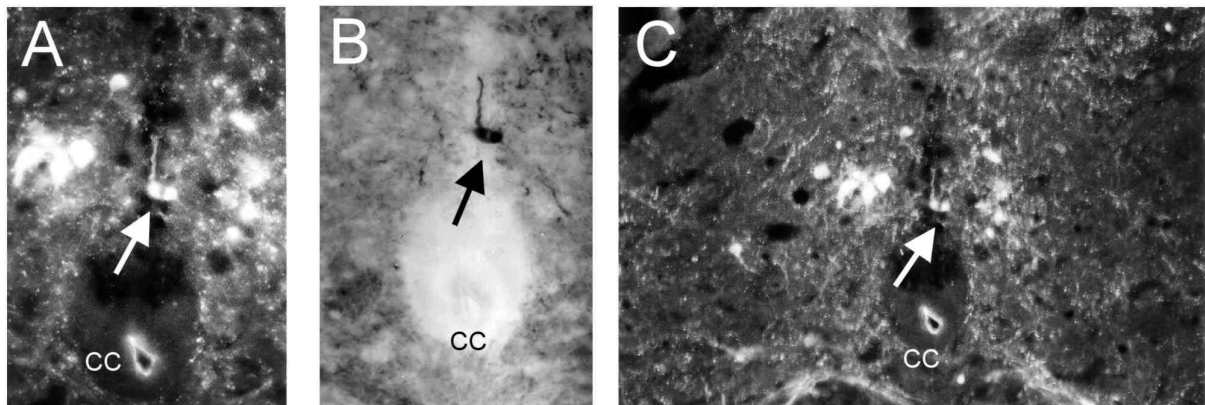


Abbildung 37: A und B: Segment S11 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppel markiertes Neuron (Pfeil) innerhalb der Zellsäule der präganglionären autonomen Neurone. C: Segment S11 – Übersicht. CC: Zentralkanal

In den sakralen Segmenten sind in den Hinterhörnern einige kleine runde Neurone in Lamina III sichtbar, die eine Doppelmarkierung aufweisen - ebenso wie doppel markierte Fasern in derselben Schicht. Die Substantia intermedia weist ebenfalls vereinzelt kleine fusiforme oder runde Interneurone in Lamina VII nahe dem Zentralkanal auf, die sich sowohl ChAT- als auch NOS-positiv darstellen (s. Abb. 38, 39 und 40).

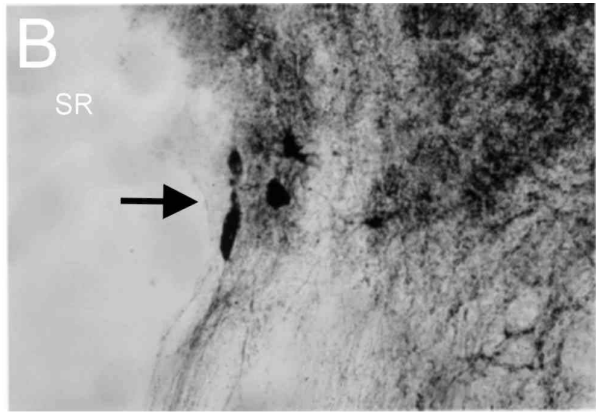
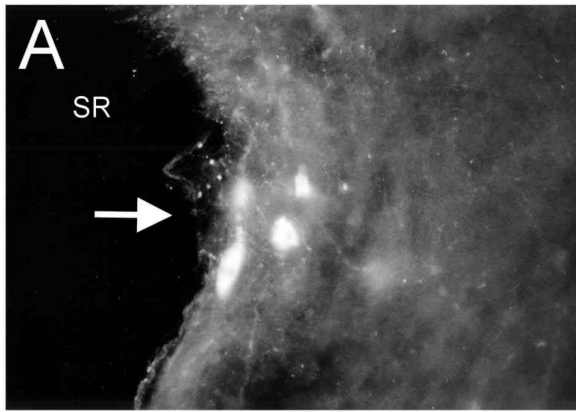


Abbildung 38: A und B: Segment S3-4 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Interneurone (Pfeil) an der Grenze zum mit dem Glykogenkörper ausgefüllten Sinus rhomboidalis. SR: *Sinus rhomboidalis*

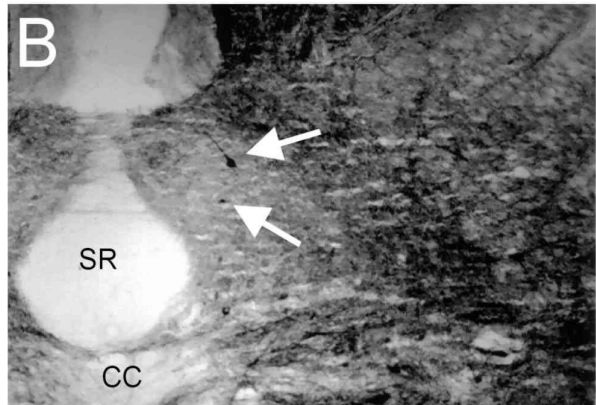
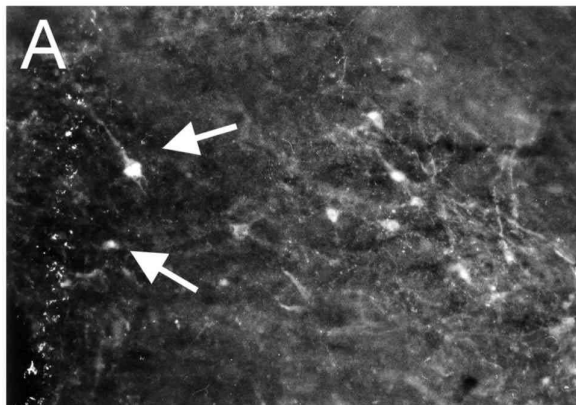


Abbildung 39: A und B: Segment S7-8 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Interneurone (Pfeile) nahe des Sinus rhomboidalis. CC: Zentralkanal, SR: *Sinus rhomboidalis*

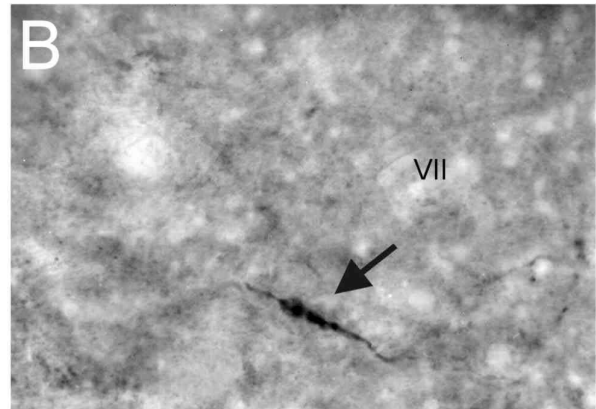
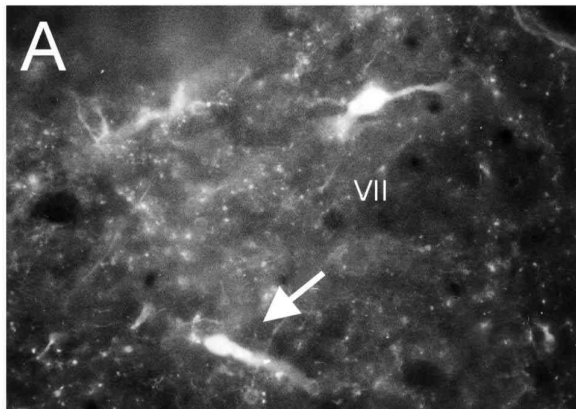


Abbildung 40: A und B: Segment S9 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markiertes Interneuron (Pfeil) innerhalb der Lamina VII. Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz

Im Bereich der Vorderhörner hingegen konnte im Rahmen dieser Experimente bei keinem der untersuchten Tiere eine Doppelmarkierung für ChAT und NOS dargestellt werden, es zeigen sich lediglich die bereits beschriebenen NOS-positiven Neurone innerhalb der Gruppe der Motoneurone (s. Abb. 41 und 42).

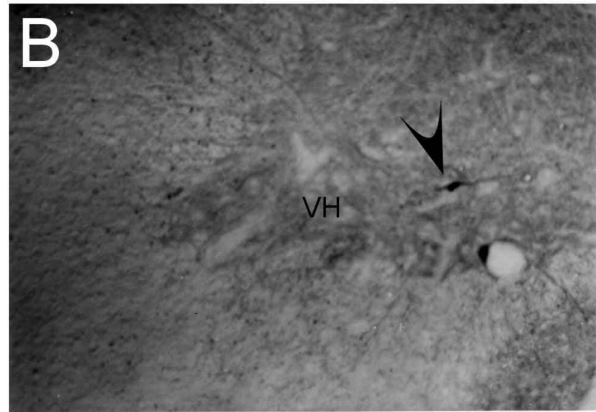
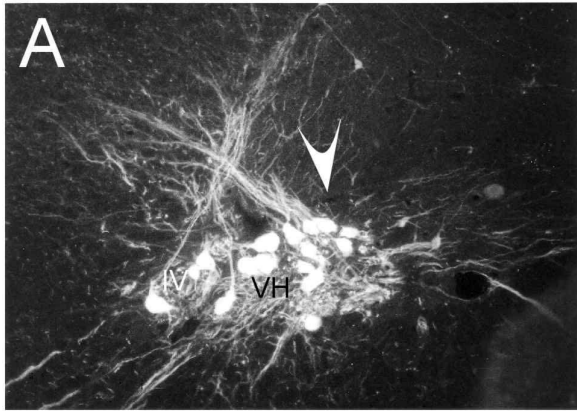


Abbildung 41: A und B: Segment T7 – Keine Kolokalisation innerhalb des Vorderhornes, lediglich NADPH-markiertes Interneuron (Pfeilspitze) sichtbar. VH: Vorderhorn

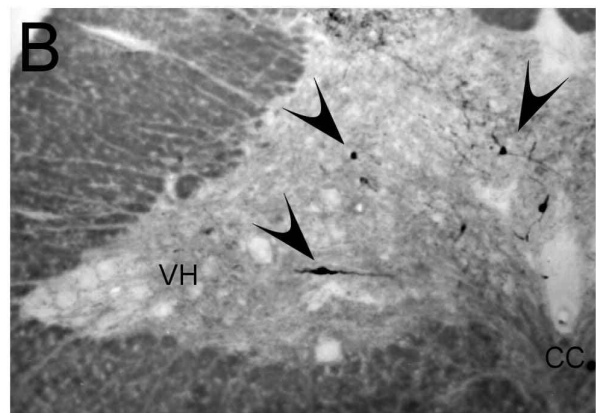
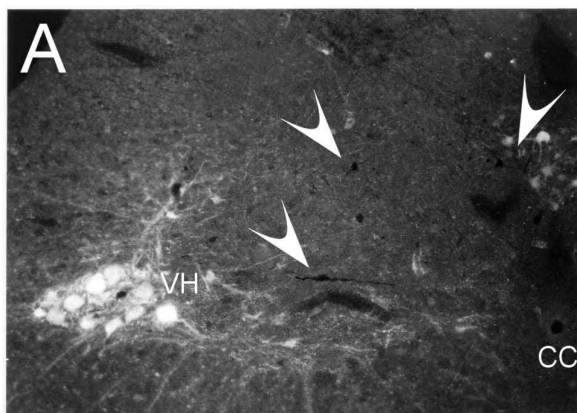


Abbildung 42: A und B: Segment S5 – Keine Kolokalisation im Bereich des Vorderhornes, einfach NADPH-markierte Interneurone (Pfeilspitze) gut sichtbar. CC: Zentralkanal, VH: Vorderhorn

Taube:

In den Laminae I – III der Hinterhörner ist bei der Taube, wie auch schon beim Huhn so gut wie keine Kolokalisation der ChAT- und NOS-markierten Strukturen auszumachen (s. Abb. 45, 48 und 49). Im Zervikalmark sind vereinzelt Interneurone der Substantia intermedia (Lamina VI) sichtbar, die sich sowohl als ChAT- als auch als NOS-markiert darstellen. Es handelt sich dabei zumeist um mittelgroße dreieckige oder fusiforme Zellen, die eher in den oberen Abschnitten der Lamina VI lokalisiert sind (s. Abb. 46). Ebenfalls in der Substantia intermedia befinden sich doppelt markierte Zellen, die aber eher zu den in der Nähe des Zentralkanales liegenden Neuronen gehören. Im tiefen Hinterhorn – Lamina V – sind auch teilweise fusiforme mittelgroße Neurone sichtbar, die ChAT und NOS-positiv sind (s. Abb. 43 und 44).

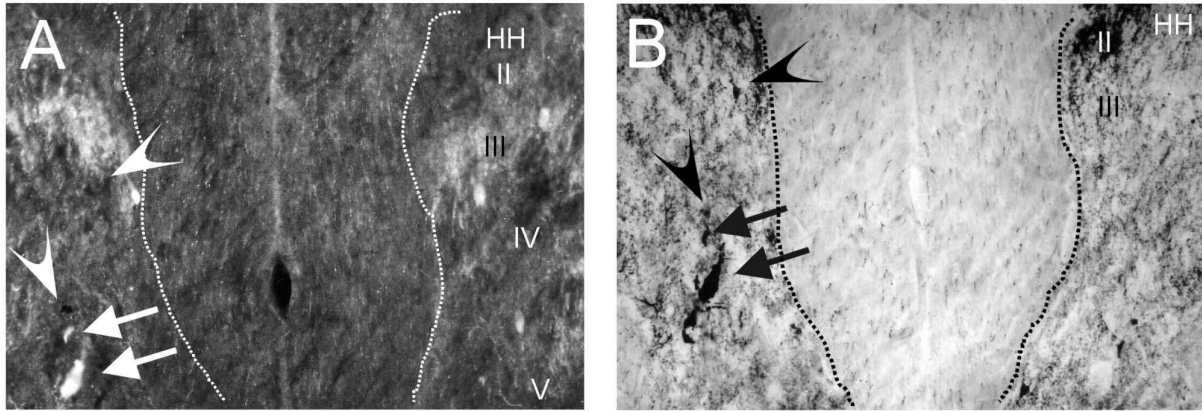


Abbildung 43: A und B: Segment T3 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Neurone (Pfeile) in Lamina V des Hinterhorns. Daneben einfach NADPH-positive Zellkörper (Pfeilspitzen). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, HH: Hinterhorn, gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zur weißen Substanz

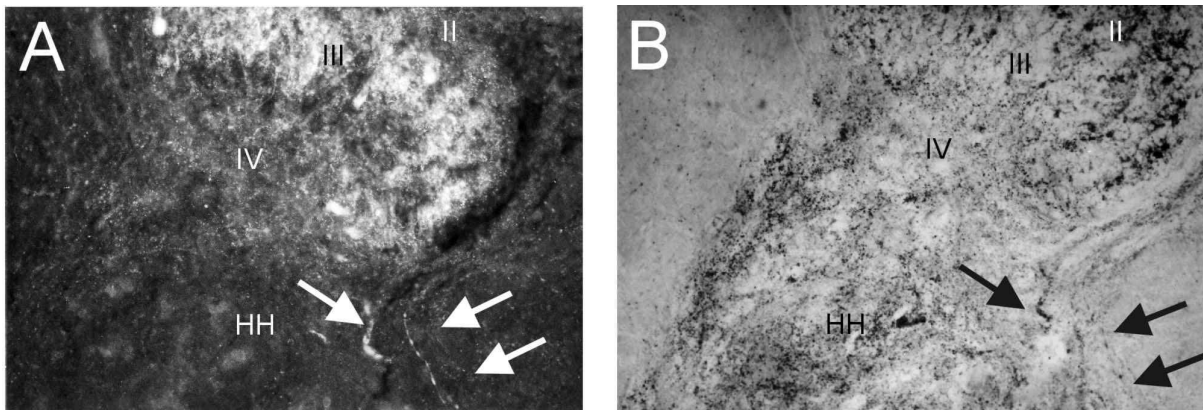


Abbildung 44: A und B: Segment L1 – ChAT- und NADPH-markierter Faserzug im Bereich des Hinterhorns (Pfeile). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, HH: Hinterhorn

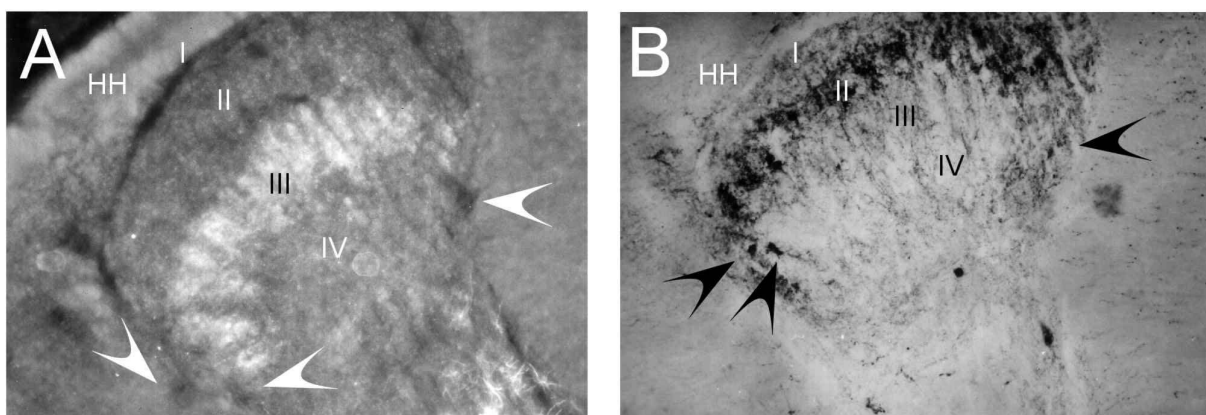


Abbildung 45: A und B: Segment T6 – Keine Kollokalisierung innerhalb dieses Hinterhorns, gut erkennbare ChAT-Aktivität in Lamina III, sowie NADPH-Diaphorase-Markierung in Lamina II und einfach NADPH-markierte Neurone (Pfeilspitzen). Römische Ziffern markieren die unterschiedlichen Laminae der grauen Substanz, HH: Hinterhorn

Die thorakalen Segmente weisen verhältnismäßig mehr doppelt markierte Neurone auf als die übrigen Anteile des Tauben Rückenmarkes. Dazu tragen zum einen Zellen bei, die sich in der

Columna Terni befinden und sowohl ChAT- als auch NOS Markierungen aufweisen. Es sind meist die am häufigsten vorkommenden mittelgroßen Zellen von rundem Aspekt (s. *Abb. 46 und 47*). Zum anderen befinden sich mehrere doppelt markierte Neurone an den Basen der Hinterhörner. Sie liegen meistens exzentrisch in der Lamina V an der Grenze zum medialen oder auch lateralen Funiculus und stellen sich als kleine fusiforme bipolare Neurone dar (s. *Abb. 48 und 49*). Auch eine doppelt markierte Faser mit perlschnurartigen Verdickungen am Rande des Hinterhornes von L1 war in einem Schnitt zu entdecken (s. *Abb. 44*).

