

**Die Charakterisierung
der Vokalisationsbahn bei der
chinesischen Rotbauchunke,
*Bombina orientalis***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Silke Maier
aus Soltau

Köln 2013

Berichtersteller/in: Prof. Dr. W. Walkowiak

PD. Dr. H. Endepols

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 22.Oktober 2013

„Alles hat seine Zeit, und jedes Vorhaben unter dem Himmel seine Stunde...“ Prediger 3,1-8

Inhalt

Zusammenfassung	7
Abstract	8
1. EINLEITUNG	10
1.1 Einführung in die Thematik	10
1.2 Die Hörbahn der Anuren	12
1.2.1 Audiomotorische Integration	14
1.3 Die Vokalisationsbahn der Anuren	16
1.3.1 Vokalisationsmechanismen	17
1.3.2 Zentralnervöse Steuerung	20
1.4 Zielsetzung	23
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Versuchstiere	26
2.2 Hirnpräparation	27
2.2.1 Anästhesie	27
2.2.2 Perfusion	27
2.2.3 Isolation des Gehirns	27
2.3 Immunhistochemische Untersuchungen der <i>c-fos</i> Expression	28
2.3.1 <i>c-fos</i> als Aktivitätsmarker	28
2.3.2 Versuchsaufbau	30
2.3.3 Versuchsablauf	30
2.4 Tracing-Experimente	33
2.4.1 Biotin-Tracing	33
2.4.1.1 Neurobiotin als neuronaler Tracer	33
2.4.1.2 Versuchsaufbau	34
2.4.1.3 Stimulations- und Ableitelektroden	36
2.4.1.3.1 Stimulationselektrode	36
2.4.1.3.2 Ableitelektrode	36
2.4.1.4 Versuchsablauf	37
2.4.2 Fluoreszenz-Tracing	39
2.4.2.1 Tetramethylrhodamin als neuronaler Tracer	39
2.4.2.2 Alexa Fluor® 488 als neuronaler Tracer	40
2.4.2.3 Versuchsaufbau	40
2.4.2.3.1 Nanoinjektion	40
2.4.2.3.2 „back-fill“-Tracing	41
2.4.2.4 Versuchsablauf	42
2.5 Aufarbeitung der Präparate	43
2.5.1 Fixierung	43
2.5.2 DAB-Nachweisreaktion	43

2.6	Auswertung	44
2.6.1	Mikroskopische Aufnahmen	44
2.6.2	Nomenklatur	44
2.6.3	Immunhistochemische Untersuchungen	45
2.6.4	Tracing-Experimente	45
2.6.4.1	Neurobiotin-Tracing	45
2.6.4.2	Fluoreszenz-Tracing	46
2.7	Verwendete Lösungen	48
2.7.1	Puffer	48
2.7.2	Ringer	48
2.7.3	Medien	48
2.7.4	Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	48
2.7.5	Sonstige Lösungen	49
3.	ERGEBNISSE	50
3.1	c-fos	50
3.1.1	Befunde zur Methode	50
3.1.2	Durchgeführte Experimente	51
3.1.3	Lokalisation von <i>c-fos</i> -positiven Zellen im Gesamthirn	52
3.1.4	Vergleich der <i>c-fos</i> -positiven Neurone in den Subnuclei der Area praeoptica	65
3.2	Afferenzen /Efferenzen des Nucleus praetrigeminalis	69
3.2.1	Befunde zur Methode	69
3.2.2	Durchgeführte Experimente	70
3.2.3	Extrazelluläres Tracing im Bereich der Somata des Nucleus praetrigeminalis	73
3.2.3.1	Applikation in den rostralen Anteil des Nucleus praetrigeminalis	73
3.2.3.2	Applikation in den caudalen Anteil des Nucleus praetrigeminalis	77
3.2.4	Extrazelluläres Tracing im Bereich des Dendritenfeldes des Nucleus praetrigeminalis	80
3.2.5	Extrazelluläre Tracings von Kontrollapplikationen	91
3.2.5.1	Tracing im ventralen Neuropil mittels multipler Injektionen	91
3.2.5.2	Applikation in das ventrale Tegmentum	96
3.2.6	Verbindungen des Nucleus praetrigeminalis	102
3.2.6.1	Applikation nahe der Somata	102
3.2.6.2	Applikation im Dendritenfeld des Nucleus praetrigeminalis	103
3.2.6.3	Kontrollapplikation im ventralen Tegmentum	104
3.3	Afferenzen/ Efferenzen der Area praeoptica	105
3.3.1	Durchgeführte Experimente	105
3.3.2	Applikation in die Area praeoptica	105
3.3.3	Verbindungen der Area praeoptica	108
3.4	Afferenzen/ Efferenzen des Infundibulum	109
3.4.1	Durchgeführte Experimente	109
3.4.2	Applikation in das dorsale Infundibulum	110
3.4.3	Applikation in das dorsoventrale Infundibulum	111
3.4.4	Verbindungen des Infundibulum	114
3.5	Afferenzen/ Efferenzen des Tegmentum	115

