

## 4 Diskussion

Bei der zytoarchitektonischen Analyse des zentralen Nervensystems finden sich häufig Areale mit identischem oder sehr ähnlichem strukturellen Aufbau. Derartige Gebiete werden im Kortex allgemein als Felder (Brodmann-Areale), subkortikal als Kerne (Nuclei) bezeichnet. In Analogie dazu nennt man strukturell ähnliche Areale innerhalb von Kerngebieten Unterkerne (Subnuclei). Es ist von erheblicher Bedeutung, ob derartige Subnuclei nur als morphologische oder auch als funktionelle Baueinheiten anzusehen sind. Von funktionell relevanten Unterkernen ist zu erwarten, dass sie sich neben ihrer Struktur sowohl durch eine spezifische Chemoarchitektur als auch durch charakteristische neuronale Verbindungen auszeichnen.

Der Habenularkomplex wurde mit Hilfe von morphologischen und immunzytochemischen Kriterien in 15 Unterkerne unterteilt (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003). Der hohe Differenzierungsgrad innerhalb dieses relativ kleinen Hirnareals könnte im Zusammenhang mit der erstaunlichen Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen stehen, in die die Habenula involviert ist (*siehe Tab. 1.1*). Allerdings ist die Frage, ob die Subnuclei des Habenularkomplexes auch funktionell bedeutsam sind, im Augenblick noch offen.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung derjenigen neuronalen Verbindungen, die der laterale Habenularkomplex (LHb) aus der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region (LPOA/LHA), dem Nucleus entopeduncularis und dem Nucleus tegmentalis laterodorsalis bezieht. Die detaillierte Analyse der Projektionen zu den einzelnen Unterkernen des LHb soll die Hypothese, dass es sich nicht nur um morphologisch differenzierbare Areale, sondern auch um funktionell relevante Unterkerne handelt, überprüfen.

### 4.1 Die Rolle methodischer Aspekte bei der Analyse neuronaler Verbindungen

Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts konnten neuronale Verbindungen nur durch Markscheidenfärbungen und über Rückschlüsse aus neuronalen oder axonalen Degenerationen nach natürlichen (Infarkte) oder experimentellen Läsionen rekonstruiert werden. Mit dem aufkommenden Verständnis, dass synaptische Organellen und Proteine zumindest teilweise im Soma der zugehörigen Nervenzelle gebildet und dann

durch das Axon zur Synapse transportiert werden (anterograder axonaler Transport), war die Grundlage für die ersten Tracing-Experimente geschaffen.

Die Injektion radioaktiver Aminosäuren in ein ausgewähltes Kerngebiet führt über spezifische Aminosäure-Transporter zur Aufnahme ins Zytosol der dort lokalisierten Nervenzellen. Damit enthalten zwangsläufig alle neu synthetisierten Proteine radioaktive Aminosäuren. Wenn die so markierten Proteine nach einem der Transportdauer entsprechenden Zeitraum in der präsynaptischen Endigung angekommen sind, lassen sie sich autoradiographisch visualisieren. So ist das Zielgebiet einer neuronalen Projektion morphologisch darstellbar.

Seit den siebziger Jahren wurden weitere Substanzen entdeckt, die entweder relativ spezifisch von neuronalen Zellkörpern und deren Dendriten (Lektine oder Latexpartikel) oder eher von präsynaptischen Endigungen (Fluorogold, Beta-Untereinheit des Cholera-toxins) aufgenommen werden. Für einige dieser Stoffe ist ein bidirektionaler Transport bekannt (Meerrettichperoxidase, Dextranskonjugate, Karbozyanine). Die Tracer-Substanzen lassen sich immunzytochemisch oder durch Kopplung an bestimmte Stoffgruppen (Meerrettichperoxidase, Biotin, fluoreszierende Farbstoffe) zytochemisch oder fluoreszenzmikroskopisch nachweisen. Zusätzlich kann durch eine chemische Modifikation die bevorzugte Transportrichtung beeinflusst werden. In jüngerer Zeit wurden transsynaptische Tracer etabliert, bei denen es sich meist um neurotrophe Viren handelt.

Die Wahl der Tracer-Substanz erfolgt anhand der gewünschten (bevorzugten) Transportrichtung sowie den Applikations- und Visualisierungsmöglichkeiten. Zusätzlich sind substanzspezifische Effekte (wie das „*Fibers of Passage*“-Problem) in Betracht zu ziehen.

#### **4.1.1 Das Phänomen des „*Fibers of Passage*“, ein Problem?**

Die Grundlage des „*Fibers of Passage*“-Phänomens ist die Schädigung von Fasersystemen, die durch den Bereich der Injektionsstelle ziehen und während der Applikation verletzt werden. Dabei kann es zu einer unspezifischen Markierung von Neuronen (akzidentieller retrograder Transport) oder von Axonendigungen (anterograder Transport) kommen. Ungeachtet des optimierten Versuchsaufbaus (*siehe Kap. 3.2.2*) wurde die Bedeutung des „*Fibers of Passage*“-Problems am eigenen Material überprüft.

#### 4.1.1.1 „Fibers of Passage“ und retrogrades Tracing

Wie aus der Literatur bekannt, handelt es sich bei Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PhaL) um einen anterograden Tracer ohne „Fibers of Passage“-Problematik. Auch in der vorliegenden Untersuchung traten keine Nervenzellen auf, deren Markierung auf retrograden Transport nach Faserläsionen zurückzuführen wäre. Die Transportrichtung von Tetramethylrhodamin-gekoppeltem Dextranamin (TMR-DA) mit einem Molekulargewicht von 10.000 Dalton erfolgt bevorzugt, aber nicht ausschließlich, anterograd. Ferner sind für TMR-DA Aufnahme und anschließender Transport durch verletzte Axone bekannt. Es ist daher möglich, dass retrograd mit TMR-DA markierte Zellen auch auf der Beschädigung von Fasersystemen beruhen. Dementsprechend ist auch eine akzidentielle anterograde Markierung von Nervenendigungen nicht auszuschließen.

