

Aus dem Centrum für Anatomie, Institut für Integrative Neuroanatomie,
Abteilung Elektronenmikroskopie und Molekulare Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die laterale Habenula -

Unterkernspezifische Projektionen zur Dorsalen Raphe

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Schneider

aus Jena

Datum der Promotion: 14.02.2014

Abstract (deutsch)

Hintergrund: Der laterale Habenularkomplex (LHb) ist Teil des Rewardsystems und damit für die Steuerung einer Vielzahl von Verhaltensweisen mitverantwortlich. Er ist mit allen wichtigen neuronalen Meß- und Steuerzentren der körpereigenen Homöostase wie dem Hypothalamus und verschiedenen Hirnstammkernen verbunden. Im LHb lassen sich morphologisch zehn Unterkerne abgrenzen.

Methoden: Mittels neuronaler Tract-Tracing-Versuche im Rattenhirn sollte hier die Frage geklärt werden, ob die Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zur Dorsalen Raphe eher diffus in beiden Hirnstrukturen verteilt oder unterkernspezifisch organisiert sind. Diese Daten wurden mit den Ergebnissen anderer Studien zu den hypothalamischen und preoptischen Afferenzen zum lateralen Habenularkomplex verglichen.

Ergebnisse: Auch die DR ist heterogen aufgebaut. Nach lichtmikroskopischen Kriterien lassen sich zehn Subareale mit unterschiedlicher Zellmorphologie sowie unterschiedlicher Expression von Neurotransmittern und Neuromodulatoren unterscheiden.

Die Axone aus dem lateralen (LHbL) und dem medialen (LHbM) Anteil des LHb enden in verschiedenen Arealen der DR. Axone aus dem LHbL enden in der ventrolateralen DR sowie im intermediomedianen Bereich der DR. Axone aus dem LHbM finden sich hingegen fast in der gesamten DR mit Schwerpunkt auf den kaudalen und dorsolateralen Anteilen.

Die retrograden Studien zeigen, dass nicht alle Unterkerne des LHb in gleichem Ausmaß zur DR projizieren. Insgesamt stammen die meisten Neurone aus dem zentralen, dem parvozellulären, und dem anterioren Unterkern des LHbM sowie dem magnozollulären Unterkern des LHbL, wobei diese in unterschiedlichem Ausmaß in die einzelnen Subareale der DR projizieren. Verhältnismäßig viele Projektionen stammen auch aus dem marginalen Unterkern des LHbM, weniger aus dem superioren und dem basalen, sehr wenige aus dem ovalen Unterkern. Im parvozellulären und marginalem Unterkern des LHbL ließen sich nur vereinzelt retrograd markierte Neurone nachweisen.

Schlussfolgerung: Sowohl die hodologischen Daten dieser Arbeit als auch die bekannten Daten zu den Afferenzen vom Hypothalamus und der preoptischen Region zeigen, dass die Projektionen des LHb unterkernspezifisch organisiert sind. Auch die Tatsache, dass die Subareale des LHb mit unterschiedlicher Sensitivität auf dopaminerge Stimula-

tion reagieren, legt eine funktionelle Bedeutung der Unterkerne nahe. Die Analyse der hodologischen Daten unter Beachtung der spezifischen Verteilung bestimmter Neurotransmitter und Neuromodulatoren in den einzelnen Subarealen erlaubt Rückschlüssen auf verschiedene Funktionskreise in den einzelnen Hirngebieten und deren mögliche gezielte Beeinflussbarkeit. Derartige Daten bilden einen Teil der Grundlage auf deren Basis die Entwicklung neuer, nebenwirkungsärmerer Pharmaka oder niedrigdosierter Pharmakakombinationen zur Anxiolyse oder Therapie von Depressionen und Abhängigkeit vorangetrieben werden kann.

Schlagwörter: Habenula, Dorsale Raphe, Subnuclei, Tract Tracing, Belohnungssystem

Abstract (english)

Background: The habenula is part of the brain reward system and modulates many biological behaviours. It is connected with the hypothalamus and several brain stem nuclei and serves as a relay between reward system and homeostatic systems. Ten subnuclei can be distinguished in the lateral habenular complex (LHb) by light microscopical criteria.

Methods: Neuronal tract tracing studies aimed to clarify the distribution of habenular efferents to the dorsal raphe nucleus (DR) considering their subnuclear organisation. These data were compared with results from studies of diencephalic afferents to the LHb.

Results: Axons from the lateral (LHbL) and the medial (LHbM) part of the LHb terminate in different areas of the DR. These areas differ in neuronal morphology and content of neuromarkers. Not all subnuclei of LHb similarly contribute to the efferents to the DR. Most projection neurons reside in the central, the parvocellular and the anterior subnucleus of the LHbM. Their axons terminate in individual areas of the DR. Many projections originate in the marginal subnucleus of the LHbM, less in the superior or basal subnucleus and very few in the oval subnucleus. The parvocellular and the marginal subnucleus of the LHbL only send scarce projections to the DR.

Conclusions: The results of this study as well as those of the hypothalamic afferents prove that the projections of the LHb show a subnuclear pattern. The subnuclei of the LHb possess different sensitivities to dopaminergic stimulation as demonstrated in recent studies. Hence a functional importance of those subnuclei is likely. In summary the combined analysis of the present hodological data considering the subnuclear organisation and specific distribution of neurotransmitters and neuromodulators may provide a more specific view on neuronal loops, their possible functions and interactions. Such data will help in the development of novel drugs for anxiolysis or treatment of depression and dependence.

Keywords: habenula, dorsal raphe nucleus, tract tracing, reward

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	11
1.1	Das Rewardsystem steuert unser Verhalten	11
1.2	Neuroanatomische Korrelate des Rewardsystems	11
1.2.1	Das dopaminerge System als Übermittler hedonistischer Emotionen	12
1.2.2	Der laterale Habenularkomplex vermittelt negativen Reward durch Inhibition dopaminergener Neurone	13
1.2.3	Der Einfluss des serotoninergen Systems auf Rewardmechanismen	14
1.2.4	Der Einfluss des lateralen Habenularkomplexes auf das serotoninerge System ist nicht abschließend geklärt	15
1.3	Funktionelle und anatomische Verbindungen zwischen dem lateralen Habenularkomplex und dem serotoninergen System	15
1.4	Anatomie und Phylogenese der Habenula	18
1.5	Afferenzen und Efferenzen des lateralen und medialen Habenularkomplexes	21
1.6	Das serotoninerge System	23
1.6.1	Nomenklatur des serotoninergen Systems	23
1.6.2	Anatomie und Lage der Dorsalen Raphe	23
1.6.3	Projektionen der Dorsalen Raphe	24
1.7	Fragestellung der Arbeit	25
2.	Material und Methoden	28
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	28
2.2	Substanzen	28
2.3	Tracing-Experiment	29
2.3.1	Tracer-Injektion	29

2.3.2	Herstellung der Mikropipetten	30
2.3.3	Anterogrades Tracing	30
2.3.4	Retrogrades Tracing	30
2.3.5	Gewebefixation	31
2.3.6	Entnahme der Gehirne, Kryoprotektion und Sektionierung	32
2.4	Immunhistochemische Darstellung der Tracer, Neurorezeptoren und Transmitter	33
2.4.1	Vorbehandlung	34
2.4.2	Auftragen der Erstantikörper	35
2.4.3	Auftragen der Zweitantikörper	35
2.4.4	Visualisierung mittels der Elite-ABC-Methode	35
2.5	Beschichtung der Objektträger	36
2.6	Referenzfärbungen	36
2.6.1	Kresylviolett-Färbung	38
2.6.2	Klüver-Barrera-Färbung	38
2.7	Dokumentation und Auswertung	39
2.7.1	Lichtmikroskopie, graphische und photographische Dokumentation und Bildverarbeitung	39
2.7.2	statistische Betrachtungen und Auswertung	39
3.	Ergebnisse	46
3.1	Die Morphologie und Zytoarchitektur der Dorsalen Raphe	46
3.1.1	In der Dorsalen Raphe lassen sich zehn Subareale morphologisch abgrenzen	47
3.1.1.1	<i>Der rostrale Unterkern der Dorsalen Raphe</i>	47
3.1.1.2	<i>Der interfaszikuläre Unterkern der DR</i>	48
3.1.1.3	<i>Der ventromediale Unterkern der DR</i>	50

3.1.1.4	<i>Der ventromediane Unterkern der DR</i>	51
3.1.1.5	<i>Der intermediomediane Unterkern der DR</i>	52
3.1.1.6	<i>Der dorsomediane Unterkern der DR</i>	53
3.1.1.7	<i>Der dorsolaterale Unterkern der DR</i>	54
3.1.1.8	<i>Der intermediolaterale Unterkern der DR</i>	55
3.1.1.9	<i>Der ventrolaterale Unterkern der DR</i>	56
3.1.1.10	<i>Der caudale Unterkern der Dorsalen Raphe</i>	57
3.2	Darstellung der Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zum Mesencephalon mittels anterogradem Tract-Tracing	64
3.2.1	Die Projektionen des medialen Anteils des lateralen Habenularkomplexes (LHbM) zum Tegmentum mesencephali	65
3.2.2	Die Projektionen des lateralen Anteils des lateralen Habenularkomplexes (LHbL) zum Tegmentum mesencephali	66
3.3	Darstellung der Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zur Dorsalen Raphe mittels retrograden Tract-Tracing	71
3.3.1	Injektionen in die rostrale Zone der Dorsalen Raphe	71
3.3.2	Injektionen in die kaudale Zone der Dorsalen Raphe	73
3.3.3	Injektionen in die Zentrale Zone der Dorsalen Raphe	74
3.3.3.1	<i>Der Dorsomediane Unterkern der DR als Hauptinjektionsort</i>	74
3.3.3.2	<i>Der Intermediomediane Unterkern der DR als Hauptinjektionsort</i>	76
3.3.3.3	<i>Der Ventromediane und Ventromediale Unterkern der DR als Hauptinjektionsorte</i>	77
3.3.4	Injektionen in die laterale Dorsale Raphe	80
3.3.5	Kontrolluntersuchungen	82
3.3.6	Zusammenfassung der Retrograden Ergebnisse	83

4.	Diskussion	95
4.1	Methodologische Aspekte bei der Analyse von Projektionssystemen mittels Tract-Tracing	95
4.1.1	Vor- und Nachteile der verwendeten Tracing-Methoden	96
	<i>4.1.1.1 Das Problem der fibers of passage</i>	97
4.2	Interpretation der Ergebnisse – Inhaltliche Überlegungen	99
4.3	Die Interpretation der Tracing-Ergebnisse erfordert eine detaillierte Kenntnis der Dorsalen Raphe	99
4.3.1	Die Dorsale Raphe ist heterogen aufgebaut	100
4.3.2	Die Projektionen der DR sind topographisch geordnet	103
4.3.3	Kombinierte Analysen ermöglichen Rückschlüsse auf lokale Funktionskreise in der Dorsalen Raphe	105
4.4	Die Organisation der Efferenzen des LHb	108
4.4.1	Der LHbM und der LHbL projizieren in unterschiedliche Kerngebiete des Mesencephalons	108
4.4.2	LHbM und LHbL projizieren zu unterschiedlichen Gebieten in der DR	110
4.4.3	Unterkernspezifische Projektionen des lateralen Habenularkomplexes	111
	<i>4.4.3.1 Nicht alle Unterkerne des lateralen Habenularkomplexes projizieren im gleichen Umfang zur Dorsalen Raphe</i>	111
	<i>4.4.3.2 Unterkernspezifische Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zu andern Raphe-Kernen</i>	113
	<i>4.4.3.3 Unterkernspezifische Projektionen der hypothalamischen und preoptische Gebiete zum lateralen Habenularkomplex</i>	113
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse und Beantwortung der Fragestellung	114
4.6	Ausblick	116

5.	Abkürzungsverzeichnis	122
6.	Abbildungsverzeichnis	126
7.	Tabellenverzeichnis	128
8.	Literaturverzeichnis	129
9.	Publikationen	143
10.	Danksagung	144
11.	Eidesstattliche Erklärung	145
12.	Lebenslauf	146

1. Einleitung

1.1 Das Rewardsystem steuert unser Verhalten

Das Verhalten von Lebewesen ist darauf ausgerichtet, sowohl das Überleben des Individuums, als auch das Fortbestehen der eigenen Art durch die Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase und die Weitergabe von Erbmaterial zu sichern. Im Laufe der Evolution haben sich immer komplexere Mechanismen entwickelt, um das Verhalten von Lebewesen sinnvoll zu steuern und den Fortbestand der Art zu garantieren. Schmerzhaft oder potenziell bedrohliche Sinnesreize lösen als Warnzeichen drohender Eigenverletzung verschiedene Schutzreflexe aus, welche immer nach den gleichen Antwortmechanismen ablaufen. Beispielsweise führt die Berührung der Cornea durch einen Luftstoß oder einen Fremdkörper unmittelbar zum unwillkürlichen Schließen der Augen. Die meisten unserer Verhaltensweisen sind jedoch komplexer und lassen sich nicht über einfache Reflexbögen erklären. Das hatte schon Jeremy Bentham (englischer Philosoph und Sozialreformer, 1748 bis 1832) Ende des 17. Jahrhunderts erfasst, als er in seinem Werk „Principles of Morals and Legislation“ schrieb:

„Nature has placed mankind under the governance of two sovereign masters, pain and pleasure. It is for them alone to point out what we ought to do, as well as to determine what we shall do“.

Tatsächlich ist das Rewardsystem des Gehirns, welches für das Empfinden von Lust und Belohnung verantwortlich ist, einer der wichtigsten Verhaltensmotoren. Biologisch sinnvolle Verhaltensweisen wie Essen, Trinken oder sexuelle Fortpflanzung werden mit dem Empfinden angenehmer Emotionen „belohnt“ und deshalb wenn möglich wiederholt. Reward ist somit die Grundlage für motiviertes oder appetitives Lernen, aber auch für das Entstehen von Sucht und Abhängigkeit.

1.2 Neuroanatomische Korrelate des Rewardsystems

Während die subkortikalen neuronalen Bestandteile und Mechanismen des Rewardsystems bereits recht gut untersucht wurden, sind die kortikalen Komponenten bisher weniger gut verstanden und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

1.2.1 Das dopaminerge System als Übermittler hedonistischer Emotionen

Die Aktivierung des dopaminergen Systems spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Belohnungsgefühlen. Die dopaminergen Neurone der Area tegmentalis ventralis (VTA) und der Substantia nigra (SN) des Mittelhirns werden durch (unerwartete) primäre Belohnung (z.B. Futter/Essen) oder das Auftreten eines konditionierten Reizes, welcher eine Belohnung ankündigt, aktiviert (Abrams, et al., 2004; Elliott, et al., 2000; Ljungberg, et al., 1992; Schultz, 1997; Schultz, 1998; Schultz, et al., 1993; Schultz, et al., 1993; Schultz, et al., 1992). Ihre Axone ziehen über das mediane Vorderhirnbündel (medial forebrain bundle, mfb; Fasciculus telencephalicus medialis) zum Nucleus accumbens (Acb) und führen dort zu einer erhöhten Dopaminausschüttung (Elliott, et al., 2000; Schultz, 1997; Schultz, et al., 1993; Stern and Passingham, 1996; Wise, 1980). Die ascendierenden dopaminergen Fasern aus der VTA zum Nucleus accumbens, der Amygdala, den Septumkernen, dem entorhinalen Cortex, dem cingulären Cortex oder dem frontalen Cortex werden auch als mesocortikale und mesolimbische Projektionen bezeichnet. Insbesondere der mesolimbische Projektionsweg ist der anatomische Hauptbestandteil des Rewardsystems des Gehirns (Fibiger and Phillips, 1988; Ikemoto, 2007).

Durch die erhöhte Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens (Teil des Ventralen Striatums) entstehen positive Gefühle, die als Belohnung empfunden werden und dadurch zu einer Verhaltensverstärkung führen. Ratten, denen beispielsweise Elektroden in die VTA implantiert werden, stimulieren sich über diese Elektroden fortwährend selbst. Dadurch steigen die extrazellulären Konzentrationen von Dopamin und seiner Metaboliten im ipsilateralen Striatum, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium (Fibiger, et al., 1987). Auch Injektionen von Dopamin-Agonisten (D1- oder D2-Rezeptor) in den Nucleus accumbens von Ratten führen zu positiven Gefühlen, wie sich aus Untersuchungen zur konditionierter Platzpräferenz ableiten lässt (White, et al., 1991).

Das mesolimbische dopaminerge System steuert nicht nur homöostatisches Verhalten, sondern ist auch für die Entstehung von Suchtverhalten (psychische Abhängigkeit von Drogen, aber auch Spielsucht etc.) verantwortlich. Ratten, die mit Dopaminantagonisten behandelt worden waren oder bei denen selektiv die dopaminergen Axonterminalen im Nucleus accumbens zerstört wurden, hörten auf, sich selbst Kokain zu

verabreichen (Fibiger, et al., 1992). Auch die funktionelle Bildgebung bei Probanden, denen Nikotin (Stein, et al., 1998) oder Kokain (Breiter, et al., 1997) appliziert wurde, zeigte Reward-assoziierte Veränderungen der neuronalen Aktivität im Nucleus accumbens, im Hirnstamm, der Amygdala und dem prefrontalen Cortex.

1.2.2 Der laterale Habenularkomplex vermittelt negativen Reward durch Inhibition dopaminergener Neurone

Das Vorhandensein eines positiv verstärkenden Systems, welches das Erzielen eines gewünschten Ergebnisses durch ein bestimmtes Verhalten mit dem Empfinden angenehmer Emotionen belohnt (=Reward), legt nahe, dass ein ähnliches System existiert, welches erfolgloses Verhalten durch den Entzug von Reward bestraft. Dies ist die biologische Aufgabe des lateralen Habenularkomplexes (LHb).

Negatives Feedback, oder aber das Ausbleiben von erwarteter Belohnung nach der Durchführung eines bestimmten Verhaltens, aktiviert Neurone im lateralen Habenularkomplex (Matsumoto and Hikosaka, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Ullsperger and von Cramon, 2003). Die Neurone des LHb projizieren teilweise direkt zur Area ventralis tegmentalis (VTA) und Substantia nigra pars compacta (SNc), teilweise indirekt über den Nucleus tegmentalis mesopontinus rostromedialis (mesopontine rostromedial tegmental nucleus, RMTg) zu diesen beiden dopaminergen Zentren (Geisler, et al., 2007; Geisler and Trimble, 2008; Jhou, et al., 2009). Über lokale GABAerge Neurone werden dopaminerge Nervenzellen in der VTA und der SNc inhibiert und dadurch die Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens und im Ventralen Striatum vermindert (Brinschwitz, et al., 2010; Christoph, et al., 1986; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Schultz, 1998). Allerdings hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass nicht alle glutamatergen Projektionen aus dem LHb an lokalen GABAergen Interneuronen der VTA enden, sondern ein Teil der Neurone aus dem LHb auch direkt die dopaminergen Neurone der VTA innerviert. Daher ist eine zusätzliche feedforward-Inhibition über den RMTg notwendig (Balcita-Pedicino, et al., 2011; Omelchenko, et al., 2009).

Die aus der Inhibition der VTA resultierende verminderte Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens führt zu einem Ausbleiben von Belohnungsgefühlen und damit in der Regel zum Abbruch des durchgeführten Verhaltens.

Unerwünschte Ergebnisse eigenen Verhaltens können vom Individuum selbst mit oder ohne bewusste Wahrnehmung (Hunger, Durst, erniedrigte Körpertemperatur) registriert oder durch externes Feedback signalisiert werden. Bewusste Fehlererkennung (Error-Monitoring) und Reward benutzen dabei nachweislich unterschiedliche Projektionswege (de Bruijn, et al., 2009). Registrieren fehlerhaften Verhaltens führt zur Aktivierung des medialen prefrontalen Cortex (de Bruijn, et al., 2009; Ullsperger and von Cramon, 2003). Abweichungen des Ist-Wertes vom Soll-Zustand bei der Homöostase werden vermutlich vom Hypothalamus detektiert, ohne zwingend das Bewusstsein zu erreichen. Beide Areale (mPFC und Hypothalamus) projizieren zum LHb und scheinen ihn zu aktivieren, um somit wenig erfolgreiches Verhalten zu beenden (Chiba, et al., 2001; Herkenham and Nauta, 1977; Thierry, et al., 1983).

1.2.3 Der Einfluss des serotoninergeren Systems auf Rewardmechanismen

Auch das serotoninerge System ist an Rewardprozessen beteiligt (Higgins and Fletcher, 2003; Liu and Ikemoto, 2007; Nakamura, et al., 2008). In Einzelzellableitungen wurde gezeigt, dass Reward-Informationen von den dopaminergen Neuronen der SNc und serotoninergeren Neuronen der Dorsalen Raphe (DR) unterschiedlich kodiert werden. Während dopaminerge Neurone in der SNc vor allem den Fehler der Reward-Voraussage kodieren, reagieren serotoninerge Neurone der DR sowohl auf den Reward ankündigenden sensorischen Reiz, als auch auf den Reward selbst (Kawagoe, et al., 2004; Nakamura, et al., 2008; Satoh, et al., 2003; Schultz, 1998; Schultz, 1998). Weiterhin zeigen die dopaminergen Neurone eine Präferenz für große Rewardreize. Die Nervenzellen der DR bestehen dagegen aus zwei Populationen, die entweder auf größeren oder auf kleineren Reward reagieren (Nakamura, et al., 2008).

1.2.4 Der Einfluss des lateralen Habenularkomplexes auf das serotoninerge System ist nicht abschließend geklärt

Die elektrische Stimulation der Habenula führt in den meisten Studien zu einer Hemmung der Neurone der Dorsalen Raphe mit einem Abfall der Serotonin-Konzentration in den zugehörigen Projektionsgebieten der DR (Reisine, et al., 1982; Wang and Aghajanian, 1977). Während eine hochfrequente Stimulation des LHb zu einer selektiven (durch den GABA_A-Antagonisten Bicullin antagonisierbaren) Hemmung der langsamfeuernden Neurone der DR führt, resultiert aus einer niederfrequenten LHb-Stimulation eine (durch NMDA-Agonisten vermittelte) Erregung von schnell und langsam feuernden Neuronen der DR (Ferraro, et al., 1996).

Dieser Projektionsweg vom LHb zur DR verwendet zumindest teilweise exzitatorische Aminosäuren als Transmitter (Kalen, et al., 1985; Reisine, et al., 1982; Wang and Aghajanian, 1977) und wird durch Substanz P modifiziert (Lacoste, et al., 2009; Neckers, et al., 1979). Die lokale Applikation von Picrotoxin (GABA-Antagonist) in den LHb lässt die Serotoninkonzentration in der DR ansteigen und verringert die 5-HT-Konzentration in der SNc. Auf die serotoninerge Innervation des Caudatoputamens ist dagegen kein Effekt durch Picrotoxin nachweisbar (Reisine, et al., 1982). Der Einfluss des LHb auf die DR und die serotoninerge Innervation der Zielgebiete der DR scheint also nicht gleichförmig zu sein, sondern je nach Projektionsgebiet unterschiedlichen Ergebnissen zu führen. Afferenzen aus dem medialen Prefrontalem Cortex (mPFC) und dem LHb konvergieren nachweislich an lokalen GABAergen Neuronen der DR und führen zu einer Inhibition serotoninerger Neurone (Varga, et al., 2003).

1.3 Funktionelle und anatomische Verbindungen zwischen dem lateralen Habenularkomplex und dem serotoninergen System

Der laterale Habenularkomplex (LHb) und die Dorsale Raphe (DR) sind in die Steuerung einer Vielzahl ähnlicher biologischer Funktionen involviert - insbesondere in die Verhaltenssteuerung (Mütterlichkeitsverhalten, Nahrungsaufnahme, Stressverhalten, zirkadiane Rhythmik) - aber auch in die Pathologie von Depression, Abhängigkeit und Sucht (Tab. 1.1, S. 17). Erst in den letzten Jahren gelang es mit der Entdeckung des Rewardsystems als übergeordnetes Konzept diese Komplexität der Verhaltenssteue-

rung zu erklären. Zwischen dem LHb und den mesencephalen Raphekernen bestehen zahlreiche Faserverbindungen (Aghajanian and Wang, 1977; Kalen, et al., 1985; Peyron, et al., 1998). Dabei stellt der LHb die wichtigste und größte afferente Verbindung zur Dorsalen Raphe dar (Aghajanian and Wang, 1977; Jacobs and Azmitia, 1992; Peyron, et al., 1998).

	laterale Habenula	Dorsale Raphe	
Schmerzverarbeitung	Benabid et al., 1989 Cohen et al., 1993 Cohen et al., 1985 Terenzi et al., 1990	Nagao et al., 1993 Daffly et al., 1990 Zhou et al., 1984	Commons 2008
Reproduktionsverhalten	Corodimas et al., 1993 Corodimas et al., 1992	Felton et al., 1998 Kalinichev et al., 2000	Kanno et al., 2008
Reward	Blander et al., 1989 Vachon et al., 1992 Sutherland et al., 1981 Morissette et al., 2008	Vachon et al., 1992 Nakajama et al., 1984 Matsumoto et al., 2007	Nakamura et al., 2008 Rogers et al., 1999 Daw et al., 2002 Doya et al., 2002 Schweighofer et al., 2007
Circadiane Rhythmik	Goldstein et al., 1983 Weaver et al., 1989 Haun et al., 1992 Landis et al., 1993 Guilding et al., 2007	Tavakoli-Nezad et al., 2005 Zhao et al., 2005 Hattar et al., 2006 Qu T et al., 1996	Mc Ginty and Harper, 1976 Lydic et al., 1993 Guzman-Marin et al., 2000 Dugovic, 2001
Stress-Verhalten	Chastrette et al., 1991 Wirtshafter et al., 1994 Timofeeva et al., 2001 Amat et al., 2001 Villareal et al., 2002		Grahn et al., 1999 Adell et al., 1997 Funada et al., 2001 Kirby et al., 1995 Kirby and Lucki, 1998 Roche et al., 2003
Lernen	Dennis et al., 1991 Thornton et al., 1991 Zagami et al., 1995	Lecourtier et al., 2007 Villareal et al., 2002	Meneses, 1999
Depression	Yang et al., 2008 Sartorius et al., 2007 Shumake et al., 2003		Delgado et al., 1990 Jolas et al., 1994 Arango et al., 1984 Gardier et al., 1996 Commons et al. 2003 Valentino et al., 2003 Amat et al., 2004 Guiard et al., 2007

Tabelle 1.1: Funktionelle Gemeinsamkeiten der lateralen Habenula und der Dorsalen Raphe.

1.4 Anatomie und Phylognese der Habenula

Die Habenula (Hb) ist eine phylogenetisch sehr alte Hirnstruktur. Sie lässt sich bei allen Wirbeltiergattungen nachweisen. Die Habenula ist Teil des dorsalen Diencephalons (Epithalamus) und liegt der Epiphyse vorgelagert in unmittelbarer Nachbarschaft des dritten Hirnventrikels. Die Bezeichnung Habenula leitet sich vom lateinischen Wort „habena“ ab und bedeutet „Zügelchen“ (der Epiphyse).

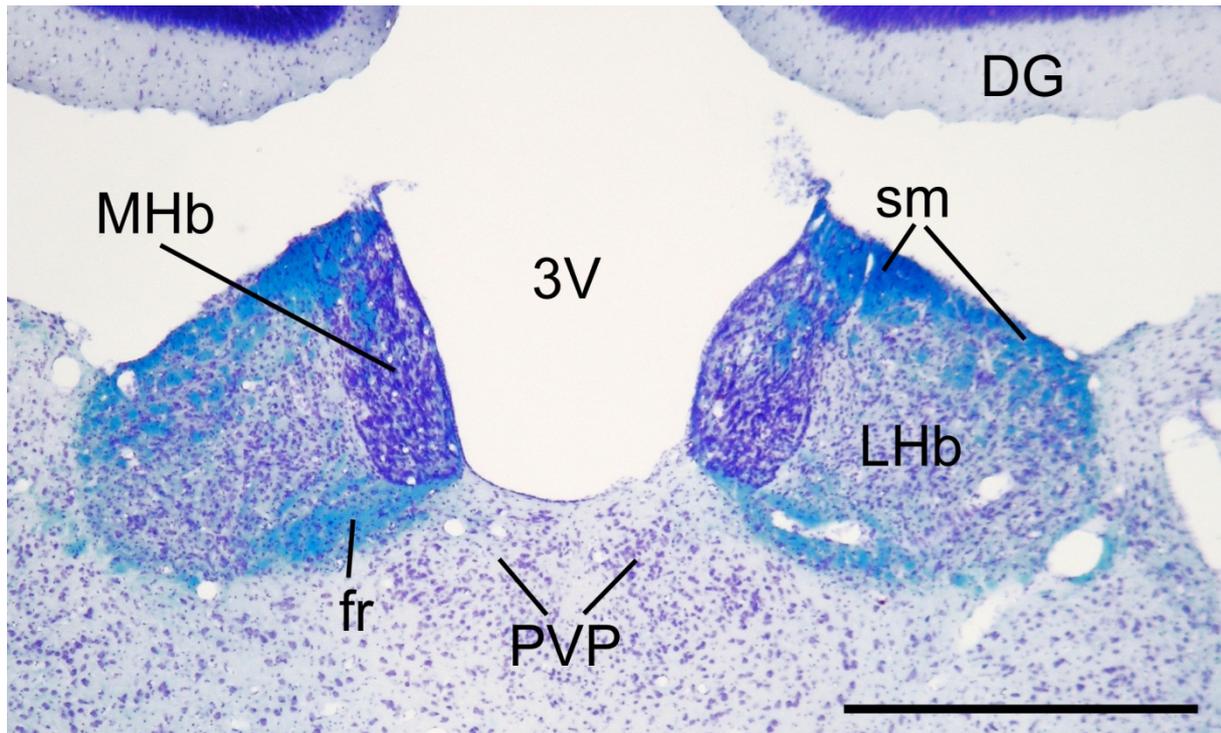


Abbildung 1.1: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme des Habenularkomplexes nach Klüver-Barrera-Färbung. MHb: mediale Habenula, sm: Stria medullaris, DG: Gyrus dentatus (Hippocampus), LHb: laterale Habenula, PVP: Ncl. paraventricularis pars posterior, fr: Fasciculus retroflexus, 3V: 3.Ventrikel. (Der Skalierungsstrich rechts unten entspricht einer Länge von 1mm).

Aufgrund ihrer paramedianen Lage unterscheidet man einen rechten und einen linken Habenularkomplex. Bei Vögeln und Säugetieren sind diese jeweils aus einem medialen (MHb) und einem lateralen (LHb) Unterkern aufgebaut (Cajal, 1904; Morgan, et al., 1973; Yanez and Anadon, 1998). Der laterale Anteil der Habenula (LHb) wird weiterhin in einen medialen (LHbM) und einen lateralen Bereich (LHbL) unterteilt (Cajal, 1904; Herkenham and Nauta, 1977; Herkenham and Nauta, 1979).

Auf der Basis neuerer morphologischer Studien wird der MHb bei Säugern in fünf und der LHb in zehn verschiedenen Unterkernen unterteilt (Andres, et al., 1999). Diese Untergliederung wird auch durch die differenzielle Verteilung von Transmittern, Rezeptoren und Neuromodulatoren bestätigt (Geisler, et al., 2003).

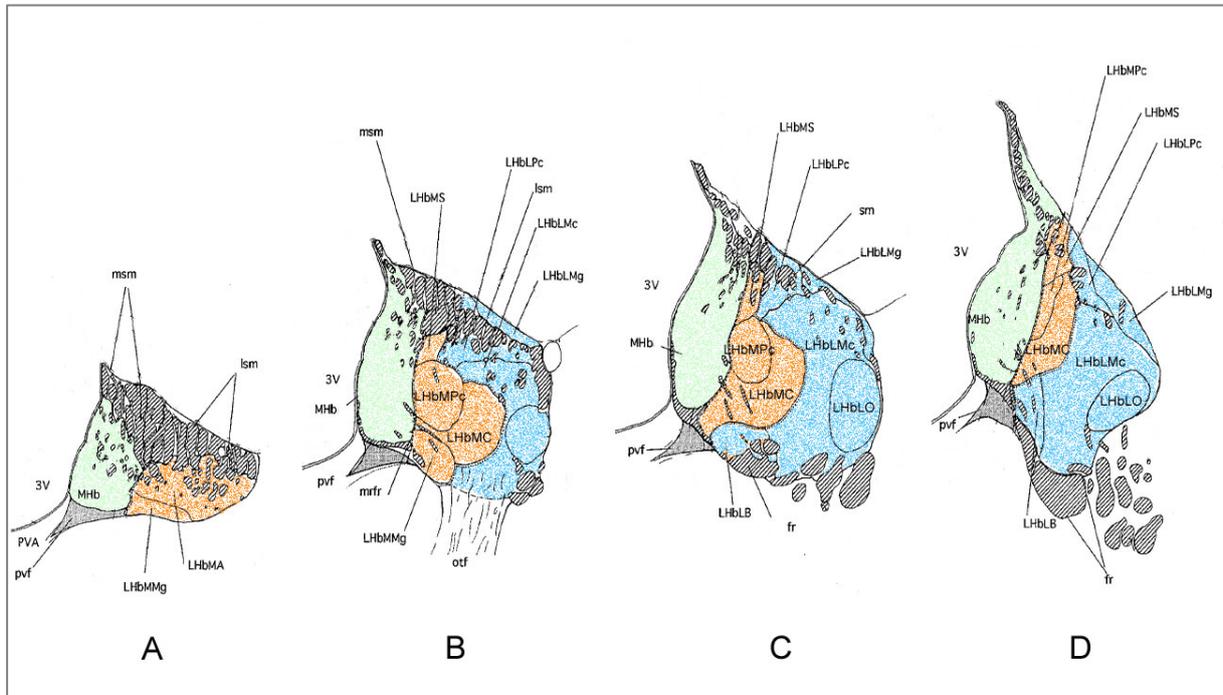


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Unterkerne des LHb in vier coronaren Ebenen (exemplarische Abbildung anhand des linken LHb, A-D in rostrokaudaler Reihenfolge, modifiziert nach Andres et al, 1999). Der MHb ist grün schattiert, die Unterkerne des LHbM orange und die des LHbL blau unterlegt.

Unterkern	LHbLB	LHbLMg	LHbLO	LHbLMc	LHbLPc	LHbMMg	LHbMC	LHbMPc	LHbMS	LHbMA
Neurone	mittelgroße bis große Neurone	wenige kleine (10µm) Neurone	große Somata mit kleinen Dendriten	große Neurone mit dicken Dendriten, einige kleine Neurone, trianguläre oder runde Somata	Klein (6-12µm)	rund bis oval (ca. 10µm)	relativ kleine (10µm) runde oder ovale Neurone mit prominentem Nucleolus	kleine, runde Neurone (6µm), dicht gepackt	kleine, ovale, dicht gepackte Neurone (6-12µm)	klein bis mittelgroß
Neuropil	quer verlaufende Dendriten, große myelinisierte Fasern	feines Neurofilament mit relativ vielen myelinisierten Axonen	ähnlich LHbLMc mit sehr dünnen verlaufenden Dendriten	Unregelmäßig, einige längs und einige quer verlaufende, dick- und dünnmyelinisierte Fasern	sehr feine, längs verlaufende Dendriten, nur wenige myelinisierte Fasern	ähnlich LHbMC, zusätzlich myelinisierte verlaufende Fasern (Fasciculus retroflexus)	regelmäßig, quer-geschnittene Dendriten, (etwas größer und stärker myelinisiert als im LHbMPc)	sehr regelmäßig, spongiforme Erscheinung durch überwiegend quergeschnittene dünne Dendriten	feines Neurofilament, überwiegend längsgeschnittene Dendriten, nur wenige myelinisierte Fasern	helles Neurofilament, von myelinisierten Fasern durchgezogen
CV	-	+	-	+	+	/	+	+	+	+
GABA _B	-	+	(+)	+	+++	(+)	++	+++	+++	/
TH	-	-	-	-	+	-	+++	+++	-	+
Kir3.2	-	+	+	++	(+)	++	(+)	(+)	(+)	++
NF	+	+	+	++	-	++	-	-	-	++
AChE	-	(+)	(+)	+	+	+	+	++	+	+

Tabelle 1.2: Immunhistochemische und lichtmikroskopische Charakteristika der Unterkerne des Lhb (modifiziert nach Geisler et al., 2003). Legende: - negativ, (+) sehr schwache Anfärbung, +/++/+++ schwache/ mittlere/ starke Anfärbung, CV: Cresyl Violet; TH: Tyrosinhydroxylase, GABA_B: GABA_B-Rezeptor, Kir3.2: calciumbindendes Protein, NF: Neurofilament, AChE: Acetylcholinesterase

1.5 Afferenzen und Efferenzen des lateralen und medialen Habenularkomplexes

Die Habenula ist Teil des Dorsalen Diencephalen Leitungssystems, welches Informationen von den Strukturen des limbischen Vorder- und Zwischenhirns unter Umgehung des medialen Vorderhirnbündels (mfh) zu den monoaminergen Zentren des Hirnstammes übermittelt (Sutherland, 1982). In der Habenula konvergieren außerdem verschiedene neuronale Makrosysteme wie zum Beispiel die septale-preoptische Schleife, die ventrale und die dorsale striatopallidale Schleife sowie der sublentikulär ausgehende Amygdalakomplex (extended Amygdala). Sie besitzt damit eine wichtige Voraussetzung, um integrative Funktionen zu erfüllen (Geisler and Trimble, 2008).

Der mediale Anteil des Habenularkomplexes (MHb) verbindet die Septumkerne mit dem Nucleus interpeduncularis (Gudden-Ganglion), welcher wiederum zu den Raphekernen, dem Periaquäduktalem Grau (PAG) und der Area tegmentalis ventralis (VTA) projiziert (Hamill and Lenn, 1983; Herkenham and Nauta, 1977; Herkenham and Nauta, 1979; Shibata, et al., 1986).

Der laterale Anteil des Habenularkomplexes (LHb) erhält hingegen über einige direkte kortikale Afferenzen aus dem mPFC auch über das Ventrale Pallidum (VP), die laterale preoptische Region (LPO), den lateralen Hypothalamus (LH) und den Nucleus entopeduncularis (entspricht dem Globus pallidus internus (GPi) im Gehirn von Nagetieren) indirekt Informationen aus allen kortikalen Gebieten des Gehirns. Zu einem geringeren Anteil terminieren auch Axone aus der VTA, der Dorsalen Raphe (DR), der Medianen Raphe (MnR) und dem Nucleus tegmentalis laterodorsalis (LDTg) im LHb (Chiba, et al., 2001; Groenewegen, et al., 1993; Herkenham and Nauta, 1977; Kowski, et al., 2008; Parent, et al., 1981; Rajakumar, et al., 1993; Zahm, et al., 1996). Über den Fasciculus retroflexus (fr) projiziert der LHb zur Dorsalen und Medianen Raphe (DR, MnR) sowie zum Nucleus tegmentalis mesopontinus rostromedialis (RMTg), der SNc, der VTA sowie dem LDTg, welche wiederum direkt oder indirekt (RMTg) das basale Vorderhirn innervieren (Herkenham and Nauta, 1979; Jhou, et al., 2009; Lehmann, et al., 2002; Lehmann, et al., 2003).

Bereits frühe autoradiographische Studien zeigten, dass der LHbM und der LHbL zu unterschiedlichen Zielgebieten projizieren (Herkenham and Nauta, 1979). Während man über einen langen Zeitraum dem LHbM aufgrund dieser Projektionen rein limbi-

1.6 Das serotoninerge System

1.6.1 Nomenklatur des serotoninergen Systems

Die Bezeichnung „Raphe“ stammt vom dem griechischem Wort „rhapê“ ab und bedeutet „Naht“. Diese Bezeichnung geht auf Koelliker (1891) bzw. Cajal (1911) zurück, welche erstmals das Vorkommen großer, multipolarer Nervenzellen entlang der Mittellinie des Hirnstammes beschrieben („strangförmige Verwachsungsnah“). Mit Hilfe einer speziellen Fluoreszenz-Technik zur Visualisierung von 5-Hydroxytryptamin erfolgte 1962 die B-Gruppen-Einteilung serotoninerner Neurone im Rattenhirn (Dahlstrom and Fuxe, 1964). Diese Einteilung ist noch heute Grundlage vieler neuroanatomischer und neurophysiologischer Studien.

Die Dorsale Raphe (DR) umfasst neben circa 30% bis 60% nicht-serotoninergen Neuronen, die serotoninergen Nervenzellen der Gruppe B6 und B7 nach Dahlström und Fuxe (Descarries, et al., 1982; Stratford and Wirtshafter, 1990; Wiklund and Bjorklund, 1980). Sie ist der größte der sieben Raphe-Kerne des Hirnstammes und bildet zusammen mit der Medianen Raphe (MnR, entsprechend B5 und B8 nach Dahlström und Fuxe) den wichtigsten Ursprungsort der serotoninergen Innervation des Vorderhirns.

1.6.2 Anatomie und Lage der Dorsalen Raphe

Die Dorsale Raphe befindet sich im Tegmentum des Mesencephalons zwischen dem Aquaeductus cerebri und dem Fasciculus longitudinalis medialis (mediales Längsbündel) und erstreckt sich bis in die anterioren Anteile des Pons. Die rostrale Begrenzung bildet der Nucleus oculomotorius. Kaudal grenzt die Dorsale Raphe an den Nucleus tegmentalis dorsalis (GUDDEN).

Die Dorsale Raphe wird bei Primaten meist in sechs (medianer, ventraler, dorsaler, ventrolateraler, lateraler and kaudaler Unterkern), bei der Ratte in fünf Subareale (DRD; DRV, DRVL; DRC; DRI) unterteilt, welche sich durch topographisch geordnete Projektionen auszeichnen (Aghajanian and Wang, 1977; Azmitia, 1981; Datiche, et al., 1995; Gonzalo-Ruiz, et al., 1995; Imai, et al., 1986; Jacobs, et al., 1978; Kalen, et al., 1985; Kirouac, et al., 2004; O'Hearn and Molliver, 1984; Semba, et al., 1989; van der Kooy and Kuypers, 1979; Waterhouse, et al., 1986; Wilson and Molliver, 1991).

In der DR kommen neben Serotonin verschiedenen Neurotransmitter und Neuromodulatoren vor (siehe review: (Michelsen, et al., 2007), deren genaue Verteilung in einer Übersichtsarbeit bisher jedoch nur am Primatenhirn demonstriert wurde (Charara and Parent, 1998).

1.6.3 Projektionen der Dorsalen Raphe

DR und MnR besitzen eine Vielzahl gemeinsamer Afferenzen, während ihre Efferenzen strikt getrennt sind (Aghajanian and Wang, 1977; Aghajanian, et al., 1978; Descarries, et al., 1986; Nishikawa and Scatton, 1983; O'Hearn and Molliver, 1984; Peyron, et al., 1996; Peyron, et al., 1995; Peyron, et al., 1998; Steinbusch, et al., 1981; Steinbusch, et al., 1980; Vertes, 1991; Vertes, et al., 1999). Fast die gesamte serotonerge Innervation des Vorderhirns geht von dem Dorsalen und dem Medianen Raphe-Kern aus (Kosofsky and Molliver, 1987; Lavoie and Parent, 1991; Molliver, 1987; Steinbusch, et al., 1981; Steinbusch, et al., 1980; van der Kooy and Hattori, 1980; van der Kooy and Kuypers, 1979; Vertes, 1991; Vertes, et al., 1999; Wilson and Molliver, 1991). Terminalen der DR innervieren einen Großteil des Vorderhirns bis hin zu den dopaminergen Kerngebieten des Mesencephalons, inklusive dem lateralen Hypothalamus, der Amygdala, dem dorsalen und ventralen Striatum. Die DR besitzt im Gegensatz zur MnR zahlreiche kortikale Projektionen in nahezu alle Gebiete des Telencephalons (Imai, et al., 1986; Vertes, 1991; Vertes, et al., 1999) Außerdem verfügt die DR im Vergleich zur MnR über viel stärkere direkte Projektionen zu den Strukturen des Rewardsystems. So entsendet die DR eine Vielzahl von Axonen zum Ventralen Pallidum (inklusive des Nucleus accumbens), der VTA, der SNc, während die MnR nur einige Projektionen zur VTA, wenige zur SNc und keine Projektionen zum Nucleus accumbens aufweist (Vertes, 1991; Vertes, et al., 1999). DR und MnR erhalten gemeinsame Afferenzen aus limbischen Cortex-Arealen, dem medialen und lateralen preoptischen Gebiet, dem LHb, dem lateralen und dorsomedialen Hypothalamus, dem Locus caeruleus (LC), Nucleus tegmentalis laterodorsalis (LDTg) und den kaudalen Raphe-Kernen. Die DR erhält ausserdem signifikante Afferenzen vom lateralen, ventralen und medialen Bettkern der Stria terminalis, dem lateralen Septum, den Kernen des Diagonalen Bandes und der Substantia innominata (Petrov, et al., 1992; Peyron, et al., 1996; Peyron, et al., 1995; Peyron, et al., 1998). Ob die Axonterminalen aus

dem LHb, welche in der DR und MnR enden, aus den gleichen oder unterschiedlichen Unterkernen des LHb stammen, bedarf weiterer Untersuchungen.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Die bisherigen Betrachtungen haben verdeutlicht, dass sowohl der LHb als auch die DR an der Steuerung einer Vielzahl, im Prinzip homöostatischer Verhaltensweisen beteiligt sind. Diesen Funktionen ist gemeinsam, dass sie eine ausgeprägte emotionale Komponente besitzen. Zudem ist inzwischen bekannt, dass die biologische Bedeutung des LHb darin liegt, einem wenig erfolgreichen oder sogar erfolglosen Verhalten eine negative emotionale Komponente zuzuordnen. Die Umsetzung dieser Emotionen scheint dann über eine Inhibierung der dopaminergen und serotonergen Systeme zu erfolgen.

Negative Abweichungen vom Soll-Wert verschiedener homöostatischer Parameter (Mangel an Nahrung, suboptimale Körpertemperatur) werden in unterschiedlichen Arealen der präoptischen/hypothalamischen Region detektiert.

Für die Umsetzung dieser Information über den LHb in die Inhibierung monoaminergere Systeme bieten sich drei Arbeitshypothesen an.