3.5.1	Durchgeführte Experimente	115
3.5.2	Applikation in das posteriore Tegmentum, pars ventralis	117
3.5.3	Applikation in das posteriore Tegmentum, pars dorsalis	127
3.5.4	Applikation in das anteriore Tegmentum, pars dorsalis	137
3.5.5	Verbindungen des Tegmentum	145
3.6	Afferenzen/ Efferenzen der Nuclei habenulares	146
3.6.1	Durchgeführte Experimente	146
3.6.2	Applikationen in die Nuclei habenulares	147
3.6.3	Verbindungen der Nuclei habenulares	158
4.	DISKUSSION	159
4.1	Isoliertes Hirnpräparat	159
4.2	c-fos	160
4.2.1	Methodische Befunde	160
4.2.2	Verteilung von <i>c-fos</i> positiven Neuronen im Gesamthirn	163
4.2.2.1	Basale <i>c-fos</i> Aktivität	163
4.2.2.2	Akustisch basierte <i>c-fos</i> Aktivität	164
4.2.2.3	Vokalisations-basierte <i>c-fos</i> Aktivität	165
4.2.2.4	Funktionelle Bedeutung	166
4.3	Hodologische Untersuchungen der Vokalisationsbahn	166
4.3.1	Methodische Befunde	166
4.3.1.1	Elektrische Stimulation	166
4.3.1.2	Neurobiotin	167
4.3.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe	169
4.3.2	Verbindungen des Nucleus praetrigeminalis (vokaler Mustergenerator)	170
4.3.2.1	Eingänge des Nucleus praetrigeminalis	170
4.3.2.2	Mögliche Relaisstationen	171
4.3.3	Verbindungen der Area praeoptica (vokaler Schrittmacher)	173
4.3.4	Verbindungen des Infundibulum	175
4.3.5	Verbindungen des Tegmentum (Relaisstation)	177
4.3.6	Verbindungen der Nuclei habenularum	179
4.4	Synopsis	181
4.5	Schlussbetrachtung zur Vokalisation	182
5.	LITERATUR	185
6.	ANHANG	204
7.	ABKÜRZUNGEN	212

Zusammenfassung

Anuren nutzen die akustische Kommunikation hauptsächlich im Rahmen des Reproduktionsverhaltens. Im Laufe der Evolution haben sich vier verschiedene Vokalisationsmechanismen entwickelt, die mit Ausnahme des atmungsunabhängigen laryngealen Rufmechanismus der Familie der Pipidae, die Schallsignale mit Hilfe des Atemluftstroms erzeugen. Die Produktion basiert dabei auf ein koordiniertes Zusammenspiel von Mund-, Rachen- und gegebenenfalls Rumpfmuskulatur, die von prämotorischen und motorischen Kerngebieten der Vokalisationsbahn gesteuert werden. Der heutige Wissenstand der zentralnervösen Verschaltung der Vokalisationsbahn basiert hauptsächlich auf neuroanatomischen Daten von der abweichenden Art *Xenopus laevis* (Pipidae), wobei zum Teil widersprüchliche Aussagen über die Verschaltung des vokalen Schrittmachers und des vokalen Mustergenerators existieren. Das Ziel meiner Arbeit war daher die Aufklärung der Vokalisationsbahn bei der pädomorphen Art *Bombina orientalis*, die insbesondere Rückschlüsse über die afferenten Eingänge des Nucleus praetrigeminalis geben sollten.