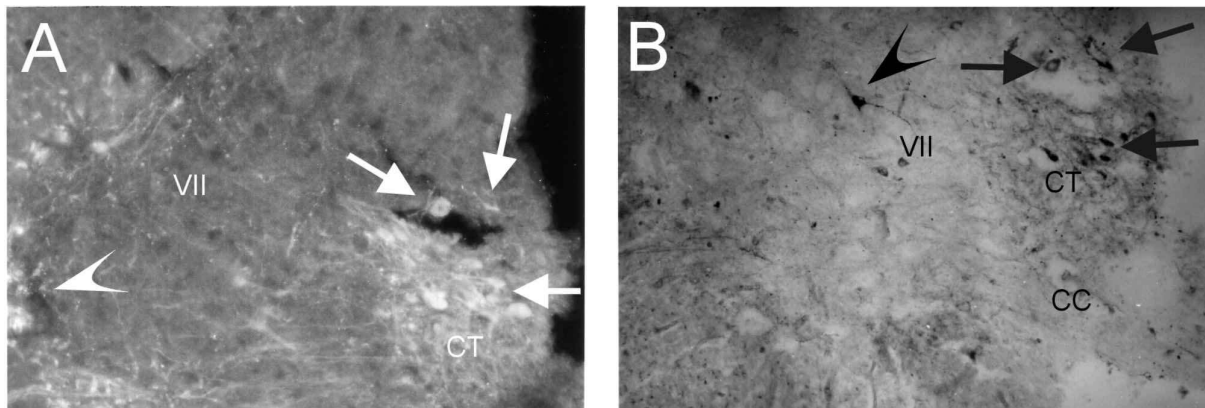


Abbildung 46: A und B: Segment C14 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Neurone (Pfeile) innerhalb der Columna Terni dorsal des Zentralkanals, daneben einfach NADPH-positives Interneuron in Lamina VII (Pfeilspitzen). CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni

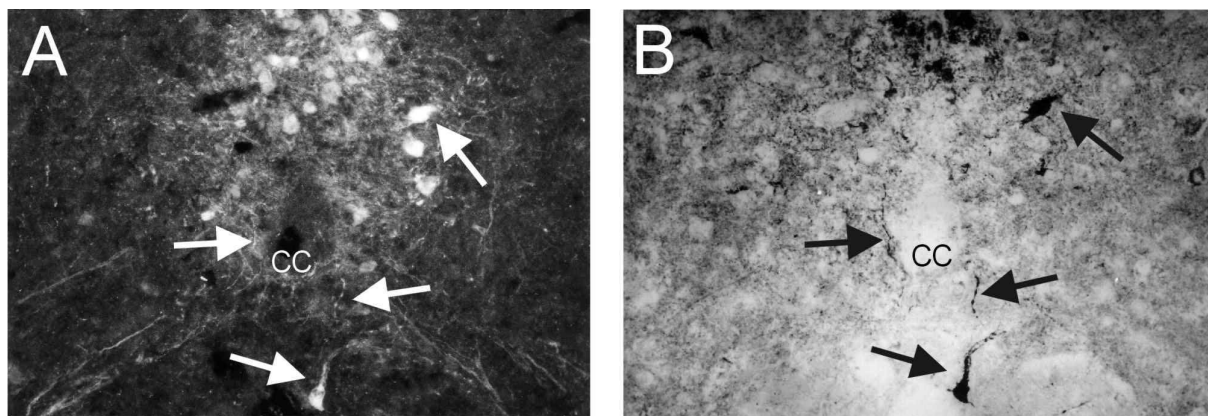


Abbildung 47: A und B: Segment T5 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Neurone sowie Fasern (Pfeile) um den Zentralkanal außerhalb der Columna Terni. CC: Zentralkanal

Die Beurteilung der Kolokalisation in den lumbosakralen Segmenten gestaltet sich wieder schwieriger. Sichtbar sind jedoch ganz vereinzelt Interneurone der Lamina VII, die für ChAT und für NOS-positiv sind (s. *Abb. 50*). Die mittelgroßen Neurone sind wieder in den hinteren Anteilen der Substantia VI lokalisiert mit Ausrichtung (auch der Faserausläufer) auf das Hinterhorn.

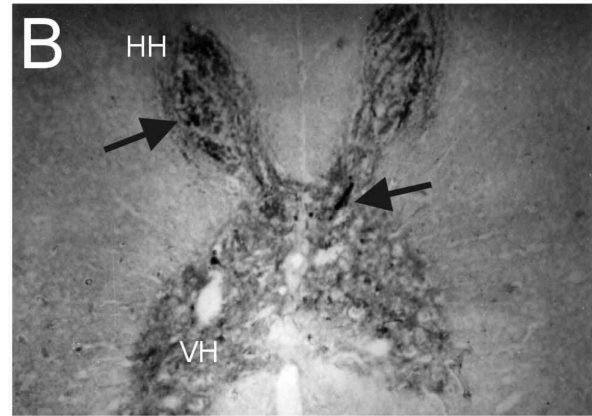
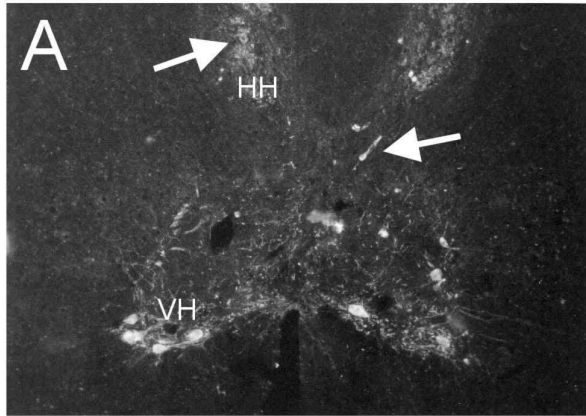


Abbildung 48: A und B: Segment C7 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Neurone (Pfeile) an der Basis des Hinterhornes sowie in Lamina III. *HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn*

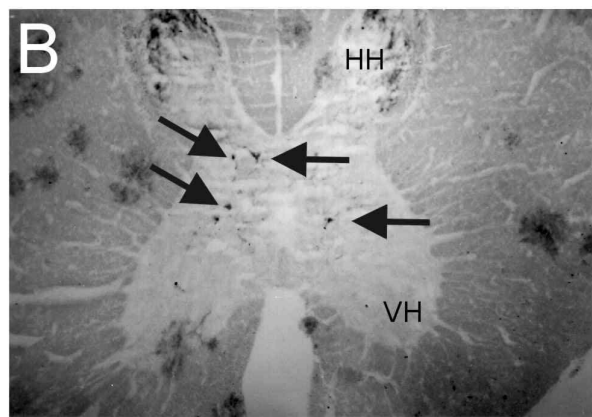
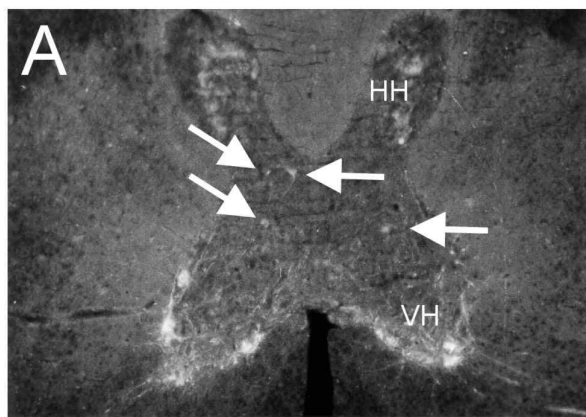


Abbildung 49: A und B: Segment C7 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markierte Interneurone (Pfeile) innerhalb der Lamina VII, an der Basis des Hinterhornes sowie in Lamina III. *HH: Hinterhorn, VH: Vorderhorn*

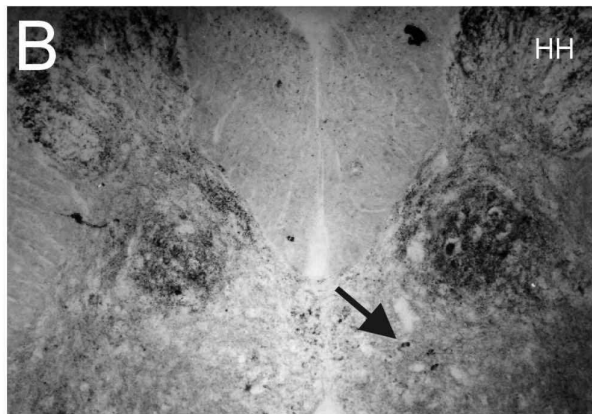
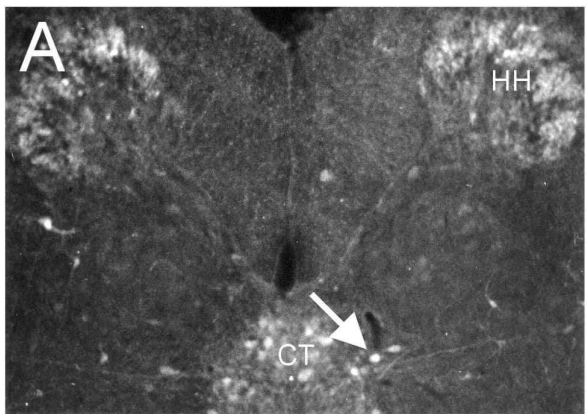


Abbildung 50: A und B: Segment T6 – Für ChAT und NADPH Diaphorase doppelt markiertes Interneuron (Pfeil) exzentrisch der Columna Termini in Lamina VII. *CT: Columna Termini, HH: Hinterhorn*

4.5 Das embryonale Hühnerrückenmark

Die embryonalen Hühner wurden in verschiedenen Bebrütungsstadien sowohl mit immunhistochemischen als auch mit enzymhistochemischen Methoden untersucht. Zur Identifizierung der neuronalen Strukturen dienten die Arbeiten von Patten (1920) sowie Hamburger und Hamilton (1992).

Der jüngste Embryo stammte vom 8. Bebrütungstag, somit E8. Bereits von diesem Stadium an konnten Anzeichen sowohl von NOS- als auch von ChAT-Aktivität im Rückenmark nachgewiesen werden, wenn auch die Markierungen teilweise noch sehr schwach und daher relativ schlecht zu interpretieren sind.

Die einzelnen untersuchten Altersstadien sollen getrennt besprochen werden.

4.5.1 E8

Lokalisation von NADPH Diaphorase:

NADPH Diaphorase-positive Strukturen zeigen sich in diesem Stadium am dorsolateralen Rand des Rückenmarkes innerhalb der weißen Substanz. Sie stellen sich als dichtes Neuropil dar, einzelne Neurone sind nicht auszumachen. Eine zweite Lokalisation ist die Region der Vorderhörner ventrolateral des Zentralkanals. Auch hier sind keine einzelnen Zellen dargestellt, es ist vielmehr eine markierte, wolkige Struktur sichtbar. Dieses Verteilungsmuster ist in höheren, zervikalen Anteilen wie auch in tieferen Rückenmarksgebieten zu finden (s. *Abb. 51*). Immunhistochemisch konnten in diesem Entwicklungsstadium noch keine NOS-haltigen Strukturen dargestellt werden.

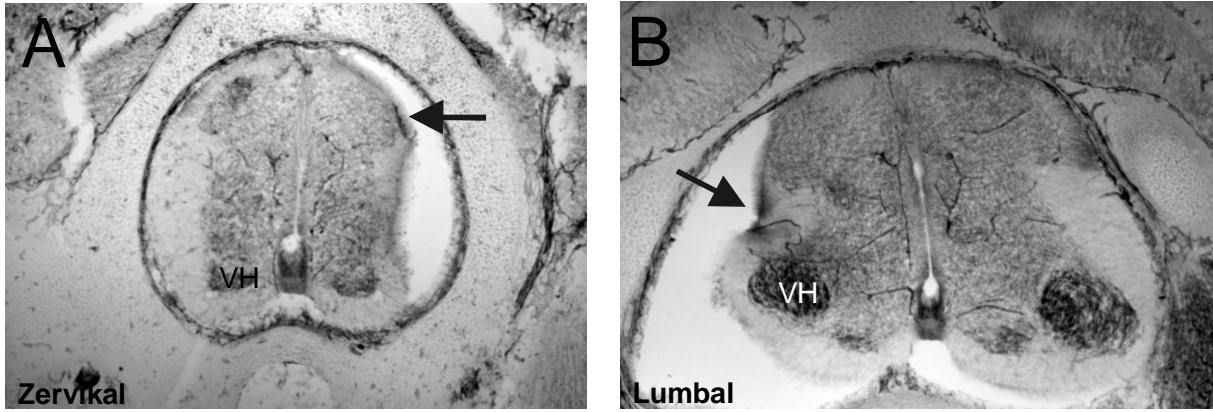


Abbildung 51: Verteilung von NADPH Diaphorase markierten Strukturen in zervikalen (A) und lumbalen (B) Anteilen des embryonalen Hühnerrückenmarkes im Stadium E8. Neuropil dorsolateral in der weißen Substanz (Pfeile) und im Vorderhorn. *VH: Vorderhorn*

Lokalisation von ChAT:

Für die Immunfluoreszenzmarkierung nach Inkubation gegen ChAT ergibt sich für Hühnerembryonen im Alter E8 eine deutliche Anfärbung im Bereich der Vorderhörner (s. *Abb. 50A*). Die Markierung dehnt sich auf die gesamte laterale Zellsäule aus, ohne dass einzelne Strukturen diskriminierbar wären. In lumbalen Segmenten tritt auch eine diffuse ChAT-positive Markierung in den Hinterhörnern auf (s. *Abb. 50B*).

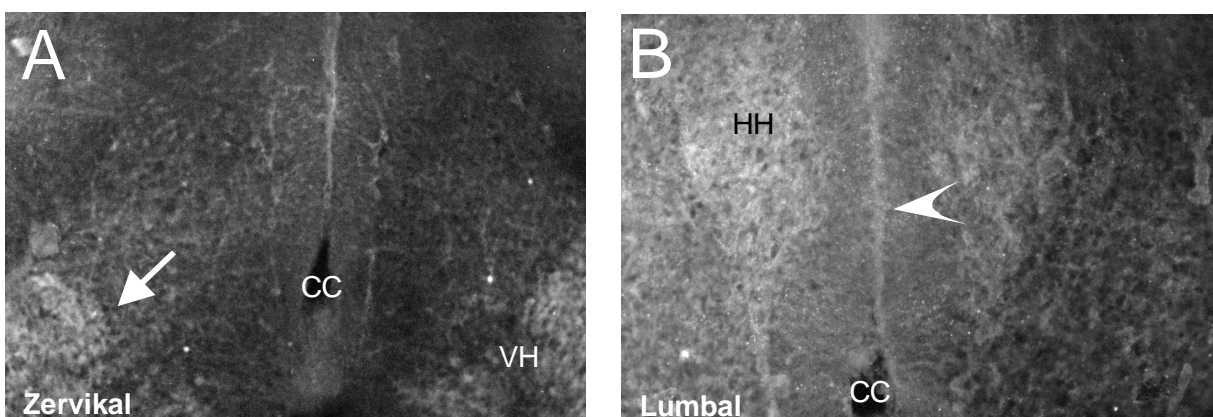


Abbildung 52: A und B: ChAT-positiv markierte Strukturen im zervikalen und lumbalen embryonalen Hühnerrückenmark (E8) im Bereich der Vorderhörner (Pfeil) und im Hinterhorn. *VH: Vorderhorn, HH: Hinterhorn, CC: Zentralkanal*

4.5.2 E15

Lokalisation von NADPH Diaphorase/NOS:

Am 15. Bebrütungstag sind deutlich durch NADPH Diaphorase und NOS Immunfluoreszenz markierte Neurone sichtbar. Diese befinden sich hauptsächlich in der Region um den Zentralkanal als großer Zellhaufen – sowohl ventral als auch dorsal davon. Sie sind jedoch auch über die gesamte Substantia intermedia verstreut. In den Hinterhörnern sind keine NADPH Diaphorase bzw. NOS-immunoreaktiven Strukturen zu erkennen. Dieses Bild zeigt sich von den oberen zervikalen Regionen über die thorakalen bis in die unteren sakralen Anteile (s. Abb. 53).

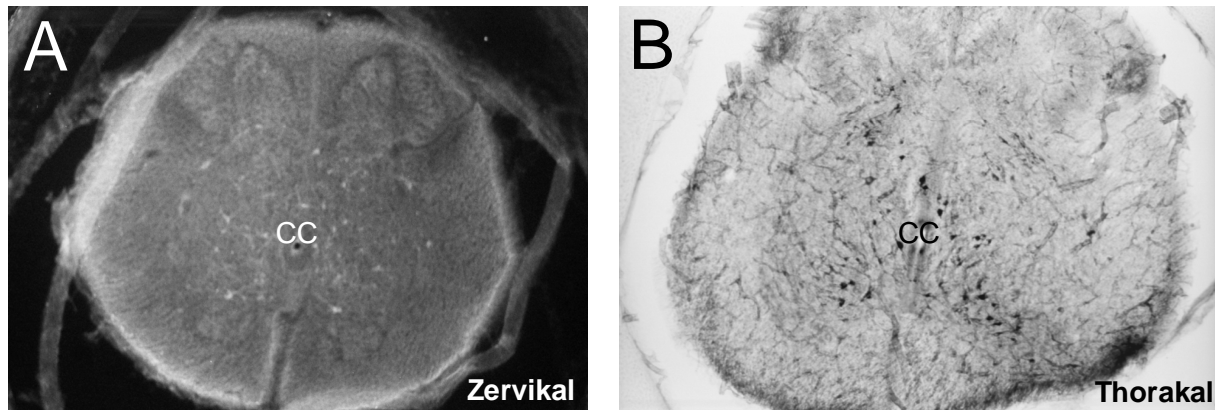


Abbildung 53: A: NOS-positive Neurone um den Zentralkanal und in der Substantia intermedia in der unteren Zervikalregion, B: NADPH Diaphorase markierte Neurone im Thorakalmark; beides im embryonalen Hühner Rückenmark, Bebrütungstag E15. CC: Zentralkanal

Die Spinalganglien stellen sich als inhomogen markiert dar. Circa 50% der Neurone weisen eine Markierung durch NADPH Diaphorase bzw. NOS Immunfluoreszenz auf. Dabei handelt es sich um Gruppen von exzentrisch gelegenen Spinalneuronen und einzelne in den zentralen Anteilen der Ganglien (s. Abb. 54).

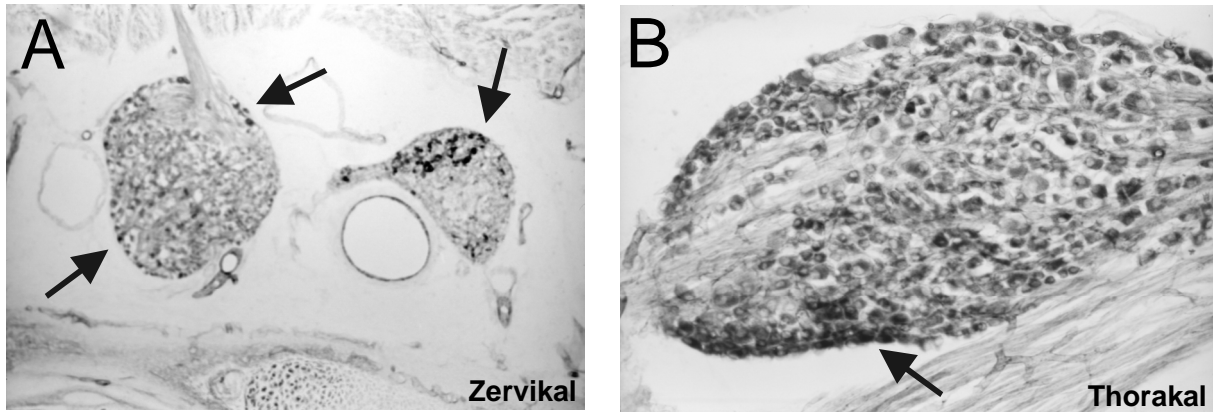


Abbildung 54: A und B: Spinalganglien am unteren Zervikalmark und am Thorakalmark des embryonalen Hühnerrückenmarkes, Stadium E15, mit vorwiegend exzentrisch gelegenen NADPH Diaphorase positiven Neuronen (Pfeile).

Lokalisation von ChAT:

Die ChAT-markierten Strukturen zeigen in diesem Stadium ein deutlich anderes Bild als noch bei E8. Es ähnelt eindeutig schon mehr der Verteilung im adulten Hühnerrückenmark. Über das gesamte Rückenmark hinweg sind im Vorderhorn Zellen zu erkennen, die sich auch als Motoneurone identifizieren lassen. In den oberen zervikalen und den thorakalen Abschnitten sind diese Motoneurone auf zwei Gruppen verteilt und entsprechen somit offenbar der ventromediale und ventrolateralen Zellsäule (s. Abb. 55A und 55B). Im Thorakalmark ist des Weiteren dorsal des Zentralkanales eine Gruppe von ChAT-positiven Neuronen auszumachen, die sich wohl aus präganglionären Neuronen zusammensetzt und somit die Columna Ternti darstellt (s. Abb. 55B). In der Nähe des Zentralkanales finden sich außerdem ganz vereinzelt kleine ChAT-markierte Interneurone. Die Hinterhörner weisen keine ChAT-positiven Strukturen auf.

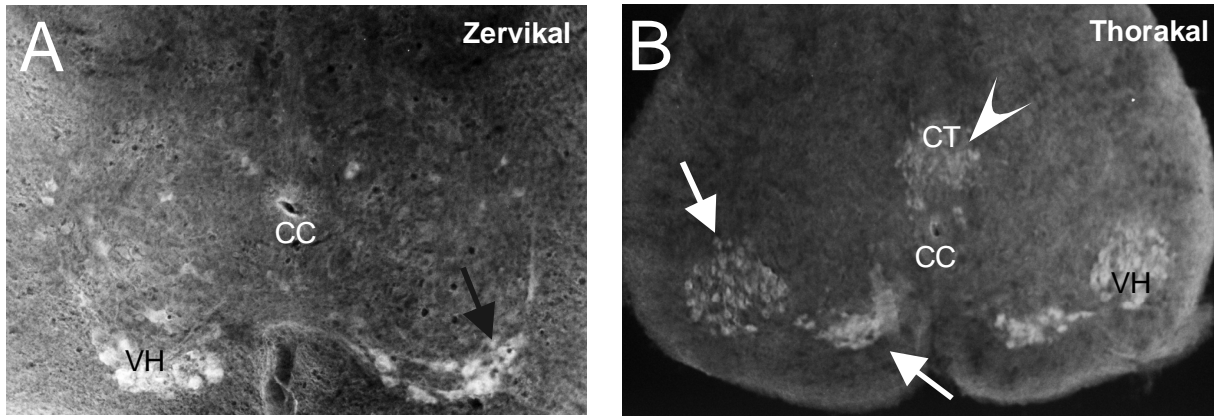


Abbildung 55: Embryonales Hühner Rückenmark, Bebrütungstag E15. A: Oberes Zervikalmark, gut erkennbar sind ChAT-markierte Motoneurone im Vorderhorn (Pfeil). B: Thorakalmark, ChAT-positive Neurone in der ventromediale und ventrolateralen Zellsäule des Vorderhornes (Pfeile) sowie präganglionäre Neurone dorsal des Zentralkanales (Pfeilspitze). CC: Zentralkanal, CT: Columna Terti, VH: Vorderhorn

4.5.3 E18

Lokalisation von NADPH Diaphorase/NOS:

Im Stadium E18 sind die NADPH Diaphorase/NOS-markierten Strukturen noch deutlicher zu erkennen. Zum ersten Mal lassen sich auch NADPH Diaphorase/NOS-positive Neurone und Fasern im Hinterhorn ausmachen, wenn auch ihre Anzahl relativ gering ist. Es sind kleine fusiforme Neurone, deren Axone auch markiert sind. Sie befinden sich im Gebiet der Intumescentia lumbosacralis, einige Neurone sind auch im Hinterhorn in Segmenten der Intumescentia cervicalis zu erkennen.