(1) Die Afferenzen aus verschiedenen (hypothalamischen/präoptischen) Regionen könnten unter Beibehaltung ihrer Topographie an Zellen im LHb enden, und diese unabhängig von der subnucleären Unterteilung des LHb zu den Zielkernen im Mesencephalon projizieren. Ein solcher mediolateraler Gradient ist für die ventralen diencephalen Afferenzen zum LHb beschrieben (Herkenham and Nauta, 1977). Die morphologisch abgegrenzten Unterkerne des LHb hätten somit kein hodologisches Korrelat.

(2) Alternativ könnten die Efferenzen aus verschiedenen Vorderhirn-Regionen an diffus verteilten Neuronen innerhalb des LHb enden. Deren Axone könnten dann funktionsspezifisch, aber unabhängig von der Unterkerneinteilung des LHb zu unterschiedlichen Arealen monoaminergere Zentren im Hirnstamm projizieren.

(3) Schließlich könnten die Afferenzen aus verschiedenen Regionen in spezifischen Unterkernen des LHb enden. Die Neurone in den verschiedenen Unterkernen des LHb senden dann ihre Axone selektiv zu den unterschiedlichen Zielgebieten. Eine funktionelle Bedeutung der morphologisch abgegrenzten Unterkerne wäre somit nahe liegend.

Aus diesen drei Hypothesen ergeben sich Fragen, deren Beantwortung Gegenstand dieser Arbeit sein soll.

1. Sind die Ausgangsneurone der Projektionen des LHb zur DR gleichmäßig über das gesamte Gebiet des LHb verteilt oder finden sie sich gehäuft in einzelnen Unterkernen des LHb (Abb. 1.4 A/B versus C/D)?
2. Wenn die Projektionen zur DR bestimmten Unterkernen des LHb entstammen, enden die Axone von Zellen in der präoptischen/hypothalamischen Region in den gleichen Arealen des LHb, in denen sich auch die Ausgangsneurone der Projektion zur DR finden?
3. Terminieren die Projektionen aus dem LHb in der gesamten DR oder nur in bestimmten Unterkernen der DR (Abb. 1.4 A/C versus B/D)?

Von der Bearbeitung dieser Fragen darf erwartet werden, dass die Ergebnisse erheblich zu unserem Verständnis der biologischen Funktion von LHb und DR beitragen.

Zwischen Folgende LHb und DR sind folgende Verschaltungsprinzipien denkbar.

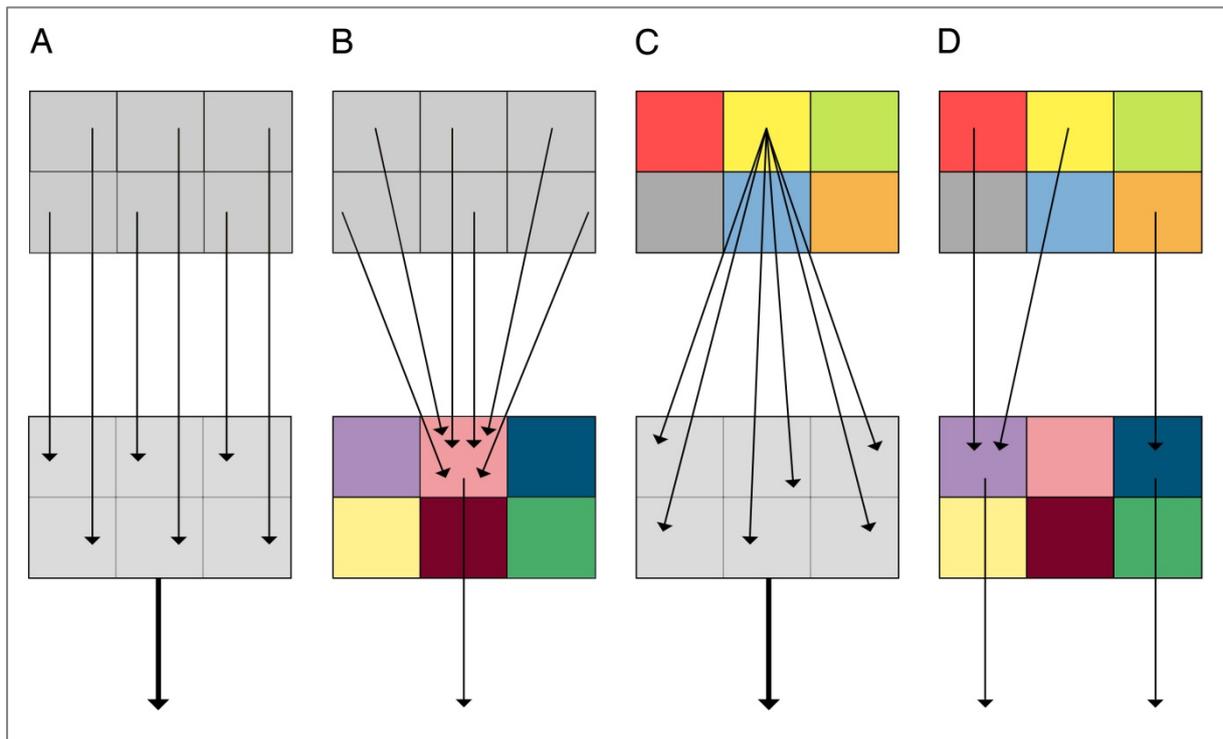


Abbildung 1.4: Theoretische Betrachtung der Verbindungen zwischen LHB und DR anhand von Projektionsmodellen. A: Die morphologisch abgegrenzten Unterkerne des LHB projizieren alle zur gesamten DR. B: Alle morphologisch abgegrenzten Unterkerne des LHB projizieren zu einem bestimmten Gebiet in der DR. C: Nur einzelne UK des LHB projizieren zur gesamten DR. D: Nur einige der Unterkerne des LHB projizieren zu bestimmten Unterkernen in der DR. Im Fall von A und B würde die Verteilung der Projektionen gegen eine hodologische Bedeutung der Unterkerne des LHB sprechen, im Fall von A und C wäre die morphologische Einteilung der Unterkerne der DR nicht von hodologischer Bedeutung

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

In den Experimenten wurden ausschließlich ausgewachsene, weibliche Wistarratten mit einem Gewicht von 270 bis 340 Gramm verwendet (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld). Die Haltung der Tiere und die Durchführung der Versuche wurde in Übereinstimmung mit institutsinternen Vorschriften und in Anlehnung an die durch das „National Institute of Health“ veröffentlichte Richtlinie „*Guide of the Care and Use of Laboratory Animals*“ durchgeführt. Für die Durchführung der Experimente liegt die Zustimmung der Ethikkommission des Berliner Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo No. G 0168/01) vor. Die Haltung der Ratten im institutseigenen Tierstall erfolgte in Gruppen von 2 bis 4 Tieren in Standardkäfigen (Bayer Makrolon Typ IV, 55×35×20cm). Die Tiere wurden bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % gehalten. Die Beleuchtung erfolgte in zwölfstündigen Hell- und Dunkelzyklen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.2 Substanzen

Für die Tracing-Versuche wurden die Neuro-Tracer Fluorogold (FG, 1%), die Beta-Untereinheit des Cholera-toxins (CTB, 1%), das Isolectin L (Leucoagglutinin) des *Phaseolus vulgaris* agglutinin (Pha-L, 2%) und ein Tetramethylrhodamin-gekoppeltes Dextranamin (TMR-DA [MW=10.000], 2,5%) verwendet. Detaillierte Angaben zur Herkunft, den verwendeten Konzentrationen und substanzspezifischen Besonderheiten finden sich in Tabelle 2.2 (S. 41). Die Visualisierung der Tracer für die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mittels einer immunhistochemisch gekoppelten Farbreaktion (Elite-ABC/ DAB- Nickel). Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.3 (S. 42), alle übrigen Chemikalien sind in Tabelle 2.4 (S. 43) aufgelistet. Für die Herstellung der Lösungen wurde ausschließlich deionisiertes Wasser genutzt (Milli Q Purification System, Millipore-Milfort, UK).

2.3 Tracing-Experiment

2.3.1 Tracer-Injektion

Zur intracerebralen Applikation des Tracers wurden die Tiere mit einer Lösung aus 45% Ketamin (50 mg/dl, CuraMED, Karlsruhe, Germany), 35% Xylazin (2%, Rompun®, BayerVital, Leverkusen, Germany) und 20% physiologischer Kochsalzlösung tief analgosediert. Diese wurde gewichtsadaptiert (0,16 mg pro 100 mg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Bei unzureichender Narkosetiefe oder zur Narkoseverlängerung erfolgten weitere fraktionierte intraperitoneale Injektionen von jeweils 5mg Ketamin.

Sobald die Tiere keine Reaktion mehr auf äußere Schmerzreize zeigten, wurden sie auf einer körpertemperaturkontrollierten Wärmeplatte bei 37°C (Temperatur-Kontrollgerät Fa. Omega, Stanford, CT, USA) gelagert und ihr Schädel in einem stereotaktischen Apparat (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) fixiert. Nach der Adjustierung des Schädels wurde der Schädelknochen freigelegt, eine kleine Knochenplatte mittels Bohrlochtrepanation entfernt und die Dura mater über dem Injektionszielpunkt eröffnet. An dieser Stelle wurde nachfolgend eine mit Tracer gefüllte Mikropipette ins Hirngewebe eingebracht (Abb. 2.1, S. 31). Alle Daten zur Planung und Auswertung der Injektionen entstammen dem topographischen Atlas des Rattenhirns von Paxinos und Watson (Paxinos and Watson, 1989). Die Applikation des Tracers erfolgte mikroiontophoretisch über eine Präzisionsgleichstromquelle (MVVCSO2, npi, Deutschland), welche an die feinen Glaspipetten angeschlossen wurde. Diese erzeugte in sieben-sekündigen On-Off-Zyklen (Impulsgeber: Master 8, A.M.P.I., Jerusalem) positive Ströme von ein bis vier μA (Tab. 2.2, S. 41). Die durchschnittliche Applikationsdauer lag bei 15 Minuten. Zur Variation der Größe der Injektionsstelle wurde die Injektionsdauer, sowie der Pipettenspitzen-durchmesser entsprechend verändert. Im Anschluss an die Tracer-Injektion wurde die Mikropipette für ca. fünf bis zehn Minuten vor der Entfernung in situ belassen, um das Diffusionsleck entlang des Injektionsweges zu minimieren. Abschließend erfolgte der Verschluss der Hautwunde mittels chirurgischer Nahttechnik bzw. Gewebekleber (Histoacryl®). Bis zur vollständigen Erholung der Tiere nach der Operation erfolgte für einige Stunden die vorübergehende Unterbringung in Einzelkäfigen. Die anschließende Überlebensdauer bis zur Perfusion der Tiere lag u.a. in Abhängigkeit vom verwendeten Tracer zwischen drei Tagen und drei Wochen (Tab. 2.2, S. 41).

2.3.2 Herstellung der Mikropipetten

Die für die Tracingversuche verwendeten Mikropipetten wurden aus Glaskapillaren (Borsilikat) hergestellt, welche mit Hilfe eines speziellen Gerätes (Puller P97, Sutter-Instruments, USA) ausgezogen wurden. Anschließend wurden die Spitzen der Glaskapillaren unter mikroskopischer Kontrolle an einem Glasblock auf Innendurchmesser von 10 bis 25 Mikrometer abgebrochen. Um die Verletzungen des angrenzenden Gewebes zu minimieren und ein allseits gleichmäßiges Austreten des Tracers zu gewährleisten wurden nur Pipetten mit geradlinigem Bruchrand für die Tracingversuche verwendet.

2.3.3 Anterogrades Tracing

Für die Analyse der efferenten Faserbindungen vom LHb zur DR wurden die Tracer PhaL und TMR-DA verwendet (Tab. 2.2, S. 41). Das verwendete Tetramethylrhodamin (TMR)-konjugiertes Dextranamin besitzt ein Molekulargewicht von lediglich 10kDA. Es wird im Gegensatz zu hochmolekularen Detrankonjugaten (ab 70kDA) überwiegend anterograd transportiert (Vercelli, et al., 2000). TMR-DA und PhaL werden im Bereich der Injektionsstelle durch aktive (im Bereich der Dendriten und Somata) und passive (Diffusion) Transportmechanismen über die Zellmembran der Neurone aufgenommen und entlang des Mikrotubulussystems in die Axonterminalen transportiert. Sie können dort durch verschiedene immunhistochemische Verfahren visualisiert werden. Die Zielkoordinaten für die Injektionen in lateralen Anteil des LHb (LHbL) lagen bei Bregma – 3,6mm (Sagittalebene), Touch Dura -4,5mm und +1,0 mm in der Mediolateralebene. Injektionen in den medialen Anteil des LHb (LHbM) erfolgten in gleicher Höhe weiter medial bei +0,6mm in der Mediolateralebene.

2.3.4 Retrogrades Tracing

Die Tracer CTB und FG wurden an verschiedenen Stellen innerhalb der Dorsalen Raphe (DR) injiziert, um die Somata ihrer Ursprungsneurone im LHb zu visualisieren. Die Koordinaten wurden in Anlehnung an den topographischen Atlas des Rattenhirns gewählt (Paxinos and Watson, 1989). Da im Fall der DR der Injektionszielpunkt genau in der Medianlinie lag, erfolgte die Bohrung zur Umgehung des Sinus sagittalis superior nach lateral verlagert und das Einführen der Mikropipette wurde unter einem Winkel von

ca. 15 - 25° durchgeführt (Abb. 2.1, S. 31). Eine Ligatur des Sinus war somit nicht erforderlich und schwere Blutungen konnten vermieden werden. Die Aufnahme des Tracers CTB im Bereich der Injektionsstelle erfolgt endozytotisch durch die Bindung der Substanz an Mono-Sialo-Ganglioside in die Synapsen (Middlebrook and Dorland, 1984). FG hingegen diffundiert als schwache Base passiv durch die Membran an den Terminalen und wird dort im sauren Milieu der Lysosomen gebunden (Wessendorf, 1991). Der intrazelluläre Transport über das Mikrotubulussystems erfolgt hauptsächlich über das Protein Dynein bis in die Dendriten der Neurone.

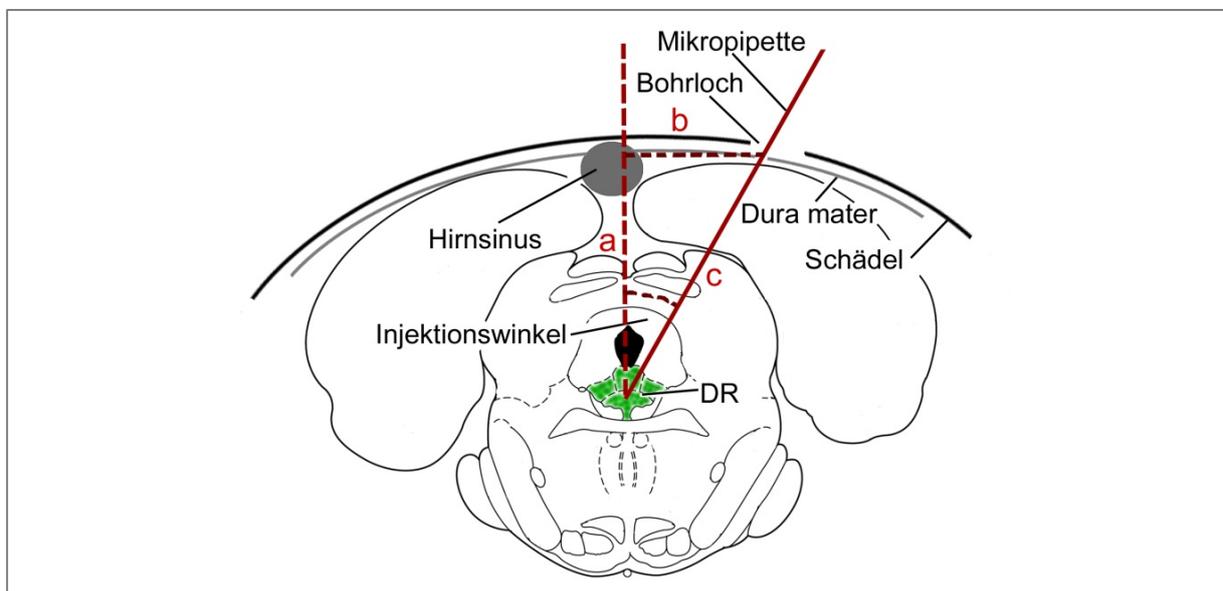


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Tracerinjektion in die DR. Zur Umgehung des Sinus sagittalis superior erfolgten die Bohrungen und Injektionen nach lateral versetzt (Strecke b). Die Strecke a entspricht dem Abstand von „Touch Dura“ bis zum Injektionsziel. Über den Satz des Pythagoras wurden der entsprechende Injektionswinkel und die Länge der Strecke c errechnet.

2.3.5 Gewebefixation

Zur transkardialen Perfusion wurden die getrackten Tiere wiederum mit einer Lösung aus 45% Ketamin (50 mg/dl, CuraMED, Karlsruhe, Germany) und 35% Xylazin (2%, Rompun®, BayerVital, Leverkusen, Germany) tief narkotisiert und mit 5.000 IE heparinisiert (Heparin-Natrium 25.000, Ratiopharm, Ulm, Germany). Die oberflächlichen Haut- und Gewebeschichten wurden von abdominal nach jugular in der Medianlinie eröffnet. Danach erfolgte die Durchtrennung der tiefen abdominalen Muskeln bis zum Xyphoid unter

Schonung des Diaphragmas und die Sektion der oberflächlichen thorakalen Muskeln nach kranial. Nach Eröffnung des Diaphragmas erfolgten zügig die linksparasternale Eröffnung des Thorax und das Einbringen eines Rippenspreizers. Die Zeit zwischen der Kollabierung der Lungen und dem Perfusionsbeginn lag zwischen 35 und 60 Sekunden. Nach transkardialer Instillation der Perfusionskanüle in die Aorta ascendens, sowie Eröffnung des rechten Vorhofes, erfolgte für die Dauer von zehn Sekunden eine Spülung der Gefäße mit einer auf 37°C vorgewärmtem Plasmaersatz-Lösung (Longasteril 70® , Fresenius, Bad Homburg, Germany). Danach begann die eigentliche Perfusion mit einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd und 0,2% Pikrinsäure in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,4) für 5 Minuten bei einem Druck von 210 Torr und anschließend für die Dauer von 20 Minuten bei 20 Torr. Abschließend folgte für die Dauer von fünf Minuten die Perfusion des Gewebes mit einer Lösung aus 5% Sucrose in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,4) bei einem Druck von 100 Torr.

2.3.6 Entnahme der Gehirne, Kryoprotektion und Sektionierung

Die Gehirne wurden direkt im Anschluss an die Perfusion aus dem Schädel präpariert, in einen Plexiglasrahmen adjustiert und in 4% Agarose (Serva, Deutschland) gegossen. Nach dem Aushärten im Eisbad wurden daraus 7 definierte 3 bis 5,5 mm dicke coronare Blöckchen geschnitten. Zur Kryoprotektion wurden die Hirnblöckchen anschließend in 0,4M Sucroslösung überführt und über Nacht in 0,8M Sucrose gelagert. Anschließend wurden die einzelnen Hirnteile bei -70°C in Hexan (Merck, Deutschland) schockgefroren und bis zur endgültigen Verwendung bei -80°C gelagert. Aus den so gewonnenen Blöckchen wurden an einem Gefriermikrotom/Kryostat bei einer Temperatur von -20°C coronare Schichten mit einer Dicke von 25 µm geschnitten und unmittelbar in PBS (Phosphat Buffer Saline; 140mM NaCl und 40mM KCl in 10mM Phosphatpuffer, pH 7,4) überführt. Die einzelnen Schnitte wurden fortlaufend auf 10 Gläschen verteilt, sodass der Abstand der einzelnen Schichten pro Glas/Serie 250 µm beträgt. Alle nicht unmittelbar verwendeten Serien wurden in einer Gefrierschutzlösung (pH 7.4) aus 2.2 M Sucrose in 100 mM Phosphatpuffer und 42% Ethylenglykol (Merck, Deutschland) bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.4 Immunhistochemische Darstellung der Tracer, Neurorezeptoren und Transmitter

Zur Visualisierung der Tracer, aber auch zur Darstellung verschiedener Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Rezeptorproteine wurde eine Antikörperfärbung nach der ABC-Methode (Avidin - Biotinylated Enzyme Complex) verwendet (Cattoretti, et al., 1988; Elias, et al., 1989; Hsu and Raine, 1981). Dabei wird ein Antigen (z.B. der Tracer) durch einen Primärantikörper erkannt und spezifisch gebunden. Der Fc-Teil des Erstantikörpers wird durch einen biotinylierten Sekundärantikörper, der aus einer anderen Spezies stammt gebunden. Biotin ist ein ubiquitäres wasserlösliches Vitamin (Vitamin H). Es besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität für das basische Glycoprotein Avidin. Biotin lässt sich durch einfache chemische Reaktionen sehr leicht an größere Moleküle, wie zum Beispiel Antikörper koppeln ohne deren Eigenschaften zu verändern. Das Hühnerereiweiß Avidin besitzt insgesamt vier hydrophobe Taschen in seiner Tertiärstruktur, welche als Bindungsstellen für Biotin dienen. Durch diese nicht kovalente starke Bindung von Biotin wird Avidin inaktiviert. Auch Avidin lässt sich leicht an verschiedenen Marker (z.B. Enzyme, Schwermetalle oder Fluoreszenzfarbstoffe) koppeln. Es besitzt außerdem die Fähigkeit als „Brücke“ zwischen zwei biotinylierten Molekülen zu dienen. Somit lässt sich durch die Bindung vieler Peroxidase-gekoppelter Avidinmoleküle an einen Zweitantikörper eine Verstärkerreaktion erreichen. Für die eigentliche Visualisierung dient eine Peroxidase-katalysierte chemische Reaktion, welche das farblose bis rosafarbene DAB (3,3'-Diaminobenzidin) unter Zusatz von Wasserstoffperoxid in ein wasserunlösliches bräunlich-schwarzes Indaminpolymer umwandelt, welches sich am Ort der Reaktion (der Antikörperbindung) niederschlägt.

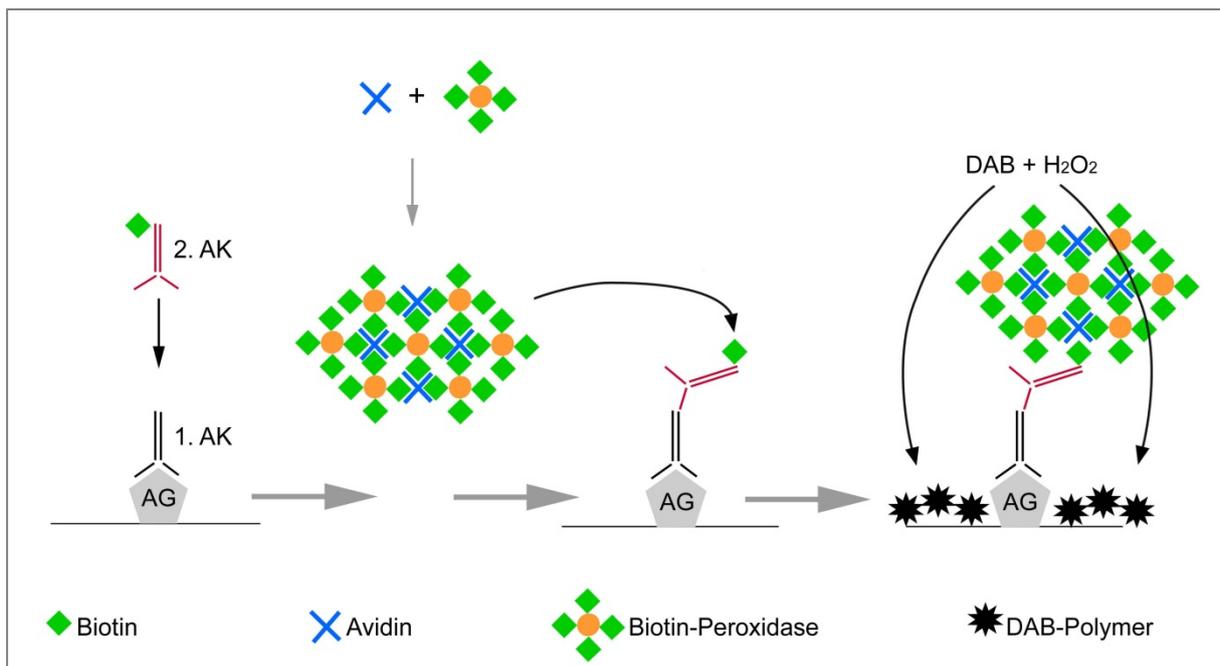


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Verstärkerreaktion mittels Elite-ABC-Komplex. Ein biotinylierter Zweitantikörper bindet das Fc-Element des Erstantikörpers, welcher spezifisch an ein Antigen (z.B. Tracer) gebunden vorliegt. Über Avidin- und Biotin-vermittelten kovalenten Bindungen entsteht am Ort der Zweitantikörperbindung eine starke Peroxidaseaktivität, welche ihr Substrat DAB nach Zugabe von Wasserstoffperoxyd in ein schwarzes Präzipitat überführt.

2.4.1 Vorbehandlung

Zum gründlichen Entfernen der Gefrierschutzlösung wurden die einzelnen Serien nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank mehrfach bei Raumtemperatur in PBS (5min, 10min., 20 min., 30min.) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für fünfzehn Minuten in eine 1% Natriumborhydrid-Lösung überführt. Dieser Zwischenschritt ist notwendig, da die in der Fixierlösung enthaltenen Aldehydgruppen (Paraformaldehyd) mit den freien Aminogruppen der Gewebeschnitte und der Antikörper Schiff'schen Basen bilden. Eine Bindung der Antikörper an ihre spezifischen Epitope wird dadurch erschwert. Durch die Zugabe von Natriumborhydrid werden diese Doppelbindungen reduziert, die Tertiärstruktur der Proteine stabilisiert und die spezifische Bindung der Antikörper erleichtert. Das Natriumborhydrid wurde anschließend durch 3 weitere Waschzyklen in PBS entfernt. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität (Verminderung der unspezifischen Hintergrundfärbung) wurden die Gewebeschnitte mit Phenylhydrazin (1:2.000, Merck, Deutschland) in einer Lösung aus 10% Ziege-Normal-Serum (Normal

Goat Serum (NGS), 10% in PBS) und 0,3% Triton (10% Triton X-100 in H₂O) inkubiert. Die Verwendung eines Normalserums vermindert die Hintergrundfärbung, da es mit den verwendeten Antikörpern um die unspezifische Bindungsstellen in der Gewebeprobe konkurriert. Entstammte der Erst-Antikörper aus Ziegen, wurde das NGS durch Pferde-Normal-Serum (Normal Horse Serum (NHS), 10% in PBS) substituiert, um eine spätere unerwünschte Zweitantikörperbindung an im Gewebe verbliebenes Ziegenserum-Protein zu verhindern. Durch den Zusatz von Triton 10% (10% Triton X-100 in H₂O) wird eine bessere Membranpermeabilität erreicht.

2.4.2 Auftragen der Erstantikörper

Die Hirnschnitte wurden direkt in die entsprechende Lösung des Primärantikörpers in 10% NGS oder 10% NHS mit 0,3% Triton-X100, 0,1% Natriumazid- (10% Natriumazid in H₂O) und 0,1% Thimerosal- (1% Thimerosal in H₂O) überführt und für 36 Stunden bei 8° Celsius im Kühlraum inkubiert. Die geeigneten Konzentrationen der Antikörper wurden in Voruntersuchungen bestimmt (Tab. 2.3, S. 42).

2.4.3 Auftragen der Zweitantikörper

Zum Entfernen der ungebundenen Erstantikörper wurden die Schnitte wiederum drei Mal in PBS gewaschen. Danach erfolgte für 60 Minuten die Vorinkubation in 1%-iger PBS-A-Lösung (2 mg Rinderserumalbumin in 1 ml PBS). Anschließend wurden die Hirnschnitte in eine Lösung aus einer geeigneten Konzentration des Zweitantikörpers (Tab. 2.3, S. 42) in 1% PBS-A, 0,3% Triton und 0,1% Natriumazid überführt und für 24 bis 36 Stunden bei 8°C inkubiert.

2.4.4 Visualisierung mittels der Elite-ABC-Methode

Nach Auswaschen der ungebundenen Zweitantikörper mit PBS und der einstündigen Vorinkubation in 1% PBS-A erfolgte anschließend das Auftragen des Elite-ABC-Komplexes. (1:1000 Elite-ABC Lösung (10 µl Elite A [Avidin] und 10 µl Elite B [biotinylierte Peroxidase] in 1% PBS-A; Vector Laboratories, USA). Die Inkubationszeit betrug

12 Stunden. Während dessen wurden die Hirnschnitte auf einem IKA-Schüttler bei Raumtemperatur gelagert.

Nach erneutem Waschen mit PBS (3x15 Minuten) wurden die Schnitte für die Dauer von 15 Minuten mit einer Lösung aus Diaminobenzidin (DAB, 1:100 in H₂O), Tris-Puffer [1:20, 12,2 g Tris(-hydroxymethylaminomethan) in 100 ml H₂O; pH 7,6] und Imidazol [1:100, 681 mg Imidazol in 10 ml H₂O, pH 7,6] in H₂O) vorinkubiert. Anschließend wurde die DAB-Lösung gegen frische DAB-Lösung ausgetauscht und die enzymatische Peroxidase-Reaktion durch die Zugabe von 0,03% H₂O₂ gestartet. Zur Verstärkung der Farbreaktion (schwarzer Niederschlag) wurde der DAB-Lösung vor Zugabe des Peroxides noch 0,3% 0,3% Ammoniumnickelsulfat beigemischt. Die Farbreaktion wurde nach spätestens 15 Minuten durch Auswaschen mit PBS gestoppt. Die entwickelten Schnitte konnten nun auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen werden, welche in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% zwei Minuten; 96%,100%, 100% je fünf Minuten) entwässert und nach Überführung in Xylol (zweimal fünf Minuten) mit Etellan® (Merck, Deutschland) eingedeckt.

2.5 Beschichtung der Objektträger

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

2.6 Referenzfärbungen

Zur exakten Zuordnung der tracerhaltigen Neurone wurden verschiedene Referenzfärbungen benachbarter Serien durchgeführt. Für die laterale Habenula dienten v.a. Kir3.2, Klüver-Barrera und Tyrosinhydroxylase als Marker für die verschiedenen Unterkerne (Geisler, et al., 2003). Die einzelnen Zellgruppen der Dorsalen Raphe wurden hauptsächlich immunhistochemisch durch Antikörperreaktionen gegen Serotonin dargestellt. In Vorversuchen wurden auch Klüver-Barrera-Färbungen durchgeführt und die Vertei-

lung verschiedener Neurotransmitter und Neuromodulatoren untersucht. Diese sind in Übersichtsform in Tabelle 2.1. dargestellt.

Transmitter/ Neuropeptid	Nachweis über	Bedeutung	Nachweis in Dorsaler Raphe
Katecholamine (Dopamin/ Noradrenalin)	Tyrosin- hydroxy- lase (TH)	TH katalysiert die Umwandlung von L-Tyrosin in Levodopa, TH dient als Marker katecholaminerger Zellen	(Allers and Sharp, 2003; Charara and Parent, 1998; Dahlstrom and Fuxe, 1964; Descarries, et al., 1986; Michelsen, et al., 2007; Pearson, et al., 1979; Stratford and Wirtshafter, 1990)
Noradrenalin	Dopamin- betahydro- xylase (DBH)	Die DBH katalysiert die Umwandlung von Dopamin in Noradrenalin, dient zu Differenzierung im Vergleich mit den TH-Ergebnissen	(Dahlstrom and Fuxe, 1964; Datiche and Cattarelli, 1996; Descarries, et al., 1986; Forloni, et al., 1987; Kwon, et al., 2000; O'Leary, et al., 2007; Pearson, et al., 1979; Stratford and Wirtshafter, 1990),
GABA	Glutamat- decar- boxylase (GAD65/ GAD67)	GAD katalysiert die Umwandlung von Glutamat in GABA. Bei Säugern existieren 2 Isoformen mit einem Molekulargewicht von 65kDA bzw. 67kDA. Vorkommen der GAD67: Somata und Nervenendigungen; GAD65: vorwiegend in Terminalen	(Allers and Sharp, 2003; Charara and Parent, 1998; Ford, et al., 1995; Gervasoni, et al., 2000; Kirouac, et al., 2004; Lee, et al., 1987; Melander, et al., 1986; Nishikawa and Scatton, 1983; Stamp and Semba, 1995; Wang, et al., 1994)
Galanin	direkt	Neuropeptid, moduliert GABAerge Transmission in DR	(Kuteeva, et al., 2008; Lu, et al., 2007; Melander, et al., 1986; Sharkey, et al., 2008)
Calbindin	direkt	Calciumbindendes Protein, Neuroprotektion (schützt vor Calciumüberladung),	(Aznar, et al., 2004; Baimbridge, et al., 1992; Charara and Parent, 1998)
Neurotensin	direkt	Neuromodulator, kolokalisiert mit verschiedenen Transmittern,	(Alexander and Leeman, 1998; Geisler and Zahm, 2006; Jolas and Aghajanian, 1996; Jolas and Aghajanian, 1997; Petkova-Kirova, et al., 2008)
Substanz-P- Rezeptor NK1	direkt	Neurokinin, kolokalisiert mit verschiedenen Neurotransmittern, wirkt modulatorisch (auf DA, 5-HT, NA),	(Baker, et al., 1991; Chan-Palay, et al., 1978; Charara and Parent, 1998; Hokfelt, et al., 1978; Lechner, et al., 1993; Li, et al., 1990; Ljungdahl, et al., 1978; Michelsen, et al., 2007; Moss and Basbaum, 1983; Pelletier, et al., 1981)
Acetylcho- lin	Cholin- Acetyl- transferase (ChAT)	ChAT katalysiert die Umwandlung von Acetyl-Coenzym A und Cholin zu Acetylcholin	(Datta, et al., 2009; Galindo-Charles, et al., 2008)

Tabelle 2.1: Die genaue Verteilung der o.g. Neurotransmitter und –modulatoren wurde aufgrund der Literaturhinweise untersucht und in die Auswertung einbezogen.

2.6.1 Kresylviolett-Färbung

Kresylviolettazetat ist ein basischer Farbstoff. Er färbt die Ribonucleinsäuren der Zellkerne blau und die Nissl-Körperchen (rauhes endoplasmatisches Retikulum) des Zytoplasmas violett an. Die Fasersysteme bleiben hell. Im Vergleich zur Klüver-Barrera-Färbung, welche zusätzlich myelinisierte Fasern darstellt, bietet die Kresylviolett-Färbung jedoch den Vorteil, dass sie nicht zu Schrumpfungsartefakten führt.

Für die Kresylviolett-Färbung wurden die in PBS (0,01 M NaH_2PO_4 in H_2O) frei flottierenden Hirnschnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und für maximal 30 Minuten an der Luft getrocknet, bevor sie zur Lipidextraktion 24 Stunden in 70% Ethanol gelagert wurden. Nach dem erneuten Waschen der Schnitte für 2 Minuten in entionisiertem Wasser, erfolgte für 30 Minuten die Färbung in 0,2% Kresyl-Violett-Lösung (0,2% Kresylviolett in 20 mM Acetat-Puffer [1,2 g Essigsäure in 1000 ml H_2O], pH 3,5). Nachfolgend wurden die Präparate erneut für 2 Minuten in entionisiertem Wasser gespült und für 5 Minuten in 70% Ethanol differenziert. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in 80%, 96%, 100%, 100% Ethanol für je 5 Minuten und die Überführung in Xylol für 10 Minuten, sowie die Einbettung in Entellan® -benetzte Deckgläschen.

2.6.2 Klüver-Barrera-Färbung

Die Klüver-Barrera-Färbung ist eine kombinierte Zell- und Markscheidenfärbung aus Kresylviolett und Luxolfastblue. Luxolfastblue ist ein basischer Farbstoff mit einer hohen Affinität zu Neurokeratin und eignet sich daher zur Darstellung von Myelinscheiden.

Die Gewebe-Schnitte wurden hierzu für 10 Minuten in 0,1M Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und anschließend unter zweimaligem Wechsel der Lösung in 70% Ethanol überführt, wo sie für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden. Am folgenden Tag erfolgte die Überführung des Gewebes in vorgewärmte Luxol-Fast-Blue-Lösung (LFB) (100 mg Solvent 38 in 100ml Ethanol [96%] und 0,5 ml Azetatpuffer [10%]). Hierin wurden die Schnitte über Nacht bei 56°C inkubiert. Nach dem erneuten Waschen des Hirngewebes in entionisiertes Wasser (Milli Q Purification System, Millipore-Milfort, UK) und PBS für je 3 Minuten, erfolgte die Fixierung in Litium-Carbonat-Lösung (0,05% in H_2O) für weitere 3 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte in 70% Ethanol differenziert (2 mal 3 Minuten) und zweifach in PBS gewaschen. Nach dem Färben der Mark-

scheiden wurden die Kryostatschnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen, für max. 30 Minuten luftgetrocknet und im Anschluss für 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte die Färbung mit Kresylviolett für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend durch das Spülen in Millipore (2 mal 5 Minuten) entfernt. Nach der Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 Minute in 70% Ethanol, 2 Minuten in 80% Ethanol, 5 Minuten in 96% und 2 mal 5 Minuten in 100% Ethanol) erfolgte die Überführung in Xylol (2 mal 5 Minuten) und die Einbettung in Entellan®.

2.7 Dokumentation und Auswertung

2.7.1 Lichtmikroskopie, graphische und photographische Dokumentation und Bildverarbeitung

Die Auswertung der Tracing-Versuche erfolgte lichtmikroskopisch an einem Leica-DMRB-Mikroskop (Leica, Bensheim, Germany). Alle Photographien wurden mit einer Digitalkamera (Olympus Camedia 4040, Auflösung 8 Millionen Pixel) aufgenommen. Das Bildmaterial wurde anschließend mit Adobe Photoshop CS 2.0 zusammengestellt und ggf. die Helligkeit und der Kontrast angeglichen. Die Zeichnung der Injektionsstellen in die Habenula erfolgte mit einem Zeichentubus (Leica), der an einem Leica-DMLS-Mikroskop adjustiert ist. Für die Digitalisierung der Bilder diente ein Scanner (HP PSC 1250, 1220 x720 Pixel).

2.7.2 statistische Betrachtungen und Auswertung

Die anterograden Studien wurden orientierend semiquantitativ ausgewertet. Die Angabe der retrograden Ergebnisse erfolgte primär quantitativ als Zellen pro Unterkern. Die inhaltliche Auswertung der retrograden Versuche erfolgte deskriptiv unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Größe der Injektionsstellen und der anterograden Tracingergebnisse. Die Größe der Injektionsstellen wurden näherungsweise über die Volumengleichung eines Ellipsoides ($V=3/4*\pi*a*b*c$) bestimmt. Lediglich im Fall MT05/04 ist der coronare Querschnitt der Injektionsstelle nicht elliptisch, sodass das Volumen nicht ideal errechnet werden konnte. Danach ergeben sich orientierend folgende Größenlevationen für die einzelnen Injektionsstellen der retrograden Versuche: 1 (MT99/02 und

MT57/02, kleinste Injektionsstellen); 1,33 (MT55/02); 1,5 (MT01/04); 3 (MT56/02); 3,75 (MT04/04, MT84/02), 5,1 (MT08/04); 5,63 (MT104/02); 6 (82/02); 7 (MT42/02); 9,33 (MT05/04); 10 (MT105/02, größte Injektionsstelle, 10 mal größer als MT99/02).

In die Auswertung der anterograden Studien gingen lediglich Button-tragend Axone in der Dorsalen Raphe ein. In den retrograden Studien wurden nur Zellen gewertet, bei denen ein Zellkern erkennbar war. Die Auswertung der Tracingergebnisse erfolgte in jeweils einer von insgesamt zehn Serien pro Gewebeblöckchen, d.h. in jedem zehnten Schnitt insgesamt. Bei einer Schichtdicke von 25µm beträgt der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Schnitten einer Serie 250µm. Bei einer durchschnittlichen Neuronengröße von 6 bis 30 µm ist eine Mehrfachzählung von Neuronen in den benachbarten Schnitten einer Serie (Abstand 250µm bei einer Schichtdicke von 25µm) nicht möglich. Geht man jedoch von der Überlegung aus, dass jedem Neuron nur eine Schichtebene zugeordnet ist (alle 25µm), muss von einer Überschätzung der Neuronenzahl pro visualisiertem Schnitt ausgegangen werden. Um das Ausmaß dieser Überschätzung zu bestimmen, berechneten wir einen Korrekturfaktor nach der Methode von Abercrombie (Abercrombie, 1946). An zwei Schnitten mit nominellen Schnittdicken von 20 µm und 30µm wurde an fünf verschiedenen Stellen mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv die effektive Dicke (z-Achse) gemessen (Williams, et al., 2003). In einem weiteren Schritt wurde an fünf Positionen Fokus-kontrolliert die relative Dicke eines Deckgläschens bestimmt und das System durch Messung der realen Dicke mit Hilfe einer Schieberlehre kalibriert (Williams, et al., 2003). Für die nominell 20µm dicken Kryostatschnitte konnte eine tatsächliche Dicke von 11µm gemessen werden. Die gemessene Schichtdicke für die nominell 30µm dicken Schnitte betrug 18µm. Für die gemessenen Zelldurchmesser in den beiden Schnitten ergaben sich nahezu identische Werte von 15,5 +/- 4,1µm und 16,7 +/- 4,3µm. Daraus ergibt sich nach der Formel von Abercrombie ein Korrekturfaktor von 0,467, sodass bei 25µm-Schnitten mit einem Overcount von 117% pro Schnitt gerechnet werden muss.

Tracer	Hersteller	Verwendete Konzentration	Applikationsstrom	Zeitdauer bis zur Perfusion
Anterograde Tracer				
Tetramethyl-rhodamin-Dextran-amin (TMR-DA)	Molecular Probes, USA	2,5% in H ₂ O	4 µA	6 bis 7 Tage
Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (Pha-L)	Vector, USA	2% in 0,01M Phosphat-Puffer	4 µA	6 bis 7 Tage
Retrograde Tracer				
Choleratoxin Untereinheit Beta(CTB)	List, Biological Lab., USA	1% in H ₂ O	1 µA	4 bis 20 Tage
Fluorogold (FG)	Fluorochrome, USA	1% in 0,1M Ca-codylate	1 µA	3 bis 6 Tage

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Tracer

Name	Spezies/ Herkunft	Dosierung	Hersteller
<i>Erstantikörper</i>			
G-a- Cholera toxin-Untereinheit beta	Ziege	1: 2.000	Medscand
Gp-a- Gaba-B Rezeptor	Meerschwein	1: 2.000	Chemicon
Gp-a- Neurotensin	Meerschwein	1: 5.000	Sigma, Deutschland
M-a- Calbindin	Maus	1: 2.000	Sigma
M-a- Neurofilament	Maus	1: 10.000	Dako MF
M-a- Tyrosin-Hydroxylase	Maus	1: 1.000	Chemicon
R-a- μ -Opiat Rezeptor	Kaninchen	1: 2.000	PharMingen, Deutschland
R-a- 5-Hydroxytryptamin	Kaninchen	1: 2.000	Sigma, Deutschland
R-a- Fluorogold	Kaninchen	1: 20.000	Chemicon, USA
R-a- Galanin	Kaninchen	1: 1.000	Peninsula Lab., USA
R-a- Glutamat-Decarboxylase 65	Kaninchen	1: 2.000	Chemicon, USA
R-a- Glutamat-Decarboxylase 67	Kaninchen	1: 2.000	Chemicon, USA
R-a- Kaliumanal Untereinheit Kir3.2	Kaninchen	1: 1.000	AG Veh, Charité
R-a- Phaseolus vulgaris leucoagglutinin	Kaninchen	1: 5.000	Vector/ Camon, Deutschland
R-a- Substanz P-Rez.NK1	Kaninchen	1: 1.000	Molekular Probes, USA
R-a- Tetramethylrhodamin-Dextranamin	Kaninchen	1: 4.000	Molekular Probes, USA
<i>Zweitantikörper</i>			
B-GaR	biotinyliertes goat-anti-rabbit- Immunglobulin G (IgG)	1: 2.000	Vector/Camon, Deutschland
B-HaG	biotinyliertes horse-anti-goat-IgG	1: 2.000	Vector/Camon, Deutschland
B-HaGp	biotinyliertes horse-anti-guinea pig-IgG	1: 2.000	Vector/Camon, Deutschland
B-HaM	biotinyliertes horse-anti-mouse-IgG	1: 2.000	Vector/Camon, Deutschland

Tabelle 2.3: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper.