Im ersten Versuchsansatz wurde mittels immunhistochemischen Untersuchungen die Gehirnaktivität bei rufaktiven Männchen mittels dem Aktivitätsmarker *c-fos* kartiert. Akustische Stimulationen mit konspezifischen Paarungsrufen führten zu *c-fos* exprimierenden Neuronen im gesamten Gehirn, insbesondere in akustischen, prämotorischen, sensomotorischen, modulierenden und limbischen Kerngebieten. Bei rufaktiven Männchen konnten markierte Somata auch im Nucleus praeopticus anterior beobachtet werden, die hauptsächlich im dorsalen Anteil lokalisiert waren. Eine Zunahme von markierten Zellkörpern konnte ebenfalls im Nucleus praeopticus posterior beobachtet werden, wobei seine Beteiligung an der Rufauslösung aufgrund der geringen Anzahl von Versuchstieren nicht ermittelt werden konnte.

Die Konnektivität der Vokalisationsareale wurden mit unterschiedlichen Tracer-Methoden analysiert. Tracer-Applikationen in den Nucleus praetrigeminalis (vokalen Mustergenerator) zeigten keinen direkten Eingang aus dem Nucleus praeopticus anterior (vokalen Schrittmacher), jedoch aus dem Tegmentum, dem

Infundibulum und dem Nucleus raphé. Die Färbungen weisen weiterhin auf einen Kontakt an den dendritischen Arborisationen hin, mit Ausnahme des Tegmentum, das wahrscheinlich über ein Faserbündel direkt zum Somata des Nucleus praetrigeminales projiziert. Tracer-Applikationen in die Area praeoptica bestätigen, dass der vokale Mustergenerator und der vokale Schrittmacher über Zwischen- oder Relaisstationen verbunden sind und sowohl das Infundibulum als auch das Tegmentum in Frage kommen. Insbesondere das Tegmentum wies zu beiden Vokalisationsarealen und zum Infundibulum reziproke Verbindungen auf, so dass eine Rolle als audio-vokales Interface evident ist.

Eine weitere Struktur, die jedoch einen indirekten Einfluss auf das Vokalisationssystem ausübt, sind die Nuclei habenulares. Tracer-Applikationen in dieses Areal konnten afferente und efferente Verbindungen mit zahlreichen Nuclei aus allen Gehirnabschnitten aufweisen, u.a. auch zum Nucleus raphé, zur Area praeoptica, zum Tegmentum und zum Infundibulum. Die Nuclei habenulares modulieren das Vokalisationssystem über das dopaminerge und serotonerge System, wobei viele Funktion innerhalb des Vokalisationssystems noch unklar sind.

Abstract

Anuran amphibians use acoustic communication mainly during their courting and mating rituals. In the course of evolution four different vocal mechanisms have developed. Except for the reduced laryngeal calling mechanism of the genus Pipidae, Anurans generate sound signals by means of an airstream. The production is based on a coordinated interaction between mouth, larynx and, if necessary, the trunk musculature, which, in turn, are controlled by premotor and motor areas of the vocal pathway. The current scientific knowledge of the neuronal interconnectivity within the vocal pathway is based on neuro-anatomical studies of the aberrant species *Xenopus laevis* (Pipidae), in which conflicting statements of the connectivity between the vocal pattern generator and the vocal pacemaker exists. The aim of this study was to investigate the vocal pathway of the pedomorphic *Bombina orientalis*, with special emphasis on the role of afferent input to the praetrigeminal nucleus.

As a first step *c-fos* staining method, a marker of activity-dependent immediate early gene expression, was used to map brain activity of calling males. Acoustic signals of conspecific advertising calls lead to *c-fos* expression in neurons in the whole brain, especially in acoustic, premotoric, sensomotoric, modulating and limbic brain regions. Brains of calling males exhibit stained neurons in the anterior preoptic nucleus, localized in the dorsal part. The posterior preoptic nucleus showed an increase of stained cell bodies as well, whereas its involvement in call triggering could not be determined due to the small number of experimental animals.

The connectivity of vocal areas was analyzed with different tracer methods. Tracer applications into the pretrigeminal nucleus (vocal pattern generator) revealed no direct projection from the anterior preoptic nucleus (vocal pacemaker), but instead from the tegmentum, infundibulum and the raphé nucleus. This staining further suggests a contact at the dendritic arborisations, except for the tegmentum, which projects presumably directly to the soma via a fiber tract. Trace application into the preoptic area confirms that the pattern generator and vocal pacemaker are connected through relay stations, probably the infundibulum and the tegmentum. The tegmentum shows reciprocal connections to both vocalization areas and to the infundibulum, so that a role as an audio-vocal interface is evident.

