

3. Ergebnisse

3.1 Die Substruktur der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region (LPOA/LHA)

Die LPOA/LHA beginnt rostral auf Höhe der vorderen Kommissur ungefähr bei Bregma 0,2 mm (Paxinos und Watson, 1989) und erstreckt sich etwa 4,6 mm nach kaudal bis zur Area tegmentalis ventralis (VTA). Sie weist morphologisch eine äußerst differenzierte Substruktur auf, die jedoch in den Arbeiten der letzten Jahre häufig unberücksichtigt blieb.

Bereits die kursorische Betrachtung von Schnittserien mit Färbungen nach Nissl oder Klüver-Barrera verdeutlicht die Komplexität dieses Areals. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Analyse (über 50 Serien mit mehr als 1000 einzelnen Schnitten) ermöglichte die Abgrenzung einer Reihe von unterschiedlichen Zellgruppen (*Abb. 3.1*).

Für die Untersuchung standen darüber hinaus zwei kontinuierlich geschnittene, nach Klüver-Barrera gefärbte Paraffinserien (nomienelle Schnittdicke 10 µm) durch das ventrale Dienzephalon zur Verfügung, die ergänzend zur Auswertung hinzugezogen wurden. So konnte nicht nur die Zellmorphologie sondern auch das Neuropil detailliert differenziert werden. Die morphologische Beschreibung der LPOA/LHA in der vorliegenden Arbeit beschränkt sich vereinfachend auf Charakteristika, die aus konventionellen Schnitten (nomienelle Schnittdicke 25 µm, Färbungen nach Nissl oder Klüver-Barrera) hervorgehen.

Ergänzend zur Zytoarchitektur sind bei der Identifizierung von Subarealen häufig auch immunzytochemische Informationen hilfreich. Wenn auch keines der 24 untersuchten Antigene (*Tab. 3.1*) durch seine Lokalisation eine sichere Identifizierung von Zellgruppen in der LPOA/LHA erlaubt, so gelingt durch die Kombination von Zyto- und Chemoarchitektur eine Unterteilung der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region dennoch. Auf Basis der so gewonnenen Informationen konnten die Afferenzen der LPOA/LHA zum lateralen Habenularkomplex (LHb) wesentlich präziser charakterisiert werden.

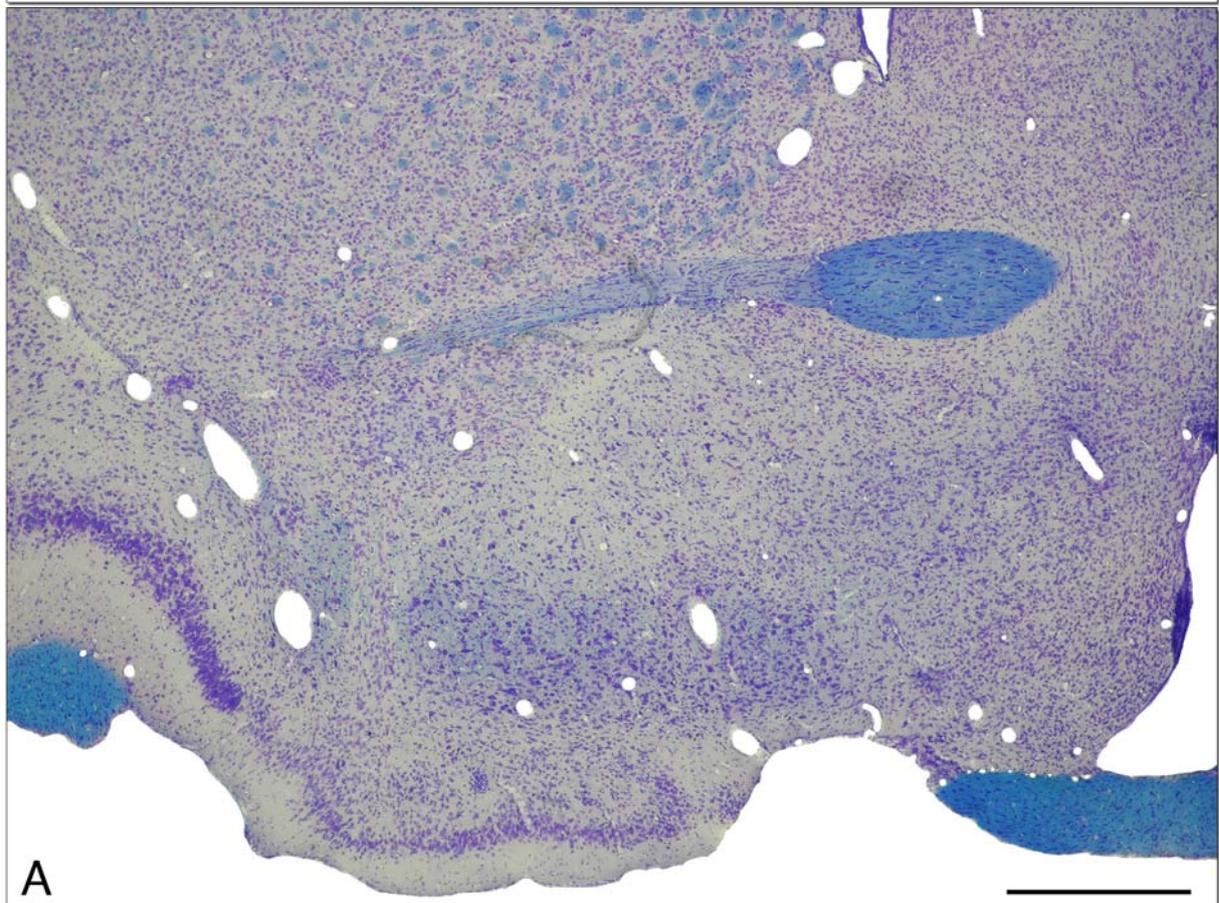
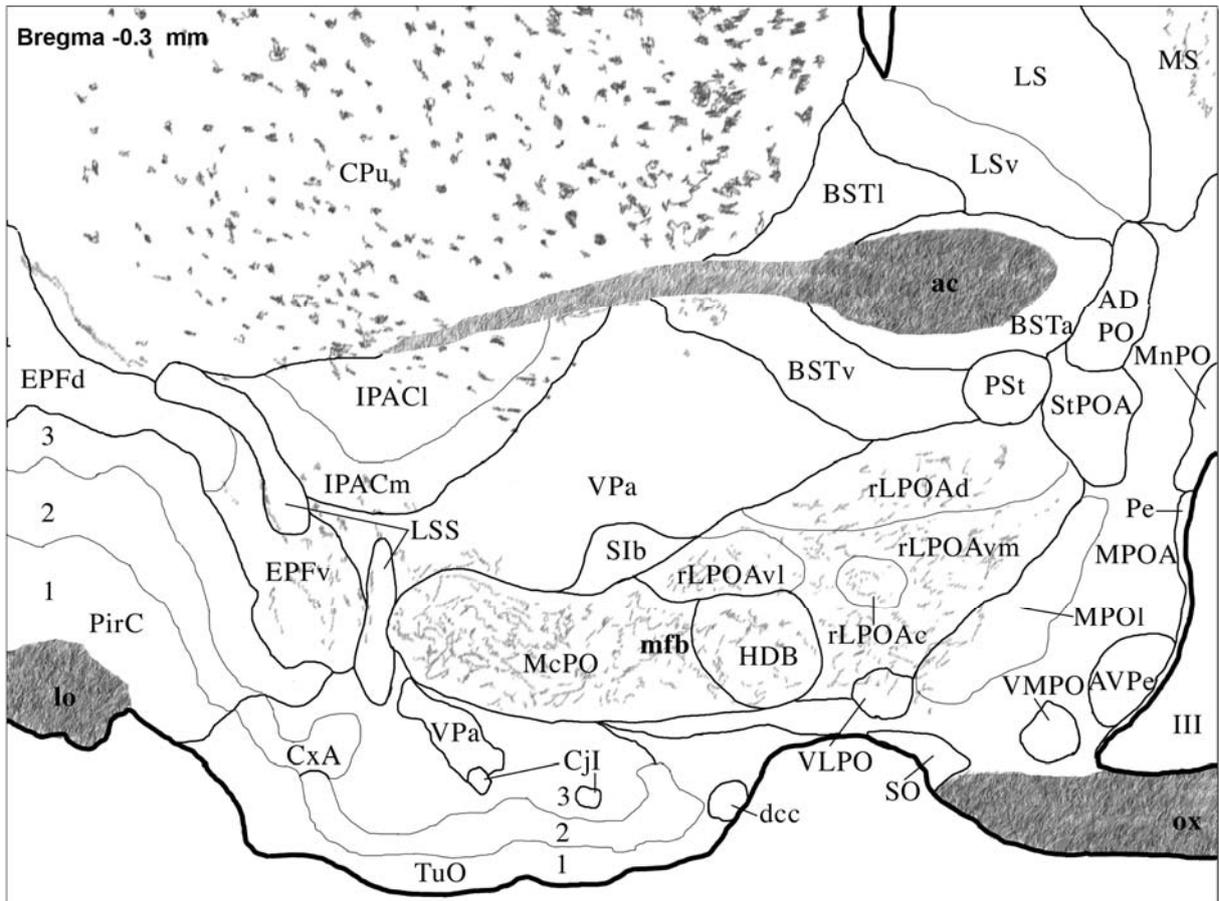


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

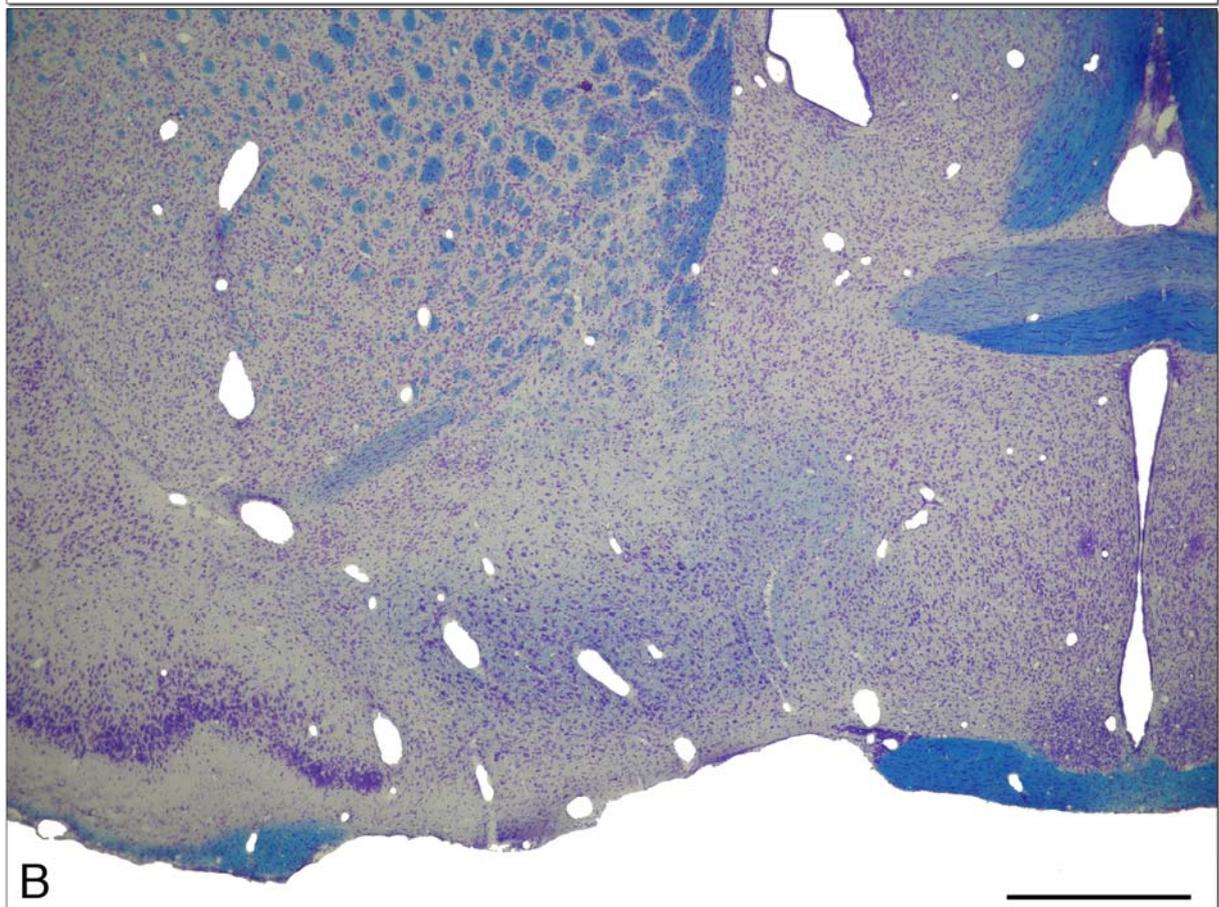
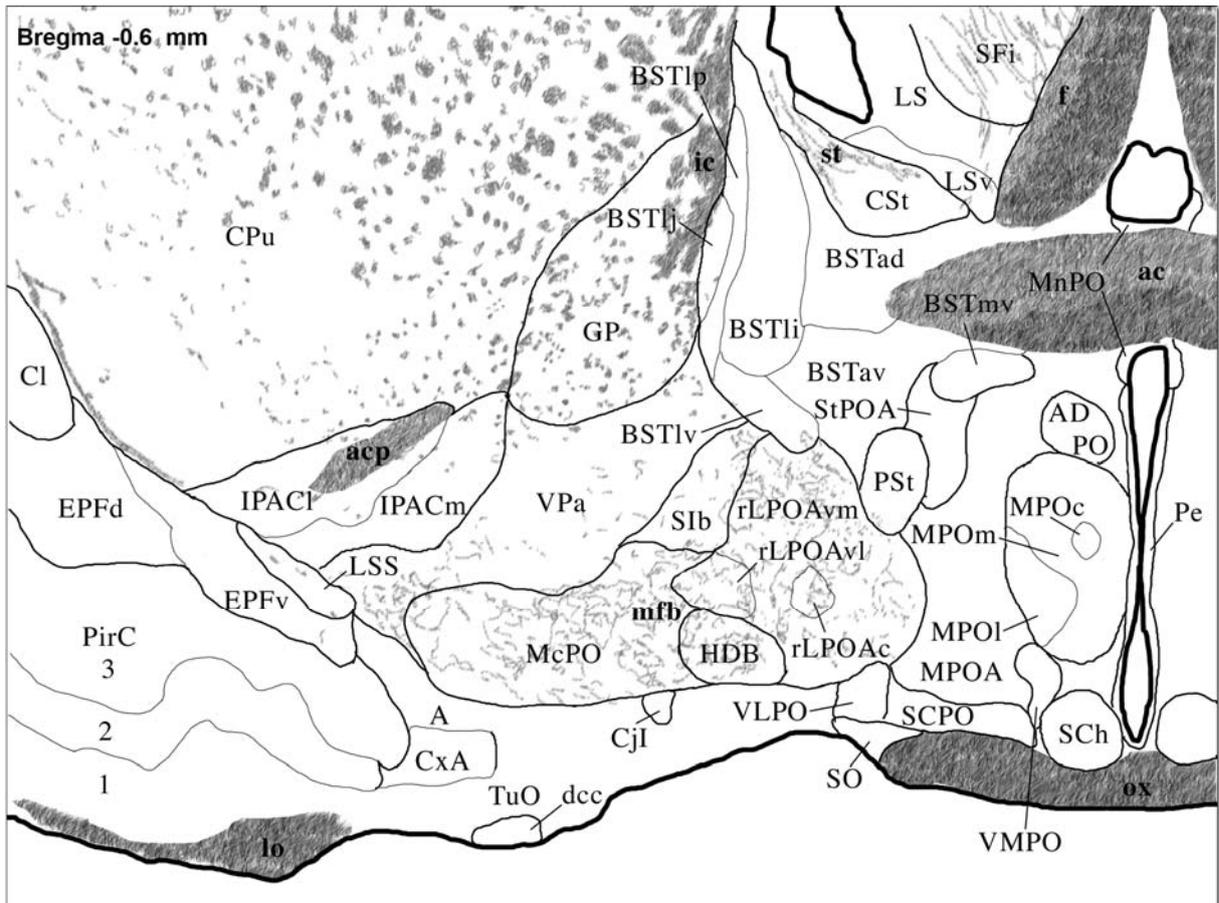
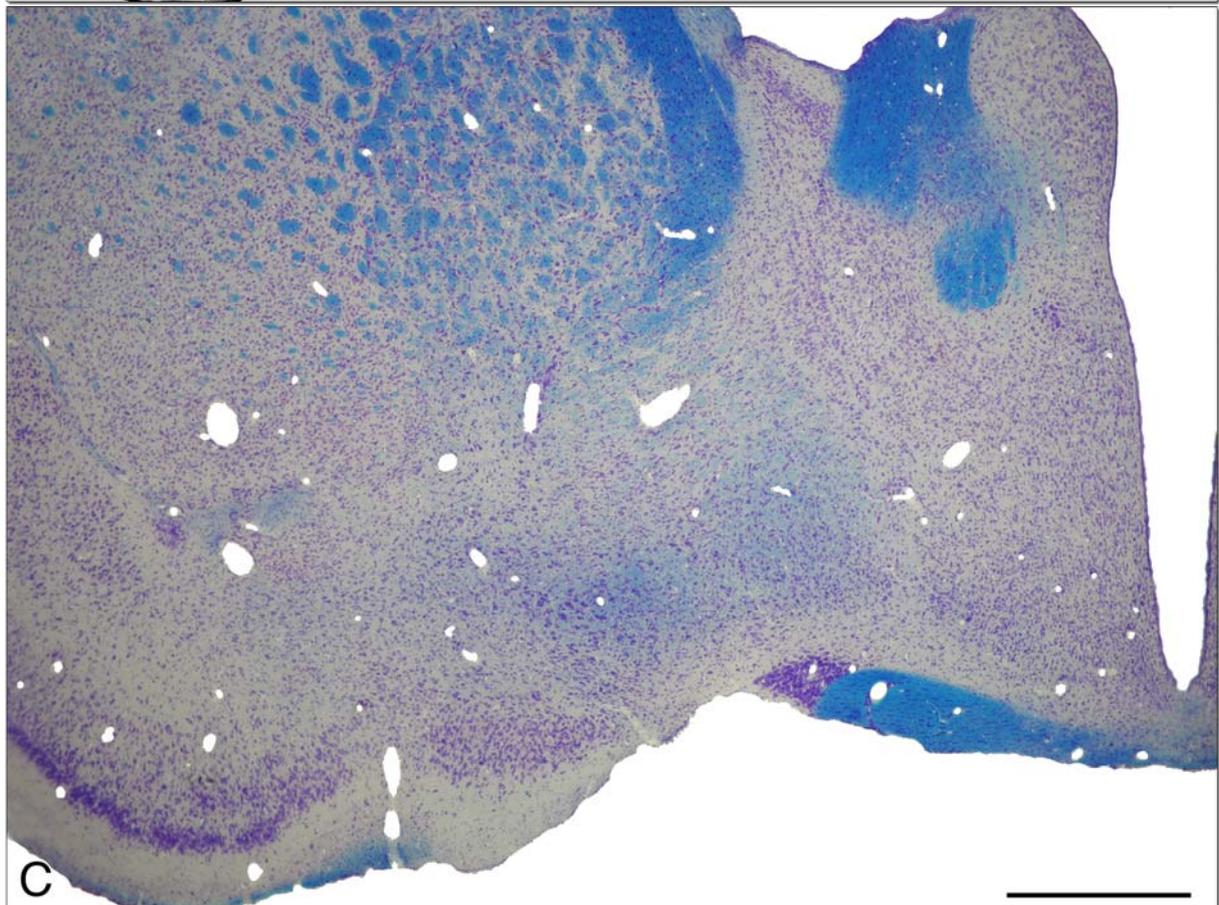
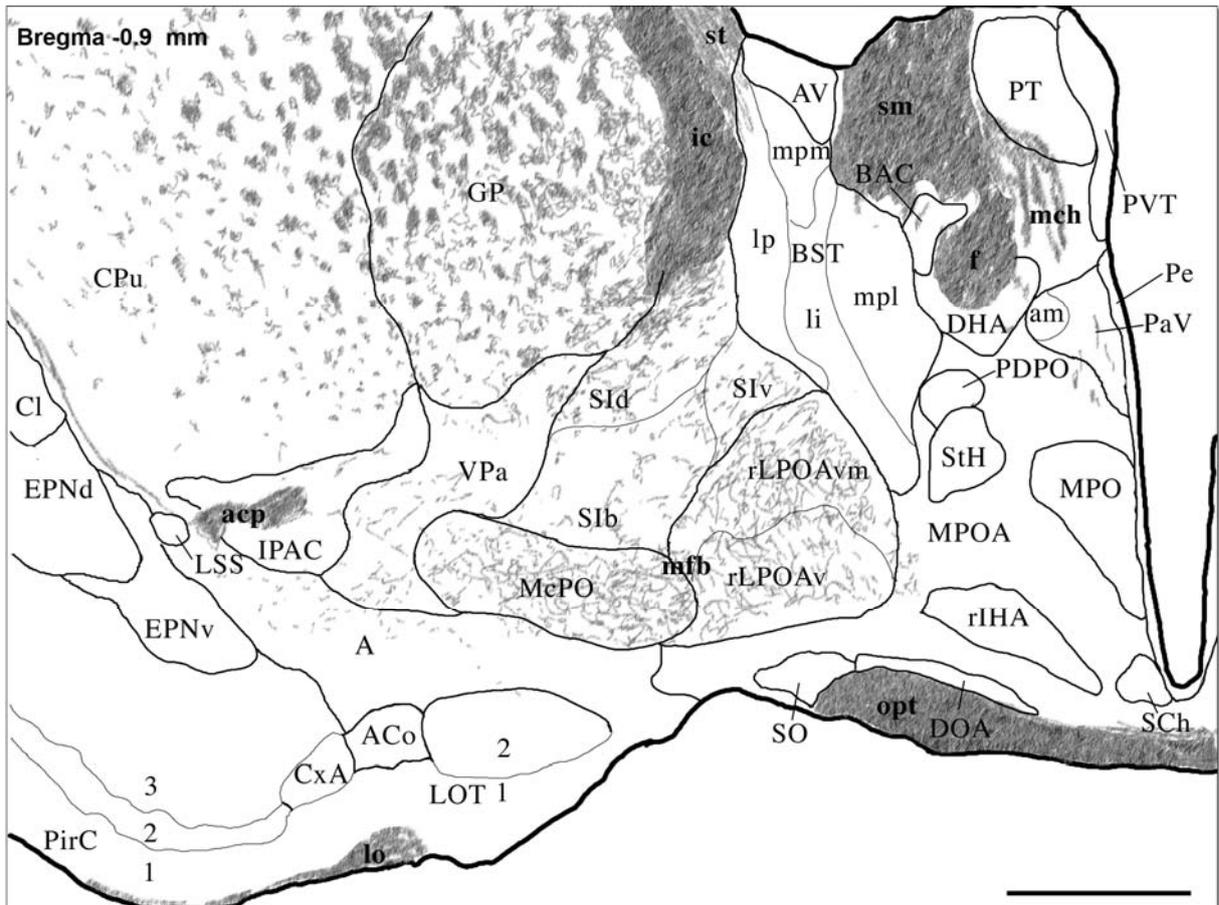
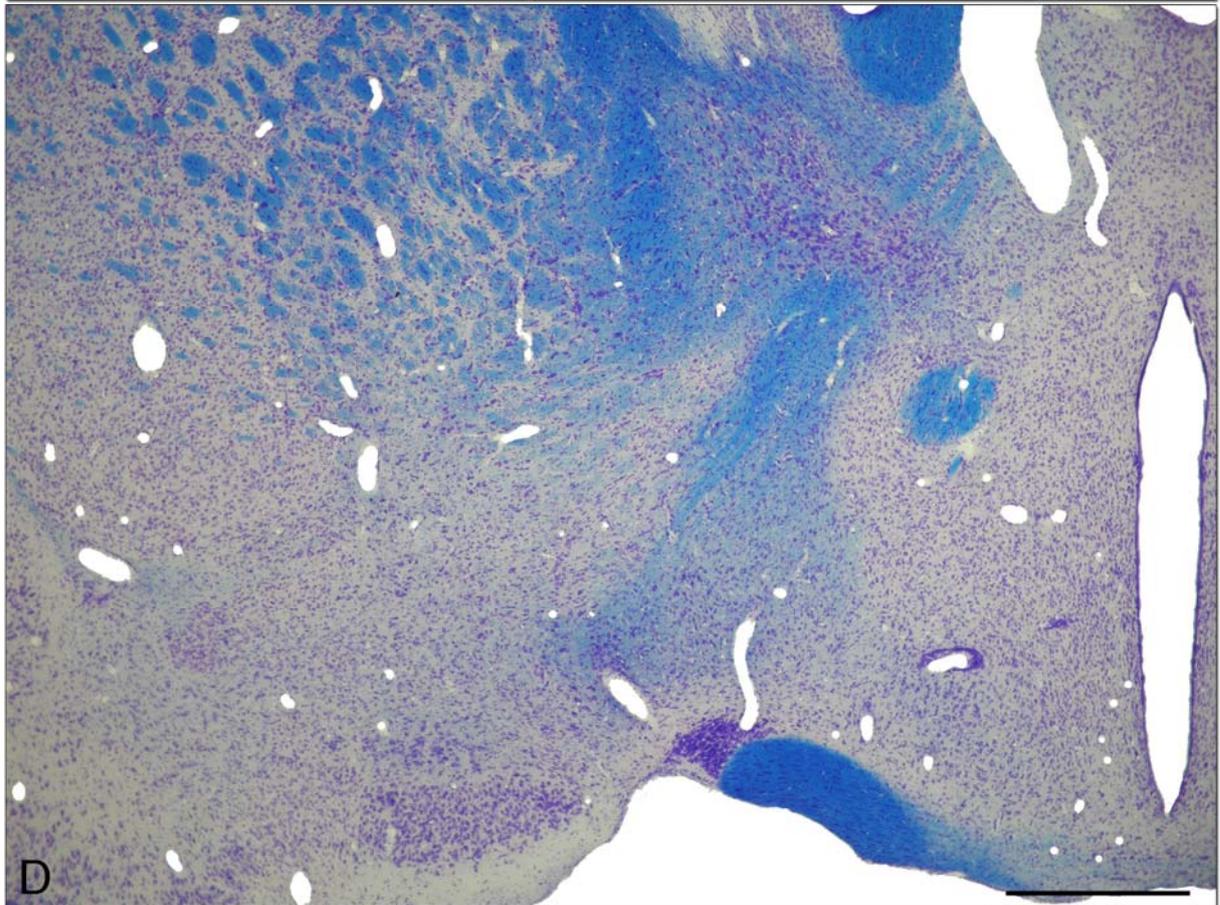
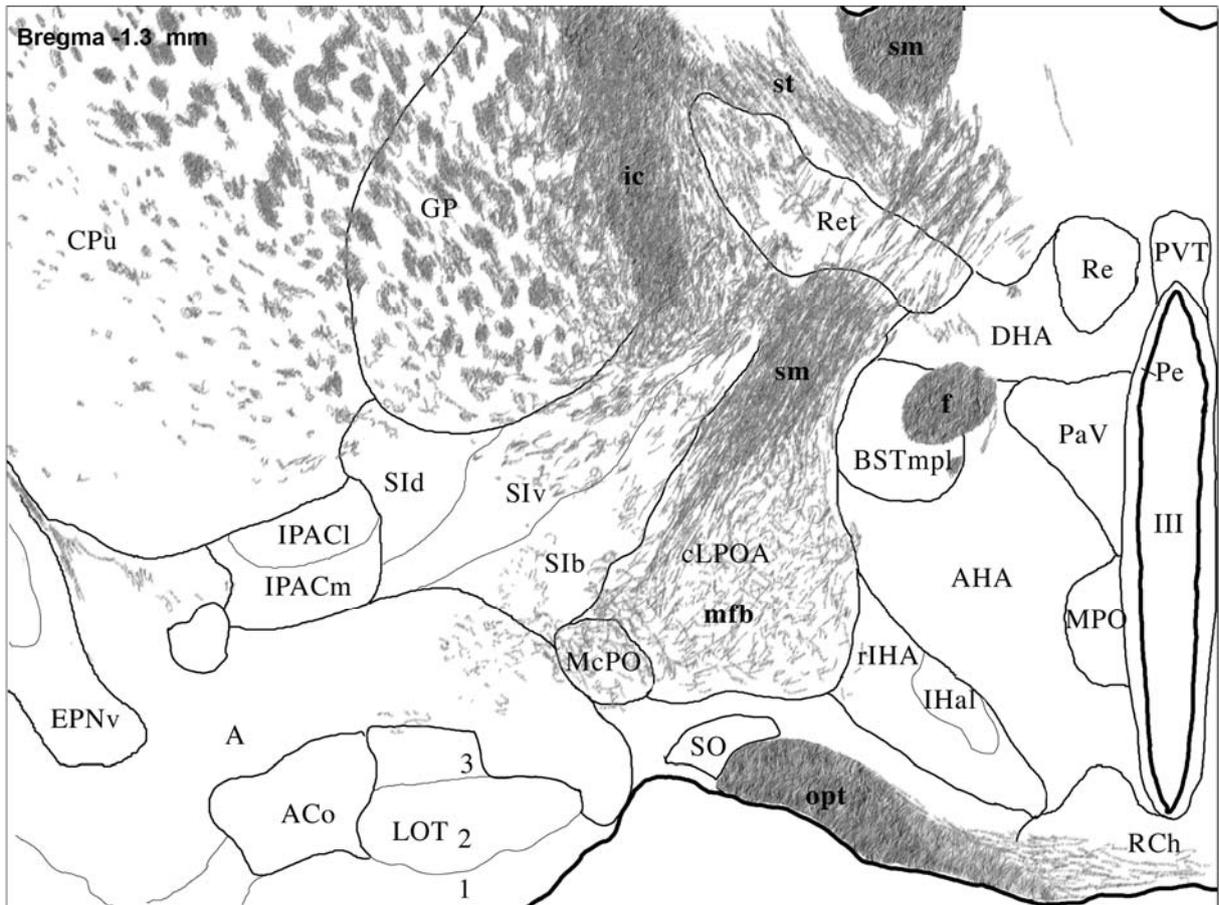


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.