Substanz	Zusammensetzung	Hersteller
Agarose		Serva, Deutschland
Ammoniumnickelsulfat	3g Ammoniumnickelsulfat in 100 ml H ₂ O	Fluka 09885, Deutschland
Azetat-Puffer	1,2 g Essigsäure in 1000 ml H ₂ O bei pH 4,0	FW 60.05; Riedel-de Haën, 33209
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)	Sigma A-7030, Deutschland
Cacodylate		Sigma, Deutschland
Cyanoferrat-Stock	823 mg Kaliumhexacyanoferrat-III (K ₃ [Fe(CN) ₆] in 10 ml H ₂ O	Sigma P-8183, Deutschland
DAB-Lösung	50 mg 3,3'-Diaminobenzidin in 1 ml H ₂ O	Sigma, Deutschland
Elite-ABC (Avidin/Biotinyl-Peroxidase Komplex)-Lösung	10 µl Elite A (Avidin H) und 10 µl Elite B (Biotinyl-Peroxidase) in 10 ml PBS-A (1:1000)	Vector/ Camon, Deutschland
Entellan®		Merck, Deutschland
Essigsäure		Merck, Deutschland
Ethanol		Merck, Deutschland
Ethylenglykol	42%	Merck, Deutschland
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd, 0,2% Pikrinsäure in 100 mM Phosphatpuffer	
Frostschutzlösung	2,2M Sucrose in 100mM Phosphatpuffer und 42% Ethylenglykol, pH 7,4	
Gelatine		Merck, Deutschland
Glutaraldehyd		Baker, Deutschland
Heparin	Heparin-Na-Ratiopharm® 25 000	Ratiopharm, Deutschland
Hexan		Merck, Deutschland
Imidazolösung	681 mg Imidazol in 10 ml H ₂ O, pH 7,6	Sigma-0125, Deutschland
Ketamin-Hydrochlorid	Ketamin-50-curamed®	CuraMED, Deutschland
Kobaltchlorid	CoCl ₂ 2x6H ₂ O	Sigma C-2644, Deutschland

Kresylviolett Lösung	1000mg Kresylviolettacetat in 500ml 20mM Acetat-Puffer bei pH 4,0	Sigma C-5042, Deutschland
Lithiumcarbonatlösung	0.01% Lithiumcarbonat in H ₂ O	Sigma, Deutschland
Longasteril 70		Fresenius, Deutschland
Luxolfastblue	Solvent 38; 100mg Solvent 38 in 100ml 96% Ethanol und 0,5ml 10% Essigsäure	Sigma, Deutschland
Maleat-Puffer	20 ml Maleat-Stock in 80 ml H ₂ O	
Maleat-Stock	11,6 g Maleinsäure in 200 ml H ₂ O bei pH 6.0	
Maleinsäure		Sigma M-0375, Deutschland
Natriumborhydrid		Sigma, Deutschland
Nachspüllösung	5% Saccharose in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4	
Natriumazidlösung	Natriumazid 10% in H ₂ O	Sigma, Deutschland
Natriumdihydrogen-Phosphat		Merck, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat		Merck, Deutschland
Natriumzitat		Fluka 71405
NGS	Normalziegeserum (Normal Goat Serum, 10% in PBS)	Interchem 301001, Deutschland
NHS	Normalpferdeserum (Normal Horse Serum, 10% in PBS)	Sigma, Deutschland
Paraformaldehyd	4%ig	Merck, Deutschland
PBS	Phosphate Buffer Saline; 150 mM Natriumchlorid in 10 mM Phosphatpufferlösung pH 7,4	
PBS-A Lösung	2 ml PBS-A Stock in 18 ml PBS	
PBS-A Stock	400 mg BSA in 20 ml PBS	
Phenylhydrazin	1:2.000	Merck 807250, Deutschland
Phosphatpuffer	0,01 M NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O	Merck, Deutschland
Pikrinsäure	0,2%	Merck, Deutschland
Sucrose	Saccharose	Merck, Deutschland

Thimerosallösung	1% Thimerosal in H ₂ O	SigmaT-5125, Deutschland
Tris-Puffer	1:20, 12,2g Trishydroxymethylaminomethan in 100ml H ₂ O, pH 7,4	
Triton	10% Triton X-100 in H ₂ O	

Tabelle 2.4: Verwendete Chemikalien und Lösungen

3. Ergebnisse

3.1 Die Morphologie und Zytoarchitektur der Dorsalen Raphe

Die Dorsale Raphe (DR) wird bei der Ratte im Allgemeinen in fünf Subareale eingeteilt – in die dorsale, ventrale, ventrolaterale, rostrale und kaudale DR (Paxinos and Watson, 1989). Diese Unterteilung orientiert sich an den zytoarchitektonischen Charakteristika der Neurone in der Nissl-Färbung und der Verteilung serotoninerger Zellen. Bereits in der lichtmikroskopischen Betrachtung finden sich jedoch Areale unterschiedlicher Zellmorphologie und Zelldichte innerhalb dieser Subareale. Dies deutet darauf hin, dass die Substruktur der DR differenzierter ist als bisher angenommen. Die Absicherung einer auf morphologischer Basis vermuteten Feindifferenzierung von Kerngebieten ist häufig über chemoarchitektonische Kriterien möglich (Geisler, et al., 2003). Die Existenz verschiedener Neurotransmitter und Neuromodulatoren in der Dorsalen Raphe ist bekannt (Tab. 2.1, S. 37). Eine detaillierte Übersicht über die Lokalisation dieser Neuromarker ist jedoch bisher lediglich für das Primatenhirn verfügbar (Charara and Parent, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst versucht, die Existenz potentieller Subareale in der DR durch die Analyse der genauen Lokalisation von Marker-Molekülen zu verifizieren. Dazu wurde die Verteilung einer Reihe von Neurotransmittern, Neuromodulatoren sowie der zugehörigen Enzyme (Tyrosinhydroxylase (TH), Dopamin-Beta-Hydroxylase (DBH), Glutamatdecarboxylase (GAD₆₅/GAD₆₇), Calbindin (Calb), Galanin (Gala), Substanz-P-Rezeptor NK1 (NK1-R), Neurotensin (NT), Cholinacetyltransferase (ChAT)) innerhalb der Grenzen der DR immunocytochemisch untersucht.

Begriffserklärung

Zum besseren Verständnis der anatomischen Strukturen wird im Folgenden der Begriff „**Zone**“ für den jeweiligen Abschnitt der Dorsalen Raphe in ihrer rostrokaudalen Ausdehnung benutzt. Man unterscheidet eine rostrale (rDR) von einer zentralen (zDR) und einer kaudalen (kDR) Zone. Die zentrale Zone lässt sich wiederum in einen rostralen und einen kaudalen Anteil einteilen. Der Begriff „**Bereich**“ bezieht sich hingegen im Folgenden auf die Lage der anatomischen Strukturen in der Koronar-

ebene - also die ventrodorsale sowie mediolaterale Lokalisation bezogen auf die Longitudinalachse des Hirnstammes (Meynert-Achse). Die Zentrale Zone der DR hat den höchsten Neuronenanteil. Die Dorsale Raphe besitzt in diesem Teil seitliche Ausläufer - die so genannten „Wings“.

Für die Darstellung der morphologisch differenzierbaren Subareale der DR wurden entlang der rostrokaudalen Achse vier repräsentative Ebenen gewählt, in denen die Subareale am deutlichsten sind (Abb. 3.1, Seite 59). Die erste Ebene befindet sich am Übergang von der rostralen (rDR) zur zentralen (zDR) Zone der DR (Abb. 3.1A und A', S. 59). Sie liegt auf der Höhe des kaudalen Endes des Nucleus trochlearis (Bregma -7,5 mm; (Paxinos and Watson, 1989). Die zweite Ebene befindet sich bei Bregma -7,8 mm in der rostralen zDR (Abb. 3.1B und B', S. 59). Die kaudale zDR ist in der dritten Ebene dargestellt (Abb. 3.1C und C', S. 59). Sie befindet sich bei Bregma -8,0 mm. Die vierte Ebene (Abb. 3.1D und D', S. 59) stellt den Übergang von der kaudalen zDR in die kDR dar und liegt bei Bregma -8,3 mm.

3.1.1 In der Dorsalen Raphe lassen sich zehn Subareale morphologisch abgrenzen
Nach lichtmikroskopischen Kriterien lassen sich anhand der Morphologie und Verteilung der Nervenzellsomata und des Neuropils in der Kresyl-Violett bzw. Klüver-Barrera-Färbung sowie unter Berücksichtigung der Expression verschiedener Neurotransmittern und Neuromodulatoren insgesamt zehn Unterkerne innerhalb der DR abgrenzen.

Die meisten morphologisch abgrenzbaren Unterkerne liegen in der zentralen Zone der DR. Dazu gehören der ventromediale, der interfaszikuläre, der ventromediane, der intermediomediane, der dorsomediane, der dorsolaterale, der intermediolaterale und der ventrolaterale Unterkerne. Außerhalb der zentralen Zone liegen der rostrale und der kaudale Unterkerne der DR.

3.1.1.1 Der rostrale Unterkerne der Dorsalen Raphe

Der rostrale Unterkerne der DR (DRr) befindet sich auf der Höhe des Nucleus oculomotorius und des rostralen Nucleus trochlearis im Mesencephalon. Er ist klein und

daher in Abb.3.1. (S. 59) nicht, wohl aber in Abb. 3.7 (S. 70) dargestellt. Der DRr besteht aus einer schmalen, vom Aquädukt in Richtung Fasciculus longitudinalis medialis verlaufenden Zellgruppe in der Medianebene des Mittelhirns und bildet zusammen mit dem interfazikulären Unterkern die rostrale Zone der DR. In diesem Gebiet finden sich verhältnismäßig wenige **serotoninerge** Nervenzellen. Die Neurone des DRr sind im Gegensatz zu den fusiformen Somata des interfazikulären Unterkerns überwiegend triangulär und multipolar. Sie lassen sich in der Nissl-Färbung nur schwer von den Neuronen des Periaquäduktalen Grau (PAG) zu unterscheiden. Die Dichte der myelinisierten Fasern ist in der rDR und rostralen zDR am höchsten, während sie nach kaudal abnimmt. Im DRr lassen sich zahlreiche katecholaminerge (**TH**-positive) und einige noradrenerge (**DBH**-exprimierende) Nervenfasern visualisieren. Besonders hoch ist der Anteil der TH-positiven Nervenfasern in den ventralen Anteilen des DRr am Übergang zum interfazikulären Unterkern. Im dorsalen DRr liegen jedoch auch einige TH-positive Somata. Der DRr enthält deutlich weniger **GAD₆₅**-positive Fasern als die weiter kaudal gelegenen Zonen der DR (Abb. 3.2F, S. 60). **GAD₆₇**-exprimierende Neurone kommen nur vereinzelt vor. Einige Nervenfasern im ventralen Bereich des Unterkerns sowie einzelne Somata im dorsalen Bereich des DRr exprimieren das calciumbindende Protein **Calbindin**. Das Neuropeptid **Galanin** findet sich hingegen nur in einigen Nervenfasern und nicht in den Zellkörpern der Neurone des DRr. Der Substanz-P-Rezeptor **NK1-R** wird von einigen Somata des DRr exprimiert. Zusätzlich finden sich im dorsalen Bereich des Unterkerns auch NK1-R-positiven Nervenfasern. Einzelne Nervenfasern am Übergang in die zentrale Zone der DR exprimieren das Neuropeptid **Neurotensin**. Der DRr besitzt keine cholinergen Neurone (**ChAT** negativ).

3.1.1.2 Der interfazikuläre Unterkern der DR

Der interfazikuläre Unterkern (DRif) erstreckt sich entlang der gesamten rostrokaudalen Ausdehnung der DR (Abb. 3.1A-D, S. 59). Er liegt zwischen den beiden Fasciculi longitudinales mediales (medial longitudinal fasciculus, mlf) im ventralen Bereich der DR. Im Bereich der rDR dehnt sich der DRif im Vergleich zu seinen kaudalen Anteilen weiter nach dorsal in Richtung Aquädukt aus und geht dann in den DRr über. Der DRif zeichnet sich durch kleine fusiforme Neurone und ein feines, schwach

myelinisiertes Neuropil aus. Sowohl Fasern als auch Neurone sind streng dorsoventral ausgerichtet. Die Mehrzahl dieser Neurone enthält **Serotonin**. Nur in der kaudalen zDR finden sich keine 5-HT-positiven Somata, aber serotonerge Fasern im DRif (Abb. 3.1A-D, S. 59). **Calbindin**-positive Fasern durchziehen den DRif fast in seiner gesamten rostrokaudalen Ausdehnung. In der rostralen und kaudalen Zone der DR sind diese Fasern median angeordnet, während sie in der rostralen zDR und der kaudalen zDR diese paramedian verlaufen. Nur der paramediane Bereich der zentralen Zone besitzt keine Calbindin-positiven Fasern (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, Abb. 3.5C, S. 60 ff.). **TH** und **DBH** sind im DRif ähnlich verteilt, wobei die Anzahl der TH-positiven Fasern generell etwas höher ist, als die Zahl der DBH-positiven Nervenfasern. Im rostralen Anteil des DRif findet sich ein dichtes Netz TH-exprimierender Fasern, während die kaudale Zone nur vereinzelt TH-positive Fasern enthält (Abb. 3.2B, Abb. 3.3D, Abb. 3.4F, S. 60 ff.). Der DRif wird von zahlreichen **GAD₆₅**-positive Nervenfasern durchzogen, während der Anteil an **GAD₆₇**-positiven Neuronen sehr gering ist (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, Abb. 3.5E, S. 60 ff.). Lediglich in der rostralen Zone finden sich einige kleine **GAD₆₇** exprimierende Somata und vereinzelte Fasern (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 f.). Das Neuropeptid **Galanin** wird in von vielen Nervenfasern in der rostralen Zone des DRif exprimiert. In der zentralen Zone besitzt der DRif kleinere Galanin-positive Somata. Der kaudale Bereich des DRif besitzt sowohl einige Galanin-haltige Fasern als auch Somata (Abb. 3.2C, Abb. 3.3B, Abb. 3.4B, Abb. 3.5D, S. 60 ff.). In den rostralen Anteilen des DRif exprimieren sowohl einige Fasern als auch kleinere fusiforme Somata den somatodentritischen **NK1-Rezeptor**. Weiter nach kaudal nimmt die NK1-R-Expression weiter ab, sodass sich nur noch vereinzelt NK1-Rezeptor tragende Neurone nachweisen lassen. Insgesamt ist der Anteil NK1-R-positiver Neurone im DRif eher niedrig (Abb. 3.2E, Abb. 3.3C, Abb. 3.4C, S. 60 ff.). Das Neuropeptid **Neurotensin** (NT) lässt sich nur in sehr wenigen Nervenfasern des DRif nachweisen (Abb. 3.2D, Abb. 3.3E, Abb. 3.4D, Abb. 3.5A, S. 60 ff.). Der DRif grenzt sich dadurch in kDR gut vom NT-reichen Nucleus rhabdoideus (Rbd) ab (Abb. 3.5A, S. 63), welcher als medialer Anteil der medianen Raphe angesehen wird (Paxinos and Watson, 1989). Der DRif besitzt keine **cholinergen** Neurone (Abb. 3.5B, S. 63, für übrige Ebenen nicht gezeigt).

3.1.1.3 Der ventromediale Unterkern der DR

Der *ventromediale Unterkern der DR (DRvml)* erstreckt sich von der rostralen zentralen Zone bis in Übergangszone zur kaudalen Dorsalen Raphe (Abb. 3.1 A bis D, S. 59). Die Neurone des DRvml sind größer als die des DRif und des DRvmn. Sie haben eine runde Form und ihr Zytoplasma ist stark basophil (Abb. 3.1 A', B', C', D', S. 59).

Der Anteil an **serotoninerger** Neuronen ist sehr hoch. Diese sind überwiegend nach dorsolateral orientiert (Abb. 3.1 A, B, C, D, S. 59). Das Neuropil des DRvml ist fein myelinisiert und ebenfalls nach dorsolateral ausgerichtet (Abb. 3.1 A', B', C', D', S. 59). Die beiden Neuropeptide Galanin und Neurotensin sowie Calbindin und Tyrosinhydroxylase besitzen einen ausgeprägten rostrokaudalen Gradienten im DRvml. **Calbindin**-positive Fasern bilden ein dichtes Fasernetz am Übergang von der rostralen in die zentrale Zone der DR, während der DRvml in der zentralen Zone bereits kaum noch Calbindin-immunoreaktive Fasern besitzt (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, Abb. 3.5 C, S. 60 ff.). Das Neuropeptid **Galanin** lässt sich ebenfalls in der rostralen zentralen Zone in zwei Fasersträngen dorsomedial des mlf im DRvml nachweisen (Abb. 3.2C, S. 60). Weiter kaudal finden sich im DRvml keine Galanin-positiven Nervenfasern mehr, jedoch Galanin-haltige Somata. Der Anteil der Galanin-positiven Nervenkörper nimmt nach kaudal ebenfalls stark ab (Abb. 3.2C, Abb. 3.3B, Abb. 3.4B, Abb. 3.5D, S. 60 ff.). Im DRvml verlaufen am Übergang von der rDR zur zDR zwei dichte **NT**-positive Faserbündel in dorsoventraler Orientierung (Abb. 3.2D, S. 60). Weiter kaudal kommen im DRvml nur noch wenige NT-positve Nervenfasern vor (Abb. 3.2D, Abb. 3.3E, Abb. 3.4D, Abb. 3.5A, S. 60 ff.). Im DRvml finden sich in der rostralen zDR ebenfalls zwei starke **TH**-exprimierende Faserbündel (Abb. 3.2B, S. 60). Diese verlaufen im Vergleich zu den NT-positiven Neuriten etwas weiter medial im Unterkern und besitzen ebenfalls eine dorsoventrale Orientierung. Im rostralen DRvml gibt es zusätzlich auch einige TH-positve Somata. Weiter kaudal besitzt der DRvml nur noch wenige TH-positve Nervenfasern (Abb. 3.2B, Abb. 3.3D, Abb. 3.4F, S. 60 ff.). Im DRvml kommen nur einzelne **DBH**-positive Nervenfasern vor (Abb. 3.2H, Abb. 3.3H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). GABAerge Neurone sind über den gesamten Unterkern verteilt. Das Isoenzym **GAD₆₇** kommt vor allem in den Neuronen der zentralen Zone vor. Die Zelldichte der GAD₆₇-positiven Somata ist im DRvml höher als in

den dorsalen Bereichen der DR (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 f.). Die Färbung gegen GAD_{65} ist insgesamt kräftiger im Vergleich zu GAD_{67} . Der DRvml besitzt in seiner gesamten Ausdehnung ein dichtes Fasernetz aus **GAD₆₅**-exprimierenden Nervenfasern (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, Abb. 3.5E, S. 60 ff.). Der DRvml besitzt keine **ChAT**-positiven Neurone (Abb. 3.5B, S.63, in übrigen Ebenen nicht dargestellt).

3.1.1.4 Der ventromediane Unterkern der DR

Der ventromediane Unterkern (DRvmn) besitzt verglichen mit dem DRvml ein lockeres Zellbild. Seine Neurone haben vornehmlich runde Somata. Im DRvmn liegen jedoch auch kleinere, eher fusiforme Neurone. Sowohl die Dichte der Neurone als auch der Anteil **serotoninerger** Neurone ist niedriger als im DRvml, jedoch höher als in den dorsal angrenzenden Unterkernen (DRimn, DRil). Insgesamt nimmt der Zelldichte nach kaudal hin etwas ab (Abb. 3.1A-C, A'-C', S. 59). Der Gehalt an **Calbindin**-positiven Neuronen ist gering. Lediglich in der rostralen zentralen Zone der DR finden sich im DRvmn vereinzelt Calbindin-haltige Somata und Nervenfasern (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, Abb. 3.5C, S. 60 ff.). Das Neuropeptid **Galanin** kommt ebenfalls nur in wenigen Neuronen des Unterkerns vor. Im rostralen DRvmn finden sich vornehmlich Galanin-haltige Nervenfasern, in den zentralen Anteilen des DRvmn eher Galanin-haltige Somata (Abb. 3.2C, Abb. 3.3B, Abb. 3.4B, S. 60 ff.). Die kaudalen Anteile des DRvmn enthalten kaum Galanin (Abb. 3.4B, Abb. 3.5D, S. 62 f.). Der somatodendritische **NK1-Rezeptor** lässt sich auf vielen kleinen Neuronen des DRvmn nachweisen. NK1-R-positive Fasern aus dem DRimn strahlen vereinzelt in den DRvmn aus (Abb. 3.2E, Abb. 3.3C, Abb. 3.4C, S. 60 ff.). Der DRvmn ist in seiner gesamten rostrokaudalen Ausdehnung von einem relativ dichten Netz **GAD₆₅**-positiver Nervenfasern durchzogen. Lediglich der angrenzende DRvl besitzt in der rostralen zDR einen noch höheren Anteil an GAD_{65} -exprimierenden Nervenfasern (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, Abb. 3.5E, S. 60 ff.). Das Isoenzym **GAD₆₇** lässt sich hingegen vornehmlich in den Anteilen der rostralen und rostralen zentralen Zone des DRvmn nachweisen. In der rDR befinden sich sowohl GAD_{67} -positive Fasern als auch kleine, fusiforme Somata, in der zDR hingegen nur noch Somata (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 f.). Der DRvmn wird in der rDR und rostralen zDR in seinen lateralen Bereichen von zwei dichten Faserbündeln durchzogen, welche **TH**-exprimieren (Abb. 3.2B, Abb.

3.3D, S. 60 f.). Weiter kaudal finden sich nur vereinzelt TH-positive Neurone und Fasern im Unterkern (Abb. 3.4F, S. 62). Der DRvmn wird ebenfalls von einigen **DBH**-exprimierenden Fasern durchzogen. Im Vergleich zu den TH-positiven Nervenfasern ist ihr Anteil jedoch viel geringer und ihre Verteilung eher diffus (Abb. 3.2H, Abb. 3.3H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). Der DRvmn besitzt keine Immunreaktivität für **Cholinacetyltransferase** (Abb. 3.5B, S. 63).

3.1.1.5 Der intermediomediane Unterkern der DR

Der intermediomediane Unterkern (DRimn) besteht aus vorwiegend kleinen fusiformen und einigen mittelgroßen ovalen Neuronen. Die Zelldichte nimmt nach kaudal hin ab. In der kaudalen zDR lassen sich einige schwach myelinisierten Nervenfasern nachweisen, welche mediolateral orientiert sind. Nur wenige der Nervenzellen enthalten **Serotonin**. (Abb. 3.1 A-D, A'-D', S. 59). Der DRimn besitzt einen sehr geringen Anteil an **Calbindin**-positiven Neuronen. Es lassen sich nur vereinzelt eingestreute Calbindin-haltige Somata und Fasern nachweisen (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, Abb. 3.5C, S. 60 ff.). Der Anteil an **Galanin**-positiven Nervenzellen- und Nervenfasern ist ebenfalls sehr gering. In der rDR und der rostralen zDR wird der DRimn von einigen Galanin-haltigen Nervenfasern durchzogen. In der zentralen Zone grenzt sich der DRimn durch das Fehlen von Galanin-haltigen Neuronen und Fasern deutlich von den anderen Unterkernen ab (Abb. 3.2C, Abb. 3.3B, Abb. 3.4B, Abb. 3.5D, S. 60 ff.). Der DRimn wird in seiner gesamten Ausdehnung von einem Netz **neurotensinhaltiger** Axone durchzogen. Eine besonders hohe Anzahl findet sich in der rostralen zDR (lateraler Bereich des DRimn) und der kaudalen zDR (gute Abgrenzung gegen NT-negativen DRdmn) (Abb. 3.2D, Abb. 3.3E, Abb. 3.4D, Abb. 3.5A, S. 60 ff.). Das auffälligste Merkmal des DRimn ist sein extrem hoher Gehalt an **NK1-Rezeptor**-exprimierenden Nervenfasern und Somata. Insbesondere in der rostralen zentralen Zone konvergieren im DRimn zahlreiche NK1-Rezeptor exprimierender Dendriten (Abb. 3.3C, S. 61). Weiter rostral und kaudal ist der Gehalt an NK1-Rezeptor-positiven Nervenfasern geringer, sodass die im DRimn gelegenen NK1-positiven Somata sichtbar werden (Abb. 3.2E, Abb. 3.3C, Abb. 3.4C, S. 60 ff.).

Der DRimn wird von einem feinen Netz **GAD₆₅**-positiver Nervenfasern durchzogen, wobei ihr Anteil von rostral nach kaudal zunächst abnimmt. Am Übergang von der

zDR zur kDR besitzt der DRimn jedoch wieder ein sehr dichtes Netz aus **GAD₆₅**-exprimierenden Nervenfasern (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, Abb. 3.5E, S. 60 ff.). **GAD₆₇**-haltige Neurone finden sich vor allem in den rostralen Anteilen der zDR. Nach kaudal hin wird ihr Anteil sehr gering (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 f.). Der DRimn besitzt kaum **TH**-Immunoreaktivität. Nur am Übergang zu rDR wird der Unterkern von einigen TH-positiven Nervenfasern durchzogen. In der zDR grenzt er sich deutlich gegen die TH-positiven DRdl und DRil ab (Abb. 3.2B, Abb. 3.3D, Abb. 3.4F, S. 60 ff.). Der DRimn besitzt einige, über den gesamten Unterkern gleichmäßig und netzartig verteilte **DBH**-exprimierende Nervenfasern (Abb. 3.2H, Abb. 3.3H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). **Cholinerge** Neurone finden sich im DRimn nicht (ohne Abbildung).

3.1.1.6 Der dorsomediane Unterkern der DR

Der dorsomediane Unterkern (DRdmn) besitzt eine relativ kurze rostrokaudale Ausdehnung (Abb. 3.1A-C, A'-C', S. 59). Er fällt besonders durch seine dicht gepackten Neurone auf. Diese sind überwiegend groß, oval und zeigen ein stark basophiles Zytoplasma mit deutlich abgrenzbaren Nucleolus. Nur wenige myelinisierte Fasern durchziehen den DRdmn in ventrolateraler Orientierung. Der Anteil an **serotoniner-gen** Neuronen ist sehr hoch (Abb. 3.1 A-D, S. 59). Der DRdmn ist überwiegend **Calbindin**-negativ. Lediglich in der rostralen zDR finden sich einige Somata und Nervenfasern, weiter kaudal nur vereinzelte Somata. Der DRdmn grenzt sich dadurch deutlich von den Calbindin-reicheren lateralen Unterkernen ab (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, S. 60 ff.). **Galanin** findet sich lediglich in einigen Nervenfasern des rostralen Anteils sowie einzelnen Somata des kaudalen Anteils des Unterkerns (Abb. 3.2C, Abb. 3.3B, Abb. 3.4B, S. 60 ff.). In den rostralen Anteilen des DRdmn verlaufen **neurotensinhaltige** Nervenfasern in dorsoventraler Orientierung, in der zDR sind diese weniger dicht gelegen und verlaufen netzartig. In der kaudalen zDR grenzt sich der NT-negative DRdmn deutlich gegen den NT-positiven DRimn ab (Abb. 3.2D, Abb. 3.3E, Abb. 3.4D, S. 60 ff.). **NK1-Rezeptor**-positive Nervenfasern finden sich vor allem in den rostralen Anteilen des Unterkerns. Weiter kaudal enthält der DRdmn weniger Fasern, jedoch kleine NK1-R-positive Somata (Abb. 3.2E, Abb. 3.3C, Abb. 3.4C, S. 60 ff.). Der gesamte DRdmn besitzt ein relativ dichtes Netz aus **GAD₆₅**-immunoreaktiven Neuriten (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, S. 60 ff.). In den rostra-

len Anteilen gibt es einige **GAD₆₇**-positive Somata und Nervenfasern (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 f.).

Der DRdmn besitzt abgesehen von seinen rostralen Anteilen kaum **TH**-positive Fasern. Lediglich die Randereiche des Unterkerns werden von TH-positiven Fasern aus benachbarten Strukturen durchquert (z.B. subependymales, dopaminerges Fasernetz des PAG, DRdl, DRil) (Abb. 3.2B, Abb. 3.3D, Abb. 3.4F, S. 60 ff.). **DBH**-positive Nervenfasern bilden ein lockeres Netz im DRdmn ohne rostrokaudalen Gradienten (Abb. 3.2H, Abb. 3.3H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). Im DRdmn finden sich keine **cholinergen** Neurone (ohne Abbildung).

3.1.1.7 Der dorsolaterale Unterkern der DR

Nur in der zentralen Zone der DR finden sich die charakteristischen seitlichen Ausläufer („Wings“) (Abb. 3.1B und B', C und C', S. 59). Sie bestehen aus je drei Unterkernen auf jeder Seite (dorsolateraler Unterkern: DRdl; intermediolateraler Unterkern: DRil; ventrolateraler Unterkern: DRvl). Am Übergang zur rostralen und kaudalen Zone sind die Wings nur noch rudimentär vorhanden (Abb. 3.1A und A'; Abb. 3.1D und D', S. 59). Im kaudalen Bereich der zentralen Zone wird der DRdl durch den sich in Richtung Aquädukt ausdehnenden DRil in je zwei Anteile unterteilt (Abb. 3.1C und C', S. 59). Das Zellbild im DRdl ist sehr gemischt. Er besteht aus überwiegend mittelgroßen fusiformen und einigen kleineren ovaloiden Zellen. Dazwischen liegen eingestreute größere runde oder dreieckige Neurone. Die Neuronendichte ist insgesamt geringer als in den medianen Unterkernen, jedoch im Vergleich zu den beiden anderen lateralen Unterkernen am höchsten. Der DRdl enthält wenige, nach kaudal hin zunehmend myelinisierte Fasern (Abb. 3.1A'-D', S. 59). Der Anteil **serotoninerger** Nervenzellen ist durchschnittlich. Dabei exprimieren vor allem die größeren und triangulären Neurone 5-HT. Ihre Fortsätze lassen sich über relativ weite Strecken verfolgen und bilden teilweise Faserneflechte (Abb. 3.1A-D, S. 59). Der DRdl besitzt einen hohen Anteil **Calbindin**-haltiger Neurone. Insbesondere in den rostralen Anteilen des Unterkerns lassen sich auch einige Calbindin-haltige Nervenfasern nachweisen (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, Abb. 3.5C, S. 60 ff.). **Galanin** kommt vor allem in den rostralen Anteilen des Unterkerns vor. Insbesondere in der rostralen zDR lassen sich zahlreiche Galanin-haltige Nervenfasern im DRdl, DRil und DRvl nachwei-

sen. Eine Differenzierung der drei Unterkerne untereinander ist durch die Galanin-Immunhistochemie nicht möglich. Weiter kaudal lassen sich einzelne, sehr kleine Galanin-exprimierende Nervenzellen visualisieren (Abb. 3.2C, Abb. 3.3B, Abb. 3.4B, Abb. 3.5D, S. 60 ff.). Der DRdl besitzt einen relativ hohen Anteil **Neurotensin**-haltiger Fasern. Ihr Anteil nimmt von rostral nach kaudal hin ab (Abb. 3.2D, Abb. 3.3E, Abb. 3.4D, Abb. 3.5A, S. 60 ff.). Nur wenige Somata und Nervenfasern des DRdl exprimieren den **Substanz-P-Rezeptor NK1-R**. Lediglich in der kaudalen zDR finden sich häufiger NK1-Rezeptor-positive kleine Somata (Abb. 3.2E, Abb. 3.3C, Abb. 3.4C, S. 60 ff.). Der DRdl besitzt ein dichtes **GAD₆₅**-positives Fasernetz. Die Nervenfaserdichte nimmt von rostral nach kaudal hin stetig zu (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, Abb. 3.5E, S. 60 ff.). Der DRdl besitzt ausserdem mehr **GAD₆₇**-haltige Neurone (Somata und Fasern) als der DRdmn und die beiden lateralen Unterkerne DRil und DRvl (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 ff.). Der DRdl zeichnet sich durch ein sehr dichtes Netz **TH**-haltiger Nervenfasern aus (Abb. 3.2B, Abb. 3.3D, Abb. 3.4F, S. 60 ff.). Von allen Unterkerne der DR besitzt der DRdl den größten Anteil an **DBH**-immunoreaktiven Nervenfasern. Weiter kaudal lassen sich auch einige Somata in den weniger dicht liegenden Nervenfasernetzen nachweisen (Abb. 3.2H, Abb. 3.3H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). Das auffälligste Merkmal des DRdl ist, sein Gehalt an **cholinergen** Neuronen in seinen kaudalsten Anteilen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eingewanderte Neurone aus dem LDTg (Abb. 3.5B, S. 63).

3.1.1.8 Der intermediolaterale Unterkerne der DR

Die Neuronendichte im intermediolateralen Unterkerne der DR (DRil) ist sehr gering. Die Somata der Nervenzellen sind eher klein und oval bis fusiform. Die fusiformen Neurone besitzen eine mediolaterale Orientierung. Der DRil enthält mehr myelinisierte Fasern als der DRdl. Diese sind ebenfalls von medial nach lateral ausgerichtet (Abb. 3.1A'-C', S. 59). Der Anteil **serotoninerger** Neurone ist eher gering (Abb. 3.1A-C, S. 59). Wie alle lateralen Unterkerne, so enthält auch der DRil viele **Calbindin**-positive Somata und Fasern. Dabei gibt es einen von rostral nach kaudal fallenden Gradienten (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, S. 60 ff.). Der DRil besitzt in seinen rostralen Anteilen einen hohen und in den kaudalen Anteilen einen geringen Gehalt an **Galanin**-haltigen Fasern. In der rostralen zDR grenzt sich der DRil deutlich vom

Galanin-negativen DRimn ab. In der kaudalen zDR sind vereinzelt Galanin-haltige Somata nachzuweisen (Abb. 3.2C, Abb. 3.3B, Abb. 3.4B, S. 60 ff.). Der DRil besitzt wie alle lateral gelegenen Unterkerne nur einzelne **NK1-Rezeptor**-exprimierende Neurone (Abb. 3.2E, Abb. 3.3C, Abb. 3.4C, S. 60 ff.). Der DRil ist in seiner gesamten Ausdehnung von einem mitteldichten **NT**-haltigem Fasernetz durchzogen. In der rostralen zDR ist der Anteil NT-positiver Neuriten im DRil besonders hoch (Abb. 3.2D, Abb. 3.3E, Abb. 3.4D, S. 60 ff.). Der DRil besitzt vor allem in seinen weiter kaudal gelegenen Anteilen ein relativ dichtes Netz aus katecholaminergen (**TH**-positiven) Nervenfasern (Abb. 3.2B, Abb. 3.3D, Abb. 3.4F, S. 60 ff.). Der Anteil an **DBH**-exprimierenden Nervenfasern ist im Vergleich zur TH im DRil deutlich geringer (Abb. 3.2H, Abb. 3.3H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). Im DRil lassen sich keine **cholinergen**, jedoch einige **GABA**erge Neurone nachweisen. In der immunhistochemischen Färbung gegen **GAD₆₇** lassen sich einige kleine Neurone und einzelne Fasern vor allem in den weiter rostral gelegenen Anteilen des Unterkerne nachweisen (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 ff.). Der DRil wird besitzt ein dichtes Fasernetz aus **GAD₆₅**-positiven Nervenfasern (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, S. 60 ff.).

3.1.1.9 Der ventrolaterale Unterkerne der DR

Neben vereinzelt größeren, runden Zellen sind die Neurone des ventrolateralen Unterkerne (DRvl) überwiegend klein und fusiform. Insgesamt ist die Neuronendichte sehr gering (Abb. 3.1A'-D', S. 59). Nur wenige Neurone enthalten **Serotonin** (Abb. 3.1A-D, S. 59). Der DRvl enthält relativ viele myelinisierte Fasern, welche nach dorso-lateral verlaufen. (Abb. 3.1A'-D', S. 59). Verglichen mit dem DRdl und DRil enthält der DRvl nur wenige **Calbindin**-haltige Neurone und Nervenfasern. Diese liegen vor allem in den rostralen Anteilen des Unterkerne (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, S. 60 ff.). Einige Nervenfasern des DRvl der rostralen zDR enthalten **Galanin** (Abb. 3.3B, S. 61). Weiter rostral und kaudal finden sich deutlich weniger Galanin-positive Neuriten, jedoch vereinzelt Somata im DRvl (Abb. 3.2C, Abb. 3.4B, S. 60, S. 62). In zahlreichen Nervenfasern des rostralen DRvl kommt **Neurotensin** vor. Weiter kaudal ist der Anteil der NT-positiven Nervenfasern deutlich geringer (Abb. 3.2D, Abb. 3.3E, Abb. 3.4D, S. 60 ff.). Nur wenige Nervenfasern und Somata des DRvl exprimieren den **Substanz-P-Rezeptor NK1**. (Abb. 3.2E, Abb. 3.3C, Abb. 3.4C, S. 60 ff.). In der

rostralen zDR wird der DRvl von den Ausläufern der beiden **TH**-positiven Faserbündel durchzogen, welche vom Fasciculus longitudinalis medialis (mlf) zum Aquädukt ziehen (Abb. 3.2B, S. 60). Weiter kaudal ist der DRvl überwiegend TH-negativ (Abb. 3.3D, Abb. 3.4F, S. 61 f.). Auch der Anteil an **DBH**-positiven Nervenfasern ist äußerst gering (Abb. 3.2H, Abb. 3.3H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). **Cholinerge** Neurone finden sich im DRvl nicht (ohne Abbildung). In den rostralen Anteilen des Unterkerns finden sich zahlreiche **GAD₆₅**-haltige Nervenfasern. Ihr Anteil nimmt nach kaudal hin ab (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, S. 60 ff.). Das Isoenzym **GAD₆₇** lässt sich in ebenfalls überwiegend rostral im DRvl nachweisen, während der Anteil der **GAD₆₇**-positiven Somata und Fasern nach kaudal hin abnimmt (Abb. 3.2G, Abb. 3.3F, S. 60 f.).

3.1.1.10 *Der caudale Unterkern der Dorsalen Raphe*

Der caudale Unterkern der DR (**DRc**) erstreckt sich bis ins Rhombencephalon (Abb.3.7, S. 70). Er beginnt auf Höhe des Nucleus tegmentalis ventralis (VTg) und reicht bis zur kaudalen Grenze des Nucleus tegmentalis dorsalis (DTg) bei Bregma - 9,3 mm (Abb. 3.1D, S. 59). Der DRc besteht aus einem schmalen, dorsoventral orientierten Zellcluster in der Medianebene des Hirnstammes. Dabei liegen lateral überwiegend kleine fusiforme Neurone und weiter medial etwas größere ovale Neurone, die sich in zwei Zellcluster einteilen lassen - eine aquäduktnahe und eine zwischen den beiden Nuclei tegmentales dorsales gelegene Gruppe. Die größeren Neurone sind überwiegend **serotoninerg**, während die kleineren 5-HT-negativ sind. Der DRc besitzt einige **Calbindin**-haltige Nervenfasern, jedoch kaum Calbindin-positive Somata (ohne Abbildung). Einzelne Nervenfasern enthalten **Galanin**. Galanin-haltige Somata finden sich nicht (ohne Abbildung). Im rostralen Anteil des DRc verlaufen zwischen den beiden Fasciculi longitudinales mediales zwei **NT**-haltige Nervenfaserbündel. Weiter kaudal nimmt der Anteil NT-positive Nervenfasern weiter ab. Nur einzelne Dendriten und Somata des DRc exprimieren den **NK1-Rezeptor**. Der benachbarte Nucleus tegmentalis dorsalis besitzt hingegen deutlich mehr NK1-immunoreaktive Fasern (ohne Abbildung). Die DRc ist von einem sehr dichten GABAergen Fasernetz durchzogen. Dieses ist in den lateralen Bereichen der DRc besonders dicht (**GAD₆₅**-immunoreaktive Fasern). Aber auch das Isoenzym **GAD₆₇** lässt sich in einigen Fasern und Nervenzellen des DRc nachweisen. Der gesamte DRc ist

frei von **cholinergen** Neuronen. Der DRc besitzt nur vereinzelt **TH**- und **DBH**- exprimierende Fasern. TH- oder DBH-positive Somata lassen sich nicht nachweisen.

Zu Abbildung 3.1. (Seite 59): Übersicht über die lichtmikroskopisch differenzierbaren Zonen und Bereiche der Dorsalen Raphe. In der linken Spalte wurden serotonerge Neurone immunhistochemisch visualisiert (5-HT) und aus Darstellungsgründen kontrastverstärkt abgebildet. In der rechten Spalte finden sich die jeweils korrespondierenden (benachbarten) Kryostatschnitte nach Klüver-Barrerra-Färbung (KB). Nervenzellen und Glia kommen dabei blau-violett zur Darstellung. Myelinisierte Fasern erscheinen türkis-blau. Über alle Abbildungen wurde eine schematische Maske zur besseren Abgrenzung der morphologisch unterschiedlichen Bereiche projiziert. Die Größenverhältnisse sind in beiden Spalten identisch. (*PAG: Periaqueductal Gray, Aq: aqueduct (Sylvius), mlf: medial longitudinal fasciculus, IV: Ncl. Trochlearis, xscp: decussation of the superior cerebellar peduncle*)

Zu Abbildung 3.2. (Seite 60): Darstellung der Verteilung verschiedener Neuromarker in der rostralen Zone der Dorsalen Raphe. Die Lage in rostrokaudaler Achse ist als Inlet in A schematisch dargestellt. (*A: Calbindin, B: Tyrosinhydroxylase, C: Galanin, D: Neurotensin, E: Neurokinin-Rezeptor 1 (NK1)(Substanz P), F: Glutamatdecarboxylase Isoenzym 65 (GABA), G: Glutamatdecarboxylase Isoenzym 67, H: Dopaminbetahydroxylase*)

Zu Abbildung 3.3. (Seite 61): Darstellung der Verteilung verschiedener Neuromarker in der zentralen Zone der Dorsalen Raphe. Die Lage in rostrokaudaler Achse ist als Inlet in A schematisch dargestellt. (*A: Calbindin, B: Galanin, C: Neurokinin-Rezeptor 1 (NK1)(Substanz P), D: Tyrosinhydroxylase, E: Neurotensin, F: Glutamatdecarboxylase Isoenzym 67 (GABA), G: Glutamatdecarboxylase Isoenzym 65, H: Dopaminbetahydroxylase*)

Zu Abbildung 3.4. (Seite 62): Darstellung der Verteilung verschiedener Neuromarker in der kaudalen zentralen Zone der Dorsalen Raphe. Die Lage in rostrokaudaler Achse ist als Inlet in A schematisch dargestellt. (*A: Calbindin, B: Galanin, C: Neurokinin-Rezeptor 1 (NK1)(Substanz P), D: Neurotensin, E: Glutamatdecarboxylase Isoenzym 65 (GABA), F: Tyrosinhydroxylase*)

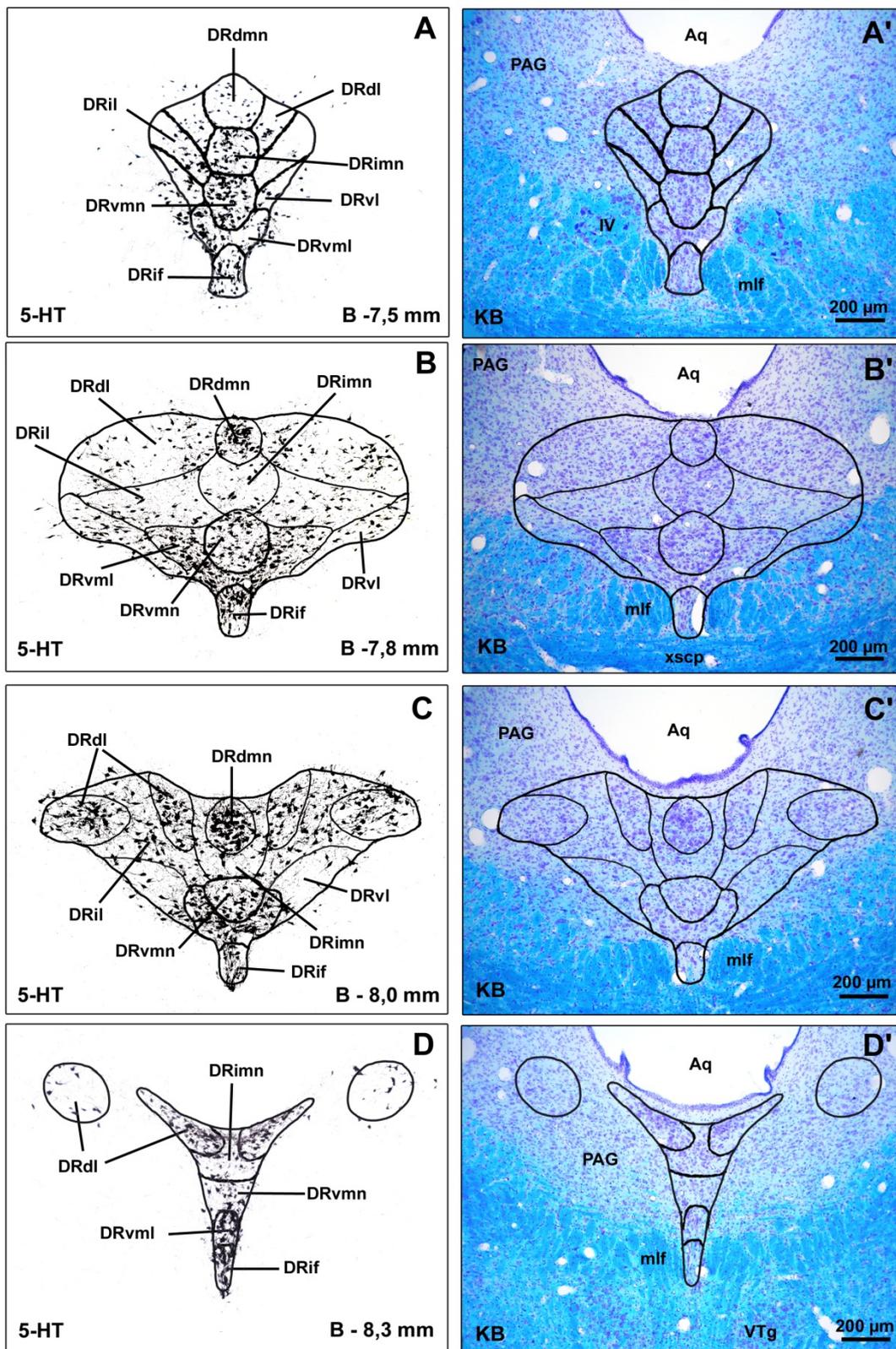


Abbildung 3.1: Erläuterung siehe Seite 58.