Another brain structure, which has an indirect influence on the vocal system, is comprised of the habenular nuclei. Tracer applications to this area revealed afferent and efferent connections to numerous nuclei in all parts of the brain, e.g. the raphé nucleus, the preoptica area, the tegmentum and infundibulum. The habenular nuclei modulate the vocal system through a dopaminergic and serotonergic system, although many functions remain ambiguous within the vocal system.

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung in die Thematik

Die Entwicklung von Kommunikationssystemen bei Wirbeltieren steht häufig im Zusammenhang mit ihrem Fortpflanzungsverhalten, denn der intraspezifische Informationsaustausch dient der Erhaltung einer Art. Bei vielen Tierarten spielt neben olfaktorischen und visuellen Reizen auch die akustische Kommunikation eine wichtige Rolle. Eine besondere Form der akustischen Kommunikation, die hauptsächlich bei Wirbeltieren vorkommt, ist die Vokalisation, bei der Schallsignale von inneren Organen mit Hilfe des Atemluftstroms erzeugt werden. Die motorischen Muster der Vokalisation sind vielfach angeboren, können jedoch auch trainiert und erlernt werden. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Kommunikation ist dabei die Codierung und Übermittlung endogener Zustände eines „Senders“, sowie die Wahrnehmung und entsprechende Interpretation des Signals seitens eines „Empfängers“ (Shannon & Weaver 1949; Duellman & Trueb 1986; Abb. 1).

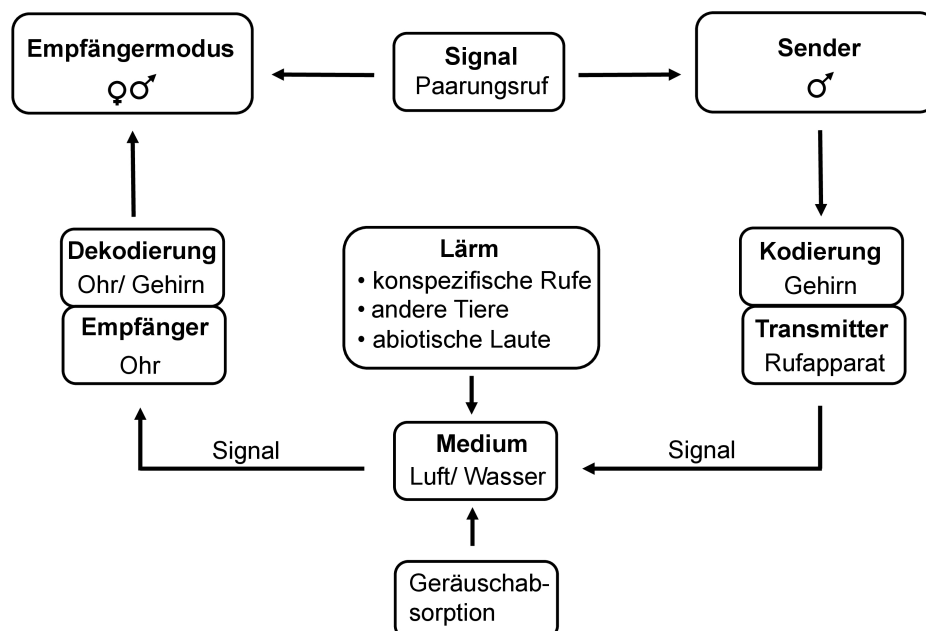


Abb. 1: Das Sender-Empfänger-Modell (modifiziert nach Duellman & Trueb 1986). Die Verschaltung ist reziprok, d.h. der Sender kann auch Empfänger sein und umgekehrt