C
Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.



D

Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

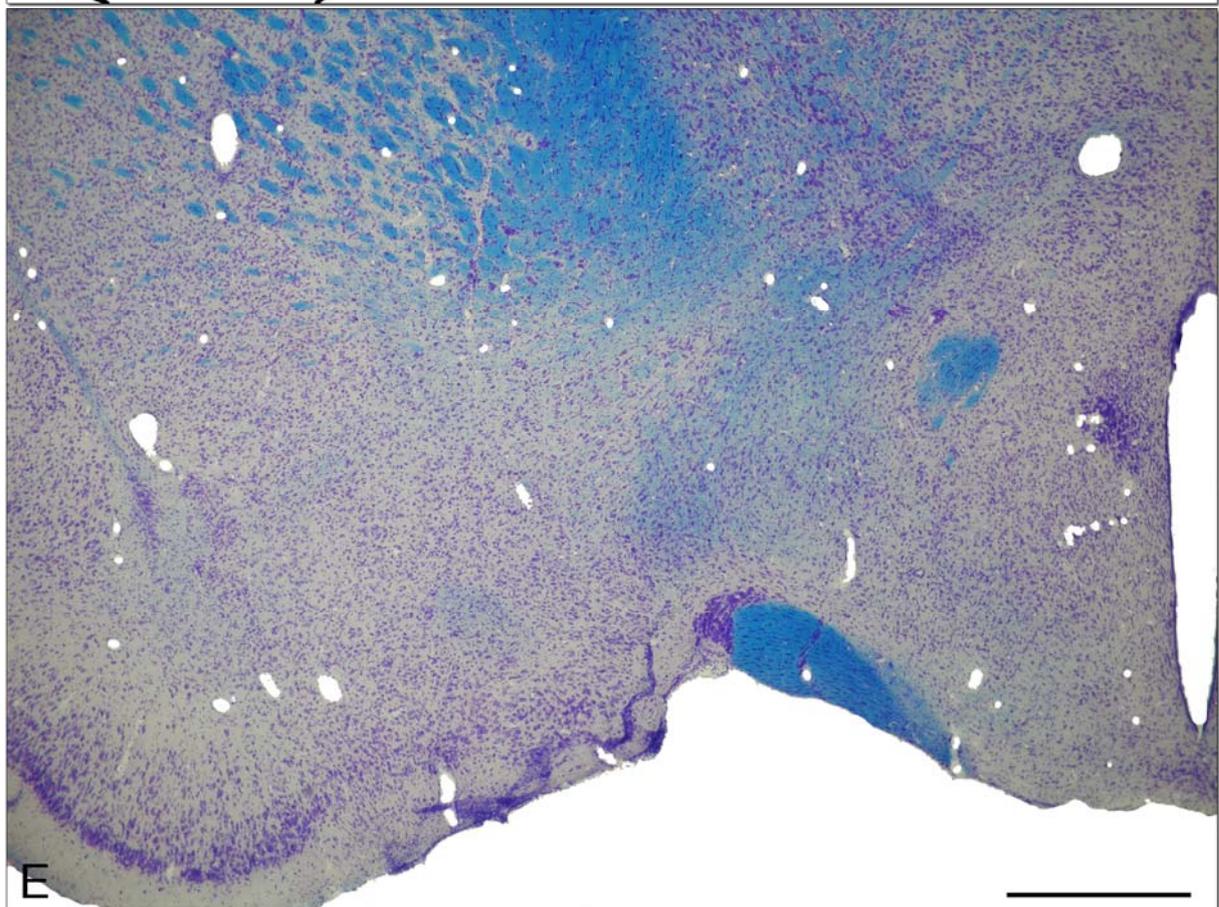
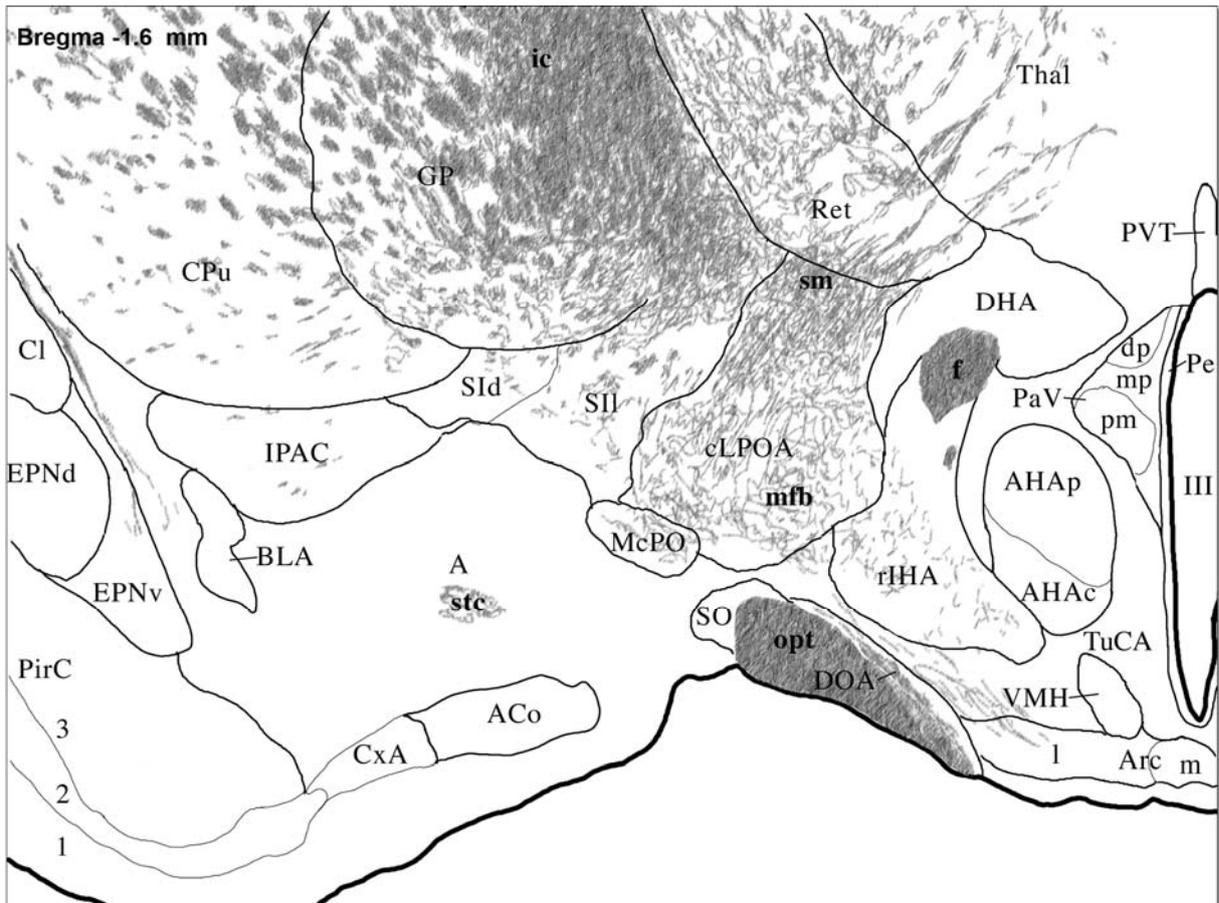


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

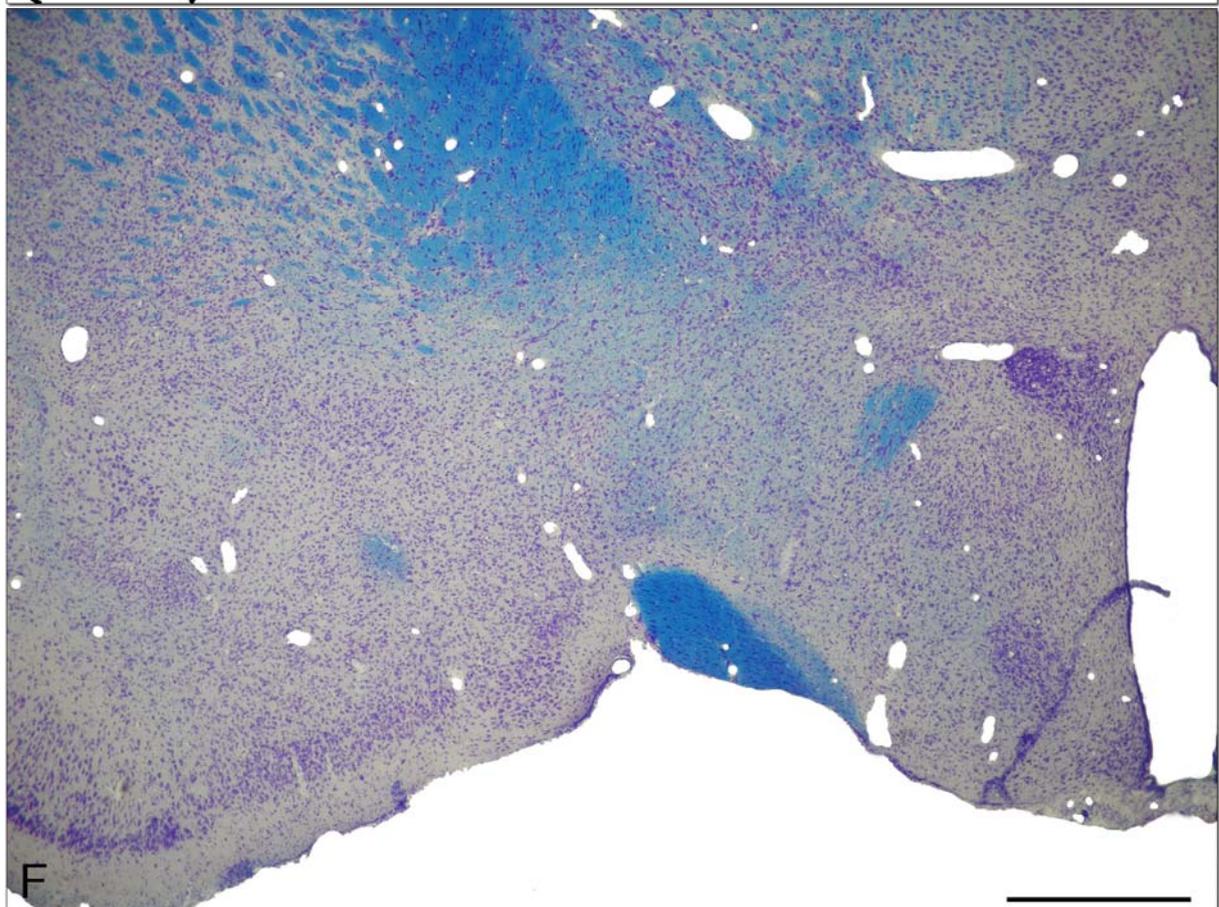
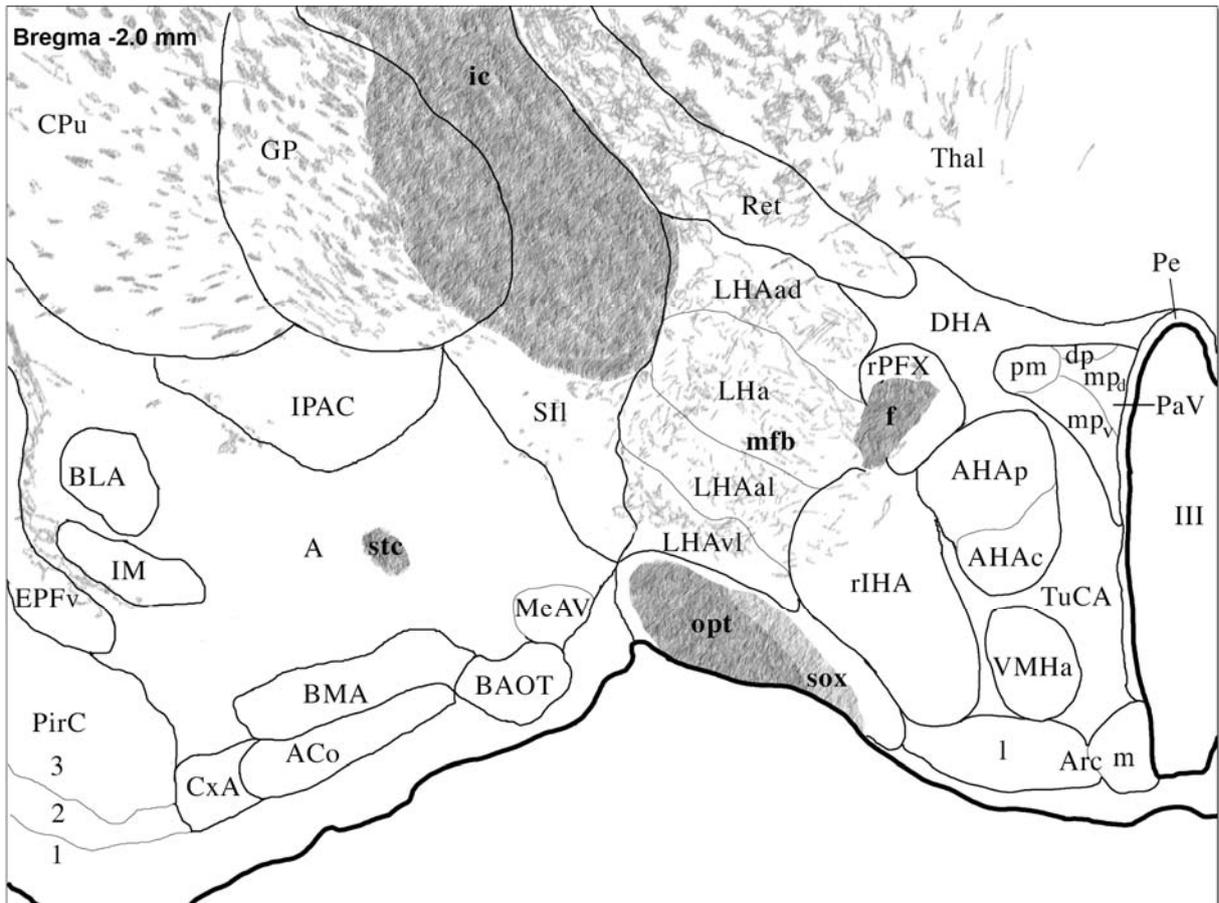


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

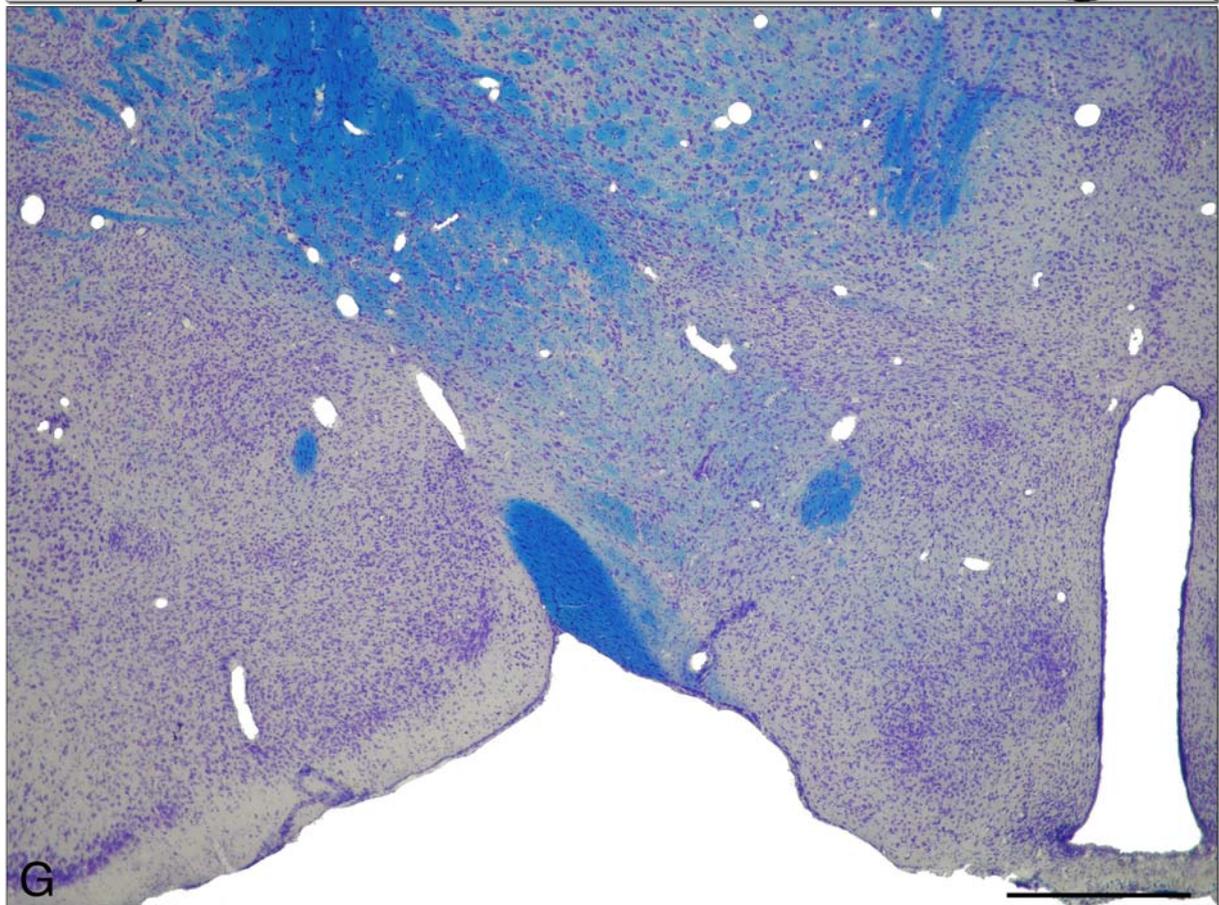
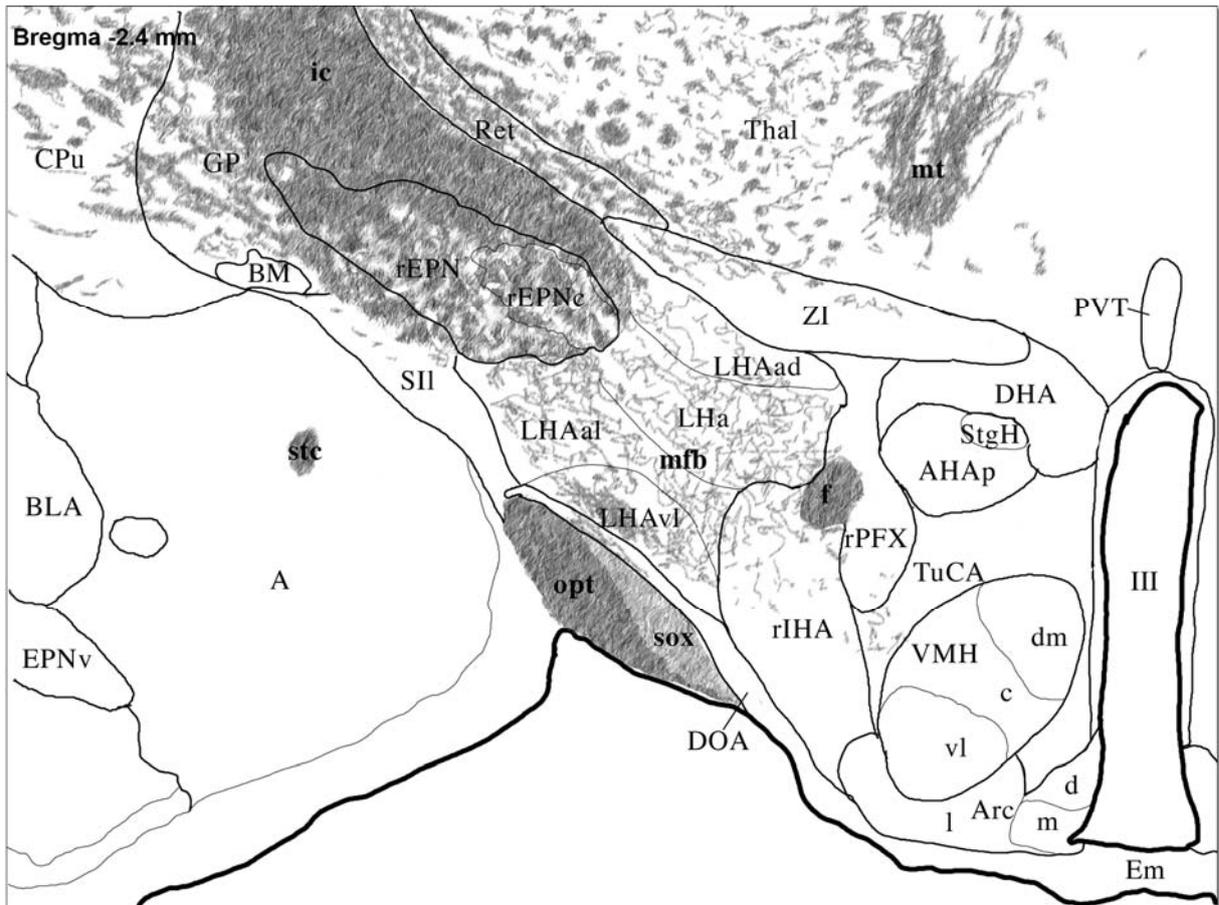


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

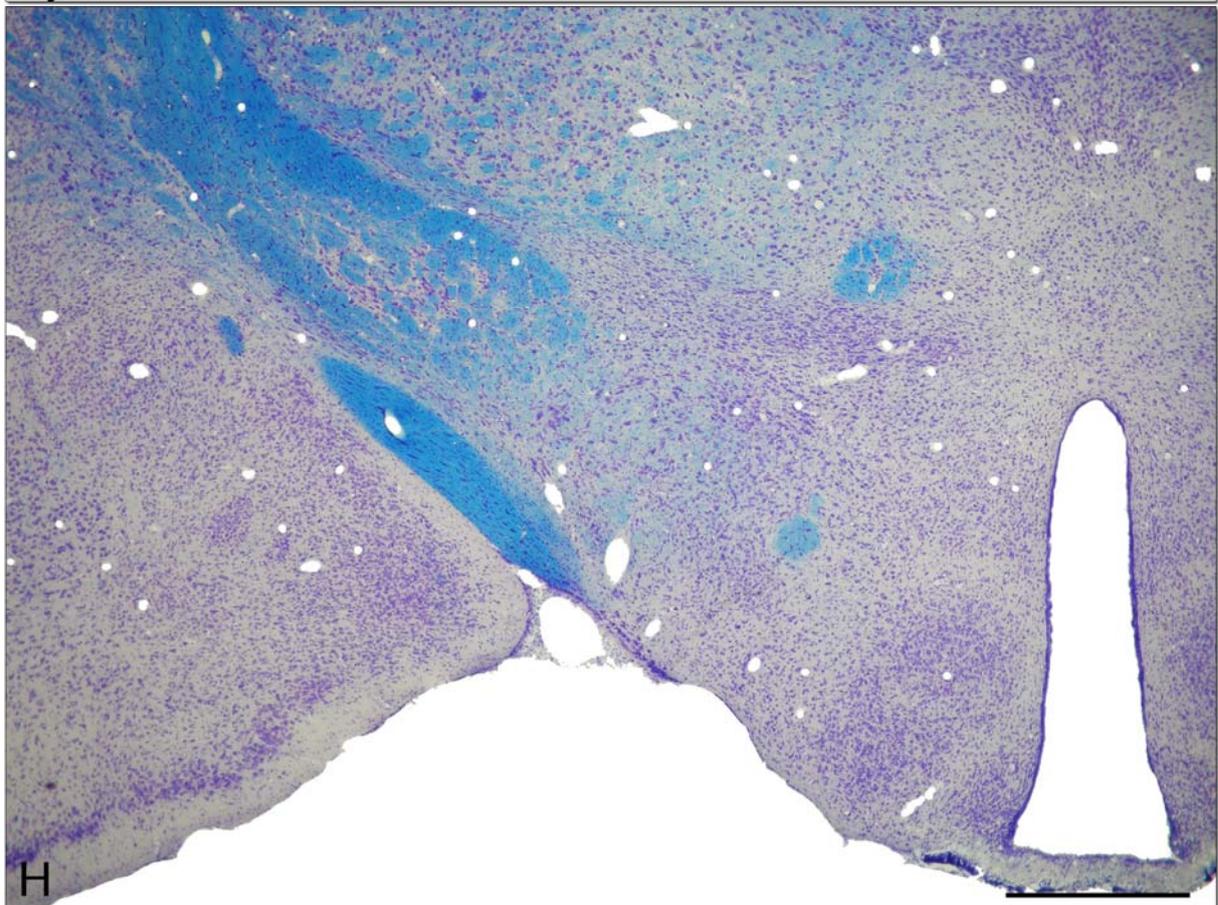
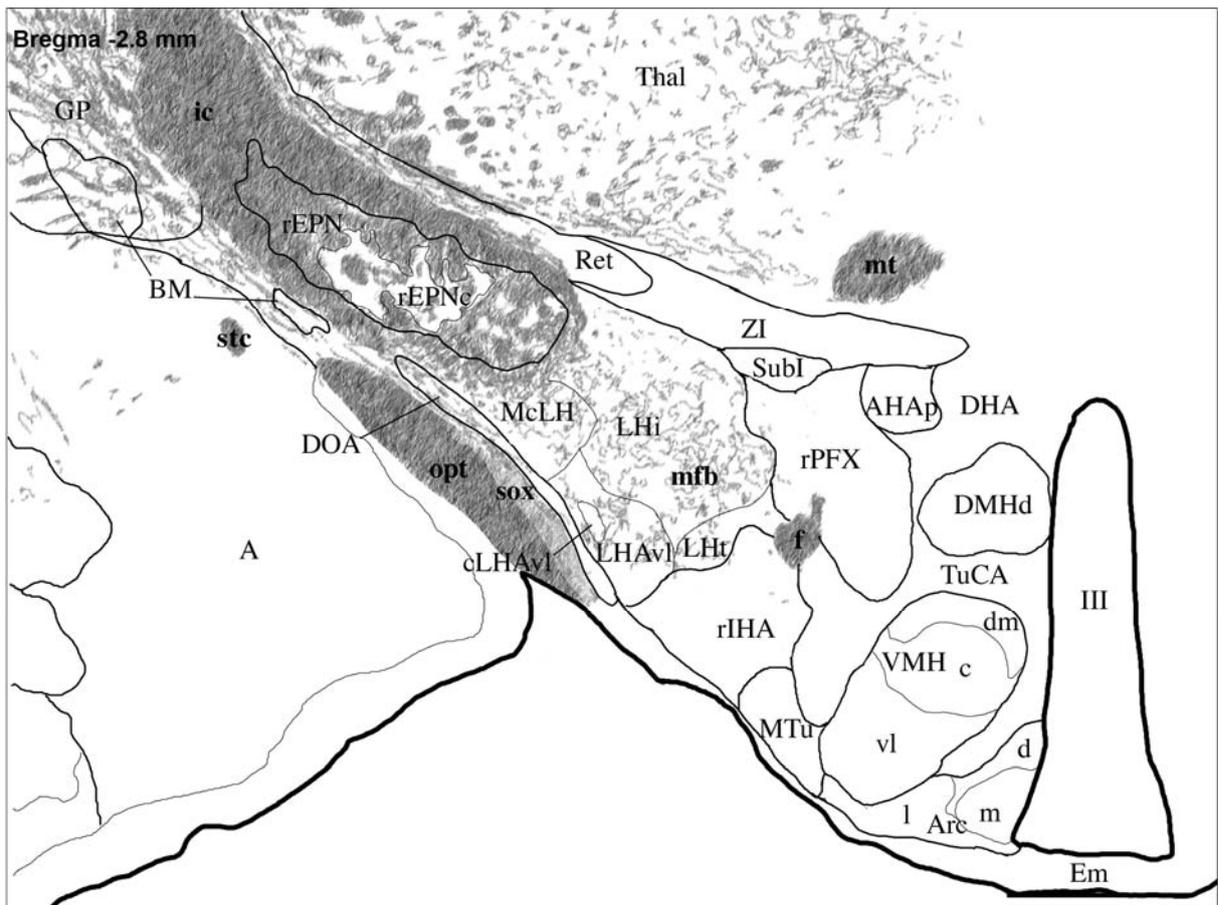