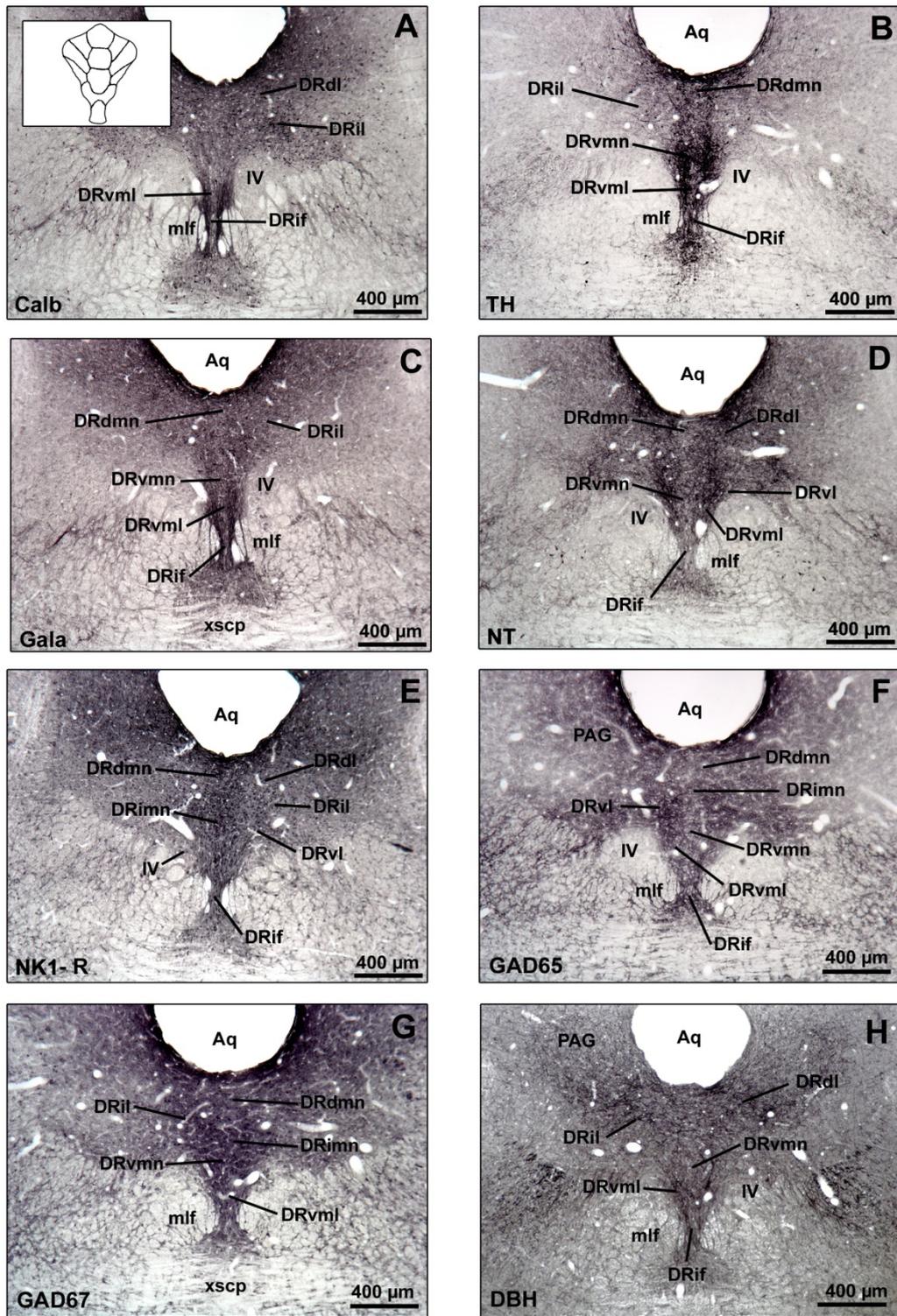


Abbildung 3.2: Erläuterung siehe Seite 58.

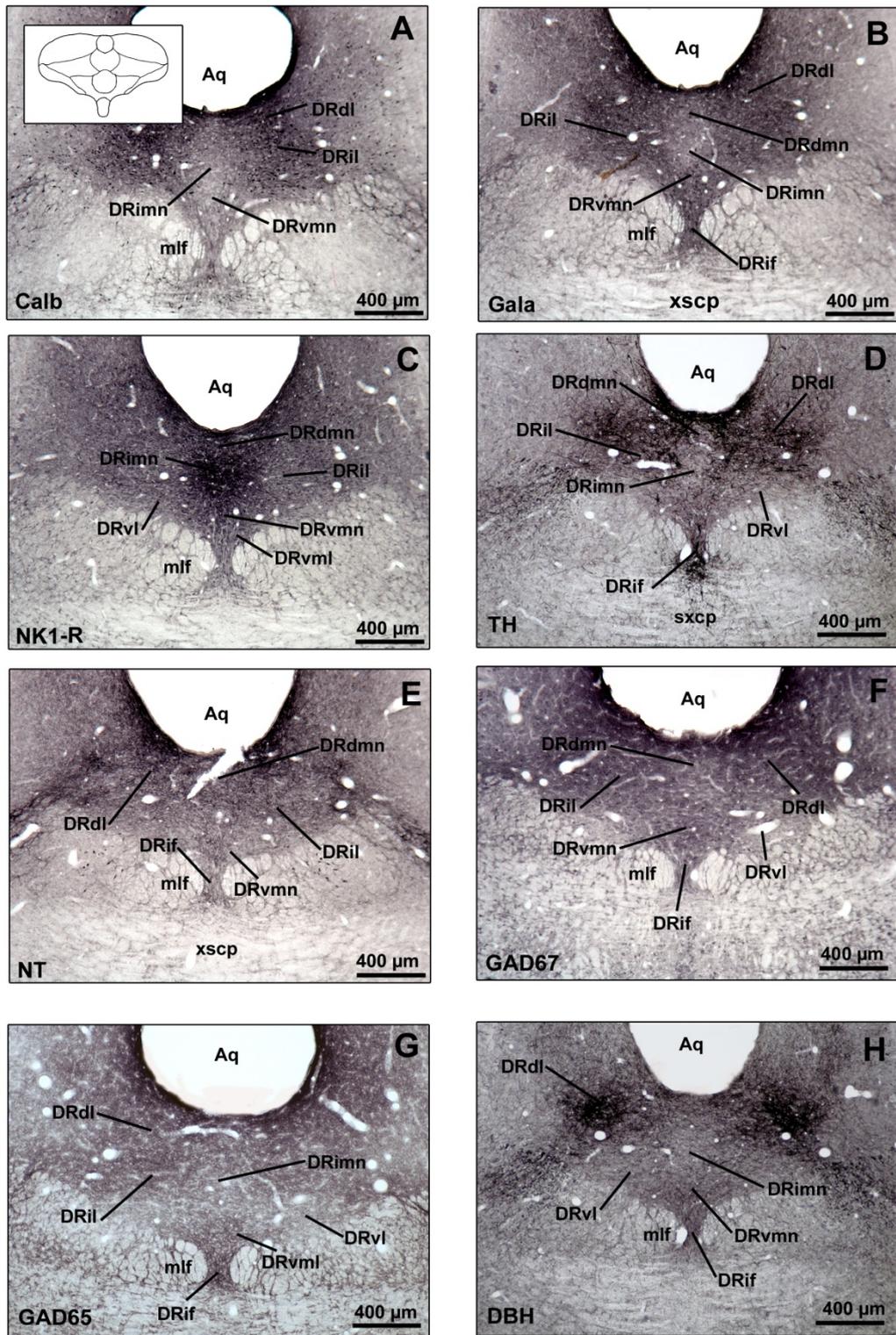


Abbildung 3.3: Erläuterung siehe Seite 58.

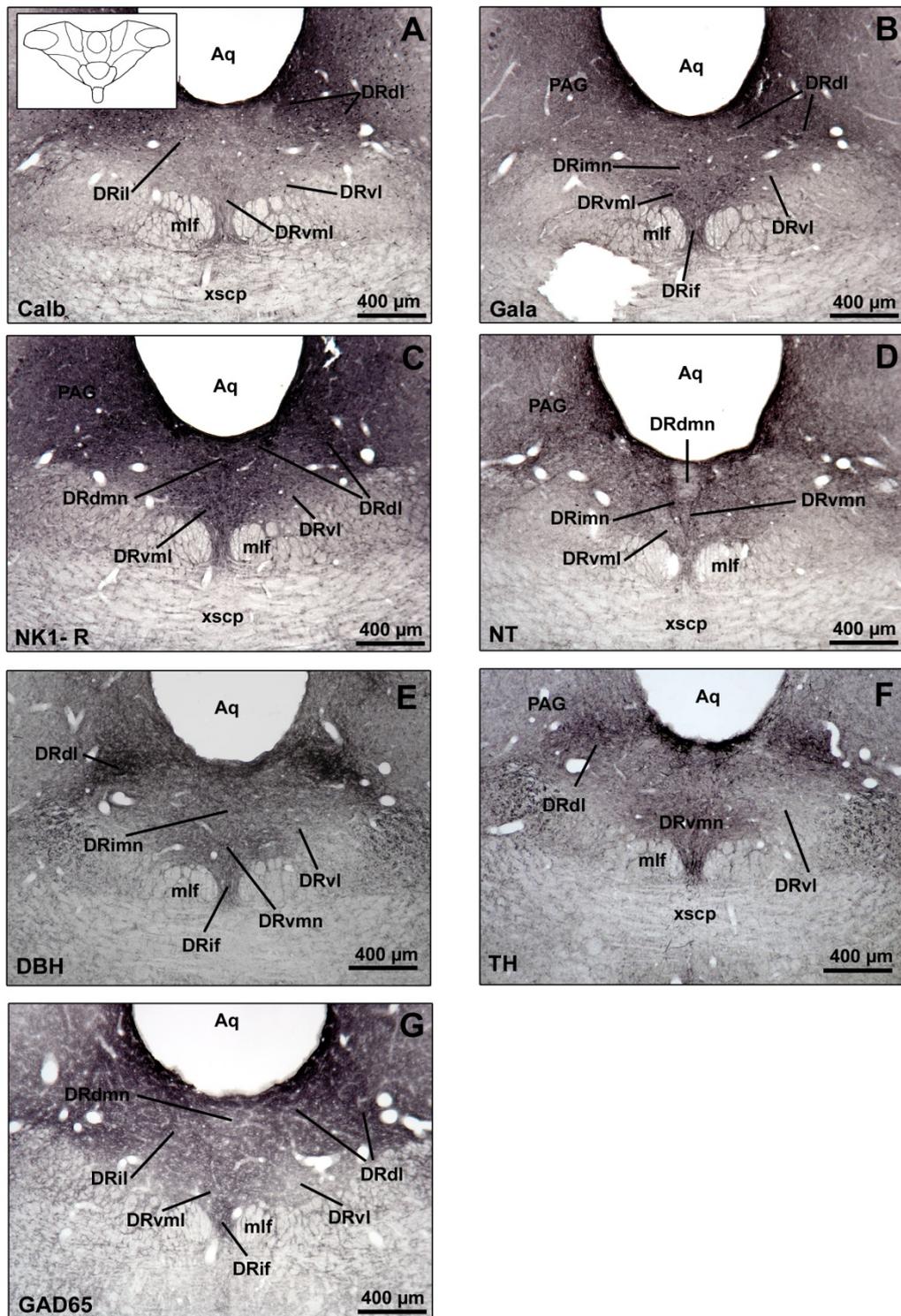


Abbildung 3.4: Erläuterung siehe Seite 58.

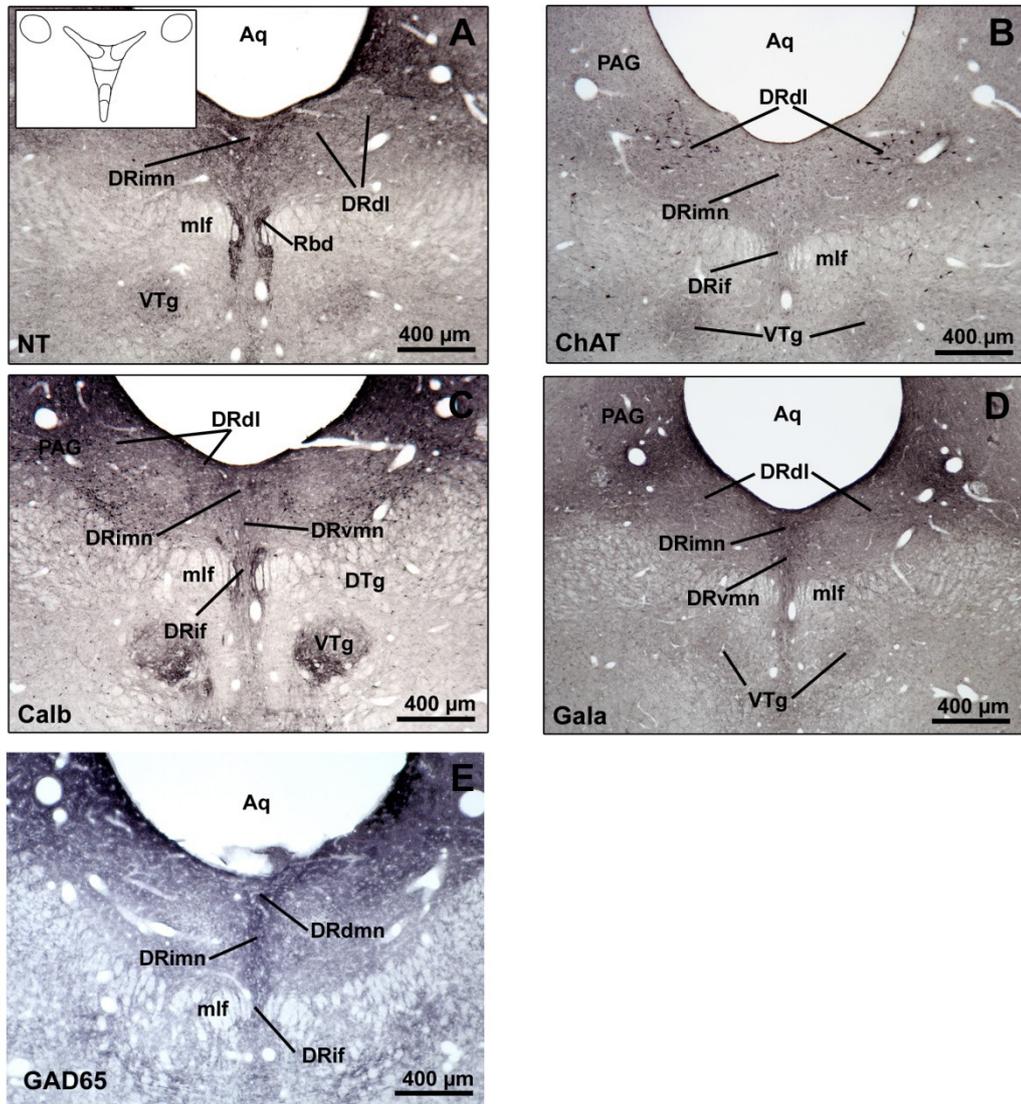


Abbildung 3.5: Darstellung der Verteilung verschiedener Neuromarker in der kaudalen Zone der Dorsalen Raphe. Die Lage in rostrokaudaler Achse ist als Inlet in A schematisch dargestellt. (A: *Neurotensin*, B: *Cholinacetyltransferase*, C: *Calbindin*, D: *Galanin*)

3.2 Darstellung der Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zum Mesencephalon mittels anterogradem Tract-Tracing

Zur Analyse der Projektionen von Neuronen des lateralen Habenularkomplexes (LHb) wurden bei insgesamt vier Tieren anterograde Tracer an verschiedenen Stellen in den LHb injiziert und die efferenten Axone anschließend immunzytochemisch dargestellt. Um die Zahl der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurden dabei jeweils Doppelinjektionen von Phaseolus vulgaris leukagglutinin (Pha-L) und Tetramethylrhodamin-Dextranamin (TMR-DA) in den LHbM und LHbL durchgeführt. Alle acht Injektionsstellen liegen im Zielgebiet des LHb und wurden für die Auswertung der anterograden Untersuchungen verwendet.

Als Projektionsgebiete des LHb wurden nur solche Bereiche in Betracht gezogen, in denen die efferenten Fasern putative präsynaptische Auftreibungen aufwiesen. So konnte zwischen durchziehenden Fasern und Axonendigungen unterschieden werden. Morphologisch lassen sich in der Dorsalen Raphe (DR) zwei verschiedenen Fasertypen unterscheiden (Abb. 3.6, S. 65). Dicke Axone, deren synaptische Auftreibungen (Boutons) größtenteils an den Endpunkten der Arborisierung liegen, dominieren das Bild. Sie sind auf alle DR-Unterkerne gleichermaßen verteilt. Im lateralen Bereich der rostralen Dorsalen Raphe finden sich außerdem gehäuft feine Fasern, deren Boutons perlschnurartig hintereinander aufgereiht sind (Abb. 3.6 A und B, S. 65).

Um nachzuweisen, dass es sich bei den vermuteten Arealen tatsächlich um Projektionsziele des LHb handelt, wurden retrograde Tracer in diese Gebiete injiziert. Das Auftreten retrograd markierter Zellen im LHb wurde als Bestätigung gewertet.

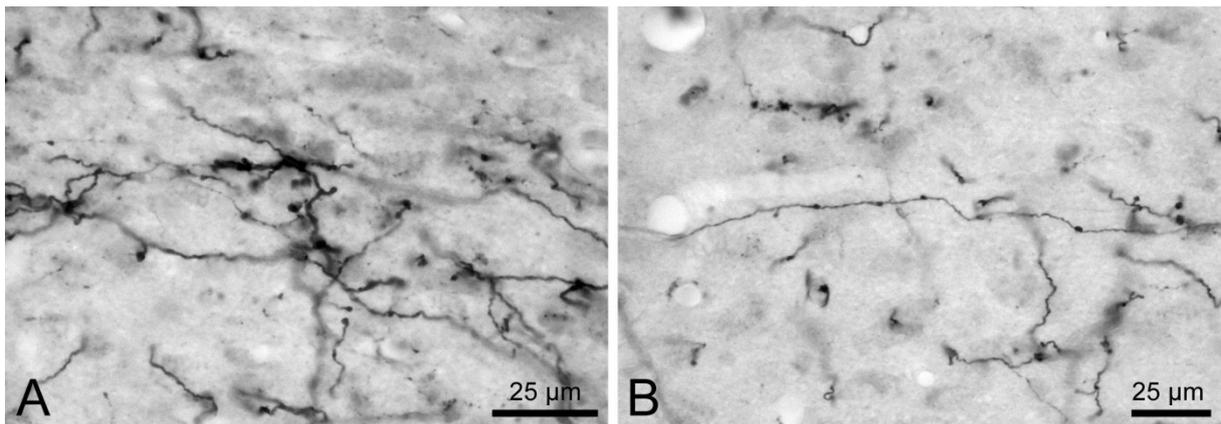


Abbildung 3.6: Verschiedene Axontypen der lateralen Habenula in der Dorsalen Raphe. A: dicke Axone mit endständigen Boutons. B: dünne Axone mit perlschnurartig aufgereihten Synapsen.

3.2.1 Die Projektionen des medialen Anteils des lateralen Habenularkomplexes (LHbM) zum Tegmentum mesencephali

Als Beispiel für Injektionen in den medialen Teil des LHb wird hier der Versuch MT18/04 exemplarisch vorgestellt. Der Injektionsbereich des anterograden Tracers TMR-DA erstreckt sich bei einem Querdurchmesser von etwa 450 mal 600 µm ungefähr 1000 µm von rostral nach kaudal. Er umfasst die meisten Unterkerne des LHbM, einschließlich Anteilen des LHbMA und dehnt sich lateral teilweise bis in den LHbLMc und nach ventral in den LHbLB aus (Abb. 3.7, Inset in A', S. 70). Der LHbMMg und der LHbMS wurden jedoch nur unvollständig erfasst.

Axonterminalen aus dem LHbM finden sich in der gesamten rostrokaudalen Ausdehnung der DR. Die meisten Axone enden in der zentralen und kaudalen Zone. Dabei wird die ipsilaterale DR stärker als die kontralaterale Seite innerviert (Abb. 3.7, S. 70). Eine große Anzahl von Axon-Endköpfchen liegt im DRdl und DRil, wobei ihre Anzahl von rostral nach kaudal hin zunimmt. Im Vergleich zu den Injektionen in den LHbL liegt der Schwerpunkt der Projektion hier eher in den dorsalen Bereichen der DR (Abb. 3.7, S. 70). Einige Axonterminalen finden sich im kaudalen DRimn. In der kaudalen DR sind die lateralen Anteile stärker als die medialen innerviert. Der DRvl und der DRdmn zeigen nur vereinzelt TMR-DA-positive Nervenfasern. Auch der DRvmn und der DRvml erhalten nur wenige Axonterminalen aus dem LHbM. Dieses Areal und der DRif werden von einigen Axonen durchzogen, die hier aber nicht enden. Lediglich in der rostralen Zone

der DR (rDR) und am Übergang von der rDR zur zDR lassen sich im DRif und DRvml häufiger markierte Axone mit Boutons finden (Abb. 3.7, S. 70, Tab. 3.2, S. 69).

Zahlreiche Neurone des LHbM terminieren in der *Paramedianen Raphe (PMnR)*. Dabei ist die Verteilung der Axonterminalen in der rostralen PMnR weitgehend bilateral symmetrisch, während im kaudalen Bereich verstärkt die ipsilaterale PMnR angesteuert wird (ohne Abbildung, Tab. 3.1, S. 68).

Weiterhin enden in der *Medianen Raphe (MnR)* sehr viele Axone aus dem LHbM (Tab. 3.1, S. 68).

Im Nucleus *tegmentalis anterior (anterior tegmental nucleus, ATg)* liegen ipsilateral zur Injektionsstelle sehr viele, kontralateral hingegen nur wenige markierte Faserendigungen. Der Nucleus *tegmentalis ventralis (ventral tegmental nucleus, VTg)* wird nicht direkt angesteuert (Tab. 3.1, S. 68).

Die Area *tegmentalis ventralis (ventral tegmental area, VTA)* erhält mehr Projektionen aus dem LHbM als aus dem LHbL. Die Terminalen finden sich weitgehend ipsilateral und gruppieren sich vor allem um den Fasciculus retroflexus.

Dagegen enden in der *Substantia nigra (SN)* nur wenige Axone aus dem LHbM. Diese liegen vor allem auf der ipsilateralen Seite im kaudalen Bereich der Pars compacta (SNc) und im medialen Anteil des Kerngebietes (SNM) (Tab. 3.1, S. 68).

3.2.2 Die Projektionen des lateralen Anteils des lateralen Habenularkomplexes (LHbL) zum Tegmentum mesencephali

Als repräsentatives Beispiel für Injektionen in den lateralen Anteil des LHb soll der Versuch MT19/04 im Folgenden detaillierter beschrieben werden. Die Injektionsstelle des Tracers (TMR-DA) erstreckt sich bei einem Durchmesser von ungefähr 450 µm über etwa 750 µm in rostro-kaudaler Richtung und umfasst vorwiegend den LHbLMc und den LHbLO, jedoch nur teilweise den LHbLMg und LHbLB (Abb. 3.7, S. 70). An der medialen Seite dehnt sich die Injektionsstelle etwas in den LHbMC aus. Der LHbLPc wurde aufgrund seiner geringen Größe und marginalen, medialen Lage mit dieser Injektion nicht erfasst.

Insgesamt ist die Anzahl immunoreaktiver Fasernendigungen in der *Dorsalen Raphe* nach Injektionen in die LHbL niedriger als nach Tracerapplikation in den LHbM. Faserendigungen liegen hauptsächlich im DRvl und dem rostralen DRimn, der sich durch eine hohe Dichte an NK1-R-positiven Dendriten auszeichnet (Kapitel 3.1.1.5). In der rostralen und kaudalen Zone der DR finden sich nur vereinzelte Axone, meist ohne Boutons. DRvmn, DRvml und DRif besitzen wenige markierte Axonterminalen. DRr, DRc, DRdl und DRil sind nahezu vollständig frei von markierten Nervenendigungen (Abb. 3.7, S. 70; Tab. 3.2, S. 69).

Die *Mediane Raphe (MnR)* enthält nur vereinzelt markierte Fasern aus der LHbL. In der *Paramedianen Raphe (PMnR)* enden einige Axone auf der ipsilateralen Seite.

Der LHbL entsendet ausserdem zahlreiche Axonterminalen in den ipsilateralen *Nucleus tegmentalis mesopontinus rostromedialis (RMTg)* (Tab. 3.1, S. 68).

Die *VTA* erhält weniger Fasern von der LHbL als von der LHbM, wobei fast ausschließlich die ipsilaterale Seite angesteuert wird. Nur im kaudalen Bereich terminieren auch kontralateral zu Injektionsstelle einige Fasern. Des Weiteren finden sich, im Gegensatz zu Injektionen in den LHbM zahlreiche Axonendigungen im ipsilateralen *Nucleus tegmentalis subpeduncularis (SPTg)* und *pedunculopontinus (PPTg)* (Tab. 3.1, S. 68).

Die *Substantia nigra pars compacta (SNc)* erhält deutlich mehr Projektionen von der LHbL als von der LHbM. Hier wird überwiegend die kaudale ipsilaterale Region der SNc angesteuert (Tab. 3.1, S. 68).

		LHbM (MT18/04)	LHbL (MT19/04)
ATg (Nucleus tegmentalis anterior et ventralis)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	++ +	- -
CLi (Nucleus linearis caudalis)		+(+)	-
DR (Dorsale Raphe)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	++(+) +(+)	+(+) +
LDTg (Nucleus tegmentalis laterodorsalis)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	(+) -	++ +
MnR (Mediane Raphe)		+++	(+)
PMnR (Paramediane Raphe)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	++ +(+)	+(+) (+)
RMTg (Nucleus tegmentalis mesopontinus rostromedialis)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	(+) -	++++ ++
PPTg/MEA (Nucleus tegmentalis pedunculopontinus/midbrain extrapyramidal area)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	+ -	+(+) (+)
SN (Substantia nigra)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	+ (+)	++ +
SPTg (Nucleus tegmentalis subpeduncularis)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	- -	+++ ++
VTA (Area tegmentalis ventralis)	<i>ipsilateral</i> <i>kontralateral</i>	++ +	(+) -

Tabelle 3.1: Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zum Mesencephalon.

	LHbM (MT18/04)	LHbL (MT19/04)
DRr (rostraler Unterkern der DR)	++	(+)
DRdmn (dorsomedianer Unterkern der DR)	(+)	-
DRimn (intermediomedianer Unterkern der DR)	++ (kaudal)	+++ (rostral)
DRvmn (ventromedianer Unterkern der DR)	+(+)	-
DRvml (ventromedialer Unterkern der DR)	+(+)	+(+)
DRif (interfaszikulärer Unterkern der DR)	++	+
DRdl (dorsolateraler Unterkern der DR)	+++ (kaudal negativ)	-
DRil (intermediolateraler Unterkern der DR)	++(+)	-
DRvl (ventrolateraler Unterkern der DR)	(+)	+++
DRc (kaudaler Unterkern der DR)	+++	(+)

Tabelle 3.2: Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zu den morphologisch abgrenzbaren Unterkernen der Dorsalen Raphe.

Zu Abbildung 3.7: (folgende Seite)

Schematische Darstellung der Projektionen vom lateralen Habenularkomplex (LHb) zur Dorsalen Raphe (DR). In der rechten Spalte sind die Axonterminalen (rot) in der DR nach TMR-Dextran-Injektion in den lateralen LHb (siehe Inset) abgebildet. Die linke Spalte zeigt die Verteilung der Nervenendigungen in der DR nach Injektion von TMR-Dextran in den medialen Anteil des LHb (siehe Inset). Mit jeweils roten bzw. blauen Markierungen wurden nur Areale gekennzeichnet, in welchen Axone terminieren (mikroskopischer Nachweis von synaptischen Auftreibungen).

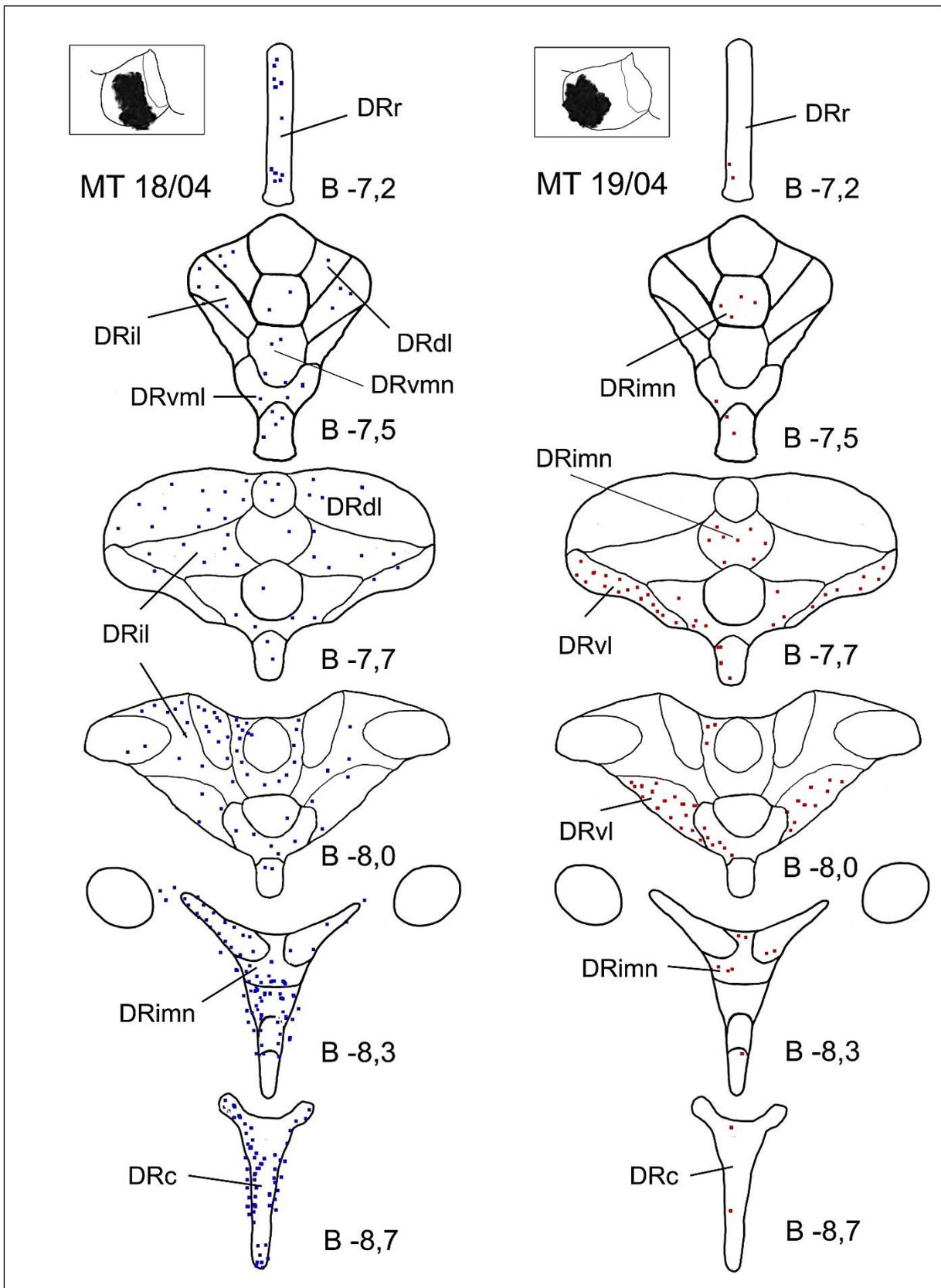


Abbildung 3.7: Erläuterungen siehe Seite 69.

3.3 Darstellung der Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zur Dorsalen Raphe mittels retrograden Tract-Tracing

Zur Analyse der efferenten Projektionen des lateralen Habenularkomplexes (LHb) wurden bei 21 Tieren retrograde Tracer in die Dorsalen Raphe oder das benachbarte Periaquäduktale Grau (PAG) injiziert und die Ursprungsneurone anschließend immunzytochemisch dargestellt. Bei insgesamt 13 Tieren liegt die Injektionsstelle in der DR unter Aussparung der benachbarten Strukturen und weist einen guten Transport des injizierten Tracers auf. Diese Versuche werden im Folgenden detailliert dargestellt. Zusätzlich wurden Kontrollinjektionen in das benachbarte PAG durchgeführt, um zu untersuchen, ob akzidentelle Tracerspuren im PAG ebenfalls zu einer Markierung von Neuronen im LHb führen. Die Auswertung der retrograden Experimente erfolgt unter Berücksichtigung der anterograden Ergebnisse, der unterschiedlichen Größe der Injektionsstellen (Kapitel 3.2) sowie der anfangs beschriebenen Substruktur der DR (Kapitel 3.1). Um möglichst alle Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zur Dorsalen Raphe zu erfassen, wurde versucht, alle Unterkerne der DR mit Injektionen des retrograden Tracers zu treffen. Die markierten Neurone wurden in jedem Gewebeschnitt gezählt und anhand topographischer, immunzytochemischer und zellmorphologischer Merkmale einem Unterkern zugeordnet. Der Grundwert der angegebenen Prozentsätze entspricht der Gesamtzahl der markierten Neurone im LHb jeweils einer Seite (Gesamtzahl der markierten Neurone im LHb links: 100%, im LHb rechts: 100%). Die Seitenbezeichnung der Habenula und der DR entspricht der anatomischen Position im nativen Rattenhirn (Abb. 3.8, 3.9, 3.14, 3.15, S. 84, S. 83 ff.).

3.3.1 Injektionen in die rostrale Zone der Dorsalen Raphe

Von den insgesamt 13 retrograden Injektionsstellen liegt eine ausschließlich innerhalb der rostralen Zone der DR (MT99/02). Eine weitere Injektionsstelle befindet sich am Übergang von der rostralen zur zentralen Zone (MT04/04). Die Auswertung der retrograden Versuche zeigt, dass mehr als 80% der Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zur rostralen DR aus dem LHbM stammen. Bei MT99/02 liegen 82% der retrograd markierten Neurone im linken LHbM, 83% im rechten LHbM. Bei MT04/04 liegen 93% der retrograd markierten Neurone im linken und 79% im rechten LHbM. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse der anterograden Studien, welche zeigen,

dass die rostrale Zone der DR bevorzugt vom LHbM angesteuert wird (Abb. 3.7, S. 70). Lediglich im interfazikulären Teil liegen vereinzelt synapsentragende Axone aus dem LHbL (Abb. 3.7, S. 70). Beide Versuche haben die Gemeinsamkeit, dass der Großteil der retrograd markierten Zellen im LHbMA und LHbMC liegt (Abb. 3.10, S. 89).

Die Injektionsstelle **MT 99/02** liegt auf der Höhe Bregma -7,1mm vornehmlich im interfazikulären Unterkern und ventralen Bereich des DRr. Sie hat eine Größe von circa 200×150×200µm (Abb. 3.9, S.88). Dieser Bereich enthält zahlreiche TH-, aber auch einige DBH-haltige Nervenfasern. Hingegen kommen nur wenige serotoninerge Neurone vor. Auch der Anteil an Neurotensin- und Calbindin-positiven Nervenfasern ist eher gering. Bei diesem Versuch finden sich CTB-positive Neurone vor allem im LHbMA und LHbMC, aber auch im LHbMMg. Einzelne Neurone liegen auch im LHbLO und LHbLMc. Bezogen auf die Größe der Unterkerne des LHb, entsenden der LHbMC, LHbMMg und der LHbLO relativ viele Axone in den Bereich der Injektionsstelle. Der LHbMS, LHbLMg, LHbLPc sowie LHbLB enthalten keine CTB-positiven Neurone. Auch der LHbMPc weist nur wenig Transport auf. Der wichtigste Unterschied zu der weiter kaudal gelegenen Injektionsstelle MT04/04 ist der relativ starke Transport in den LHbMMg und LHbLO (Abb. 3.10, S. 89).

Die Injektionsstelle von **MT04/04** liegt am Übergang von der rostralen zur zentralen Zone der DR (Bregma -7,3mm). Sie befindet sich im DRr und den rostralen Anteilen des rechten DRvl, DRil, DRimn und DRvmn. Die Größe der Injektion beträgt circa 300×250µm×300µm (Abb. 3.9, S. 88). Im Bereich der Injektionsstelle finden sich zahlreiche TH-positive, jedoch nur wenige DBH-immunoreaktive Fasern. Der Anteil an serotoninerger Zellen und NT-haltigen Nervenfasern in diesem Gebiet höher als beim Versuch MT99/02. In diesem Areal kommen zusätzlich zahlreiche GABAerge Neurone (dichtes GAD₆₅-Faserwerk, GAD₆₇-positive Somata und Nervenfasern) vor. Die ipsilaterale (rechte) Habenula weist geringfügig mehr retrograden Transport auf als die kontralaterale Seite (33 versus 28 Zellen). Insbesondere der ipsilaterale LHbMC, LHbLMc und LHbLB enthalten mehr markierte Zellen als die Gegenseite. Lediglich der ipsilaterale LHbLB besitzt CTB-positive Neurone. Im Gegensatz dazu findet sich nur im kontralateralen LHbMS und LHbMMg retrograder Transport (Abb. 3.10, S. 89). Der LHbLO ist im Gegensatz zum Versuch MT99/02 bilateral frei von CTB-immunoreaktiven Nervenzellen (Abb. 3.10, S. 89). Wie beim Versuch MT99/02 liegen die meisten Neuro-

ne im LHbMA und LHbMC. Aber auch der LHbMPc enthält beim Versuch MT04/04 verhältnismäßig viele markierte Neurone. Das prozentuale Verhältnis verschiebt sich bei diesen beiden Injektionen nach kaudal hin zunehmend vom LHbMA zum LHbMC und vor allem zum LHbMPc. Aus dem LHbMMg sind hingegen kaum Projektionen nachzuweisen.

Der rostrale LHbM scheint bevorzugt zur Gegenseite zu projizieren. Obwohl die Injektionsstelle von MT99/02 genau in der Mittellinie liegt und im Fall MT04/04 sogar auf der rechten Seite, enthält der linke LHbMA mehr markierte Neurone als der LHbMA der rechten Seite (Abb.3.10, S. 89).

3.3.2 Injektionen in die kaudale Zone der Dorsalen Raphe

Die Injektionsstelle des Versuches **MT57/02** befindet sich auf der Höhe von Bregma - 8,7mm mittig im interfazikulären Unterkern und ventralen Anteil der kaudalen DR (Abb. 3.9, S.88). Sie hat eine Größe von circa 300×200×100µm. In diesem Bereich kommen zahlreiche GABAerge Neurone vor (Abb. 3.5, S. 63). Mittelliniennah liegen jedoch auch serotoninerge Zellen und im lateralen Anteil Calbindin-haltige Fasern (Abb. 3.5, S. 63). Trotz ihrer geringen Größe weist diese Injektionsstelle, verglichen mit den rostralen Injektionen relativ viel Transport auf. Die anterograden Tracingstudien zeigen, dass die kaudalen Areale der DR über zahlreiche Axonterminalen vom LHbM angesteuert werden, aus dem LHbL jedoch kaum Nervenendigungen nachweisbar sind (Abb. 3.7, S. 70). Dieses Ergebnis bestätigt sich weitestgehend in den retrograden Versuchen. 90% der CTB-positiven Neurone befinden sich im linken LHbM und 82% im LHbM rechts. Alle Unterkerne des LHbM projizieren zum kaudalen interfazikulären (DRif) und kaudalen Unterkern der DR (DRc) (Abb.3.10, S. 89). Im Vergleich zu den Injektionsstellen in die rostrale DR befindet sich ein deutlich höherer Anteil an markierten Neuronen im LHbMMg und vor allem im LHbMS, welcher kaum oder keinen retrograden Transport von der DRr aufweist (Abb. 3.10, S. 89). Im Vergleich zum LHbMC befinden sich auch verhältnismäßig viele Neurone im kleinen LHbMPc. Der laterale Teil des LHb projiziert fast ausschließlich über den LHbLMc zur kaudalen DR (Abb. 3.10, S. 89). Der Anteil ist gemessen an den Gesamtprojektionen der Injektionsstelle insgesamt gering.

3.3.3 Injektionen in die Zentrale Zone der Dorsalen Raphe

3.3.3.1 *Der Dorsomediane Unterkern der DR als Hauptinjektionsort*

Zwei der insgesamt 13 Injektionsstellen liegen mit ihrem Hauptanteil im dorsomedianen Unterkern der DR (MT42/02, MT56/02). Auch die Injektionsstelle des Versuches MT84/02 liegt zum Teil im DRdmn. Die anterograden Versuche haben gezeigt, dass im DRdmn insgesamt nur wenige Axone aus dem Lhb enden (Abb.3.7, S. 70). Diese liegen vor allem nahe dem Aquaeductus cerebri in der rostralen zentralen Zone der DR (Abb. 3.7; B -7,5 und B -7,7; S. 70).

Die Injektionsstelle **MT42/02** befindet sich auf Höhe Bregma -7,6 mm relativ weit rostral in der zentralen Zone der DR und hat eine Ausdehnung von circa 400×350×300 µm (Abb. 3.9, S. 88). Sie breitet sich nach lateral in den DRdl und nach ventral in den DRimn aus. Der Bereich, in dem die Injektionsstelle liegt zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Serotonin und Tyrosinhydroxylase aus (Abb. 3.1B und 3.3D, S. 59, S. 61). In einigen Neuronen kommen DBH, Galanin und der NK1-Rezeptor vor (Abb. 3.3H, B, C, S. 61). Auch der Gehalt an Neurotensin-haltigen Fasern ist vergleichsweise hoch (Abb. 3.3E, S. 61). Trotz der beachtlichen Größe der Injektionsstelle, ist die Anzahl der retrograd markierten Neurone in der Lhb relativ gering (29 Zellen in der Lhb links, 29 Zellen in der Lhb rechts). Dies bestätigt jedoch das Ergebnis der anterograden Studien, welche gezeigt haben, dass der DRdmn in diesem Bereich nur wenig input vom Lhb bekommt, im benachbarten DRdl und DRimn jedoch einige Axone aus dem LhbL und LhbM enden. Bei diesem Versuch liegen auf der linken Seite 69% aller retrograd markierten Neurone im LhbM und 31% im LhbL. Im rechten Lhb enthält der LhbM 59% aller tracerhaltigen Neurone und der LhbL 41%. Im linken Lhb liegen die tracerhaltigen Nervenzellen vor allem im LhbMC, LhbMPc und LhbLMc (Abb.3.10, S. 89). Auf der rechten Seite ist die Verteilung etwas diffuser. Hier enthalten auch der LhbMA, LhbMS, MHbLPc, LhbLMg und LhbLO einige markierte Somata (Abb. 3.10, S. 89). In Relation zum Größenverhältnis der einzelnen Unterkerne entsenden der LhbMPc, aber auch der LhbLPc, LhbLMg und LhbMS viele Neurone in diesen Bereich. Aufgrund ihrer geringen Größe und marginalen Lage wurden der LhbLPc, LhbLMg und teilweise auch der LhbMS nicht optimal bei den anterograden Tracingversuchen erfasst, sodass diese Ergebnisse schlecht validiert werden können. Insgesamt stammen bei diesem Versuch wenige der Projektionen aus dem LhbMA und LhbMMg.

Die Injektionsstelle des Versuches **MT56/02** befindet sich subaquäduktal im DRdmn. Sie liegt weiter kaudal als MT42/02 (Bregma -8,0 mm) und besitzt eine Größe von ungefähr 450×200×200 µm (Abb. 3.9, S. 88). Sie dehnt sie sich bis in die dorsalen Anteile des DRimn und in den DRdl aus. Dieser Bereich zeichnet sich im Vergleich zu MT42/02 durch eine geringere Anzahl an serotoninergeren und einen etwas höheren Anteil an GABAergen Neuronen aus (Abb. 3.1C, Abb. 3.4G, S. 59, S. 62). Das Neuropeptid Galanin befindet sich lediglich in den Nervenzellen der lateralen Anteile des DRimn (Abb. 3.4B, S. 62). Die Zahl NT-positiver Nervenfasern ist vor allem in den medialen Anteilen der Injektionsstelle etwas geringer als beim Versuch MT42/02 (Abb. 3.4D, S. 62). Die Verteilung TH-positiver Neurone ist vergleichbar mit der Injektionsstelle MT42/02 (Abb. 3.4F, S. 62). Da die Injektionsstelle eher im kaudalen Bereich des DRdmn und DRimn liegt, ist der Hauptanteil der retrograd markierten Neurone im LHbM zu erwarten (Abb. 3.7, S. 70). Insgesamt liegen 79% aller CTB-haltigen Neurone im linken LHbM (21% LHbL) und 85% im rechten LHbM (15% LHbL; Abb. 3.11, S. 90). Trotz der medianen Lage der Injektionsstelle fällt auf, dass die Projektionen aus dem rechten LHb überwiegen (LHb rechts: 59 Zellen; LHb links: 33 Zellen; Abb.3.11, S. 90).

Die meisten markierten Neurone liegen beim Versuch MT56/02 im LHbMC, gefolgt vom LHbMPc, LHbLMc und LHbMA. Aber auch im LHbMMg liegen zahlreiche Neurone (Abb.3.11, S. 90). Der LHbMPc, LHbMMg und LHbMA besitzen im Vergleich zur weiter rostral gelegenen Injektion von MT42/02 mehr retrograd markierte Zellen. Der rechte LHbMA enthält wie im Versucht MT42/02 deutlich mehr CTB-positive Neurone als der linke LHbMA (Abb.3.11, S. 90). Im Bereich des LHbL finden sich die meisten CTB-positive Nervenzellen im großen magnozellären Unterkern (LHbLMc). In Relation zur geringeren Unterkerngröße liegen verhältnismäßig viele Ursprungsneurone im rechten LHbLB. Der LHbMS enthält keine retrograd markierten Zellen (Abb.3.11, S. 90).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der DRdmn nur wenige Projektionen aus dem LHb erhält. Durch den Vergleich mit den Versuchen MT105/02, MT82/02, MT55/02 und MT56/02 lässt sich ableiten, dass der DRdmn anscheinend vor allem vom LHbMC und LHbMPc angesteuert wird. Hingegen enden in ihm kaum Axone aus dem LHbMA, LHbMMg und LHbLB. Diese projizieren eher zum benachbarten DRdl. In den rostralen Anteilen des DRdmn enden einige Fasern aus dem LHbMS, aber auch vereinzelte aus dem LPc, LB, LMg und LO. Insgesamt ergibt sich für die Projektionen zum DRdmn ein

sehr gemischtes Bild. Er scheint aus allen Unterkernen des LHb, wenn auch nur wenige Projektionen zu erhalten. Da es sich jedoch insgesamt nur um sehr wenige Projektionen handelt, die aus technischen Gründen nicht isoliert mit einer Injektionsstelle erfasst werden können, ist eine genaue Aussage über die Projektionen nicht möglich.

3.3.3.2 Der Intermediomediane Unterkern der DR als Hauptinjektionsort

Die anterograden Studien haben gezeigt, dass der rostrale Anteil des intermediomedianen Unterkerns der DR (DRimn) vor allem vom LHbL angesteuert wird. Am Übergang zur kaudalen Zone der DR befinden sich im DRimn hingegen gehäuft Nervenendigungen aus dem LHbM (Abb. 3.7; B -7,7 und B -8,0, S. 70). Zwei der 13 Injektionsstellen liegen mit ihrem Hauptanteil im DRimn.