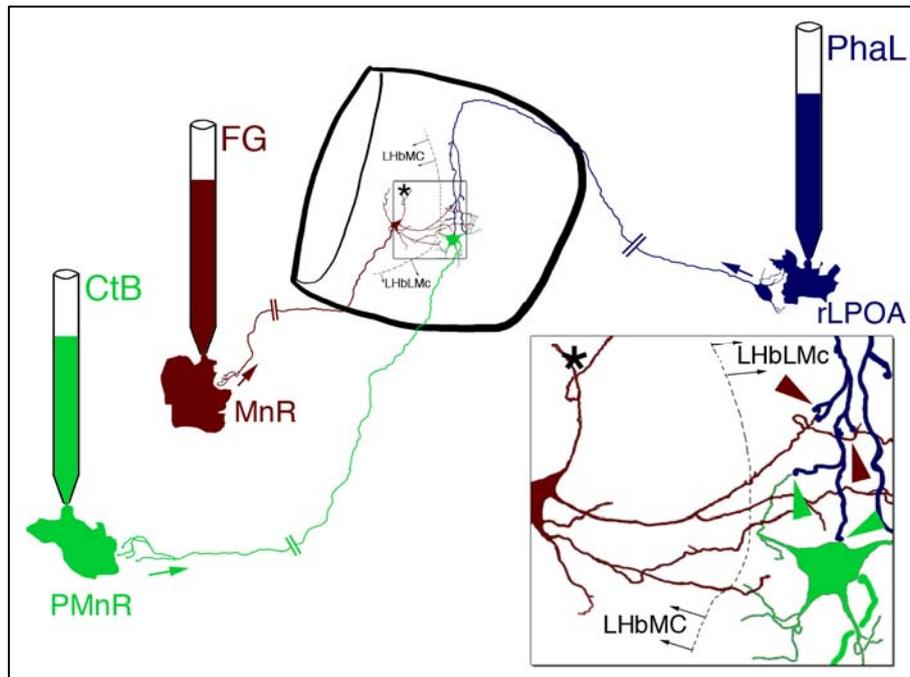
#### 4.1.1.2 „Fibers of Passage“ und anterograder Transport

Tatsächlich ist eine Unterscheidung, ob anterograd markierte Axone auf Basis des „Fibers of Passage“-Phänomens oder durch „korrektes“ Tracing dargestellt sind, nicht direkt möglich. Daher kann nur über einen Vergleich zwischen einem Tracer ohne (PhaL) und einem mit bekannter „Fibers of Passage“-Problematik (TMR-DA) das Ausmaß „falsch“ markierter Nervenendigungen beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Tracer simultan in die Area hypothalamica intermedialis injiziert (*siehe Abb. 3.12, A*). Als Ergebnis zeigten sich Axone und Terminalen nicht nur im LHb (*siehe Abb. 3.2, B und C*) sondern auch in anderen Hirnarealen an nahezu identischen Stellen. Zusätzlich waren die retrograden Zellmarkierungen konsistent mit den anterograden Daten korrelierbar (*siehe Kap. 4.1.2*). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass dem „Fibers of Passage“-Phänomen bei der Interpretation der vorliegenden Daten keine Bedeutung zukommt.

### **4.1.2 Die Ergebnisse der anterograden Tracing-Experimente sind mit den Daten aus retrograden Untersuchungen kongruent**

Durch die Kombination von anterograden und retrograden Tracing-Untersuchungen lassen sich Fehlinterpretationen vermeiden. So konnten beispielsweise anterograd nachgewiesene Projektionen aus der kaudalen Zellgruppe der LPOA zum medialen Anteil des LHb (*siehe Abb. 3.26*) durch die Markierung von Ausgangsneurone in der cLPOA nach Applikation eines retrograden Tracers in den LHbM (*siehe Abb. 3.13, A und B*) bestätigt werden. Die Ergebnisse der anterograden Untersuchungen stimmten



**Abbildung 4.1:** Nach Injektion eines anterograden Tracers (PhaL) in die rLPOA (blau) sind Terminalen im LHbLMc (Inset, blau) markiert. In diesem Unterkern liegen jedoch nicht nur dessen Neurone (Inset, grün) sondern auch Dendriten von Zellen des LHbMC (Inset, rot). Die Neurone und zugehörigen Dendriten des LHbMC bzw. LHbLMc sind durch Injektion retrograder Tracer in die mediane Raphe (MnR) oder paramediane Raphe (PMnR) darstellbar (Lehmann et al., 2003). Terminalen, die an Dendriten und Somata im LHbLMc enden (Inset, grüne Pfeilspitzen) könnten auch Dendriten innervieren, die von Zellen im LHbMC stammen (Inset, rote Pfeilspitzen). Abkürzungen siehe Anhang.

auch bei allen anderen untersuchten Hirnregionen mit den Daten aus dem retrograden Tracer überein (siehe Abb. 3.13, H bis J; 3.20), damit sind diese Verbindungen im Rahmen der Genauigkeit der verwendeten Techniken eindeutig nachgewiesen.

#### 4.1.3 Markierte Terminalen in einem Unterkern = Innervation?

Zunächst erscheint es nahe liegend, dass markierte, afferente Axone auch an den Neuronen im Zielgebiet enden. Die Identifizierung von anterograd markierten Nervenfaserverendigungen in den Unterkernen des Lhb erlaubt dennoch keine Rückschlüsse, dass die innervierten Neurone tatsächlich in den markierten Subarealen liegen, da auch Synapsen an distalen Dendriten auftreten können, deren Zellkörper möglicherweise in anderen Unterkernen liegen. Im Lhb sind Nervenzellen mit weit verzweigten Dendritenbäumen dokumentiert (Iwahori, 1977; Kim und Chang, 2005). So reichen die Dendriten einiger Neurone, die ihrer Lage nach dem LHbMC zu zuordnen sind, bis in

das Gebiet des LHbLMc. Demnach ist es also möglich, dass Projektionen, die im LHbLMc enden, zusätzlich Nervenzellen im LHbMC beeinflussen (*Abb. 4.1*).

Inwieweit Projektionen zu einem Unterkern direkt an den dortigen Neuronen enden, kann mit verschiedenen Techniken untersucht werden. Die direkte Bestätigung durch elektrische Stimulation im Ausgangsareal und Ableitung im Zielareal (als in vivo Tierversuch) ist äußerst aufwendig. Eine weitere Vorgehensweise besteht darin, einen anterograden Tracer beispielsweise in die rLPOA zu applizieren um damit Terminalen im LHbLMc zu markieren (*Abb. 4.1, PhaL*). Gleichzeitig werden Nervenzellen und deren Dendriten im LHbLMc durch Injektionen in die paramediane Raphe (*Abb. 4.1, PMnR, grün*) und im LHbMC durch Tracerapplikation in die mediane Raphe (*Abb. 4.1, MnR, rot*) retrograd dargestellt. Auf elektronenmikroskopischer Ebene wird dann untersucht, ob die aus der rLPOA anterograd markierten Terminalen im LHbLMc tatsächlich an lokalen Nervenzellen und Dendriten enden, oder eher mit distalen Dendriten von Neuronen des LHbMC Synapsen bilden.