Vor allem in Höhe des oberen und unteren Zervikalmarkes finden sich viele positive kleine Neurone um den Zentralkanal, die durch ein dichtes Netz von Faserausläufern miteinander verbunden zu sein scheinen. Auch in den unteren Abschnitten des Rückenmarkes sind solche Zellen erkennbar, jedoch in deutlich geringerer Anzahl (s. Abb. 56A und 56B). In den sonstigen Regionen der Substantia intermedia sind auch größere runde Neurone auszumachen, die sich als NADPH Diaphorase/NOS-positiv darstellen. Diese Zellen liegen vermehrt an der Grenze zum Glykogenkörper (s. Abb. 56C).

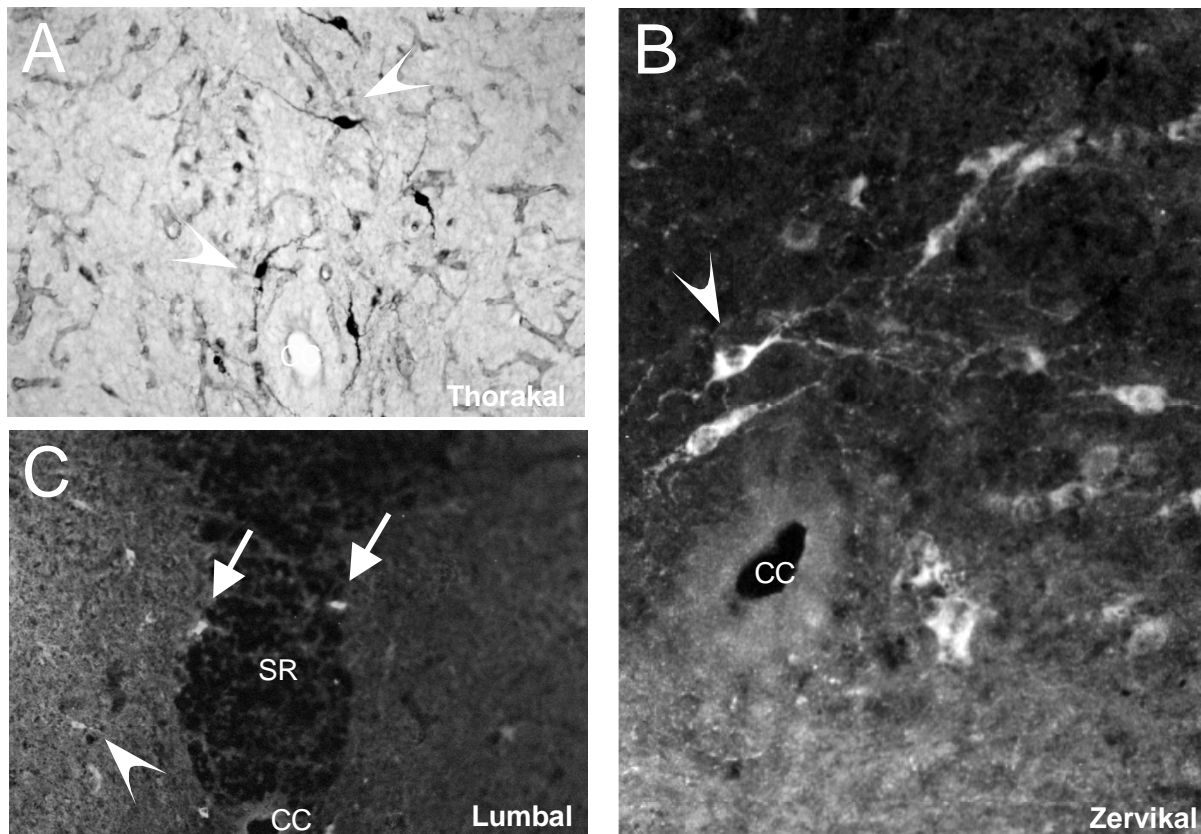


Abbildung 56: A, B und C: Embryonales Hühnerrückenmark, Bebrütungstag E18. A und B: NADPH Diaphorase bzw. NOS-markierte Interneurone (Pfeilspitzen) um den Zentralkanal in Höhe des Thorakal- und oberen Zervikalmarkes. C: NOS-positive Neurone an der Grenze zum Glykogenkörper (Pfeile) und an der Basis des Hinterhornes (Pfeil) im Bereich der Intumescentia lumbalis. CC: Zentralkanal, SR: Sinus rhomboideus

Auch in den Hofmannsche Kerngruppen finden sich in diesem Alter Markierungen mit NADPH Diaphorase, einige Neurone der Hofmannschen Großkerne in den lumbosakralen Anteilen des Rückenmarkes sind stark positiv.

Die Neurone der Spinalganglien sind wieder inhomogen markiert, jedoch variiert ihr Erscheinungsbild mit der Höhenlokalisierung. Während sich in zervikalen Abschnitten nur wenig (~20%) positive Neurone finden, sind dies bei lumbosakralen Segmenten deutlich mehr (~70%) (s. Abb. 57)

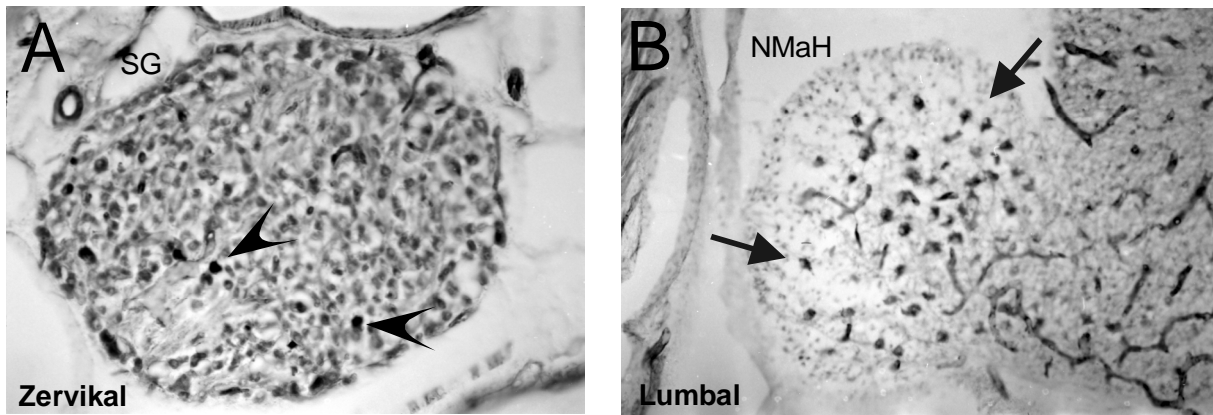


Abbildung 57: A und B: Spinale Strukturen embryonales Huhn, Bebrütungstag E18. A: Wenig eindeutig NADPH Diaphorase-positive Spinalganglienneurone (Pfeilspitzen) im oberen Zervikalmark. B: NADPH Diaphorase markierte Neurone (Pfeile) innerhalb eines Hofmannschen Großkernes in der Region der Intumescencia lumbalis. *NmaH*: Nucleus majoris Hofmann, *SG*: Spinalganglion

Lokalisation von ChAT:

Im Rückenmark von seit 18 Tagen bebrüteten Hühnerembryonen sind deutlich ChAT-positive Strukturen zu finden. Die auffälligsten Elemente stellen wieder die Motoneurone des Vorderhornes dar. Sie sind als die typischen großen polygonalen Zellen erkennbar, ihr Volumen und ihre Anzahl ist gegenüber den Vorstufen deutlich gewachsen. Sie sind in der gesamten Länge des Rückenmarkes auszumachen, vor allen Dingen im unteren Zervikalmark sind zwei Gruppen von Motoneuronen sichtbar. Die ventromediale Gruppe enthält eindeutig mehr und größere Neurone (s. Abb. 58A und 58C).

In den thorakalen Segmenten fallen ChAT-markierte Neurone dorsal des Zentralkanales auf, die präganglionäre Zellen der Columna Ternti darstellen dürften. Sie sind deutlich kleiner als die motorischen Vorderhornzellen und rund oder auch fusiform (s. Abb. 58B).

Ebenfalls ChAT-positive Strukturen finden sich in den Hofmannschen Kernen, es sind deutlich markierte Neurone, die unwesentlich kleiner sind als die Motoneurone des Vorderhornes (s. Abb. 58C).

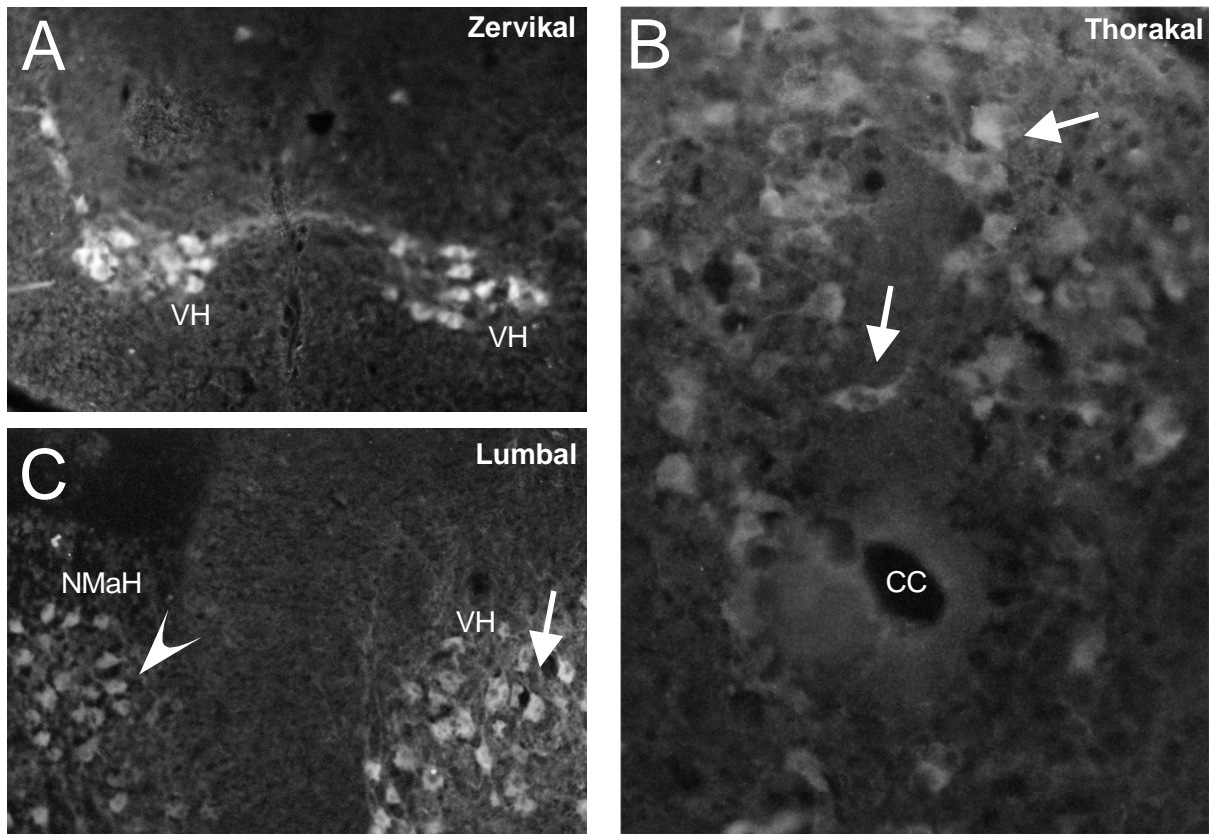


Abbildung 58: A, B und C: Embryonales Hühnerrückenmark, Bebrütungstag E18. A: ChAT-markierte Motoneurone im Vorderhorn im unteren Zervikalmark. B: Präganglionäre sympathische ChAT-positive Neurone unterschiedlicher Morphologie (Pfeile) im Thorakalmark. C: In der Intumescentia lumbosacralis ChAT-positive Zellen sowohl im Hofmanschen Großkern (Pfeilspitze) als auch im Vorderhorn (Pfeil). CC: Zentralkanal, NmaH: Nucleus Majoris Hofmann, VH: Vorderhorn

4.5.4 E20

Lokalisation von NADPH Diaphorase/NOS:

Die bisher beschriebenen NADPH Diaphorase/NOS-markierten Strukturen wiederholen sich auch bei den Embryonen im Stadium E20.

Im oberen Zervikalmark sind relativ viele kleine fusiforme Neurone um den Zentralkanal zu erkennen, deren Axone auch wieder stark markiert sind. Diese Interneurone sind auch in Höhe der Intumescentia cervicalis und in den thorakalen Rückenmarksabschnitten sichtbar, wenn auch ihre Zahl abnimmt und sie in diesem Teil des Rückenmarkes eher eine Tendenz aufweisen, sich entlang der gesamten Mittellinie zu gruppieren und sich in übrigen zentralen Abschnitten der Substantia intermedia zu befinden (Abb. 59A). In den sakralen Segmenten zeigen sich nur vereinzelt kleine NADPH Diaphorase/NOS-positive Neurone in diesen

Lokalisationen. Gelegentlich waren auch NADPH-positive Interneurone zwischen den Motoneuronen der Vorderhörner zu vermuten.

Vor allem im thorakalen Rückenmark und unterhalb davon fallen kleine NADPH Diaphorase/NOS-markierte Zellen am Rande der weißen Substanz am Übergang zum Glykogenkörper oder den lateralen Funiculi auf (s. Abb. 59A und 59B).

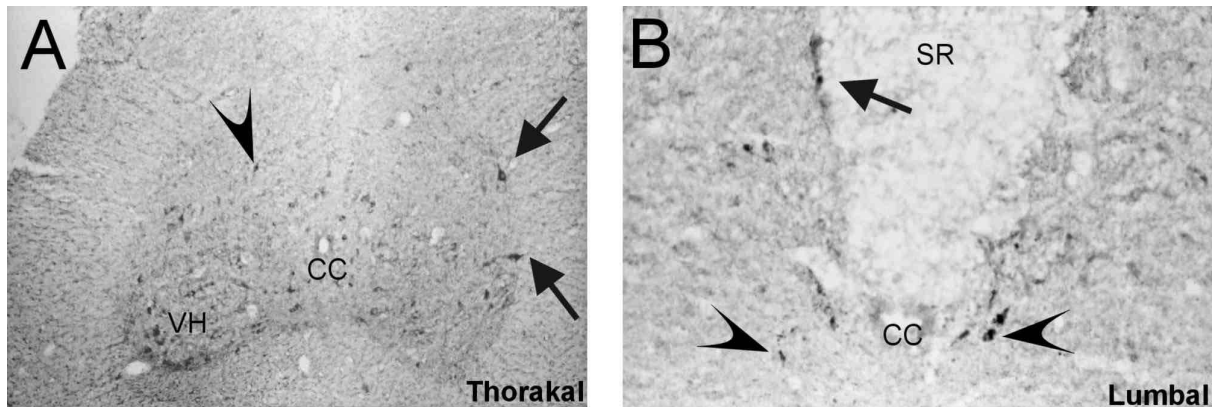


Abbildung 59: A und B: Embryonales Hühner Rückenmark, 20. Bebrütungstag. A: NADPH Diaphorase positive Neurone am Rand der weißen Substanz (Pfeile) und Interneurone in der Substantia intermedia (Pfeilspitze) im Thorakalmark. B: Innerhalb der Intumescentia lumbosacralis sichtbare NADPH Diaphorase markierte Neurone am Übergang zum Glykogenkörper (Pfeil) und Interneurone nahe des Zentralkanales. CC: Zentralkanal, SR: Sinus rhomboideus, VH: Vorderhorn

Die Hofmannschen Kerngruppen weisen wieder deutlich sichtbare Markierungen auf. Das gilt sowohl für die Hofmannschen Kleinkerne in Höhe der Intumescentia cervicalis (s. Abb. 60A) als auch für die Hofmannschen Großkerne und die paragrisealen Zellen der Intumescentia lumbosacralis (s. Abb. 60B).

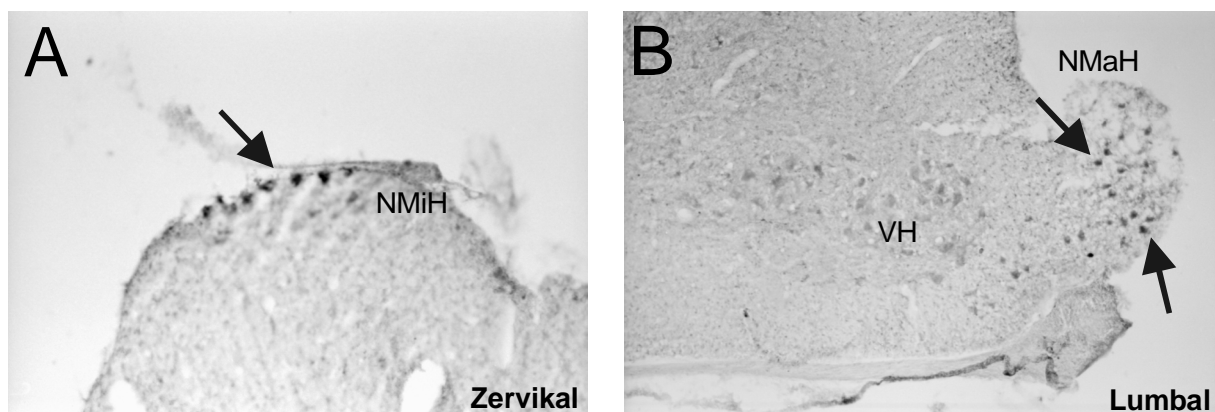


Abbildung 60: A und B: Strukturen des embryonalen Hühner Rückenmarkes, Bebrütungstag 20. A: NADPH Diaphorase markierte Neurone im Hofmannschen Kleinkern (Pfeil) innerhalb der Intumescentia cervicalis. B: Intumescentia lumbosacralis mit Hofmannschen Großkern, der NADPH Diaphorase positive Zellen (Pfeile) enthält. NmaH: Nucleus Majoris Hofmann, NmiH: Nucleus Minoris Hofmann, VH: Vorderhorn

Lokalisation von ChAT:

ChAT-markierte Neurone sind wieder in allen Abschnitten des embryonalen Hühnerrückenmarkes bei E20 sichtbar.

Die Motoneurone des Vorderhornes sind in den oberen zervikalen Segmenten zunächst nur als eine einzelne Zellgruppe erkennbar (s. *Abb. 61A*), dies ändert sich jedoch in Höhe der Intumescentia cervicalis und Intumescentia lumbosacralis, wo eindeutig zwei Gruppen – ventrolateral und ventromedial – die Gesamtheit der motorischen Vorderhornzellen ausmachen (s. *Abb. 61B und 62*). Die Anzahl der Motoneurone ist vor allen Dingen in den unteren Teilen des Rückenmarkes wieder deutlich höher als in den vorhergehenden Stadien, ihre Größe bleibt gegenüber E18 dagegen eher unverändert.

Die präganglionären autonomen Neurone der Columna Terni sind eindeutig ChAT-markiert. Sie sind von der Intumescentia cervicalis bis zum Ende des thorakalen Abschnittes des Rückenmarkes sichtbar. Die kleinen runden Zellen sind mit ebenfalls deutlichen Axonen stark vernetzt. Sie liegen alle dorsal des Zentralkanales (s. *Abb. 61B*).