Die Injektionsstelle des Versuches **MT55/02** befindet sich auf Höhe Bregma -7,7 mm hauptsächlich im Gebiet des DRimn und dehnt sich nach rostral etwas in den DRvmn aus. Sie hat eine Größe von 200×200×200µm (Abb. 3.9, S. 88). In diesem Bereich findet sich die höchste Dichte an NK1-Rezeptoren (Abb. 3.3C, S. 61). Serotoninerge Zellen kommen hingegen nur vereinzelt vor (Abb.3.1B, S. 59). Der Anteil an TH-, DBH-, GAD-, Galanin- und NT-positiven Neuronen ist ebenfalls gering (Abb. 3.3, S. 61). Calbindin lässt sich nicht nachweisen (Abb. 3.3A, S. 61). Die anterograden Ergebnisse haben gezeigt, dass dieses Areal überwiegend vom LHbL angesteuert wird (Abb. 3.7, S. 70). Im rostralen, ventralen Bereich der Injektionsstelle liegt der DRvmn. An dieser Stelle sowie im kaudalen Bereich der Injektionsstelle enden auch einige Axone aus dem LHbM. Insgesamt liegen 41,2% aller retrograd markierten Zellen im LHbM der linken Seite und 58,3% im LHbM der rechten Seite. Die Injektionsstelle hat mit insgesamt 29 markierten Neuronen, am ehesten aufgrund ihrer geringen Größe nur wenig Transport. Der überwiegende Anteil der Zellen befindet sich im LHbLMc (59% links, 42% rechts) und dem LHbMC (33% links, 29% rechts). Aus dem LHbMA (17% links, 6% rechts) und vor allem aus dem LHbMPc (0% links, 6% rechts) stammen nur wenige Projektionen. Der LHbMS, LHbMMg und die übrigen Unterkerne des LHbL enthalten keine retrograd markierten Zellen (Abb. 3.11, S. 90).

Die Injektionsstelle des Versuches **MT84/02** liegt etwas weiter kaudal auf der Höhe Bregma -7,9 mm in der zentralen Zone der DR und umfasst neben dem kaudalen Anteil des DRimn auch Teile des DRdmn. Ihre Größe beträgt ca. 300×250×300µm (Abb. 3.9, S. 88). Der Gehalt an NK1-positiven Fasern ist in diesem Gebiet deutlich geringer (Abb. 3.4C, S. 62). Serotoninerge Zellen sowie neurotensinhaltige Terminalen finden sich jedoch aufgrund der kaudalen Lage häufiger als im Versuch MT55/02 (Abb. 3.1C, Abb. 3.4D, S. 59, S. 62). Gemäß den anterograden Tracing-Versuchen ist ein höherer Anteil CTB-positiver Neurone im LHbM als beim Versuch MT55/02 zu erwarten (Abb. 3.7, S. 70). 65% aller retrograd markierten Nervenzellen im linken LHbM und 67% im rechten LHbM. Die meisten retrograd markierten Neurone liegen auch hier im LHbMC und LHbLMc, wobei das Verhältnis deutlich vom LHbLMc (22% links, 27% rechts) zum LHbMC (48% links, 33% rechts) verschoben ist (Abb. 3.11, S. 90). Deutlich weniger Neurone liegen im LHbMA (9% links, 13% rechts) und LHbMPc (4% links, 13% rechts), noch weniger im LHbMMg (4% links, 7% rechts), LHbLMg (4% links, 7% rechts) und LHbLO (9% links, 0% rechts).

Insgesamt zeichnen sich alle Injektionen in den DRimn durch viel retrograden Transport in den LHbLMc und LHbMC aus. Der Vergleich der beiden Versuche mit den anterograden Ergebnissen und den Ergebnissen benachbarter Injektionsstellen erlaubt den Rückschluss, dass der DRimn in seinen rostralen und zentralen Anteilen vor allem vom LHbLMc angesteuert wird. Seine Axone enden im Areal der höchsten NK1-Rezeptordichte. Der kaudale Anteil des DRimn hingegen erhält seine Projektionen überwiegend aus dem LHbMC, aber auch einzelne aus dem LHbLO. Der LHbMPc, der LHbMA und der LHbMMg scheinen kaum zum DRimn bzw. zum angrenzenden DRdmn zu projizieren. Der LHbMS, der LHbLPc und der LHbLB sind frei von tracerhaltigen Neuronen (Abb. 3.11, S. 90).

3.3.3.3 Der Ventromediane und Ventromediale Unterkern der DR als

Hauptinjektionsorte

Die anterograden Tracingversuche haben gezeigt, dass im ventromedianen (DRvmn) und im ventromedialen Unterkern der DR (DRvml) insgesamt eher wenige Axone aus dem LHb enden (Abb. 3.7, S. 70). Lediglich in der kaudalen zentralen Zone, am Übergang zum DRc, finden sich in im DRvmn und DRvml zahlreiche Axonterminalen aus

dem LHbM (Abb. 3.7, B – 8,3, S. 70). In der zentralen Zone der DR enden in den lateralen Anteilen des DRvml einige Axone aus dem LHbL (Abb. 3.7, S. 70). DRvmn und DRvml werden außerdem von nicht terminierenden Axonen aus der Habenula durchquert.

Die Injektionsstelle des Versuches **MT 05/04** liegt auf Höhe Bregma -7,9 mm in der zentralen Zone der DR und hat eine Ausdehnung von 400×400×350µm (Abb. 3.9, S. 88). Sie liegt mit ihrem Hauptanteil im DRvml und DRvmn. Nach ventral dehnt sie sich in den benachbarten DRif aus (Abb. 3.9, S. 88). Bei diesem Versuch lässt sich entlang des Einstichkanals eine feine akzidentelle Tracerspur im dorsolateralen PAG nachweisen. Im Bereich der Injektionsstelle finden sich zahlreiche GAD₆₅- und GAD₆₇- sowie Galanin-positive Neurone (Abb. 3.3F, G, B, S. 61). Der Anteil serotoninerger Somata und Fasern ist durchschnittlich (Abb. 3.1B, S. 59). Calbindin- oder NK1-Rezeptor-immunoreaktive Nervenzellen finden sich in diesem Gebiet kaum (Abb. 3.3A, C, S. 61).

In diesem Versuch liegen rechts 67% aller retrograd markierten Neurone im LHbM und 33% im LHbL, während links 77% im LHbM und 23% im LHbL liegen. Insgesamt waren 233 CTB-haltige Nervenzellen im LHb nachweisbar (Abb. 3.11, S. 90). Der prozentual größte Anteil der Projektionen stammt bei diesem Versuch aus dem LHbMPc (31% links, 24% rechts), dem LHbMC (21% links, 28% rechts) und dem LHbMA (10% links, 8% rechts) (Abb. 3.11, S. 90). Aber auch im LHbMMg finden sich zahlreiche CTB-positive Neurone (15% links, 6% rechts). Im LHbMS lässt sich nur eine CTB-positive Nervenzelle nachweisen (Abb. 3.11, S. 90). Aus dem LHbL stammen die Projektionen hauptsächlich aus dem LHbLMc (15% links, 20% rechts), deutlich weniger aus dem LHbLO (2% links, 6% rechts), LHbLB (2% links, 2% rechts) und LHbLMg (1% links, 5% rechts; siehe Abb. 3.11, S. 90).

Die Injektionsstelle des Versuches **MT08/04** liegt bei Bregma -8,1 mm überwiegend im DRvml und dehnt sich teilweise in den benachbarten DRvmn und DRif aus. Sie besitzt eine Größe von circa 350×350×250µm (Abb. 3.9, S. 88). Im linken LHb finden sich 91, im rechten LHb 90 retrograd markierte Somata (Abb. 3.12, S. 91). 69% der Neurone liegen im linken LHbM und 71% im rechten LHbM. Ähnlich wie beim Versuch MT05/04 befinden sich absolut gesehen die meisten der markierten Neurone in den Unterkernen LHbMPc, LHbMC, LHbLMc, aber auch LHbMA und LHbMMg (Abb. 3.12, S. 91). In Relation zu den einzelnen Unterkerngrößen betrachtet, stammen verhältnismäßig die

meisten Projektionen aus dem LHbMPc. LHbMS und LHbLB entsenden keine nennenswerten Projektionen in das Gebiet der Injektionsstelle von MT05/04 und MT08/04 (Abb. 3.12, S. 91).

Die Injektionsstelle des Versuches **MT01/04** befindet sich auf Höhe Bregma -8,1mm und umfasst neben dem linken lateralen Anteil des DRvml auch Teile des angrenzenden DRvl (Abb. 3.9, S. 88). Dieses Gebiet zeichnet sich durch einen hohen Anteil an serotoninergen und Galanin-haltigen Nervenzellen aus (Abb. 3.1C, Abb. 3.4B, S. 59, S. 62). NK1-Rezeptor-positive Neurone sowie GAD₆₅ und Neurotensin kommen kaum vor (Abb. 3.4C, G, D; S. 62). Die Größe der Injektionsstelle beträgt nur circa 200×300×150µm (Abb. 3.9, S. 88). Die Mehrzahl der retrograd markierten Neurone befindet sich im ipsilateralen LHb (63 Zellen links, 35 Zellen rechts). Insgesamt stammen ca. 55% aller Projektionen aus dem LHbL (Abb. 3.12, Abb. 3.15, S. 91, S. 94). Dieses Ergebnis bestätigt die anterograden Beobachtungen, welche zeigten, dass im DRvl und den lateralen Bereichen des angrenzenden DRvml auf der Höhe Bregma - 8,0mm überwiegend Axone aus dem LHbL terminieren (Abb. 3.7, S. 70). In den kaudalen Anteilen der Injektionsstelle (DRvml) enden vorwiegend Fasern aus dem LHbM (Abb. 3.7, S.70). Die zahlreichsten CTB-positiven Neurone liegen im LHbLMc (ipsilateral: 38%, kontralateral: 51%), LHbMC (ipsilateral: 24%, kontralateral: 14%) und dem LHbMA (ipsilateral: 16%, kontralateral: 14%) (Abb. 3.12, Abb. 3.15, S. 91, S. 94). Aus dem LHbMPc stammen 3% (ipsilateral) bzw. 11% (kontralateral) und aus dem LHbMMg 2% (ipsilateral) bzw. 6% (kontralateral) aller Projektionen. Der LHbMS, LHbLPc und LHbLMg enthalten keine oder nur vereinzelt retrograd gelabelte Neurone (Abb. 3.12, Abb. 3.15, S. 91, S. 94). Insgesamt stammen 6,5% aller Projektionen aus dem LHbLO und 3% aus dem LHbLB, wobei insbesondere die ipsilaterale Seite angesteuert wird (Abb. 3.12, S. 91). Die markierten Nervenzellen liegen dabei ausschließlich im Randbereich des LHbLO am Übergang zum LHbLMc (Abb. 3.15, S. 94).

Die Injektionsstelle des Versuches **MT104/02** liegt links im lateralen DRvml und DRvl auf Höhe Bregma -8,2mm am Übergang zur kaudalen DR (Abb. 3.9, S. 88). Neben Serotonin und GABA finden sich in diesem Bereich viele neurotensinhaltige und calbindin-positive Nervenfasern (Abb. 3.1C, D; Abb. 3.4G, D, A; Abb. 3.5E, A, C, S. 59, S. 62 f.). Die Größe der Injektionsstelle beträgt circa 450×300×250µm (Abb. 3.9, S. 88). Die anterograden Studien haben gezeigt, dass im vorderen Bereich der Injektionsstelle einzel-

ne Fasern sowohl aus dem LHbM als auch dem LHbL enden (Abb. 3.7, S. 70). Im kaudalen Anteil der Injektionsstelle finden sich fast ausschließlich Terminalen von Axonen aus dem LHbM (Abb. 3.7, S. 70). Insgesamt zeichnet sich die Injektionsstelle MT104/02 durch einen relativ starken Transport des retrograden Tracers CTB zur LHb aus (linke LHb: 198 Zellen, rechte LHb: 176 Zellen) (Abb. 3.12, S. 91). Dabei liegen rund 68% aller markierten Neurone im LHbM, wobei der LHbMC mit ca. 35% den Hauptanteil der Projektionen ausmacht (34% links, 36% rechts). Die übrigen markierten Nervenzellen liegen vornehmlich im LHbLMc (22% links, 19% rechts), LHbMPc (12% links, 10% rechts), aber auch LHbMA (9% links, 15% rechts), LHbMMg (10% links, 8% rechts) und LHbLB (6% links, 5% rechts, Abb. 3.12, S. 91). Der LHbMS und der LHbMA gemessen an ihrer Größe und Neuronenzahl entsenden nur sehr wenige Axone in das Gebiet des DRvmn, DRvml und den angrenzenden DRvl. Wie auch im Versuch MT01/04 liegen die retrograd markierten Nervenzellen im LHbLO eher im Randbereich zum LHbLMc (Abb. 3.12, S. 91).

Zusammenfassend zeichnen sich alle vier CTB-Injektionen in den DRvmn und DRvml durch sehr hohe Zellzahlen im LHb aus. Bis auf den Versuch MT01/04, bei dem die Injektionsstelle im lateralen Bereich des DRvml bzw. im angrenzenden DRvl liegt und den DRvmn ausspart, sind vor allem Neurone im LHbM retrograd gelabelt. Dieses Ergebnis stimmt mit den anterograden Studien überein, welche gezeigt haben, dass im kaudalen Bereich des DRvml und DRvmn Fasern aus dem LHbM und den lateralen Anteilen des DRvml und DRvl überwiegend Fasern aus dem LHbL enden. Diese stammen überwiegend aus dem LHbLMc. Im Gegensatz zu den Projektionen zum DRimn, enden im DRvl mehr Axone, die sich dem LHbLB und LHbLO zuordnen lassen. In den kaudalen Anteilen des DRvml, am Übergang zum DRc, terminieren sehr viele Axone aus dem LHbM. Diese liegen überwiegend im LHbMC, LHbMPc, LHbMMg und LHbMA. Ausserdem werden der DRvmn, DRvml und DRif von einigen Nervenfasern aus dem LHb durchzogen ohne Synapsen in diesem Bereich auszubilden.

3.3.4 Injektionen in die laterale Dorsale Raphe

Vier der Injektionsstellen liegen ganz oder teilweise in den lateralen Unterkernen der DR. Die Versuche MT01/04 und MT104/02, welche neben dem DRvml auch Anteile des DRvl umfassen, wurde bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die Injektionsstel-

len der beiden anderen Versuche (MT105/02 und MT82/02) liegen im dorsalen und intermediären Anteil der Wings. Die anterograden Studien haben gezeigt, dass der DRdl und der DRil – im Gegensatz zum DRvl - vornehmlich vom LHbM angesteuert werden (Abb. 3.7, S. 71).

Die Injektionsstelle des Versuches **MT82/02** befindet sich auf der Höhe Bregma -8,1 mm überwiegend im rechten DRdl (Abb.3.9, S. 88). Die Injektionsstelle dehnt sich in geringerem Ausmaß bis in den DRimn und DRil aus. Sie ist mit einer Ausdehnung von $400 \times 300 \times 300 \mu\text{m}$ etwas kleiner als die weiter rostral gelegene Injektionsstelle von MT105/02 (Abb. 3.9, S. 88). Sie ist gekennzeichnet durch ein relativ hohes Vorkommen von Neurotensin sowie GAD₆₅-haltigen Fasern (Abb. 3.4D und G, S. 63). Der Gehalt an serotoningen Neuronen ist durchschnittlich (Abb. 3.1C, S. 60). Im Bereich des angrenzenden subependymalen DRdmn bilden TH-positive Fasern ein dichtes Netzwerk (Abb. 3.3F, S. 62). In Übereinstimmung mit den anterograden Ergebnissen befindet sich der Hauptteil der insgesamt 110 retrograd markierten Neurone in der LHbM (78% links, 79% rechts; siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.13, S. 71, S. 93). Während im lateralen Anteil des LHb vor allem der LHbLMc (links: 12%, rechts: 11%) und der LHbLB (links: 6%, rechts: 3%) CTB-positive Nervenzellen enthalten, verteilen sich die markierten Neurone im LHbM auf den anterioren (links: 30%, rechts: 25%), den parvozellulären (links: 12%, rechts: 11%), den zentralen (links: 22%, rechts: 25%) und den marginalen (links: 14%, rechts: 18%) Unterkern (Abb. 3.13, S. 93). Der LHbMS und der LHbLO enthalten keine retrograd gelabelten Neurone (Abb. 3.13, S. 93).

Der Versuch **MT 105/02** zeigt eine ähnliche Verteilung der retrograd gelabelten Neurone wie das Experiment MT82/02. Die Injektionsstelle befindet sich auf Höhe Bregma -8,0 mm rechtsseitig im DRdl, DRil und DRimn (Abb. 3.9, S. 88). Sie ist mit einer Ausdehnung von $500 \times 400 \times 300 \mu\text{m}$ etwas als im Fall MT 82/02 (Abb. 3.9, S. 88). Insgesamt konnten 536 CTB-positive Nervenzellen gezählt werden, welche sich zu annähernd gleichen Anteilen auf den rechten und die linken LHb verteilen (Abb. 3.12, Abb. 3.15, S. 91, S. 94). Die meisten Neurone liegen im LHbMC (links: 25%, rechts: 28%), LHbMA (links: 21%, rechts: 22%) und LHbMPc (links: 21%, rechts: 21%) (Abb. 3.12, Abb. 3.14, S. 91, S. 93). Im LHbMMg lassen sich etwas weniger tracerhaltige Nervenzellen als im Versuch MT 82/02 nachweisen (links: 11%, rechts: 8%) (Abb. 3.12, Abb. 3.14, S. 91, S. 93). Im lateralen Anteil des LHb stammen die Projektionen vorwiegend aus dem

LHbLMc (links: 14%, rechts: 11%) und dem LHbLB (links: 5%, rechts: 7%). Auch bei diesem Versuch lassen sich keine oder nur vereinzelt Neurone im LHbMS (1% links, 2% rechts) und LHbLO (0%) nachweisen (Abb. 3.12, Abb. 3.14, S. 91, S. 93). Im LHbLMg liegen links 2%, rechts 1% aller markierten Neurone. Trotz der lateralen Lokalisation der beiden Injektionsstellen in der DR ist das Verteilungsmuster der retrograd markierten Neurone in den beiden Habenulae relativ symmetrisch (Abb. 3.12, Abb. 3.14, S. 91, S. 93).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Injektionen in den DRdl und DRil zum Labeling zahlreicher Neurone im LHbMA, LHbMC, LHbMPc, LHbMMg, aber auch LHbLMc und LHbLB führen. Verglichen mit der Größe der einzelnen Unterkerne, projizieren verhältnismäßig viele Neurone aus dem LHbMPc, LHbMMg und LHbLB in den DRdl und DRil. Im Verhältnis stammen nur wenige Neurone aus dem LHbLMc.

3.3.5 Kontrolluntersuchungen

Bei einigen der retrograden Injektionen in die DR kam es zu einer ungewollten Ausbreitung des Tracers das umgebende zentrale Höhlengrau (Periaquäduktales Grau, PAG). Deshalb wurden Kontrollinjektionen ins PAG durchgeführt, um zu untersuchen, ob es durch Tracing des PAG zu falsch positiven Ergebnissen bei der Auswertung der Zellen im LHb kommt. Beim Versuch MT05/04 trat eine Tracerspur entlang des Stichkanals im dorsolateralen PAG auf. Bei den Versuchen MT 105/02 und MT 82/02 lag ein kleinerer Teil der Injektionsstelle außerhalb der DR im ventrolateralen und ventralen PAG. Insgesamt wurden 3 Kontrolluntersuchungen mit Injektionen in verschiedene Stellen des PAG durchgeführt. Beim Versuch **MT20/02** wurde der Tracer FG in den dorsolateralen Anteil des PAG (dIPAG) injiziert (Abb. 3.8, S. 83). Retrograd markierte Somata finden sich vor allem im medialen Prefrontalen Cortex und im Hypothalamus (AHA, DHA, PHA). Die Habenulae enthalten keine markierten Neurone. Beim Versuch **MT24/02** befindet sich die Injektionsstelle im lateralen Anteil und ventrolateralen Anteil des PAG (lIPAG, vIPAG) und beim Versuch **MT43/02** im ventrolateralen Anteil des PAG (vIPAG) (Abb. 3.8, S. 83). Retrograd markierte Zellen lassen sich im lateralen Hypothalamus (LH) sowie den rostralen Anteilen des medialen Prefrontalen Cortex (mPFC) sowie im Medialen Orbitalen Cortex (MO) und Dorsolateralen Orbitalen Cortex (DLO) nachweisen. Auch in diesen

beiden Fällen sind die Habenulae frei von tracerhaltigen Neuronen. Alle drei Injektionsstellen sind circa $300 \times 200 \times 200 \mu\text{m}$ groß.

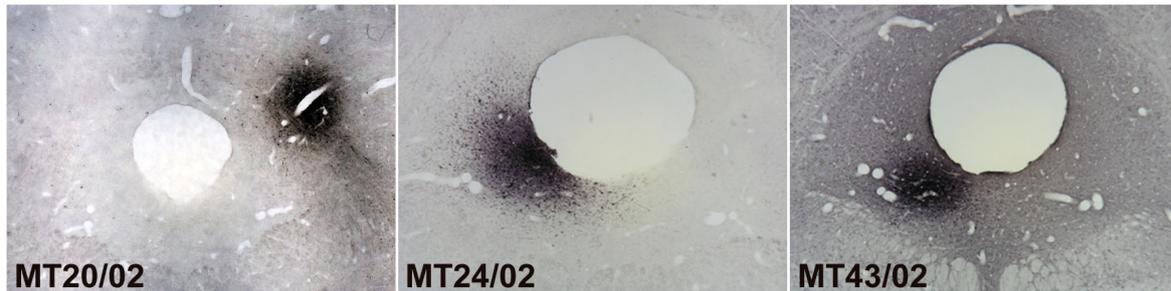


Abbildung 3.8: Lage der Injektionsstellen der Kontrollversuche im dIPAG (MT20/02) und IPAG (MT24/02) und vIPAG (MT43/02). Bei den Versuchen MT20/02 und 24/02 wurde der Tracer CTb, beim Versuch MT43/02 der Tracer FG verwendet. Bei keinem der Versuche fanden sich markierte Neuroe im LHb.

3.3.6 Zusammenfassung der Retrograden Ergebnisse

Nach Injektionen retrograder Tracer in die unterschiedlichen Areale der Dorsalen Raphe lassen sich die Ursprungsneurone im lateralen Habenularkomplex visualisieren. Diese befinden sich überwiegend im medialen Bereich des LHb. Die meisten Neurone liegen im zentralen, parvozellulären, marginalen und anterioren Unterkern des LHbM sowie im magnozöllulären Unterkern des LHbL.

Die einzelnen Unterkerne des LHb projizieren in unterschiedlichem Ausmaß zu den verschiedenen Subarealen der DR. Unter Beachtung der unterschiedlichen Größe der Injektionsstellen sowie durch den Abgleich mit den anterograden Ergebnissen ergeben sich folgende Aussagen.

Injektionen in den DRc, DRr, DRif, aber auch in den DRdl und DRil führen prozentual betrachtet zu einem Labeling zahlreicher Neurone im **LHbMA** (22 bis 40% der Gesamtprojektionen des LHb in das jeweilige Gebiet). Unter Beachtung der Anzahl der Gesamtprojektionen des LHb in diese Areale (Vgl. anterograde Ergebnisse, Abb. 3.7, S. 70) lässt sich daraus ableiten, dass besonders viele Axone des LHbMA im DRdl und DRc, weniger im DRvml enden. Im DRr enden aufgrund der eher geringen Gesamtprojektionen in dieses Gebiet trotz des hohen prozentualen Anteils nur mäßig viele bis wenige Axone aus dem LHbMA. Sehr wenige oder keine Axonterminalen lassen sich im DRdmn, DRimn und DRvl nachweisen.

Der Anteil der Projektionen des **LHbMS** zu den jeweiligen Injektionsstellen liegt unter dreizehn Prozent. Der LHbMS projiziert sehr stark zum DRc bzw. dem kaudalen DRif, weniger stark zum DRdmn sowie zum DRvmn. Keine Axone scheinen im DRvl, DRdl, DRil, DRimn und DRr zu enden, wobei die Aussage über die Absolutzahlen der Projektionen nur eingeschränkt möglich ist, da bei den anterograden Tracingversuchen der LHbMS nicht vollständig erfasst wurde.

Der prozentuale Anteil der Projektionen des **LHbMMg** zu den einzelnen Injektionsstellen liegt unter siebenundzwanzig Prozent. Relativ viele Axonterminalen finden sich im DRc, gefolgt vom DRr bzw. dem rostralen DRif, dem DRdl und DRil. Prozentual weniger Axonterminalen finden sich im DRvml, dem kaudalen DRvmn und kaudalen DRimn. Relativ wenige oder keine Projektionen laufen zum rostralen DRvmn, rostralen DRimn, DRdmn und DRvl. Unter Beachtung der anterograden Ergebnisse und der unterschiedlichen Größe der Injektionsstellen scheint der LHbMMg besonders zahlreich zum DRc sowie den angrenzenden DRvml und DRvmn, aber auch zum DRdl und DRil zu projizieren. Im DRr und kaudalem DRimn enden absolut betrachtet wenige, im rostralen DRimn, DRdmn und DRvl scheinbar keine Axone.

Bei den einzelnen retrograden Versuchen stammen weniger als einunddreißig Prozent aller Neurone aus dem **LHbMPc**. Dabei projizieren relativ und absolut betrachtet besonders viele Neurone zum zentralen Anteil des DRdl und DRil sowie im kaudalen Anteil des DRvml und DRvmn. Im DRc bzw. kaudalen DRif sowie im rostralen DRvmn und DRvml finden sich mäßig viele, im DRr bzw. rostralen DRif sowie im rostralen DRimn, im DRdmn und DRvl sehr wenige bis keine Axonterminalen.

Der **LHbMC** projiziert zu allen Gebieten der DR. Sein Anteil an den Gesamtprojektionen zu den jeweiligen Injektionsstellen liegt zwischen 14 und 50 Prozent. Die Injektionen in den kaudalen DRimn, aber auch in den DRvml und DRr bzw. rostralen DRif haben prozentual sehr viele tracerhaltige Neurone im LHbMC. Aber auch Injektionen in DRdl, DRil und DRvmn markieren relativ viele Neurone im LHbMC. Verhältnismäßig wenige Neurone werden nach Tracerapplikation in den DRc oder DRvl markiert. In Zusammenschau dieser Relationen mit den anterograden Ergebnissen scheint der LHbMC besonders stark in den kaudalen DRvml/DRvmn, gefolgt vom kaudalen DRimn und DRdl/DRil zu projizieren. Absolut betrachtet enden auch zahlreiche Neurone im DRc bzw. kaudalen DRif, wenige hingegen im DRdmn, dem DRvl und dem DRr bzw. rostralen DRif.

Die Neurone des **LHbLMc** enden ebenfalls in allen Unterkerne des LHb. Ihr Anteil an den Gesamtprojektionen der einzelnen Injektionsstellen liegt zwischen 4 und 59 Prozent. Prozentual die meisten Axonendigungen finden sich im DRvl und angrenzendem DRvml sowie im DRimn. Nach Injektionen in den DRvl und DRvml sind die Absolutzahlen der markierten Neurone deutlich höher als nach Injektionen in den DRimn. Der DRdl und der DRil werden kaum vom LHbLMc angesteuert. Nach Injektionen in den kaudalen DRif und DRc liegen ca. 12 Prozent aller markierten Neurone im LHbLMc. Diese stammen entweder aus den am meisten dorsomedial gelegenen Anteilen des LHbLMc, welche beim anterograden Tracing beim Versuch MT19/04 nicht erfasst wurden oder sind möglicherweise einem fibers of passage-Phänomen zuzuordnen, da im DRc nur vereinzelte Axonterminalen aus dem LHbL nachweisbar sind. Im DRdmn, DRr, DRvmn und rostralen DRif enden keine oder nur vereinzelt Axone aus dem LHbLMc.

Der **LHbLO** entsendet insgesamt wenige Axone zur DR. Sein Anteil an den Gesamtprojektionen zu den unterschiedlichen Injektionsstellen liegt zwischen null und elf Prozent. Relativ betrachtet sendet der LHbLO viele Neurone in den rostralen interfaszikulären Teil der DR, aber auch in den DRvl und kaudalen DRimn, gefolgt vom DRvml. Unter Beachtung der anterograden Ergebnisse und unterschiedlichen Größen der Injektionsstellen lässt sich daraus ableiten, dass die meisten Neurone im DRvl, gefolgt vom DRvml und kaudalen DRimn liegen. Der rostrale DRif hingegen erhält absolut betrachtet nur wenige Projektionen aus dem LHbLO. Im DRc, kaudalen DRif, DRdmn, rostralen DRimn, DRvmn sowie im DRdl und DRil scheinen keine Axone zu enden. Insgesamt ist die Zahl der Projektionen des LHbLO zu DR eher gering.

Der **LHbLPc** ist ein sehr kleiner Unterkern. Nur wenige Neurone projizieren zur DR. Sein Anteil an den Gesamtprojektionen zu den jeweiligen Injektionsstellen in der DR liegt unter sieben Prozent. Insgesamt konnten nur bei sechs Versuchen retrograder Tracer im LHbLPc nachgewiesen werden. Die Axone aus dem LHbLPc scheinen dabei am ehesten im DRvml und dem rostralen bzw. zentralen Anteil des DRdmn zu enden. Injektionen in den DRvmn, DRimn, DRr, DRc, DRif, DRdl und DRil führten zu keiner Markierung von Neuronen im LHbLPc.

Auch der **LHbLMg** ist ein sehr kleiner Unterkern mit einem ebenfalls eher geringen Anteil an den Gesamtprojektionen zur DR (unter sieben Prozent). Seine Axone scheinen

im DRdmn, DRvmn/vml aber auch im DRdl/il zu enden. Der DRr, DRc, DRif, DRvl, DRimn und DRil scheinen nicht angesteuert zu werden.

Auch der **LHbLB** sendet insgesamt eher wenige Axone zur DR. Sein Anteil an den Gesamtprojektionen liegt unter neun Prozent. Am zahlreichsten projizieren seine Neurone in die lateralen Areale der DR, d.h. zum ipsilateralen DRvl, aber auch zum DRil, DRdl und DRvml. Im rostralen DRif, aber auch im DRdmn und DRimn scheinen keine Axone zu enden.

Versuch MT	42/04	84/02	55/02	57/02	99/02	04/04	08/04	05/04	104/02	01/04	105/02	56/02	82/02
Lage/ Bregma	-7,6 mm	-7,9 mm	-7,7 mm	-8,7 mm	-7,1 mm	-7,3 mm	-8,0 mm	-7,9 mm	-8,2 mm	-8,1 mm	-8,0 mm	-8,0 mm	-8,1 mm
Maße in µm	400* 350* 300	300* 250* 300	200* 200* 200	300* 200* 100	200* 150* 200	300* 250* 300	350* 350* 250	400* 400* 350	450* 300* 250	200* 300* 150	500* 300* 400	450* 200* 200	400* 300* 300
Unter- kerne	DRdmn, (DRdl, DRimn), mittig	DRdmn, DRimn, mittig	DRimn, mittig	DRc, (DRif), mittig	DRr, DRif, mittig	DRr, (DRvl, DRil), rechts	DRvmn, mittig	DRvmn, DRif, DRvml, mittig	DRvml, DRvmn, DRvl, links	DRvml, (DRvl), links	DRdl, DRil, (DRimn/ dmn), rechts	DRdmn, DRimn, mittig	DRdl, (DRimn) rechts
Tracer	FG	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb	CTb
5-HT	++	+ DRdmn -DRimn	+	+	+	++	+	+	(+)	+(+)	+	+	+(+)
TH	++ (Zellen, Fasern)	(-) (einige Fasern)	(+) (einige Fasern)	(+) (einige Fasern)	++(+)	+++	+	+	(-) einige Fasern	+	+	++	++ Zellen und Fasern
DBH	+	+	+	-	+(+)	+(+)	+	+	+	(+)	+++	+(+)	+++
GAD 65	(+)	+	+	+++	(+)	+++	++	++	-	+	+	++	+
GAD 67	-	+	(+)	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+
Gala-nin	+	-	+	(+)	(+) einige Fasern	+	++	++	++	++	- DRdmn + DRimn	- DRdmn + DRimn	(+)
NK1-Rez.	+	+	+++	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+	+	+
NT	(+)+	+	(+)	(+)	+ Fasern	++	+ zentral	+ zentral	-	(+)	++	+	++
Cal-bindin	-	-	-	+ lateral	+ Fasern	+	-	-	-	-	(+)	-	+ Zellen
ChAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3.3: Übersicht über die genaue Lage, immunhistochemische Eigenschaften des Injektionsgebietes und die verwendeten retrograden Tracer.

Legende: -/ (+) keine/ kaum Immunoreaktivität , +/ ++/ +++ wenig/ mäßig/ starke Immunoreaktivität

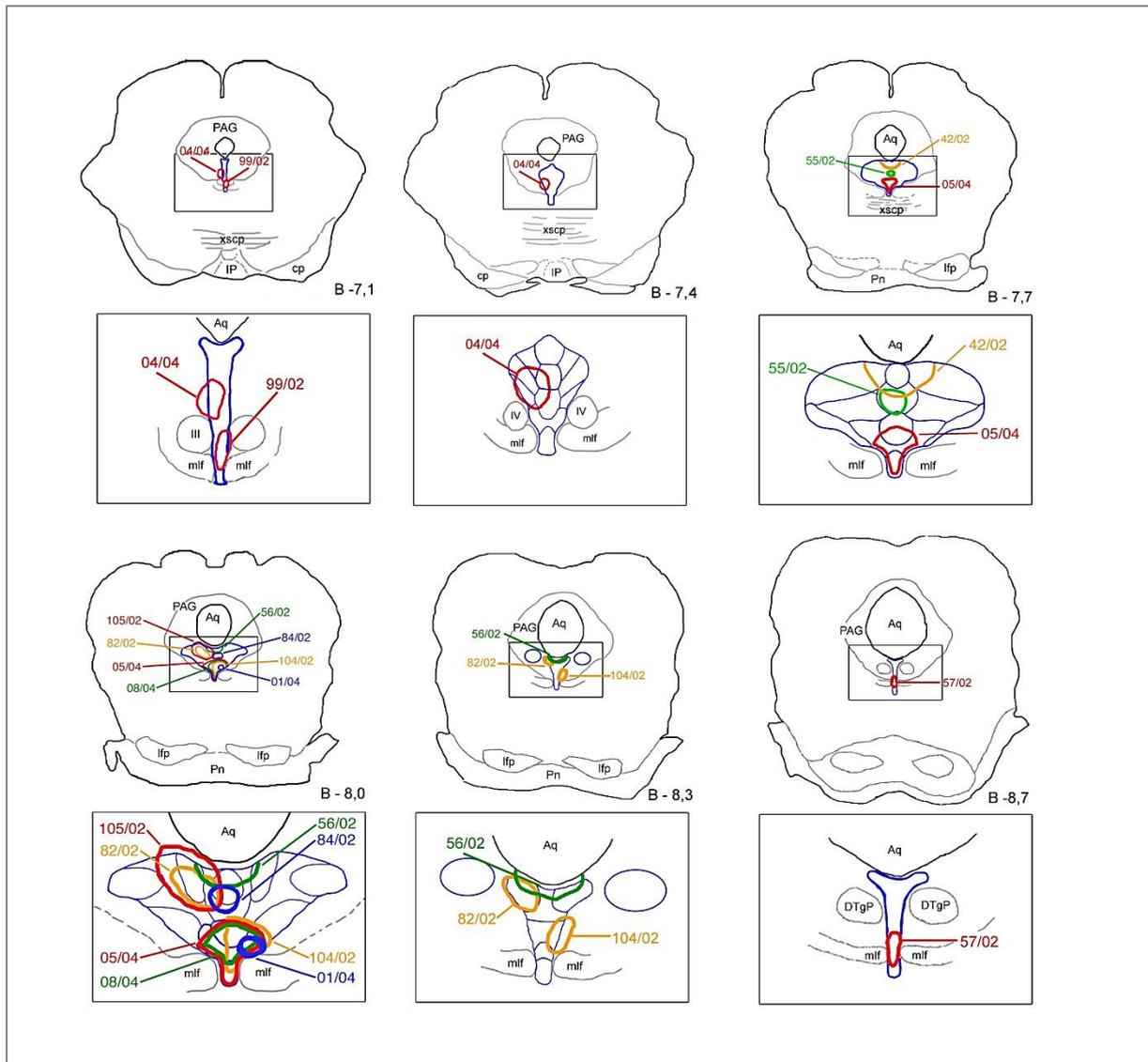


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Injektionsstellen in die einzelnen Unterkerne der Dorsalen Raphe mit Angabe der Koordinaten in rostrokaudaler Achse (Bregma - 7,1mm bis Bregma - 8,7mm). Unterhalb der Koronarschnitte befindet sich jeweils die dazugehörige vergrößerte Abbildung der DR.

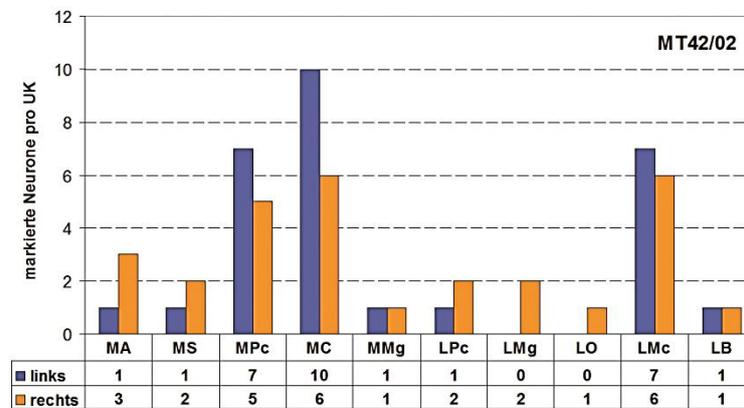
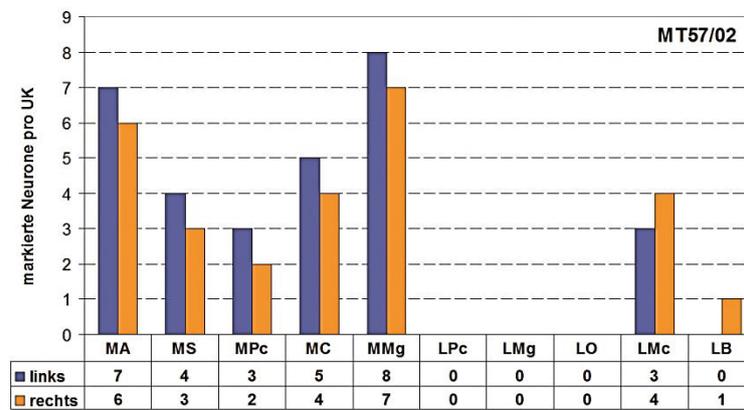
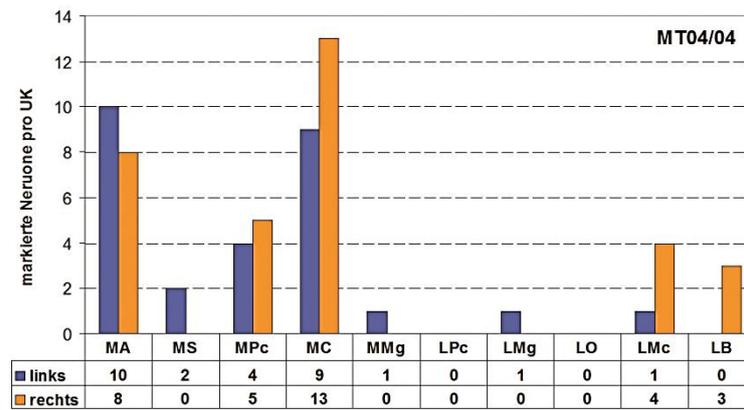
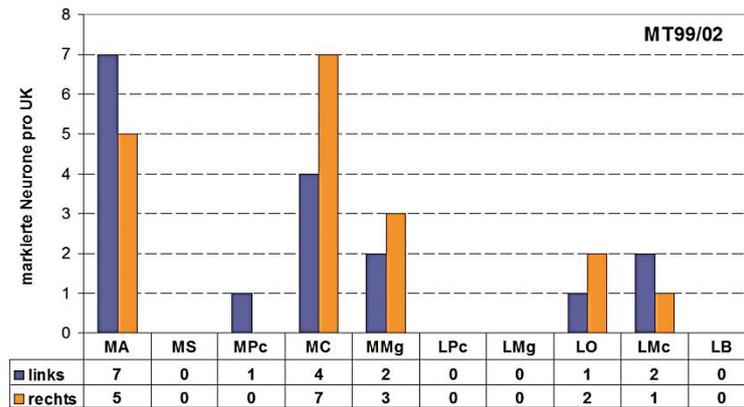


Abbildung 3.10: Erklärung siehe Seite 92.

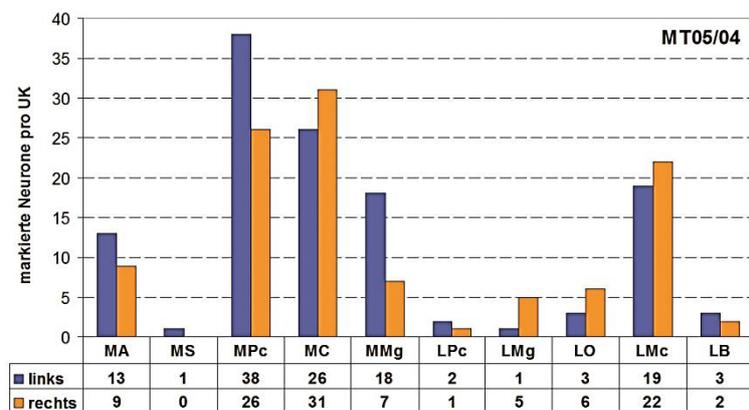
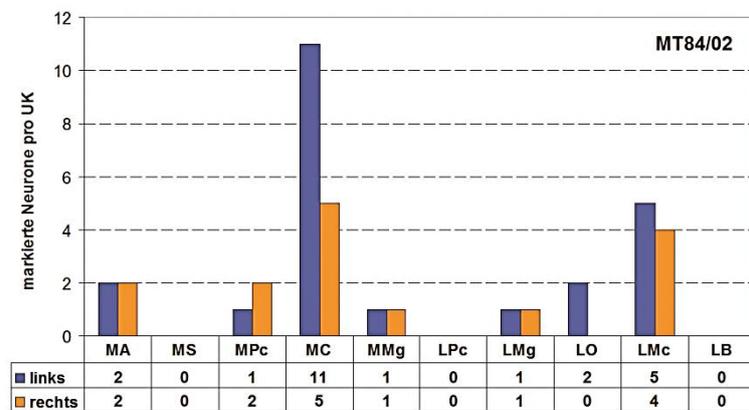
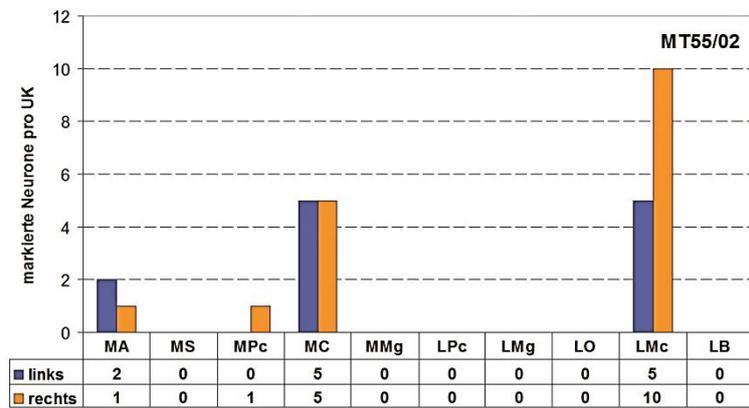
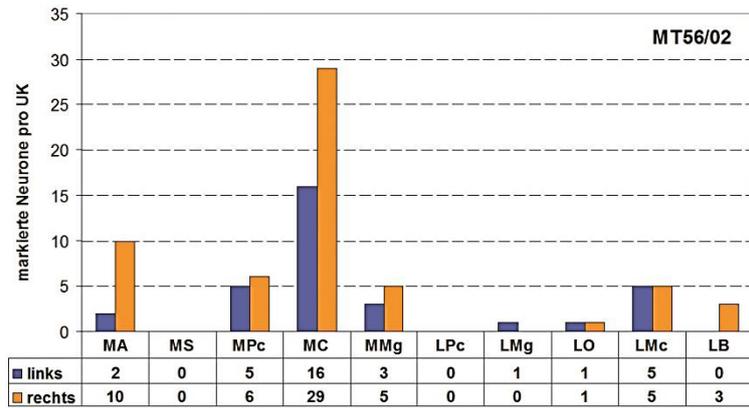


Abbildung 3.11: Erklärung siehe Seite 92.

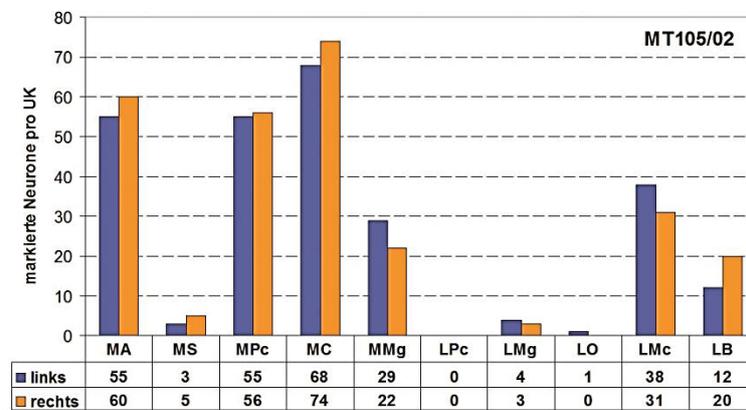
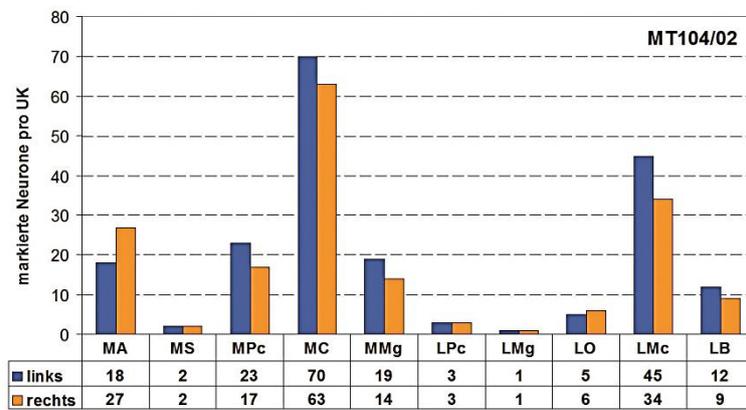
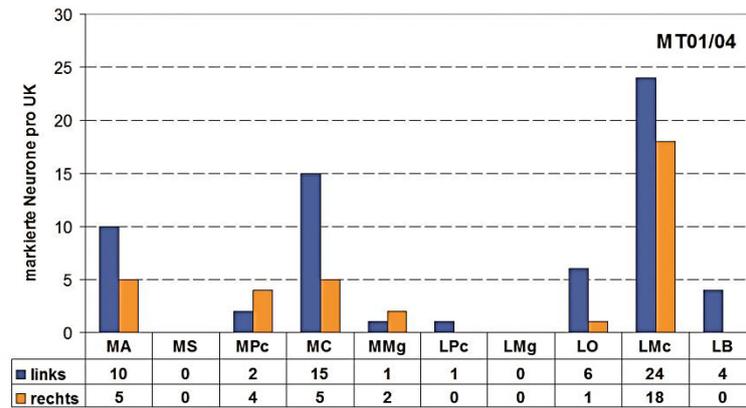
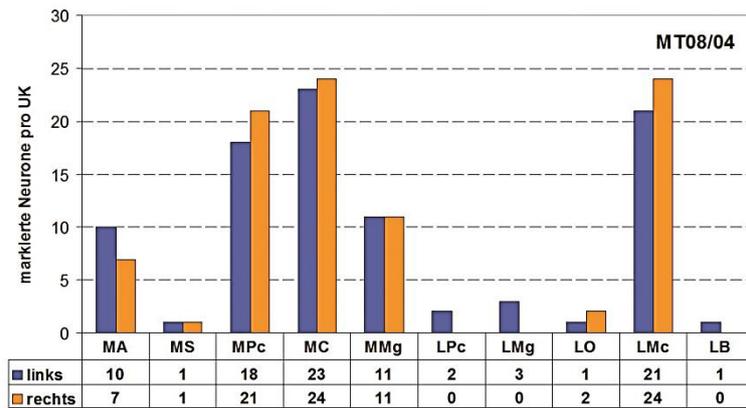


Abbildung 3.12: Erklärung siehe Seite 92.