## **4.2 Die Kenntnis der Morphologie der LPOA/LHA ist eine Voraussetzung für die Untersuchung der Projektionen zum LHb**

Die LPOA/LHA weist eine äußerst differenzierte Substruktur auf (vorliegende Arbeit; Geeraedts et al., 1990a; Geeraedts et al., 1990b), die allerdings in der Literatur der letzten Jahre häufig unberücksichtigt blieb. In den gängigen Atlanten (Paxinos und Watson, 1986; Paxinos und Watson, 1989; Swanson, 1992; Swanson, 1996) wird sie als einheitliches und nicht untergliedertes Gebiet dargestellt (*Tab. 4.1*). Dem gegenüber steht eine Serie detaillierter Untersuchungen aus den 1980er und 90er Jahren, die eine deutliche Differenzierung dieses komplexen Areals (*Tab. 4.1*) belegen konnte (Geeraedts et al., 1990a; Geeraedts et al., 1990b; Nieuwenhuys et al., 1982; Veening et al., 1982). Dem wurde in der derzeit neuesten Auflage des Swanson-Atlas (Swanson, 2004) inzwischen insofern Rechnung getragen, dass die laterale hypothalamische Region auf zytoarchitektonischer Basis in 17 individuelle Zellgruppen unterteilt wurde (*Tab. 4.1*). Jedoch stimmen die von der Swanson-Gruppe, die männliche Sprague-Dawley Ratten untersucht hatten, beschriebenen Areale weder in ihrer Position noch in der Ausdehnung mit denen der Nieuwenhuys-Gruppe überein, die jedoch mit Wistar Ratten beiderlei Geschlechtes gearbeitet hatten.

**Tabelle 4.1:** Die Struktur der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region wird in den verschiedenen Atlanten sehr unterschiedlich angegeben, auch die Nomenklatur ist nicht einheitlich.

Paxinos und Watson, 1998	Niewenhuys et al., 1982-1990	Swanson, 1992	Swanson, 2006	Kowski, 2006
LPO	LPOA LPOA1 „subareas“ LPOA2 LPOA3 LPOA5 LPOA6 LPOA4 ISM „interstitial nucleus of the stria medullaris“	LPO	LPO	LPOA <b>laterale präoptische Region</b> rLPOAvm ventromediale Zellgruppe der rostralen LPOA rLPOAv ventrale - rLPOAc zentrale - rLPOAd dorsale - rLPOAvl ventrolaterale - cLPOA kaudale Zellgruppe der LPOA
VLPO	VLPO	VLPO	VLPO	VLPO <b>Nucleus preopticus ventrolateralis</b>
MCPO	POMA „subareas“ 1-3	MCPO	MCPO	McPO <b>Nucleus preopticus magnocellularis</b>
LH	LHA	LHA	LHA	LHA <b>laterale hypothalamische Region</b>
PeF	PFX1 „subareas“ PFX2			rPFX Nucleus perifornicalis, rostraler und kaudaler Anteil cPFX
	LHN „subnuclei“ LHN1 LHN2 LHN3 LHN4 LHAD			LH Nucleus hypothalamicus lateralis LHa anteriorer Part LHi intermediärer - LHp posteriorer - LHt tuberaler - LHAad anterodorsale Zellgruppe der LHA
	LHAL		TUi tuberal nucleus; intermediate part	LHAal anterolaterale -
	LHVL1 „subareas“ LHVL2			LHAVl ventrolaterale -, mit zentralem Areal cLHAVl
				rIHA Area hypothalamica intermedialis, rostraler und kaudaler Anteil cIHA
LA „antero-dorsal hypothalamic nucleus“				IHal Nucleus hypothalamicus intermedialis anterolateralis
MCLH	TUL „lateral tuberal nucleus“		LHAm	McLH Nucleus hypothalamicus magnocellularis
			LHAjp juxtapara-ventricular region LHAs supraforfornical region LHAsfa subforfornical region, anterior zone LHAsfp subforfornical region, posterior zone LHAjvv juxtaventromedial region, ventral zone LHAjvd juxtaventromedial region, dorsal zone LHAjd juxtadorsomedial region	

Stamm- oder geschlechtsabhängige Besonderheiten könnten hierbei eine Rolle spielen. Insgesamt bestehen zurzeit weiterhin gravierende Differenzen zwischen den einzelnen Atlanten (*siehe auch Abb. 4.2*).

Die genaue Zytoarchitektur der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region erschien daher zu Beginn der vorliegenden Arbeit weiterhin unklar und erforderte eine detaillierte morphologische Analyse an unserem Tiermaterial. Als Ergebnis dieser Arbeit konnten im Bereich der präoptisch-hypothalamischen Region 20 verschiedene Zellgruppen unterschieden (*siehe Kap. 3.1 und Abb. 3.1*) und die Unterteilung der Nieuwenhuys-Gruppe im Wesentlichen bestätigt werden. Die Einteilung der Swanson-Gruppe dagegen ließ sich im Rahmen dieser Untersuchung nicht nachvollziehen. Die Bearbeitung der eigentlichen Fragestellung, nämlich die präzise Untersuchung der Projektionen aus identifizierten Zellgruppen der LPOA/LHA zum LHb war erst aufgrund dieser neuen Erkenntnisse möglich.

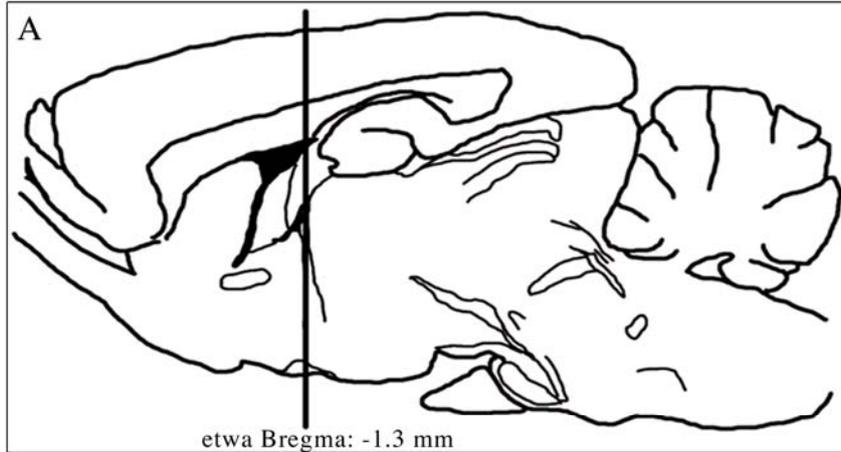
#### **4.2.1 Gibt es in der Literatur Hinweise für die Heterogenität der LPOA/LHA?**

Im ZNS ist die Verteilung zahlreicher neuroaktiver Substanzen relativ genau bekannt. Einige von ihnen kommen auch im Hypothalamus vor und grenzen zum Teil die LPOA/LHA so deutlich ab, so dass die morphologisch identifizierten Zellgruppen sich auch durch eine charakteristische Chemoarchitektur auszeichnen.