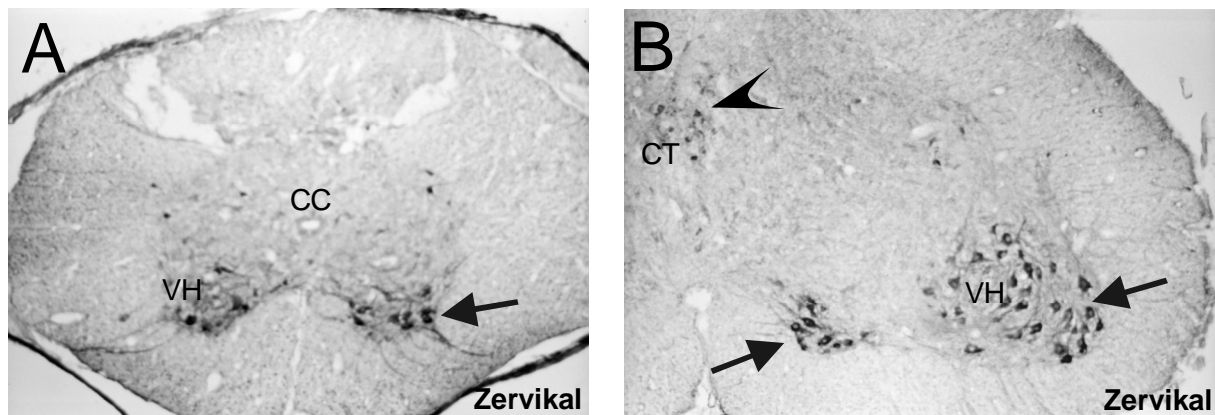


Abbildung 61: A und B: Embryonales Hühnerrückenmark, 20. Bebrütungstag, Färbung Peroxidase gegen ChAT. A: Oberes Zervikalmark mit ChAT-positiven Motoneuronen (Pfeil) im Bereich der Vorderhörner. B: Auf Höhe der Intumescentia cervicalis sind die zwei Gruppen innerhalb der Motoneurone des Vorderhornes gut als ChAT-markiert erkennbar (Pfeile), daneben auch ChAT-positiv präganglionäre Neurone der Columna Terni (Pfeilspitze). CC: Zentralkanal, CT: Columna Terni, VH: Vorderhorn

In der Intumescentia lumbosacralis erkennt man wieder ChAT-positiv Neurone in den Zellansammlungen der Hofmannschen Großkerne. Paragriseale Zellen sind ebenfalls markiert (s. *Abb. 62B*).

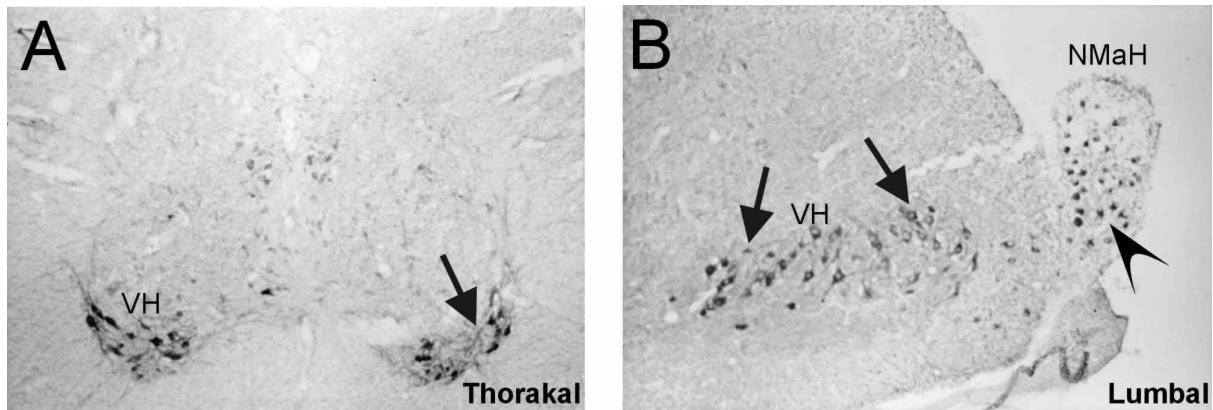


Abbildung 62: A und B: Embryonales Hühnerrückenmark, 20. Bebrütungstag, Färbung: Peroxidase gegen ChAT. A: Thorakalmark mit ChAT-markierten Motoneuronen im Vorderhorn (Pfeil). B: In der Intumescentia lumbosacralis angedeutet 2 ChAT-positive Zellgruppen innerhalb des Vorderhornes erkennbar (Pfeile), daneben ChAT-markierte Strukturen im Hofmannschen Großkern (Pfeilspitze). *NmaH: Nucleus majoris Hofmann, VH: Vorderhorn*

4.6 Spinalganglien

Um ein besseres Verständnis für die Aufgaben der beiden Neurotransmitter in den spinalen Systemen der Vögel zu gewinnen, wurde auch die Verteilung von ChAT und NOS in den Spinalganglien von Tauben und Huhn untersucht. Auch bei den Untersuchungen an den embryonalen Hühnern wurde ein Augenmerk auf das Vorkommen der Transmitter in den Spinalganglien gelegt.

Grundsätzlich ist zu beobachten, dass sowohl ChAT als auch NOS in allen Spinalganglien vorkommen und dass sich die Verteilung der Neurotransmitter auf den verschiedenen Segmenthöhen nicht wesentlich unterscheidet. Man kann generell für die beiden untersuchten Vogelarten sagen, dass ChAT ubiquitär und auch in größerer Dichte als NOS zu finden ist.

Auffällig sind die extrem deutlichen NOS-Markierungen, die auf einigen Schnitten in sympathischen Grenzstrangganglien sichtbar sind, wenn diese bedingt durch die räumliche Nähe zufällig in der Ebene mit angeschnitten wurden. Eine solch deutliche NOS-Markierung ist in den Spinalganglienzellen selber nicht zu beobachten, somit scheint der Gehalt an NOS in den Neuronen der Spinalganglien wesentlich geringer zu sein.

4.6.1 Huhn

In den Spinalganglienzellen des Huhnes finden sich auf allen Segmenten des Rückenmarkes ChAT-positive Neuronen. Die Intensität der Markierung ist variabel, so zeigen sich sowohl intensiv Fluoreszenz-markierte Zellen als auch schwächer markierte. Insgesamt sind jeweils ungefähr 50% der Neurone in den Spinalganglien deutlich ChAT-markiert. Die intensiv markierten Zellen sind tendenziell eher größere Neurone, und sie sind ohne Präferenzen oder eindeutige Gruppierungen über das gesamte Ganglion verteilt (s. Abb. 63 und 64).

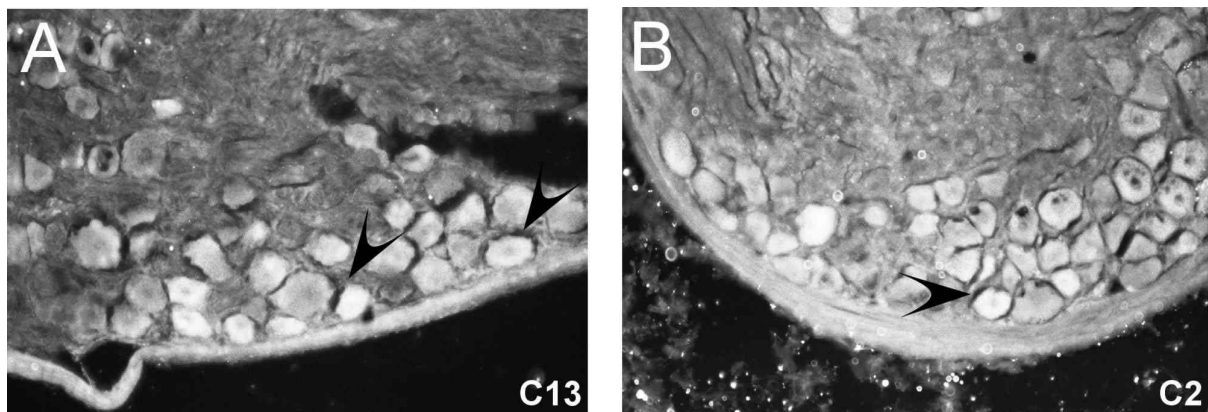


Abbildung 63: A und B: ChAT-positiv markierte Spinalganglienzellen in unterschiedlichen zervikalen Höhen (Segment C13 und C2); die Satellitenzellen bleiben unmarkiert (Pfeilspitzen).

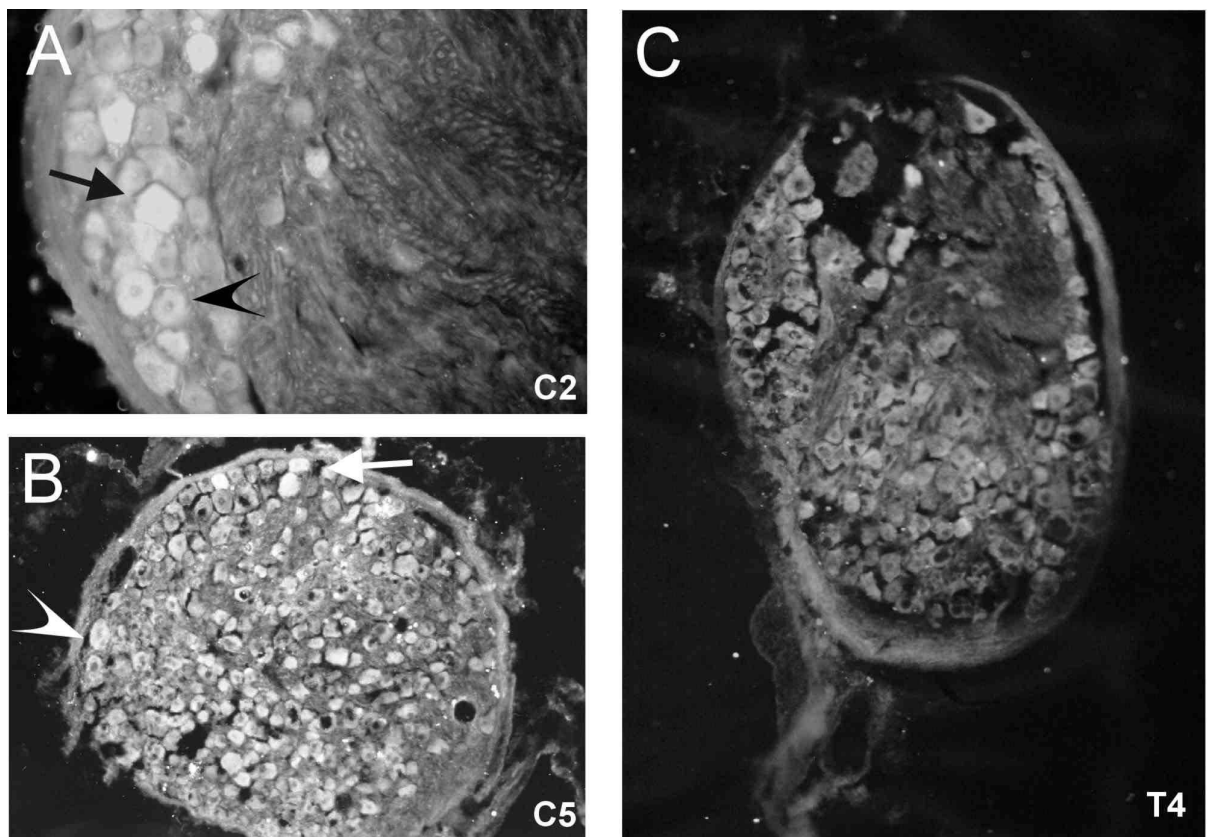


Abbildung 64: A, B und C: Segmente C2, C5 und T4 – Unterschiedlich intensiv ChAT-markierte Spinalganglienzellen (Pfeile und Pfeilspitzen) in Spinalganglien unterschiedlicher Höhen.

Die NOS-Markierung der Spinalganglienzellen des Huhnes unterscheidet sich deutlich von der eben besprochenen ChAT-Markierung. Zum einen sind weniger Neurone NOS-positiv. Ihre Zahl beläuft sich auf circa 35% der Spinalganglienneurone. Es sind ebenfalls eher die großen Zellen, die sich als eindeutig NOS-markiert darstellen. Sie sind jedoch häufig in Gruppen zu finden, die exzentrisch am Rande des Spinalganglions und entlang Nervenfaserversträngen liegen. Unter den kleineren Spinalganglienneuronen existieren etliche leicht gefärbte oder fraglich positive Zellen (s. Abb. 65). Des Weiteren zeichnen sich die Satellitenzellen innerhalb der Ganglien durch eine auffällige NOS-Markierung ab, auch wenn die von ihnen umhüllten Somata nicht NOS-positiv sind (s. Abb. 65). Eine ChAT-Markierung von Satellitenzellen ist hingegen nicht zu beobachten (s. Abb. 63).

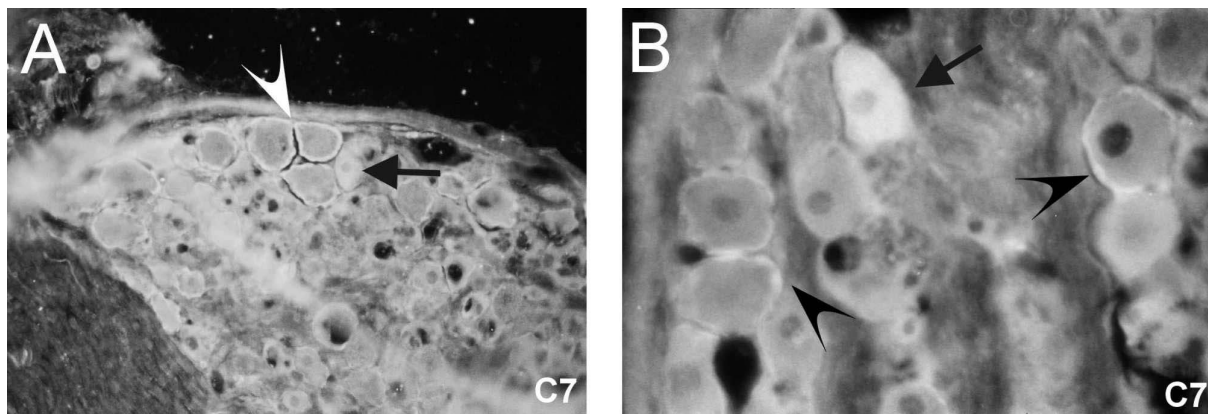


Abbildung 65: A und B: NOS-positiv markierte Spinalganglienneurone (Pfeile) sowie deutliche NOS-Markierung der Satellitenzellen (Pfeilspitzen) auf Höhe Segment C7.

4.6.2 Taube

In den Spinalganglien der Taube stellt sich die Markierung der Neurone mit NOS etwas spärlicher dar. Es sind relativ wenige NOS-positive Zellen, im Ganzen beträgt ihre Zahl ungefähr 30% – inklusive der schwach oder fraglich markierten Neurone. Es sind immer wieder einzeln gelegene stark NOS-markierte Zellen sichtbar, dagegen ist der Anteil der schwach gefärbten Neurone relativ klein. Um die NOS-positiven Neurone liegt meist ein Kranz von unmarkierten Zellen, selten liegen mehrere markierte Neurone in einer Gruppe. Auch scheint keine Präferenz für eine Größe der sich NOS-positiv darstellenden Spinalganglienzellen zu existieren. Sowohl sehr große runde als auch eher kleine Neurone

sind eindeutig NOS-markiert. Die Satellitenzellen waren in dieser Spezies negativ (s. Abb. 66).

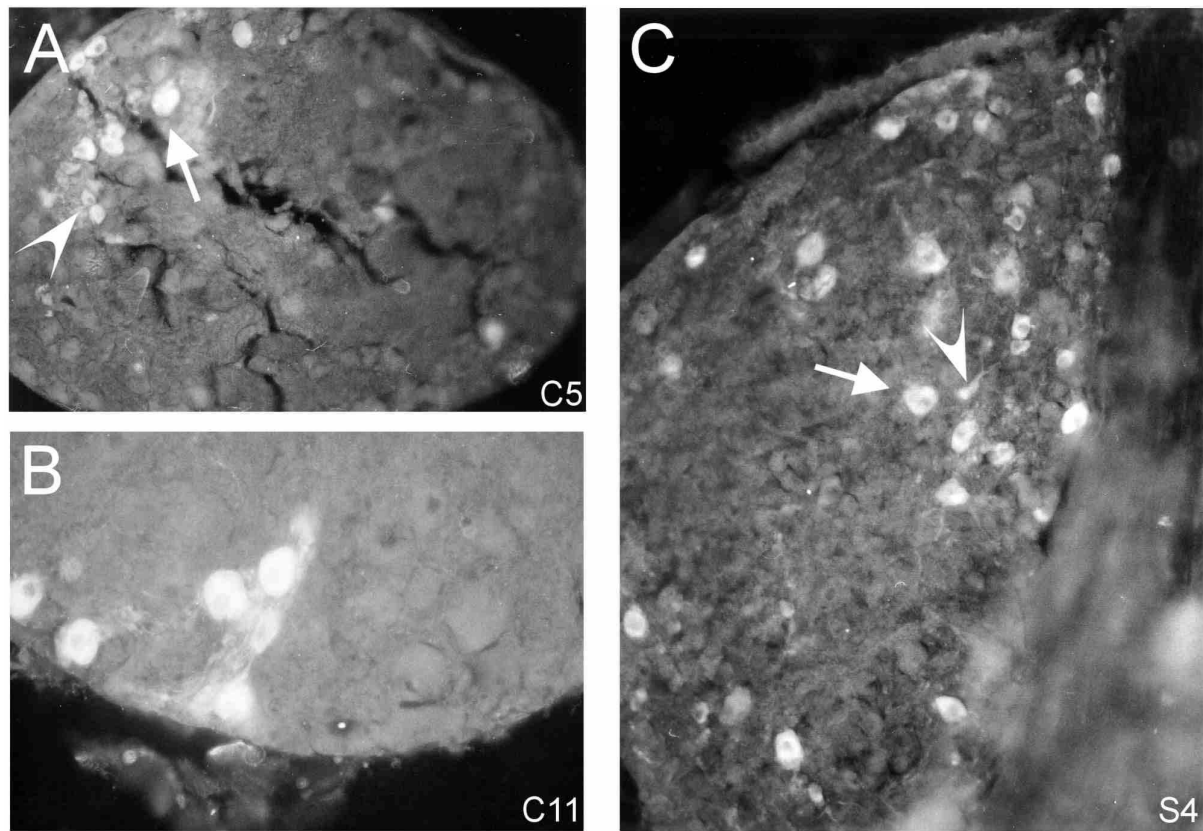


Abbildung 66: A, B und C: Segmente C5, C11 und S4 –NOS-markierte sensorische Neurone (Pfeile), teilweise offenbar randständig angeschnitten (Pfeilspitzen)..

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist die erste, welche die Lokalisation von Stickoxidsynthase und Cholinacetyltransferase im gesamten adulten Rückenmark von Huhn und Taube sowie in Spinalganglien derselben Spezies untersucht und mit immun- bzw. enzymhistochemischen Methoden nachweist. Sie liefert somit Informationen über die Lokalisation und die möglichen Funktionen Stickoxid- und Acetylcholin-produzierender Neurone in diesem Teil des ZNS von Vögeln.

Um Aussagen über das Auftreten der Neurotransmitter während der Entwicklung treffen zu können, wurde auch embryonales Gewebe vom Huhn in die Untersuchungen einbezogen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass beide Enzyme in allen Abschnitten des Rückenmarkes vorhanden sind und dass ihr Verteilungsmuster in vielen Aspekten demjenigen entspricht, wie es in anderen Spezies, vornehmlich in Säugetieren, beobachtet wurde. Anders als bei Säugetieren wurden jedoch keine Hinweise auf ausgedehnte Kolokalisation der beiden Transmitter gefunden. Die Beobachtungen für Huhn und Taube sind sehr ähnlich, so dass angenommen werden kann, dass es sich dabei um grundsätzliche, genetisch verankerte Muster für die Verteilung von Stickoxidsynthase und Cholinacetyltransferase enthaltende Neurone im Rückenmark von Vögeln handelt.

Es sollen anhand der beobachteten Lokalisationen von markierten Neuronen und Fasern Überlegungen über die möglichen Funktionen von Stickoxid-bildenden und cholinergen Neuronen in spinalen Systemen von Vögeln angestellt werden.

5.1 Stickoxidbildende Systeme im Rückenmark von Huhn und Taube

Zum Nachweis von NOS wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die enzym- als auch die immunhistochemische Methode verwendet. Beide Markierungsmethoden zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Eine Ausnahme waren die Schnitte durch den acht Tage alten Embryo, in dem zwar NADPH Diaphorase, jedoch keine Immunreaktivität nachweisbar war. Die meisten publizierten und in der folgenden Diskussion referierten Arbeiten zur Lokalisation von NOS bedienten sich der histochemischen Methode.