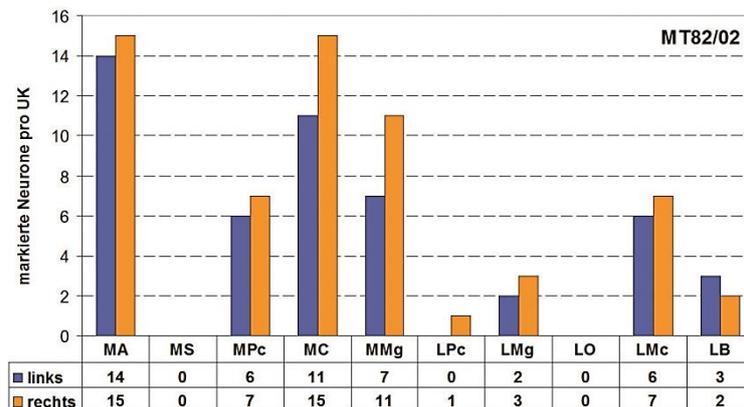


Abbildung 3.13: Erklärung siehe unten.

Zu Abbildungen 3.10 bis 3.13: Seitengetrennte Darstellung der Ergebnisse der retrograden Tracingversuche. Linke Spalte: Anzahl der Tracer-haltigen Neurone in den einzelnen Unterkernen des LHbM; rechte Spalte: Anzahl der Tracer-haltigen Neurone in den einzelnen Unterkernen des LHbL. Rostraler Bereich der DR: MT 99/02, MT 04/04; dorsaler Bereich der DR: MT 42/02, MT55/02, MT 84/02, MT 56/02; ventraler Bereich der DR: MT 05/04, MT 01/04, MT 08/04, MT 104/02; lateraler Bereich der DR: MT 105/02, MT 82/02.

Zu Abbildung 3.14 (folgende Seite): Exemplarische Abbildung der Habenula nach CTB-Injektion in den DRdl/DRil (MT105/02). In der linken Spalte (A-E) wurde der jeweilige Schnitt nach Klüver-Barrera-Färbung fotografiert und nachträglich am Computer die einzelnen Unterkerne für den linken LHb eingezeichnet. Die mittlere Spalte (A'-E') zeigt den angrenzenden Kryostat-Schnitt durch die Habenula nach immunhistochemischer Visualisierung des CTB. Die markierten Neurone befinden sich vornehmlich im LHbM. In der rechten Spalte (A''-E'') ist der jeweils nachfolgende Kryostatschnitt der rechten Habenula nach immunhistochemischer Visualisierung von Kir3.2 dargestellt.

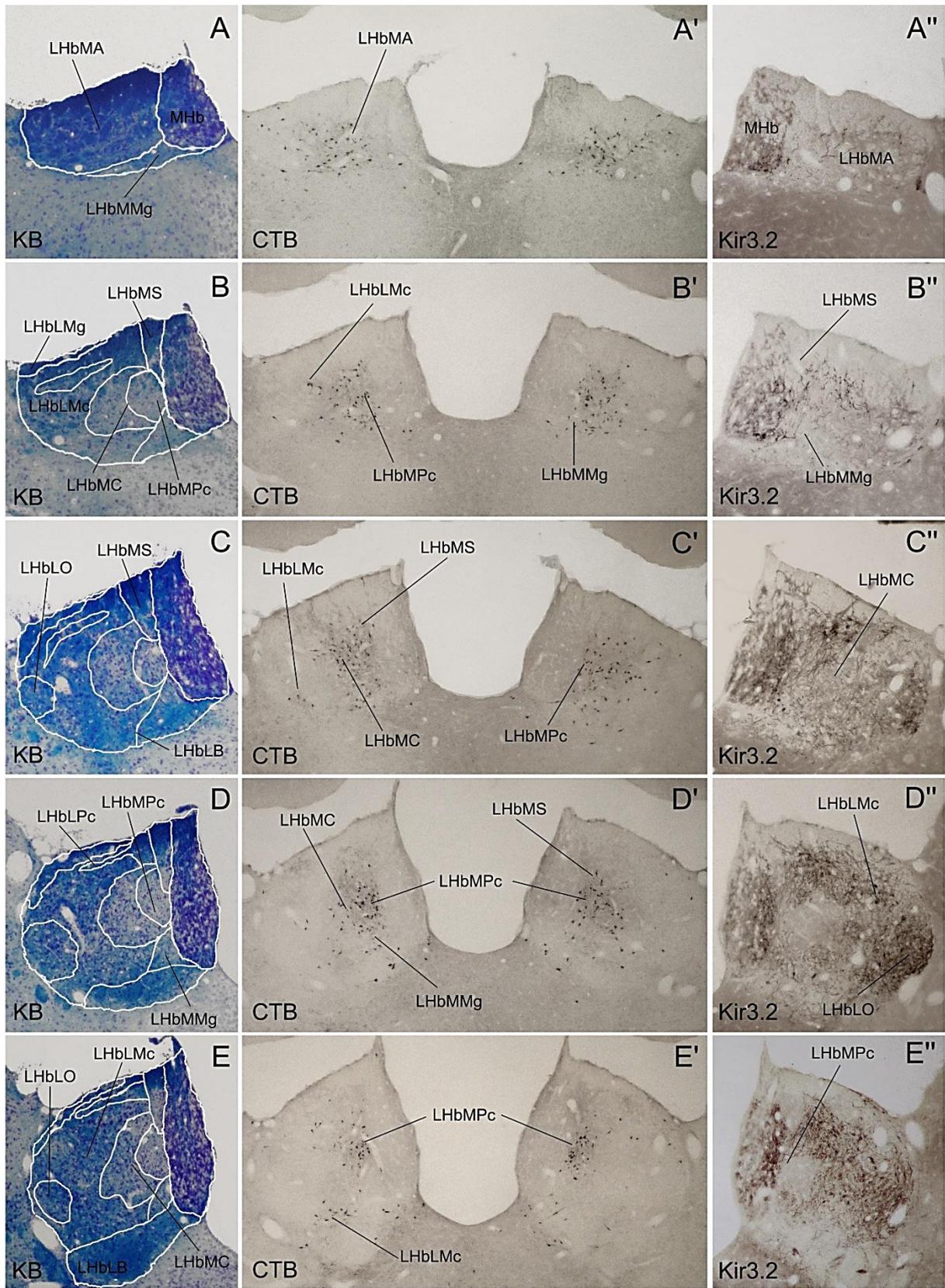


Abbildung 3.14: Erläuterung siehe Seite 92.

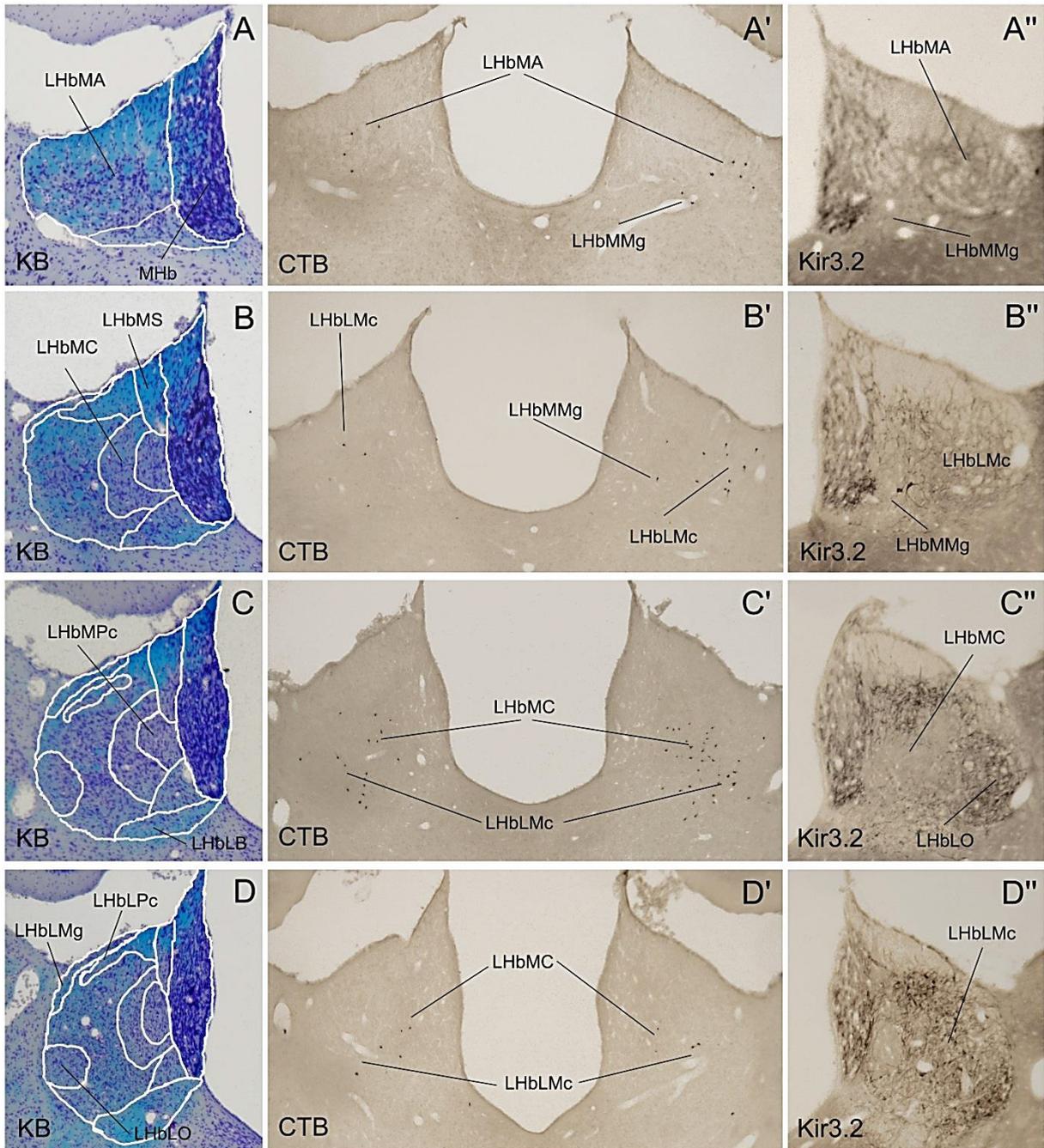


Abbildung 3.15: Exemplarische Abbildung der Habenula nach CTB-Injektion in den DRvml/DRvl (MT01/04). Linke Spalte (A-E): Klüver-Barrera-Färbung der Habenula mit schematischer Einzeichnung der Unterkerne. Mittlere Spalte (A'-E'): CTB-haltige Neurone im LHb liegen vor allem im lateralen LHb (LHbL). Rechte Spalte (A''-E''): immunohistochemische Visualisierung von Kir3.2 am nachfolgenden Kryostatschnitt.

4. Diskussion

Mikroskopische Anatomie und Neurophysiologie bilden die Grundlage der Untersuchung neuronaler Netzwerke. Die Analyse der strukturellen Vernetzung exzitatorischer und inhibitorischer Neurone sowie die Untersuchung der jeweiligen Transmitter, Ko-transmitter und Neuropeptide erlauben wichtige Rückschlüsse auf mögliche Funktionskreise und bilden somit die Grundlage für Entwicklung neuromodulatorischer Pharmaka mit möglichst hoher Effektivität und geringem Nebenwirkungsprofil.

Nachdem in der lateralen Habenula zehn Unterkerne nach morphologischen Kriterien abgegrenzt wurden (Andres, et al., 1999; Geisler, et al., 2003), sollte hier untersucht werden, ob sich diese Areale auch durch spezifische Projektionen unterscheiden, welche möglicherweise von funktioneller Bedeutung sind.

4.1 Methodologische Aspekte bei der Analyse von Projektionssystemen mittels Tract-Tracing

Zur Untersuchung von neuronalen Netzwerken sind im Laufe der Zeit bereits verschiedene Methoden etabliert worden. Diese reichen von unspezifischen Markscheidenfärbungen und Läsionsstudien bis hin zu verschiedenen Tracing-Techniken. Bei den modernen Tracing-Techniken wird die Fähigkeit von Neuronen genutzt, visualisierbare Moleküle aufzunehmen und durch axonalen Transport innerhalb der Nervenzelle aktiv zu befördern. Die verschiedenen Marker (Tracer) unterscheiden sich durch die Nutzung unterschiedlicher Transportproteine in der Zellmembran. So werden Fluoro-Gold (FG) und die Beta-Untereinheit des Cholera-Toxins B (CTB) an den präsynaptischen Endigungen der Nervenzellen, Lektine und Latexpartikel hingegen an Dendriten und Somata aufgenommen. Tracer lassen sich je nach Transportrichtung in der Nervenzellen einteilen. So nutzten die Tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (Phal-L) rein anterograde und Fluorogold hingegen retrograde Transportmechanismen. Tetramethylrhodamingekoppelte Dextrane (TMR-DA) werden prinzipiell bidirektional transportiert, wobei je nach Größe der gekoppelten Dextrane dieses Gleichgewicht zugunsten einer bestimmten Transportrichtung verschoben werden kann (Vercelli, et al., 2000).

Bei der Wahl bestimmter Neurotracer sind auch substanzspezifische Eigenschaften zu beachten. Diese spielen beispielsweise für die unterschiedliche intrazelluläre Haltbarkeit (Resistenz gegenüber Abbauprozessen) oder Zytotoxizität eine entscheidende Rolle.

Während in den Anfangsjahren vornehmlich radioaktiv markierte Aminosäuren für die anterograde Darstellung von Projektionswegen in Frage kamen, finden heutzutage eine Vielzahl von Substanzen Verwendung. Diese sind entweder selbst-visualisierend (Fluoreszenz-Farbstoffe) oder bilden durch Enzymreaktionen (Meerrettichperoxidase) im Gewebe Farbniederschläge. Mittlerweile stehen auch verschiedene Verstärker-Methoden zur Verfügung (z.B. Biotin-Avidin-Methode, Streptavidin-Methode). Die Verwendung von attenuierten, neurotrophen Viren ermöglicht inzwischen sogar den transsynaptischen Transport über mehrere Neurone hinweg und somit die Unterscheidung in Projektionen erster und zweiter Ordnung (Felton, et al., 1999).

Bei der Anwendung von Tract-Tracing-Studien spielt die Größe der Injektionsstellen eine wichtige Rolle. Sie sollte einerseits hinreichend groß sein, um ausreichend Tracer ins Hirngewebe einzubringen und somit möglichst viele der transportierenden Neurone darstellen zu können. Für die genaue Erfassung von potentiellen Neuronenkreisen sind dagegen möglichst kleine und genau lokalisierte Injektionsstellen wünschenswert. Im Fall der lateralen Habenula ist es technisch nicht realisierbar, eine ausreichende Menge an Tracer isoliert in jeden einzelnen der zehn Unterkerne zu injizieren ohne die benachbarten Subnuclei ebenfalls zu treffen. Für die Untersuchung von putativen unterkernspezifischen Projektionen ist es daher sinnvoll, retrograd in die Projektionsgebiete des LHb zu tracen und anschließend die Verteilung von Neuronen in den einzelnen Subnuclei zu untersuchen. Auch durch den Vergleich ähnlicher Injektionsstellen, welche in unterschiedlichem Maße benachbarte Subnuclei einbeziehen, lassen sich häufig Aussagen bezüglich der Projektionen relative kleiner Areale treffen, auch wenn die einzelnen Injektionsstellen größer sind als der jeweilige Unterkern.

4.1.1 Vor- und Nachteile der verwendeten Tracing-Methoden

Für die anterograden Tracingstudien wurden hier Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (Pha-L) und Tetramethylrhodamin-Dextranamin (TMR-DA) verwendet. TMR-DA wird prinzipiell bidirektional in den Neuronen transportiert. Bei der verwendeten Molekülgrö-

ße von 10kDA findet jedoch vornehmlich anterograder neuronaler Transport statt (Vercelli, et al., 2000). Als retrograde Tracer wurden Fluoro-Gold (FG) und die Beta-Untereinheit des Choleratoxins (CTB) verwendet. Alle vier Tracer werden von vitalen Neuronen gut aufgenommen und entlang des Mikrotubulussystems transportiert. Für die immunhistochemische Visualisierung wurden optimierte und standardisierte Protokolle verwendet, welche die Tracer sehr selektiv darstellen. Die Verwendung von Verstärkersystemen (ABC-Methode) führt zu kontrastreicherer Färbungen und ermöglicht dadurch eine gute lichtmikroskopische Identifikation der neuronalen Strukturen.

Die Ergebnisse einiger älterer Tracing-Studien führten zur Hypothese einer potenziellen Neurotoxizität von Fluorogold, da dieser Tracer mit zunehmender Verweildauer in-vivo zu einem scheinbaren Neuronenverlust im Gehirn führt (Illert, et al., 1982; Naumann, et al., 2000). Auch eine neuere Arbeit, welche die Wirkung von FG auf die Neurone von rTg4510-transgenen Mäusen mit Überexpression des humanen pathologischen Tau-Proteins untersuchte, belegte neurologische Defizite und verstärkte Caspase-abhängige Apoptose in diesen Neuronen (He, 2009). Die überwiegende Mehrheit der Studien an gesunden Neuronen verschiedener Spezies (überwiegend Mäuse und Neunaugen) ergab jedoch, dass FG nicht neurotoxisch wirkt, sondern über lange Zeit insbesondere in den Lysosomen nachgewiesen werden kann (Akhavan, et al., 2006; Aston-Jones, et al., 2009; McClellan, et al., 2006; Novikova, et al., 1997; Persson and Havton, 2009). Die Nachweisbarkeit lässt sich dabei durch die Verwendung von immunhistochemischen Methoden im Vergleich zur direkten Fluoreszenzmikroskopie deutlich erhöhen (Akhavan, et al., 2006). Ab einer Verweildauer von 6 bis 12 Wochen in vivo nimmt der Gehalt an FG durch Zerfalls- und Abbauprozesse in den Neuronen jedoch wieder ab (Akhavan, et al., 2006). Auf eine möglichst kurze Verweildauer im operierten Tier sollte daher geachtet werden.

4.1.1.1 Das Problem der fibers of passage

Ein häufig diskutierter Punkt bei der Interpretation von Tracing-Studien ist das Problem der „fibers of passage“. Dabei ist gemeint, dass Nervenfasern, welche ein Kerngebiet nur durchziehen ohne dort zu Synapsen zu bilden, Tracersubstanzen akzidentell aufnehmen und diese ebenfalls transportieren können. Dieses Phänomen tritt teilweise durch lokale Gewebeverletzung im Injektionsgebiet, teilweise jedoch auch ohne ent-

sprechende Läsionen durch tracerspezifische Charakteristika auf. Durch diese akzidentelle Traceraufnahme kommt es zu falsch positiven Ergebnissen, welche zu Fehlinterpretationen führen können. Es ist bekannt, dass nicht alle Neurotracer im gleichen Ausmaß zu einer „fibers of passage“-Problematik führen (Brodal, et al., 1983; Chen and Aston-Jones, 1995; Dado, et al., 1990; Frey, et al., 1997; Llewellyn-Smith, et al., 1990; Luppi, et al., 1990; Swanson, 2002; Vrang, et al., 1995).

Um die akzidentelle Aufnahme von Tracersubstanz durch „fibers of passage“ zu reduzieren, wurden alle zur Verfügung stehenden Maßnahmen zur Minimierung des lokalen Gewebes Schadens ergriffen. So wurden nur geradlinige gebrochene Mikropipetten mit kleinen Spitzendurchmessern verwendet und die applizierten Stromstärken gering gehalten. Die Tracer wurden iontophoretisch und nicht mechanisch appliziert, um das Risiko falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren (Luppi, et al., 1990).

Durch die Gegenüberstellung der anterograden und retrograden Tracing-Versuche sowie durch den Vergleich der Ergebnisse von Tracern mit bekannter „fibers of passage“-Problematik (z.B. TMR-DA) mit Tracern, welchen bisher keine oder wenig akzidenteller Transport nachgewiesen werden konnte (z.B. PHA-L), wird eine Aussage darüber möglich, in welchem Umfang falsch positive Ergebnisse durch „fibers of passage“ die Resultate beeinflussen (Conte, et al., 2009). Im Fall der DR wäre eine fibers-of-passage-Problematik theoretisch am ehesten für Injektionen in den DRif, DRvmn und DRvml denkbar, da diese Areale von zahlreichen nicht terminierenden Fasern aus dem LHb durchzogen werden. Der Vergleich der Gesamtzahlen der retrograd markierten Zellen mit den anterograden Ergebnissen und den jeweiligen Größen der dazugehörigen Injektionsstelle spricht jedoch eher gegen das Vorliegen einer relevanten fibers-of-passage-Problematik bei den retrograden Studien.

Der Vergleich der anterograden Tracer TMR-DA (siehe Kapitel 3.2, MT 18/04, MT19/04) und PHA-L (nicht dargestellte eigene Ergebnisse und weitere institutsinterne Untersuchungen) zeigt übereinstimmende Ergebnisse für die Verteilung der Axonterminalen des LHb in der DR. Eine gravierende Verfälschung der Ergebnisse durch die fibers of passage-Problematik bei der Untersuchung der Projektionen vom LHb zur DR mit TMR-DA ist daher unwahrscheinlich.

4.2 Interpretation der Ergebnisse – Inhaltliche Überlegungen

Der Nachweis von Axonendigungen in einem Kerngebiet legt auf den ersten Blick nahe, dass diese Axone zu einer Exzitation oder Inhibition der Neurone jenes Kerngebietes führen können. Bei der Beurteilung von Tracing-Studien muss jedoch beachtet werden, dass Axone zwar im Gebiet eines Subnucleus enden können, jedoch synaptische Kontakte mit den Dendriten benachbarter Areale besitzen können. Solche verzweigten Dendritensysteme sind beispielsweise für den LHb, nicht jedoch für die DR beschrieben (Iwahori, 1977; Kim and Chang, 2005). Umgekehrt kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass bei Injektionen in die einzelnen Subareale einer Hirnstruktur retrograder Tracer über Axonkollateralen benachbarter Subareale aufgenommen und transportiert wurden. Eine genauere Beurteilung der Innervation eines Kerngebietes erlauben weiterführende Methoden wie zum Beispiel Doppelmarkierungen oder Tract-Tracing in Kombination mit elektronenmikroskopischem Nachweis von Zellkontakten. Diese sind jedoch technisch aufwendiger und stehen daher in der Regel erst an zweiter Stelle zur Beantwortung spezieller Fragestellungen.

Die Anzahl der markierten Neurone pro Unterkern erlaubt keinen direkten Rückschluss auf die funktionelle Bedeutung oder „Intensität“ dieser Verbindung. Es ist bekannt, dass in manchen Fällen ein synaptischer Kontakt zwischen zwei Neuronen ausreicht, um die zweite Nervenzelle zu depolarisieren, in anderen Fällen ist eine Bahnung durch mehrere Neurone notwendig, um eine Erregung weiterzuleiten. Weiterführende elektrophysiologische oder pharmakologische Untersuchungen sind hierzu notwendig.

4.3 Die Interpretation der Tracing-Ergebnisse erfordert eine detaillierte Kenntnis der Dorsalen Raphe

Die gebräuchlichste Einteilung der DR ist die Nomenklatur nach Paxinos und Watson. Diese unterteilten die DR in rostrale, kaudale, dorsale, ventrale und ventrolaterale Subareale (Paxinos and Watson, 1989). Die Zellmorphologie und Verteilung serotoninerger Neurone deuten jedoch bereits auf einen komplexeren Aufbau der einzelnen Unterkerne hin. Bei der Auswertung der anterograden Tracing-Versuche fiel außerdem auf, dass sich die Axonterminalen je nach Lage der Injektionsstelle im LHb clusterähnlich innerhalb der bekannten Unterkerne der DR abbilden. Um diese Cluster besser charakteri-

sieren zu können und Rückschlüsse auf mögliche Funktionskreise ziehen zu können, wurde das Vorkommen verschiedener Neuropeptide, Transmitter und anderer Markerproteine in der DR untersucht. Anhand der Zellmorphologie sowie der zytochemischen Charakteristika der Neurone kann die DR in zehn verschiedene Subareale eingeteilt werden (Kapitel 3.1).

4.3.1 Die Dorsale Raphe ist heterogen aufgebaut

In der DR kommen verschiedene Neurotransmitter und Neuropeptide vor. Für das Primatenhirn wurde die Verteilung und Kolo-kalisation der verschiedenen Transmitter und Neuromodulatoren bereits in einer sehr detaillierten Übersichtsarbeit dargestellt (Charara and Parent, 1998). Für das Rattenhirn existiert bisher keine ähnliche Untersuchung, wengleich inzwischen einzelne Reviews die Verteilung der unterschiedlichen Neurotransmitter in der DR beschreiben (Michelsen, et al., 2008; Michelsen, et al., 2007). Zum besseren Verständnis der neuroanatomische Unterschiede zwischen beiden Gattungen, zum Beispiel bezüglich der Anzahl der Unterkerne und Verteilung serotoninerger Neurone der DR ist eine genauere Untersuchung des Rattenhirns notwendig.

Circa ein bis zwei Drittel der Neurone der DR des Rattenhirns enthalten **Serotonin**, wobei dieses häufig mit anderen Neurotransmittern und Neuromodulatoren kolo-kalisiert ist (Hokfelt, et al., 1978; Jacobs and Azmitia, 1992; Melander, et al., 1986; Molliver, 1987). **Katecholaminerge** (Tyrosinhydroxylase-positive), insbesondere **dopaminerge** Neurone, machen bei der Ratte bis zu ein Drittel der Neurone der DR aus (Descarries, et al., 1986; German, et al., 1983; Hokfelt, et al., 1976; Hokfelt, et al., 1978; Kohler and Goldstein, 1984; Stratford and Wirtshafter, 1990). Bei Katzen (Miachon, et al., 1984) und Menschen (Pearson, et al., 1979) ist ihr Anteil geringer als im Rattenhirn (Descarries, et al., 1986). Sie liegen vor allem in den ventromedialen Anteilen der DR und projizieren vornehmlich zum Nucleus accumbens sowie dem lateralen Septum, während der mediale Prefrontale Cortex und das Caudatoputamen kaum von ihnen innerviert werden (Stratford and Wirtshafter, 1990).

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass neben einer Häufung TH-positiver Neurone in den rostralen ventromedialen Abschnitten der DR, auch zahlreiche TH-positive Somata und Nervenfasern im DRdl und DRil vorkommen (Abb. 3.2B, Abb. 3.3D, S. 60 f.).

Die Dopaminbetahydroxylase (DBH) katalysiert die Umwandlung von Dopamin in **Noradrenalin**. Sie lässt sich vor allem in den Nervenfasern und einigen Somata des DRdl und des angrenzenden Periaquäduktalen Grau (PAG) nachweisen. Die gesamte DR ist bis auf den DRimn und den DRvl von einem feinen DBH-positiven Fasernetz durchzogen (Abb. 3.2H, Abb. 3.3.H, Abb. 3.4E, S. 60 ff.). Noradrenerge Afferenzen zur DR bewirken eine tonische Aktivierung serotoningerger Neurone über den Alpha-1-Adrenorezeptor, welcher auf nahezu allen serotoninergen, aber auch einigen GABAergen Neuronen den DR lokalisiert ist (Day, et al., 2004).

Im Rattenhirn befinden sich zahlreiche **GABA**erge Neurone im Bereich des dorsalen mesopontinen Tegmentums (Belin, et al., 1983; Ford, et al., 1995; Nanopoulos, et al., 1982; Ottersen and Storm-Mathisen, 1984; Stamp and Semba, 1995). Dieses Gebiet umfasst neben der DR auch das Periaquäduktale Grau (PAG), die Extrapyramidalregion des Mittelhirns (midrain extrapyramidal area, MEA) und verschiedene cholinerge Kerngebiete (PPTg und LDTg) (Baker, et al., 1991; Rye, et al., 1987; Steininger, et al., 1992). Pharmakologische Untersuchungen zeigen, dass GABAerge Neurone die serotoninergen Nervenzellen der DR inhibieren (Lee, et al., 1987; Nishikawa and Scatton, 1983; Pan and Williams, 1989) und bei der Schmerzmodulation eine wichtige Rolle spielen (Levine and Jacobs, 1992; Moreau and Fields, 1986; Wang, et al., 1994; Wang and Nakai, 1994). GABAerge Neurone kommen beim Primaten (Squirrel monkey) weniger häufig, jedoch prinzipiell in den gleichen Gebieten wie serotoninerge Neurone vor (Charara and Parent, 1998). Sie sind außerdem kleiner als serotoninerge Nervenzellen und bilden um diese zahlreiche boutontragende Fasernetze (Charara and Parent, 1998). Sie sind überwiegend als symmetrische Synapsen mit den Perikarya und Dendriten der Serotonin-haltigen Neurone verbunden (Wang and Nakai, 1994). Einige der GABAergen Neurone fungieren nicht als lokale, sondern Projektionsneurone beispielsweise zum posterioren lateralen Hypothalamus (Ford, et al., 1995).

In den eigenen Untersuchungen zeigt sich in allen Unterkernen ein dichtes GABAerges Fasernetz. Die Glutamatdecarboxylase (GABA-synthetisierendes Enzym) der Isoform GAD₆₅ lässt sich vor allem kaudal im DRc, DRdl und DRil nachweisen, während in den rostralen Anteilen die ventralen Unterkerne (DRif, DRvml, DRvl) ein besonders dichtes GAD₆₅-positives Fasernetz aufweisen (Abb. 3.2F, Abb. 3.3G, Abb. 3.4G, Abb. 3.5E, S.

60 ff.). Besonders viele GAD₆₇-haltige Somata liegen im DRvmn, DRif und DRdl (Abb. 3.3F, Abb. 3.2G, S. 60 f.).

Das Neuropeptid **Substanz P** (SP) kommt in einigen Neuronen der rostralen und kaudalen DR vor (Chan-Palay, et al., 1978; Hokfelt, et al., 1978; Ljungdahl, et al., 1978). Es wird häufig mit Serotonin koexprimiert (Hokfelt, et al., 1978; Pelletier, et al., 1981). Während SP in den rostralen Bereichen und den Wings vornehmlich in den Somata lokalisiert ist, wurde ein dichtes Netz von SP-haltigen Terminalen im Bereich des DRD (Einteilung der Unterkerne nach Paxinos und Watson) beschrieben (Ljungdahl, et al., 1978; Moss and Basbaum, 1983). Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass der Substanz-P-Rezeptor NK1 sehr zahlreich auf den Dendriten des DRimn vorkommt (Abb. 3.3C, S. 61). Der NK1-Rezeptor findet sich zusätzlich auf vielen Neuronen der zentralen und rostralen Zone (Abb. 3.2E, S. 60). Einige der SP-immunoreaktiven Neurone besitzen ascendierende Projektionen zur Amygdala, der Zona incerta und den Ncll. laterales thalami (Lechner, et al., 1993; Li, et al., 1990).

Für das Neuropeptid **Galanin** konnte eine Kollokalisierung mit serotoninerger Neuronen gezeigt werden (Lu, et al., 2007; Melander, et al., 1986; Ogren, et al., 2007). Auch in den eigenen Untersuchungen kommt Galanin häufig in Arealen mit einem hohen Anteil serotoninerger Neurone vor (z.B. DRvmn). Der serotoninarme DRimn hingegen enthält keine Galanin-positiven Zellen (Abb. 3.3B, S. 61)

Das calciumbindende Protein **Calbindin** wurde bisher nur in den kaudalen Anteilen im Rattenhirn beschrieben (Celio, 1990). Während sich in den eigenen Untersuchungen Calbindin-positive Neurone vor allem in den rostralen und lateralen Anteilen der DR darstellen lassen (Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, S. 60 f.). Beim Primaten konnte eine beträchtliche Anzahl calbindinhaltiger Neurone nachgewiesen werden. Diese liegen vor allem zentral in den 5-HT-negativen Arealen (Charara and Parent, 1998). Calbindin ist jedoch auch teilweise mit Serotonin kollokalisiert (Charara and Parent, 1998). Ihm wird eine protektive Funktion in neurodegenerativen Prozessen mit konsekutiver Kalziumüberladung zugeschrieben (Baimbridge, et al., 1992; Braun, et al., 1991; Celio, 1990; Parent, et al., 1996).

Das Neuropeptid **Neurotensin** wurde vor allem in den Somata der rostralen Raphe-Kerne nachgewiesen, während alle Raphe-Kerne von einem Netz NT-haltiger Nervenfasern durchzogen werden (Jolas and Aghajanian, 1996; Jolas and Aghajanian, 1997;

Uhl, et al., 1979). Neurotensin führt zu einer erhöhten Entladungsrate einiger serotoninerger Neurone speziell im ventralen Unterkern der DR, während in den dorsalen und lateralen Anteilen der DR die meisten serotoninerger Neurone nicht oder nur schwach auf Neurotensingabe reagierten (Jolas and Aghajanian, 1996). Tracing-Studien mit kombinierter Neurotensin-mRNA-in situ-Hybridisierung zeigten, dass die DR über Neurotensin zur Area tegmentalis ventralis (VTA) projiziert und dort dopaminerge Neurone aktivieren kann (Geisler and Zahm, 2006).

In den eigenen Untersuchungen konnten am Übergang von der der rostralen zur zentralen Zone der DR zwei dichte NT-positive Faserstränge nachgewiesen werden, welche von ventral nach dorsal verlaufen. Diese liegen vor allem im DRvml und im Randbereich des DRvmn und DRimn, aber auch im DRdl. Zwischen diesen Fasern finden sich auch NT-positive Somata (Abb. 3.2D, S. 60). In der kaudalen zDR finden sich weniger NT-haltige Neurone. Diese liegen vor allem im DRdl und im DRimn. Der DRdmn und DRvml weisen kaum NT-positive Neurone auf (Abb. 3.4D, 3.5A, S. 62 f.).

4.3.2 Die Projektionen der DR sind topographisch geordnet

In Übereinstimmung mit zahlreichen Arbeiten belegen auch die eigenen Tracingergebnisse eine topographische Ordnung der Afferenzen und Efferenzen der DR. Die meisten hodologischen Studien verwenden dabei die Nomenklatur nach Paxinos und Watson, bei der die DR in die Subareale DRD, DRV, DRVL sowie die rostrale und kaudale DR eingeteilt wird (Paxinos and Watson, 1989).

Der DRD und der DRV erhalten einen beträchtlichen Teil ihrer Innervation vom zentralen Kern der Amygdala (Peyron, et al., 1998). Insbesondere im DRD enden sehr zahlreich Axonterminalen aus dem Bettkern der Stria terminalis sowie den lateralen, dorsalen und posterioren hypothalamischen Gebieten (Peyron, et al., 1998).

Die rostralen Anteile der DR projizieren über den medialen aufsteigenden Projektionsweg vornehmlich zur Substantia nigra pars compacta (SNc) und über den dorsalen aufsteigenden Projektionsweg zum Striatum und Globus pallidus (GP) (Bobillier, et al., 1976; Brown and Molliver, 2000; DeVito, et al., 1980; Imai, et al., 1986; Jacobs, et al., 1978; Miller, et al., 1975; Steinbusch, et al., 1981; Steinbusch, et al., 1980; van der Kooy and Hattori, 1980; van der Kooy and Kuypers, 1979). Während die rostrale Raphe

also vornehmlich zu motorischen Zentren projiziert, steuert die kaudale Raphe eher limbische Regionen wie zum Beispiel den Hippocampus und die Amygdala an (Azmitia, 1981; Jacobs, et al., 1978). DRD und DRV weisen viele Projektionen zum motorischen, sensomotorischen und visuellen Cortex auf. Die „Wings“ hingegen haben keine kortikalen Projektionen (O'Hearn and Molliver, 1984; Waterhouse, et al., 1986).

Der DRV projiziert dreifach stärker zum Cortex als der DRD, wobei sich ein Gradient in rostrokaudaler und mediolaterale Ebene beobachten lässt (O'Hearn and Molliver, 1984). Der DRV besitzt besonders zahlreiche efferente Verbindungen zum piriformen Cortex (Datiche, et al., 1995; O'Hearn and Molliver, 1984). Die meisten Projektionen der DR zu den anterioren thalamischen Kerngebieten stammen aus dem DRD und dem DRV (Gonzalo-Ruiz, et al., 1995). Das wichtigste Zielgebiet des DRD ist das Striatum und das laterale Septum (Peyron, et al., 1998; Waselus, et al., 2006). Dabei ist bekannt, dass im DRD zwei morphologisch abgrenzbare Regionen existieren, welche sich auch in ihren Projektionen unterscheiden. Die sogenannte „core“-Region entsendet ihre Axonterminalen vornehmlich zum Caudatoputamen (Peyron, et al., 1998; Steinbusch, et al., 1981) während die „shell“-Region, welche auch Teile des DRV beinhaltet, starke efferente Verbindungen zum Basolateralen Unterkern der Amygdala besitzt (Abrams, et al., 2005; Peyron, et al., 1998).

Der LHb projiziert unter Verwendung exzitatorischer Aminosäuren zur Dorsalen Raphe (Kalen, et al., 1985; Nishikawa and Scatton, 1983). Die Projektionen des LHb enden sowohl in der rostralen, als auch zentralen und kaudalen Zone der DR (Peyron, et al., 1998), wobei die Ergebnisse dieser Arbeit eine genauere Differenzierung ermöglichen.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen, dass eine Unterteilung der dorsomedianen Raphe in zwei Anteile (DRdmn und DRimn) notwendig ist, welche sich nicht nur morphologisch, sondern auch in der Expression verschiedener Neuropeptide sowie in ihren afferenten Verbindungen vom LHb unterscheiden (siehe Kapitel 3.1.1.5, 3.1.1.6, 3.2.1, 3.2.2, 3.3.3.1 und 3.3.3.2).

Der rostrale Anteil des intermediomedianen Unterkerns der DR (DRimn) entspricht der „shell-Region“ des DRD (Abrams, et al., 2005). Der DRimn fällt durch sein dichtes Netz NK1-Rezeptor-positiver Nervenfasern auf, was darauf hindeutet, dass dieser Projektionsweg durch Substanz P modifiziert wird (Commons and Valentino, 2002; Commons, et al., 2003; Valentino, et al., 2003) (eigene Untersuchungen, siehe Kapitel 3.1.1.5). Der

rostrale bzw. zentrale Anteil des DRimn wird überwiegend vom LHbLMc angesteuert, während im kaudalen Anteil vorwiegend Neurone aus dem LHbMC enden (eigene Ergebnisse, siehe Kapitel 3.3.3.2). Im benachbarten dorsomedianen Unterkern der DR terminieren hingegen nur vereinzelte Axone aus dem LHb (eigene Untersuchungen, siehe Kapitel 3.3.3.1). Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass auch die Wings aus morphologisch unterschiedlichen Gebieten (DRdl, DRil DRvl) bestehen, welche Axonterminalen aus unterschiedlichen Unterkernen des LHb erhalten. Im DRdl und DRil enden zahlreiche Axone aus dem LHbM (MA, MC, MPc und MMg), im DRvl vorwiegend Neurone aus dem LHbL(Mc) (eigene Ergebnisse, siehe Kapitel 3.3.4 und 3.3.3.3, Abb. 3.7, S. 70, Tab. 3.2, S. 69).

4.3.3 Kombinierte Analysen ermöglichen Rückschlüsse auf lokale Funktionskreise in der Dorsalen Raphe

Erst durch die kombinierte Analyse von Morphologie, Hodologie, Rezeptor- und Membraneigenschaften der einzelnen Subareale kann ein funktionelles Verständnis von komplexen Hirnstrukturen wie der Dorsalen Raphe oder dem lateralen Habenularkomplex entstehen.

Seit längerer Zeit sind verschiedene Neuropeptide in den Focus der pharmakologischen Forschung gerückt. So werden NK1- und CRF-Antagonisten anxiolytische und antidepressive Eigenschaften zugeschrieben (Kramer, et al., 1998). Die genauen Wirkmechanismen sind jedoch bisher nicht im Detail verstanden. Neurophysiologische Studien zeigen, dass Neuropeptide auf die Neurone der DR je nach Applikationsort unterschiedlich wirken, was jedoch aufgrund des beschriebenen heterogenen Aufbaus nicht überraschend ist. Die lokale Injektion von SP führt in den meisten Unterkernen der DR zu einer Inhibition von rund 80% aller serotoninergen Neurone, wobei 17% dieser Neurone eine vorherige Exzitationsphase aufweisen (Valentino, et al., 2003). Im dorsomedianen Bereich der Dorsalen Raphe, die eine hohe Dichte an NK1-Rezeptoren aufweist (entspricht DRimn der eigenen Untersuchungen), wirkt SP jedoch überwiegend aktivierend auf die serotoninergen Neurone des unmittelbar angrenzenden DRdmn (Commons, et al., 2003; Valentino, et al., 2003). Dabei scheint SP die glutamatvermittelte Erregung von serotoninergen Neuronen zu begünstigen, welche wiederum zu einer erhöhten Autoinhibition führt, wie sich aus den weiterführenden elektrophysiologischen

Untersuchungen unter Verwendung selektiver Rezeptorantagonisten ableiten lässt (Commons and Valentino, 2002; Valentino, et al., 2003). Immunhistochemische Studien zur Kolokalisation von Neuropeptiden zeigen, dass der überwiegende Teil der NK1-Rezeptor exprimierenden Neurone nicht-serotoninerg ist (96% Tryptophanhydroxylase-negativ), während 48-65% der Neurone glutamaterg sind und ein kleinerer Teil (11%) Enkephalin exprimiert (Commons and Valentino, 2002). Die Autoinhibition serotoninerg Neurone wird über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt. Dieser wird von nahezu allen serotoninergen Neuronen, aber auch von einem beträchtlichen Anteil nicht-serotoninerg Neurone in der DR exprimiert (Commons, 2008; Day, et al., 2004; Kirby, et al., 2003).

Die serotoninergen Neurone des DRdmn liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zum DRimn und exprimieren ausserdem den Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF)(Commons, et al., 2003). Anterograde Tracing-Studien (Commons, et al., 2003) zeigen, dass diese 5-HT/CRF-positiven Neurone zum zentralen Kern der Amygdala, dem dorsalen Hypothalamus, dem Bettkern der Stria terminalis sowie dem Locus caeruleus projizieren (Abb. 4.3, S. 121). Die überwiegend nichtserotoninergen, NK1-Rezeptor-positiven Neurone der Shell-Region (entsprechen DRimn) hingegen projizieren unter Verwendung von Glutamat zur VTA, SNc, dem Hypothalamus und der preoptischen Region (Abb. 4.3, S. 121)(Hioki, et al., 2010).

Diese in der DR und letztlich auch in der VTA konvergierenden Neuronenkreise könnten die ähnlichen und überlappenden Wirkungen von Serotonin-Reuptake-Hemmern (SSRI), CRF- und NK1-Antagonisten in Bezug auf Anxiolyse, Depression und antiaggressives Verhalten erklären. SSRI bewirken unter anderem über eine Desensibilisierung der 5-HT_{1A}-Autorezeptoren der DR eine verstärkte serotoninerge Aktivierung des Frontalen und Prefrontalen Cortex, welche wiederum einen inhibitorischen Einfluss auf aggressives Verhalten ausüben, sofern dieses mit negativen Konsequenzen für das Individuum verbunden ist (Siever, 2008). Dabei spielen insbesondere der orbitale frontale Cortex und das anteriore Cingulum eine wichtige Rolle für die Voraussage von Belohnung oder Bestrafung (Siever, 2008).

Analog zur Wirkung von SP auf die einzelnen Neuronengruppen in der DR könnte vermutet werden, dass NK1-Antagonisten in den meisten Unterkernen der DR zu einer erhöhten Serotoninausschüttung führen und damit auch im frontalen und prefrontalen

Cortex, welcher besonders zahlreiche Projektionen aus dem DRV (DRvmn, DRvml) erhält (O'Hearn and Molliver, 1984). Möglicherweise wirken NK1-Antagonisten hemmend auf die serotonergen, CRF-haltigen Neurone des DRdmn, welche zum zentralen Kern der Amygdala (Ce) projizieren. Der Ce besitzt wiederum reziproke Verbindungen zu verschiedenen vegetativen Zentren des Hirnstamms, aber auch der LPO und LHA. Eine verminderte Aktivierung des zentralen Kernes der Amygdala könnte so zu einer verminderten vegetativen Begleitreaktion auf Angst- und Stressstimuli führen. Jedoch ist ein einfacher Umkehrschluss aus den Daten der Wirkung von SP auf mögliche Wirkung von Antagonisten ohne weiterführende Untersuchungen nicht möglich, sondern kann lediglich die Basis für weiterführende Untersuchungen sein.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass vor allem der LHbLMc zum rostralen, NK1-Rezeptor-reichen DRimn projiziert, sollte in weiterführenden Doppelmarkierungsstudien geprüft werden, ob diese Neurone Glutamat und SP oder andere Transmitter verwenden. Interessant wäre weiterhin die Klärung der Frage, wie der LHbMC, der von anderen hypothalamischen und preoptischen Gebieten angesteuert wird als der LHbLMc (Kowski, et al., 2008) das 5HT/CRF-System beeinflusst. Der LHbMC, der LHbMA und der LHbMMg erhalten ihren Haupt-Input vom IHA und cLPOA (Kowski, et al., 2008). Diese drei Unterkerne projizieren zusammen sehr zahlreich in nahezu jedes Gebiet der DR. Daher liegt insgesamt die Vermutung nahe, dass der IHA und die cLPOA einen größeren Einfluss auf die Funktion der DR ausüben als andere hypothalamische oder preoptische Gebiete. Diese Fragestellung wurde bisher jedoch noch nicht spezifisch in elektrophysiologischen Studien getestet.