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

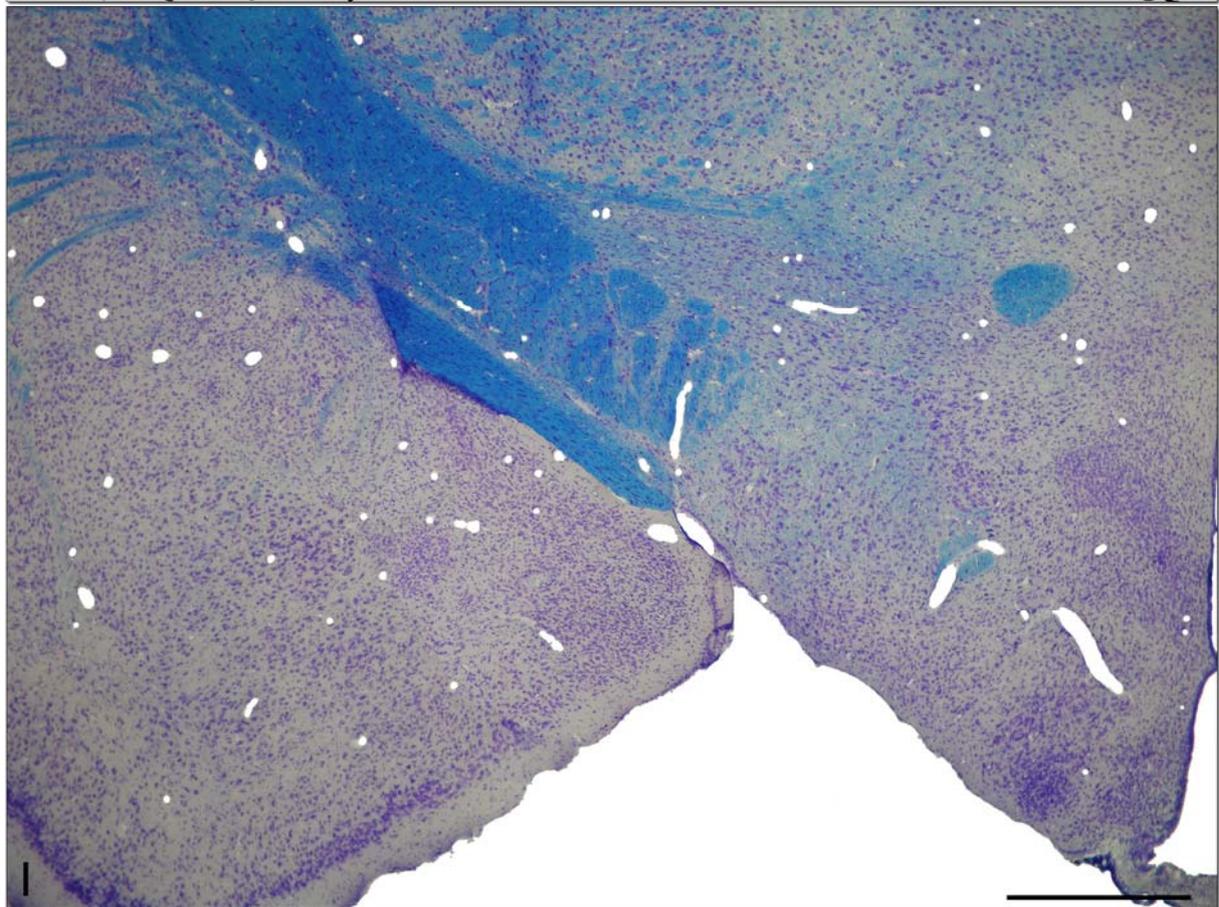
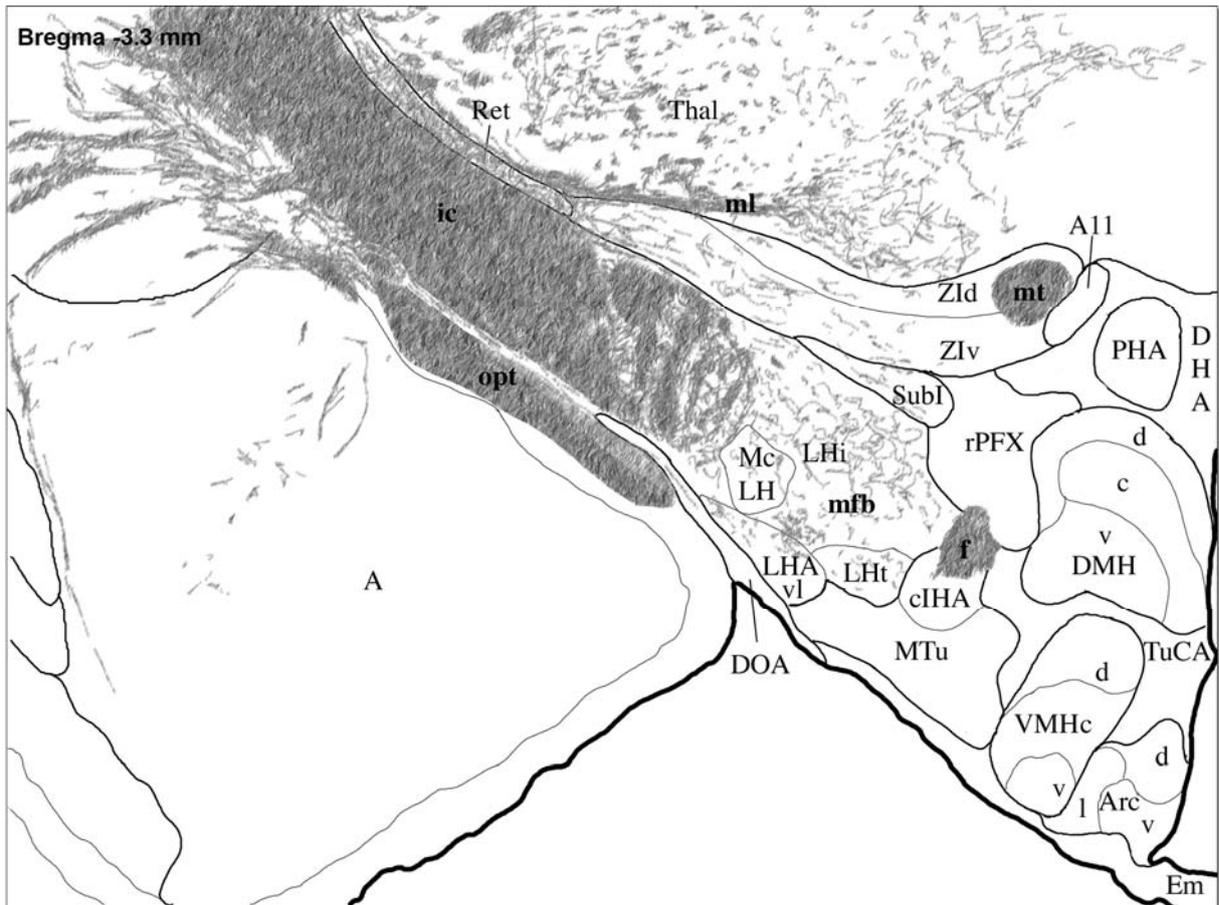


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

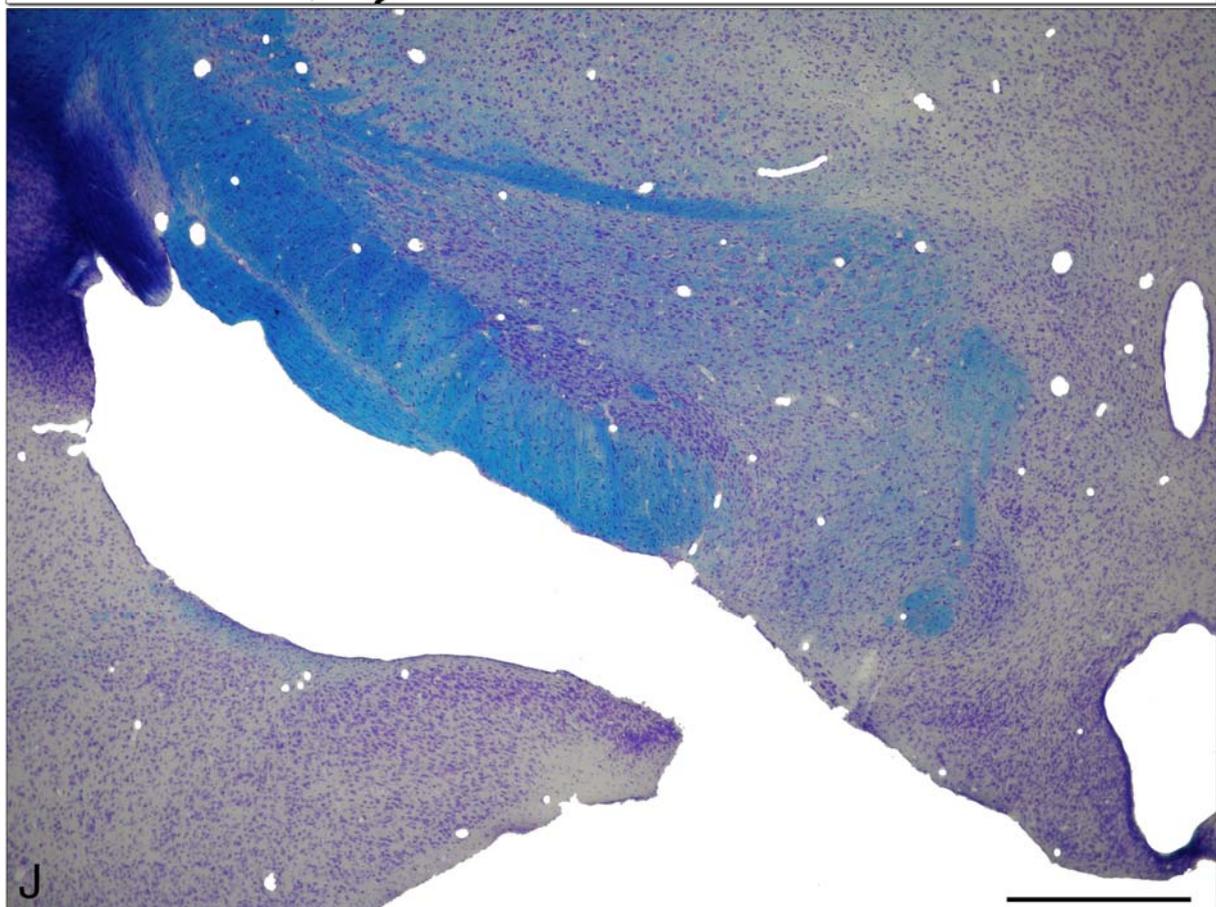
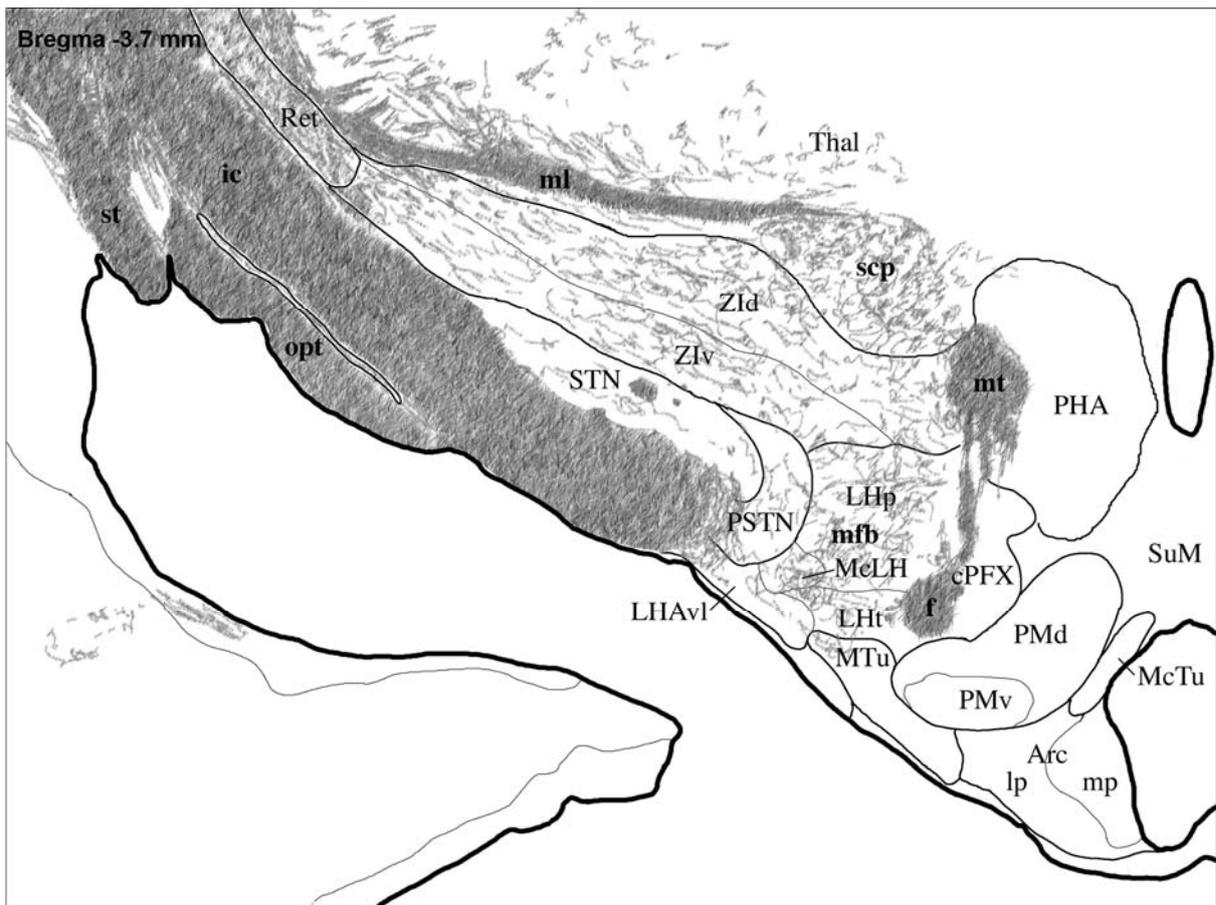


Abbildung 3.1: Fortsetzung nächste Seite.

Abbildung 3.1: Atlas des ventralen Zwischenhirns, insbesondere der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region (A bis J). Die schematische Darstellung (*obere Abb.*) zeigt jeweils die Lage und Ausdehnung dienzephaler Strukturen, die in Klüver-Barrera gefärbten Frontalschnitten (*untere Abb.*) oder in Nissl gefärbten Material (*ohne Abb.*) identifiziert wurden. Die Skalierstriche in den Abbildungen entsprechen 1000 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

Tabelle 3.1. Übersicht über die Antigene bzw. Enzyme, die als potentielle Marker zur Identifizierung der verschiedenen Zellgruppen in der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region (LPOA/LHA) analysiert wurden.

Substanz	Ergebnis	Abbildung
Acetylcholinesterase	(1)	3.11
Arginin-Vasopressin	(1)	3.7
Calbindin	(1)	3.4
Calretinin	(2)	ohne
Cholin-Azetyl-Transferase	(3)	ohne
GABA-B-Rezeptor	(2)	ohne
Galanin	(1)	3.5
Glutamat-Decarboxylase	(2)	ohne
Kaliumkanal Untereinheit Kir3.2	(2)	ohne
Leu-Enkephalin	(2)	ohne
Met-Enkephalin	(2)	ohne
Neurofilament H	(1)	ohne
Neuropeptid Y	(1)	3.8
Neurotensin	(1)	3.2
Orexin A	(1)	3.10
Orexin B	(1)	3.10
Parvalbumin	(1)	3.6
Substanz P	(2)	ohne
Tyrosin-Hydroxylase	(2)	ohne
Vesikulärer Azetylcholintransporter	(1)	3.3
Vesikulärer Glutamat-Transporter I	(2)	ohne
Vesikulärer Glutamat-Transporter II	(3)	ohne
µ-Opiat Rezeptor	(3)	ohne

Erklärung der Ergebnisse: Die Verteilung einiger potentieller Marker korreliert gut mit den in der LP OA/LHA identifizierten Zellgruppen (1). Andere hingegen lassen sich durchaus nachweisen, ohne dass ihre Verteilung in Zusammenhang zu den Zellgruppen steht (2). Einige der geprüften Substanzen kommen in der LPOA/LHA nicht vor (3).

3.1.1 Die laterale präoptische Region (LPOA) dehnt sich von der vorderen Kommissur bis zum Foramen interventriculare (Monroi) aus

Die LPOA beginnt etwa bei Bregma 0,2 mm im Bereich der vorderen Kommissur (*Abb. 3.1, A*) und erstreckt sich ungefähr 1,9 mm nach kaudal bis zur lateralen hypothalamischen Region (LHA; *Abb. 3.1, F*). Die Abgrenzung der LPOA gegen die mediale präoptische Region (MPOA) ist einfach. Die Zellen der MPOA liegen besonders dicht, während die Neurone in der LPOA locker um die dorsomedialen

Anteile des medialen Vorderhirnbündels (mfb) verstreut sind. Dieses Fasersystem gibt dem Neuropil der LPOA/LHA in der kombinierten Zell- und Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera (KB-Färbung) sein charakteristisches zartblaues Erscheinungsbild (*besonders deutlich in Abb. 3.1, C*).

Weiter kaudal wird die LPOA medial von der Area hypothalamica anterior (AHA) und der medialen Zone der LHA flankiert (*Abb. 3.1, D und E*). Die Bettkerne der Stria terminalis (BST) sind durch einen schmalen zellfreien Streifen von der LPOA getrennt (*Abb. 3.1, B und C*). Die Substantia innominata bildet mit ihren in der KB-Färbung blassen und mittelgroßen Zellen die laterale Grenze der LPOA (*Abb. 3.1, B bis E*). Dagegen gehören die großen, dunklen und eng beieinander liegenden Nervenzellen ventral der LPOA zum Kern des horizontalen Schenkels des Diagonalen Bandes von Broca (*Abb. 3.1, A und B*) und zum magnozellularen präoptischen Kern (*Abb. 3.1, A bis E*).

3.1.1.1 Im rostralen Anteil der lateralen präoptischen Region werden sechs Zellgruppen unterschieden

Die rostralen Zellgruppen der lateralen präoptischen Region (rLPOA), im Einzelnen rLPOAvm (ventromedial), rLPOAv (ventral), rLPOAc (zentral), rLPOAd (dorsal) und rLPOAvl (ventrolateral), sowie der ventrolaterale präoptische Kern (VLPO) liegen in den vorderen zwei Dritteln der LPOA.

Die rLPOAvm (Bregma 0,2 bis -1,0 mm) enthält vorwiegend mittelgroße, in der KB-Färbung helle Neurone, die zwischen den Fasern des medialen Vorderhirnbündels angeordnet sind (*Abb. 3.1, A bis C*). Innerhalb der rLPOAvm liegt mit ihren dicht gepackten, kleinen, ovalen und dunklen Zellen von Bregma -0,3 bis -0,6 mm die zentrale Zellgruppe der rLPOA (rLPOAc; *Abb. 3.1, A und B*). Die Lokalisation ist in frontalen Schnittserien anhand zytoarchitektonischer Merkmale nicht einfach. Sie wird jedoch durch die hodologischen Kriterien bestätigt, da sich ihre Neurone vom LHb aus nicht retrograd markieren lassen (*Abb. 3.16, A und B*).

Die ventrale Zellgruppe der rLPOA liegt von Bregma -0,8 bis -1,0 mm im kaudalen Bereich der LPOA und enthält mittelgroße bis kleine Zellen (rLPOAv; *Abb. 3.1, C*). Einige Neurone scheinen Substanz P zu exprimieren (Panula et al., 1984).

Auch die dorsale Zellgruppe der rLPOAd (Bregma 0,1 bis -0,3 mm) besteht aus mittelgroßen und dunklen Zellen (*Abb. 3.1, A*). Weiterhin kann ventrolateral in der rLPOA von Bregma 0,2 bis -0,6 mm eine Gruppe von kleineren, helleren Zellen als rLPOAvl identifiziert werden (*Abb. 3.1, A und B*).

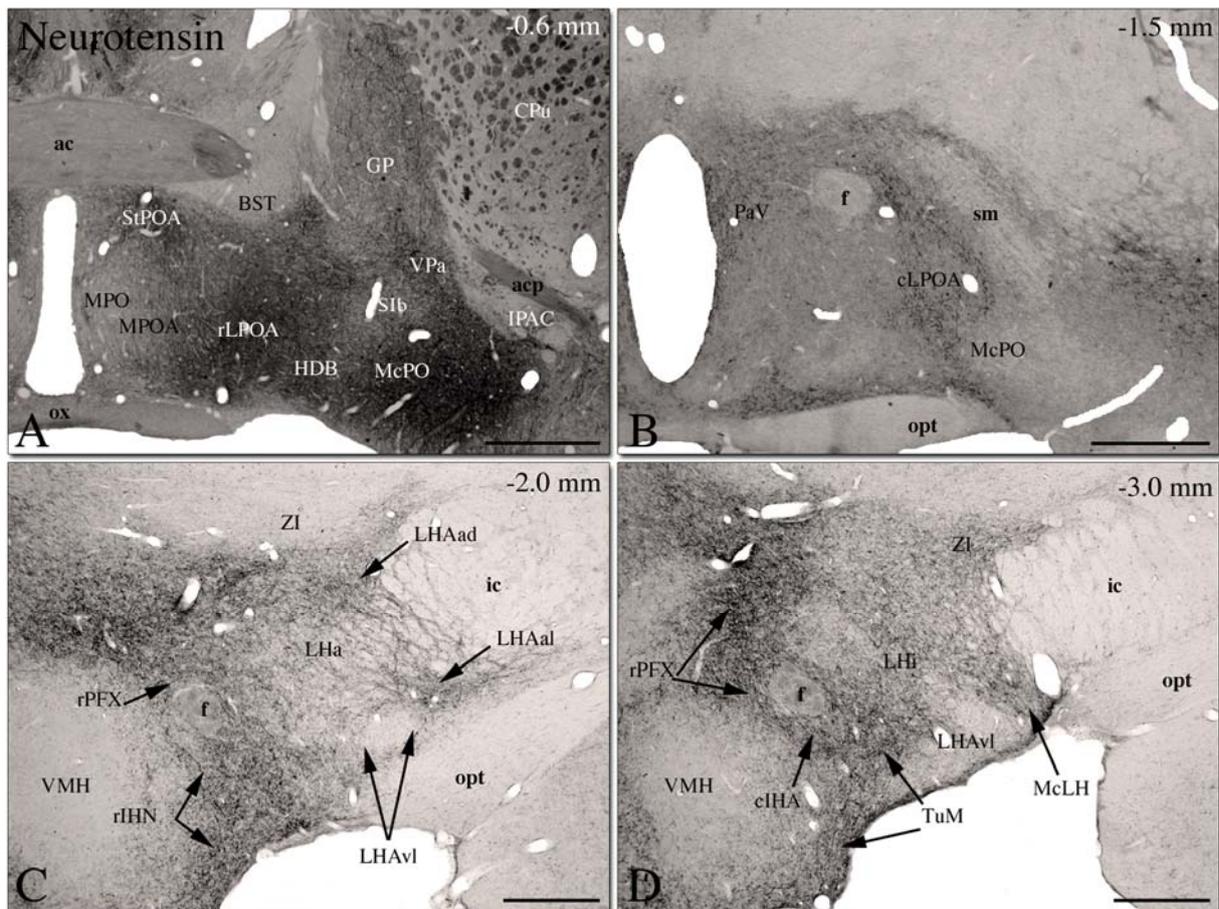


Abbildung 3.2: Die Verteilung neurotensinerner Fasern ist für die Abgrenzung der einzelnen Zellgruppen in der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region (LPOA/LHA) hilfreich. Die rostralen und die kaudale Zellgruppe der LPOA lassen sich gut von den angrenzenden Strukturen differenzieren. Ebenso kann die anterolaterale (LHAal) und anterodorsale (LHAad) Zellgruppe der LHA vom Nucleus hypothalamicus lateralis (LH) und von der ventrolateralen Zellgruppe (LHAvl) unterschieden werden. Auch bei der Identifizierung der Kerne im medialen Anteil der LHA (IHA, PFX) kann Neurotensin hilfreich sein. Die Skalierstriche entsprechen 1000 μm in **A** und **B**, 600 μm in **C** und **D**. Abkürzungen siehe Anhang.

Die rostrale LPOA lässt sich durch die hohe Dichte an neurotensinergen Fasern immunzytochemisch relativ einfach von den umgebenden Strukturen abgrenzen (Abb. 3.2 A). Ob diese Projektionen den rostralen Anteil der präoptischen Region innervieren oder nur durchziehen ist nicht bekannt.

Neben den rostralen Zellgruppen liegt von Bregma -0,2 bis -0,8 mm der Nucleus preopticus ventrolateralis in der LPOA (VLPO; Abb. 3.1, A und B). Seine kleinen, triangulären Zellen zeichnen sich durch die Expression von Galanin aus (Melander et al., 1986).

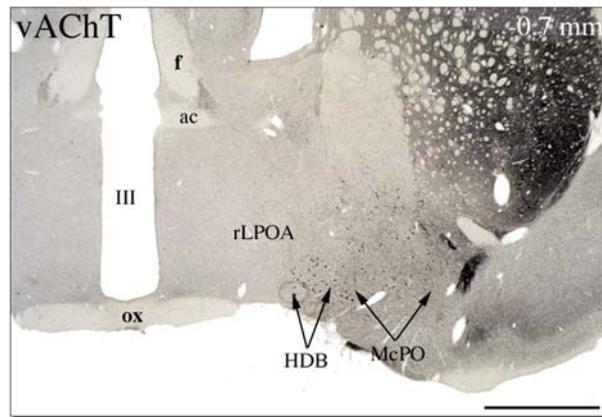


Abbildung 3.3: Nervenzellen in der lateralen präoptischen Region exprimieren nicht den vesikulären Azetylcholintransporter (vAChT). Hingegen wird eine hohe Dichte des vAChT im „Kern des horizontalen Schenkels des Diagonalen Bandes von Broca“ (HDB) und im magnozellulareren Kern der präoptischen Region (McPO) gefunden. Der Skalierstrich entspricht 1000 μ m. Abkürzungen siehe Anhang.

Der magnozellularere präoptische Kern (McPO; *Abb. 3.1, A bis E*) wird nicht der lateralen präoptischen Region zugeordnet. Er lässt sich mit seinen großen, dunklen Neuronen leicht von den anderen Zellgruppen der LPOA unterscheiden. Auch der McPO ist inhomogen und besteht aus mindestens drei unterschiedlichen Subarealen, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird. Vergleichbar große und dunkle, aber eher runde Nervenzellen charakterisieren den „Kern des horizontalen Schenkels des Diagonalen Bandes von Broca“ (HDB; *Abb. 3.1, A und B*). Der HDB enthält viele, hingegen der McPO nur einige cholinerge Neurone. Beide können daher gut mit Antikörpern gegen den vesikulären Azetylcholintransporter von der LPOA unterschieden werden (*Abb. 3.3*).

3.1.1.2 Die kaudale LPOA besteht aus einer Zellgruppe

Die kaudale Zellgruppe der LPOA (cLPOA) beginnt bei Bregma -1,0 mm und grenzt nach etwa 600 μ m an die anteriore Zone der lateralen hypothalamischen Region (*Abb. 3.1, D und E*). Innerhalb der cLPOA gibt es schlanke, vorwiegend fusiforme Zellen, die sich dunkel anfärben lassen. Vereinzelt finden sich auch mittelgroße Neurone. Die cLPOA wird lateral von der Stria medullaris flankiert (*Abb. 3.1, D*). Die Zellen innerhalb dieses Fasertrakts gehören ebenfalls zur cLPOA. Immunzytochemisch lässt sie sich mit Antikörpern gegen Neurotensin als fasereiches Areal von der Umgebung abgrenzen (*Abb. 3.2 B*). Auch die Verteilung von Calbindin ist hilfreich, da dieses Kalzium-bindende Protein in der cLPOA nicht vorkommt (*Abb. 3.4, A*).

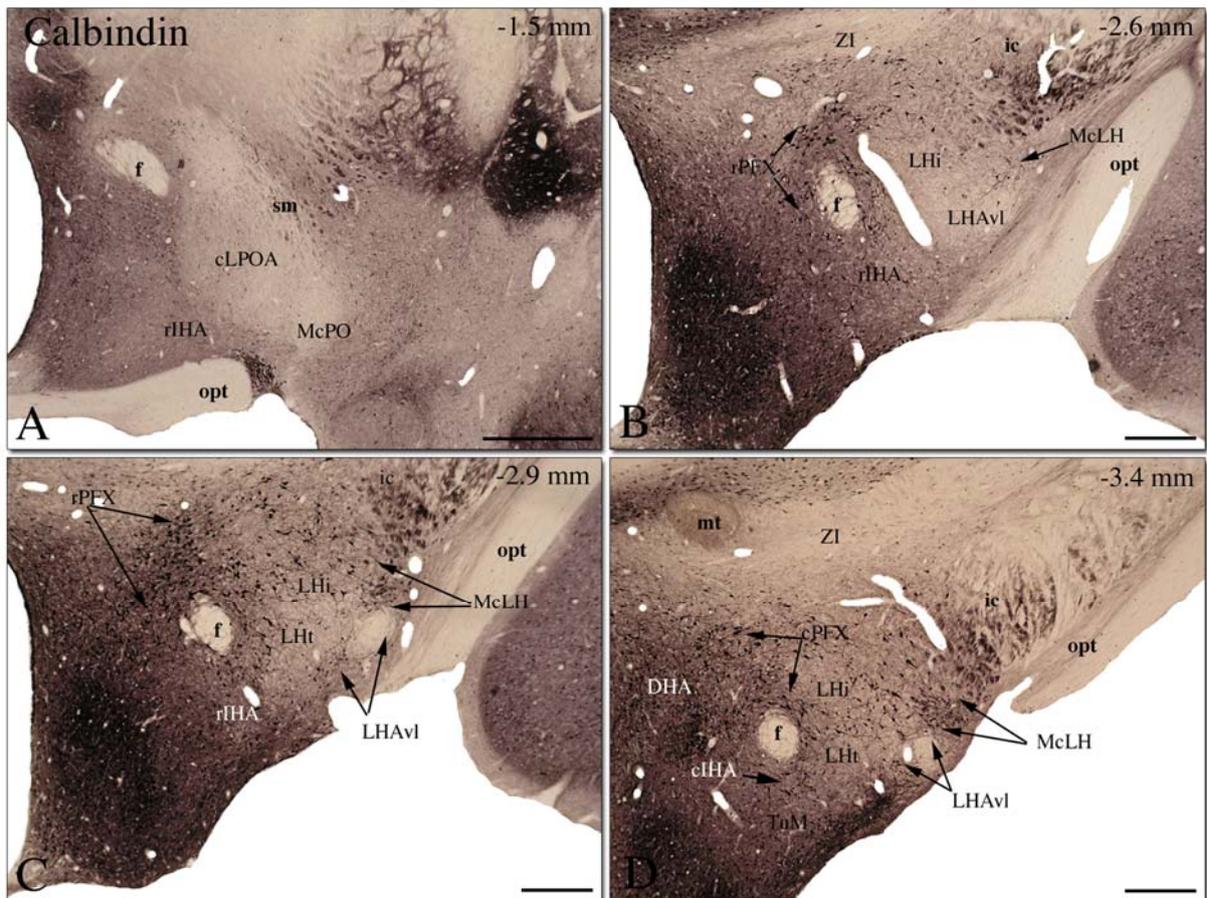


Abbildung 3.4: Das Kalzium-bindende Protein Calbindin wird in der lateralen hypothalamischen Region vorwiegend von Neuronen im Nucleus perifornicalis (PFX) gebildet. Aber auch im magnozellularären Kern (McLH) und in der Area hypothalamica intermedialis (IHA) liegen zahlreiche Calbindin-positive Zellen. Die kaudale Zellgruppe der LPOA (cLPOA) und die ventrolaterale Zellgruppe der LHA (LHAvl) enthalten kein Calbindin, sodass die Abgrenzung zur Umgebung einfach ist. Die Skalierstriche entsprechen 1000 μm in **A**, 600 μm in **B** bis **D**. Abkürzungen siehe Anhang.