In allen untersuchten Segmenten konnten in den oberflächlichen Laminae (I und II) des Hinterhornes sowohl beim Huhn als auch bei der Taube NADPH Diaphorase/NOS-positive Neurone nachgewiesen werden, die in ein dichtes Neuropil von markierten Fasern eingebettet sind. Diese Schichten entsprechen den Projektionsfeldern der primären Afferenzen (Leonard & Cohen, 1975b; Sakamoto & Atsumi, 1989; Eide & Glover, 1997). Ein solches NOS-positives Neuropil aus dünnen Fasern und Terminalen im Hinterhorn wird auch bei anderen Spezies beobachtet (Valtschanoff *et al.*, 1992a; Valtschanoff *et al.*, 1992b; Vizzard *et al.*, 1994b; Gonzalez *et al.*, 1996; Smeets *et al.*, 1997; Munoz *et al.*, 2000) und scheint sich charakteristischerweise aus primären Afferenzen und intraspinalen Fasern zusammzusetzen. Diese Vermutung kann durch die Tatsache unterstützt werden, dass auch in den Spinalganglien der beiden Vögel stets ein Teil der Neurone NADPH Diaphorase/NOS-positiv sind. Ähnliche Ergebnisse brachten auch die Untersuchungen von Radmilovich *et al.* (1997) an Hinterhorn und Spinalganglien der Schildkröte, die sie zu der Schlussfolgerung führte, dass NADPH Diaphorase/NOS-positive Neurone des Hinterhornes Teil der spinalen sensorischen Bahnen des Rückenmarkes sind. Die Voraussetzungen für eine solche Schlussfolgerung sind durch die vorliegende Arbeit auch für Huhn und Taube gegeben. Somit kann für NO auch bei Vögeln auf eine Funktion bei der somatosensorischen Informationsweiterleitung geschlossen werden. Für die Beteiligung von NO-haltigen Strukturen an somatosensorischen Bahnen spricht auch die Markierung von Fasern und einigen Neuronen im Bereich der Columna dorsalis magnocellularis, die der Clarke-Säule der Säugetiere, dem Ursprung des Tractus spinocerebellaris posterior, gleichgesetzt wird (Leonard & Cohen, 1975b; Atoji *et al.*, 2001; Necker, 2005).

Die Lokalisation von NADPH Diaphorase/NOS in Spinalganglienneuronen und die Projektionen nitrerger Spinalganglienneuronen in das Hinterhorn wurde auch bei anderen Spezies untersucht (Ratte: (Aimi *et al.*, 1991); Mensch und Ratte: (Terenghi *et al.*, 1993); Ratte und Affe: (Zhang *et al.*, 1993); Katze: (Vizzard *et al.*, 1994a); Schildkröte: (Radmilovich *et al.*, 1997), Delphin: (Bombardi *et al.*, 2011)). Es zeigte sich immer eine je nach Spezies und Segment unterschiedlich große Subpopulation der sensorischen Neurone als NOS-positiv. Die überwiegende Zahl markierter Neurone war von kleinem bis mittleren Durchmesser und enthielt auch Substanz P oder *Calcitonin-Gene-Related-Peptide* (CGRP). Diese Befunde haben die Hypothese erhärtet, dass Stickoxid ein Signalmolekül für die Verarbeitung nozizeptiver Signale darstellt.

Die Gruppe um Aimi und Fujimura beobachtete bei der Ratte durch retrograde Markierung, dass einige NADPH Diaphorase-reaktive Neurone der thorakolumbalen Spinalganglien zur Magenwand und zum Ganglion coeliacum projizieren (Aimi *et al.*, 1991). Der Befund wurde von Vizzard und Erdman bestätigt, die über einen hohen Anteil an NADPH Diaphorase-reaktiven viszeroafferenten Spinalganglien-Neuronen von Ratten berichten (Vizzard *et al.*, 1993a). Dies initiierte Spekulationen über die Möglichkeit, dass NADPH Diaphorase-reaktive Neurone im Hinterhorn und den Spinalganglien an viszerosensiblen Prozessen beteiligt sein könnten. Für das Huhn existieren Untersuchungen, die zeigen, dass viszerale und somatische Afferenzen unterschiedliche Projektionsfelder haben (Ohmori *et al.*, 1987). Während viszerale afferente Fasern am lateralen Rand und an der Basis des Hinterhornes enden, projizieren somatische Afferenzen in die Laminae II und III. Nach vorliegenden Befunden erscheint somit eine Rolle für NO in viszeroafferenten spinalen Systemen bei *Gallus domesticus* eher unwahrscheinlich.

Es wurde gezeigt, dass sich der Gehalt an NADPH Diaphorase/NOS-reaktiven Neuronen eines Spinalganglions unter Einwirkung verschiedener schädigender Einflüsse wie z.B. Axotomie (Zhang *et al.*, 1993; Vizzard *et al.*, 1993b; Choi *et al.*, 1996; Rydh-Rinder *et al.*, 1996), chemischer Noxen (Vizzard *et al.*, 1995) oder chronischer Rückenmarksschädigung (Vizzard *et al.*, 1997) erhöht. Dies spricht für eine variable Expression von NOS und für die Möglichkeit einer induzierbaren Synthese durch chemische Stimulation oder Verletzung und steht im Einklang mit der postulierten Rolle von NO bei plastischen Phänomenen wie zentraler Sensitivierung, Langzeitpotenzierung und Entwicklung von Hyperalgesie (Meller *et al.*, 1992; Meller & Gebhart, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals NOS in Satellitenzellen nachgewiesen. Zuvor war bereits in Spinalganglien neugeborener Ratten *ex vivo* gezeigt worden, dass NO die Aktivität der Guanylatzyklase in Satellitenzellen stimuliert (Morris *et al.*, 1992). Darüber hinaus war bekannt, dass durch Axotomie des Nervus ischiadicus nicht nur die Expression von NOS in den sensorischen Neuronen, sondern auch von cGMP in Satellitenzellen gesteigert wird (Shi *et al.*, 1998). Diese Daten führten zu dem Konzept, dass NO ein wichtiges Signalmolekül mit neuroprotektiver Funktion in der Entwicklung der Spinalganglienzellen und für ihre Reaktion auf Schädigung der peripheren Axone darstellt (Thippeswamy & Morris, 2002). Während nach diesen Arbeiten an Säugern NO als Signal von sensorischen Neuronen zu Satellitenzellen angesehen wird, ist nach den hier vorgelegten Befunden beim Huhn auch die Existenz des umgekehrten Signalweges, von den Gliazellen zu den von ihnen umgebenen

Neuronen, anzunehmen. Andererseits könnte NO auch als ein autokrines Signal in Satellitenzellen des Huhnes wirken.

Die Substantia intermedia weist bei Huhn und Taube ebenso wie bei den anderen bisher untersuchten Spezies eine Vielzahl von NADPH Diaphorase/NOS-reaktiven Neuronen auf. Der Großteil davon liegt unweit des Zentralkanales und scheint damit auf den ersten Blick auch mit der Lokalisation der präganglionären autonomen Neurone übereinzustimmen (Huber, 1936; Brinkman & Martin, 1973; Leonard & Cohen, 1975a; Ohmori *et al.*, 1992). Jedoch ist die Verteilung der beiden Neuronengruppen nicht deckungsgleich. Stattdessen dürfte es sich bei den NOS-positiven Zellen um Interneurone unbekannter Funktion handeln.

Das Vorkommen von NOS in Neuronen der Substantia intermedia ist eine Beobachtung, die in allen Untersuchungen zur Lokalisation dieses Enzyms in Säugetieren beschrieben wurde (Anderson, 1992; Blottner & Baumgarten, 1992; Brüning, 1992; Dun *et al.*, 1992; Valtschanoff *et al.*, 1992a; Dun *et al.*, 1993; Terenghi *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1994; Vizzard *et al.*, 1994a; Brüning *et al.*, 1995; Marsala *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2000). Die NADPH Diaphorase/NOS-positiven Neurone stellen dabei überwiegend eine Untergruppe der präganglionären autonomen Neurone dar. Vor allen Dingen die Columna intermediolateralis besteht zu großen Teilen aus NADPH Diaphorase/NOS-reaktiven Neuronen (Anderson, 1992; Blottner & Baumgarten, 1992; Brüning, 1992; Dun *et al.*, 1992; Valtschanoff *et al.*, 1992a; Dun *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1994; Kluchova *et al.*, 2000). Die Gruppe um Vizzard fand NOS nur in präganglionären sympathischen, nicht aber in parasymphatischen Neuronen im Rückenmark der Katze (Vizzard *et al.*, 1994b) und des Hundes (Vizzard *et al.*, 1997); eine Beobachtung, die zumindest auf Ratte (Dun *et al.*, 1992; Dun *et al.*, 1993; Vizzard *et al.*, 1993b; Saito *et al.*, 1994) und Maus (Brüning, 1992) nicht zutrifft. Insgesamt lässt sich sicher sagen, dass bei Säugetieren ein bedeutender Anteil präganglionärer autonomer Neurone in der Lage ist, NO zu synthetisieren und damit auch als Transmitter zu nutzen. Diese auf morphologischen Daten beruhende Folgerung wird durch pharmakologische Studien gestützt (Briggs, 1992).

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint Stickoxid in präganglionären Neuronen der Vögel, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Während sich bei Funk (1997) und der Arbeitsgruppe um Atoji (2001) keine Angaben zur Expression von NOS in den vegetativen präganglionären Kernen bei Huhn bzw. Taube finden, beobachtete Necker (2005) bei der Taube zwar nur wenige Neurone, die NADPH Diaphorase-positiv, jedoch

durchaus viele, die immunreaktiv waren – ein Widerspruch, der nicht aufgelöst wurde und hinter dem methodische Ursachen vermutet werden müssen.

Während im Rückenmark der Schildkröte keine NOS-positiven autonomen Neurone identifiziert werden konnten (Wiese, 1997), sind über Amphibien widersprüchliche Daten publiziert worden. Obwohl über NADPH Diaphorase-positive Neurone sowohl in sympathischen als auch parasymphatischen Zellen des Rückenmarkes von *Xenopus laevis* berichtet wurde (Crowe *et al.*, 1995), gelang es weder der Gruppe um Munoz (Munoz *et al.*, 2000) noch Brüning und Mayer (2001) NADPH Diaphorase/NOS-markierte Neurone in den präganglionären autonomen Neuronen im Rückenmark der Froscharten *Rana perezi* bzw. *Xenopus laevis* zu identifizieren. Auch zu Teleostern wurden sich widersprechende Ergebnisse publiziert. Während Brüning *et al.* (1995) keine Hinweise für NOS in präganglionären Neuronen beim Goldfisch fanden, berichteten Funakoshi *et al.* (1995) über NADPH Diaphorase-positive sympathische Neurone beim Feilenfisch.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass es für Nicht-Säugetiere keine eindeutigen Belege für eine wichtige Rolle von Stickoxid als Signalmolekül autonomer spinaler Neurone gibt.

Im Vorderhorn von Huhn und Taube stellte sich nur eine sehr geringe Anzahl von Neuronen als NADPH Diaphorase/NOS-positiv dar. Es konnten darunter keine Zellen gefunden werden, deren Morphologie oder Lokalisation für eine Identität als Motoneurone sprechen würde. Somit dürfte es sich bei den markierten Zellen um Stickoxid-bildende Interneurone handeln.

NOS enthaltende Zellen im Vorderhorn wurden in verschiedenen Säugetieren beschrieben. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (Terenghi *et al.*, 1993; Pullen & Humphreys, 1995; Marsala *et al.*, 1998), waren Motoneurone – in Übereinstimmung mit vorliegenden Befunden bei Vögeln – negativ (Brüning, 1992).

5.2 Cholinerge Systeme im Rückenmark von Huhn und Taube

Ein Teil der cholinergen Neurone in spinalen Systemen ist bereits seit Jahrzehnten bekannt. Acetylcholin galt schon lange als Neurotransmitter der Motoneurone sowie der präganglionären autonomen Neurone. Diese Vermutungen bestätigten sich auch in ersten Untersuchungen der Lokalisation von Acetylcholinesterase. Erst mit Einführung der immunhistochemischen Methoden zur Lokalisation des Acetylcholin synthetisierenden

Enzyms gelang es, bisher unbekannte cholinerge Neurone im Hinterhorn, um den Zentralkanal und sogenannte „partition cells“ (Phelps *et al.*, 1984) in der Substantia intermedia zu beschreiben (Kasa, 1986; Vincent *et al.*, 1986b).

Dieses Grundmuster der Lokalisation cholinergischer Neurone scheint für einen großen Teil verschiedenster Spezies gültig zu sein und sich im wesentlichen zu wiederholen. Auch die vorliegende Untersuchung an Huhn und Taube kann dies bestätigen.

Im Hinterhorn der beiden Vögel wurden in allen Segmenten im Bereich der tieferen Schichten (Laminae III und IV) ChAT-markierte Strukturen gesehen. Zumeist handelte es sich um kleine runde Neurone in Lamina III und IV sowie dünne markierte Fasern in Lamina III. Diese Beobachtung ist für fast alle untersuchten Spezies beschrieben (Mensch: (Aquilonius *et al.*, 1981); Katze: (Kimura *et al.*, 1981); Ratte: (Barber *et al.*, 1984; Phelps *et al.*, 1984; Borges & Iversen, 1986; Wetts & Vaughn, 1994); embryonales Huhn: (Thiriet *et al.*, 1992; Necker, 2005); Eidechse: (Medina *et al.*, 1993); Taube: (Medina & Reiner, 1994; Necker, 2004). Die Gruppe um Munoz fand jedoch keine ChAT Markierung von Neuronen im Hinterhorn des Frosches (Munoz *et al.*, 2000). Untersuchungen an Kaninchengewebe blieben ebenfalls ohne Hinweise auf cholinerge Neurone im Hinterhorn (Kan *et al.*, 1978). Auch die Studien, die molekularbiologische Methoden anwandten, um ChAT mRNA im Rückenmark der Ratte nachzuweisen, konnten zum Teil keine oder nur geringe Aktivität in den Hinterhörnern finden (Oh *et al.*, 1992; Lauterborn *et al.*, 1993).

Die ChAT-Reaktivität der Neurone und Fasern im Hinterhorn wird generell durch das Vorhandensein von intrinsischen cholinergen Systemen im Rückenmark erklärt. Es scheint, dass viele der markierten Fasern in Lamina III zu Prozessen von cholinergen Neuronen der Laminae III–VI gehören, die ihrerseits wiederum Interneurone darstellen (Barber *et al.*, 1984; Borges & Iversen, 1986; Gillberg *et al.*, 1990). Auch für die ChAT-markierten Neurone um den Zentralkanal (Lamina X) werden Projektionen zu Hinterhornneuronen angenommen (Borges & Iversen, 1986). Die Annahme, dass die hier beobachtete cholinerge Aktivität nicht von extraspinalen Quellen herrührt, wird auch dadurch gestützt, dass bisher keine ChAT-markierten Fasern in Hinterwurzeln gefunden wurden (Barber *et al.*, 1984).

In diesem Zusammenhang stellt sich zwingend die Frage, ob es primär-sensorische Neurone gibt, die cholinerg sind. Die vorliegende Arbeit liefert nun gerade Evidenz für die Expression von ChAT in einer Vielzahl der Spinalganglienzellen von Vögeln. Mit demselben Antiserum wurde zuvor erstmals ChAT-Immunoreaktivität in primär-sensorischen Neuronen von

Säugetern nachgewiesen (Sann *et al.*, 1995). Später konnten Bellier & Kimura (2007) nachweisen, dass die in Spinalganglien exprimierte periphere ChAT tatsächlich auch katalytische Aktivität aufweist. Daher ist die Hypothese berechtigt, dass Spinalganglienneurone auch in Vögeln in der Lage sind, Acetylcholin zu bilden. Die Frage, ob sie Acetylcholin auch tatsächlich als Transmitter bei der zentralen Umschaltung im Rückenmark bzw. in der Medulla oblongata verwenden, bleibt zu klären. Da das hier zum Nachweis der von ChAT im Spinalganglion verwendete Antiserum keine spezifischen Signale im Rückenmark lieferte, müssen die hier im Hinterhorn beobachteten Fasern allerdings intrinsischen, zentralen Ursprungs sein.

In der vorliegenden Studie zeigten sich sowohl beim Huhn als auch bei der Taube in zervikalen Segmenten deutlich ChAT-positive Fasern in der Hinterwurzel. Es ist anzunehmen, dass diese zentralen Ursprungs sind, da durch das verwendete Antiserum gegen ChAT keine Spinalganglienzellen markiert werden. In der Literatur finden sich Studien (Matsushita, 1968), in denen die Zytoarchitektur des Hühnerrückenmarks durch Golgi- und Nissl-Färbung untersucht wurde und in denen deutliche Hinweise gefunden wurden, dass diese Fortsätze in den Motoneuronen entspringen und mithin efferente Hinterwurzelfasern darstellen. Wie in diesen früheren Arbeiten wurden auch in der vorliegenden Arbeit diese markanten Fasern ausschließlich im Zervikalmark der Vögel gefunden. Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich um die Axone von Motoneuronen handeln dürfte, ist durch die besondere Dicke der immunreaktiven Fasern gegeben. Durch die vorliegenden immunzytochemischen Daten wird daher die Hypothese erhärtet, dass es im Zervikalmark von Vögeln Motoneurone gibt, die dorsal austreten und damit ein Dogma der Neuroanatomie, das Bell-Magendie-Gesetz, verletzen.

In der Substantia intermedia sind es vor allen Dingen die Zellen der präganglionären autonomen Neurone, die sich als ChAT-positiv darstellen lassen. Die Lokalisation dieser Neurone unterscheidet sich im Vogelrückenmark deutlich von der in Säugetieren. Während bei Säugetieren die präganglionären Neurone auf verschiedene Untergruppen aufgeteilt sind (Nucleus intermediolateralis thoracolumbalis, Nucleus intercalatus spinalis, Nucleus intercalatus pars paraependymalis und – die größte Gruppe – Nucleus intermediolateralis des Seitenhornes), verfügen Vögel hauptsächlich nur über ein Kerngebiet dorsal des Zentralkanales – die Columna Terzi (Huber, 1936; Ohmori *et al.*, 1984; Ohmori *et al.*, 1992). Einige wenige präganglionäre Neurone liegen verstreut innerhalb der Substantia intermedia und bilden auch hier den Nucleus intercalatus spinalis, wie Untersuchungen nach retrogradem

axonalem Transport von Meerrettich-Peroxidase zeigten (Cabot & Bogan, 1987; Ohmori *et al.*, 1992).

Beim Huhn wurde in der vorliegenden Arbeit eine Ausdehnung der präganglionären autonomen Zellsäulen von C15 bis S1 für den sympathischen Teil und von S9 bis S14 für den parasympathischen Teil beobachtet. Bei der Taube erstrecken sich die beiden Anteile jeweils von C14 bis L2 und von S2 bis S6. In diesen Segmenten zeigte sich stets eine deutliche ChAT-Immunoreaktivität der Columna Terni. Der Nucleus intercalatus spinalis ist in beiden Vögeln nicht als eindeutige Kerngruppe zu identifizieren, vielmehr befinden sich in der Substantia intermedia vereinzelt liegende ChAT-markierte Neurone, deren Morphologie mit den Neuronen der Columna Terni übereinstimmt.

An der Rolle von Acetylcholin als Transmitter im autonomen Nervensystem gibt es keine Zweifel, und so ist es auch nicht verwunderlich, dass sich präganglionäre autonome Neurone in durchweg allen Studien an Säugetieren über die Lokalisation von ChAT im Rückenmark als immunoreaktiv erweisen (Kan *et al.*, 1978; Barber *et al.*, 1984; Phelps *et al.*, 1984; Borges & Iversen, 1986).

Auch außerhalb der Columna Terni und des Systems der präganglionären autonomen Neurone finden sich ChAT-reaktive Neurone innerhalb der Substantia intermedia, wobei sich eine Anhäufung in der Umgebung des Zentralkanales erkennen lässt. Dieses Muster ist bei Säugetieren ebenfalls bekannt, die Lamina X wird auch dort als eine der Hauptlokalisationen von cholinergen Neuronen im Rückenmark beschrieben (Barber *et al.*, 1984; Phelps *et al.*, 1984; Borges & Iversen, 1986; Wetts & Vaughn, 1994), die Neurone wurden entsprechend „central canal cluster cells“ getauft (Barber *et al.*, 1984). Bei dieser Gruppe handelt es sich wahrscheinlich um eine cholinerge Schaltstation, die sowohl Ziel von Afferenzen ist, als auch selber modulatorisch – eventuell auch auf präganglionäre autonome Neurone – wirkt. In dieser Region sind in vielen Neuronen Peptide exprimiert, so dass von einer Kolo-kalisation von Acetylcholin mit verschiedenen Peptiden in diesen Neuronen ausgegangen werden kann (Barber *et al.*, 1984; Borges & Iversen, 1986).

Die weiteren vereinzelt gelegenen ChAT-markierten Neurone der Substantia intermedia („partition cells“) der hier vorliegenden Untersuchung werden vermutlich cholinerge Interneurone sein, die – falls man von einer vergleichbaren Situation wie bei Säugetieren ausgeht – wiederum Teil eines intrinsischen cholinergen Systems bilden. Untersuchungen an der Ratte deuten darauf hin, dass die im Rückenmark beobachteten cholinergen Terminale und

Fasern weder aus Hirnregionen (Sherriff *et al.*, 1991) noch aus der Peripherie (Barber *et al.*, 1984) stammen und dass vor allen Dingen die „partition cells“ der Lamina VII an intraspinalen cholinergen Schaltkreisen beteiligt sind und in die benachbarten Segmente projizieren (Sherriff & Henderson, 1994).