Nicht nur die Anxiolyse via NK1-Rezeptor-Antagonisten scheint unterkernspezifisch in der DR organisiert zu sein, sondern auch die Verarbeitung von Stressreizen. So werden beispielsweise die serotonergen Neurone der Wings (DRVL) deutlich schneller und intensiver durch verschiedene Stressoren (Schwimmstress, sozialer Stress, Stress durch Umgebungswechsel) aktiviert als beispielsweise die des DRV (Commons, et al., 2005; Crawford, et al., 2010; Johnson, et al., 2008). Die Wings und der DRV weisen wie bereits aufgeführt unterschiedliche Projektionen auf. Der Locus caeruleus (LC), welcher lange Zeit als Motor der serotonergen Spontalaktivität in der DR galt, projiziert gleichermaßen zum DRV und den Wings (Kim, et al., 2004). LHb und mPFC projizieren hingegen stärker zum DRVL als zum DRV (Araki, et al., 1988; Peyron, et al., 1998; Varga,

et al., 2003). Die Wings zeichnen sich durch zahlreiche Projektionen zum dorsolateralen PAG und zur rostralen ventrolateralen Medulla (RVLM) aus und wirken dort regulierend (hemmend) auf die Vasopressoren- und sympathogene Antwort auf Stress (Bago and Dean, 2001; Bago, et al., 2002). In-vitro-Patch-Clamp-Versuche haben nun gezeigt, dass die höhere Sensibilität für Stressoren nicht nur durch einen unterschiedlichen Input zu den einzelnen Subarealen, sondern auch durch unterschiedliche aktive und passive Membraneigenschaften im DRVL und DRV entsteht (Crawford, et al., 2010). Maßgeblich ist dafür ein verstärkter Calcium-Influx in die Neurone des DRVL (Crawford, et al., 2010). In den eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Calbindin als intrazelluläres calciumbindendes neuroprotektives Neuroprotein vor allem in den lateralen, aber auch in den rostralen, interfaszikulären Anteilen der DR vorkommt (siehe Kapitel 3.1.1, Abb. 3.2A, Abb. 3.3A, Abb. 3.4A, S. 60 ff.). Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der DRvl vorwiegend vom LHbLMc, der DRdl und DRil hingegen hauptsächlich vom LHbMPc/MC und LHbMA angesteuert werden, wäre es von weiterem Interesse, die efferenten Verbindungen dieser lateralen DR-Areale detaillierter zu untersuchen, um mögliche funktionelle Bedeutungen der einzelnen Subareale des lateralen Habenularkomplexes zu erschließen. Im DRdl und DRil konvergieren somit auch nachweislich Informationen aus hypothalamischen und cholinergen tegmental Kerngebieten, da der LHbMPc seinen Hauptinput vom LDTg erhält ((Kowski, et al., 2008), institutsinterne nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die kaudale DR erhält Afferenzen aus dem LHbMS. Allerdings ist der neuronale Input zum LHbMS bisher unbekannt. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass der LHbMS seine Spontanaktivität durch systemische Dopamingabe um mehr als 50% erhöht (Kowski, et al., 2009).

4.4 Die Organisation der Efferenzen des LHb

4.4.1 Der LHbM und der LHbL projizieren in unterschiedliche Kerngebiete des Mesencephalons

Der LHbM und der LHbL unterscheiden sich nicht nur in ihren Projektionen zu den einzelnen Unterkernen der DR, sondern auch in ihren efferenten Verbindungen zu anderen Kerngebieten des Mittelhirns. Der LHbM hat zahlreiche Projektionen zur Area tegmentalis ventralis (VTA) und der Medianen Raphe (MnR) (Lehmann, et al., 2002; Lehmann, et al., 2003), eigene Ergebnisse). Zahlreiche Axonterminalen aus dem LHbM lassen sich

auch im Nucleus tegmentalis anterior (ATg) nachweisen (eigene Ergebnisse, Kapitel 3.2.1). Nach Injektionen in den LHbL finden sich keine markierten Axonterminalen im ATg, auch die MnR und VTA enthalten deutlich weniger Axonterminalen (Lehmann, et al., 2002; Lehmann, et al., 2003), eigene Ergebnisse). Hingegen finden sich zahlreiche Projektionen zum Nucleus pedunculopontinus (PPTg) und der Extrapyramidalregion des Mittelhirns (midbrain extrapyramidal area, MEA), dem Nucleus tegmentalis subpeduncularis (SPTg) und der Paramedianen Raphe (PMnR). Auch der Nucleus caudalis der Raphe erhält mehr Projektionen vom LHbL als vom LHbM. Die meisten Axonendigungen finden sich im RMTg (eigene Ergebnisse, Kapitel 3.2.1 und 3.2.2).

Bei den Projektionen des LHb zu den Raphekernen scheint auf den ersten Blick ein mediolateraler Gradient vorzuliegen. Der LHbM projiziert vorwiegend zur medial gelegenen DR und MnR, der LHbL stärker zur lateral gelegenen PMnR (Kim, 2009; Lehmann, et al., 2002; Lehmann, et al., 2003), eigene Ergebnisse). Die Projektionen zum Nuclus interpeduncularis (IP) folgen ebenfalls einem Gradienten, wobei der dorsale IP vom dorsalen MHb, der ventrale IP vom ventralen MHb und der Nucleus intermedius (IN) des IP vom medialen und zentralen Bereich des LHbL, nicht jedoch vom lateralen Bereich des LHbL angesteuert wird (Kim, 2009). Möglicherweise wurde hierbei jedoch der IN durch durch fibers of passage (Injektion in den Fasciulus retroflexus) zumindest teilweise falsch positiv markiert.

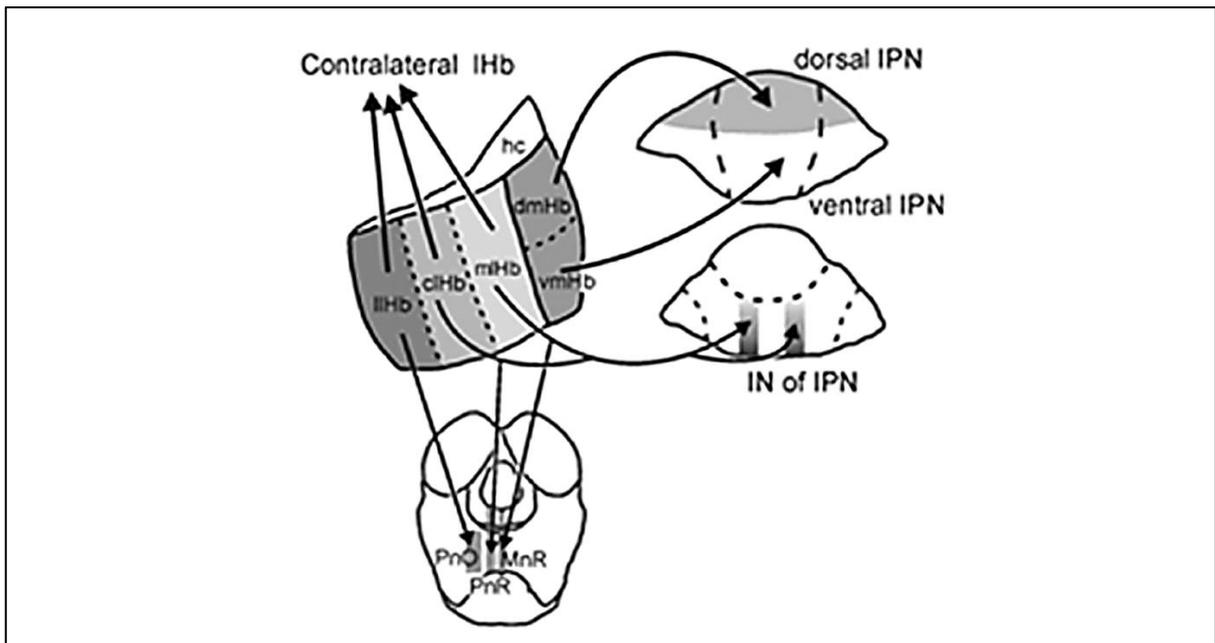


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der deszendierenden Projektionen des Habenularkomplexes (nach Kim et. al., 2009)

4.4.2 LHbM und LHbL projizieren zu unterschiedlichen Gebieten in der DR

Im deutlichen Gegensatz zu früheren Annahmen (Aghajanian and Wang, 1977; Herkenham and Nauta, 1979) zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sowohl der mediale als auch der laterale Anteil des lateralen Habenularkomplexes direkt zur Dorsalen Raphe projizieren. Die Axone aus dem LHbM und dem LHbL enden dabei in verschiedenen Gebieten. Während Neurone des LHbL vornehmlich im Bereich der DRvl sowie den rostralen Anteilen des DRimn terminieren, enden die Axone aus dem LHbM diffuser und zahlreicher in der DR. Der größte Teil der Axonterminalen aus dem LHbM findet sich in den dorsalen Wings (DRdl und DRil) und der kaudalen DR. Aber auch rostrale Gebiete werden vom LHbM angesteuert. Das Gebiet des DRvmn und DRvml wird vorwiegend von Fasern aus dem LHbM, aber auch aus dem LHbL durchzogen, von denen nur wenige hier terminieren. Sie scheinen ein Verbindungsweg zu anderen Teilen der DR (DRdl und DRil) bzw. weiter kaudal gelegenen Raphekernen (MnR, PMnR) zu sein. Diese Vermutung basiert auf den dorsoventralen Faserverläufen im DRvmn und DRif, die sich mikroskopisch nachweisen lassen und dem ähnlichen Verteilungsmuster der Ursprungsneurone im LHb. In der Literatur werden ebenfalls Fasern beschrieben, die von der Medianen Raphe (MnR) und der Paramedianen Raphe

(PMnR) zwischen dem Fasciculus longitudinalis medialis (mlf) zum Periaquäduktalen Grau (PAG) ziehen (Kim, 2009).

4.4.3 Unterkernspezifische Projektionen des lateralen Habenularkomplexes

4.4.3.1 Nicht alle Unterkerne des lateralen Habenularkomplexes projizieren im gleichen Umfang zur Dorsalen Raphe

Nach Injektionen retrograder Tracer in die unterschiedlichen Areale der Dorsalen Raphe lassen sich die Ursprungsneurone im lateralen Habenularkomplex visualisieren. Diese befinden sich überwiegend im medialen Bereich des LHb, was die Vermutung eines mediolateralen Gradienten bei den Projektionen des LHb zu den Raphekernen nahe legt (Kim, 2009). Bei genauer Betrachtung der eigenen Ergebnisse auf Unterkernebene zeigt sich jedoch, dass die einzelnen Zonen hodologisch inhomogen sind. So weisen beispielsweise der LHbMS und der LHbMPc als „mediale“ Areale des LHb, aber auch der LHbMC und LHbLPc als „zentrale“ Areale des LHb und der LHbLO und LHbLMc als „laterale“ Areale des LHb (Abb. 4.1, S. 110) unterschiedliche Projektionsmuster auf (Kim, 2009), vergleiche Kapitel 3.3.6).

Die meisten Neurone, die zur DR projizieren, liegen im zentralen, anterioren und parvozellulären Unterkern des LHbM sowie im magnozellulareren Unterkern des LHbL.

Der **LHbMA** projiziert prozentual betrachtet sehr zahlreich zum DRr und DRc bzw. dem rostralen und kaudalen DRif, aber auch zum DRdl, DRil und DRvmn. Im DRdmn und DRimn enden nur wenige Fasern aus dem LHbMA obwohl in diesem Gebiet Axonterminalen aus dem LHbM nachweisbar sind. Absolut betrachtet enden die meisten Nervenfasern aus dem LHbMA im DRdl/il und DRc.

Der **LHbMMg** projiziert prozentual am stärksten zur DRc, gefolgt vom DRr bzw. rostralen DRif. Relativ betrachtet enden auch im DRdl, DRil, DRvml, kaudalem DRvmn und kaudalem DRimn zahlreiche Neurone. Zum rostralen DRvmn, rostralen DRimn, DRdmn und DRvl scheinen keine oder nur sehr wenige Projektionen vom LHbMMg zu bestehen. Absolut betrachtet enden die meisten Axone aus dem LHbMMg im DRc und angrenzendem DRvmn/DRvml sowie im DRdl und DRil.

Der **LHbMS** entsendet ebenfalls Neurone zum DRc und kaudalen DRif, jedoch kaum in andere Gebiete der DR. Wenige Axone scheinen zusätzlich im DRdmn und DRvmn zu enden.

Der **LHbMPc** und der LHbMC projizieren über zahlreiche Neurone in nahezu jedes Gebiet der DR. Besonders viele Nervenendigungen aus dem LHbMPc finden sich relativ und absolut betrachtet im DRdl, DRil, DRvmn und DRvml. Deutlich weniger Neurone enden im kaudalen DRimn sowie im DRc und kaudalen DRif. Nur einzelne oder keine Projektionen konnten zum DRr und rostralen DRif, zum DRdmn, DRvl und rostralen DRimn nachgewiesen werden.

Der **LHbMC** projiziert prozentual betrachtet sehr stark zum DRr bzw. rostralen DRif, zum DRvml und kaudalen DRimn. Absolut gesehen liegen die meisten Axonendigungen im DRvml und kaudalen DRvmn sowie im DRdl und DRil. Im Vergleich zum LHbMPc projiziert der LHbMC stärker zum rostralen DRimn und DRr bzw. rostralen DRif, während der DRdl und DRil verstärkt vom LHbMPc angesteuert wird. Prozentual gesehen hat der LHbMC relativ wenig Anteil an den Projektionen des LHbM in die kaudale Zone.

Der **LHbLMc** projiziert anteilig sehr stark zum DRvl und angrenzendem DRvml sowie zum DRimn. Absolut betrachtet überwiegen die Projektionen zum DRvl und lateralem DRvml. Die rostralen und kaudalen Anteile der DR, der DRdmn, DRil und DRdl hingegen weisen relativ wenige Axonterminalen aus dem LHbLMc auf.

Die übrigen Unterkerne des LHbL projizieren kaum nennenswert zu DR. Die lateralen Anteile der DR, d.h. der DRvl, weniger der DRdl, DRil und DRvml erhalten gehäuft Affenzenzen vom **LHbLB**. Der DRimn und der DRr werden hingegen nicht vom LHbLB innerviert.

Der **LHbLO** erhält lediglich vom DRvml, DRvl, dem rostralen DRif und kaudalen DRimn einige Axonterminalen.

Der **LHbLPc** und **LHbLMg** besitzten keine nennenswerten Projektionen zur DR. In ihnen konnten nur vereinzelte retrograd markierte Neurone visualisiert werden (Details siehe Kapitel 3.3).

4.4.3.2 Unterkernspezifische Projektionen des lateralen Habenularkomplexes zu andern Raphe-Kernen

Mediane (MnR) und Paramediane Raphe (PMnR) erhalten ebenfalls Projektionen aus dem LHb. Verschiedene anterograde Tracing-Studien Studien sowie die eigenen anterograden Ergebnisse haben einen mediolateralen Gradienten für diese Projektionen nachweisen können ((Kim, 2009); eigene Ergebnisse, Abb. 4.1, S. 110). Durch die kombinierte Anwendung von anterogradem und retrogradem Tract-Tracing wurde darüber hinaus eine unterkernspezifischen Verteilung der Projektionen gezeigt. Während die MnR vorwiegend vom LHbMC, MMg aber auch LHbLMc angesteuert wird, stammen die Projektionen zur PMnR überwiegend aus dem LHbLMc, aber auch aus dem LHbMA und zu einem geringeren Anteil aus fast allen anderen Unterkernen des LHb bis auf den LHbMS (Lehmann, et al., 2002; Lehmann, et al., 2003).

4.4.3.3 Unterkernspezifische Projektionen der hypothalamischen und preoptische Gebiete zum lateralen Habenularkomplex

Nicht nur die Efferenzen des LHb scheinen unterkernspezifisch organisiert zu sein, sondern auch seine Afferenzen. Die preoptische Region und der laterale Hypothalamus sind heterogen aufgebaute Hirnregionen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen. Erst kürzlich wurden die hodologischen Eigenschaften dieser Neurone auf der Ebene der verschiedenen Unterkerne untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die rostrale laterale preoptische Region (rLPOA) vor allem zum LHbLMc und LHbLB projiziert, während Axone aus der kaudalen preoptischen Region (cLPOA) vorwiegend im LHbMA, LHbMC und LHbMMg enden (Kowski, et al., 2008). Auch die hypothalamischen Projektionen zum LHb scheinen unterkernspezifisch organisiert zu sein. Es konnten bereits Projektionen des rostralen Nucleus perifornicalis (rPFX) zum LHbLMc und LHbLB, sowie der Area hypothalamica intermedialis (IHA) zum LHbMC, LHbMMg und LHbMA nachgewiesen werden (Kowski, et al., 2008). Der laterale Hypothalamus (LH) hingegen entsendet Axone in den LHbLMc und LHbLB und der Nucleus hypothalamicus lateralis in den LHbLPc und LHbLMg (Kowski, et al., 2008). Für den LHbMS und LHbMPc konnten keine Afferenzen aus hypothalamischen oder preoptischen Regionen nachgewiesen werden (Kowski, et al., 2008). Im LHbMPc terminieren jedoch zahlreiche Axone aus dem Nucleus tegmentalis laterodorsalis (LDTg)(Kowski, et al., 2008). Im LHbLO enden kaum

Axone aus dem LH und der LPO. Lediglich die anterodorsalen Zellgruppe des lateralen Hypothalamus (LHAad) und der rostrale Nucleus entopeduncularis (EPN) (Globus pallidus internus) projizieren in relevanten Maß zum LHbLO (Kowski, et al., 2008). Einige Forscher vertraten bisher die Meinung, dass das striatale Patch-Kompartiment über den EPN und den LHb die Funktion des Dorsalen Raphe steuert (Rajakumar et al., 1993). Die Ergebnisse der hodologischen Untersuchungen sprechen auf den ersten Blick eher gegen diese Theorie, da nur sehr wenige Neurone vom LHbLO zur DR projizieren. Allerdings gibt es zahlreiche Verbindungen vom angrenzenden LHbLMc zur DR. Durch Doppelmarkierungen mit Injektionen in den EPN und die DR könnte hier die Frage geklärt werden, ob doch eine direkte Verbindung zwischen diesen beiden Hirnstrukturen über in den LHbLO reichende Dendriten des LHbLMc besteht (siehe Kapitel 4.2), ob der LHbLO indirekt über Interneurone zum LHbLMc die DR ansteuert oder ob beide Hypothesen verworfen werden müssen.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse und Beantwortung der Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Projektionsmuster vom lateralen Habenularkomplex (LHb) zur Dorsalen Raphe (DR) und der Vergleich zu den Afferenzen des LHb aus den hypothalamischen und preoptischen Gebieten. Dabei sollte geklärt werden, ob diese Muster für oder gegen eine unterkernspezifische Organisation der morphologisch abgrenzbaren Subareale des LHb sprechen. Neben immunzytochemischen Untersuchungen zu den anatomischen Charakteristika der einzelnen Subareale der Dorsalen Raphe wurden dazu antero- und retrograde Tract-Tracing-Studien durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nicht nur wie lange Zeit vermutet der LHbM, sondern auch der LHbL zur DR projizieren. Dabei enden beide Projektionswege in verschiedenen Regionen der DR, welche sich auch durch den Gehalt an Neurotransmittern und Neuromodulatoren unterscheiden.

Die eingangs gestellten Fragen lassen sich wie folgt beantworten:

1. Die Ausgangsneurone der Projektionen des LHb zur DR sind nicht gleichmäßig über das gesamte Gebiet des LHb verteilt, sondern lassen sich in unterschiedlichem Ausmaß den morphologisch abgegrenzten Subarealen des LHb zuordnen (siehe Kapitel 4.4.3.1). Insgesamt stammen die meisten Neurone aus dem LHbMC, LHbMPc, LHbMA und LHbLMc, wobei diese in unterschiedlichem Ausmaß in die einzelnen Subareale der DR projizieren. Verhältnismäßig viele Projektionen stammen auch aus dem LHbMMg, weniger aus dem LHbMS und LHbLB, sehr wenige aus dem LHbLO. Im LHbLPc und LHbLMg ließen sich nur vereinzelt retrograd markierte Neurone nachweisen. Die Verteilung der Ursprungsneurone im LHb folgt dabei keinem rostrokaudalen oder mediolateralen Gradienten (Vgl. Kapitel 4.4.3.1), sondern spricht eher für unterkernspezifische Projektionen, was auch eine funktionelle Bedeutung der morphologisch abgegrenzten Unterkerne des LHb suggeriert. Am deutlichsten wird dieses Verteilungsmuster unter Beachtung der verschiedenen Subareale der DR (siehe Abb. 3.1 ff., S. 59 ff.). Die Projektionen vom LHb zur DR entsprechen somit am ehesten dem Modell D in Abbildung 1.4.
2. Bei der Betrachtung der hypothalamischen/preoptischen Afferenzen zum LHb und den Efferenzen zur DR gibt es einige Überschneidungen, jedoch auch Unterschiede (Vergleiche Kapitel 4.4.3.1 und (Kowski, et al., 2008). Hypothalamische und preoptische Afferenzen terminieren hauptsächlich in zwei Projektions-Clustern (Kowski, et al., 2008). Dabei enden Axone aus dem LH, PFX und der rLPOA überwiegend im LHbLMc und LHbLB, Axone aus dem IHA und dem cLPOA hingegen im LHbMA, LHbMMg und LHbMC (Kowski, et al., 2008). Der LHbLB hat jedoch nur wenige neuronale Verbindungen zur DR. Der LHbLMc projiziert zwar prinzipiell in fast alle Gebiete der DR, eine auffallend hohe Zahl von Axonterminalen finden sich jedoch nur im DRvl und rostralem DRimn. Anders hingegen ist der LHbMC über zahlreiche Neurone mit fast jedem Gebiet der DR verbunden und könnte somit sowohl limbische als auch motorische Informationen modulieren. Über den LHbMC wird ebenfalls der DRvl, DRvml und DRimn angesteuert, sodass in diesen Bereichen Informationen aus dem LH, dem IHA, dem PFX, der rLPOA und cLPOA konvergieren.
3. Die Projektionen aus dem LHb sind nicht gleichmäßig über die gesamte DR verteilt, sondern zeigen eine topographische Ordnung. Insgesamt projiziert der LHbM stärker zur DR als der LHbL. Ihre Projektionsgebiete sind jedoch verschieden. Axonter-

minalen aus den LHbM finden sich in der gesamten rostrokaudalen Ausdehnung der DR, am zahlreichsten jedoch in den dorsalen (DRdl und DRil) und kaudalen Gebieten (DRc und kaudale Anteile des DRvmn und DRvml). Der LHbL dagegen projiziert vorwiegend in die zentrale Zone zum DRvl und DRimn projiziert. In der rostralen DR finden sich nur wenige Axonterminalen aus dem LHb. Diese stammen vor allem aus dem LHbMA, LHbMC und LHbMMg, weniger aus dem LHbLMc, LHbLO und LHbMPc. Aus dem LHbMS, LHbLPc, LHbLMg und LHbLB ließen sich keine Projektionen nachweisen. Im DRdmn enden nur vereinzelt Axone aus dem LHb. Diese lassen sich nicht mit absoluter Sicherheit einem bestimmten Unterkern zuordnen, da die relevanten Injektionsstellen jeweils Teile der beachtlichen Subnuclei einschließen. Wahrscheinlich stammen die Projektionen jedoch aus dem LHbMC. Die kaudale DR wird sehr stark vom LHb angesteuert. Zahlreiche Projektionen stammen vom LHbMA und LHbMMg, weniger vom LHbMC, LHbMS, LHbMPc und LHbLMc. Keine Projektionen zur DRc konnten vom LHbLPc, LHbLMg und dem LHbLO nachgewiesen werden. Der rostrale bzw. zentrale Anteil der DRimn weist zahlreiche somatodendritische NK1-Rezeptoren auf. Er wird fast ausschließlich vom LHbLMc angesteuert. Die kaudalen Anteile des Unterkerns erhalten ihre Projektionen vor allem vom LHbMC, weniger vom LHbLMc, LHbMA und LHbMPc. Auch der LHbMMg, LHbLMg und LHbLO projizieren vereinzelt in den NK1-Rezeptor-armen kaudalen Anteil des DRimn. Der DRvl erhält in seinen zentralen Anteilen viele Axonterminalen aus dem LHbL. Diese stammen überwiegend aus dem LHbLMc. Im Gegensatz zu den Projektionen zum DRimn, enden im DRvl mehr Axone, die sich dem LHbLB und LHbLO zuordnen lassen. In den rostralen und zentralen Anteilen des DRvmn und DRvml enden nur wenige Axone aus dem LHb, zahlreiche Nervenendigungen lassen sich jedoch in den kaudalen Arealen am Übergang zur DRc nachweisen. Diese stammen überwiegend aus dem LHbMC, LHbMPc, LHbMMg und LHbMA.

4.6 Ausblick

Die letzte Dekade neurowissenschaftlicher Forschung hat das Wissen um das Belohnungssystem des Gehirns enorm erweitert. Als anatomische Hauptstrukturen konnten bisher der Nucleus accumbens (Acb), der mediale prefrontale Cortex (mPFC), der laterale Hypothalamus (LH), die Area tegmentalis ventralis (VTA), die Dorsale Raphe

(DR), der laterale Habenularkomplex (LHb) und der Nucleus tegmentalis mesopontinus rostromedialis (RMTg) identifiziert werden (Abrams, et al., 2004; Elliott, et al., 2000; Fibiger and Phillips, 1988; Geisler, et al., 2007; Geisler and Trimble, 2008; Ikemoto, 2010; Jhou, et al., 2009; Ljungberg, et al., 1992; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Schultz, 1997; Schultz, 1998; Schultz, 1998; Schultz, et al., 1993; Schultz, et al., 1993; Schultz, et al., 1992; Stern and Passingham, 1996). Zwischen diesen Kerngebieten bestehen zahlreiche, teils reziproke, teils direkte oder indirekte Verbindungen (Abb. 4.2 und 4.3, S. 120 f.). Hierdurch entsteht ein sehr komplexes neuronales Netzwerk, in dem die einzelnen Komponenten je nach Koaktivierung von Nachbarstrukturen unterschiedlich wirken können, was bei der Auswertung von Studienergebnissen berücksichtigt werden muss. Gesichert ist, dass Belohnungsgefühle über eine erhöhte Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens durch die VTA entstehen (Elliott, et al., 2000; Ikemoto, 2010; Schultz, 1997; Schultz, 1998; Schultz, 1998; Schultz, et al., 1993; Schultz, et al., 1993; Schultz, et al., 1992). Doch auch weitere Transmittersysteme wie das serotoningerge System mit seinen zahlreichen Neuromodulatoren oder das Orexin-System des Hypothalamus sind beteiligt (Aston-Jones, et al., 2009; Lee, et al., 2005). Bleibt eine erwartete Belohnung aus, steigt die neuronale Aktivität des LHb und nachgeschaltete monoaminerge Hirnstammkerne (VTA, SNc, DR) werden gehemmt (Brinschwitz, et al., 2010; Geisler and Trimble, 2008; Jhou, et al., 2009; Ji and Shepard, 2007; Lacoste, et al., 2009; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Ullsperger and von Cramon, 2003).

Lange Zeit war unklar, ob die Aktivierung des LHb nach ausbleibendem Reward durch seine spezifischen Afferenzen (beispielsweise aus dem mPFC, dem LH, der LPO oder der VTA) bedingt oder intrinsisch generiert wird. Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass der LHb ein tonisches Aktivitätsmuster aufweist, welches durch hyperpolarisierende zyklonukleotid-regulierte Kationenkanäle mit Schrittmacherfunktion generiert wird (Poller, et al., 2011). Diese intrinsische tonische Aktivierung kann jedoch durch den unterschiedlichen synaptischen Input zum LHb moduliert werden (Gruber, et al., 2007; Kowski, et al., 2009; Poller, et al., 2011).

Die Analyse der Zellmorphologie, die unterschiedliche Verteilung von Neurotransmittern und Neuropeptiden als auch die hodologischen Daten sprechen für die Existenz von

verschiedenen Unterkernen im lateralen Habenularkomplex (Andres, et al., 1999; Geisler, et al., 2003; Kowski, et al., 2008; Lehmann, et al., 2002; Lehmann, et al., 2003). Während erste in-vitro-Studien keine unterkernspezifischen elektrophysiologischen Neuroneneigenschaften im LHb nachweisen konnten, zeigten in-vivo-Studien eine unterschiedliche Sensitivität einiger Unterkerne des LHb auf dopaminerge Stimulation (Kowski, et al., 2009; Weiss and Veh, 2011). Dieser dopaminerge Input erfolgt größtenteils durch die VTA, welche bidirektionale Verbindungen zum LHb aufweist (Gruber, et al., 2007). Circa 47% der Projektionen aus der VTA sind dopaminerg (Gruber, et al., 2007). Weiterer dopaminerg Input scheint von incerto-hypothalamischen und periventriculären Neuronen zu kommen (Gruber, et al., 2007). Bei der Untersuchung der Sensitivität auf dopaminerg Stimulation zeigte sich eine selektive Zunahme der Spontankativität des LHbLO um 96% und des LHbMS um 56% (Kowski, et al., 2009). Der LHbMS projiziert relativ stark in die kaudalen Anteile der DR, welche besonders reich an GABAergen Neuronen sind, aber auch neurotensinhaltige Projektionen zur VTA aufweisen (Geisler and Zahm, 2006); eigene Untersuchungen). Ein feedback-Mechanismus zwischen dopaminergen Zentren und der serotoninergen DR ist über diesen Weg denkbar.

Die Rolle der Dorsalen Raphe im Rewardsystem scheint vor allem in der zeitlichen Integration appetitiver und aversiver Reward-Informationen zu liegen. Sie wird aktiviert, wenn das Individuum lernt, größere, jedoch zeitversetzte zukünftige Belohnungen zu erhalten (Nakamura, et al., 2008). Eine Hemmung der Neurone der DR hat einen belohnenden Effekt über eine Desinhibition dopaminerg Neurone (Nakamura, et al., 2008). Zerstörung der Neurone der DR oder Serotoninverlust führt dazu, dass Versuchstiere zu kleineren, jedoch unmittelbaren Belohnungen tendieren anstatt auf größere, jedoch zeitversetzte Belohnungen zu warten (Denk, et al., 2005; Mobini, et al., 2000; Mobini, et al., 2000; Nakamura, et al., 2008). Eine zeitliche Integration von Rewardinformationen ist über die verschiedenen in der LHb und DR konvergierenden Schleifen möglich (Abb. 4.2 und 4.3, S. 120 f.). So projizieren beispielsweise die orexinergen Neurone des lateralen Hypothalamus (LHA) und des Nucleus perifornicalis (PFX) direkt in die rostralen, zentralen und lateralen Anteile der DR (Abb. 4.3, S. 121) (Lee, et al., 2005). Die kaudalen Anteile der DR, welche über das Neuropeptid Neurotensin zur VTA projizieren, werden hingegen nicht direkt innerviert (Geisler and Zahm, 2006; Lee, et al., 2005). Andererseits projizieren der LH und der rostrale PFX zum LHbLMc und LHbLB,

welche wiederum zum intermediomedianen (DRimn) und ventrolateralen Unterkern (DRvl) der DR projizieren ((Kowski, et al., 2008), eigene Ergebnisse). Der DRimn projiziert über Glutamat/SP zur VTA und SNc sowie zurück in hypothalamische und preoptische Regionen (Hioki, et al., 2010). Parallel projizieren der LHbLMc und LHbLB zum LDTg (bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe, (Cornwall et al., 1990; Satoh and Fibiger, 1086b). Der LDTg weist ebenfalls direkte exzitatorische Verbindungen zur VTA auf, projiziert aber auch über den LHbMC, indirekt zur VTA (Abb. 4.3, S. 121) (bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe, (Cornwall et al., 1990; Satoh and Fibiger, 1086a). Parallel dazu ist eine zeitliche Integration von Rewardinformationen auch über die Zwischenschaltung des RMTg möglich (Abb. 4.2, S. 120).

Bleibt Reward aus, steigt die neuronale Aktivität von LHb und RMTg und die VTA und DR werden über GABAerge Projektionsneurone aus dem RMTg stärker inhibiert (Abb. 4.2, S. 120) (Balcita-Pedicino, et al., 2011; Jhou, et al., 2009; Omelchenko, et al., 2009). Dabei liegen die Ursprungsneurone zum RMTg vor allem im LHbL während die direkten glutamatergen Neurone zur VTA aus dem LHbM stammen und überwiegend an lokalen GABAergen Interneuronen in der VTA terminieren (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 ; siehe Tabelle 3.1, S. 68) (Brinschwitz, et al., 2010; Geisler, et al., 2007; Geisler and Trimble, 2008; Goncalves, et al., 2012).

Die Wirkung der direkten Verbindungen des LHb zur DR ist nicht abschließend geklärt. Der LHb scheint die DR jedoch überwiegend über lokale GABAerge Interneurone zu inhibieren (Ferraro, et al., 1996; Reisine, et al., 1982; Valentino, et al., 2003; Varga, et al., 2003). Auf die Neurone des rostralen DRimn scheint der LHb(LMc) jedoch primär exzitatorisch zu wirken (Commons, et al., 2003; Valentino, et al., 2003). Wie die Wirkung des LHbMC auf die weiter kaudal gelegenen Anteile des DRimn ist, bedarf weiterer Abklärung. Auch die Verbindungen zwischen DR, VTA und SNc sind nicht einheitlich (Abb. 4.2, S. 120). Insbesondere scheint der Einfluss der DR auf die beiden dopaminergen Kerngebiete entgegengesetzt zu sein. So führt die elektrische Stimulation der DR in der VTA bei 63% aller dopaminergern Neurone zu einer initialen Exzitation, während 34% initial gehemmt werden (Gervais and Rouillard, 2000), in der SNc hingegen wird durch eine elektrische Stimulation der DR eine initiale Inhibition von rund 56% aller dopaminergen Neurone verursacht während 31% primär aktiviert werden (Gervais and Rouillard, 2000).

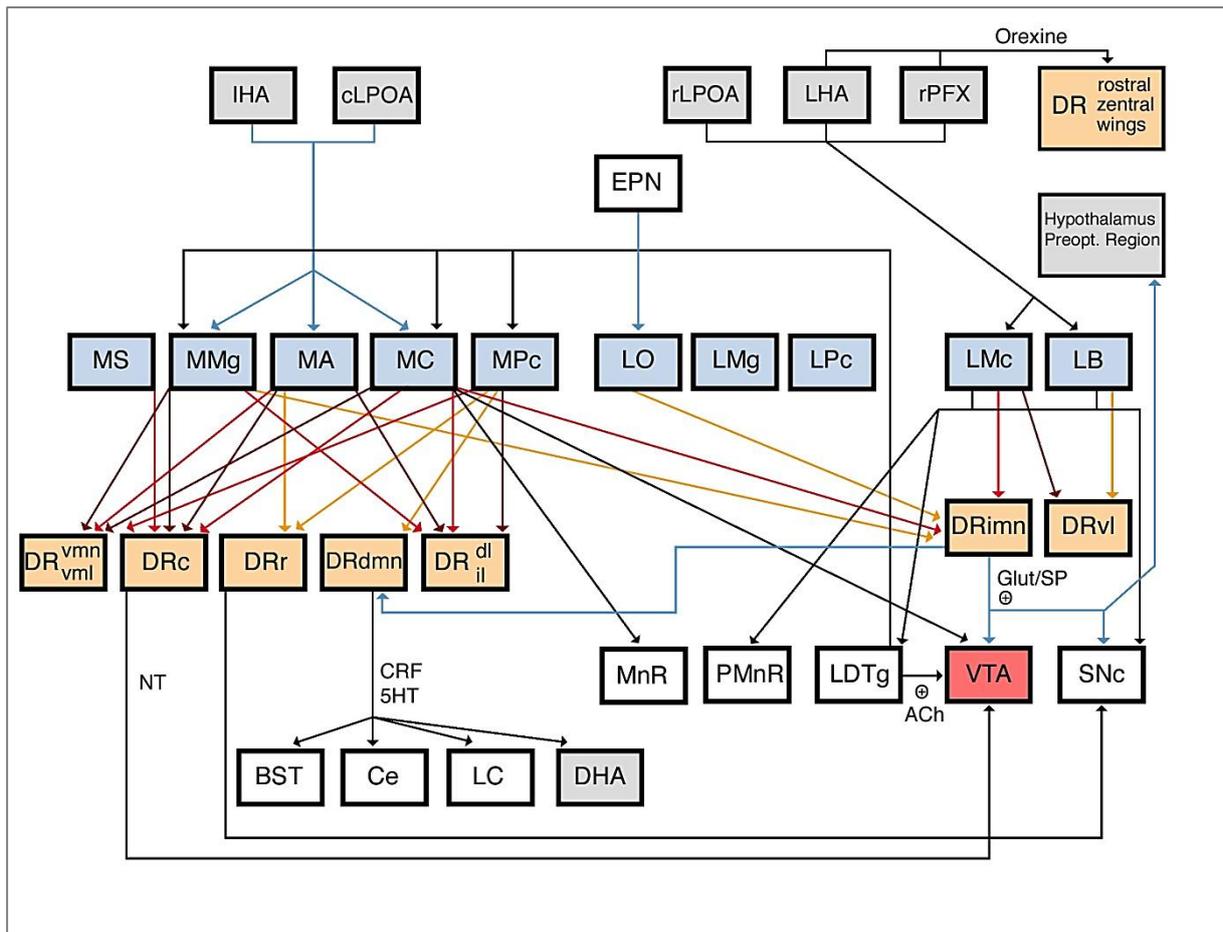


Abbildung 4.3: Detaillierte Darstellung der Projektionen aus den hypothalamischen Gebieten (graue Kästchen) zu den Subnuclei des lateralen Habenularkomplexes (blaue Kästchen), den Subarealen der Dorsalen Raphe (orange Kästchen) und anderen mesencephalen Kerngebieten. Aus Übersichtsgründen wurde auf die Darstellung der wenigen Projektionen des LHbLMg und LHbLPc zur DR verzichtet. Auch die Projektionen vom LHb zur PMnR und MnR wurden vereinfacht dargestellt. Blaue und schwarze Pfeile zeigen Projektionswege unabhängig von ihrer Stärke, rotbraune Pfeile signalisieren zahlreiche Projektionen, orangerote Pfeile mäßig viele und gelbe Pfeile wenige Projektionen von der LHb zur DR. (Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis).

5. Abkürzungsverzeichnis

μ1A	Opioid-μ1A-Rezeptor
3V	3. Ventrikel
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
A	Amygdala
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-biotinylated Complex,
Acb	Nucleus accumbens
AG	Antigen
AK	Antikörper
Aq	aqueduct (Sylvius), Aqueductus cerebri
ATg	Anterior tegmental nucleus; Nucleus tegmentalis anterior
B	Bregma
BL	Nucleus basolateralis der Amygdala
BST	Bettkern der Stria terminalis
Calb	Calbindin
Ce	Nucleus centralis der Amygdala
ChAT	Cholinacetyltransferase/ Azetylcholinesterase
CLi	Caudal Linear nucleus
cLPOA	Caudaler Anteil der LPOA
CTB	Cholera-Toxin-B-Untereinheit
ctg	Central tegmental tract
CV	Cresyl Violet-Färbung
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
DBH	Dopamin-Beta-Hydroxylase
DG	Gyrus dentatus hippocampi
DHA	Area hypothalamica dorsalis
DHA	Dorsal hypothalamic area
DLO	Dorsolateraler Orbitaler Cortex
dLPAG	Dorsolaterales PAG
DR	Dorsale Raphe
DRc	caudalen Unterkern der DR

DRD	Dorsaler Unterkern der DR (nach Paxinos)
DRdl	Dorsolateraler Unterkern der DR
DRdmn	Dorsomedianer Unterkern der DR
DRI	Interfaszikulärer Anteil der DR (nach Paxinos und Watson)
DRif	Interfaszikulärer Unterkern der DR
DRil	Intermediolateraler Unterkern der DR
DRimn	Intermediomedianer Unterkern der DR
DRr	Rostraler Unterkern der DR
DRV	Ventraler Unterkern der DR (nach Paxinos)
DRvl	Ventrolateraler Unterekern der DR
DRVL	Ventrolateraler Unterkern der DR (nach Paxinos)
DRvml	Ventromedialer Unterkern der DR
DRvmn	Ventromedianer Unterkern der DR
DTg	Dorsal Tegmental nucleus, Nucleus tegmentalis dorsalis
FG	Fluorogold
fr	Fasciculus retroflexus
GABA	Gamma-Amino-Butter-Säure
GAD65	Glutamat-Decarboxylase, 65kDa-Untereinheit
GAD67	Glutamat-Decarboxylase, 67kDa-Untereinheit
Gala	Galanin
Glut	Glutamat
GPI	Globus pallidus internus
Hb	Habenula
HDB	Horizontales Band von Broca
Hipp	Hippocampus
IHA	Area hypothalamica intermedialis
IP	Interpeduncular nucleus
IV	Ncl. Trochlearis
KB	Klüver-Barrerra-Färbung
kDR	kaudale Zone der Dorsalen Raphe
Kir3.2	G-Protein-gekoppelter Kalium-Kanal, Untereinheit 2
LC	Locus caeruleus
LDTg	Nucleus laterodorsalis tegmentalis
LFB	Luxol Fast Blue

LH(A)	lateral Hypothalamus (lateral hypothalamic area)
LHb	lateral Habenularkomplex
LHbL	lateral Habenularkomplex, lateraler Anteil
LHbLB	basaler Unterkern des LHbL
LHbLMc	Magnocellulärer Unterkern des LHbL
LHbLMg	Marginaler Unterkern des LHbL
LHbLO	Ovaler Unterkern des LHbL
LHbLPc	Parvocellulärer Unterkern des LHbL
LHbM	lateral Habenularkomplex, medialer Anteil
LHbMA	Anteriorer Unterkern des LHbM
LHbMC	Zentraler Unterkern des LHbM
LHbMMg	Marginaler Unterkern des LHbM
LHbMPc	Parvocellulärer Unterkern des LHbM
LHbMS	Superiorer Unterkern des LHbM
IPAG	laterales PAG
LPO(A)	laterale preoptische Region (lateral preoptic area)
ltg	lateral tegmental tract
MHb	medialer Habenularkomplex
mIf	medial longitudinal fasciculus/ Fasciculus longitudinalis medialis
MnR	Mediane Raphe
MO	medialer orbitaler Cortex
mPFC	medialer prefrontaler Cortex
NF	Neurofilament
NGS	Normal Goat Serum, Ziege-Normal-Serum
NHS	Normal Horse Serum, Pferde-Normal-Serum
NK1-R	Neurokinin-Rezeptor 1 (Substanz-P-Rezeptor)
NT	Neurotensin
PAG	Periaqueductal Gray, Periaquäduktales Grau
PBS	Phosphat buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-A	Albuminserum in PBS
PFC	Prefrontaler Cortex
PHA	Posterior hypothalamic area
Pha-L	Phaseolus vulgaris-Leucagglutinin
PMnR	Paramediane Raphe

PnO	Nucleus pontis oralis
PPTg	Pedunculo-pontine tegmental nucleus, Nucleus tegmentalis peduncu-
PVP	Nucleus paraventricularis thalami, posteriorer Teil
Rbd	Nucleus rhabdoideus
rDR	rostrale Zone der DR
RLi	Rostral Linear nucleus
rLPOA	Rostraler Anteil der LPOA
RMTg	Nucleus tegmentalis mesopontinus rostromedialis
rPFX	Rostraler Anteil des Nucleus perifornicalis
sm	Stria medullaris (thalami)
SN	Substantia nigra
SNC	Substantia nigra, Pars compacta
SNM	medialer Anteil der Substantia nigra
SP	Substanz P
SPTg	Subpeduncular tegmental nucleus
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosinhydroxylase
TMR-DA	Tetramethylrhodamin-Dextran
vIPAG	Ventrolaterales PAG
VP	Ventrales Pallidum
VS	Ventrales Subiculum
VTA	Ventral tegmental area
VTg	Ventral tegmental nucleus, Ncl. tegmentalis ventralis
xscp	Kreuzung des oberen Kleinhirnstieles
zDR	zentrale Zone der DR

6. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme des Habenularkomplexes	18
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Unterkerne des LHb.....	19
Abb. 1.3: Afferenzen und Efferenzen des Medialen und Lateralen Habenularkomplexes.....	22
Abb. 1.4: Theoretische Betrachtung der Verbindungen zwischen LHb und DR anhand von Projektionsmodellen.....	27
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Tracerinjektion in die DR.....	31
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Verstärkerreaktion mittels Elite-ABC-Komplex.....	34
Abb. 3.1: Übersicht über lichtmikroskopisch differenzierbaren Subareale der DR...	59
Abb. 3.2: Verteilung verschiedener Neuromarker in der rostralen Zone der DR.....	60
Abb. 3.3: Verteilung verschiedener Neuromarker in der rostralen zentralen Zone der DR	61
Abb. 3.4: Verteilung verschiedener Neuromarker in der kaudalen zentralen Zone der DR	62
Abb. 3.5: Verteilung verschiedener Neuromarker in der kaudalen Zone der DR	63
Abb. 3.6: Axontypen der lateralen Habenula in der Dorsalen Raphe.....	65
Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Projektionen des LHb zur DR	70
Abb. 3.8: Lage der Injektionsstellen der Kontrollversuche	83
Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Injektionsstellen in die einzelnen Unterkerne der Dorsalen Raphe.....	88
Abb. 3.10: retrograde Ergebnisse MT99/02, MT04/04, MT57/02,MT42/02	89
Abb. 3.11: retrograde Ergebnisse MT56/2, MT55/2, MT84/2, MT05/04	90
Abb. 3.12: retrograde Ergebnisse MT08/04, MT01/04, MT104/02,105/02.....	91
Abb. 3.13: retrograde Ergebnisse MT82/02.....	92

Abb. 3.14: Exemplarische Abbildung der Habenula nach CTB-Injektion in den DRdl/DRil (MT105/02)	93
Abb. 3.15: Exemplarische Abbildung der Habenula nach CTB-Injektion in den DRvml/DRvl (MT01/04).....	94
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der deszendierenden Projektionen des Habenularkomplexes	110
Abb. 4.2: Übersicht über die wichtigsten Bestandteile des Rewardsystems und deren Verbindungen.	120
Abb. 4.3: Detaillierte Darstellung der Projektionen aus den hypothalamischen Gebieten zu den Subnuclei des lateralen Habenularkomplexes, den Subarealen der Dorsalen Raphe und anderen mesencephalen Kerngebieten.	121

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Funktionelle Gemeinsamkeiten des LHb und der DR.....	17
Tab. 1.2: Immunhistochemische und lichtmikroskopische Charakteristika der Unterkerne des LHb.....	20
Tab. 2.1: Verteilung und Funktion verschiedener Neurotransmitter und Neuromodulatoren sowie ihr Nachweis in der DR.....	37
Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten Tracer.....	41
Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten Antikörper.....	42
Tab. 2.4: verwendete Chemikalien und Lösungen.....	43
Tab. 3.1: Projektionen des LHb zum Mesencephalon.....	68
Tab. 3.2: Projektionen des LHb zu den Unterkernen der DR.....	69
Tab. 3.3: Übersicht über Lage und immunhistochemische Eigenschaften des Injektionsgebietes sowie die verwendeten retrograden Tracer.....	87

8. Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M. (1946): Estimation of nuclear population from microtome sections, *Anat.Rec.* 94, pp. 239-247.
- Abrams, J.K.; Johnson, P.L.; Hay-Schmidt, A.; Mikkelsen, J.D.; Shekhar, A. and Lowry, C.A. (2005): Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs, *Neuroscience* 133 [4], pp. 983-997.
- Abrams, J.K.; Johnson, P.L.; Hollis, J.H. and Lowry, C.A. (2004): Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1018, pp. 46-57.
- Aghajanian, G.K. and Wang, R.Y. (1977): Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique, *Brain Res.* 122 [2], pp. 229-242.
- Aghajanian, G.K.; Wang, R.Y. and Baraban, J. (1978): Serotonergic and non-serotonergic neurons of the dorsal raphe: reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation, *Brain Res.* 153 [1], pp. 169-175.
- Akhavan, M.; Hoang, T. X. and Havton, L. A. (2006): Improved detection of fluorogold-labeled neurons in long-term studies, *J Neurosci Methods* 152 [1-2], pp. 156-62.
- Alexander, M.J. and Leeman, S.E. (1998): Widespread expression in adult rat forebrain of mRNA encoding high-affinity neurotensin receptor, *J.Comp Neurol.* 402 [4], pp. 475-500.
- Allers, K.A. and Sharp, T. (2003): Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo, *Neuroscience* 122 [1], pp. 193-204.
- Andres, K.H.; von Düring, M. and Veh, R.W. (1999): Subnuclear organization of the rat habenular complexes, *J.Comp Neurol.* 407 [1], pp. 130-150.
- Araki, M.; McGeer, P.L. and Kimura, H. (1988): The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method, *Brain Res.* 441 [1-2], pp. 319-330.
- Aston-Jones, G.; Smith, R. J.; Moorman, D. E. and Richardson, K. A. (2009): Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction, *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, pp. 112-21.
- Azmitia, E.C. (1981): Bilateral serotonergic projections to the dorsal hippocampus of the rat: simultaneous localization of 3H-5HT and HRP after retrograde transport, *J.Comp Neurol.* 203 [4], pp. 737-743.
- Aznar, S.; Qian, Z.X. and Knudsen, G.M. (2004): Non-serotonergic dorsal and median raphe projection onto parvalbumin- and calbindin-containing neurons in hippocampus and septum, *Neuroscience* 124 [3], pp. 573-581.
- Bago, M. and Dean, C. (2001): Sympathoinhibition from ventrolateral periaqueductal gray mediated by 5-HT(1A) receptors in the RVLM, *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 280 [4], pp. R976-R984.
- Bago, M.; Marson, L. and Dean, C. (2002): Serotonergic projections to the rostroventrolateral medulla from midbrain and raphe nuclei, *Brain Res.* 945 [2], pp. 249-258.
- Baimbridge, K.G.; Celio, M.R. and Rogers, J.H. (1992): Calcium-binding proteins in the nervous system, *Trends Neurosci.* 15 [8], pp. 303-308.