3.1.2 Die laterale hypothalamische Region (LHA) erstreckt sich von der LPOA bis zum Mittelhirn

Die LHA grenzt bei Bregma -1,7 mm direkt an die kaudale Zellgruppe der LPOA. In der LHA wird eine mediale (LHA-M) von einer lateralen (LHA-L) Zone unterschieden, die sich beide etwa 2,9 mm bis zur Area tegmentalis ventralis (VTA) ausdehnen.

Die LHA liegt zwischen der Capsula interna und den Kerngebieten des medialen Hypothalamus. Die dorsale Grenze bildet die Zona incerta, die den Thalamus von der LHA trennt. Die laterale Zone der LHA enthält vier unterschiedliche Teilgebiete, die ventrolaterale (LHAvl), die anterolaterale (LHAal) und die anterodorsale (LHAad)

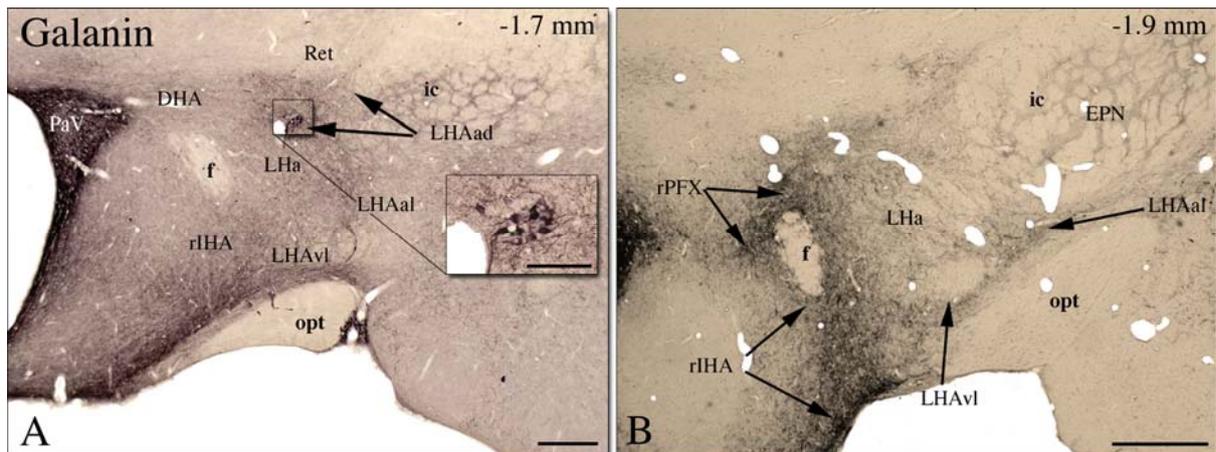


Abbildung 3.5: Das Neuropeptid Galanin wird von Neuronen in der anterodorsalen Zellgruppe der lateralen hypothalamischen Region gebildet (LHAad; **A**, Inset). Diese morphologisch leicht zu identifizierenden Zellansammlung (siehe *Abb. 3.9*) enthält auch Neuropeptid Y (siehe *Abb. 3.8*) und Arginin-Vasopressin (siehe *Abb. 3.7*). Galanin-haltige Fasern passieren vor allem den Nucleus perifornikalis (PFX) und die Area hypothalamica intermedialis (IHA). Die Skalierstriche entsprechen 600 μ m in **A** und **B**, im Inset 45 μ m. Abkürzungen siehe Anhang.

Zellgruppe sowie den Nucleus hypothalamicus lateralis (LH). In der medialen Zone werden die Area hypothalamica intermedialis (IHA), der Nucleus perifornikalis (PFX), der Nucleus tuberalis medialis (MTu) und der Nucleus geminus posterior unterschieden. Der Nucleus supramammillaris lateralis, der Nucleus submammillothalamicus, der Nucleus presubthalamicus und der Nucleus retrosubthalamicus können nicht sicher in das Konzept der LHA integriert werden, sie zählen zu den LHA-assoziierten Strukturen. Da diese Kerne nicht zur Habenula projizieren (Herkenham und Nauta, 1977), wird in der vorliegenden Arbeit auf sie nicht detaillierter eingegangen.

Zusätzlich zu der mediolateralen Gliederung wird die LHA auch entlang ihrer rostrokaudalen Ausdehnung in drei Zonen unterteilt (Saper et al., 1979; Swanson und Cowan, 1979). Die anteriore Zone bildet den rostralen, die posteriore den kaudalen Anteil der lateralen hypothalamischen Region, die tuberale Zone liegt dazwischen.

3.1.2.1 In der lateralen Zone der LHA sind insgesamt neun verschiedene Subareale differenzierbar

Die ventrolaterale Zellgruppe der LHA liegt direkt dorsal des Tractus opticus und erstreckt sich von Bregma -1,7 mm zirka zwei Millimeter nach kaudal (LHAvl; *Abb. 3.1, F bis J*). Sie lässt sich durch die dicht gepackten und dick myelinisierten Fasern im ventrolateralen Faserkontingent des medialen Vorderhirnbündels von den benachbarten Strukturen leicht unterscheiden. Innerhalb der zellarmen LHAvl, mit ihren

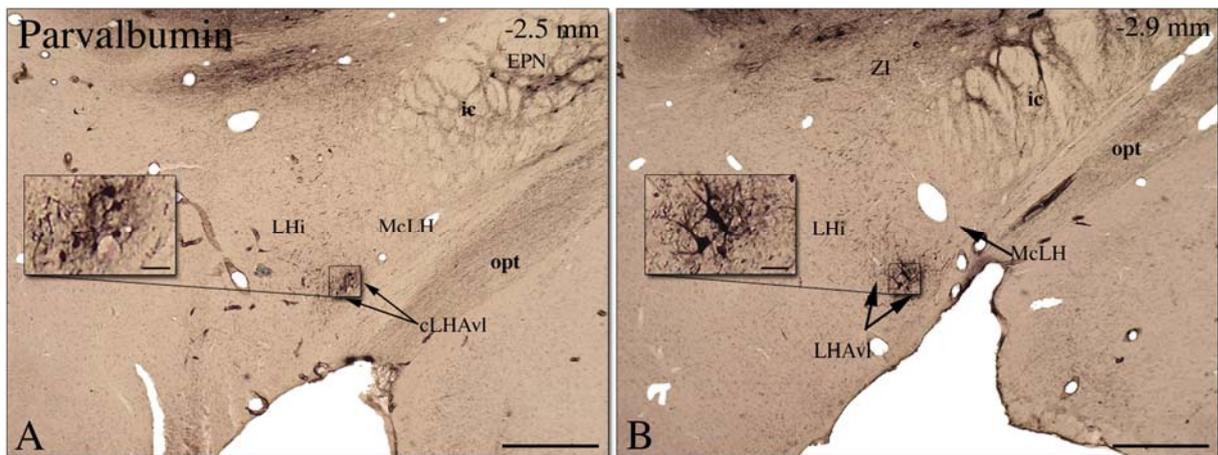


Abbildung 3.6: Das Kalzium-bindende Protein Parvalbumin kommt in der lateralen hypothalamischen Region ausschließlich in der ventrolateralen Zellgruppe vor. Die Skalierstriche entsprechen 600 µm in den Insets 40 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

kleinen, locker gepackten, wenig gefärbten Nervenzellen findet sich die zell dichtere cLHAvl (Abb. 3.1, H). Beide Regionen enthalten aber auch mittelgroße bis große, multipolare Neurone.

Die LHAvl enthält weder Fasern noch Zellen mit Immunreaktivität gegen Neurotensin, Calbindin oder Galanin und grenzt sich so deutlich gegen ihre Umgebung ab (Abb. 3.2, C und D; 3.4, A und 3.5, A und B). Im kaudalen Anteil der LHAvl findet sich eine kleine Gruppe mit Parvalbumin-positiven Neuronen (Abb. 3.6).

Die anterolaterale Zellgruppe der LHA (LHAal) liegt dorsal der LHAvl (Abb. 3.1, F und G). Sie kann ab Bregma -1,7 mm identifiziert werden und grenzt nach etwa 800 µm an den magnozellulareren Kern der LHA. Die mediolateral orientierten mittelgroßen bis großen, ovalen Zellen der LHAal färben sich in der Regel hell an. Dazwischen liegen immer wieder größere, dunkle Neurone. Im rostralen Anteil der LHAal werden einige vasopressinerge und Neuropeptid Y-enthaltende Zellen gefunden (Abb. 3.7, A und 3.8, B).

Anterodorsal in der lateralen hypothalamischen Region, medial der Capsula interna liegen die kleinen, hellen Nervenzellen der LHAad (Abb. 3.1, F und G). Diese Zellgruppe beginnt ebenso bei Bregma -1,7 mm und ist etwa 800 µm lang. Rostral in der LHAad befindet sich eine Ansammlung mit deutlich größeren und dunkleren Zellen (Abb. 3.9). Sie sind auch mit Antikörpern gegen Galanin, Arginin-Vasopressin (AVP) oder Neuropeptid Y darstellbar (Abb. 3.5, A; 3.7, A und B sowie 3.8, A und B).

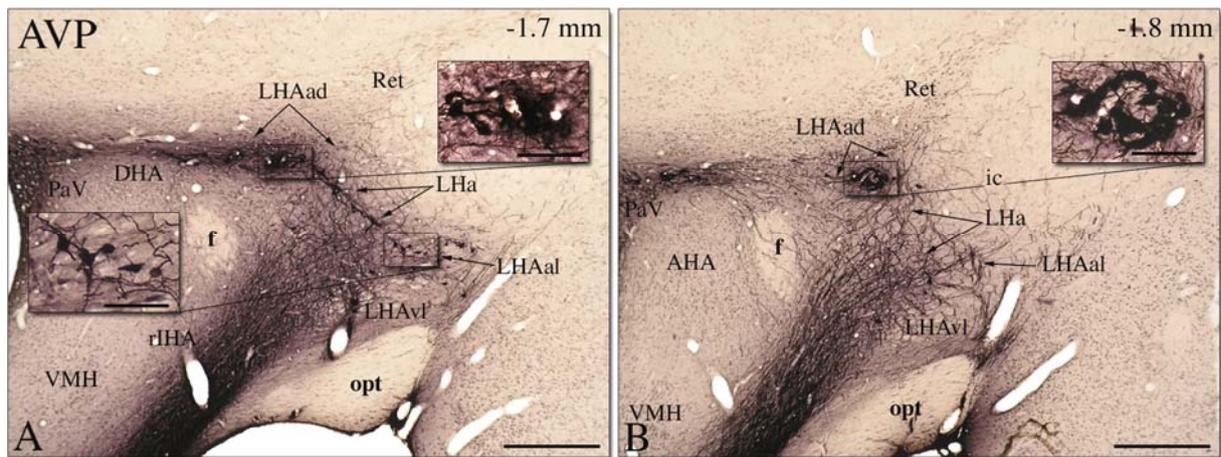


Abbildung 3.7: Arginin-Vasopressin (AVP) wird im Hypothalamus vorwiegend im paraventriculären und supraoptischen Kern gebildet. Jedoch konnte auch innerhalb der anterodorsalen Zellgruppe der LHA (LHAad) eine Ansammlung AVP-exprimierender Neurone identifiziert werden (**A** und **B**). Diese Neurone sind auch morphologisch leicht erkennbar (*siehe Abb. 3.9*). Außerdem produzieren sie NPY (*siehe Abb. 3.8*) und Galanin (*siehe Abb. 3.5*). Andere AVP-Zellen liegen im anterioren Teil des Nucleus hypothalamicus lateralis (LHa), sowie in der anterolateralen Zellgruppe der LHA (LHAal). Die Skalierstriche entsprechen 600 µm, in den Insets 40 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

Die vasopressinergen und galaninergen Neurone liegen im LHAad an identischer Position. Da im extrahypothalamischen vasopressinergen System AVP immer mit Galanin kolokalisiert ist (Landry et al., 1991; Miller et al., 1993; Planas et al., 1995), könnte es sich auch hier um eine Koexpression handeln. Für die ebenso an dieser Stelle liegenden Neuropeptid Y-exprimierenden Zellen ist eine Koexpression mit AVP nicht beschrieben.

Der LHAal schließt sich kaudal der magnozellular Kern der LHA (McLH) an, der sich 1,4 mm bis zum Nucleus retrosubthalamicus erstreckt (*Abb. 3.1, H bis J*). Die dicht gedrängten, dunklen Zellen sind im vorderen Anteil mittelgroß bis groß, während sie nach kaudal etwas kleiner werden. Der McLH enthält einige Calbindin-positive Nervenzellen (*Abb. 3.4, C und D*). Dabei handelt es sich vorwiegend um mittelgroße, eher runde Zellen. Die ventrolaterale Zellgruppe der LHA hingegen ist Calbindin-negativ, während die Calbindin-Neurone im Nucleus hypothalamicus lateralis deutlich größer sind und weiter auseinander liegen (*Abb. 3.4, B bis D*). Durch seine Chemoarchitektur grenzt sich der McLH so deutlich von seiner Umgebung ab. Zusätzlich sind seine Neurone immunohistochemisch mit Antikörpern gegen Melanozyten-stimmulierendes Hormon (alpha-MCH) visualisierbar, sie projizieren zum Kortex, Hippocampus und Hirnstamm (Cechetto und Saper, 1988).

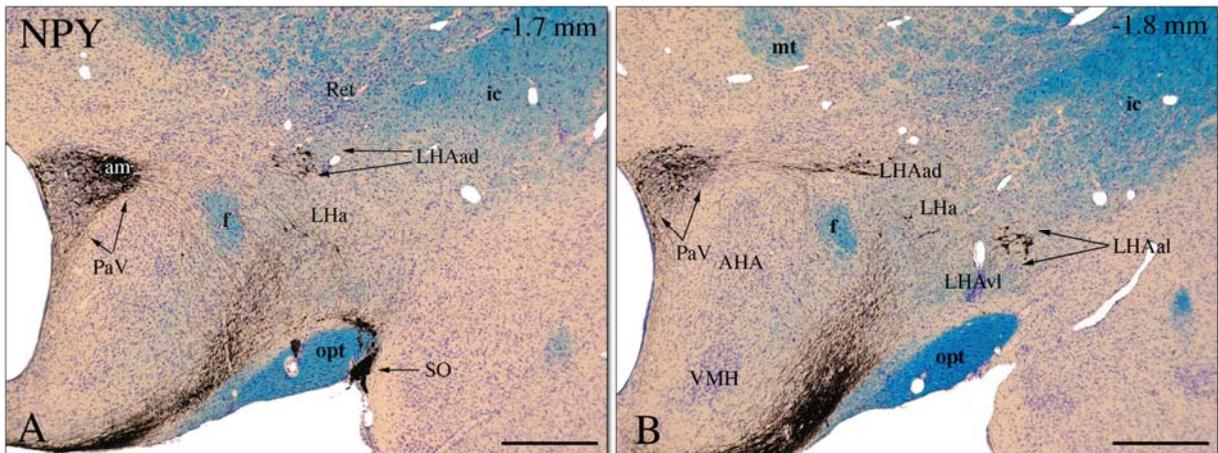


Abbildung 3.8: In der lateralen hypothalamischen Region wird das Neuropeptid Y (NPY) vorwiegend von Nervenzellen im Nucleus paraventricularis und im Nucleus supraopticus gebildet. Einige NPY-positive Neurone liegen auch in der ventrolateralen (LHAvl) und anterolateralen (LHAad) Zellgruppe der LHA (**A** und **B**). Die clusterförmige Ansammlung von NPY-positiven Neuronen in der LHAad lässt sich auch morphologisch identifizieren (siehe auch *Abb. 3.9*). Von diesen Zellen wird auch Galanin (*Abb. 3.5*) und Arginin-Vasopressin (*Abb. 3.7*) gebildet. Im anterioren Anteil des Nucleus hypothalamicus lateralis (LHa) sind nur vereinzelt NPY-Neurone zu finden. Die Skalierstriche entsprechen 600 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

Innerhalb des Nucleus hypothalamicus lateralis (LH) werden vier Anteile unterschieden. Der anteriore Abschnitt (LHa) ist ein eher zellarmes Areal im rostralen Pol (Bregma -1,7 bis -2,5 mm) der LHA (*Abb. 3.1, F und G*). Er enthält mittelgroße bis große, intensiv gefärbte Zellen. Die größeren Neurone im LHa tendieren dazu, kleinere Cluster zu bilden. Dazwischen werden immer wieder kleinere Zellen angetroffen. Immunzytochemisch lassen sich einige vasopressinerge Neurone nachweisen (*Abb. 3.7, A und B*).

Der intermediäre Bereich (LHi) liegt in der LHA von Bregma -2.6 bis -3.6 mm zwischen dem anterioren und posterioren Anteil des LH (*Abb. 3.1, H und I*). Er ist durch mittelgroße bis große Zellen charakterisiert, die bogenförmig angeordnet sind und deren Zelldichte zum Zentrum hin abnimmt (*Abb. 3.1, H*). Die Neurone im LHi exprimieren eine Vielzahl neuroaktiver Substanzen. So liegt hier etwa ein Viertel aller Orexin- (*Abb. 3.10, A bis D*) sowie eine beträchtliche Anzahl Acetylcholinesterase-positiver Zellen (*Abb. 3.11, A und B*).

Der zellärmere posteriore Bereich des LH (LHp) schließt sich dem LHi an und dehnt sich ungefähr 400 µm nach kaudal aus (*Abb. 3.1, J*). Mit eher kleinen Neuronen kann der LHp relativ einfach von der zell dichteren Umgebung differenziert werden. Ventral von LHi und LHp, in der tuberalen Zone der LHA liegen von Bregma -2,6 bis -4,6 mm

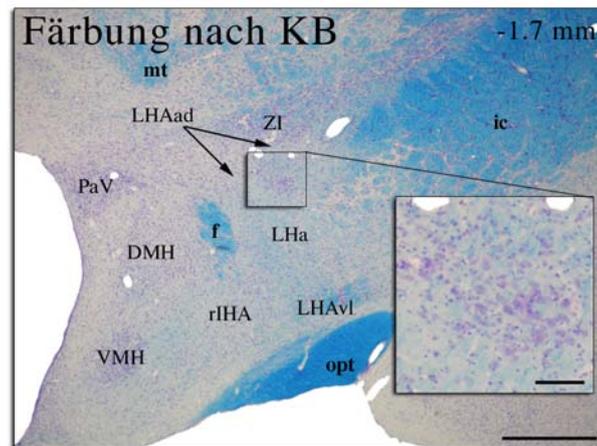


Abbildung 3.9: In nach Klüver-Barrera gefärbten Schnitten ist in der anterodorsalen Zellgruppe (LHAad) der lateralen hypothalamischen Region ein Zellformation besonders auffällig. Die Neurone sind dort meist mittelgroß und oval. Außerdem enthalten sie Galanin (Abb. 3.5), Arginin-Vasopressin (Abb. 3.6) und Neuropeptid Y (Abb. 3.8) n. Skalierstrich entspricht 600 µm, im Inset 45 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

die dicht gepackten, kleinen und mittelgroßen Zellen des tuberalen Subareals des LH (LHt; Abb. 3.1, H bis J).

3.1.2.2 In der medialen Zone der LHA werden sechs Zellgruppen unterschieden

In der Area hypothalamica intermedialis, ventral des Fornix, wird eine rostrale (rHA) von einer kaudalen (cHA) Zellpopulation unterschieden. Die rHA liegt in der präoptische Region bei Bregma -0,8 mm direkt dorsal des Tractus opticus. Sie erstreckt sich von dort ungefähr 2,0 mm nach kaudal und grenzt an den Nucleus tuberalis medialis (Abb.3.1, C bis H). Die rHA erscheint als ein heterogenes Gebiet mit einer Vielzahl locker arrangierter, verschieden großer und unterschiedlich geformter Zellen, die sich in der KB-Färbung vorwiegend dunkel darstellen. In ihr können zwei Zellansammlungen identifiziert werden. Eine kleinere Gruppe schlanker, spindelförmiger Zellen liegt direkt ventral des Fornix, während das Zentrum der rHA eher irregulär verteilte, trianguläre Zellen enthält.

Innerhalb der rHA befindet sich der Nucleus hypothalamicus intermedialis anterolateralis (IHal). Hier liegen bei Bregma -1,3 mm mittelgroße, dicht gepackte, kräftig gefärbte Zellen (Abb. 3.1, D). Das gleiche Areal wird durch Prepro-Enkephalin-positive Neurone charakterisiert (Harlan et al., 1987).

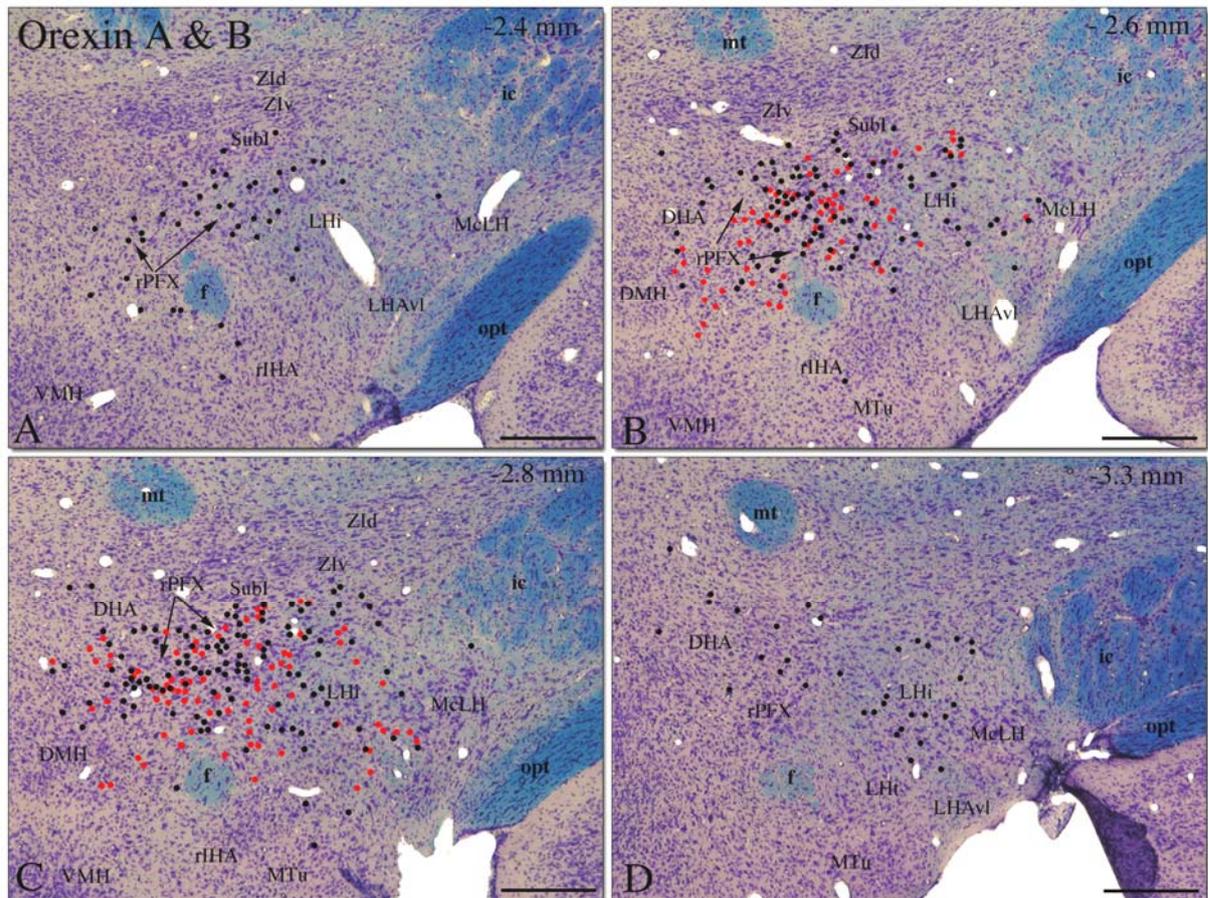


Abbildung 3.10: Die laterale hypothalamische Region enthält viele Orexin-positive Neurone. Nervenzellen, die Orexin A enthalten, sind mit einem schwarzen, die mit Orexin B durch einen roten Punkt markiert. Die Skalierstriche entsprechen 600 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

Die wesentlich kleinere aber zell dichtere clHA beginnt bei Bregma -2,9 mm und dehnt sich etwa 400 µm nach kaudal aus (Abb. 3.1, I). Hier werden vorwiegend kleine spindelförmige sowie eingestreute größere, trianguläre Zellen angetroffen. Die Unterscheidung zwischen rHA und clHA anhand morphologischer Kriterien ist in koronaren Schnittserien nicht unproblematisch. Durch ihre Neurotensin- und Galanin-Immunoreaktivität lässt sich die IHA zumindest teilweise von ihrer Umgebung abgrenzen (Abb. 3.2, C und D; 3.5, B). Zusätzlich werden auch Calbindin-haltige Zellen gefunden (Abb. 3.4, B bis D).

Der rHA schließen sich medioventral etwa ab Bregma -2,4 mm die Zellen des Nucleus tuberalis medialis (MTu) an (Abb. 3.1, H bis J). Der MTu dehnt sich nach kaudal weiter in Richtung innere Kapsel und Fornix aus, sodass er den hinteren Anteil der rHA umschließt. Mit Beginn der präammillären Region endet der MTu ungefähr bei Bregma -4,6 mm. Der mediale tuberale Kern besteht aus einer eher homogenen Population kleiner bis mittelgroßer Zellen, die kaudalwärts dunkler werden.

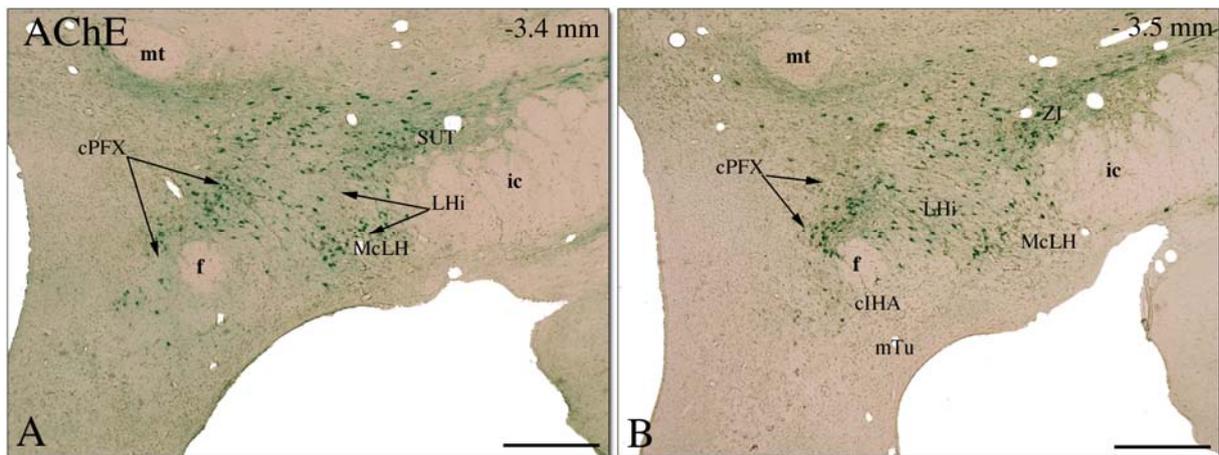


Abbildung 3.11: In der lateralen hypothalamischen Region gibt es Nervenzellen, die Enzymaktivität für Acetylcholinesterase (AChE) enthalten. Im Nucleus perifornicalis sind AChE-positive Neurone auf den kaudalen Anteil beschränkt (cPFX, **A** und **B**). Auch die Zellen im intermediären Anteil des Nucleus hypothalamicus lateralis und in der Zona incerta zeigen AChE-Aktivität (**A** und **B**). Die Skalierstriche entsprechen 600 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

Dorsal und medial des Fornix liegen die Zellen des perifornikalen Kerns (PFX), der in einen rostralen (rPFX) und kaudalen (cPFX) Anteil gegliedert wird. Der rPFX, mit einer Ausdehnung von Bregma -1,8 bis -3,2 mm, enthält vorwiegend mittelgroße bis große, spindelförmige Neurone. Sie sind unterschiedlich dicht angeordnet und lassen sich in der KB-Färbung deutlich darstellen (*Abb. 3.1, F bis I*). Einige Zellen finden sich auch innerhalb des Fornix.