Im Nucleus perifornicalis liegen beispielsweise gehäuft Zellen, die Dynorphin B, Leu-Enkephalin, arteriales natriuretisches Peptid und Melanozyten-stimulierendes Hormon alpha (Kohler et al., 1984; Melrose und Knigge, 1988; Ruggiero et al., 1985), Somatostatin (Vincent et al., 1985), Galanin (Levin et al., 1987), Substanz P (Milner und Pickel, 1986) sowie Corticotropin releasing Faktor (Sakanaka et al., 1987) exprimieren. Die typische Chemoarchitektur dieses hypothalamischen Kerns ist jedoch in der Vergangenheit unbeachtet geblieben. Ferner entspricht eine Zellgruppe von Preproenkephalin-exprimierenden Neuronen in der LPOA/LHA etwa dem Nucleus hypothalamicus intermedialis anterolateralis (Harlan et al., 1987). In der ventralen Zellgruppe der rostralen LPOA wird mehr Substanz P als in der Umgebung exprimiert (Panula et al., 1984). Ebenso ist die VLPO mit einer Ansammlung Galanin-positiven Zellen deutlich von der Umgebung abgrenzbar (Sherin et al., 1998).

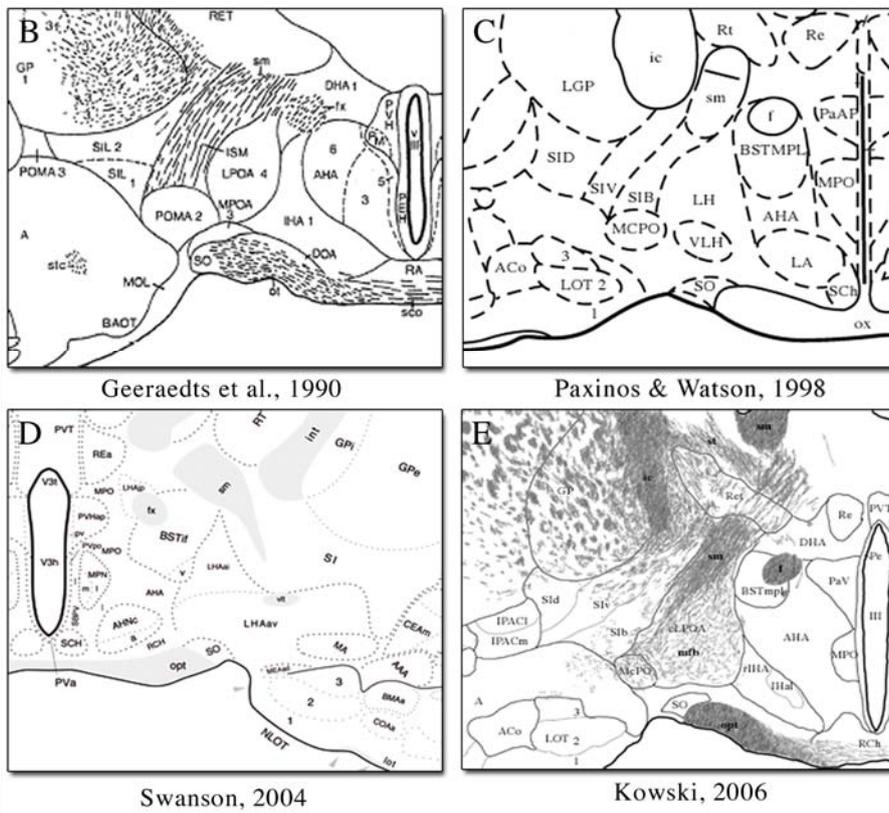
Insgesamt spricht die inhomogene Verteilung der verschiedenen neuroaktiven Substanzen deutlich gegen die weit verbreitete Annahme, dass die LPOA/LHA ein homogenes Zellkontinuum darstellt.

Paramediane Sagittalansicht auf das Gehirn einer Ratte mit



etwa Bregma: -1.3 mm

korrespondierenden Koronarschnitten



Geeraedts et al., 1990

Paxinos & Watson, 1998

Swanson, 2004

Kowski, 2006

**Abbildung 4.2:** Die schematische Darstellung des Rattenhirns in einer paramedianen Sagittalebene (A) zeigt die Lage von drei korrespondierenden koronaren Schnitte bei etwa Bregma -1.3 mm (B, C, E linke; D rechte Gehirnhälfte). Die unterschiedliche Einteilung und Nomenklatur des ventralen Zwischenhirns wird am Beispiel des Areals zwischen Fornix (f, fx), Stria medullaris (sm) und dem Tractus opticus (ot, ox, opt) deutlich. Laterale präoptisch-hypothalamische Region in B, LH/VLH; C, LPOA 4; D, LHAai/LHAav; E, cLPOA. Weitere Abkürzungen siehe Anhang.

Dagegen lassen sich die Afferenzen und Efferenzen der LPOA/LHA bisher kaum den Zellgruppen innerhalb der LPOA/LHA zuordnen. Eine Ausnahme stellen die Projektionen aus dem Nucleus incertus dar, die im lateralen Hypothalamus bevorzugt ventral des Fornix enden (Goto et al., 2001). Dieses Gebiet entspricht der Area hypothalamica intermedialis (IHA) und teilweise der Region, die von Swanson als subfornikales Areal des lateralen Hypothalamus (LHAsfa) bezeichnet wird.

Auch die Efferenzen der LHA sind nicht homogen verteilt. Nur die als „BAL“ (area **b**etween **a**nterior hypothalamic area and **l**ateral hypothalamus) bezeichnete Region (Sakanaka et al., 1982), die innerhalb der Grenzen der IHA liegt, sendet Axone zum lateralen Septum und zur parabrachialen Region (Milner und Pickel, 1986).