Die auffälligsten ChAT-immunoreaktiven Neurone sind in der vorliegenden Untersuchung eindeutig die somatischen Motoneurone des Vorderhornes – im Einklang mit allen bisher untersuchten Spezies (Kan *et al.*, 1978; Aquilonius *et al.*, 1981; Kimura *et al.*, 1981; Barber *et al.*, 1984; Phelps *et al.*, 1984; Borges & Iversen, 1986; Thiriet *et al.*, 1992; Medina *et al.*, 1993; Medina & Reiner, 1994; Kluchova *et al.*, 2000; Munoz *et al.*, 2000; Necker, 2004). Der Gehalt an Cholinacetyltransferase in den Motoneuronen verschiedener Spezies variiert allerdings offenbar deutlich. So beträgt die ChAT-Aktivität kaltblütiger Tiere nur etwa ein Zehntel derer von Warmblütern (Kato & Murashima, 1985). Sowohl beim Huhn als auch bei der Taube lassen sich in den Untersuchungen die Veränderungen der Motoneuronengruppe im Verlauf des Rückenmarkes erkennen: das Vorhandensein einer lateralen zweiten Motoneuronengruppe in Höhe der Intumescenzen und die Varianz von Größe und Anzahl der Motoneurone abhängig vom jeweiligen Segment. Auch deren axonale Ausläufer in die Vorderwurzel sind deutlich ChAT-markiert.

Im Großen und Ganzen zeigen die Lokalisationen der cholinergen Systeme im Rückenmark von Huhn und Taube eine hochgradige Übereinstimmung mit den bei Säugetieren beschriebenen. Es ist somit durchaus auch von einer Ähnlichkeit in der Funktionsweise der verschiedenen Regelkreise auszugehen.

5.3 NADPH Diaphorase/NOS und ChAT im embryonalen Rückenmark des Huhnes

5.3.1 Entwicklung NADPH Diaphorase/NOS-reaktiver Strukturen

Die verschiedenen NADPH Diaphorase/NOS-positiven Fasern und Neurone, die sich orientierend im Rückenmark des embryonalen Huhnes ausmachen lassen, erscheinen zu unterschiedlichen Zeiten. Besonders deutlich und früh sind die Neurone in der Substantia intermedia um den Zentralkanal ausgeprägt. Interessanterweise lassen sich in frühen Stadien

wie E8 NADPH Diaphorase-markierte Strukturen im Vorderhorn nachweisen. Dies könnte auf eine Beteiligung von NO in der Entwicklung von Motoneuronen hindeuten, wie schon nach Studien an embryonalem Rattengewebe vermutet wurde, wo sich NADPH Diaphorase-reaktive Motoneurone in frühen Embryonalstadien zeigten, die zum Geburtstermin verschwanden (Kalb & Agostini, 1993; Wetts *et al.*, 1995; Brüning & Mayer, 1996b; Necker, 2005).

Im Hinterhorn der embryonalen Hühner wurde in der vorliegenden Arbeit erstaunlicherweise erst zu einem relativ späten Zeitpunkt (E18) NADPH Diaphorase/NOS-Aktivität gesehen. Hingegen waren schon sehr viel früher große Zahlen NADPH Diaphorase-positiver Spinalganglienneurone erkennbar. Das Bild der markierten Spinalganglienneurone unterschied sich von dem der adulten Tiere, da sich ein größerer Anteil an Neuronen pro Ganglion als positiv darstellte.

Weitere Studien an embryonalen Spinalganglienneuronen von Ratte (Wetts & Vaughn, 1993) und Huhn (Ward *et al.*, 1994) zeigen, dass eine Diskrepanz besteht zwischen der Expression von NADPH Diaphorase/NOS in embryonalen und adulten Spinalganglienneuronen. Während in frühen Embryonalstadien alle untersuchten Neurone in der Lage zu sein scheinen, NO zu synthetisieren, nimmt die Anzahl der markierten Strukturen in späteren Stadien stetig ab. Im adulten Gewebe der beiden Spezies zeigt nur ein kleiner Teil der Spinalganglienneurone NADPH Diaphorase/NOS-Reaktivität. Dies könnte Hinweise auf eine besondere Rolle von NO in der Entwicklung und auf Funktionen in embryonalem Gewebe geben (Wetts & Vaughn, 1993; Ward *et al.*, 1994), die sich möglicherweise von denen in adulten Neuronen unterscheiden.

Detailliertere Untersuchungen zur Lokalisation NOS-haltiger Strukturen im embryonalen Rückenmark von Vögeln, welche auch weitere Aussagen erbringen könnten über die Rolle von NO in der embryonalen Entwicklung spinaler Systeme, stehen aus.

5.3.2 Entwicklung cholinergere Strukturen

Auch wenn Cholinacetyltransferase mit sensitiven Methoden wie Radiometrie und Kationenaustausch-Methode schon ab dem Stadium E2¹/₄ in lumbalen Spinalsegmenten nachgewiesen werden konnte (Maderdrut, 1995), scheint der immunhistochemische Nachweis von ChAT in

solch frühen Stadien noch nicht möglich. ChAT-positive Neurone konnten immunzytochemisch bisher frühestens ab E9 nachgewiesen werden (Thiriet *et al.*, 1992).

Somit erscheint es nicht sicher, wie die hier vorliegenden Ergebnisse von E8 zu werten sind, da keine ChAT-markierten Neurone und keine ChAT-Aktivität im Vorderhorn erkennbar sind, obwohl zu diesem Zeitpunkt sowohl die Motoneurone des Vorderhornes als auch ein Großteil der präganglionären autonomen Neurone der Columna Terni ihre endgültige, der adulten entsprechende Lokalisation eingenommen haben müssten (Prasad & Hollyday, 1991). Entweder setzt die Expression von ChAT sehr spät ein, oder die Sensitivität der hier verwendeten Methode ist nicht ausreichend. In späteren Stadien sind die ChAT-positiven Neurone der Columna Terni und des Vorderhornes stets deutlich erkennbar.

Im Hinterhorn der Embryonen zeigen sich in den vorliegenden Untersuchungen keine ChAT-reaktiven Strukturen. Es könnte sein, dass sich die intraspinalen cholinergen Systeme erst nach der Geburt endgültig ausbilden und Synapsen bilden. Necker bestätigt das späte Auftreten cholinergischer Strukturen im Hinterhorn, konnte jedoch in seinen Untersuchungen ein Vorhandensein cholinergischer Strukturen im Hinterhorn ab Stadium E20 von 21 beim Huhn und E18 von 18 bei der Taube beschreiben (Necker, 2005).

Interessanterweise ist eine ChAT-Markierung der Hofmannschen Kerne im embryonalen Hühnerrückenmark zu beobachten, die in keinem der Versuche an adultem Gewebe gezeigt werden konnte. Auch wenn noch keine Klarheit über die Funktion dieser Neurone herrscht, wird vermutet, dass sie als kommissurale Interneurone Afferenzen auch an die kontralateralen Motoneurone abgeben und somit Einfluss auf die Motorik ausüben (Eide, 1996). Ob dies der Fall ist und inwieweit ihnen eine spezifische Funktion während der embryonalen Entwicklung zukommt, ist durch weitere Arbeiten zu ergründen.

5.4 Kolokalisation von NADPH Diaphorase und ChAT in spinalen Systemen von Huhn und Taube

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Kolokalisation von NOS und ChAT im Rückenmark von Huhn oder Taube nachgewiesen werden. Zwar existieren Gebiete mit deutlicher Kodistribution der beiden Neurotransmitter – um den Zentralkanal und in der

Substantia intermedia – aber auch in diesen stellen Neurone, die beide Transmitter enthalten, die absolute Ausnahme dar.

Detaillierte Studien mit Doppelmarkierungen für NADPH Diaphorase und ChAT an der Ratte hingegen ergaben, dass in allen vier Gruppen von NADPH Diaphorase-positiven Neuronen im Rückenmark ebenfalls deutliche ChAT-Immunoreaktivität nachzuweisen ist. So stellten sich 62% der präganglionären autonomen Neurone, 54% der „partition cells“ in Lamina VII, 70% der Neurone in den Laminae III - V des Hinterhornes und 56% der Neuronen um den Zentralkanal als doppelt markiert dar (Wetts & Vaughn, 1994).

Im Hinterhorn der beiden untersuchten Vögel zeigten sich in der vorliegenden Studie gemeinsames Vorkommen von NOS- sowie ChAT-markierten Neuronen hauptsächlich in den tieferen Laminae an der Basis des Hinterhornes, wo sich von beiden Gruppen jeweils nur vereinzelte Neurone befinden. Hingegen waren Laminae I und II NOS-positiven und Laminae III und IV eher cholinergen Strukturen vorbehalten. Während zumindest bei der Ratte von einer deutlichen Kolokalisation in dieser Region ausgegangen werden kann (Spike *et al.*, 1993; Wetts & Vaughn, 1994), scheint im Hinterhorn des Frosches noch nicht einmal eine Kodistribution der beiden Transmitter zu herrschen, zumal keine cholinergen Neurone im Hinterhorn von *Rana perezi* nachweisen werden konnten (Munoz *et al.*, 2000).

Die Neurone der Substantia intermedia, zu denen auch die präganglionären autonomen Neurone gehören, weisen bei Huhn und Taube ebenfalls keine Kolokalisation auf. Dies steht im Kontrast zu allen bisherigen Arbeiten an Säugetieren, in denen die Expression von NOS und ChAT in den autonomen präganglionären Neuronen vergleichend untersucht wurde (Anderson, 1992; Blottner & Baumgarten, 1992; Dun *et al.*, 1992; Dun *et al.*, 1993; Spike *et al.*, 1993; Wetts & Vaughn, 1994). Nur für den Frosch ist bisher ein ähnliches Fehlen von Kolokalisation von NOS und ChAT beschrieben worden (Munoz *et al.*, 2000). Nach vorliegenden Ergebnissen scheint Stickoxid für die spinale Steuerung sympathischer oder parasymphischer Efferenzen bei Vögeln kaum von Bedeutung zu sein. Es bleibt zu klären, ob dies ein gemeinsames Merkmal von Nichtsäugern ist, ob somit also die Bildung von Stickoxid in präganglionären autonomen Neuronen ein erst später in der Evolution auftauchendes Phänomen ist.

Im Vorderhorn von Huhn und Taube war in keinem der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente eine Kolokalisation von NOS und ChAT zu erkennen. NOS-markierte Strukturen stellten im Vorderhorn eher eine Rarität dar, im Gegensatz zu den

ubiquitär vorhandenen ChAT-positiven Motoneuronen. Es handelt sich hierbei offenbar um völlig unterschiedliche Neuronenpopulationen. Im Vorderhorn anderer Wirbeltierklassen hingegen wurden NOS-positive Neurone durchaus gefunden (Dun *et al.*, 1992; Valtschanoff *et al.*, 1992a; Dun *et al.*, 1993; Vizzard *et al.*, 1994b; Arevalo *et al.*, 1995; Brüning *et al.*, 1995; Gonzalez *et al.*, 1996; Munoz *et al.*, 1996; Radmilovich *et al.*, 1997; Smeets *et al.*, 1997; Marsala *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2000). Etliche Doppelmarkierungsexperimente konnten jedoch auch in diesen Spezies keine Kollokalisierung von NOS mit ChAT nachweisen (Blottner & Baumgarten, 1992; Dun *et al.*, 1992; Dun *et al.*, 1993; Spike *et al.*, 1993; Wetts & Vaughn, 1994). In Übereinstimmung mit hier vorliegenden Daten aus Vögeln wurde in den genannten Arbeiten keine NOS in Motoneuronen identifiziert. Warum wenige Autoren dennoch NADPH Diaphorase/NOS-Immunreaktivität in Motoneuronen fanden (Ratte: (Terenghi *et al.*, 1993); Katze: (Pullen & Humphreys, 1995); Frosch: (Crowe *et al.*, 1995); Hund: (Marsala *et al.*, 1999)), ist weiter ungeklärt.

Einige Untersuchungen fanden im Rückenmark der embryonalen Ratte und Maus eine Untergruppe von Motoneuronen, die während der Entwicklung NADPH Diaphorase-positiv bzw. NOS-immunreaktiv waren und diese Eigenschaft dann aber zum Geburtszeitpunkt hin verloren (Kalb & Agostini, 1993; Wetts *et al.*, 1995; Brüning & Mayer, 1996b). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zwar in frühen Embryonalstadien des Huhnes eine diffuse Ansammlung von NADPH Diaphorase/NOS-positiven Strukturen im Vorderhorn, es konnten jedoch keine eindeutigen Hinweise auf markierte Motoneurone zu irgendeinem Zeitpunkt der Entwicklung gefunden werden.

Insgesamt kann gefolgert werden, dass cholinerge und Stickoxid bildende/ nitrerge Systeme im Rückenmark von Huhn und Taube – und somit vermutlich von Vögeln grundsätzlich – stärker voneinander getrennt existieren als dies bei Säugetieren der Fall ist. Hinweise auf eine derartige Unabhängigkeit beider Transmissionssysteme existieren ansonsten bisher nur noch für den Frosch *Rana perezi* (Munoz *et al.*, 2000).

5.5 Mögliche Kollokalisierung von NOS mit anderen Transmittern im Rückenmark von Huhn und Taube

Da bisher in keiner Spezies Neurone identifiziert wurden, die Stickoxid als alleinigen Transmitter verwenden, und NOS und ChAT nur in äußerst wenigen Zellen im Rückenmark

von Huhn und Taube gemeinsam exprimiert sind, drängt sich die Frage auf, welche anderen Ko-Transmitter Stickoxid in spinalen Systemen von Vögeln möglicherweise besitzt.

Für das Gehirn von Vögeln wurde aufgrund des Verteilungsmusters von NOS die Hypothese aufgestellt, dass NO nicht nur mit einem einzelnen, sondern mit einer Vielzahl von anderen Transmittern kolokalisiert ist (Brüning, 1993; Panzica *et al.*, 1994). Im Hypothalamus der Vögel wurden die Lokalisation von NOS und Antidiuretischem Hormon (ADH) vergleichend untersucht und keinerlei Koexpression gefunden (Sanchez *et al.*, 1996). In einigen mesencephalen Neuronen – nicht jedoch im Diencephalon und im Pons – wurde eine partielle Koexpression von NOS und Tyrosinhydroxylase, dem Markerenzym für catecholaminerge Neurone, beschrieben (Montagnese & Csillag, 1996; Panzica *et al.*, 1996). Obwohl im Mesencephalon und pontinen Tegmentum von Vögeln auch eine weitgehende Ähnlichkeit mit der Verteilung von cholinergen Neuronen besteht, wurde ebenfalls nur eine partielle Koexpression von NOS und ChAT gefunden (Panzica & Garzino, 1997).

Am Rückenmark von Vögeln wurden Lokalisation und Kolokalisation verschiedener Transmitter untersucht, so dass sich durchaus Überlegungen zur möglichen Koexistenz dieser Substanzen mit NOS anstellen lassen.

Substanz P – ein Transmitter in primären Afferenzen, die nozizeptive Stimuli vermitteln – konnte in einigen NOS-immunoreaktiven Spinalganglienneuronen von Ratten und Affen nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 1993). Im Rückenmark des Huhnes sind vor allen Dingen Fasern in den Laminae I und II sowie Fasern und Perikarya um den Zentralkanal herum positiv für Substanz P (Lavalley & Ho, 1983; Du *et al.*, 1987; Sakamoto & Atsumi, 1989). Diese Verteilung lässt durchaus eine Kolokalisation von NOS mit Substanz P und eine Beteiligung von NO an der Schmerzverarbeitung in spinalen Systemen von Vögeln vermuten.

Ähnlichkeit zur Lokalisation von NOS ist auch im Verteilungsmuster für das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP) zu sehen. So ist VIP-Immunreaktivität vor allem in der Lamina I und um den Zentralkanal erkennbar (Du & Dubois, 1988).

Weitere Peptidtransmitter, für die Daten zur Lokalisation im Rückenmark von Vögeln vorliegen, sind Somatostatin und Methionin-Enkephalin. Beide sind ebenfalls hauptsächlich im Hinterhorn und um den Zentralkanal sowie nahe der Columna Terni nachzuweisen (Lavalley & Ho, 1983). Auch Immunreaktivität für das Calcium-bindende Protein Calbindin wird sowohl eindeutig in einem Teil der sensorischen Neurone der Spinalganglien nachgewiesen, als auch im Lissauer Trakt und in Neuronen der Laminae I bis III und um den

Zentralkanal (Lunam, 1989). Diese Verteilung scheint wiederum der von NOS nicht unähnlich und legt – auch durch die Abhängigkeit der neuronalen NOS von Calcium – eine Kolokalisation nahe.

γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin stellen auch im Rückenmark von Vögeln wichtige inhibitorische Neurotransmitter in Interneuronen in allen Bereichen der grauen Substanz dar (Spike *et al.*, 1993). Insbesondere in Lamina II und III darf angenommen werden, dass NO bei Vögeln – wie bei Säugern beschrieben (Valtschanoff *et al.*, 1992b; Berki *et al.*, 1995; Popratiloff *et al.*, 1996) – ein Ko-transmitter GABAerger Neurone darstellen könnte, evtl. in zusätzlicher Koexpression mit Glycin. Die in der vorliegenden Arbeit gefunden NOS-positiven, ChAT-negativen Neurone in der Columna Terni könnten mit den von Bogan beschriebenen GABAergen Interneuronen in der präganglionären Kernsäule identisch sein (Bogan *et al.*, 1989).

Auch catecholaminerge Systeme sind im Rückenmark von Vögeln untersucht worden (Sako *et al.*, 1986; Okado *et al.*, 1991). Okado fand einen besonders hohen Anteil von Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen und Fasern in den Laminae I, V und X und dichte Fasergeflechte in der medialen Säule der Motoneurone. Daher erscheint auch eine partielle Kolokalisation von NOS mit catecholaminergen Neuronen denkbar.

Insgesamt kann angenommen werden, dass NO auch im Rückenmark von Vögeln nicht nur mit einem sondern mit mehreren Neurotransmittern kolokalisiert ist und so auch verschiedene Funktionen in der Neurotransmission erfüllt. Studien, die weiteren Aufschluss über NO und seine Funktion in spinalen Systemen liefern könnten, stehen noch aus.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit liefert als erste eine umfassende Untersuchung über die Lokalisation und Kolokalisation von Cholinacetyltransferase und Stickoxidsynthase in spinalen Systemen von Vögeln. Durch die Untersuchung an zwei verschiedenen Vogelarten, durch die Verwendung sowohl von adultem als auch von embryonalem Gewebe und die Einbeziehung immunhistochemischer und enzymhistochemischer Methoden baut sie auf vorhandenes Wissen auf und ergänzt dieses.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die hier gewonnenen Erkenntnisse über cholinerge Neurotransmission im Rückenmark bei *Gallus domesticus* und *Columba livia* weitestgehend mit den Gegebenheiten anderer Spezies übereinstimmen. Trotz der differentiellen evolutionären Entwicklung der verschiedenen Klassen von Wirbeltieren kommt Cholinacetyltransferase damit eine bedeutende Rolle in der Neurotransmission in autonomen und somatischen Neuronenpopulationen zu, daneben scheint Acetylcholin vergleichbare Funktionen der spinalen Transmission sowohl bei Vögeln als auch bei Säugetieren zu übernehmen.

Die Verteilung von NOS innerhalb der hier untersuchten Gewebe von *Gallus domesticus* und *Columba livia* zeigt hingegen an, dass die Rolle von NO in spinalen Systemen von Vögeln nicht deckungsgleich ist mit der in Säugetieren beschriebenen. Zwar lässt sich NO erneut auch in den aktuellen Untersuchungen eine Aufgabe in der sensorischen Informationsverarbeitung zuschreiben, im Gegensatz zu Säugetieren scheint jedoch der Anteil von NO an der autonomen Transmission bei Vögeln verschwindend gering zu sein.

Die Experimente konnten keine signifikante Kolokalisation der beiden Neurotransmittersynthetisierenden Enzyme ermitteln, die wenigen Beispiele für Kolokalisation waren Einzelfälle. Kolokalisierte Zellen waren vorwiegend als Interneurone um den Zentralkanal und in der Lamina VII zu beobachten. Innerhalb der Vorderhörner konnte in keinem der Experimente Kolokalisation der beiden Neurotransmitter beobachtet werden, in den Hinterhörnern der beiden Vogelarten nur zu einem sehr geringen Anteil. Präganglionäre autonome Neurone, in denen NOS und ChAT kolokalisiert waren, blieben in diesen Untersuchungen eine absolute Ausnahme. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu bisher beschriebenen Analysen über spinale autonome Transmission bei Säugetieren, die eine klare Kolokalisation beider Neurotransmitter beinhalten.