Der cPFX beginnt ungefähr bei Bregma -3,3 mm und erstreckt sich 900 µm nach kaudal (*Abb. 3.1, J*). Zwischen mehreren dichten Ansammlungen von kleinen bis mittelgroßen, schwach gefärbten Zellen liegen vereinzelt größere, dunklere Neurone. Beide perifornikalen Gruppen enthalten Neurotensin- und Calbindin-positive Nervenzellen (*Abb. 3.2, C und D; 3.4, B bis D*). Im rPFX verlaufen auch einige galaninerge Fasern (*Abb. 3.5, B*). Unterscheiden lassen sich beide Zellgruppen durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), das ausschließlich im kaudalen Anteil des PFX vorkommt (*Abb. 3.11, A und B*). Dagegen werden die Peptide Orexin A und B nur im rostralen Anteil des Nucleus perifornicalis exprimiert (*Abb. 3.10, A bis D*). Der rPFX enthält ungefähr die Hälfte der orexinergen Neurone des Diencephalons.

Der Nucleus subincertus (SubI) liegt von Bregma -2,3 bis -3,5 mm zwischen der LHA und der Zona incerta (*Abb. 3.1, H und I*). Dieses Areal wird klassischerweise zum ventralen Thalamus gezählt. Aufgrund neuerer hodologischer und ontologischer Daten und der engen Lagebeziehung zur LHA findet der SubI hier kurz Erwähnung.

Charakteristisch sind in diesem Kern mittelgroße, dunkle Neurone, von denen eine beträchtliche Anzahl das Enzym AChE exprimiert (Abb. 3.11, A und B).

3.2 Die Tracing-Experimente wurden unter optimierten Bedingungen durchgeführt

Tracing-Untersuchungen in einem so heterogenen Gebiet wie der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region erfordern zunächst große Injektionsstellen mit retrograden Tracer-Substanzen in das zu untersuchende Projektionsareal. So kann geklärt werden, von welchen Subarealen in der LPOA/LHA eine Verbindung zum lateralen Habenularkomplex besteht. Anschließend sind kleine bis sehr kleine Injektionen mit einem anterograden Tracer notwendig, die möglichst innerhalb einer Zellgruppe der LPOA/LHA liegen sollten.

3.2.1 Mit Variation von Spitzendurchmesser und Applikationsdauer lassen sich unterschiedlich große Injektionsstellen erzielen

Prinzipiell lässt sich die Größe der Injektionsstelle durch die Veränderung von vier verschiedenen Parametern (Stromstärke, Konzentration der Tracer-Substanz, Spitzendurchmesser und Applikationsdauer) kontrollieren. Vorversuche ergaben jedoch, dass Veränderungen von Tracer-Konzentration oder Stromstärke wenig geeignet sind. Die Reduktion beider Parameter unterhalb eines von der Tracer-Substanz abhängigen Wertes verhindert entweder das Austreten des Tracers aus der Glaskapillare oder führt dazu, dass zu wenig Tracer für den neuronalen Transport zur Verfügung steht. Die Steigerung der Stromstärke ergibt kaum größere Injektionsstellen, sondern führt zu vermehrten Nekrosen im Applikationsgebiet. Mit der Erhöhung der Tracer-Konzentration konnten ebenfalls nicht die gewünschten Änderungen erzielt werden. Zudem ist es unpraktikabel, größere Mengen unterschiedlich konzentrierter Tracer-Lösungen bevorraten zu müssen. Daher wurden zunächst die beiden Parameter Stromstärke und Konzentration für die jeweilige Tracer-Substanz optimiert und anschließend konstant gehalten.

Änderungen von Spitzendurchmesser (10 bis 25 μm) und Applikationsdauer (10 bis 20 Minuten) sind hingegen einfach und führen zu den gewünschten Effekten (siehe Tab. 2.2). Bei allen vier verwendeten Tracern ist eine Verkürzung der Applikationsdauer auf fünf Minuten möglich. Zusammenfassend führt die Kombination aus geringem Spitzendurchmesser und kurzer Applikationszeit zu kleinen Injektionsstellen und vice

versa. Auch mit der Wahl des Tracers lässt sich die Größe der Injektionsstelle teilweise beeinflussen.

Tetramethylrhodamin-gekoppeltes Dextranamin (TMR-DA) und Fluorogold (FG) ergeben bei vergleichbaren Bedingungen, auf Grund einer vermehrten Diffusion in das umgebene Neuropil, wesentlich größere Injektionsstellen als die Tracer Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (PhaL) oder die Beta-Untereinheit des Cholera-toxins (CtB).

3.2.2 Die Tracing-Versuche wurden in Bezug auf das Phänomen des „*Fibers of Passage*“ methodentechnisch evaluiert

Im Bereich der Injektionsstelle besteht prinzipiell die Gefahr, dass durchziehende Nervenfasern während der Applikation geschädigt werden. Die Tracer können von diesen verletzten Axonen aufgenommen und transportiert werden. Das führt zu einer unbeabsichtigten Markierung von Nervenzellen oder Terminalen. Die Axonschädigung im Bereich der Injektionsstelle tritt besonders bei Tracer-Applikation über Druckvorrichtungen oder iontophoretisch, bei hohen Stromstärken und bei Glaskapillaren mit irregulär geformten Spitzen auf.

Dieses als „*Fibers of Passage*“ bezeichnete Phänomen wird besonders bei Dextrankonjugaten beobachtet (Vercelli et al., 2000). Bei der Verwendung von Lektinen soll es keine besondere Rolle spielen (Gerfen und Sawchenko, 1984). Um die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten, konnte bei Doppelinjektionen jedoch auf die Verwendung von TMR-DA nicht verzichtet werden. Alle Tracer wurden daher mit einer iontophoretischen Vorrichtung bei niedrigen Stromstärken appliziert. Außerdem wurde der Stromfluss während der Applikation gepulst, um thermische Nekrosen im Bereich der Injektionsstelle zu vermeiden. Zusätzlich kamen nur Glaskapillaren zum Einsatz, deren Spitzen unter mikroskopischer Kontrolle einen konisch zulaufenden, glatt begrenzten Rand aufwiesen.

Trotz optimierter Bedingungen kann das Auftreten des „*Fibers of Passage*“-Phänomens und die daraus resultierende Gefahr von Fehlinterpretationen bei der Analyse der Afferenzen zum LHb rein theoretisch nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden die hier durchgeführten Experimente daraufhin überprüft. Das Experiment 10/04 kann hierfür als repräsentativ angesehen werden. Die Tracer PhaL und TMR-DA wurden an annähernd gleicher Position appliziert. Beide Injektionsstellen haben etwa die gleiche Größe, wobei die PhaL-Injektionsstelle aufgrund der Tracerdiffusion größer erscheint (*Abb. 3.12, A und B*). Nach immunzytochemischer Visualisierung der beiden Tracer-Substanzen zeigt sich sowohl im lateralen Habenularkomplex (*Abb. 3.12, C*) wie

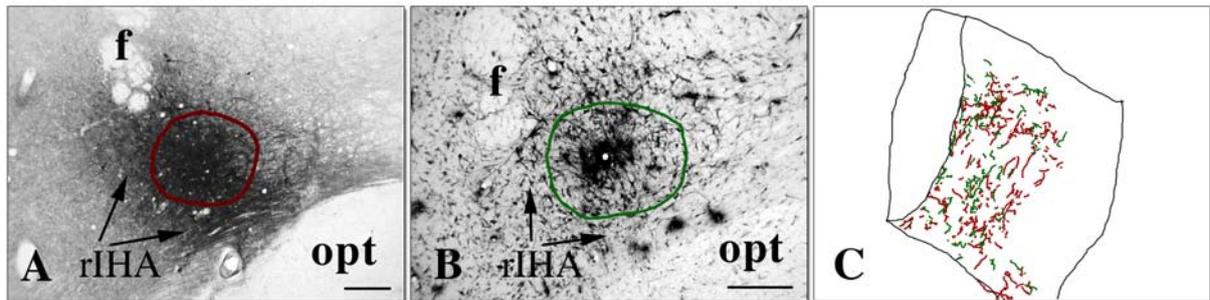


Abbildung 3.12: Die beiden Injektionsstellen PhaL (A, rot) und TMR-DA (B, grün) liegen fast deckungsgleich im rostralen Nucleus hypothalamicus intermedialis (rIHA). Die anterograd markierten Axonterminalen zeigen im medialen Anteil des lateralen Habenularkomplex eine annähernd gleiche Verteilung (C). Die Skalierstriche entsprechen 400 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

auch in anderen Gehirnarealen ein beinahe identisches Muster von Axonen und deren Terminalen.

Auch den beiden als retrograde Tracer verwendeten Substanzen CtB (Chen und Aston-Jones, 1995) und FG (Dado et al., 1990) werden Aufnahme und Transport durch verletzte Axone zugeschrieben. Es ist daher denkbar, dass einige Nervenzellen auch retrograd über „Fiber of Passage“-Tracing markiert wurden. Allerdings waren im Bereich der Injektionsstellen keine Nekrosen sichtbar. Die Anzahl der verletzten Axone, die möglicherweise Tracer aufgenommen haben, muss daher gering sein.

Insgesamt ergaben sich keinerlei Anhaltspunkte für durch das „Fibers of Passage“-Phänomen verursachte falsch positive Tracing-Resultate.

3.3 Die afferenten Verbindungen zum lateralen Habenularkomplexes sind komplex organisiert

Seit den frühen siebziger Jahren ist bekannt, dass Neurone der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region und des Nucleus entopeduncularis zur Habenula projizieren. Detaillierte Informationen über die genaue Organisation dieser Afferenzen liegen bisher nicht vor. Daher wurden in einer ersten Versuchsreihe zwei retrograde Tracer (FG und CtB) in den lateralen Habenularkomplex appliziert, um die zum lateralen Habenularkomplex projizierenden Zellgruppen genauer zu lokalisieren.

3.3.1 Die zum lateralen Habenularkomplex projizierenden Zellen liegen vorwiegend in der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region und im Nucleus entopeduncularis

Von mehreren großen Injektionen (n=10) in den lateralen Habenularkomplex soll der Versuch 33/03-A (Doppelinjektionsstelle) repräsentativ näher vorgestellt werden (*Abb. 3.13, A und B*). Die Injektionsstelle mit dem retrograden Tracer FG liegt im LHbMC, LHbMPc, LHbMMg, LHbMS, LHbLB und medial im LHbLMc. Im LHbMA, LHbLO, LHbLMg, LHbLPc sowie lateral im LHbLMc ist kaum Tracer vorhanden (*Tab. 3.2*). Insgesamt sind 1182 Neurone entlang der rostro-kaudalen Ausdehnung des ventralen Diencephalons retrograd markiert (*Abb. 3.13*). Jeweils ein knappes Drittel der zum lateralen Habenularkomplex projizierenden Neurone liegt in der LPOA und der LHA. Die restlichen Zellen verteilen sich vorwiegend auf den EPN, BST und McPO (*Tab. 3.2*). Einige Zellgruppen und Kerne der LPOA/LHA scheinen nicht zum LHb zu projizieren (rLPOAc, McLH, LHp, LHt, cPFX und MTu). Die Versuche 34/03-A (Doppelinjektionsstelle) und 37/03 zeigen eine ähnliche Verteilung retrograd markierter Zellen (*Tab. 3.2*). Im Prinzip sind in der LPOA/LHA zwei verschiedene Typen von retrograd markierten Neuronen morphologisch unterscheidbar. In die erste Kategorie fallen größere (Durchmesser etwa 20 µm) trianguläre oder multipolare Neurone. Sie liegen hauptsächlich in der IHA (*Abb. 3.14, A und A2***; *B und B1*), der rLPOAvm (*Abb. 3.14, C und C1*), in der LHAad (*Abb. 3.14, D und D1*) sowie zentral im rEPN (*Abb. 3.14, A und A1*). Der zweite Zelltyp ist etwa 10-15 µm groß, eher spindelförmig und meist bipolar. Er tritt bevorzugt im LHa (*Abb. 3.14, F und F1*), LHi, in der LHAal (*Abb. 3.14, A und A1**), im rPFX (*Abb. 3.14, A und A1*), in der rLPOAd, rLPOAv, rLPOAvl, im VLPO, in der cLPOA (*Abb. 3.14, G und G1*) auf.

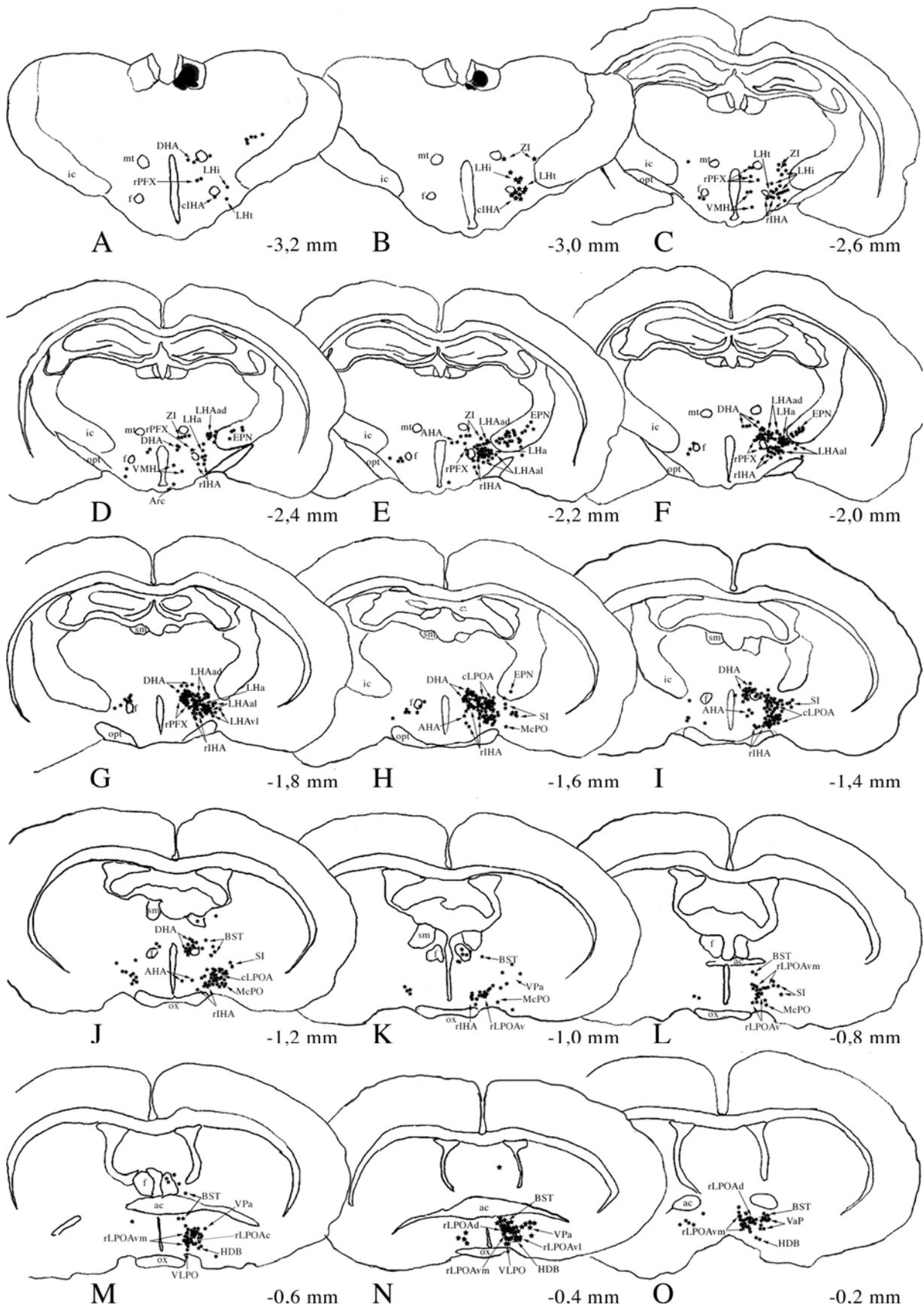
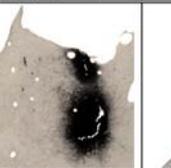
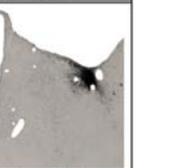


Abbildung 3.13: Beschreibung siehe folgende Seite.

Abbildung 3.13: Kamera-Lucida Zeichnungen einer frontalen Schnittserie (33/03-A) durch das Gehirn einer weiblichen Wistar-Ratte nach Applikation des retrograden Tracers FG in den lateralen Habenularkomplex (**A, B**). Entlang der rostro-kaudalen Achse des ventralen Dienzephalons (Bregma 0,2 bis -2,3 mm) und insbesondere in der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region sind zahlreiche Neurone markiert („□“, **A bis O**). Abkürzungen siehe Anhang.

Genauere Hinweise auf mögliche Unterkern-spezifische Projektionen zum LHb sollten kleinere Injektionsstellen (n=10) liefern. Auch wenn diese immer noch mehrere Unterkerne umfassen, wird jetzt die unterschiedliche Verteilung der retrograd markierten Neurone in Abhängigkeit zur Position der Injektionsstellen im LHb deutlich. Nach Injektionen in den medialen Anteil des LHb überwiegen Zellen in der LHA-M und in der cLPOA, während laterale Injektionen zu Markierungen bevorzugt in der LHA-L, der rLPOA und im EPN führen (*Tab 3.2*). Die CtB-Injektionsstellen (03/03, 33/03-B und 34/03-B) liegen lateral im LHb. Im Fall 33/03-B und 34/03-B (jeweils Doppelinjektionen, Vergleiche 33/03-A und 34/03-A) befindet sich der Tracer vorwiegend im magnozellularären und im ovalen Unterkern des LHbL. Die meisten Neurone sind im EPN und im LH markiert, rostral der Sehnervenkreuzung finden sich kaum Zellen (*Tab. 3.2*). Im Experiment 03/03 wurde nur ein kleiner, Ventrikel-naher Bereich im LHbLMc. Bei diesem Versuch sind im ventralen Zwischenhirn nur wenige Nervenzellen markiert. Sie liegen vorwiegend im LHa, rPFX, in der LHAal, LHAad und in der rLPOAvm. Zusätzlich finden sich mehrere Zellen im dorsalen Hypothalamus (*Tab. 3.2*). Der EPN hingegen enthält keine markierten Zellen, da die Injektionsstelle nicht in dem Bereich des LHb liegt, in dem Afferenzen aus dem EPN enden (*siehe Kap. 3.3.2.4*).

Tabelle 3.2: Die Verteilung der FG- oder CtB-markierten Nervenzellen im ventralen Dienzephalon nach Injektion an verschiedene Positionen im lateralen Habenularkomplex

		33/03-A		34/03-A		37/03		33/03-B		34/03-B		03/03		
Injektionsstellen														
		LHb		LHb		LHb, medial		LHb, lateral		LHb, lateral		LHb, dorsolateral		
		FG ^a	% ^b	FG ^a	% ^b	FG ^a	% ^b	CtB ^a	% ^b	CtB ^a	% ^b	CtB ^a	% ^b	
L P O A	r	-vm	88	7,4	63	7,5	109	11,4	21	6,5	28	4,9	11	8,0
		-c	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		-d	30	2,5	25	3,0	20	2,1	3	0,9	7	1,2	1	0,7
		-vl	10	0,8	3	0,4	2	0,2	2	0,6	0	0,0	0	0,0
		-v	37	3,1	30	3,6	49	5,1	0	0,0	8	1,4	3	2,2
			165	13,8	121	14,5	180	18,8	26	8,0	43	7,5	15	10,9
	VLPO	11	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	cLPOA	134	11,3	140	16,7	150	15,7	11	3,4	10	1,8	0	0,0	
		310	26,0	261	31,2	330	34,5	37	11,4	53	9,3	15	10,9	
L H A	LHAad	29	2,5	14	1,7	27	2,8	28	8,6	64	11,2	12	8,7	
	LHAal	55	4,7	14	1,7	28	2,9	21	6,5	20	3,5	0	6,5	
	LHAvl	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	2,5	0	0,0	0	0,0	
	LHa	135	11,4	100	12,0	58	6,1	62	19,1	43	7,5	33	23,9	
	LHi	18	1,5	3	0,4	9	0,9	4	1,2	28	4,9	2	1,4	
	LHt	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	LHp	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	McLH	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	IHal	2	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	rIHA	100	8,5	64	7,7	104	10,9	4	1,2	11	1,9	0	0,0	
	clHA	8	0,7	4	0,5	6	0,6	2	0,6	0	0,0	0	0,0	
	rPFX	149	12,6	100	12,0	66	6,9	1	0,3	21	3,7	10	7,2	
cPFX	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
		496	42,1	299	36	298	31,1	130	40,0	187	32,7	57	47,7	
w e i t e r e R e g i o n e n	EPN	78	6,6	72	8,6	71	7,4	95	29,3	188	32,9	0	0,0	
	BST	50	4,2	15	1,8	20	2,1	1	0,3	10	1,8	6	4,3	
	VPa	26	2,2	36	4,3	32	3,4	0	0,0	14	2,5	6	4,3	
	AHA	5	0,4	2	0,2	7	0,7	0	0,0	0	0,0	2	1,4	
	DMH	3	0,3	0	0,0	13	1,4	1	0,3	2	0,4	1	0,7	
	DHA	78	6,6	70	8,4	106	11,1	24	7,4	38	6,7	28	20,3	
	VMH	3	0,3	16	1,9	15	1,6	0	0,0	7	1,2	0	0,0	
	ZI	17	1,4	33	3,9	8	0,8	8	2,5	18	3,2	0	0,0	
	Subl	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	McPO	71	6,0	14	1,7	21	2,2	8	2,5	1	0,2	3	2,2	
	SI	41	3,5	16	1,9	34	3,6	20	6,2	53	9,3	11	8,0	
HDB	4	0,3	2	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
		376	31,8	276	32,9	327	34,3	157	48,5	331	58,2	57	41,2	
		1182	100	836	100	955	100	324	100	571	100	129	100	

^a Nativ-Anzahl der retrograden FG oder CtB-markierten Nervenzellen ipsilateral zur Injektionsstelle, die absolute Anzahl ergibt sich durch die Multiplikation mit dem Korrekturfaktor 0,467 (siehe Methodik)

^b Prozentualer Anteil der Neurone an der Gesamtpopulation markierter Zellen im ventralen Dienzephalon von Bregma + 0,5 mm bis -5,0 mm

Abkürzungen sind dem Anhang zu entnehmen.

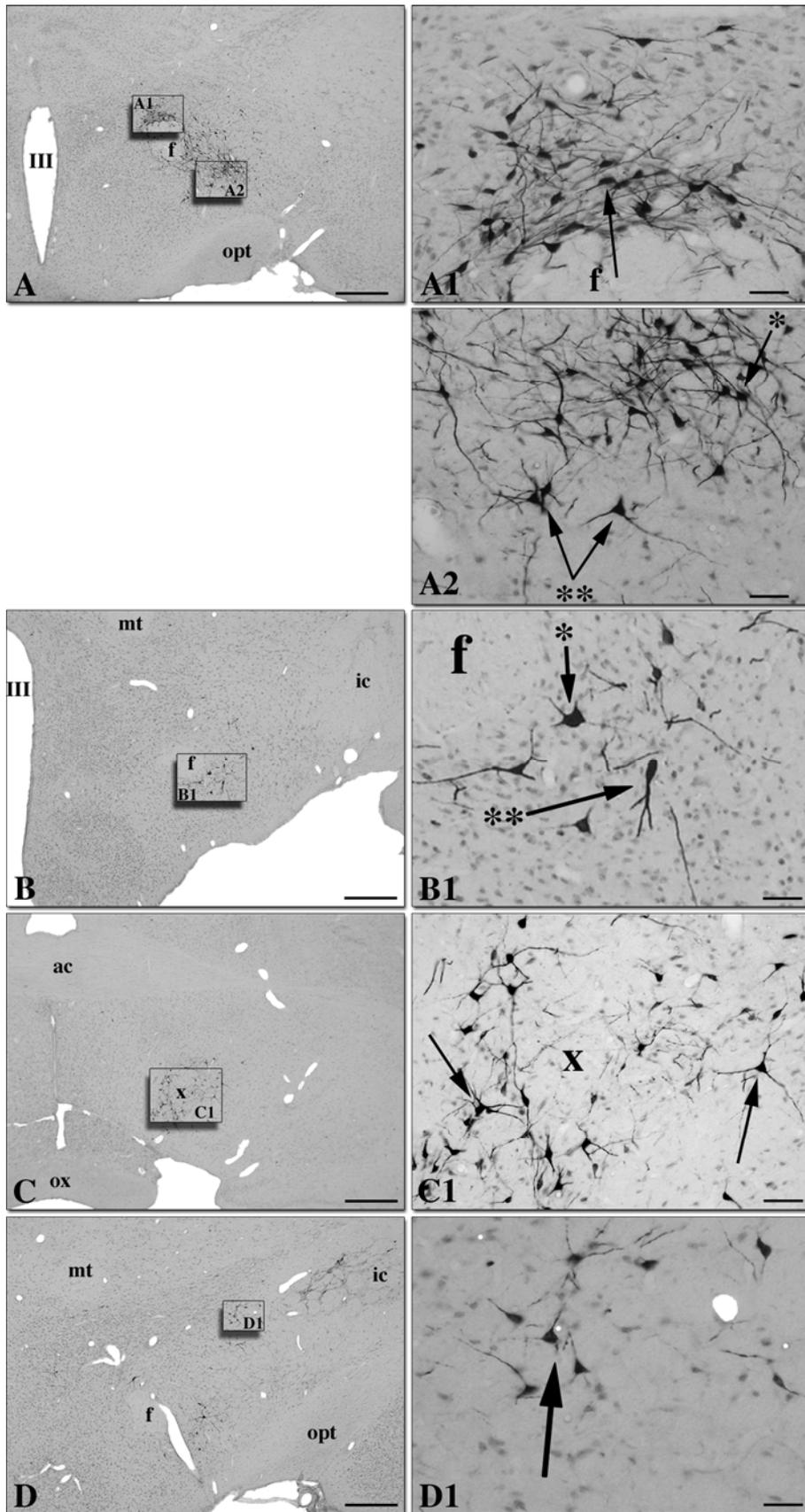


Abbildung 14: Fortsetzung nächste Seite.

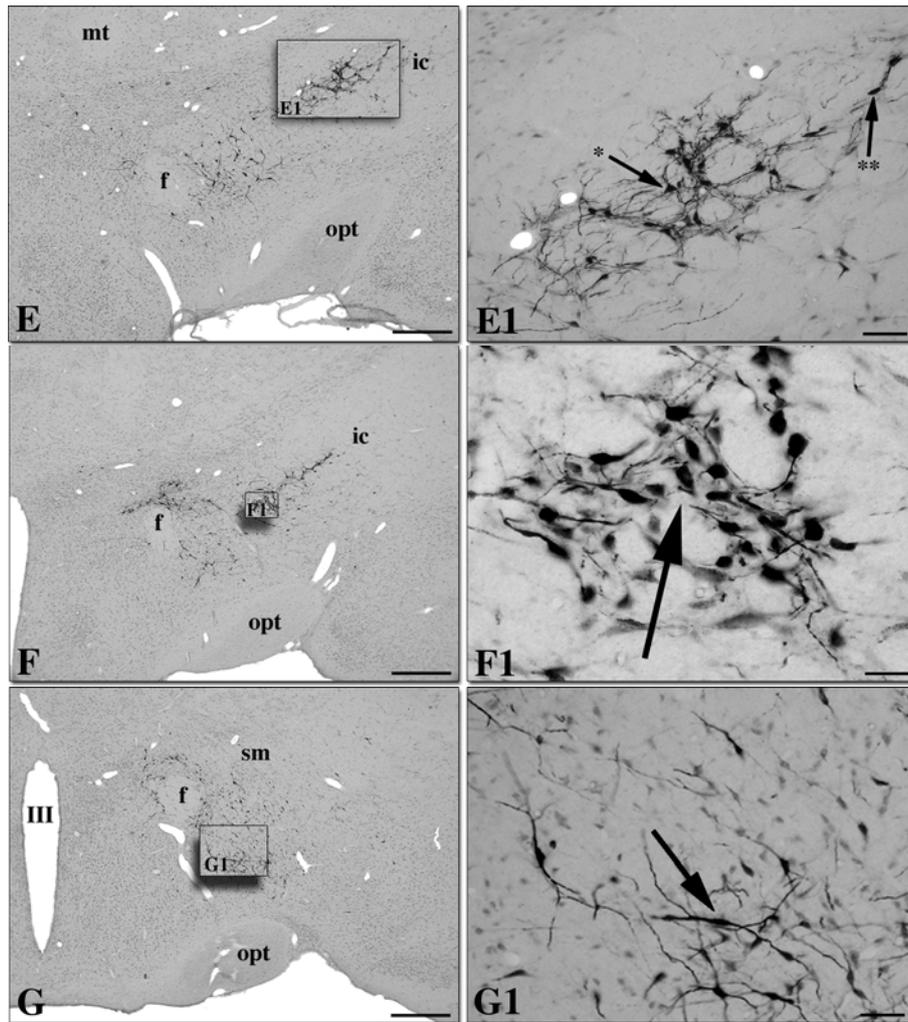


Abbildung 3.14: Nach Injektion eines retrograden Tracers in den LHb markieren sich in der LPOA/LHA zahlreiche Neurone (A bis G). Eine Schar von Zellen liegt im Bereich des Fornix (A). Im vorderen perifornikalen Kern sind eher plumpe spindelförmige (A1, Pfeil), in der rostralen Area hypothalamica intermedialis vorwiegend trianguläre multipolare Zellen markiert (A2, **). Lateral davon liegen die meist kleineren und ovalen Neurone der anterolateralen Zellgruppe der LHA (A2, *). In der kaudalen Area hypothalamica intermedialis (B) liegen hingegen trianguläre (B1, *) und schmale, ovale Zellen (B1, **). In der ventromedialen Zellgruppe der rLPOA (C) liegen meist große, multipolare Neurone mit kräftigen Dendriten (C1, Pfeile), die von bipolaren Zellen umgeben sind. Ein kleines Areal, rLPOAc projiziert nicht zum LHb (x in C1). In der anterodorsalen Zellgruppe der LHA (D) finden sich kleine trianguläre Zellen mit zarten Dendriten (D1, Pfeil). Im vorderen Drittel des EPN (E) liegen zwischen den Faserbündeln der inneren Kapsel trianguläre, multipolare Zellen mit meist drei bis vier kräftigen Dendriten (E1, *), umgeben von schlankeren spindelförmige Neuronen (E1, **). Im anterioren Teil des Nucleus hypothalamicus lateralis (F) ist eine Gruppe von kleinen, dicht beieinander liegenden Zellen markiert, die in der koronaren Ebene eine rundliche bis ovale Form haben (F1, Pfeil). In der kaudalen Zellgruppe der LPOA (G) befinden sich spindelförmige Nervenzellen (G1, Pfeil). Die Skalierstriche entsprechen 1000 µm in B und C; 600 µm in A, D bis F; 700 µm in G sowie 30 µm F1, G1 und 40 µm in A1/A2 bis E1. Abkürzungen siehe Anhang.