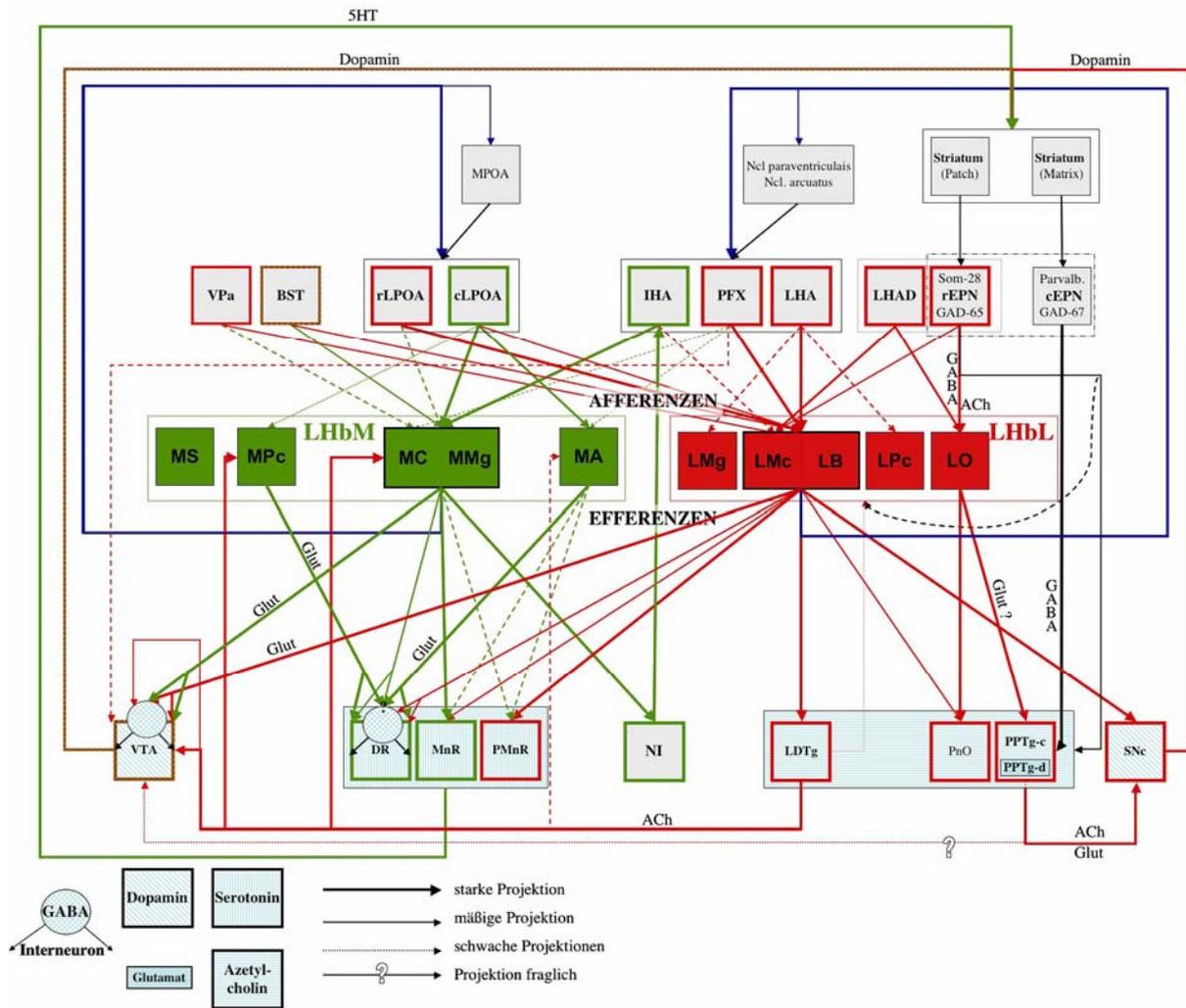
### **4.3 Der laterale Habenularkomplex, funktionelle Vielfalt und komplexe Organisation seiner Afferenzen und Efferenzen**

Die Hauptverbindungen des LHb als Gesamtstruktur sind aus früheren Tracing-Untersuchungen prinzipiell bekannt (Herkenham und Nauta, 1977; Herkenham und Nauta, 1979). Seine komplexe Organisation mit zehn Unterkernen hingegen wurde erst später verstanden (Andres et al., 1999). Ein detailliertes und auf die Unterkerne bezogenes Wissen über die afferenten und efferenten Verbindungen lag bisher nicht vor, es ist jedoch Voraussetzung für das Verständnis der komplexen Funktionen des LHb.

#### **4.3.1 Die Projektionen der präoptischen Region**

Aus der LPOA können vereinfacht zwei unterschiedliche Projektionen zum LHb identifiziert werden (*Vergleiche Kap. 3.3.2.1*). Die Afferenzen aus der rostralen Zellgruppen der LPOA enden im LHb bevorzugt im LHbLMc und LHbLB, während die kaudale Zellgruppe Axone zum LHbMA, LHbMC und LHbMMg projiziert (*siehe auch Abb. 4.3*).

Anhand der unterschiedlichen Konnektivität lässt sich damit die morphologische Unterteilung der LPOA zumindest in einen rostralen und kaudalen Anteil belegen. Unterschiede zwischen den Afferenzen der einzelnen Zellgruppen der rLPOA zum LHb lassen sich nur vage feststellen. Hierzu wären kleinere, juxtazelluläre Applikationen innerhalb der Grenzen einer Zellgruppe notwendig. Da aus der zentralen Zellgruppe der rLPOA keine Efferenzen im LHb enden (*Vergleiche Kap. 3.3.2.1.1*), ist auch offensichtlich die rLPOA nicht homogen aufgebaut.



**Abbildung 4.3** Schematische Darstellung der Verschaltung des lateralen Habenulkomplexes. Abkürzungen siehe Anhang. (Kowski et al. 2008, Lehmann et al. 2002/3 Herkenham und Nauta, 1979)

Die kombinierte Applikation von FG und PRV (Pseudorabiesvirus, als retrograder transneuraler Tracer) in den LHb ermöglichte die Identifikation von Afferenzen erster und zweiter Ordnung (Matthews-Felton et al., 1999). So wurde gezeigt, dass die mediale präoptische Region (MPOA) nicht direkt, sehr wohl aber indirekt, zum LHb projiziert. Möglicherweise beeinflusst die MPOA den LHb über ihre Verbindungen zur LPOA.