- Baker, K.G.; Halliday, G.M.; Hornung, J.P.; Geffen, L.B.; Cotton, R.G. and Tork, I. (1991): Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus, *Neuroscience* 42 [3], pp. 757-775.
- Balcita-Pedicino, J.J.; Omelchenko, N.; Bell, R. and Sesack, S.R. (2011): The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: Ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus, *J.Comp Neurol.* 519 [6], pp. 1143-1164.
- Belin, M.F.; Nanopoulos, D.; Didier, M.; Aguera, M.; Steinbusch, H.; Verhofstad, A.; Maitre, M. and Pujol, J.F. (1983): Immunohistochemical evidence for the presence of gamma-aminobutyric acid and serotonin in one nerve cell. A study on the raphe nuclei of the rat using antibodies to glutamate decarboxylase and serotonin, *Brain Res.* 275 [2], pp. 329-339.
- Bobillier, P.; Seguin, S.; Petitjean, F.; Salvart, D.; Touret, M. and Jouvet, M. (1976): The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography, *Brain Res.* 113 [3], pp. 449-486.
- Braun, K.; Scheich, H.; Braun, S.; Rogers, J.H. and Heizmann, C.W. (1991): Parvalbumin-, calretinin- and calbindin-D28k-immunoreactivity and GABA in a forebrain region involved in auditory filial imprinting, *Brain Res.* 539 [1], pp. 31-44.
- Breiter, H.C.; Gollub, R.L.; Weisskoff, R.M.; Kennedy, D.N.; Makris, N.; Berke, J.D.; Goodman, J.M.; Kantor, H.L.; Gastfriend, D.R.; Riorden, J.P.; Mathew, R.T.; Rosen, B.R. and Hyman, S.E. (1997): Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion, *Neuron* 19 [3], pp. 591-611.
- Brinschwitz, K.; Dittgen, A.; Madai, V.I.; Lommel, R.; Geisler, S. and Veh, R.W. (2010): Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain, *Neuroscience* 168 [2], pp. 463-476.
- Brodal, P.; Dietrichs, E.; Bjaalie, J.G.; Nordby, T. and Walberg, F. (1983): Is lectin-coupled horseradish peroxidase taken up and transported by undamaged as well as by damaged fibers in the central nervous system?, *Brain Res.* 278 [1-2], pp. 1-9.
- Brown, P. and Molliver, M.E. (2000): Dual serotonin (5-HT) projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity, *J.Neurosci.* 20 [5], pp. 1952-1963.
- Cajal, S.R.Y. (1904): *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, Imprenta y Libreria de Nicolas Moya, Madrid.
- Cattoretti, G.; Berti, E.; Schiro, R.; D'Amato, L.; Valeggio, C. and Rilke, F. (1988): Improved avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) staining, *Histochem.J.* 20 [2], pp. 75-80.
- Celio, M.R. (1990): Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system, *Neuroscience* 35 [2], pp. 375-475.
- Chan-Palay, V.; Jonsson, G. and Palay, S.L. (1978): Serotonin and substance P coexist i, neurons of the rat's central nervous system, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75 [3], pp. 1582-1586.
- Charara, A. and Parent, A. (1998): Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus, *J.Chem.Neuroanat.* 15 [2], pp. 111-127.
- Chen, S. and Aston-Jones, G. (1995): Evidence that cholera toxin B subunit (CTb) can be avidly taken up and transported by fibers of passage, *Brain Res.* 674 [1], pp. 107-111.

- Chiba, T.; Kayahara, T. and Nakano, K. (2001): Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*, *Brain Res.* 888 [1], pp. 83-101.
- Christoph, G.R.; Leonzio, R.J. and Wilcox, K.S. (1986): Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat, *J.Neurosci.* 6 [3], pp. 613-619.
- Commons, K. G. and Valentino, R. J. (2002): Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus, *J Comp Neurol* 447 [1], pp. 82-97.
- Commons, K.G. (2008): Evidence for topographically organized endogenous 5-HT-1A receptor-dependent feedback inhibition of the ascending serotonin system, *Eur.J.Neurosci.* 27 [10], pp. 2611-2618.
- Commons, K.G.; Beck, S.G. and Bey, V.W. (2005): Two populations of glutamatergic axons in the rat dorsal raphe nucleus defined by the vesicular glutamate transporters 1 and 2, *Eur.J.Neurosci.* 21 [6], pp. 1577-1586.
- Commons, K.G.; Connolley, K.R. and Valentino, R.J. (2003): A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders, *Neuropsychopharmacology* 28 [2], pp. 206-215.
- Conte, W.L.; Kamishina, H. and Reep, R.L. (2009): The efficacy of the fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B for multiple retrograde tract tracing in the central nervous system, *Brain Struct.Funct.*
- Crawford, L.K.; Craige, C.P. and Beck, S.G. (2010): Increased intrinsic excitability of lateral wing serotonin neurons of the dorsal raphe: a mechanism for selective activation in stress circuits, *J.Neurophysiol.* 103 [5], pp. 2652-2663.
- Dado, R.J.; Burstein, R.; Cliffer, K.D. and Giesler, G.J., Jr. (1990): Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage, *Brain Res.* 533 [2], pp. 329-333.
- Dahlstrom, A. and Fuxe, K. (1964): Localization of monoamines in the lower brain stem, *Experientia* 20 [7], pp. 398-399.
- Datiche, F. and Cattarelli, M. (1996): Catecholamine innervation of the piriform cortex: a tracing and immunohistochemical study in the rat, *Brain Res.* 710 [1-2], pp. 69-78.
- Datiche, F.; Luppi, P.H. and Cattarelli, M. (1995): Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study, *Brain Res.* 671 [1], pp. 27-37.
- Datta, S.; Siwek, D.F. and Stack, E.C. (2009): Identification of cholinergic and non-cholinergic neurons in the pons expressing phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein as a function of rapid eye movement sleep, *Neuroscience* 163 [1], pp. 397-414.
- Day, H. E.; Greenwood, B. N.; Hammack, S. E.; Watkins, L. R.; Fleshner, M.; Maier, S. F. and Campeau, S. (2004): Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus, *J Comp Neurol* 474 [3], pp. 364-78.
- de Bruijn, E.R.; de Lange, F.P.; von Cramon, D.Y. and Ullsperger, M. (2009): When errors are rewarding, *J.Neurosci.* 29 [39], pp. 12183-12186.
- Denk, F.; Walton, M. E.; Jennings, K. A.; Sharp, T.; Rushworth, M. F. and Bannerman, D. M. (2005): Differential involvement of serotonin and dopamine systems in cost-

- benefit decisions about delay or effort, *Psychopharmacology (Berl)* 179 [3], pp. 587-96.
- Descarries, L.; Berthelet, F.; Garcia, S. and Beaudet, A. (1986): Dopaminergic projection from nucleus raphe dorsalis to neostriatum in the rat, *J.Comp Neurol.* 249 [4], pp. 511-515.
- Descarries, L.; Watkins, K.C.; Garcia, S. and Beaudet, A. (1982): The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study, *J.Comp Neurol.* 207 [3], pp. 239-254.
- DeVito, J.L.; Anderson, M.E. and Walsh, K.E. (1980): A horseradish peroxidase study of afferent connections of the globus pallidus in *Macaca mulatta*, *Exp.Brain Res.* 38 [1], pp. 65-73.
- Elias, J.M.; Margiotta, M. and Gaborc, D. (1989): Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods, *Am.J.Clin.Pathol.* 92 [1], pp. 62-67.
- Elliott, R.; Friston, K.J. and Dolan, R.J. (2000): Dissociable neural responses in human reward systems, *J.Neurosci.* 20 [16], pp. 6159-6165.
- Felton, T.M.; Linton, L.; Rosenblatt, J.S. and Morell, J.I. (1999): First and second order maternal behavior related afferents of the lateral habenula, *Neuroreport* 10 [4], pp. 883-887.
- Ferraro, G.; Montalbano, M.E.; Sardo, P. and La, Grutta, V (1996): Lateral habenular influence on dorsal raphe neurons, *Brain Res.Bull.* 41 [1], pp. 47-52.
- Fibiger, H.C.; LePiane, F.G.; Jakubovic, A. and Phillips, A.G. (1987): The role of dopamine in intracranial self-stimulation of the ventral tegmental area, *J.Neurosci.* 7 [12], pp. 3888-3896.
- Fibiger, H.C. and Phillips, A.G. (1988): Mesocorticolimbic dopamine systems and reward, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 537, pp. 206-215.
- Fibiger, H.C.; Phillips, A.G. and Brown, E.E. (1992): The neurobiology of cocaine-induced reinforcement, *Ciba Found.Symp.* 166, pp. 96-111.
- Ford, B.; Holmes, C.J.; Mainville, L. and Jones, B.E. (1995): GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus, *J.Comp Neurol.* 363 [2], pp. 177-196.
- Forloni, G.; Grzanna, R.; Blakely, R.D. and Coyle, J.T. (1987): Co-localization of N-acetyl-aspartyl-glutamate in central cholinergic, noradrenergic, and serotonergic neurons, *Synapse* 1 [5], pp. 455-460.
- Frey, S.; Morris, R. and Petrides, M. (1997): A neuroanatomical method to assess the integrity of fibers of passage following ibotenate-induced damage to the central nervous system, *Neurosci.Res.* 28 [3], pp. 285-288.
- Galindo-Charles, L.; Hernandez-Lopez, S.; Galarraga, E.; Tapia, D.; Bargas, J.; Garduno, J.; Frias-Dominguez, C.; Drucker-Colin, R. and Mihailescu, S. (2008): Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors, *Synapse* 62 [8], pp. 601-615.
- Geisler, S.; Andres, K.H. and Veh, R.W. (2003): Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat, *J.Comp Neurol.* 458 [1], pp. 78-97.
- Geisler, S.; Derst, C.; Veh, R.W. and Zahm, D.S. (2007): Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat, *J.Neurosci.* 27 [21], pp. 5730-5743.

- Geisler, S. and Trimble, M. (2008): The lateral habenula: no longer neglected, *CNS.Spectr.* 13 [6], pp. 484-489.
- Geisler, S. and Zahm, D.S. (2006): Neurotensin afferents of the ventral tegmental area in the rat: [1] re-examination of their origins and [2] responses to acute psychostimulant and antipsychotic drug administration, *Eur.J.Neurosci.* 24 [1], pp. 116-134.
- German, D.C.; Schlusselberg, D.S. and Woodward, D.J. (1983): Three-dimensional computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: from mouse to man, *J.Neural Transm.* 57 [4], pp. 243-254.
- Gervais, J. and Rouillard, C. (2000): Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra, *Synapse* 35 [4], pp. 281-91.
- Gervasoni, D.; Peyron, C.; Rampon, C.; Barbagli, B.; Chouvet, G.; Urbain, N.; Fort, P. and Luppi, P.H. (2000): Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons, *J.Neurosci.* 20 [11], pp. 4217-4225.
- Goncalves, L.; Sego, C. and Metzger, M. (2012): Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat, *J Comp Neurol* 520 [6], pp. 1278-300.
- Gonzalo-Ruiz, A.; Lieberman, A.R. and Sanz-Anquela, J.M. (1995): Organization of serotonergic projections from the raphe nuclei to the anterior thalamic nuclei in the rat: a combined retrograde tracing and 5-HT immunohistochemical study, *J.Chem.Neuroanat.* 8 [2], pp. 103-115.
- Groenewegen, H.J.; Berendse, H.W. and Haber, S.N. (1993): Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents, *Neuroscience* 57 [1], pp. 113-142.
- Gruber, C.; Kahl, A.; Lebenheim, L.; Kowski, A.; Dittgen, A. and Veh, R.W. (2007): Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat, *Neurosci.Lett.* 427 [3], pp. 165-170.
- Hamill, G.S. and Lenn, N.J. (1983): Synaptic plasticity within the interpeduncular nucleus after unilateral lesions of the habenula in neonatal rats, *J.Neurosci.* 3 [11], pp. 2128-2145.
- He, Z. (2009): Fluorogold induces persistent neurological deficits and circling behavior in mice over-expressing human mutant tau, *Curr.Neurovasc.Res.* 6 [1], pp. 54-61.
- Herkenham, M. and Nauta, W.J. (1977): Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem, *J.Comp Neurol.* 173 [1], pp. 123-146.
- Herkenham, M. and Nauta, W.J. (1979): Efferent connections of the habenular nuclei in the rat, *J.Comp Neurol.* 187 [1], pp. 19-47.
- Higgins, G.A. and Fletcher, P.J. (2003): Serotonin and drug reward: focus on 5-HT_{2C} receptors, *Eur.J.Pharmacol.* 480 [1-3], pp. 151-162.
- Hioki, H.; Nakamura, H.; Ma, Y. F.; Konno, M.; Hayakawa, T.; Nakamura, K. C.; Fujiyama, F. and Kaneko, T. (2010): Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei, *J Comp Neurol* 518 [5], pp. 668-86.
- Hokfelt, T.; Ljungdahl, A.; De La Mora, M.P. and Fuxe, K. (1976): Further evidence that apomorphine increases GABA turnover in the DA cell body rich and DA nerve terminal rich areas of the brain, *Neurosci.Lett.* 2 [4], pp. 239-242.

- Hokfelt, T.; Ljungdahl, A.; Steinbusch, H.; Verhofstad, A.; Nilsson, G.; Brodin, E.; Pernow, B. and Goldstein, M. (1978): Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system, *Neuroscience* 3 [6], pp. 517-538.
- Hsu, S.M. and Raine, L. (1981): Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry, *J.Histochem.Cytochem.* 29 [11], pp. 1349-1353.
- Ikemoto, S. (2007): Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex, *Brain Res.Rev.* 56 [1], pp. 27-78.
- Ikemoto, S. (2010): Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory, *Neurosci Biobehav Rev* 35 [2], pp. 129-50.
- Illert, M.; Fritz, N.; Aschoff, A. and Hollander, H. (1982): Fluorescent compounds as retrograde tracers compared with horseradish peroxidase (HRP). II. A parametric study in the peripheral motor system of the cat, *J.Neurosci.Methods* 6 [3], pp. 199-218.
- Imai, H.; Steindler, D.A. and Kitai, S.T. (1986): The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat, *J.Comp Neurol.* 243 [3], pp. 363-380.
- Iwahori, N. (1977): A Golgi study on the habenular nucleus of the cat, *J.Comp Neurol.* 72 [3], pp. 319-344.
- Jacobs, B.L. and Azmitia, E.C. (1992): Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol Rev.* 72 [1], pp. 165-229.
- Jacobs, B.L.; Foote, S.L. and Bloom, F.E. (1978): Differential projections of neurons within the dorsal raphe nucleus of the rat: a horseradish peroxidase (HRP) study, *Brain Res.* 147 [1], pp. 149-153.
- Jhou, T.C.; Geisler, S.; Marinelli, M.; Degarmo, B.A. and Zahm, D.S. (2009): The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta, *J.Comp Neurol.* 513 [6], pp. 566-596.
- Ji, H. and Shepard, P.D. (2007): Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism, *J.Neurosci.* 27 [26], pp. 6923-6930.
- Johnson, P.; Lowry, C.; Truitt, W. and Shekhar, A. (2008): Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic, *J.Psychopharmacol.* 22 [6], pp. 642-652.
- Jolas, T. and Aghajanian, G.K. (1996): Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro, *Eur.J.Neurosci.* 8 [1], pp. 153-161.
- Jolas, T. and Aghajanian, G.K. (1997): Neurotensin and the serotonergic system, *Prog.Neurobiol.* 52 [6], pp. 455-468.
- Kalen, P.; Karlson, M. and Wiklund, L. (1985): Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H]aspartate tracing, *Brain Res.* 360 [1-2], pp. 285-297.
- Kawagoe, R.; Takikawa, Y. and Hikosaka, O. (2004): Reward-predicting activity of dopamine and caudate neurons--a possible mechanism of motivational control of saccadic eye movement, *J.Neurophysiol.* 91 [2], pp. 1013-1024.
- Kim, M.A.; Lee, H.S.; Lee, B.Y. and Waterhouse, B.D. (2004): Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat, *Brain Res.* 1026 [1], pp. 56-67.

- Kim, U. (2009): Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat, *J.Comp Neurol.* 513 [2], pp. 173-187.
- Kim, U. and Chang, S.Y. (2005): Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus, *J.Comp Neurol.* 483 [2], pp. 236-250.
- Kirby, L. G.; Pernar, L.; Valentino, R. J. and Beck, S. G. (2003): Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies, *Neuroscience* 116 [3], pp. 669-83.
- Kirouac, G.J.; Li, S. and Mabrouk, G. (2004): GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus, *J.Comp Neurol.* 469 [2], pp. 170-184.
- Kohler, C. and Goldstein, M. (1984): Golgi-like immunoperoxidase staining of dopamine neurons in the reticular formation of the rat brainstem using antibody to tyrosine-hydroxylase, *J.Comp Neurol.* 223 [2], pp. 302-311.
- Kosofsky, B.E. and Molliver, M.E. (1987): The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei, *Synapse* 1 [2], pp. 153-168.
- Kowski, A.B.; Geisler, S.; Krauss, M. and Veh, R.W. (2008): Differential projections from subfields in the lateral preoptic area to the lateral habenular complex of the rat, *J.Comp Neurol.* 507 [4], pp. 1465-1478.
- Kowski, A.B.; Veh, R.W. and Weiss, T. (2009): Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo, *Neuroscience* 161 [4], pp. 1154-1165.
- Kramer, M.S.; Cutler, N.; Feighner, J.; Shrivastava, R.; Carman, J.; Sramek, J.J.; Reines, S.A.; Liu, G.; Snavely, D.; Wyatt-Knowles, E.; Hale, J.J.; Mills, S.G.; MacCoss, M.; Swain, C.J.; Harrison, T.; Hill, R.G.; Hefti, F.; Scolnick, E.M.; Cascieri, M.A.; Chicchi, G.G.; Sadowski, S.; Williams, A.R.; Hewson, L.; Smith, D.; Carlson, E.J.; Hargreaves, R.J. and Rupniak, N.M. (1998): Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors, *Science* 281 [5383], pp. 1640-1645.
- Kuteeva, E.; Wardi, T.; Lundstrom, L.; Sollenberg, U.; Langel, U.; Hokfelt, T. and Ogren, S.O. (2008): Differential role of galanin receptors in the regulation of depression-like behavior and monoamine/stress-related genes at the cell body level, *Neuropsychopharmacology* 33 [11], pp. 2573-2585.
- Kwon, Y.; Kang, M.; Ahn, C.; Han, H.; Ahn, B. and Lee, J. (2000): Effect of high or low frequency electroacupuncture on the cellular activity of catecholaminergic neurons in the brain stem, *Acupunct.Electrother.Res.* 25 [1], pp. 27-36.
- Lacoste, B.; Riad, M.; Ratte, M.O.; Boye, S.M.; Levesque, D. and Descarries, L. (2009): Trafficking of neurokinin-1 receptors in serotonin neurons is controlled by substance P within the rat dorsal raphe nucleus, *Eur.J.Neurosci.* 29 [12], pp. 2303-2314.
- Lavoie, B. and Parent, A. (1991): Serotonergic innervation of the thalamus in the primate: an immunohistochemical study, *J.Comp Neurol.* 312 [1], pp. 1-18.
- Lechner, J.; Leah, J.D. and Zimmermann, M. (1993): Brainstem peptidergic neurons projecting to the medial and lateral thalamus and zona incerta in the rat, *Brain Res.* 603 [1], pp. 47-56.
- Lee, E.H.; Wang, F.B.; Tang, Y.P. and Geyer, M.A. (1987): Gabaergic interneurons in the dorsal raphe mediate the effects of apomorphine on serotonergic system, *Brain Res.Bull.* 18 [3], pp. 345-353.

- Lee, H.S.; Kim, M.A. and Waterhouse, B.D. (2005): Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat, *J.Comp Neurol.* 481 [2], pp. 179-193.
- Lehmann, A.; Geisler, S.; Schneider, K. and Veh, R.W. (2002): INDIVIDUAL SUBNUCLEI OF THE LATERAL HABENULAR COMPLEX DISTINCTLY PROJECT TO THE DORSAL AND MEDIAN RAPHE NUCLEI, Abstract viewer/Itinerary Planner, Washington DC: Society for Neuroscience 2002, online.
- Lehmann, A.; Geisler, S. and Veh, R.W. (2003): MEDIAN AND PARAMEDIAN RAPHE NUCLEI SHOW DISTINCT PATTERN OF INNERVATION BY THE SUBNUCLEI OF THE LATERAL HABENULAR COMPLEX, Abstract Viewer/Itinerary Planner, 2003; Washington DC: Society for Neuroscience, 2003 online.
- Levine, E.S. and Jacobs, B.L. (1992): Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat, *J.Neurosci.* 12 [10], pp. 4037-4044.
- Li, Y.Q.; Rao, Z.R. and Shi, J.W. (1990): Substance P-like immunoreactive neurons in the nucleus tractus solitarii of the rat send their axons to the nucleus accumbens, *Neurosci.Lett.* 120 [2], pp. 194-196.
- Liu, Z.H. and Ikemoto, S. (2007): The midbrain raphe nuclei mediate primary reinforcement via GABA(A) receptors, *Eur.J.Neurosci.* 25 [3], pp. 735-743.
- Ljungberg, T.; Apicella, P. and Schultz, W. (1992): Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions, *J.Neurophysiol.* 67 [1], pp. 145-163.
- Ljungdahl, A.; Hokfelt, T. and Nilsson, G. (1978): Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals, *Neuroscience* 3 [10], pp. 861-943.
- Llewellyn-Smith, I.J.; Minson, J.B.; Wright, A.P. and Hodgson, A.J. (1990): Cholera toxin B-gold, a retrograde tracer that can be used in light and electron microscopic immunocytochemical studies, *J.Comp Neurol.* 294 [2], pp. 179-191.
- Lu, X.; Sharkey, L. and Bartfai, T. (2007): The brain galanin receptors: targets for novel antidepressant drugs, *CNS.Neurol.Disord.Drug Targets.* 6 [3], pp. 183-192.
- Luppi, P.H.; Fort, P. and Jouvet, M. (1990): Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons, *Brain Res.* 534 [1-2], pp. 209-224.
- Matsumoto, M. and Hikosaka, O. (2007): Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons, *Nature* 447 [7148], pp. 1111-1115.
- Matsumoto, M. and Hikosaka, O. (2008): Negative motivational control of saccadic eye movement by the lateral habenula, *Prog.Brain Res.* 171, pp. 399-402.
- Matsumoto, M. and Hikosaka, O. (2009): Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula, *Nat.Neurosci.* 12 [1], pp. 77-84.
- McClellan, A.D.; Zhang, L. and Palmer, R. (2006): Fluorogold labeling of descending brain neurons in larval lamprey does not cause cell death, *Neurosci.Lett.* 401 [1-2], pp. 119-124.
- Melander, T.; Hokfelt, T.; Rokaeus, A.; Cuello, A.C.; Oertel, W.H.; Verhofstad, A. and Goldstein, M. (1986): Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS, *J.Neurosci.* 6 [12], pp. 3640-3654.
- Miachon, S.; Berod, A.; Leger, L.; Chat, M.; Hartman, B. and Pujol, J.F. (1984): Identification of catecholamine cell bodies in the pons and pons-mesencephalon

- junction of the cat brain, using tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry, *Brain Res.* 305 [2], pp. 369-374.
- Michelsen, K. A.; Prickaerts, J. and Steinbusch, H. W. (2008): The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease, *Prog Brain Res* 172, pp. 233-64.
- Michelsen, K.A.; Schmitz, C. and Steinbusch, H.W. (2007): The dorsal raphe nucleus--from silver stainings to a role in depression, *Brain Res.Rev.* 55 [2], pp. 329-342.
- Middlebrook, J.L. and Dorland, R.B. (1984): Bacterial toxins: cellular mechanisms of action, *Microbiol.Rev.* 48 [3], pp. 199-221.
- Miller, J.J.; Richardson, T.L.; Fibiger, H.C. and McLennan, H. (1975): Anatomical and electrophysiological identification of a projection from the mesencephalic raphe to the caudate-putamen in the rat, *Brain Res.* 97 [1], pp. 133-136.
- Mobini, S.; Chiang, T. J.; Al-Ruwaitea, A. S.; Ho, M. Y.; Bradshaw, C. M. and Szabadi, E. (2000): Effect of central 5-hydroxytryptamine depletion on inter-temporal choice: a quantitative analysis, *Psychopharmacology (Berl)* 149 [3], pp. 313-8.
- Mobini, S.; Chiang, T. J.; Ho, M. Y.; Bradshaw, C. M. and Szabadi, E. (2000): Effects of central 5-hydroxytryptamine depletion on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement, *Psychopharmacology (Berl)* 152 [4], pp. 390-7.
- Molliver, M.E. (1987): Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function, *J.Clin.Psychopharmacol.* 7 [6 Suppl], pp. 3S-23S.
- Moreau, J.L. and Fields, H.L. (1986): Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission, *Brain Res.* 397 [1], pp. 37-46.
- Morgan, M.J.; O'Donnell, J.M. and Oliver, R.F. (1973): Development of left-right asymmetry in the habenular nuclei of *Rana temporaria*, *J.Comp Neurol.* 149 [2], pp. 203-214.
- Moss, M.S. and Basbaum, A.I. (1983): The peptidergic organization of the cat periaqueductal gray. II. The distribution of immunoreactive substance P and vasoactive intestinal polypeptide, *J.Neurosci.* 3 [7], pp. 1437-1449.
- Nakamura, K.; Matsumoto, M. and Hikosaka, O. (2008): Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus, *J.Neurosci.* 28 [20], pp. 5331-5343.
- Nanopoulos, D.; Belin, M.F.; Maitre, M.; Vincendon, G. and Pujol, J.F. (1982): Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurons containing serotonin and GABA, *Brain Res.* 232 [2], pp. 375-389.
- Naumann, T.; Hartig, W. and Frotscher, M. (2000): Retrograde tracing with Fluoro-Gold: different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies, *J Neurosci Methods* 103 [1], pp. 11-21.
- Neckers, L.M.; Schwartz, J.P.; Wyatt, R.J. and Speciale, S.G. (1979): Substance P afferents from the habenula innervate the dorsal raphe nucleus, *Exp.Brain Res.* 37 [3], pp. 619-623.
- Nishikawa, T. and Scatton, B. (1983): Evidence for a GABAergic inhibitory influence on serotonergic neurons originating from the dorsal raphe, *Brain Res.* 279 [1-2], pp. 325-329.
- Novikova, L.; Novikov, L. and Kellerth, J. O. (1997): Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers: a comparison between Fast Blue, Fluoro-Gold and various dextran conjugates, *J Neurosci Methods* 74 [1], pp. 9-15.

- O'Hearn, E. and Molliver, M.E. (1984): Organization of raphe-cortical projections in rat: a quantitative retrograde study, *Brain Res.Bull.* 13 [6], pp. 709-726.
- O'Leary, O.F.; Bechtholt, A.J.; Crowley, J.J.; Valentino, R.J. and Lucki, I. (2007): The role of noradrenergic tone in the dorsal raphe nucleus of the mouse in the acute behavioral effects of antidepressant drugs, *Eur.Neuropsychopharmacol.* 17 [3], pp. 215-226.
- Ogren, S.O.; Razani, H.; Elvander-Tottie, E. and Kehr, J. (2007): The neuropeptide galanin as an in vivo modulator of brain 5-HT_{1A} receptors: possible relevance for affective disorders, *Physiol Behav.* 92 [1-2], pp. 172-179.
- Omelchenko, N.; Bell, R. and Sesack, S.R. (2009): Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area, *Eur.J.Neurosci.* 30 [7], pp. 1239-1250.
- Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J. (1984): Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique, *J.Comp Neurol.* 229 [3], pp. 374-392.
- Pan, Z.Z. and Williams, J.T. (1989): GABA- and glutamate-mediated synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro., *J.Neurophysiol.* 61 [4], pp. 719-726.
- Parent, A.; Fortin, M.; Cote, P.Y. and Cicchetti, F. (1996): Calcium-binding proteins in primate basal ganglia, *Neurosci.Res.* 25 [4], pp. 309-334.
- Parent, A.; Gravel, S. and Boucher, R. (1981): The origin of forebrain afferents to the habenula in rat, cat and monkey, *Brain Res.Bull.* 6 [1], pp. 23-38.
- Paxinos, George and Watson, Charles (1989): *The Rat Brain in Stereotactic Coordinates 4*, Academic Press, Sydney, ISBN: ISBN-13: 978-0125476195.
- Pearson, J.; Goldstein, M. and Brandeis, L. (1979): Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in human brain, *Brain Res.* 165 [2], pp. 333-337.
- Pelletier, G.; Steinbusch, H.W. and Verhofstad, A.A. (1981): Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense-core vesicles, *Nature* 293 [5827], pp. 71-72.
- Persson, S. and Havton, L. A. (2009): Retrogradely transported fluorogold accumulates in lysosomes of neurons and is detectable ultrastructurally using post-embedding immuno-gold methods, *J Neurosci Methods* 184 [1], pp. 42-7.
- Petkova-Kirova, P.; Rakovska, A.; Zaekova, G.; Ballini, C.; Corte, L.D.; Radomirov, R. and Vagvolgyi, A. (2008): Stimulation by neurotensin of dopamine and 5-hydroxytryptamine (5-HT) release from rat prefrontal cortex: possible role of NTR1 receptors in neuropsychiatric disorders, *Neurochem.Int.* 53 [6-8], pp. 355-361.
- Petrov, T.; Jhamandas, J.H. and Krukoff, T.L. (1992): Characterization of peptidergic efferents from the lateral parabrachial nucleus to identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus, *J.Chem.Neuroanat.* 5 [5], pp. 367-373.
- Peyron, C.; Luppi, P.H.; Fort, P.; Rampon, C. and Jouvet, M. (1996): Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus, *J.Comp Neurol.* 364 [3], pp. 402-413.
- Peyron, C.; Luppi, P.H.; Kitahama, K.; Fort, P.; Hermann, D.M. and Jouvet, M. (1995): Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus, *Neuroreport* 6 [18], pp. 2527-2531.
- Peyron, C.; Petit, J.M.; Rampon, C.; Jouvet, M. and Luppi, P.H. (1998): Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods, *Neuroscience* 82 [2], pp. 443-468.

- Poller, W.C.; Bernard, R.; Derst, C.; Weiss, T.; Madai, V. I. and Veh, R.W. (2011): Lateral habenular neurons projecting to reward-processing monoaminergic nuclei express hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated cation channels, *Neuroscience* 193, pp. 205-16.
- Rajakumar, N.; Elisevich, K. and Flumerfelt, B.A. (1993): Compartmental origin of the striato-entopeduncular projection in the rat, *J.Comp Neurol.* 331 [2], pp. 286-296.
- Reisine, T.D.; Soubrie, P.; Artaud, F. and Glowinski, J. (1982): Involvement of lateral habenula-dorsal raphe neurons in the differential regulation of striatal and nigral serotonergic transmission cats, *J.Neurosci.* 2 [8], pp. 1062-1071.
- Rye, D.B.; Saper, C.B.; Lee, H.J. and Wainer, B.H. (1987): Pedunculo-pontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum, *J.Comp Neurol.* 259 [4], pp. 483-528.
- Satoh, T.; Nakai, S.; Sato, T. and Kimura, M. (2003): Correlated coding of motivation and outcome of decision by dopamine neurons, *J.Neurosci.* 23 [30], pp. 9913-9923.
- Schultz, W. (1997): Dopamine neurons and their role in reward mechanisms, *Curr.Opin.Neurobiol.* 7 [2], pp. 191-197.
- Schultz, W. (1998): The phasic reward signal of primate dopamine neurons, *Adv.Pharmacol.* 42, pp. 686-690.
- Schultz, W. (1998): Predictive reward signal of dopamine neurons, *J.Neurophysiol.* 80 [1], pp. 1-27.
- Schultz, W.; Apicella, P. and Ljungberg, T. (1993): Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task, *J.Neurosci.* 13 [3], pp. 900-913.
- Schultz, W.; Apicella, P.; Ljungberg, T.; Romo, R. and Scarnati, E. (1993): Reward-related activity in the monkey striatum and substantia nigra, *Prog.Brain Res.* 99, pp. 227-235.
- Schultz, W.; Apicella, P.; Scarnati, E. and Ljungberg, T. (1992): Neuronal activity in monkey ventral striatum related to the expectation of reward, *J.Neurosci.* 12 [12], pp. 4595-4610.
- Semba, K.; Reiner, P.B.; McGeer, E.G. and Fibiger, H.C. (1989): Brainstem projecting neurons in the rat basal forebrain: neurochemical, topographical, and physiological distinctions from cortically projecting cholinergic neurons, *Brain Res.Bull.* 22 [3], pp. 501-509.
- Sharkey, L.M.; Madamba, S.G.; Siggins, G.R. and Bartfai, T. (2008): Galanin alters GABAergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus, *Neurochem.Res.* 33 [2], pp. 285-291.
- Shibata, H.; Suzuki, T. and Matsushita, M. (1986): Afferent projections to the interpeduncular nucleus in the rat, as studied by retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase, *J.Comp Neurol.* 248 [2], pp. 272-284.
- Siever, L. J. (2008): Neurobiology of aggression and violence, *Am J Psychiatry* 165 [4], pp. 429-42.
- Stamp, J.A. and Semba, K. (1995): Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei, *Brain Res.* 677 [1], pp. 39-49.
- Stein, E.A.; Pankiewicz, J.; Harsch, H.H.; Cho, J.K.; Fuller, S.A.; Hoffmann, R.G.; Hawkins, M.; Rao, S.M.; Bandettini, P.A. and Bloom, A.S. (1998): Nicotine-

- induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study, *Am.J.Psychiatry* 155 [8], pp. 1009-1015.
- Steinbusch, H.W.; Nieuwenhuys, R.; Verhofstad, A.A. and van der, Kooy D. (1981): The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study, *J.Physiol (Paris)* 77 [2-3], pp. 157-174.
- Steinbusch, H.W.; van der, Kooy D.; Verhofstad, A.A. and Pellegrino, A. (1980): Serotonergic and non-serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the caudate-putamen complex in the rat, studied by a combined immunofluorescence and fluorescent retrograde axonal labeling technique, *Neurosci.Lett.* 19 [2], pp. 137-142.
- Steininger, T. L.; Rye, D. B. and Wainer, B. H. (1992): Afferent projections to the cholinergic pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. I. Retrograde tracing studies, *J Comp Neurol* 321 [4], pp. 515-43.
- Stern, C.E. and Passingham, R.E. (1996): The nucleus accumbens in monkeys (*Macaca fascicularis*): II. Emotion and motivation, *Behav.Brain Res.* 75 [1-2], pp. 179-193.
- Stratford, T.R. and Wirtshafter, D. (1990): Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat, *Brain Res.* 511 [1], pp. 173-176.
- Sutherland, R.J. (1982): The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex, *Neurosci.Biobehav.Rev.* 6 [1], pp. 1-13.
- Swanson, L.W. (2002): *Brain Architecture: Understanding the Basic Plan*, Oxford Univ Pr, ISBN: ISBN-13: 978-0195105056.
- Thierry, A.M.; Chevalier, G.; Ferron, A. and Glowinski, J. (1983): Diencephalic and mesencephalic efferents of the medial prefrontal cortex in the rat: electrophysiological evidence for the existence of branched axons, *Exp.Brain Res.* 50 [2-3], pp. 275-282.
- Uhl, G.R.; Goodman, R.R. and Snyder, S.H. (1979): Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping, *Brain Res.* 167 [1], pp. 77-91.
- Ullsperger, M. and von Cramon, D.Y. (2003): Error monitoring using external feedback: specific roles of the habenular complex, the reward system, and the cingulate motor area revealed by functional magnetic resonance imaging, *J.Neurosci.* 23 [10], pp. 4308-4314.
- Valentino, R.J.; Bey, V.; Pernar, L. and Commons, K.G. (2003): Substance P Acts through local circuits within the rat dorsal raphe nucleus to alter serotonergic neuronal activity, *J.Neurosci.* 23 [18], pp. 7155-7159.
- van der Kooy, D. and Hattori, T. (1980): Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat, *Brain Res.* 186 [1], pp. 1-7.
- van der Kooy, D. and Kuypers, H.G. (1979): Fluorescent retrograde double labeling: axonal branching in the ascending raphe and nigral projections, *Science* 204 [4395], pp. 873-875.
- Varga, V.; Kocsis, B. and Sharp, T. (2003): Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus, *Eur.J.Neurosci.* 17 [2], pp. 280-286.

- Vercelli, A.; Repici, M.; Garbossa, D. and Grimaldi, A. (2000): Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals, *Brain Res.Bull.* 51 [1], pp. 11-28.
- Vertes, R.P. (1991): A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat, *J.Comp Neurol.* 313 [4], pp. 643-668.
- Vertes, R.P.; Fortin, W.J. and Crane, A.M. (1999): Projections of the median raphe nucleus in the rat, *J.Comp Neurol.* 407 [4], pp. 555-582.
- Vrang, N.; Larsen, P.J. and Mikkelsen, J.D. (1995): Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tract tracing, *Brain Res.* 684 [1], pp. 61-69.
- Wang, Q.P.; Guan, J.L. and Nakai, Y. (1994): Immunoelectron microscopy of enkephalinergic innervation of GABAergic neurons in the periaqueductal gray, *Brain Res.* 665 [1], pp. 39-46.
- Wang, Q.P. and Nakai, Y. (1994): The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation, *Brain Res.Bull.* 34 [6], pp. 575-585.
- Wang, R.Y. and Aghajanian, G.K. (1977): Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe, *Science* 197 [4298], pp. 89-91.
- Waselus, M.; Galvez, J.P.; Valentino, R.J. and Van Bockstaele, E.J. (2006): Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum, *J.Chem.Neuroanat.* 31 [4], pp. 233-242.
- Waterhouse, B.D.; Mihailoff, G.A.; Baack, J.C. and Woodward, D.J. (1986): Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor, and visual cortical areas in the rat, *J.Comp Neurol.* 249 [4], pp. 460-481.
- Weiss, T. and Veh, R.W. (2011): Morphological and electrophysiological characteristics of neurons within identified subnuclei of the lateral habenula in rat brain slices, *Neuroscience* 172, pp. 74-93.
- Wessendorf, M.W. (1991): Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake, *Brain Res.* 553 [1], pp. 135-148.
- White, N.M.; Packard, M.G. and Hiroi, N. (1991): Place conditioning with dopamine D1 and D2 agonists injected peripherally or into nucleus accumbens, *Psychopharmacology (Berl)* 103 [2], pp. 271-276.
- Wiklund, L. and Bjorklund, A. (1980): Mechanisms of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence histochemical observations, *Brain Res.* 191 [1], pp. 109-127.
- Williams, R.W.; von Bartheld, C.S. and Rosen, G.D. (2003): Counting cells in sectioned material: a suite of techniques, tools, and tips, *Curr.Protoc.Neurosci.* Chapter 1, p. Unit.
- Wilson, M.A. and Molliver, M.E. (1991): The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates: regional distribution of axon terminals, *Neuroscience* 44 [3], pp. 537-553.
- Wise, R.A. (1980): Action of drugs of abuse on brain reward systems, *Pharmacol.Biochem.Behav.* 13 Suppl 1, pp. 213-223.
- Yanez, J. and Anadon, R. (1998): Neural connections of the pineal organ in the primitive bony fish *Acipenser baeri*: a carbocyanine dye tract-tracing study, *J.Comp Neurol.* 398 [2], pp. 151-161.

Zahm, D.S.; Williams, E. and Wohltmann, C. (1996): Ventral striatopallidothalamic projection: IV. Relative involvements of neurochemically distinct subterritories in the ventral pallidum and adjacent parts of the rostroventral forebrain, *J.Comp Neurol.* 364 [2], pp. 340-362.

9. Publikationen

- (1) Lehmann, A.; Geisler, S.; Schneider, K. and Veh, R.W. (2002): Individual Sunnuclei Of The Lateral Habenular Complex Distinctly Project To The Dorsal And Median Raphe Nuclei, Abstract viewer/Itinerary Planner, Washington DC: Society for Neuroscience 2002
- (2) Schneider K, Trenkwalder C, Berger K. Prevalence of RLS symptoms in primary care - A survey in Germany; Eur J Neurol. 2007;14 Suppl. ():13-13
- (3) Schneider K; Heise M; Heuschmann P; Berger K (2009). Lebens- und Versorgungssituation von Schlaganfallpatienten, 3-Monats-Follow-up des Qualitätssicherungsprojektes Nordwestdeutschland. Nervenheilkunde 2009; 28: 114–118
- (4) K. Schneider, B. Gess, R. Dittrich, E.B. Ringelstein, R. Dziewas. Akute intermittierende Porphyrie als seltene Differentialdiagnose eines fulminanten, therapieresistenten GBS. Neurologische Intensivmedizin Aktuell 2010; 1: 74.

10. Danksagung

Mein Dank für die Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit sowie der Überlassung des interessanten Themas geht vor allem an meinen Doktorvater Herr Prof. Dr. R.Veh, aber auch an die (ehemaligen) Mitarbeiter Frau Dr. Stefanie Geisler, Frau Ina Wolter und Heike Meyer für die Einführung in die Technik des Tracens bzw. in die Laboarbeit. Ich bedanke mich bei Frau Annett Kaphan für ihr stets „offenes Ohr“ und die Unterstützung bei organisatorischen Angelegenheiten. Ich danke meinem ehemaligen Kommilitonen und Mitdoktoranten Alexander Kowski für die langjährige tatkräftige Unterstützung sowie die anregenden Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären. Auch möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Schwester Andrea bedanken, die mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Lieber Kay, ich danke Dir für Deine Ausdauer und beständige Unterstützung in den letzten Jahren. Du hast mich stets bestärkt, wenn ich an mir gezweifelt habe und mir die ganze Zeit den Rücken frei gehalten, um diese Arbeit fertig zu stellen. Mein größter Dank gilt daher Dir.

11. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katja Schneider, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die laterale Habenula – unterkernspezifische Projektionen zur Dorsalen Raphe“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Katja Schneider

12. Lebenslauf

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