3.3.2 Die Verteilung der anterograd markierten Terminalen im lateralen Habenularkomplex zeigt ein komplexes Muster

Auf Grundlage der retrograden hodologischen Daten wurde in einer weiteren Serie von etwa 50 anterograden Tracing-Experimenten die Lokalisation axonaler Endigungen innerhalb des lateralen Habenularkomplexes im Detail untersucht. Dazu wurden die Tracer PhaL und TMR-DA in die zuvor identifizierten Zellpopulationen der LPOA/LHA (Abb. 3.1, A bis J) injiziert und die zugehörigen Projektionsgebiete untersucht.

Prinzipiell können im LHb bei hoher lichtmikroskopischer Auflösung zwei verschiedene Arten von Axonterminalen, deren Varikositäten sich in Form, Größe und Verteilung unterscheiden, identifiziert werden. Die erste Kategorie enthält große axonale Schwellungen, vorwiegend entlang von Axonen, die auch als „*boutons en passant*“ bezeichnet werden. Der zweite Typ zeichnet sich durch eher kleine Auftreibungen am Ende von Axonen und Axonverweigungen im Sinne von „*boutons terminaux*“ aus. Zusätzlich sind im LHb dicke und dünnere, sowie stark und sich wenig verzweigende Axone unterscheidbar. Diese Eigenschaften sind aber unabhängig von der Herkunft der Projektionen und zeigen im LHb keine unterkernspezifische Verteilung.

3.3.2.1 Die Verbindungen der einzelnen Zellgruppen der lateralen präoptischen Region zu den verschiedenen Unterkernen des LHb

Die Projektionen aus den Zellgruppen der lateralen präoptischen Region (LPOA) zum lateralen Habenularkomplex (LHb) zeigen eine deutliche ipsilateralen Dominanz.

3.3.2.1.1 Die rostralen Zellgruppen der LPOA projizieren vorwiegend zum ipsilateralen magnozellulären und basalen Unterkern des LHbL

Eine große Injektion mit dem Tracer PhaL in die rLPOA (92/02-A; Abb. 3.16, B und C; 3.17) soll repräsentativ im Folgenden näher beschrieben werden. Die Injektionsstelle hat eine rostrokaudale Ausdehnung von Bregma -0,3 bis -0,8 mm und umfasst die präoptischen Zellgruppen rLPOvm, rLPOAvl, rLPOAc. Wenig Tracer ist in die rLPOAd, in den HDB und in den VLPO übergetreten. Die Injektionsstelle wird medial durch den Nucleus preopticus medialis und die Area preoptica medialis, lateral von der Substantia innominata basalis und dem magnozellulären präoptischen Kern, rostrolateral durch das ventrale Pallidum und dorsal von den Bettkernen der Stria terminalis begrenzt.

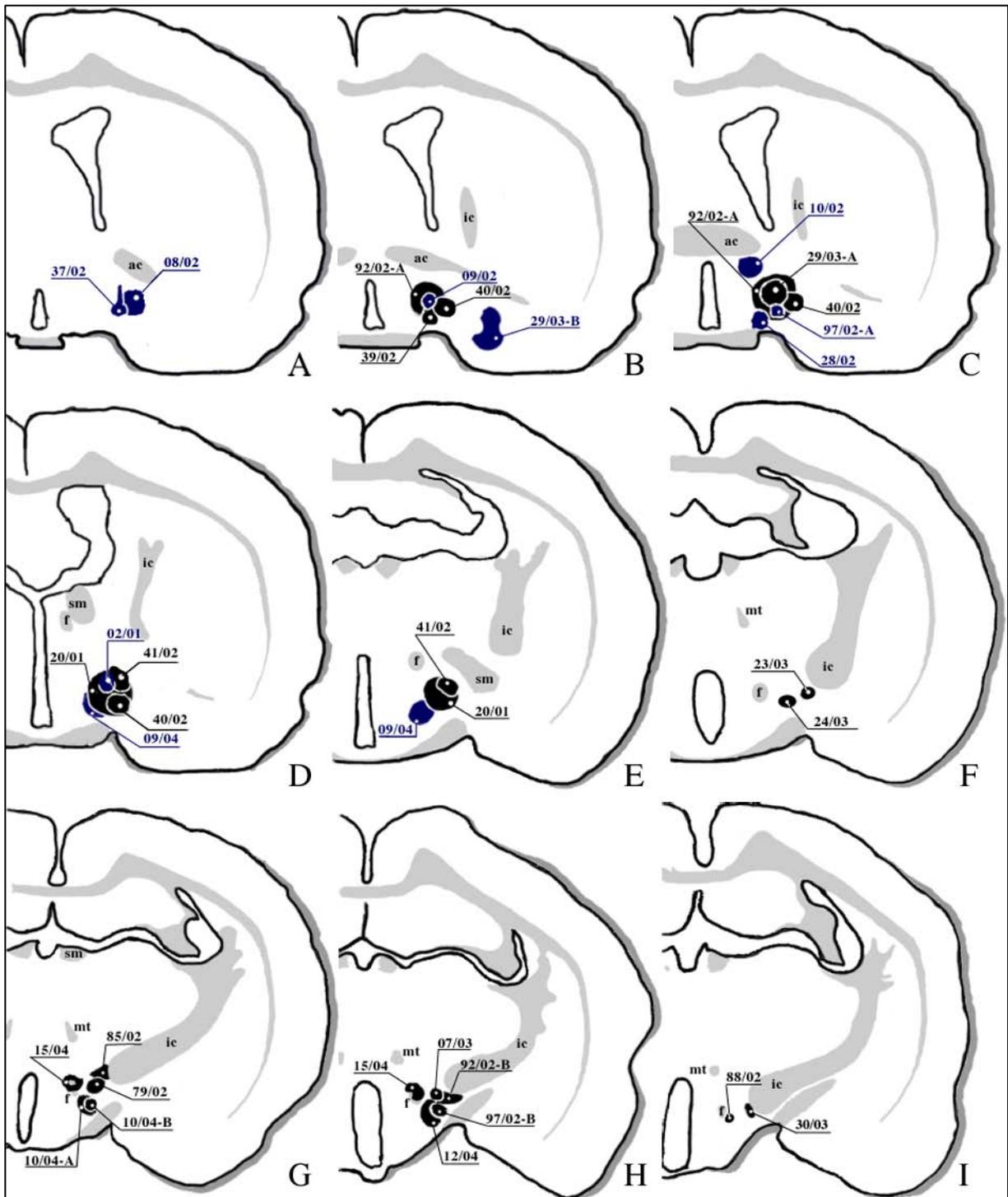


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung von Position und Ausdehnung der verschiedenen Injektionsstellen in der LPOA/LHA. Laterale präoptische Region (A bis E), laterale hypothalamische Region (F bis I). A, Bregma (B): +0,4 bis -0,1 mm; B, B: -0,2 bis -0,4 mm; C, B: -0,5 bis -0,8 mm; D, B: -0,9 bis -1,2 mm; E, B: -1,3 bis -1,6 mm; F, B: -1,7 bis -1,9 mm; G, B: -2,0 bis -2,3 mm; H, B: -2,4 bis -3,0 mm; I, B: -3,1 bis -3,3 mm. Die Tracing-Ergebnisse schwarz markierter Injektionsstellen sind in den folgenden Abbildungen illustriert, blaue ausschließlich im Text beschrieben. Abkürzungen siehe Anhang.

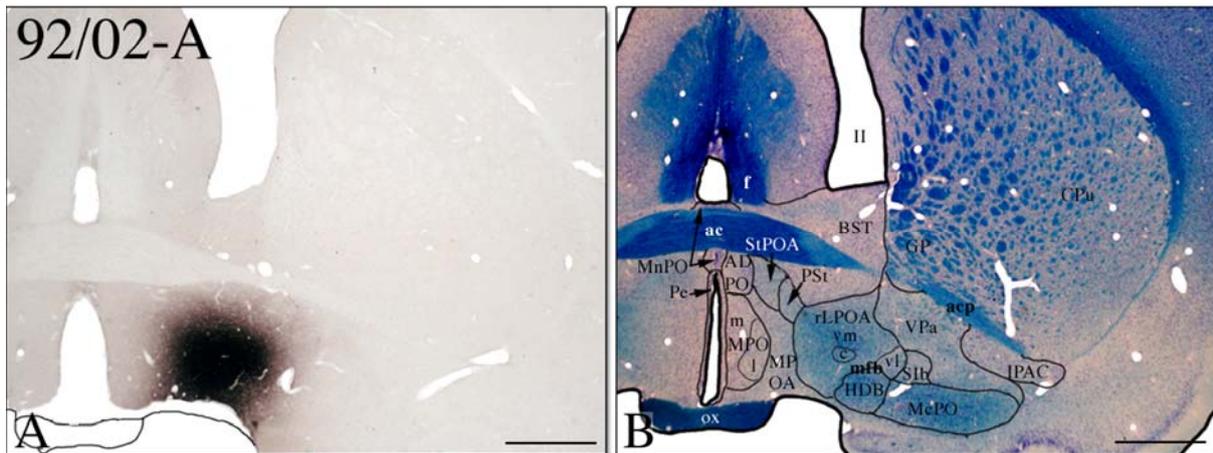


Abbildung 3.17: Die PhaL-Injektionsstelle 92/02-A (A) und ein dazu benachbarter nach Klüver-Barrera gefärbter Schnitt (B). Die Zellgruppen in der rLPOA sind in B schematisch dargestellt. Die Skalierstriche entsprechen 1000 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

Viele Axone enden im lateralen Anteil des ipsilateralen LHb. Insbesondere der magnozellularä und basale Unterkern des LHbL (LHbLMc, LHbB) zeigen dicht gepackte Boutons (Abb. 3.18, B3 bis B5). Zusätzlich enden Axone auch im anterioren (LHbMA), zentralen (LHbMC) und marginalen (LHbMMg) Unterkern des LHbM. Keine PhaL-Immunreaktivität wurde im superioren und parvozellulären Unterkern des LHbM (LHbMS, LHbMPc) sowie im marginalen, parvozellulären und ovalen Unterkern des LHbL (LHbLMg, LHbLPc, LHbLO) beobachtet (Abb. 3.18, B1 bis B5). Im lateralen Unterkern des medialen Habenularkomplexes (MHbL) konnten zwei Axone mit wenigen Boutons identifiziert werden (Abb. 3.18, B2 und B3). Die Eingänge in die kontralaterale Habenula beschränken sich auf den LHbLMc (ohne Abb.).

Eine andere PhaL-Injektionsstelle (29/03-A; Abb. 3.16, C) liegt von Bregma -0,4 bis -0,8 mm in den Zellgruppen rLPOAvm und rLPOAc sowie anteilig auch in rLPOAd und rLPOAv. Die ventrolaterale Zellgruppe der rLPOA und die Kerne HDB und VLPO sind in diesem Versuch nicht getroffen. Eine beträchtliche Anzahl immunreaktiver Fasern und Endigungen ist im ipsilateralen LHbLMc und LHbLB visualisiert. Bei diesem Experiment finden sich jedoch mehr Boutons im LHbMC, an der Grenze zum LHbLMc und im LHbMA (Abb. 3.19, A1 bis A3). Ein Axon mit kleinen Boutons konnte bis in den MHbL verfolgt werden (Abb. 3.19, A3). In der kontralateralen Habenula sind einige Axone im LHbLMc und wenige im LHbMA markiert (ohne Abb.).

Eine wesentlich kleinere PhaL-Injektionsstelle (09/02; Abb. 3.16, B) liegt bei Bregma -0,3 mm in der zentralen Zellgruppe der rLPOA. Die Tracer-Substanz ist aber auch in der rLPOAvm nachweisbar, die die rLPOAc umgibt. Nach dieser Injektion finden sich

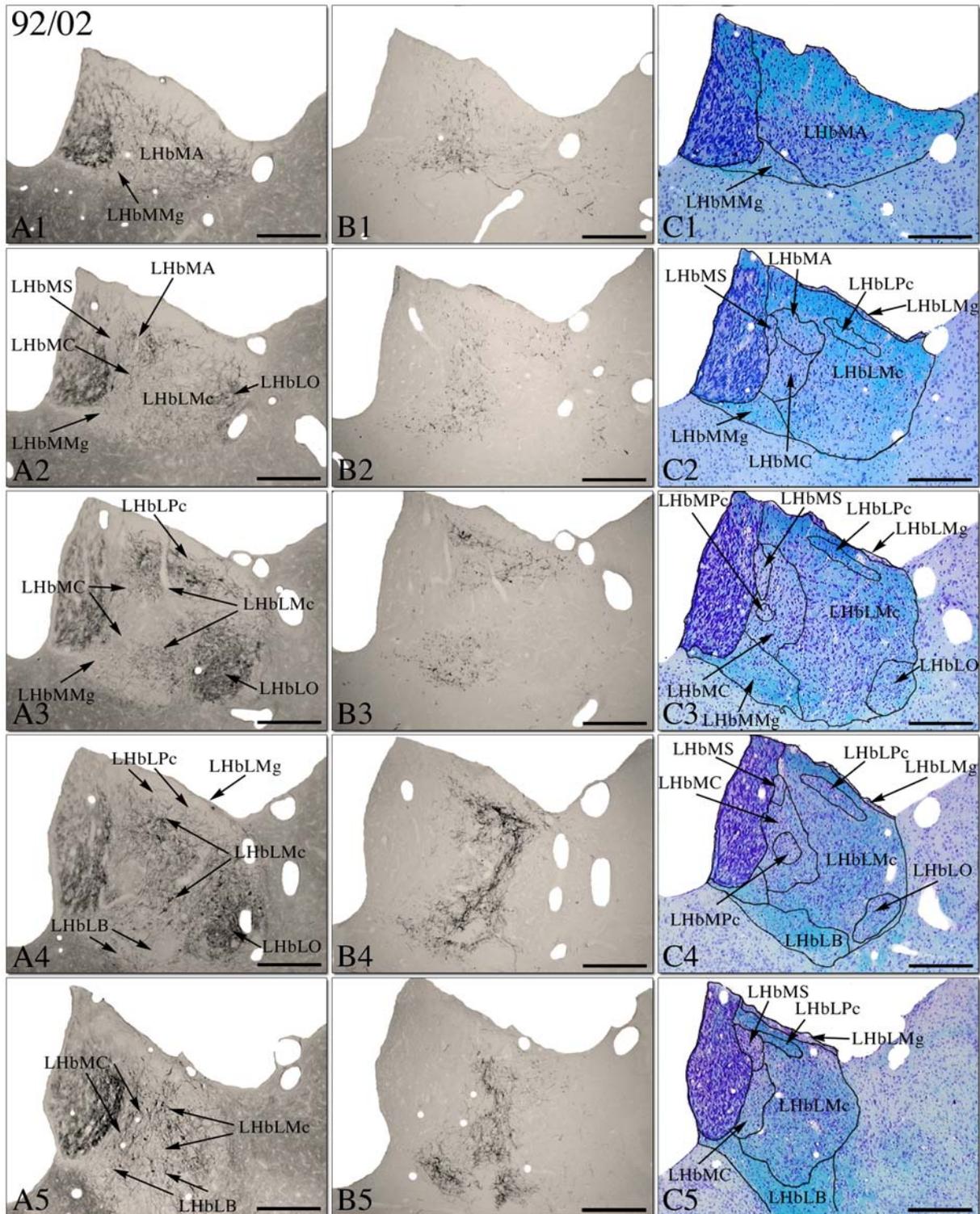


Abbildung 3.18: Nach Tracerapplikation in Zellgruppen der rLPOA sind vorwiegend Projektionen im ipsilateralen LHbLMc und LHbLB anterograd markiert (B3-B5). Terminalen liegen außerdem medial im LHbMA (B1, B2), im LHbMC (B2-B5) und im LHbMMg (B1-B3). Im LHbMS, LHbMPC, LHbLMg, LHbLPC und LHbLO sind keine Endigungen nachweisbar. In je einer benachbarten Serie sind die Chemoarchitektur mit einem Antikörper gegen die Kaliumkanal-Untereinheit Kir3.2 (A1-A5) und die Zytoarchitektur mit der Färbung nach Klüver-Barrera (C1-C5) dargestellt. Die Skalierstriche entsprechen 300 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

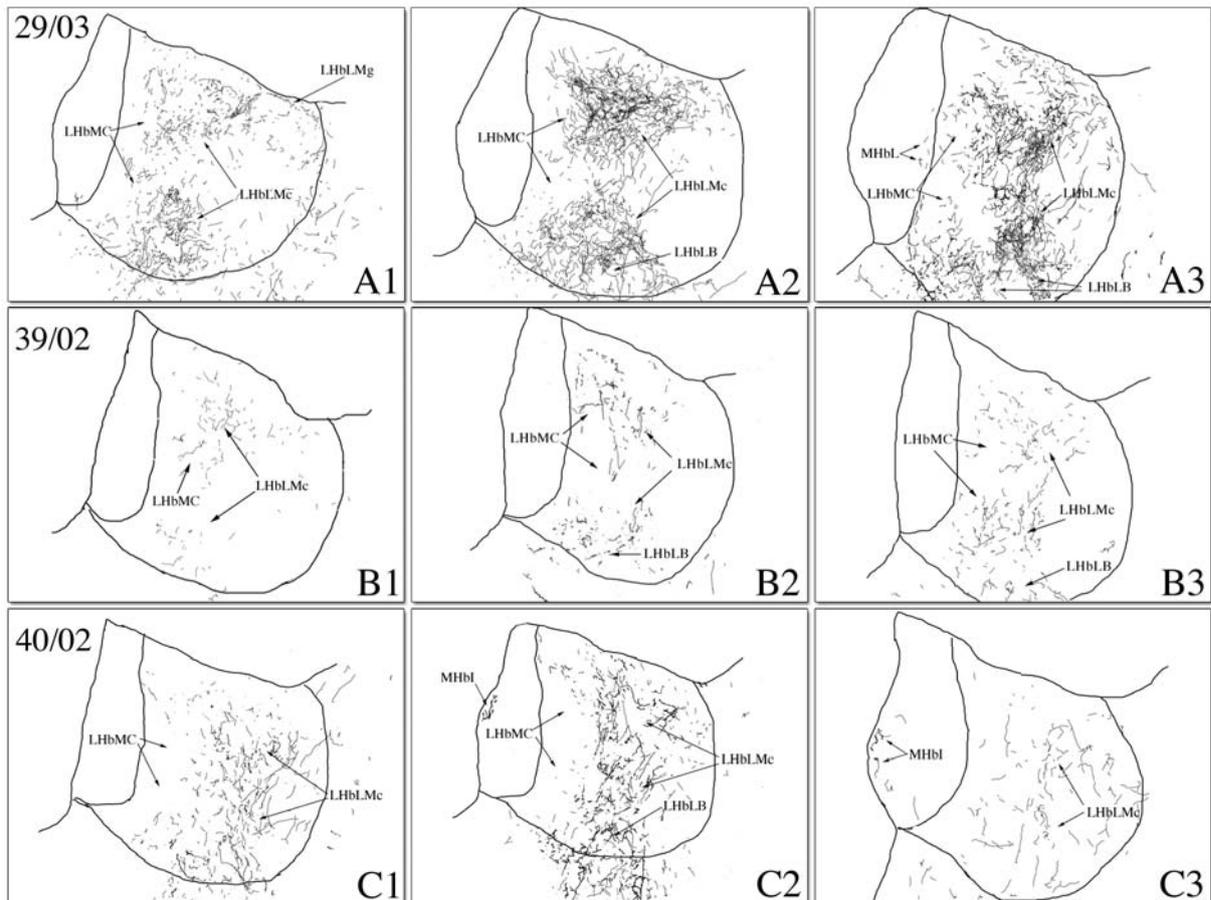


Abbildung 3.19: Die Kamera-Lucida Zeichnungen zeigen markierte Projektionen im ipsilateralen LHB nach Injektionen anterograder Tracer in verschiedene Bereiche der rLPOA. Die Axone von Zellen der ventromedialen, dorsalen und ventralen Zellgruppe der rLPOA (29/03) enden vorwiegend im LHbLMc und LHbLB, einige auch im LHbMC (**A1** bis **A3**). Nach Tracerapplikation in den Nucleus preopticus ventrolateralis (39/02) sind Terminalen hauptsächlich im LHbLMc, wenige auch im LHbMC, LHbLB und LHbMA markiert (**B1** bis **B3**). Projektionen aus dem Grenzbereich zwischen der rLPOA und der Substantia innominata (40/02) enden mehrheitlich im LHbLMc und LHbLB (**C1** bis **C3**). In allen drei Fällen sind keine Endigungen in den Unterkernen LHbMS, LHbMPc, LHbLMg, LHbLPc und LHbLO sichtbar (**A**, **B**, **C**). Abkürzungen siehe Anhang.

anterograd markierte Axonendigungen nur vereinzelt im ipsilateralen LHbLMc und LHbMA (*ohne Abb.*). In der kontralateralen Habenula enden zwei Axone im LHbLMc. Dagegen enden in anderen Hirnregionen (wie VTA oder ventrales Pallidum) deutliche mehr Projektionen. Entsprechend sind bei retrograden Untersuchungen mit Tracer-Applikation in den LHB keine retrograd markierten Zellen in der rLPOAc nachweisbar (*siehe auch Kap. 3.3.1*). Die Axone im LHB stammen hier daher vermutlich von Neuronen im rLPOAvm. Eine bedeutende Anzahl von Axonterminalen liegt im ipsilateralen LHB im LHbLMc und LHbLB (*ohne Abb.*).

Weitere Axone enden im LHbMC und lateral im LHbMA, diese stammen von Nervenzellen der cLPOA. In der kontralateralen Habenula (LHbLMc, LHbMC) sind kaum Projektionen markiert.

In einem anderen Experiment 97/02-A (Abb. 3.21, D) ist die Innervation der Habenula spärlicher (Vergleiche mit 02/01). Die Axone terminieren vorwiegend im LHbLMc und weniger auch im LHbMA (ohne Abb.). Die sehr kleine PhaL-Injektionsstelle liegt in der ventralen Zellgruppe der rLPOA bei Bregma -0,8 mm. Die cLPOA wurde nicht getroffen, daher sind im LHbMC keine Endigungen markiert.

Im nächsten Experiment (39/02; Abb. 3.16 B) wurden die Projektionen aus dem Nucleus preopticus ventrolateralis (VLPO) untersucht. Die Injektionsstelle mit TMR-DA liegt ungefähr bei Bregma -0,3 mm und umfasst jedoch teilweise die rLPOAvm. Nervenzellen in diesem Bereich innervieren vorwiegend den ipsilateralen LHbLMc. In den Unterkernen LHbLB, LHbMC und LHbMA lassen sich dagegen nur wenige TMR-DA-positive Terminalen beobachten (Abb. 3.19, B bis B3). Die kontralaterale Habenula enthält nur im LHbLMc markierte Fasern.

Die Injektionsstelle 28/02 (Abb. 3.16, C) liegt von Bregma -0,6 bis -0,8 mm. Auch hier wurde TMR-DA in den VLPO appliziert, jedoch ist auch ein Teil der rostralen Area hypothalamica intermedialis (rHA) getroffen. Die meisten Projektionen enden mit ipsilateraler Dominanz im LHbLMc. Da die rHA vorwiegend zum LHbMC projiziert (siehe Kap. 3.3.2.2.1), sind auch bei diesem Versuch mehr Axonterminalen im LHbMC zu finden, als nach einer isolierten VLPO-Injektion zu erwarten wären (ohne Abb.).

An der Grenze zwischen rLPOA und Substantia innominata basalis liegt von Bregma -0,4 bis -0,9 mm die Injektionsstelle 40/02 (Abb. 3.16, B bis D). TMR-DA ist dort in der rLPOAvl, lateral in der rLPOAv und rLPOAvm sowie im HDB und in der Substantia innominata visualisiert. Die Projektionen aus dieser Region enden vorwiegend im ipsilateralen LHbLMc und LHbLB (Abb. 3.19, C1 bis C3). Lateral im LHbMA terminieren wenige Projektionen, im LHbMC haben die Axone nur vereinzelt Boutons. Bei dieser Injektion traten auch Axonendigungen im inferioren Unterkern des MHb (MHbl) auf (Abb. 3.19, C2 und C3). Die kontralateralen Unterkerne (LHbLMc und LHbLB) erhalten kaum Projektionen.

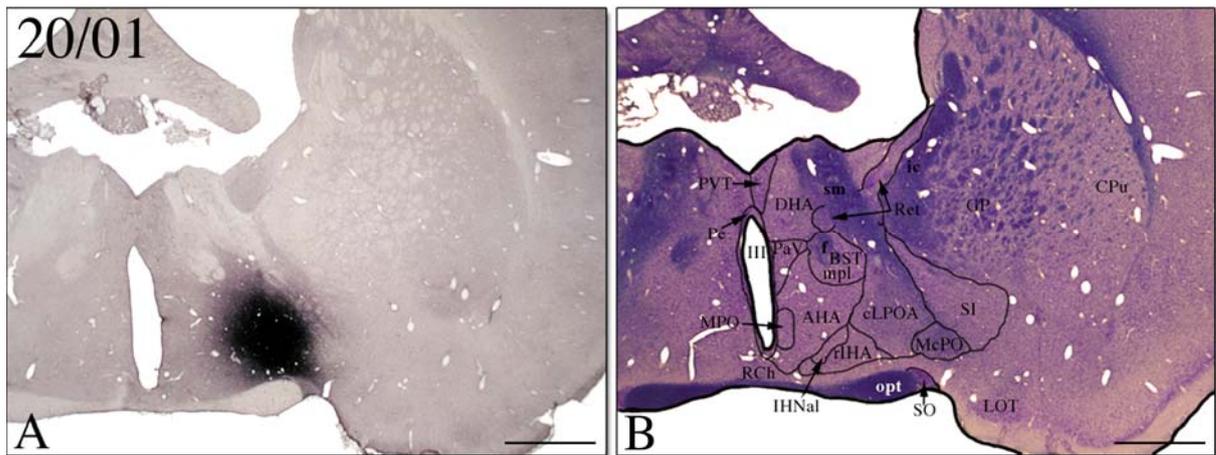


Abbildung 3.20: Die Phal-Injektionsstelle (20/01) liegt in der kaudalen LPOA (cLPOA, **A**). In die Mikrofotografie eines angrenzenden Frontalschnittes in kombinierter Zell- und Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera sind die Zellgruppen des ventralen Zwischenhirns schematisch ergänzt (**B**). Die Skalierstriche entsprechen 1000 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

3.3.2.1.2 Die Afferenzen aus dem kaudalen Anteil der LPOA terminieren hauptsächlich im zentralen Unterkern des LHbM

Die größte Injektionsstelle im Bereich der kaudalen LPOA, 20/01 (cLPOA; Abb. 3.16, D und E; 3.20), soll hier beispielhaft näher beschrieben werden. Das Zentrum der Phal-Applikation liegt von Bregma -0,9 bis -1,6 mm in der cLPOA, im geringen Umfang auch in den Zellgruppen der rLPOA (rLPOAv, rLPOAvm. Die Injektionsstelle wird lateral von der Stria medullaris, medial durch AHA und rHA, dorsal vom Nucleus reticularis thalami und kaudal durch die LHA begrenzt. Die Projektionen enden am dichtesten im LHbMA, LHbMC und LHbMMg der ipsilateralen Habenula (Abb. 3.21, B1 bis B5). Im Vergleich dazu ist die Zahl der Boutons im LHbLMc, LHbLB und LHbLMg wesentlich geringer. Der LHbMPc und der LHbLPc werden von Fasern nur durchzogen, Axonendigungen sind selten. In der kontralateralen Habenula terminieren Axone vereinzelt im LHbMC und LHbMMg, jedoch kaum im LHbLMc (ohne Abb.). Die Unterkerne LHbMS, LHbLO und die MHb werden weder ipsi- noch kontralateral innerviert.