Funktionell ist die MPOA unter anderem für die Aufrechterhaltung des „slow-wave-sleep“ wichtig, während die LPOA für seine Initiation benötigt wird (Srividya et al., 2006). Mit den Projektionen der beiden Regionen zum LHb, stützen nun auch hodologische Daten die Hypothese, dass der LHb bei der Tag-Nacht-Rhythmik beteiligt ist (siehe Tab. 1.1).

Eine weitere Gemeinsamkeit ist die vermehrte zelluläre Aktivität bei Stressreaktionen. Die Immobilisation eines Versuchstiers bedingt zum Beispiel eine Erhöhung des Aktivitätsmarkers cFOS in der LPOA (Briski und Gillen, 2001) und im LHb (*Tab 1.1*). Auch hierfür könnten die Projektionen der LPOA zum LHb funktionell bedeutsam sein. Die genaue funktionelle Bedeutung der Projektionen der LPOA zum LHb bleibt aber im Augenblick noch unklar.

#### **4.3.2 Die hypothalamischen Projektionen**

Wie die MPOA projiziert auch der mediale Hypothalamus nicht direkt zum LHb. Die Efferenzen aus der lateralen hypothalamischen Region zum LHb sind wie die der LPOA sehr heterogen organisiert (*Vergleiche Kap. 3.3.2 und Abb. 4.3*). Axone aus dem rostralen Nucleus perifornicalis (rPFX) enden in der Habenula vorwiegend LHbLMc und LHbLB, die aus der Area hypothalamica intermedialis (IHA) hingegen im LHbMC, LHbMMg und LHbMA. Zellgruppen in der lateralen Zone der LHA projizieren zum LHbLMc und LHbLB. Im LHbLPc und LHbLMg enden jedoch nur Axone aus dem Nucleus hypothalamus lateralis.

Die Afferenzen der anterodorsalen Zellgruppe (LHAad) stellen insofern eine Besonderheit dar, da sie als einzige hypothalamische Projektionen im LHbLO enden. Die Projektionsmuster von LHAad und rEPN im LHb ähneln einander sehr (*Vergleiche Kap. 3.3.2.3.2 und 3.3.2.4*). Das könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass zumindest der rEPN phylogenetisch zur dorsalen Zone des Hypothalamus gehört (*siehe Kap 1.6*).

Insgesamt unterstützt die Verteilung der Terminalen aus der LHA die Hypothese von funktionell bedeutsamen Unterkernen im LHb. Gleichzeitig bestätigen die individuellen Afferenzen der LHA auch ihre heterogene Struktur.

Allgemein werden der LHA die Beeinflussung peripherer vegetativer Vorgänge, aber auch zentrale Aktivierungsmechanismen, zugeschrieben (*siehe Tab. 1.1*). Die genaue Untersuchung ist jedoch schwierig, da diese Hirnregion von den Fasern des medialen Vorderhirnbündels (mfb), einer bedeutenden Bahn des „reward“-Systems, durchzogen wird (*siehe Abb. 3.1*). Somit gestaltet sich die Interpretation von Daten aus Läsionsexperimenten oder Stimulationsversuchen besonders problematisch, da diese meist auf einer Affektion des mfb beruhen. Dennoch gibt es konkrete Hinweise auf eine Beteiligung der LHA bei Aufmerksamkeitsverhalten, Schmerzverarbeitung und bei der Regulation der Nahrungsaufnahme, Funktionen, an denen auch der LHb beteiligt ist (*siehe Tab. 1.1*).

So führen Läsionsexperimente bei Ratten, die mit der Zerstörung von Neuronen in der LHA einhergehen, zu Aphagie und deutlichem Gewichtsverlust (Stricker et al., 1978). Dagegen wird eine Steigerung der Futterraufnahme nach intraventrikulärer Injektion von Orexin A, nicht jedoch Orexin B erreicht (Haynes et al., 1999; Qu et al., 1996; Sakurai, 1999). Beide Neuropeptide wurden in der LHA nachgewiesen (Nambu et al., 1999), und konzentrieren sich im rostralen Anteil des Nucleus perifornicalis, im intermediären Anteil des LH aber auch in der Area hypothalamica dorsalis (*siehe Abb. 3.10*). Im LHbMC, weniger im LHbLMc gibt es Orexin A-positive Axone, während Orexin B-Fasern kaum in der Habenula zu finden sind (eigene Beobachtungen). Für die Orexine sind zwei Rezeptoren bekannt, der Orexin-1 und -2 Rezeptor (OxR1, OxR2). OxR1 zeigt eine relative Selektivität für Orexin A, bindet aber auch die B-Variante. Am OxR2 binden beide Orexine. Im LHb wird nur der OxR2 exprimiert, der mit der Narkolepsie in Zusammenhang gebracht wird (Marcus et al., 2001).

Auch das Hectapeptid Nozizeptin (Orphanin FQ) hat einen bedeutsamen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme (Olszewski et al., 2000; Pomonis et al., 1996). Dieses Neuropeptid ist endogener Ligand für den Opioid-artigen Rezeptor ORL1, dessen mRNA im LHb exprimiert wird (Neal et al., 1999). Nach intraventrikulärer Gabe von Nozizeptin steigt die cFOS-Expression im medialen Anteil des LHb. Dieses Areal ähnelt in Position und Größe dem Gebiet von LHbMPc und LHbMC. Unklar ist, ob die erhöhte Aktivität im LHbMPc/LHbMC in direktem Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme steht oder möglicherweise auch durch andere Effekte (erhöhte Aufmerksamkeit, Aktivierung des Belohnungssystems) verursacht werden kann.

#### **4.3.3 Die Axone des Nucleus entopeduncularis enden vorwiegend im LHbLO**

Die Afferenzen und Efferenzen des Nucleus entopeduncularis sind gut bekannt. Retrograde Untersuchungen zeigen, dass ausschließlich der vordere Anteil des EPN (rEPN) zum LHb projiziert (Herkenham und Nauta, 1977; van der Kooy und Carter, 1981). Der rEPN seinerseits wird vom Patch-Kompartiment des Striatums innerviert. Dieses erhält vorwiegend Afferenzen von limbischen Hirnstrukturen, unter anderem aus dem präfrontalen Kortex und dem basolateralen Kern der Amygdala (Ragsdale und Graybiel, 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Afferenzen unter Berücksichtigung der Substruktur des LHb untersucht. Axone aus dem rEPN enden im LHb in einem Areal, das sich durch eine intensive Immunoreaktivität für die Kir3.2 Kaliumkanal-Untereinheit auszeichnet (*Vergleiche Kap. 3.3.2.4*). Dieses Areal entspricht dem LHbLO (*siehe Abb.*

3.36, *D und E*). Zusätzlich enden Terminalen in einem umschriebenen Bereich dorsolateral im LHbLMc.