Darüber hinaus wird in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expression von NOS in den die Spinalganglienneurone umgebenden Gliazellen, den Mantel- bzw. Satellitenzellen, nachgewiesen. Es werden auch Hinweise gegeben, dass ChAT in Spinalganglienneuronen der Vögel exprimiert ist. Schließlich wird die Hypothese, dass es im Zervikalmark der Vögel dorsal austretende Axone von Motoneuronen gibt, immunzytochemisch gestützt.

Weitere Arbeiten werden nötig sein, um die spezifischere Rolle von NO in spinalen Systemen bei Vögeln – vor allen Dingen in Bezug auf mögliche Kolo-kalisation mit anderen Neurotransmittern wie z.B. GABA oder Glycin – zu untersuchen. Daneben sollte ein Augenmerk auf die Unterschiede in der autonomen Transmission bei Vögeln und Säugetieren gelegt werden, um die Signifikanz der hier beschriebenen Unterschiede besser einordnen zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, S. R., & Kimura, H. (1991). Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J.Comp Neurol.* **306**, 382-392.
2. Anderson, C. R. (1992). NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neurosci.Lett.* **139**, 280-284.
3. Aquilonius, S. M., Eckernas, S. A., & Gillberg, P. G. (1981). Topographical localization of choline acetyltransferase within the human spinal cord and a comparison with some other species. *Brain Res.* **211**, 329-340.
4. Arevalo, R., Alonso, J. R., Garcia-Ojeda, E., Brinon, J. G., Crespo, C., & Aijon, J. (1995). NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench (*Tinca tinca* L., 1758). *J.Comp Neurol.* **352**, 398-420.
5. Armstrong, D. M., Saper, C. B., Levey, A. I., Wainer, B. H., & Terry, R. D. (1983). Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J.Comp Neurol.* **216**, 53-68.
6. Atoji, Y., Yamamoto, Y., & Suzuki, Y. (2001). Distribution of NADPH diaphorase-containing neurons in the pigeon central nervous system. *J.Chem.Neuroanat.* **21**, 1-22.
7. Barber, R. P., Phelps, P. E., Houser, C. R., Crawford, G. D., Salvaterra, P. M., & Vaughn, J. E. (1984). The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J.Comp Neurol.* **229**, 329-346.
8. Bellier, J. P. & Kimura, H. (2007). Acetylcholine synthesis by choline acetyltransferase of a peripheral type as demonstrated in adult rat dorsal root ganglion. *J.Neurochem.* **101**, 1607-1618.
9. Bellier, J. P. & Kimura, H. (2011). Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. *J.Chem.Neuroanat.* **42**, 225-235.

10. Berki, A. C., O'Donovan, M. J., & Antal, M. (1995). Developmental expression of glycine immunoreactivity and its colocalization with GABA in the embryonic chick lumbosacral spinal cord. *J.Comp Neurol.* **362**, 583-596.
11. Blottner, D. & Baumgarten, H. G. (1992). Nitric oxide synthetase (NOS)-containing sympathoadrenal cholinergic neurons of the rat IML-cell column: evidence from histochemistry, immunohistochemistry, and retrograde labeling. *J.Comp Neurol.* **316**, 45-55.
12. Bogan, N., Mennone, A., & Cabot, J. B. (1989). Light microscopic and ultrastructural localization of GABA-like immunoreactive input to retrogradely labeled sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res.* **505**, 257-270.
13. Bombardi, C., Cozzi, B., Nenzi, A., Mazzariol, S., & Grandis, A. (2011). Distribution of nitregic neurons in the dorsal root ganglia of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Anat.Rec.(Hoboken.)* **294**, 1066-1073.
14. Borges, L. F. & Iversen, S. D. (1986). Topography of choline acetyltransferase immunoreactive neurons and fibers in the rat spinal cord. *Brain Res.* **362**, 140-148.
15. Brecht, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., & Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* **7**, 615-624.
16. Brecht, D. S., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**, 768-770.
17. Brecht, D. S. & Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 682-685.
18. Briggs, C. A. (1992). Potentiation of nicotinic transmission in the rat superior cervical sympathetic ganglion: effects of cyclic GMP and nitric oxide generators. *Brain Res.* **573**, 139-146.
19. Brinkman, R. & Martin, A. H. (1973). A cytoarchitectonic study of the spinal cord of the domestic fowl *Gallus gallus domesticus*. I. Brachial region. *Brain Res.* **56**, 43-62.
20. Brüning, G. (1992). Localization of NADPH diaphorase, a histochemical marker for nitric oxide synthase, in the mouse spinal cord. *Acta Histochem.* **93**, 397-401.
21. Brüning, G. (1993). Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. *J.Comp Neurol.* **334**, 192-208.

22. Brüning, G., Katzbach, R., & Mayer, B. (1995). Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. *J.Comp Neurol.* **358**, 353-382.
23. Brüning, G. & Mayer, B. (1996a). Localization of nitric oxide synthase in the brain of the frog, *Xenopus laevis*. *Brain Res.* **741**, 331-343.
24. Brüning, G. & Mayer, B. (1996b). Prenatal development of nitric oxide synthase in the mouse spinal cord. *Neurosci.Lett.* **202**, 189-192.
25. Brüning, G. & Mayer, B. (2001). Nitric oxide synthase in the spinal cord of the frog, *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* **305**, 457-462.
26. Brüning, G., Wiese, S., & Mayer, B. (1994). Nitric oxide synthase in the brain of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J.Comp Neurol.* **348**, 183-206.
27. Butcher, L. L., Talbot, K., & Bilezikjian, L. (1975). Acetylcholinesterase neurons in dopamine-containing regions of the brain. *J.Neural Transm.* **37**, 127-153.
28. Cabot, J. B. & Bogan, N. (1987). Light microscopic observations on the morphology of sympathetic preganglionic neurons in the pigeon, *Columba livia*. *Neuroscience* **20**, 467-486.
29. Carnio, E. C., Moreto, V., Giusti-Paiva, A., & Antunes-Rodrigues, J. (2006). Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. *Endocr.Metab Immune.Disord.Drug Targets.* **6**, 137-142.
30. Choi, Y., Raja, S. N., Moore, L. C., & Tobin, J. R. (1996). Neuropathic pain in rats is associated with altered nitric oxide synthase activity in neural tissue. *J.Neurol.Sci.* **138**, 14-20.
31. Crawford, G. D., Correa, L., & Salvaterra, P. M. (1982). Interaction of monoclonal antibodies with mammalian choline acetyltransferase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**, 7031-7035.
32. Crowe, M. J., Brown, T. J., Bresnahan, J. C., & Beattie, M. S. (1995). Distribution of NADPH-diaphorase reactivity in the spinal cord of metamorphosing and adult *Xenopus laevis*. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **86**, 155-166.
33. Cuello, A. C. & Sofroniew, M. V. (1984). The anatomy of the CNS cholinergic neurons. *Trends Neurosci* **7**, 74-78.

34. Czeh, B., Hajnal, A., & Seress, L. (2005). NADPH-diaphorase positive neurons of the rat hippocampal formation: regional distribution, total number and colocalization with calcium binding proteins. *Prague.Med.Rep.* **106**, 261-274.
35. Dale, H. H., Feldberg, W., & Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J.Physiol* **86**, 353-380.
36. Dawson, T. M., Brecht, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1991a). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 7797-7801.
37. Dawson, T. M., Dawson, V. L., & Snyder, S. H. (1992). A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann.Neurol.* **32**, 297-311.
38. Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Brecht, D. S., & Snyder, S. H. (1991b). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 6368-6371.
39. Doone, V. G., Pelissier, N., Manchester, T., & Vizzard, A. M. (1999). Distribution of NADPH-d and nNOS-IR in the thoracolumbar and sacrococcygeal spinal cord of the guinea pig. *J.Auton.Nerv.Syst.* **77**, 98-113.
40. Du, F., Charnay, Y., & Dubois, P. (1987). Development and distribution of substance P in the spinal cord and ganglia of embryonic and newly hatched chick: an immunofluorescence study. *J.Comp Neurol.* **263**, 436-454.
41. Du, F. & Dubois, P. (1988). Distribution of substance P and vasoactive intestinal polypeptide neurons in the chicken spinal cord, with notes on their postnatal development. *J.Comp Neurol.* **278**, 253-264.
42. Dun, N. J., Dun, S. L., Forstermann, U., & Tseng, L. F. (1992). Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci.Lett.* **147**, 217-220.
43. Dun, N. J., Dun, S. L., Wu, S. Y., Forstermann, U., Schmidt, H. H., & Tseng, L. F. (1993). Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord. *Neuroscience* **54**, 845-857.
44. Eckenstein, F. & Sofroniew, M. V. (1983). Identification of central cholinergic neurons containing both choline acetyltransferase and acetylcholinesterase and of central neurons containing only acetylcholinesterase. *J.Neurosci.* **3**, 2286-2291.

45. Eckenstein, F. & Thoenen, H. (1982). Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *EMBO J.* **1**, 363-368.
46. Egberongbe, Y. I., Gentleman, S. M., Falkai, P., Bogerts, B., Polak, J. M., & Roberts, G. W. (1994). The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* **59**, 561-578.
47. Eide, A. L. (1996). The axonal projections of the Hofmann nuclei in the spinal cord of the late stage chicken embryo. *Anat.Embryol.(Berl)* **193**, 543-557.
48. Eide, A. L. & Glover, J. C. (1997). Developmental dynamics of functionally specific primary sensory afferent projections in the chicken embryo. *Anat.Embryol.(Berl)* **195**, 237-250.
49. Feldberg, W. & Gaddum, J. H. (1934). The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *J.Physiol* **81**, 305-319.
50. Fibiger, H. C. (1982). The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res.* **257**, 327-388.
51. Funakoshi, K., Abe, T., & Kishida, R. (1995). NADPH-diaphorase activity in the sympathetic preganglionic neurons of the filefish, *Stephanolepis cirrhifer*. *Neurosci.Lett.* **191**, 181-184.
52. Funk, U. Vergleichende immunhistochemische und enzymhistochemische Lokalisation der Stickoxidsynthase im Zentralnervensystem des Huhnes, *Gallus domesticus*. 1997. Berlin, Freie Univ./Dissertation
53. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
54. Garthwaite, J., Charles, S. L., & Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* **336**, 385-388.
55. Gillberg, P. G., Askmark, H., & Aquilonius, S. M. (1990). Spinal cholinergic mechanisms. *Prog.Brain Res.* **84**, 361-370.
56. Goller, H. (1959). Topographie des Hühnerrückenmarkes. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **18**, 349-351.

57. Gonzalez-Albo, M. C., Elston, G. N., & DeFelipe, J. (2001). The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles. *Cereb.Cortex* **11**, 1170-1181.
58. Gonzalez, A., Moreno, N., Morona, R., & Lopez, J. M. (2003). Somatostatin-like immunoreactivity in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. Colocalization with catecholamines and nitric oxide. *Brain Res.* **965**, 246-258.
59. Gonzalez, A., Munoz, A., Munoz, M., Marin, O., Arevalo, R., Porteros, A., & Alonso, J. R. (1996). Nitric oxide synthase in the brain of a urodele amphibian (*Pleurodeles waltl*) and its relation to catecholaminergic neuronal structures. *Brain Res.* **727**, 49-64.
60. Griffith, T. M., Edwards, D. H., Newby, A. C., Lewis, M. J., & Henderson, A. H. (1986). Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovasc.Res.* **20**, 7-12.
61. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev.Dyn.* **195**, 231-272.
62. Holmqvist, B., Ellingsen, B., Alm, P., Forsell, J., Oyan, A. M., Goksoyr, A., Fjose, A., & Seo, H. C. (2000). Identification and distribution of nitric oxide synthase in the brain of adult zebrafish. *Neurosci.Lett.* **292**, 119-122.
63. Holmqvist, B. I., Ostholm, T., Alm, P., & Ekstrom, P. (1994). Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. *Neurosci.Lett.* **171**, 205-208.
64. Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M., & Vincent, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 2811-2814.
65. Houser, C. R., Crawford, G. D., Barber, R. P., Salvaterra, P. M., & Vaughn, J. E. (1983). Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* **266**, 97-119.
66. Houser, C. R., Crawford, G. D., Salvaterra, P. M., & Vaughn, J. E. (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J.Comp Neurol.* **234**, 17-34.
67. Huber, J. F. (1936). Nerve roots and nuclear groups in the spinal cord of the pigeon. *J.Comp Neurol.* **65**, 43-91.

68. Ichikawa, T. & Hirata, Y. (1986). Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the forebrain of the rat. *J.Neurosci.* **6**, 281-292.
69. Ichikawa, T., Ishida, I., & Deguchi, T. (1983). Monoclonal antibodies to choline acetyltransferase of rat brain. *FEBS Lett.* **155**, 306-310.
70. Ignarro, L. J. (1989). Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* **3**, 31-36.
71. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 9265-9269.
72. Jinno, S. & Kosaka, T. (2002). Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *J.Comp Neurol.* **449**, 1-25.
73. Jinno, S. & Kosaka, T. (2004). Patterns of colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector. *Neuroscience* **124**, 797-808.
74. Johnson, C. D. & Epstein, M. L. (1986). Monoclonal antibodies and polyvalent antiserum to chicken choline acetyltransferase. *J.Neurochem.* **46**, 968-976.
75. Kalb, R. G. & Agostini, J. (1993). Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development. *Neuroscience* **57**, 1-8.
76. Kan, K. S., Chao, L. P., & Eng, L. F. (1978). Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in rabbit spinal cord and cerebellum. *Brain Res.* **146**, 221-229.
77. Kasa, P. (1986). The cholinergic systems in brain and spinal cord. *Prog.Neurobiol.* **26**, 211-272.
78. Kasashima, S., Muroishi, Y., Futakuchi, H., Nakanishi, I., & Oda, Y. (1998). In situ mRNA hybridization study of the distribution of choline acetyltransferase in the human brain. *Brain Res.* **806**, 8-15.
79. Kato, T. & Murashima, Y. L. (1985). Choline acetyltransferase activities in single motor neurons from vertebrate spinal cords. *J.Neurochem.* **44**, 675-679.

80. Kharazia, V. N., Schmidt, H. H., & Weinberg, R. J. (1994). Type I nitric oxide synthase fully accounts for NADPH-diaphorase in rat striatum, but not cortex. *Neuroscience* **62**, 983-987.
81. Kimura, H., McGeer, P. L., Peng, F., & McGeer, E. G. (1980). Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* **208**, 1057-1059.
82. Kimura, H., McGeer, P. L., Peng, J. H., & McGeer, E. G. (1981). The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J.Comp Neurol.* **200**, 151-201.
83. Kitchener, P. D. & Diamond, J. (1993). Distribution and colocalization of choline acetyltransferase immunoreactivity and NADPH diaphorase reactivity in neurons within the medial septum and diagonal band of Broca in the rat basal forebrain. *J.Comp Neurol.* **335**, 1-15.
84. Kluchova, D., Rybarova, S., Miklosova, M., Lovasova, K., Schmidtova, K., & Dorko, F. (2001). Comparative analysis of NADPH-diaphorase positive neurons in the rat, rabbit and pheasant thoracic spinal cord. A histochemical study. *Eur.J.Histochem.* **45**, 239-248.
85. Kluchova, D., Schmidtova, K., Rybarova, S., Lovasova, K., Pomfy, M., Prosbova, T., & Vat'ak, A. (2000). Partial colocalization of NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase positivity in spinal cord neurons. *Physiol Res.* **49**, 151-155.
86. Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 5159-5162.
87. Koelle, G. B. & Friedenwald, J. S. (1949). A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* **70**, 617-622.
88. Kowianski, P., Morys, J. M., Wojcik, S., Dziewiatkowski, J., Luczynska, A., Spodnik, E., Timmermans, J. P., & Morys, J. (2004). Neuropeptide-containing neurons in the endopiriform region of the rat: morphology and colocalization with calcium-binding proteins and nitric oxide synthase. *Brain Res.* **996**, 97-110.
89. Lauterborn, J. C., Isackson, P. J., Montalvo, R., & Gall, C. M. (1993). In situ hybridization localization of choline acetyltransferase mRNA in adult rat brain and spinal cord. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **17**, 59-69.

90. Lavalley, A. L. & Ho, R. H. (1983). Substance P, somatostatin, and methionine enkephalin immunoreactive elements in the spinal cord of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J.Comp Neurol.* **213**, 406-413.
91. Lehmann, J. & Fibiger, H. C. (1978). Acetylcholinesterase in the substantia nigra and caudate-putamen of the rat: properties and localization in dopaminergic neurons. *J.Neurochem.* **30**, 615-624.
92. Leonard, R. B. & Cohen, D. H. (1975a). A cytoarchitectonic analysis of the spinal cord of the pigeon (*Columba livia*). *J.Comp Neurol.* **163**, 159-180.
93. Leonard, R. B. & Cohen, D. H. (1975b). Spinal terminal fields of dorsal root fibers in the pigeon (*Columba livia*). *J.Comp Neurol.* **163**, 181-192.
94. Levey, A. I., Aoki, M., Fitch, F. W., & Wainer, B. H. (1981). The production of monoclonal antibodies reactive with bovine choline acetyltransferase. *Brain Res.* **218**, 383-387.
95. Levey, A. I., Wainer, B. H., Mufson, E. J., & Mesulam, M. M. (1983). Co-localization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum. *Neuroscience* **9**, 9-22.
96. Lopez, J. M., Moreno, N., Morona, R., Munoz, M., & Gonzalez, A. (2005). Colocalization of nitric oxide synthase and monoamines in neurons of the amphibian brain. *Brain Res.Bull.* **66**, 555-559.
97. Lowenstein, C. J. & Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707.
98. Luebke, J. I., Weider, J. M., McCarley, R. W., & Greene, R. W. (1992). Distribution of NADPH-diaphorase positive somata in the brainstem of the monitor lizard *Varanus exanthematicus*. *Neurosci.Lett.* **148**, 129-132.
99. Lunam, C. A. (1989). Calbindin immunoreactivity in the neurons of the spinal cord and dorsal root ganglion of the domestic fowl. *Cell Tissue Res.* **257**, 149-153.
100. Lyser, K. M. (1973). The fine structure of the glycogen body of the chicken. *Acta Anat.(Basel)* **85**, 533-549.
101. Maderdrut, J. L. (1995). A radiometric microassay for choline acetyltransferase. Some observations on the spinal cord of the chicken embryo. *Neurochem.Res.* **20**, 69-77.

102. Marsala, J., Marsala, M., Vanicky, I., & Taira, Y. (1999). Localization of NADPHd-exhibiting neurons in the spinal cord of the rabbit. *J.Comp Neurol.* **406**, 263-284.
103. Marsala, J., Vanicky, I., Marsala, M., Jalc, P., Orendacova, J., & Taira, Y. (1998). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the spinal cord of dogs. *Neuroscience* **85**, 847-862.
104. Martin, A. H. (1979). A cytoarchitectonic scheme for the spinal cord of the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*: lumbar region. *Acta Morphol.Neerl.Scand.* **17**, 105-117.
105. Martin, A. H. & Brinkman, R. (1970). The dorsal horn of the avian spinal cord, a re-examination. *Experientia* **26**, 887-889.
106. Matsushita, M. (1968). Zur Zytoarchitektonik des Hühnerrückenmarkes nach Silberimprägnation. *Acta Anat.(Basel)* **70**, 238-259.
107. Mayer, B., John, M., & Bohme, E. (1990). Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* **277**, 215-219.
108. McGeer, P. L., McGeer, E. G., & Peng, J. H. (1984). Choline acetyltransferase: purification and immunohistochemical localization. *Life Sci.* **34**, 2319-2338.
109. McGeer, P. L., McGeer, E. G., Singh, V. K., & Chase, W. H. (1974). Choline acetyltransferase localization in the central nervous system by immunohistochemistry. *Brain Res.* **81**, 373-379.
110. Medina, L. & Reiner, A. (1994). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J.Comp Neurol.* **342**, 497-537.
111. Medina, L., Smeets, W. J., Hoogland, P. V., & Puelles, L. (1993). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *J.Comp Neurol.* **331**, 261-285.
112. Meller, S. T. & Gebhart, G. F. (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* **52**, 127-136.
113. Meller, S. T., Pechman, P. S., Gebhart, G. F., & Maves, T. J. (1992). Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience* **50**, 7-10.

114. Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Levey, A. I., & Wainer, B. H. (1984). Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* **12**, 669-686.
115. Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H., & Levey, A. I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* **10**, 1185-1201.
116. Milinski, T. & Necker, R. (2001). Histochemical and immunocytochemical investigations of the marginal nuclei in the spinal cord of pigeons (*Columba livia*). *Brain Res.Bull.* **56**, 15-21.
117. Mizukawa, K., McGeer, P. L., Tago, H., Peng, J. H., McGeer, E. G., & Kimura, H. (1986). The cholinergic system of the human hindbrain studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res.* **379**, 39-55.
118. Mizukawa, K., Vincent, S. R., McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1989). Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J.Comp Neurol.* **279**, 281-311.
119. Montagnese, C. M. & Csillag, A. (1996). Comparative distribution of NADPH-diaphorase activity and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the diencephalon and mesencephalon of the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Anat.Embryol.(Berl)* **193**, 427-439.
120. Morona, R., Moreno, N., Lopez, J. M., & Gonzalez, A. (2006). Immunohistochemical localization of calbindin-D28k and calretinin in the spinal cord of *Xenopus laevis*. *J.Comp Neurol.* **494**, 763-783.
121. Morris, R., Southam, E., Braid, D. J., & Garthwaite, J. (1992). Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neurosci.Lett.* **137**, 29-32.
122. Munoz, M., Marin, O., & Gonzalez, A. (2000). Localization of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase and choline acetyltransferase in the spinal cord of the frog, *Rana perezi*. *J.Comp Neurol.* **419**, 451-470.
123. Munoz, M., Munoz, A., Marin, O., Alonso, J. R., Arevalo, R., Porteros, A., & Gonzalez, A. (1996). Topographical distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezi*. *J.Comp Neurol.* **367**, 54-69.

124. Nagai, T., Pearson, T., Peng, F., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (1983). Immunohistochemical staining of the human forebrain with monoclonal antibody to human choline acetyltransferase. *Brain Res.* **265**, 300-306.
125. Necker, R. (2004). Distribution of choline acetyltransferase and NADPH diaphorase in the spinal cord of the pigeon. *Anat.Embryol.(Berl)* **208**, 169-181.
126. Necker, R. (2005). Embryonic development of choline acetyltransferase and nitric oxide synthase in the spinal cord of pigeons and chickens with special reference to the superficial dorsal horn. *Anat.Embryol.(Berl)* **210**, 145-154.
127. Oda, Y. (1999). Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol.Int.* **49**, 921-937.
128. Oda, Y. & Nakanishi, I. (2000). The distribution of cholinergic neurons in the human central nervous system. *Histol.Histopathol.* **15**, 825-834.
129. Oh, J. D., Woolf, N. J., Roghani, A., Edwards, R. H., & Butcher, L. L. (1992). Cholinergic neurons in the rat central nervous system demonstrated by in situ hybridization of choline acetyltransferase mRNA. *Neuroscience* **47**, 807-822.
130. Ohmori, Y., Wakita, T., & Watanabe, T. (1992). Sympathetic and sensory neurons projecting into the cervical sympathetic trunk in the chicken. *J.Auton.Nerv.Syst.* **40** , 207-213.
131. Ohmori, Y., Watanabe, T., & Fujioka, T. (1984). Location of parasympathetic preganglionic neurons in the sacral spinal cord of the domestic fowl. *Jpn.J.Zootech.Sci.* **55**, 792-794.
132. Ohmori, Y., Watanabe, T., & Fujioka, T. (1987). Projections of visceral and somatic primary afferents to the sacral spinal cord of the domestic fowl revealed by transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Neurosci.Lett.* **74**, 175-179.
133. Okado, N., Ishihara, R., Ito, R., Homma, S., & Kohno, K. (1991). Immunohistochemical study of tyrosine-hydroxylase-positive cells and fibers in the chicken spinal cord. *Neurosci.Res.* **11**, 108-118.
134. Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.

135. Panzica, G. C., Arevalo, R., Sanchez, F., Alonso, J. R., Aste, N., Viglietti-Panzica, C., Aijon, J., & Vazquez, R. (1994). Topographical distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the brain of the Japanese quail. *J.Comp Neurol.* **342**, 97-114.
136. Panzica, G. C. & Garzino, A. (1997). Anatomically specific colocalization of NADPH-diaphorase and choline acetyltransferase in the quail brainstem. *Neurosci.Lett.* **231**, 151-154.
137. Panzica, G. C., Garzino, A., & Garcia, O. E. (1996). Coexistence of NADPH-diaphorase and tyrosine hydroxylase in the mesencephalic catecholaminergic system of the Japanese quail. *J.Chem.Neuroanat.* **11**, 37-47.
138. Pasqualotto, B. A. & Vincent, S. R. (1991). Galanin and NADPH-diaphorase coexistence in cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Brain Res.* **551**, 78-86.
139. Patten, B. M. (1920). *The early embryology of the chick*, Third. ed. reprint ed. P. Blakiston's Son & Company, Philadelphia.
140. Phelps, P. E., Barber, R. P., Houser, C. R., Crawford, G. D., Salvaterra, P. M., & Vaughn, J. E. (1984). Postnatal development of neurons containing choline acetyltransferase in rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J.Comp Neurol.* **229**, 347-361.
141. Popratiloff, A., Valtschanoff, J. G., Rustioni, A., & Weinberg, R. J. (1996). Colocalization of GABA and glycine in the rat dorsal column nuclei. *Brain Res.* **706**, 308-312.
142. Prasad, A. & Hollyday, M. (1991). Development and migration of avian sympathetic preganglionic neurons. *J.Comp Neurol.* **307**, 237-258.
143. Pullen, A. H. & Humphreys, P. (1995). Diversity in localisation of nitric oxide synthase antigen and NADPH-diaphorase histochemical staining in sacral somatic motor neurones of the cat. *Neurosci.Lett.* **196**, 33-36.
144. Radmilovich, M., Fernandez, A., & Trujillo-Cenoz, O. (1997). Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in the spinal dorsal horn and spinal sensory ganglia of the turtle *Chrysemys d'orbigny*. *Exp.Brain Res.* **113**, 455-464.
145. Rapoport, R. M., Draznin, M. B., & Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* **306**, 174-176.

146. Riedel, W. & Neeck, G. (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z.Rheumatol.* **60**, 404-415.
147. Roberts, R. C. & Difiglia, M. (1988). Localization of immunoreactive GABA and enkephalin and NADPH-diaphorase-positive neurons in fetal striatal grafts in the quinolinic-acid-lesioned rat neostriatum. *J.Comp Neurol.* **274**, 406-421.
148. Rodrigo, J., Springall, D. R., Uttenthal, O., Bentura, M. L., Abadia-Molina, F., Riveros-Moreno, V., Martinez-Murillo, R., Polak, J. M., & Moncada, S. (1994). Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **345**, 175-221.
149. Rydh-Rinder, M., Holmberg, K., Elfvin, L. G., Wiesenfeld-Hallin, Z., & Hokfelt, T. (1996). Effects of peripheral axotomy on neuropeptides and nitric oxide synthase in dorsal root ganglia and spinal cord of the guinea pig: an immunohistochemical study. *Brain Res.* **707**, 180-188.
150. Saito, S., Kidd, G. J., Trapp, B. D., Dawson, T. M., Brecht, D. S., Wilson, D. A., Traystman, R. J., Snyder, S. H., & Hanley, D. F. (1994). Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* **59**, 447-456.
151. Sakamoto, H. & Atsumi, S. (1989). Substance P-immunoreactive elements in laminae I and II of the chicken spinal cord: a light- and electron-microscopic study. *Neurosci.Res.* **7**, 103-116.
152. Sako, H., Kojima, T., & Okado, N. (1986). Immunohistochemical study on the development of serotonergic neurons in the chick: II. Distribution of cell bodies and fibers in the spinal cord. *J.Comp Neurol.* **253**, 79-91.
153. Sanchez, F., Alonso, J. R., Arevalo, R., Blanco, E., Aijon, J., & Vazquez, R. (1994). Coexistence of NADPH-diaphorase with vasopressin and oxytocin in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Cell Tissue Res.* **276**, 31-34.
154. Sanchez, F., Alonso, J. R., Arevalo, R., Brüning, G., & Panzica, G. C. (1996). Absence of coexistence between NADPH-diaphorase and antidiuretic hormone in the hypothalamus of two galliforms: Japanese quail (*Coturnix japonica*) and chicken (*Gallus domesticus*). *Neurosci.Lett.* **216**, 155-158.
155. Sann, H., McCarthy, P. W., Mader, M., & Schemann, M. (1995). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in small diameter neurones of the rat dorsal root ganglion. *Neurosci.Lett.* **198**, 17-20.

156. Schemann, M., Sann, H., Schaaf, C., & Mader, M. (1993). Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am.J.Physiol* **265**, G1005-G1009.
157. Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H., & McGeer, E. G. (1983). Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J.Neurosci.Methods* **9**, 229-234.
158. Schober, A., Malz, C. R., Schober, W., & Meyer, D. L. (1994). NADPH-diaphorase in the central nervous system of the larval lamprey (*Lampetra planeri*). *J.Comp Neurol.* **345**, 94-104.
159. Scott, J. W., McDonald, J. K., & Pemberton, J. L. (1987). Short axon cells of the rat olfactory bulb display NADPH-diaphorase activity, neuropeptide Y-like immunoreactivity, and somatostatin-like immunoreactivity. *J.Comp Neurol.* **260**, 378-391.
160. Seidel, C. & Bicker, G. (1997). Colocalization of NADPH-diaphorase and GABA-immunoreactivity in the olfactory and visual system of the locust. *Brain Res.* **769**, 273-280.
161. Semba, K. & Fibiger, H. C. (1989). Organization of central cholinergic systems. *Prog.Brain Res.* **79**, 37-63.
162. Sherriff, F. E. & Henderson, Z. (1994). A cholinergic propriospinal innervation of the rat spinal cord. *Brain Res.* **634**, 150-154.
163. Sherriff, F. E., Henderson, Z., & Morrison, J. F. (1991). Further evidence for the absence of a descending cholinergic projection from the brainstem to the spinal cord in the rat. *Neurosci.Lett.* **128**, 52-56.
164. Shi, T. J., Holmberg, K., Xu, Z. Q., Steinbusch, H., de Vente, J., & Hokfelt, T. (1998). Effect of peripheral nerve injury on cGMP and nitric oxide synthase levels in rat dorsal root ganglia: time course and coexistence. *Pain* **78**, 171-180.
165. Shute, C. C. & Lewis, P. R. (1967). The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* **90**, 497-520.
166. Smeets, W. J., Alonso, J. R., & Gonzalez, A. (1997). Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in relation to catecholaminergic neuronal structures in the brain of the lizard *Gekko gekko*. *J.Comp Neurol.* **377**, 121-141.

167. Soares-Mota, M., Henze, I., & Mendez-Otero, R. (2001). Nitric oxide synthase-positive neurons in the rat superior colliculus: colocalization of NOS with NMDAR1 glutamate receptor, GABA, and parvalbumin. *J.Neurosci.Res.* **64**, 501-507.
168. Sofroniew, M. V., Eckenstein, F., Thoenen, H., & Cuello, A. C. (1982). Topography of choline acetyltransferase-containing neurons in the forebrain of the rat. *Neurosci.Lett.* **33**, 7-12.
169. Sorenson, E. M., Parkinson, D., Dahl, J. L., & Chiappinelli, V. A. (1989). Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the chicken mesencephalon. *J.Comp Neurol.* **281**, 641-657.
170. Spike, R. C., Todd, A. J., & Johnston, H. M. (1993). Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J.Comp Neurol.* **335**, 320-333.
171. Terenghi, G., Riveros-Moreno, V., Hudson, L. D., Ibrahim, N. B., & Polak, J. M. (1993). Immunohistochemistry of nitric oxide synthase demonstrates immunoreactive neurons in spinal cord and dorsal root ganglia of man and rat. *J.Neurol.Sci.* **118**, 34-37.
172. Terni, T. (1923). Ricerche anatomiche sul sistema nervoso autonomo degli uccelli. *Arch Ital Anat Embriol* **20**, 433-510.
173. Thippeswamy, T., McKay, J. S., Quinn, J. P., & Morris, R. (2006). Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad? *Histol.Histopathol.* **21**, 445-458.
174. Thippeswamy, T. & Morris, R. (2002). The roles of nitric oxide in dorsal root ganglion neurons. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **962**, 103-110.
175. Thiriet, G., Kempf, J., & Ebel, A. (1992). Distribution of cholinergic neurons in the chick spinal cord during embryonic development. Comparison of ChAT immunocytochemistry with AChE histochemistry. *Int.J.Dev.Neurosci.* **10**, 459-466.
176. Thomas, E. & Pearse, A. G. (1961). The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Z.Zellforsch.Microsk.Anat.Histochem.* **2**, 266-282.
177. Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Kharazia, V. N., Schmidt, H. H., Nakane, M., & Rustioni, A. (1993). Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. *Neurosci.Lett.* **157**, 157-161.

178. Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., & Rustioni, A. (1992a). NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J.Comp Neurol.* **321**, 209-222.
179. Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Rustioni, A., & Schmidt, H. H. (1992b). Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci.Lett.* **148**, 6-10.
180. Villani, L. & Guarnieri, T. (1995). Localization of NADPH-diaphorase in the goldfish brain. *Brain Res.* **679**, 261-266.
181. Vincent, S. R. (1984). Neuropeptide coexistence in the mammalian forebrain. In *Coexistence of Neuroactive Substances in Neurons*, eds. Chan-Palay, V. & Palay, S. L., pp. 127-135. John Wiley & Sons, New York.
182. Vincent, S. R. (1986). NADPH-diaphorase histochemistry and neurotransmitter coexistence. In *Neurohistochemistry: Modern Methods and Applications*, eds. Panula, P., Päivärinta, H., & Soinila, S., pp. 375-396. Alan R. Liss Inc., New York.
183. Vincent, S. R., Johansson, O., Hokfelt, T., Skirboll, L., Elde, R. P., Terenius, L., Kimmel, J., & Goldstein, M. (1983a). NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J.Comp Neurol.* **217**, 252-263.
184. Vincent, S. R. & Kimura, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* **46**, 755-784.
185. Vincent, S. R., Satoh, K., Armstrong, D. M., & Fibiger, H. C. (1983b). Substance P in the ascending cholinergic reticular system. *Nature* **306**, 688-691.
186. Vincent, S. R., Satoh, K., Armstrong, D. M., Panula, P., Vale, W., & Fibiger, H. C. (1986a). Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat. *Neuroscience* **17**, 167-182.
187. Vincent, S. R., Satoh, K., & Fibiger, H. C. (1986b). The localization of central cholinergic neurons. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **10**, 637-656.
188. Vizzard, M. A., Erdman, S. L., & de Groat, W. C. (1993a). Localization of NADPH-diaphorase in pelvic afferent and efferent pathways of the rat. *Neurosci.Lett.* **152**, 72-76.

189. Vizzard, M. A., Erdman, S. L., & de Groat, W. C. (1993b). The effect of rhizotomy on NADPH diaphorase staining in the lumbar spinal cord of the rat. *Brain Res.* **607**, 349-353.
190. Vizzard, M. A., Erdman, S. L., & de Groat, W. C. (1995). Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in dorsal root ganglion neurons after systemic capsaicin administration. *Neuroscience* **67**, 1-5.
191. Vizzard, M. A., Erdman, S. L., Erickson, V. L., Stewart, R. J., Roppolo, J. R., & de Groat, W. C. (1994a). Localization of NADPH diaphorase in the lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia of the cat. *J.Comp Neurol.* **339**, 62-75.
192. Vizzard, M. A., Erdman, S. L., Roppolo, J. R., Forstermann, U., & de Groat, W. C. (1994b). Differential localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in the cat spinal cord. *Cell Tissue Res.* **278**, 299-309.
193. Vizzard, M. A., Erickson, K., & de Groat, W. C. (1997). Localization of NADPH diaphorase in the thoracolumbar and sacrococcygeal spinal cord of the dog. *J.Auton.Nerv.Syst.* **64**, 128-142.
194. von Bartheld, C. S. & Bothwell, M. (1992). Development and distribution of noradrenergic and cholinergic neurons and their trophic phenotypes in the avian ceruleus complex and midbrain tegmentum. *J.Comp Neurol.* **320**, 479-500.
195. Ward, S. M., Shuttleworth, C. W., & Kenyon, J. L. (1994). Dorsal root ganglion neurons of embryonic chicks contain nitric oxide synthase and respond to nitric oxide. *Brain Res.* **648**, 249-258.
196. Wetts, R., Phelps, P. E., & Vaughn, J. E. (1995). Transient and continuous expression of NADPH diaphorase in different neuronal populations of developing rat spinal cord. *Dev.Dyn.* **202**, 215-228.
197. Wetts, R. & Vaughn, J. E. (1993). Transient expression of beta-NADPH diaphorase in developing rat dorsal root ganglia neurons. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **76**, 278-282.
198. Wetts, R. & Vaughn, J. E. (1994). Choline acetyltransferase and NADPH diaphorase are co-expressed in rat spinal cord neurons. *Neuroscience* **63**, 1117-1124.
199. Wiese, S. Lokalisation der neuronalen Stickoxidsynthase im Zentralnervensystem der Schildkröte *Pseudemys scripta elegans*. 1997. Berlin, Freie Univ./Dissertation

200. Zhang, X., Verge, V., Wiesenfeld-Hallin, Z., Ju, G., Bredt, D., Synder, S. H., & Hokfelt, T. (1993). Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J.Comp Neurol.* **335**, 563-575.

201. Zhou, Y., Mack, P. O., & Ling, E. A. (1998). Localization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase reactivity and nitric oxide synthase immunoreactivity in the lumbosacral dorsal root ganglia in guinea pigs. *J.Hirnforsch.* **39**, 119-127.

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna Hauswedell, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleichende Untersuchungen zur Verteilung von Cholinacetyltransferase und Stickoxidsynthase in spinalen Systemen von Vögeln“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Anna Hauswedell hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Brüning G, Hauswedell A. 1998. Localization of choline acetyltransferase and nitric oxide synthase in the chicken spinal cord. *Eur. J. Neurosci. Abstr.* **10**, 197

Beitrag im Einzelnen: Eigenständige Durchführung der experimentellen Arbeiten, Beteiligung an der Abfassung des Abstract

Publikation 2: Brüning G, Hauswedell A, Mayer B. Localization of nitric oxide synthase in the pigeon brain and spinal cord. *Soc. Neurosci. Abstr.* **28** (1998), 159

Beitrag im Einzelnen: Eigenständige Durchführung der experimentellen Arbeiten, Beteiligung an der Abfassung des Abstracts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

8.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.3 Publikationsliste

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht unter:

- Brüning G, Hauswedell A. 1998. Localization of choline acetyltransferase and nitric oxide synthase in the chicken spinal cord. *Eur. J. Neurosci. Abstr.* **10**, 197
- Brüning G, Hauswedell A, Mayer B. Localization of nitric oxide synthase in the pigeon brain and spinal cord. *Soc. Neurosci. Abstr.* **28** (1998), 159

Publikationen als Mitglied der NNIPPS Study Group:

- Bensimon, G., Ludolph, A., Agid, Y., Vidailhet, M., Payan, C., & Leigh, P. N.; NNIPPS Study Group. (2009). Riluzole treatment, survival and diagnostic criteria in Parkinson plus disorders: the NNIPPS study. *Brain* **132**, 156-171.
- Brown, R. G., Lacomblez, L., Landwehrmeyer, B. G., Bak, T., Uttner, I., Dubois, B., Agid, Y., Ludolph, A., Bensimon, G., Payan, C., & Leigh, N. P.; NNIPPS Study Group. (2010). Cognitive impairment in patients with multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Brain* **133**, 2382-2393.
- Rolland, Y., Verin, M., Payan, C. A., Duchesne, S., Kraft, E., Hauser, T. K., Jarosz, J., Deasy, N., Defevbre, L., Delmaire, C., Dormont, D., Ludolph, A. C., Bensimon, G., & Leigh, P. N.; NNIPPS Study Group. (2011). A new MRI rating scale for progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: validity and reliability. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* **82**, 1025-1032.
- Payan, C. A., Viallet, F., Landwehrmeyer, B. G., Bonnet, A. M., Borg, M., Durif, F., Lacomblez, L., Bloch, F., Verny, M., Fermanian, J., Agid, Y., Ludolph, A. C., Leigh, P. N., & Bensimon, G.; NNIPPS Study Group. (2011). Disease severity and progression in progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: validation of the NNIPPS--Parkinson Plus Scale. *PLoS.One.* **6**, e22293.
- McCrone, P., Payan, C. A., Knapp, M., Ludolph, A., Agid, Y., Leigh, P. N., & Bensimon, G.; NNIPPS Study Group. (2011). The economic costs of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in France, Germany and the United Kingdom. *PLoS.One.* **6**, e24369.

8.4 Danksagungen

Mein Dank gilt O. Univ.-Prof. Dr. Bernd Mayer, Karl-Franzens-Universität Graz für die Überlassung des Antiserums gegen die Stickoxidsynthase, Prof. Dr. Michael Schemann, Technische Universität München für die Überlassung des Antiserums gegen die Cholinacetyltransferase im peripheren Nervensystem und Prof. Miles Epstein, Ph.D., University of Wisconsin – Madison für die Überlassung des Antiserums gegen die Cholinacetyltransferase im zentralen Nervensystem.

Die Arbeit wäre ohne die anhaltende und intensive Betreuung von Priv.-Doz. Dr. Gerold Brünig nicht zustande gekommen. Herzlichen Dank hierfür.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Mann Julian bedanken für seine unendliche Geduld, die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit und seinen Glauben an das Gelingen.