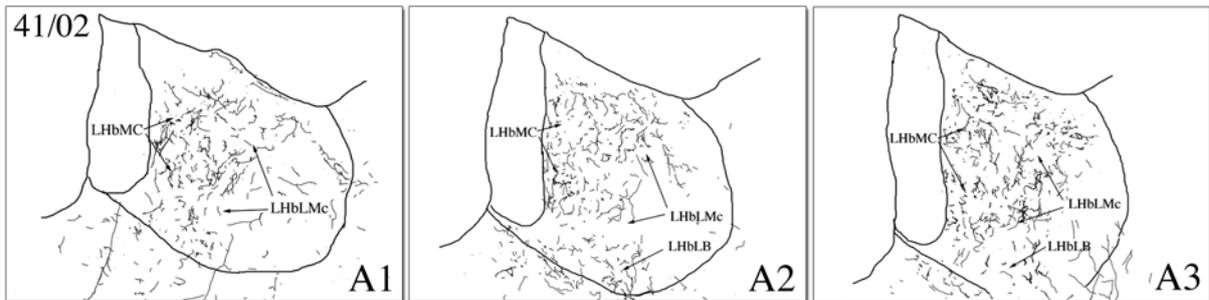


Abbildung 3.22: Kamera-Lucida Zeichnung des ipsilateralen LHb (41/02) nach Tracerapplikation in die dorsolateralen Anteile der cLPOA, auch die ventromediale Zellgruppe der rLPOA ist von der Injektionsstelle betroffen. Die markierten Nervenendigungen liegen im LHbMC und LHbLMc, einige auch im LHbLB (A1 bis A3). Keine Axonterminalen liegen in den Unterkernen LHbMS, LHbMPc, LHbLMg sowie im LHbLO. Abkürzungen siehe Anhang.

Im Experiment 09/04 (Abb. 3.16, D) liegt die PhaL-Injektion an ähnlicher Stelle in der cLPOA und erstreckt sich von Bregma -1,0 bis -1,3 mm. Die zugehörigen Axone enden medial im LHbMC und LHbMMg, wenige auch im LHbMA und LHbLB (ohne Abb.). Kontralateral enden wenige Fasern im LHbMC. Die Injektionsstelle 41/02 (Abb. 3.161, D und E) mit dem Tracer TMR-DA liegt dorsolateral in der cLPOA und dehnt sich von Bregma -1,6 mm etwa 700 µm nach rostral bis in die rLPOAvm aus. In diesem Fall liegt eine bedeutende Anzahl von Axonterminalen im LHbMC, LHbMA und LHbLMc der ipsilateralen Habenula (Abb. 3.22, A1 bis A3). Dabei stammen die Endigungen im Bereich des LHbLMc von Zellgruppen in der rLPOA, während die cLPOA vorwiegend zum zentralen Unterkern des LHbM projiziert. In der kontralateralen Habenula sind nur im LHbLMc einige Terminalen markiert (ohne Abb.).

3.3.2.1.3 Zwischen den Projektionen der rostralen und kaudalen LPOA zum lateralen Habenularkomplex bestehen deutliche Unterschiede

Insgesamt projiziert die LPOA vorwiegend über die Stria medullaris zur ipsilateralen Habenula, nur ein Teil der Axone zieht nahe der Medianlinie durch den Thalamus nach dorsal. Im medialen Vorderhirnbündel verlaufen kaum Fasern nach kaudal, diese schließen sich jedoch im Bereich der VTA entweder dem Fasciculus retroflexus an oder ziehen lateral des dritten Ventrikels, im so genannten paraventrikulären Fasersystem, in Richtung Habenula. Einige Projektionen kreuzen im Bereich des Thalamus und der VTA, andere in der Commissura habenularum zur Gegenseite. Der Unterschied in der Innervation des LHb aus der rostralen und kaudalen präoptischen Region ist in den Versuchen 92/02-A und 20/01 besonders deutlich.

Die rostralen Zellgruppen der LPOA projizieren zusammengefasst hauptsächlich zum magnozellulären und basalen Unterkern des LHbL, während die Afferenzen aus der kaudalen Zellgruppe vorwiegend im zentralen, anterioren und marginalen Unterkern des LHbM enden. Individuelle Projektionen der einzelnen Zellgruppen der rLPOA lassen sich nur schwer nachweisen. Möglicherweise sind die Dendriten der Neurone in den einzelnen Zellgruppen über deren Grenzen hinweg ineinander verwoben, sodass eine isolierte Analyse unmöglich ist.

Dennoch stellt die ventromediale Zellgruppe den größten Anteil der zum LHbLMc und LHbLB projizierenden Fasern der rostralen LPOA (*Tab. 3.3*). Im Vergleich dazu enden Axone aus der rLPOvl mehr in den rostralen Anteilen der Unterkerne des LHbL, während die rLPOAc gar nicht zum LHb projiziert.

Die rLPOAd innerviert den magnozellulären und basalen Unterkern des LHbL, während nur wenige Afferenzen aus der LPOAv im LHbLMc enden (*Tab. 3.3*). Die sehr ähnlichen Projektionen aus dem Nucleus preopticus ventrolateralis und der rLPOAvl unterscheiden sich lediglich in der Dichte terminierender Axone. Die LPOA projiziert nicht zum LHbMS, LHbMPc und LHbLO. In der kontralateralen Habenula enden wenige Fasern, im medialen Habenularkomplex sind nur vereinzelt Terminalen nachweisbar (*Tab. 3.3*). Ob diese spärlichen Endigungen im MHb tatsächlich an MHb-Neuronen oder an exterritorialen Zellen des LHb enden, muss noch geklärt werden.

Tabelle 3.3: Die Verteilung von anterograd markierten Afferenzen im medialen und lateralen Habenularkomplex - Semiquantitative Darstellung der Faserdichte

		MHb		LHbM						LHbL					
		LHbMA	LHbMS	LHbMPC	LHbMC	LHbMMg		LHbLMg	LHbLPc	LHbLMc	LHbLO	LHbLB			
L	rLPOAvm	(+)	-	-	+/x	+		-	-	+++x	-	+++x			
	rLPOAc	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-			
	rLPOAd	-	-	-	+	-		-	-	+++x	-	++			
	rLPOAvi	(+)	-	-	+	-		-	-	+++x	-	+++x		+++x	
	rLPOAv	(+)	-	-	-	-		-	-	+++x	-	+x			
	VLPO	-	-	-	+	-		-	-	+++x	-	+			
A	cLPOA	-	+++x	(+)	+++x	+++x		(+)	(+)	+++x	-	+		+++x	
	LHAad	-	-	-	-	-		-	-	+++x	++	+		+++x	
	LHAal	-	-	-	-	-		-	-	+++x	-	++			
	LHAvi/cLHAvi	-	-	-	-	-		-	-	++	-	++		+++x	
	LHAi/it	-	(+)	-	(+)	-		+	+	+++x	-	+++x			
	LHp	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	
H	McLH	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	
	rHA/ciHA/iHal	-	-	-	+++x	+++x		-	-	+	-	+		+	
	rPFx	(+)	-	-	+	-		-	-	+++x	-	+++		+++x	
	cPFx	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	
	BST	-	-	-	++	-		-	-	++	-	++		++	
	VPa	-	-	-	+/x	-		-	-	+++x	-	-		+++x	
EPN		-	-	-	-	-		-	-	++	+++	+		+++	
	LDTg	-	+	+++x	++	++		(+)	(+)	(+)	-	(+)		(+)	

- +++ starke Projektion
- ++ mäßige Projektion
- + wenige Projektionen
- (+) sporadisches Auftreten von Axonterminalen
- keine Projektionen
- x kontralaterale Projektionen

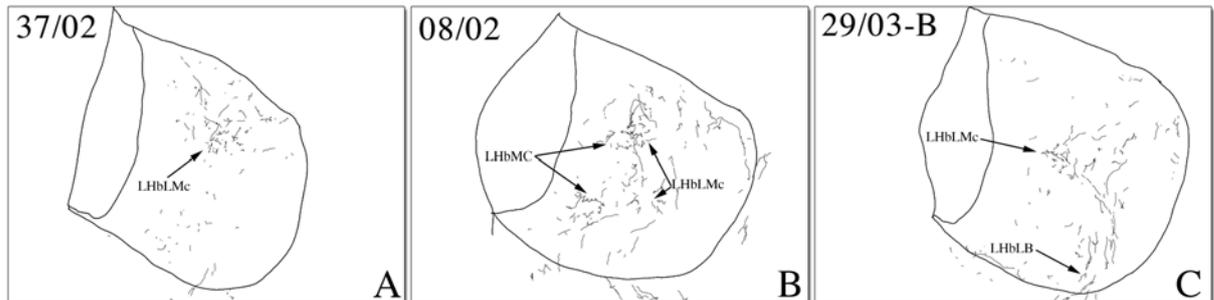


Abbildung 3.23: Die drei Anteile des ventralen Pallidums projizieren individuell zum LHb. Die Afferenzen des subkommissuralen Areals der Substantia innominata (37/02) zum LHb enden vorwiegend dorsal im LhbLMc (**A**). Die Projektionen aus dem ventralen Fünftel des Globus pallidus (08/02) erreichen hauptsächlich im Bereich zwischen LhbMC und LhbLMc (**B**). Markierte Axonterminalen aus dem pallidalen Anteil des Tuberculum olfactorium liegen dagegen mehr zentral im LhbLMc (**C**). Abkürzungen siehe Anhang.

3.3.2.2 Auch andere diencephale Kerngebiete projizieren individuell zu den Unterkernen des lateralen Habenularkomplex

Einige Injektionsstellen lagen auch außerhalb der LPOA, im ventralen Pallidum (VPa) und im Bettkern der Stria terminalis (BST). Das VPa besteht aus drei unterschiedlichen Teilgebieten, dem subkommissuralen Anteil der Substantia innominata, dem ventralen Fünftel des Globus pallidus und dem pallidalen Bereich des Tuberculum olfactorium (Alheid et al., 1990).

Die PhaL-Injektionsstelle 37/02 (Abb. 3.16, A) liegt vorwiegend im subkommissuralen Anteil der Substantia innominata und erstreckt sich von Bregma 0,2 bis 0,4 mm. Der anterograde Tracer TMR-DA wurde im Experiment 08/02 (Abb. 3.16 A) in das ventrale Fünftel des Globus pallidus (Bregma 0,1 bis 0,3 mm) und im Fall 29/03-B (Abb. 3.16, B) in den pallidalen Bereich des Tuberculum olfactorium (Bregma -0,2 bis -0,4 mm) appliziert. Die Projektionen aus allen drei Arealen enden vorwiegend im LhbLMc. Innerhalb dieses Unterkerns gibt es jedoch eine differenzierte Verteilung der Terminalen. Die Afferenzen aus den subkommissuralen Anteilen der Substantia innominata enden vorwiegend dorsal im LhbLMc (Abb. 3.23 A), während die aus dem ventralen Fünftel des Globus pallidus an der Grenzen zwischen LhbM und LhbLMc liegen (Abb. 3.23, B). Im Zentrum des LhbLMc sind nach Injektionen in den pallidalen Bereich des Tuberculum olfactorium Fasern und Endigungen markiert, der LhbLB wird von Axonen nur durchzogen (Abb. 3.23, C). Die Verteilung der Axonendigungen aus den drei unterscheidbaren Anteilen des VPa ist prinzipiell mit der Vorstellung eines

mediolateralen Gradienten vereinbar. Mediale Anteile des VPa terminieren medial, lateral gelegene weiter lateral im LHb. Die Projektionen aus den einzelnen Teilgebieten des VPa erreichen den LHb jedoch unterschiedlich. Die Afferenzen aus dem subkommissuralen Anteil der Substantia innominata verlaufen vorwiegend in der Stria medullaris, die aus dem pallidalen Bereich des Tuberculum olfactorium hingezogen hauptsächlich mittelliniennahe durch den dorsalen Thalamus. Das ventrale Fünftel des Globus pallidus projiziert vorwiegend über das mediale Vorderhirnbündel und weiter über das paraventrikuläre Fasersystem zum LHb. Die kontralaterale Habenula wird vom VPa nur spärlich innerviert, die wenigen Terminalen liegen im LHbLMc (*ohne Abb.*). Im MHb sind keine Axone nachweisbar.

Der Bettkern der Stria terminalis ist eine heterogene Ansammlung mehrerer Kerngebiete im Bereich der Stria terminalis und der vorderen Kommissur. Aufgrund seiner zytoarchitektonischen Komplexität mit mindestens zehn Unterkernen (je nach Autor unterschiedlich), soll nur die subkommissural gelegene Injektionsstelle 10/02 (*Abb. 3.16, C*) exemplarisch vorgestellt werden. Die Tracer-Substanz TMR-DA liegt im ventralen Anteil des anterioren Areals des Bettkerns der Stria terminalis (BSTav) etwa bei Bregma -0,5 mm. Die Axone erreichen den Habenularkomplex über die Stria medullaris und das mediale Vorderhirnbündel. Sie enden im LHb diffus im LHbMC, LHbLMc und LHbLB (*Tab. 3.3*). Alle anderen Unterkerne, der MHb und die kontralaterale Seite werden nicht innerviert.

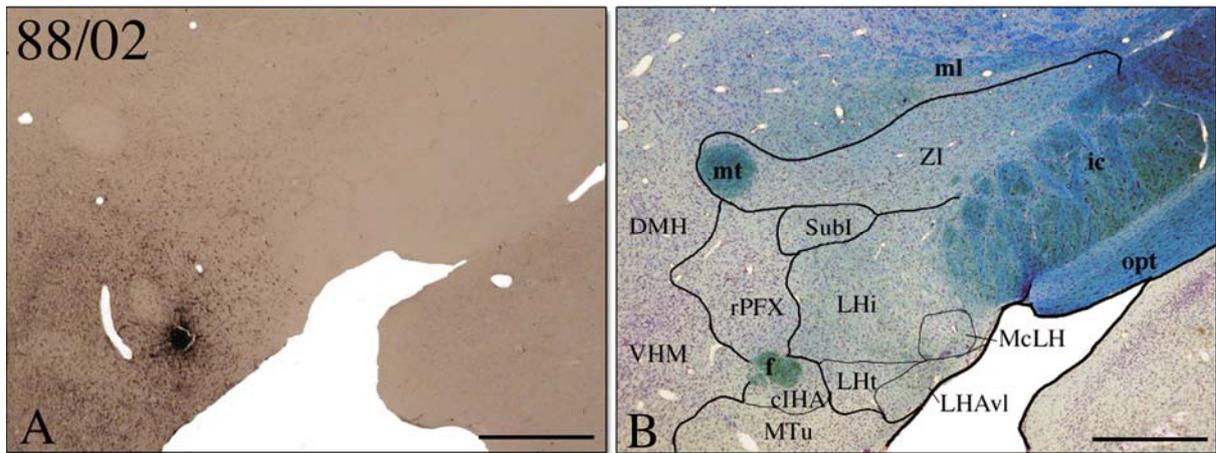


Abbildung 3.24: Im Versuch 88/02 liegt die Injektionsstelle ventrolateral des Fornix in der kaudalen Area hypothalamica intermedialis (cIHA; **A**). In der Mikrofotografie eines dazu benachbarten Klüver-Barrera gefärbten Frontalschnitts sind zur besseren Orientierung die Zellgruppen der LHA dargestellt (**B**). Die Skalierstriche entsprechen 600 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

3.3.2.3 Die Projektionen der medialen und lateralen Zone der lateralen hypothalamischen Region zum LHB

Die verschiedenen Subareale der lateralen hypothalamischen Region projizieren vorwiegend zum ipsilateralen lateralen Habenularkomplex.

3.3.2.3.1 Die Zellgruppen in der medialen Zone der LHA projizieren individuell zu den Unterkernen im medialen und lateralen Anteil des LHB

Die Projektionen der medialen Zone der LHA (LHA-M) zum LHB wurden anhand der Afferenzen der Area hypothalamica intermedialis (IHA) und des Nucleus perifornicalis (PFX) untersucht. Das Experiment 88/02 (Abb. 3.161, I; 3.24) soll repräsentativ für eine Injektion in die IHA im Detail vorgestellt werden. Der Tracer TMR-DA wurde etwa bei Bregma -3,3 mm in den kaudalen Anteil der IHA appliziert. Die Injektionsstelle liegt in der tuberalen Zone der LHA-M. Das Dextranamin ist hier nur wenig in den lateral angrenzenden Nucleus hypothalamicus lateralis diffundiert. Eine bedeutende Ansammlung terminierender Axone ist ipsilateral im LHbMC und LHbMMg zu finden (Abb. 3.25, B2 bis B4). Das sehr dichte Terminalenfeld liegt an der Grenze zwischen LHbMC und MHb (Abb. 3.25 B3). Einige markierte Axonendigungen lassen sich auch medial im LHbMA nachweisen, während im dorsomedialen Anteil des LHbLMc und im LHbLB nur vereinzelt Boutons zu finden sind (Abb. 3.25, B1 bis B4). In den anderen Unterkernen (LHbMPc, LHbMS, LHbLPc, LHbLMg und im LHbLO) gibt es keine

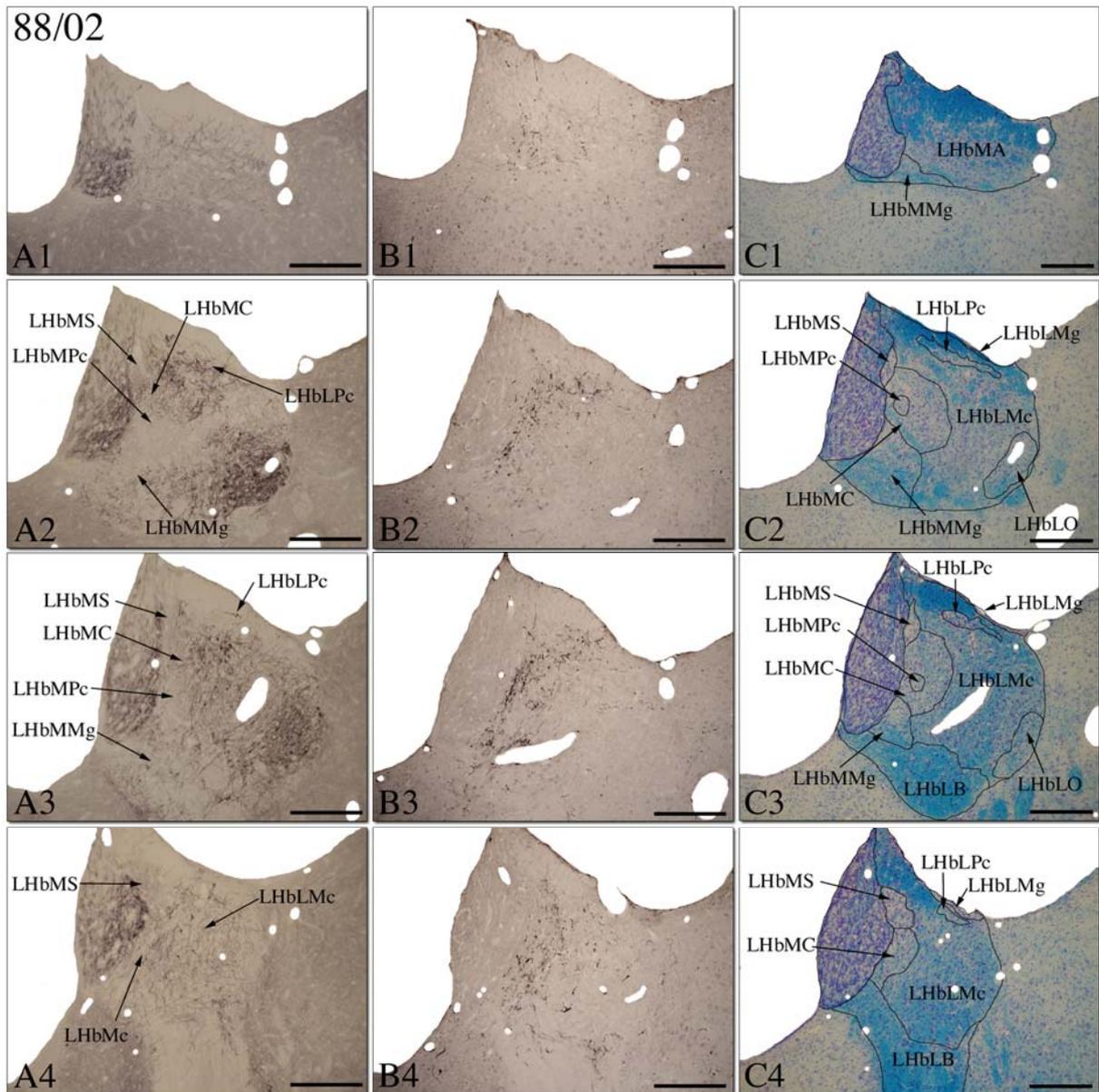


Abbildung 3.25: Nach Applikation des Tracers TMR-DA in die kaudale Area hypothalamica intermedialis (clHA) sind mehrheitlich Terminalen im LHbMC und LHbMMg (**B2 bis B4**), wenige auch im LHbMA (**B1 bis B3**) anterograd markiert. Vereinzelt liegen Axonterminalen im LHbLB und dorsomedial im LHbLMc (**B2 bis B5**). Die anderen Unterkerne sind von der clHA nicht innerviert. Mit einem Antikörper gegen die Kaliumkanal Untereinheit Kir3.2 ist die Chemoarchitektur dargestellt (**A1 bis A5**). Zusätzlich sind die Unterkerne des LHb in die Mikro fotografie eines angrenzenden Klüver-Barrera gefärbten Schnitts eingezeichnet (**C1 bis C5**). Die Skalierstriche entsprechen 300 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

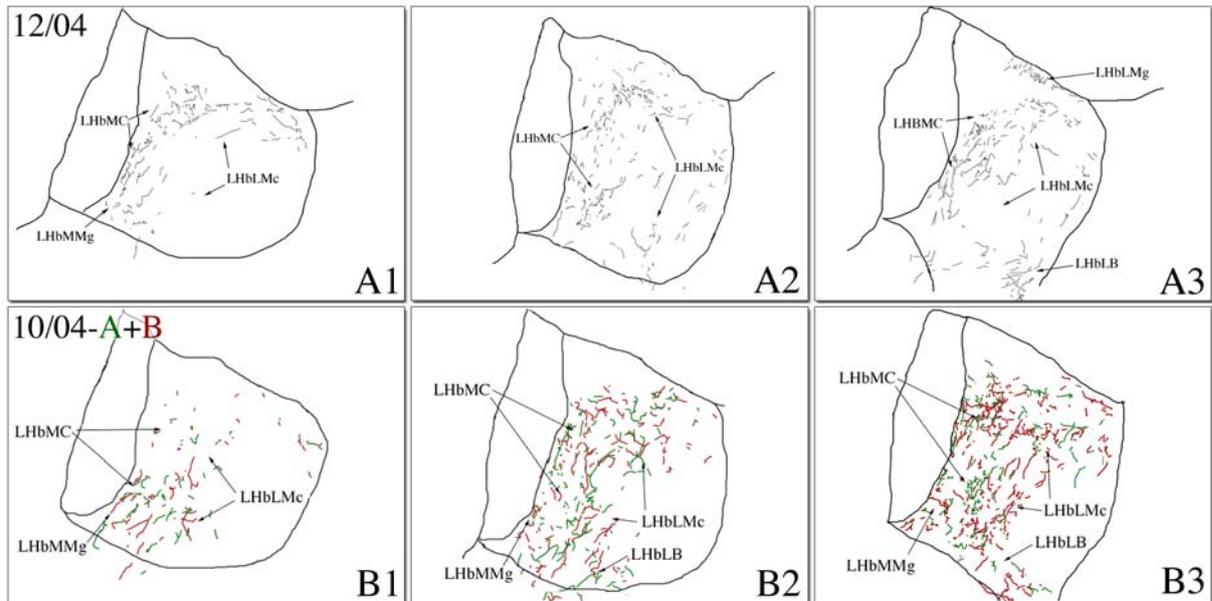


Abbildung 3.26: Die Axone aus dem rostralen Anteil der Area hypothalamica intermedialis (rHA; 12/04) enden im LHbMC und LHbMMg (**A1** bis **A3**). Einige Boutons liegen auch im LHbLMc, LHbLMg und LHbLB. Auch nach der Doppelinjektion 10/04-A+B (PhaL, grün; TMR-DA, rot) in die rHA sind Axonendigungen vorwiegend im LHbMC und LHbMMg markiert (**B1** bis **B3**). Abkürzungen siehe Anhang.

Endigungen (*Abb. 3.25, B2 bis B4*). In der kontralateralen Habenula sind wenige Axone im LHbMC und LHbMMg markiert (*ohne Abb.*). Der MHb wird nicht innerviert.

Die Injektionsstelle im Fall 12/04 (*Abb. 3.16, H*) liegt etwa bei Bregma -2,5 mm in der rostralen IHA. Der verwendete Tracer (TMR-DA) ist teilweise auch in den Nucleus hypothalamicus lateralis und in die ventrolaterale Zellgruppe der LHA diffundiert. Auch in diesem Fall enden die Axone vornehmlich im ipsilateralen LHbMC und LHbMMg (*Abb. 3.26, A1 bis A3*). Im Vergleich zu 88/02 sind jedoch deutlich mehr Fasern und Boutons im LHbLMg, LHbLMc und LHbLB markiert (*Abb. 3.26, A1 bis A3*). Die Axone zu diesen Unterkernen stammen wahrscheinlich aus dem Nucleus hypothalamicus lateralis (*siehe auch Kap. 3.3.2.3.2*). Dagegen sind im LHbLO, LHbLPc, LHbMS, LHbMPc und in der MHb keine Terminalen markiert. Im kontralateralen Lhb findet sich lediglich eine unbedeutende Anzahl von Fasern im LHbMC (*ohne Abb.*).

Die Doppelinjektionsstelle 10/04-A+B (*Abb. 3.12, A und B; 3.16, G*) befindet sich ebenfalls in der rHA. Sie erstreckt von Bregma -2,3 mm ungefähr 300 µm in Richtung der präoptischen Region. Bei der TMR-DA Applikation (10/04-B) ist der Tracer mehr in die medialen Anteile der LHA_{vl}, LHA_{al} und in den lateralen hypothalamischen Kern diffundiert als bei der PhaL-Injektion (10/04-A). Daher sind im LHbLMc auch mehr

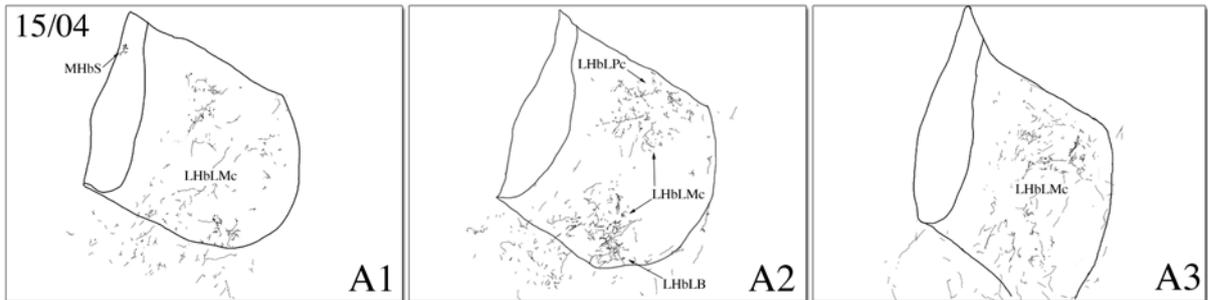


Abbildung 3.27: Die Projektionen des Nucleus perifornicalis (15/04) enden in der ipsilateralen Habenula vorwiegend im LHbLMc, LHbLB und LHbL (A1 bis A3). Ein kaum verzweigtes Axon liegt im superioren Kern der MHb (A1). Abkürzungen siehe Anhang.

TMR-DA- als PhaL-positive Axonendigungen nachweisbar (*rote vs. grüne Fasern in Abb. 3.26, B2 und B3*). Der Hauptanteil der Projektionen terminiert jedoch in beiden Fällen ipsilateral im LHbMC. Zahlreiche Projektionen erreichen auch den LHbMMg und den LHbMA, einige den LHbLB (*Abb. 3.26, B1 bis B3*). Die Unterkerne LHbLO, LHbLMg, LHbMS, LHbMPc werden nicht von Neuronen aus dem Bereich dieser Injektionsstellen innerviert. Im medialen Habenularkomplex und im kontralateralen LHb sind ebenfalls keine Terminalen vorhanden (*ohne Abb.*).

Der Tracer PhaL wurde im Fall 15/04 (*Abb. 3. 16, G und H*) bei Bregma -2,5 bis -2,8 mm in den rostralen Anteil des Nucleus perifornicalis appliziert. Die Projektionen zum ipsilateralen LHb enden im LHbLMc, LHbLB aber auch im LHbLPc. Im LHbMC und LHbMA sind kaum Fasern vorhanden, während die anderen Unterkerne vom rPFX nicht innerviert werden (*Abb. 3.27, A1 bis A3*). Im medialen Habenularkomplex ist ein einziges wenig verzweigtes Axon mit spärlichen „*Boutons terminaux*“ im superioren Unterkern des MHb markiert (*Abb. 3.27, A1*). Der kontralaterale LHb enthält wenige Boutons im LHbLMc und im LHbLB (*ohne Abb.*).