Funktionell wurde der pedunkulo-habenularen Verbindung zunächst eine direkte Kontrolle des serotoninergeren Systems der dorsalen Raphe (DR) zugeschrieben (Rajakumar et al., 1994; Yuan et al., 1997). Inzwischen ist dies unwahrscheinlich, da sich nach Injektionen retrograder Tracer an verschiedenen Positionen innerhalb der DR keine Neurone im LHbLO nachweisen lassen (eigene Beobachtungen). Ein Einfluss der pedunkulo-habenularen Projektionen auf das serotoninerge System der DR wäre daher nur mit der Zwischenschaltung von weiteren Neuronen erklärbar.

Dagegen enden Efferenzen des LHbLO im Nucleus tegmentalis pedunculopontinus, PPTg (eigene Beobachtungen; Lehmann et al., 2003). Dieser Kern erhält somit nicht nur direkte Afferenzen aus dem kaudalen Anteil des EPN, sondern auch indirekte aus dem rEPN über den LHb (*siehe Abb. 4.3*).

Die cholinergen und glutamatergen Zellen im PPTg aktivieren dopaminerge Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und damit das nigrostriatale Projektionssystem (Blaha et al., 1996; Chen et al., 2006). Eine Verbindung zur VTA wird ebenfalls diskutiert (Winn, 2006). Möglicherweise beeinflusst der LHbLO über seine Efferenzen zum PPTg die Dopaminausschüttung der SNc im Striatum und integriert so Informationen aus dem limbischen in das motorische System.

#### **4.3.4 Die Projektionen des Nucleus tegmentalis laterodorsalis**

In Analogie zur Rolle des PPTg im nigrostriatalen System ist der Nucleus tegmentalis laterodorsalis (LDTg) mit seinen cholinergen und glutamatergen Zellen für die Funktion des mesolimbischen Systems von entscheidender Bedeutung.

Im Nucleus accumbens (Acc) erhöht sich die Dopaminkonzentration nach Aktivierung nikotinerger, muskarinerger aber auch ionotroper Glutamat-Rezeptoren in der VTA, ebenso wie nach elektrischer Stimulation im LDTg (Forster und Blaha, 2000; Karreman et al., 1996). Der pharmakologische Effekt der vermehrten Dopaminausschüttung im Acc durch Neostigmin-Applikation in die VTA kann durch zytotoxische Läsionen des LDTg, nicht aber durch die des PPTg, abgeschwächt werden (Blaha et al., 1996). Die cholinergen Projektionen des LDTg zur VTA sind für die Vermittlung Dopamin-abhängiger Verhaltensweisen (Lokomotion, Belohnungsverhalten) von entscheidender Bedeutung. Die VTA wird aber auch vom LHb(MC) massiv beeinflusst (*siehe Kap. 4.3.5*). Da die Projektionen aus dem LDTg in der Habenula im LHbMC und LHbMPc

enden, steuert der LDTg möglicherweise über den LHbMC die VTA, über den LHbMPc jedoch die dorsale Raphe (*siehe Kap. 4.3.5 und Abb. 4.3*).

#### **4.3.5 Die Efferenzen der habenulären Unterkerne zu den Mittelhirnkernen sind individuell organisiert**

Retrograde Tracing-Untersuchungen mit FG oder CtB zeigen, dass die paramediane Raphe vorwiegend vom LHbLMc, die mediane Raphe dagegen vom LHbMMg/MC innerviert wird (Lehmann et al., 2003). Demgegenüber stammen die Efferenzen der Habenula zur dorsalen Raphe größtenteils aus dem LHbMC/MPc (Lehmann et al., 2002). Die serotoninergeren und nicht-serotoninergeren Raphe-Neurone werden vom LHb durch Glutamat, wahrscheinlich über Interneurone, gesteuert (Behzadi et al., 1990; Kalen et al., 1989), sodass sich die striatale Serotoninausschüttung durch eine erhöhte Aktivität der Habenula verringert (Kalen et al., 1989). Die individuellen Projektionen des LHb zu den Raphe-Kernen (*siehe Abb. 4.3*) unterstützen nicht nur das Konzept der Unterkerne des LHb sondern bestätigen auch die Existenz von mindestens zwei separaten aufsteigenden serotoninergeren Systemen aus der dorsalen und der medianen Raphe. Die genaue Bedeutung des LHb in diesem Regelkreis und bei der Pathophysiologie neuropsychiatrischer Erkrankungen bedarf noch weiterer Klärung.

Besonders wichtig sind die Projektionen vom LHb zur VTA (*siehe Abb. 3.4*), die im LHbMC/MPc und LHbLMc entspringen (eigene Beobachtungen). Die VTA ist die zentrale Schaltstation des Reward-Systems (Geisler und Zahm, 2005). Hier liegen die dopaminergen Neurone, die über ihre Endigungen die extrazelluläre Konzentration von Dopamin im Nucleus accumbens (Acc) bestimmen (mesolimbisches System). Die Dopaminkonzentration korreliert direkt mit dem intensiven Wohlgefühl, das ein Individuum nach einer erfolgreichen Verhaltensstrategie erlebt, und das den zentralen Mechanismus des Reward-Systems darstellt.

Dabei kommt die Information über das positive Ergebnis eines Verhaltens vermutlich direkt vom präfrontalen Kortex. Im negativen Fall dagegen ist wohl der LHb für die Blockade der Dopamin-Freisetzung im Acc entscheidend. Dementsprechend hemmt die elektrische Stimulation des LHb bei Ratten die Aktivität der dopaminergen Neurone in der VTA (Christoph et al., 1986; McCulloch et al., 1980) und führt bei 80-90% zu einem kompletten Verlust ihrer Spontanaktivität (Ji und Shepard, 2005; Shepard et al., 2006). Mit welchem Transmitter der LHb die Aktivität VTA beeinflusst, ist bisher nicht genau bekannt. Vermutlich enden glutamaterge Projektionen aus dem LHb an GABAergen

Interneuronen in der VTA (Brinschwitz et al., 2005) und führen so zur Inhibierung der dopaminergen Neurone.