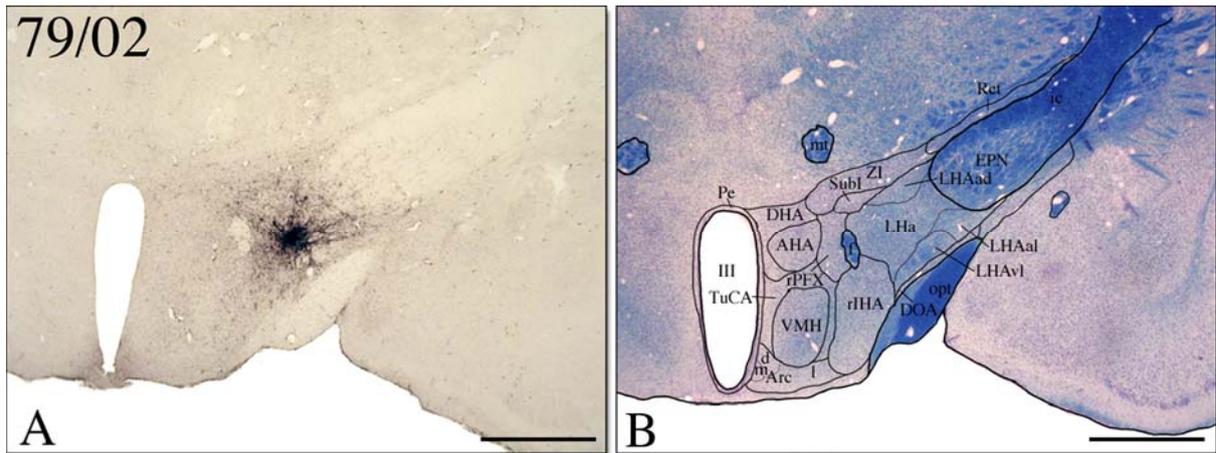


Abbildung 3.28: Die Injektionsstelle 79/02 (TMR-DA; **A**) liegt im anterioren Anteil des Nucleus hypothalamicus lateralis (LHa), im Bereich der anterolateralen Zellgruppe der LHA (LHAal) und teilweise lateral im rostralen Nucleus hypothalamicus intermedius (rHA). In einem benachbarten Klüver-Barrera gefärbten Frontalschnitt ist die Morphologie dieser Region dargestellt, die Zellgruppen der LHA sind ergänzend eingezeichnet (**B**). Die Skalierstriche entsprechen 600 µm. Abkürzungen siehe Anhang.

3.3.2.3.2 Nervenzellen in der lateralen Zone der LHA innervieren vorwiegend den magnozellularen und basalen Unterkern des LHb

Die zentral in der lateralen Zone der LHA (LHA-L) liegende Injektionsstelle 79/02 (TMR-DA; *Abb. 3.16, G und 3.28*) soll stellvertretend genauer beschrieben werden. Sie erstreckt sich von Bregma -2,0 mm bis -2,2 mm und umfasst den LHa, die LHAal, aber auch den dorsolateralen Anteil der rHA. Die Axone zum ipsilateralen LHb enden im LHbLMc, LHbLpc, LHbLMg und LHbLB (*Abb. 3.29, B1 bis B5*). Besonders im dorsomedialen und dorsolateralen Anteil des LHbLMc treten dicht gepackte Axonschwellungen auf (*Abb. 3.29, B3 und B4*). Im Bereich des LHbMA, LHbMC und LHbMMg zeigen sich Terminalen, deren Axone wahrscheinlich aus dem Gebiet der rHA stammen (*siehe Kap. 3.3.2.3.1*). Im superioren und im parvozellulären Unterkern des LHbM sowie im LHbLO konnten keine Axonendigungen identifiziert werden. Im kontralateralen LHb sind vereinzelt Boutons im LHbLMc und LHbLB markiert (*ohne Abb.*). Der MHb erhält weder ipsi- noch kontralateral Projektionen.

Die Neurone im Bereich dieser Injektionsstelle projizieren fast ausschließlich zum ipsilateralen LHbLMc und LHbLB (*Abb. 3.30, A1 bis A3*). Die kontralaterale Habenula und der MHb werden nicht innerviert.

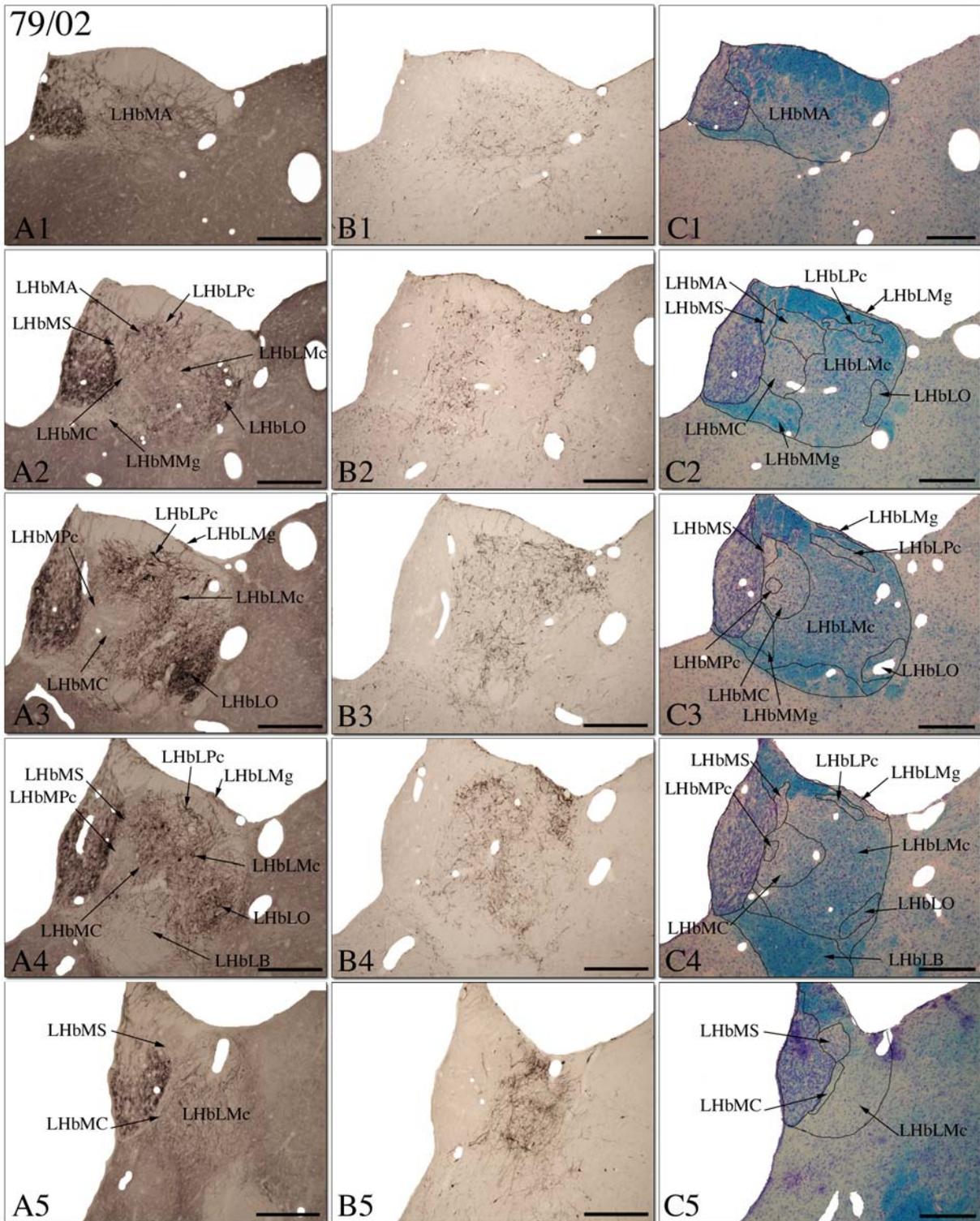


Abbildung 3.29: Die Projektionen aus dem anterioren Anteil des Nucleus hypothalamicus lateralis (LHa) und der LHAal enden vorwiegend dorsomedial und -lateral im LHbLMc (**B3** bis **B5**). Außerdem enden Axone im LHbMA, LHbMMg und LHbMC (**B1** bis **B3**), jedoch stammen diese von Neuronen der rLHA. Im LHbMS, LHbMPC, LHbLO und in der MHb liegen keine markierten Axonterminalen. Die Chemoarchitektur der LHb ist mit einem Antikörper gegen die Kaliumkanal-Untereinheit Kir3.2 dargestellt (**A1** bis **A5**). Zusätzlich ist die Zytoarchitektur des LHb in einem benachbarten nach Klüver-Barrera gefärbten Frontalschnitt dargestellt (**C1** bis **C5**). Die Skalierstriche entsprechen 300 μm . Abkürzungen siehe Anhang.

Zwei weitere TMR-DA-Injektionsstellen (23/03 und 24/03; Abb. 3.16, F) liegen bei Bregma -1,8 mm in der Area hypothalamica anterolateralis. Im Fall 24/03 umfasst sie teilweise auch die rHA. Bei beiden Experimenten sind immunreaktive Endigungen besonders im ipsilateralen LHbLMc markiert (Abb. 3.30, B1 bis B3 sowie C1 bis C3). Im Versuch 24/03 sind zusätzlich Projektionen zum LHbMC nachweisbar (Abb. 3.30, B1 und B2), sie stammen wahrscheinlich aus der rHA. Der LHbLMc der kontralateralen Seite ist kaum innerviert (ohne Abb.).

Die Injektionsstelle im Versuch 97/02-B (TMR-DA; Abb. 3.16, H) liegt ungefähr 700 µm weiter kaudal in der LHAal und LHAvl. Auch in diesem Fall ist der Tracer partiell in der rHA visualisiert. Der größte Anteil der Projektionen aus der LHAal/LHAvl endet ipsilateral im LHbLMc, einige Fasern sind auch im LHbLB markiert (Abb. 3.30, D1 bis D3). Die wenigen Endigungen im LHbMA und LHbMC gehören zu Projektionen aus der rHA (Abb. 3.35, D1-D2). In der kontralateralen Habenula liegen keine markierten Fasern. Im Fall 92/02-B (TMR-DA; Abb. 3.16, H) wurden bei Bregma -2.5 mm die LHAal kaudal, der LHa und LHi ventral sowie der McLH rostral getroffen. Die ipsilateralen Projektionen lassen sich bis in den LHbLMc und den LHbLB verfolgen (Abb. 3.30, E1 bis E3). Im LHbMMg treten auch einige Axone ohne Boutons auf. Nervenzellen im McLH haben wahrscheinlich nicht zur anterograden Markierung von Axonendigungen im LHb beigetragen. Das entspricht auch retrograden Tracing-Experimenten, bei denen sich keine Nervenzellen im McLH markierten (siehe Kap 3.3.1). Zusätzlich sind nach TMR-DA-Applikation in den McLH (30/03; Abb. 3.16 I) im LHb keine Axonterminalen anterograd markiert (ohne Abb.). Eine weitere Injektionsstelle mit dem Tracer PhaL (85/02; Abb. 3.21, G) liegt bei Bregma -2,1 mm in der LHAad. Die Efferenzen enden fast ausschließlich im ipsilateralen LHbLO, einige Terminalen befinden sich auch dorsolateral im LHbLMc (Abb. 3.35, F1 und F2). Kontralateral sind wenige Fasern im LHbLMc visualisiert (ohne Abb.).

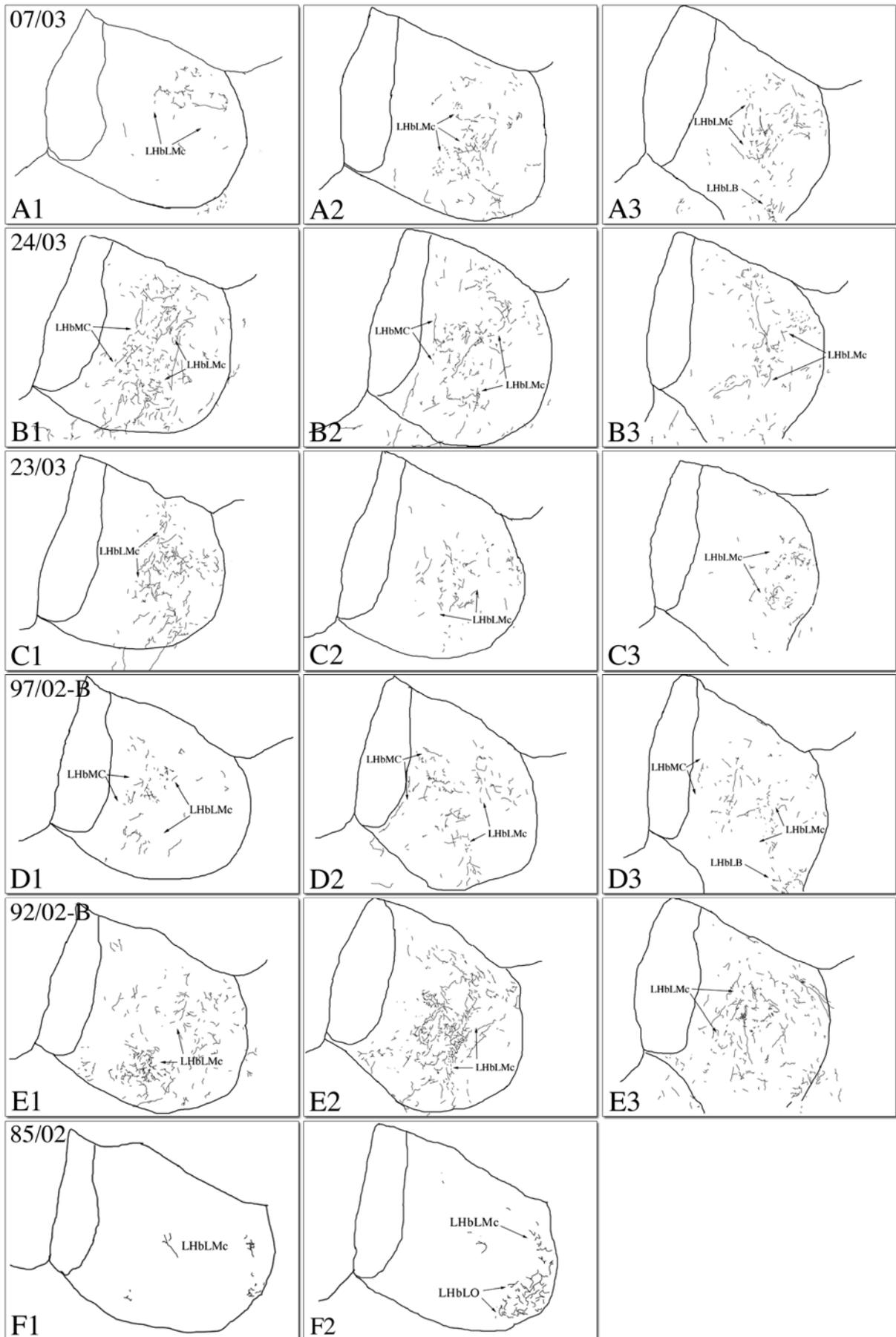


Abbildung 3.30: Beschreibung siehe nächste Seite.

Abbildung 3.30: Neurone im intermediären Anteil des Nucleus hypothalamicus lateralis (LHi; 07/03) projizieren fast ausschließlich zum LHbLMc und LHbLB (**A1** bis **A3**). Nach Tracerapplikation in die LHAal (medial Anteil, 24/03; lateraler Bereich, 23/03) sind Axonterminalen vorwiegend im LHbLMc, wenige auch im LHbMC markiert (**B1** bis **B3** und **C1** bis **C3**). Die Injektionsstelle 97/02-B liegt in der LHAal und LHAvl, teilweise auch in der rHA. Die Projektionen enden im LHbLMc und LHbLB (**D1** bis **D3**). Die markierten Axone im LHbMC (**D1**, **D2**) stammen von Zellen der rHA. Neurone ventral im LHAal, im LHa und im vorderen Anteil des McLH projizieren hauptsächlich zum LHbLMc und LHbLB (92/02-B; **E1** bis **E3**). Die Efferenzen aus dem LHAad (85/02) hingegen enden fast ausschließlich im LHbLO (**F1** und **F2**). Abkürzungen siehe Anhang.

3.3.2.3.3 *Auch die laterale hypothalamische Region projiziert spezifisch zu den Unterkernen des LHb*

Die Projektionen aus der LHA erreichen die Habenula überwiegend über zwei Wege. Axone von Nervenzellen, die rostral der tuberalen Zone der LHA liegen, ziehen bevorzugt im medialen Vorderhirnbündel Richtung präoptische Region und schließen sich dann auf dem Weg zum LHb der Stria medullaris an. Afferenzen aus dem Bereich der tuberalen Zone der LHA verlaufen im medialen Vorderhirnbündel nach kaudal, ziehen dann im paraventriculären Fasersystem und teilweise im Fasciculus retroflexus nach dorsal zum LHb. Einige Fasern steigen mittelliniennahe über den Thalamus zum ipsi-, wenige auch zum kontralateralen LHb auf. In der Commissura habenularum kreuzen kaum Fasern Gegenseite.

Die Zellgruppen der LHA-L aber auch der rPFX projizieren hauptsächlich ipsilateral zum LHbLMc und LHbLB (*Tab. 3.3*). Der LHbMC ist vorwiegend das Ziel von Axonen aus der IHA (*Tab. 3.3*). Der LHbMA wird im Vergleich mit allen anderen Zellgruppen und Kernen der LHA am dichtesten von der IHA innerviert. Interessanterweise projiziert ausschließlich die anterodorsale Zellgruppe der LHA zum LHbLO (*Tab. 3.3*). Der LHbMS, der LHbMPc und der LHbLMg erhalten weder aus der medialen noch aus der lateralen Zone der LHA einen Eingang. Ebenso projizieren nicht alle Areale der LHA (LHAvl, McLH, LHp und cPFX) zum LHb. Im Vergleich zur LPOA sendet die LHA deutlich weniger Axone zur kontralateralen Habenula. Sie enden jedoch in den gleichen Unterkernen, wie die ipsilateralen Fasern (*Tab. 3.3*).

3.3.2.4 Die Projektionen des Nucleus entopeduncularis enden hauptsächlich im ovalen Unterkern des lateralen Habenularkomplexes

Von mehreren Injektionsstellen in den Nucleus entopeduncularis (EPN) soll exemplarisch das Experiment 28/03 (*Abb. 3.31, A*) näher beschrieben werden. Die Applikationsstelle des Tracers PhaL befindet sich bei Bregma -2.5 mm im rostralen Anteil des EPN.

Die Axone der rostralen EPN-Neurone verlassen die Capsula interna in Richtung LHA und Zona incerta. Sie aszendieren nach dorsomedial durch den ventromedialen Thalamus, in dem sie sich zum Teil verzweigen. Die Fasern verlaufen weiter zum ventrolateralen Thalamus, von hier erreicht ein kleiner Teil der Axone den laterodorsalen Thalamus. Der größere Anteil jedoch durchzieht den zentromedianen Thalamus und steigt im paraventrikulären Fasersystem, weniger auch lateral im Fasciculus retroflexus zum LHb auf. Axone mit dicht gepackten kleinen Varikositäten befinden sich vorwiegend im LHbLO (*Abb. 3.31, E1 und E2*). Dieses Areal ist mit einem Antikörper gegen die Kaliumkanal-Untereinheit Kir3.2 immunzytochemisch visualisierbar (*Abb. 3.31, D1 und D2*). Ein weiteres Terminalenfeld mit jedoch deutlich weniger Varikositäten liegt in einem Kir3.2-negativen Areal dorsal im LHbLMc (*Abb. 3.31, E1 bis D1*). Die anderen Unterkerne des LHb, der MHb und die kontralaterale Habenula erhalten keine direkten Informationen aus dem EPN.

Ob die ähnlichen Projektionen von rEPN und LHAad ein Hinweis auf ihre vermutete entwicklungsgeschichtliche Zusammengehörigkeit sind, muss noch weiter geklärt werden (*siehe Kap. 1.6*). Injektionen in den kaudalen EPN führen nicht zu Axonmarkierung in den Unterkernen des LHb (*ohne Abb.*).

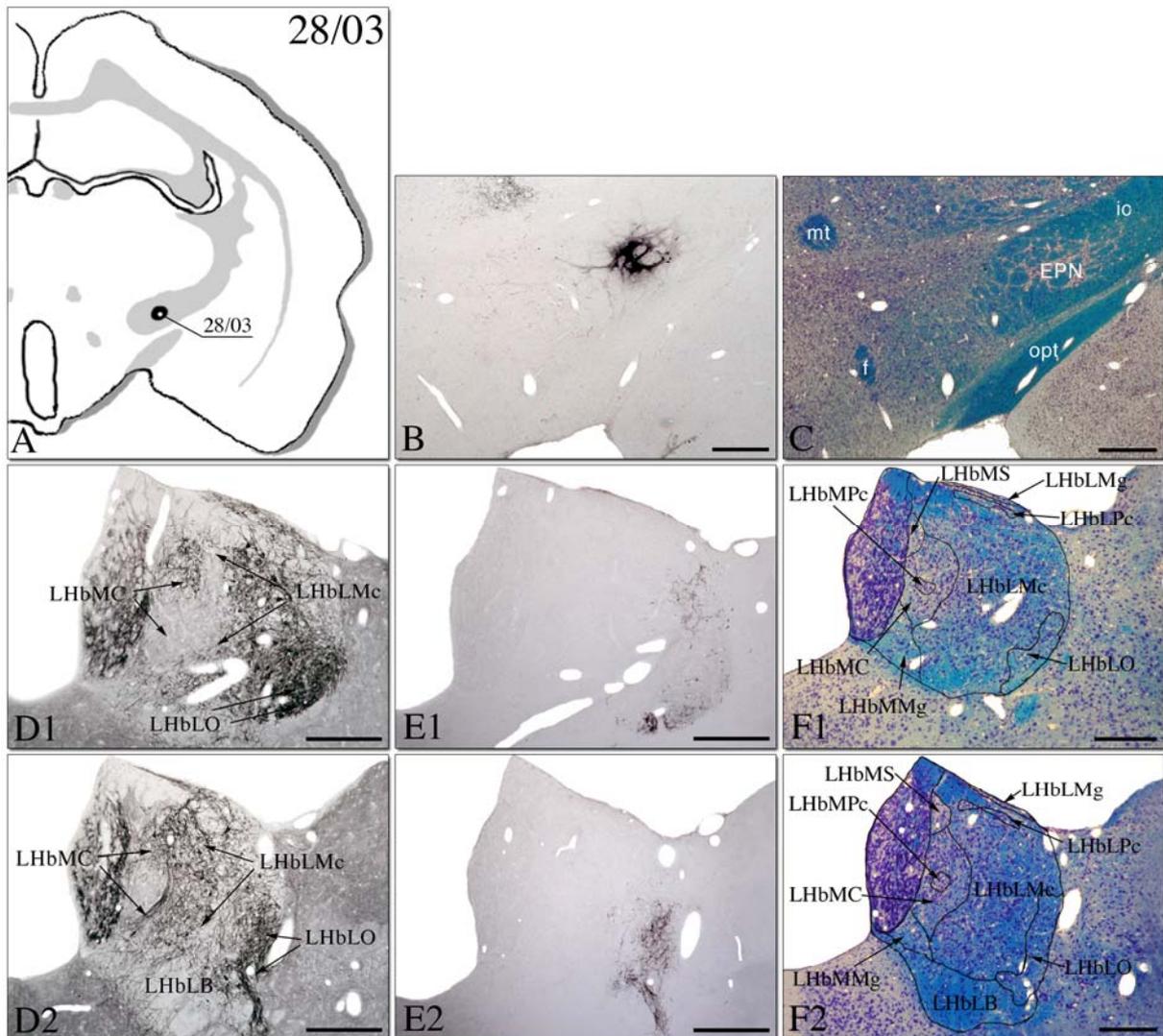


Abbildung 3.31: Nach Injektion von PhaL in den rostralen Pol des EPN (28/03; **A** bis **C**) sind Terminalen hauptsächlich im LHbLO markiert (**E1**, **E2**). Zusätzlich enden die Axone dorsolateral im LHbLMc (**E1**). Die anderen Unterkerne des LHb werden nicht vom EPN innerviert. In je zwei benachbarten Serien wurden die Chemoarchitektur mit einem Antikörper gegen die Kaliumkanaluntereinheit Kir3.2 (**D1**, **D2**) und die Zytoarchitektur in der kombinierten Zell- und Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera (**C**, **F1**, **F2**) dargestellt. Das Terminalenfeld im LHbLO korrespondiert deutlich mit Bereichen von Kir3.2-Immunoreaktivität (Vergleiche **D2** und **E2**). Die Axonendigungen im LHbLMc hingegen liegen in einem Kir3.2- negativen Areal (**D1**, **E1**). Die Skalierstriche entsprechen 600 μm in **A** und **B**, sowie 300 μm **D** bis **F**. Abkürzungen siehe Anhang.

3.3.2.5 Der Nucleus tegmentalis laterodorsalis innerviert die Unterkerne im medialen Anteil des lateralen Habenularkomplexes

Von den Applikationen in das laterodorsale Tegmentum soll das Experiment 70/02 beispielhaft detaillierter beschrieben werden. Die Injektionsstelle liegt bei Bregma -9,7 mm zentral im Nucleus tegmentalis laterodorsalis (LDTg; *Abb. 3.35, A bis C*). Die rostralen Afferenzen ziehen im dorsotegmentalen Faszikel zur VTA, schließen sich dem paraventriculären Fasersystem an und treten kaudoventral in den ipsilateralen LHb ein. Nur ein kleiner Teil der Fasern kreuzt dorsal der VTA zur Gegenseite. Die Projektionen des LDTg enden vorwiegend im LHbMC und LHbMPc (*Abb. 3.35, E1 und E2*). Einige Axonendigungen befinden sich auch medial im LHbMA, im LHbLPc, im LHbMMg und im LHbLMg, medial im LHbLMc sowie LHbLB. Im LHbMS und LHbLO sind keine Fasern anterograd markiert. Kontralateral sind Axone nur im LHbMPc nachweisbar, der MHb wird nicht innerviert.

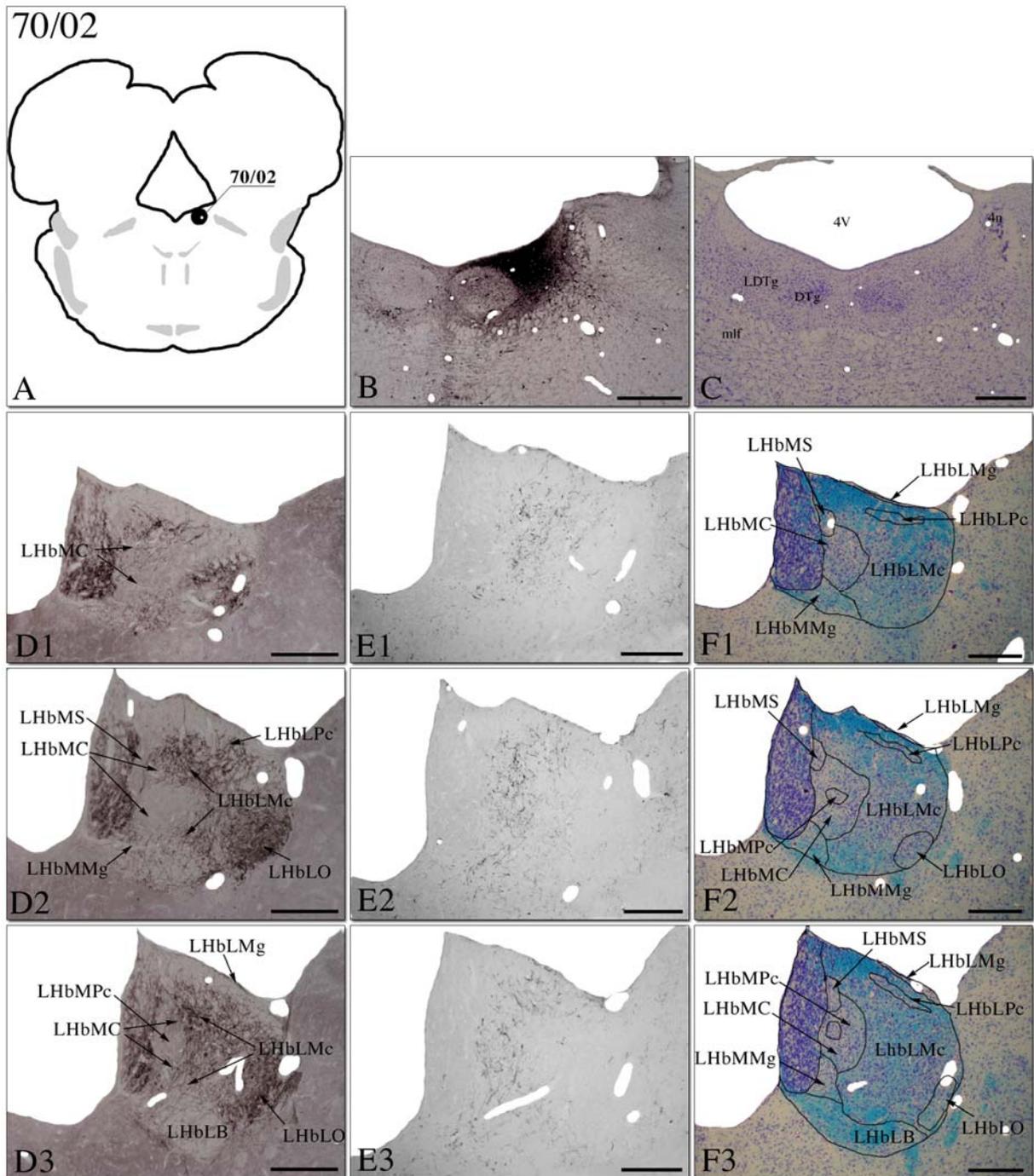


Abbildung 3.35: Nach Tracerapplikation in den Nucleus tegmentalis laterodorsalis (A und B, Vergleiche C) sind Axonterminalen mehrheitlich im LHbMC und LHbMPC anterograd markiert (E1 bis E3). Zusätzlich liegen Endigungen im LHbMMg, medial im LHbLMc und im LHbLB. In benachbarten Frontalschnitten sind die Chemoarchitektur mit einem Antikörper gegen die Kaliumkanal-Untereinheit Kir3.2 (D1 bis D3) und die Zytoarchitektur mit der Färbung nach Klüver-Barrera dargestellt (F1 bis F3). Die Skalierstriche entsprechen 500 µm in B und C, sowie 300 µm in D bis F. Abkürzungen siehe Anhang.