Diese Vorstellung wird auch durch die funktionelle Bildgebung gestützt. Bei Probanden führt das Ausbleiben von erwarteten Belohnungsreizen tatsächlich zu einer erhöhten Aktivität im LHb (Ullsperger und von Cramon, 2003). Inwieweit die Nervenzellen des LHb, die die Aktivität der VTA regulieren, auch durch Projektionen aus dem LDTg (*siehe Kap. 4.3.3*) aktiviert werden, kann im Augenblick noch nicht abschließend beurteilt werden.

#### **4.4 Die hodologischen Daten sprechen für eine funktionelle Bedeutung der Unterkerne des LHb**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, wie die verschiedenen Projektionen der lateralen präoptisch-hypothalamischen Region zum lateralen Habenularkomplex im Einzelnen organisiert sind. Im Zentrum des Interesses stand dabei die Frage, ob die morphologisch identifizierten Unterkerne auch durch unterschiedliche Afferenzen charakterisiert sind.

Bei isolierter Betrachtung der Afferenzen aus der medialen und lateralen Zone der LHA zum LHb scheint ein Innervationsmuster entsprechend einer topographischen Organisation im LHb mit einem medio-lateralen Gradienten vorzuliegen. Das entspricht der Vorstellung von Neuronenverbindungen, die parallel durch den LHb ziehen (*siehe Kap. 1.4; Modell A, Abb. 1.3, A*). Eine solche Organisation der Projektionen erscheint, bei der komplexen Struktur der LPOA/LHA mit mehreren unterscheidbaren Zellgruppen, wenig plausibel.

Anhaltspunkte für eine funktionelle Bedeutung der Unterkerne des LHb liefern,

- 1) Afferenzen aus LPOA, LHA, EPN, LDTg, die sich den einzelnen Unterkernen im LHb zuordnen lassen (*siehe Kap. 3.3*),
- 2) Unterkerne wie der LHbMS, die keine Afferenzen aus den hier untersuchten Regionen erhalten,
- 3) der LHbLO, in dem nur Projektionen aus bestimmten Arealen (EPN, LHAad) enden,
- 4) die Efferenzen des LHb zum Mittelhirn (DR, MnR, PMnR, PPT, PnO, VTA; *siehe auch Kap. 4.3.5*), die eine unterkernabhängige Organisation erkennen lassen, und
- 5) Aktivitätsmarker (wie cFos oder Zytochromoxidase), deren Verteilung bei ausgewählten biologischen Funktionen und Verhaltensweisen auf einzelne Unterkerne im LHb beschränkt ist (*siehe Tab. 1.1*).

Die klare Beziehung von Afferenzen und Efferenzen zu einzelnen Subarealen im LHb spricht für den komplexen Aufbau des LHb in zehn Unterkerne, jedoch gegen das Modell B (siehe *Abb. 1.3, B*) und deutlich für das dritte vorgeschlagene Modell (siehe *Abb. 1.3, C*). Die Hypothese, dass es sich bei den morphologisch identifizierten Subarealen des LHb tatsächlich um funktionelle Unterkerne handelt, wird somit auch hodologisch unterstützt.

## 4.5 Zusammenfassung

Der laterale Habenularkomplex (LHb) ist eine phylogenetisch alte Struktur im dorsalen Dienzephalon aller Wirbeltiere. In den vergangenen Jahren wurde viel über seine funktionelle Bedeutung spekuliert. Der LHb soll eine entscheidende Rolle bei biologischen Funktionen wie Aufmerksamkeit, Schmerzverarbeitung, Nahrungsaufnahme und Sexualverhalten spielen, ihm wird aber auch eine Beeinflussung des Belohnungssystems („reward“) zugeschrieben (siehe *Tab. 1.1*). Wie der LHb eine solche Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen bewältigen kann, ist bisher ungeklärt.

Erste Hinweise ergaben sich aus der komplexen morphologischen Struktur des LHb mit zehn Unterkernen bei Ratten (Andres et al., 1999). Die neuronale Verschaltung dieser Unterkerne war bislang unbekannt.

Der LHb erhält Projektionen aus dem dorsolateralen Tegmentum (LDTg) und dem Nucleus entopeduncularis (EPN), dem Nagetieräquivalent des internen Pallidumsegments. Die laterale präoptisch-hypothalamische Region (LPOA/LHA), eine weitere wichtige Quelle für Afferenzen der Habenula, wurde in der Literatur als homogenes Zellkontinuum entlang des medialen Vorderhirnbündels beschrieben. Die vorliegende Arbeit bestätigte zunächst, dass die LPOA/LHA eine komplex strukturierte Hirnregion mit 20 morphologisch unterscheidbaren Zellgruppen ist, die sich durch charakteristische Afferenzen und Efferenzen auszeichnen.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob die Unterkerne des LHb spezifische Projektionen aus diesen Regionen erhalten. Die Verbindungen von den Zellgruppen der LPOA/LHA, dem LDTg und dem EPN zu den Unterkernen des LHb bei Ratten wurden daher im Detail untersucht.

Efferenzen aus den rostralen Zellgruppen der LPOA, der lateralen Zone der LHA und des Nucleus perifornicalis enden im magnozellularen (LHbLMc) und basalen (LHbLB) Unterkern des lateralen Anteils des LHb (LHbL). Die Projektionen aus der kaudalen

Zellgruppe der LPOA und aus der medialen Zone der LHA hingegen sind vorwiegend auf den anterioren (LHbMA), zentralen (LHbMC) and marginalen (LHbMMg) Unterkern des medialen Anteils des LHb (LHbM) beschränkt. Die Fasern aus dem LDTg terminieren im LHbMC und LHbMMg aber auch im parvozellulären Unterkern des LHbM. Demgegenüber beschränkt sich der Eingang aus dem EPN auf den ovalen Unterkern des LHbL und auf einen kleinen Bereich im dorsolateralen LHbLMc. Den superioren Unterkern des LHbM erreichen keine Afferenzen aus den untersuchten Hirnregionen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Afferenzen aus der lateralen präoptisch-hypthalamischen Region, dem Nucleus entopeduncularis und dem Nucleus tegmentalis laterodorsalis im lateralen Habenularkomplex nicht zufällig verteilt , sondern mit deutlichem Bezug zu einzelnen Unterkernen enden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der LHb eine Relaisstation innerhalb verschiedenen Aufgaben dienenden Neuronenkreise darstellt und die einzelnen Unterkerne unterschiedliche Funktionen wahrnehmen.