Bei Anuren wird das Fortpflanzungsverhalten hauptsächlich akustisch gesteuert. Die Männchen verfügen meistens über vier bis fünf verschiedene Rufotypen (Paarungsruf, Werbungsruf, Revierruf, Befreiungsruf, Schreckruf), die in unterschiedlichen sozialen Kontexten generiert werden und bei Artgenossen zum größten Teil genetisch determinierte Verhaltensweisen auslösen (Capranica 1965). Im Reproduktionszyklus generieren Männchen primär Paarungs- bzw. Werbungsrufe, um paarungsbereite Weibchen anzulocken. Die Weibchen reagieren dann mit phonotaktischem Verhalten und bewegen sich aktiv auf ein Männchen ihrer Wahl zu (Schneider 1982). Dabei entscheiden sich die Weibchen der Gattung *Hyla versicolor* nach rein akustischen Kriterien für einen Partner (z.B. Länge des Rufes; Lautstärke; Gerhardt et al. 1996; Welsh et al. 1998; Schwartz et al. 2001). In geräuschvollen Umgebungen dient die Schallblase als ein zusätzliches visuelles Signal, an denen sich paarungsbereite Weibchen, wie z.B. bei der Gattung *Pysalaemus pustulosus* (Túngara-Frosch), orientieren und somit das ausgewählte Männchen anhand der rhythmischen Bewegung der Schallblase, die synchron zum Zeitmuster des Rufes erfolgt, identifizieren können (Rosenthal et al. 2004, Wells & Schwartz 2007). Interessanterweise produzieren auch einige Weibchen Paarungsrufe, wie z.B. der Krallenfrosch *Xenopus laevis*, um ihre bevorstehende Eiablage anzukündigen (Tobias et al. 1998; Emerson & Boyd 1999). Ein weiteres Beispiel stellen die Weibchen der Gattung *Alytes* dar, die bedingt durch ihr Habitat (felsen- und höhlenreiche Umgebungen) Paarungsrufe zur Orientierung für näherkommende Männchen abgeben (Heinzmann 1970; Bush 1997; Wells & Schwartz 2007). Generell bildet eine stark ausgeprägte intrasexuelle Konkurrenz die Voraussetzung für ein erfolgreiches Fortpflanzungsverhalten und fördert gleichzeitig die Artenseparation im Tierreich (Wells 1977b).

Artgleiche Männchen bilden häufig einen Chor. Die akustische Interaktion wird meistens durch ein spontanaktives Tier eingeleitet, so dass in der Nähe befindliche Männchen entweder zum Rufen animiert werden oder mit Fluchverhalten reagieren (Wells 1977b; Wells & Greer 1981). Für eine effektive Signalübertragung mit einem geringeren Energieverbrauch passen rufaktive Männchen innerhalb eines Chores ihre eigene Rufphase an die eines anderen oder mehrerer Männchen an, so dass die einzelnen Signale in einer größeren Gruppe besser detektierbar bleiben (antiphones

Rufen; Foster 1967; Akef & Schneider 1985; Walkowiak 1988; Wells & Schwartz 2007). Rufaktive Männchen zeigen während des Reproduktionszyklus eine beträchtliche Plastizität bezüglich der Attraktion eines Partners, der Revierverteidigung und in der Kommunikation mit anderen Männchen, auch wenn das Zeitmuster und die spektrale Zusammensetzung der Paarungsrufe weitestgehend genetisch determiniert sind (Capranica 1965; Wells 1988; Boatright-Horowitz et al. 2000; Grafe et al. 2000; Wells & Schwartz 2007). Bei einigen Spezies wenden die Männchen die Strategie des „stillen Satelliten“ an, das sich in der Nähe eines rufenden Männchens aufhält und versucht, sich mit einem Weibchen zu paaren, das eigentlich zu einem Rufer unterwegs war (Perrill et al. 1978; Lucas et al. 1996). Neben der Evozierung von willkürlichen Bewegungen können konspezifische Rufe auch elektrodermale Reaktionen (Brzoska 1981), eine vermehrte Hormonproduktion (Brzoska & Obert 1980) und eine Veränderung der Herzschlagrate auslösen (Megela-Simmons et al. 1985).

Die verschiedenen Verhaltensinteraktionen zwischen konspezifischen Männchen innerhalb eines Chores laufen in unterschiedlichen Zeitfenstern ab (ca. 40 Millisekunden bis in den Minutenbereich; Ryan 1986; Walkowiak 1988b) und weisen auf ein komplexes Netzwerk hin, das wahrscheinlich durch unterschiedliche audiomotorische und audiovokale Schnittstellen koordiniert wird und somit ein adäquates Antwortverhalten auf einen bestimmten Reiz zulässt. Das Zusammenspiel zwischen auditorischen Eingängen und der motorischen Steuerung von Vokalisation scheint evident zu sein, so dass im Folgenden erst kurz die akustische Verarbeitung beschrieben wird, um anschließend auf die unterschiedlichen Rufmechanismen sowie die zentralnervöse Steuerung der Vokalisation bei Anuren einzugehen.

1.2 Die Hörbahn der Anuren

Alle Klassen der terrestrischen Vertebraten haben zur Detektierung und Verarbeitung von Luftschall Strukturen entwickelt, die es ermöglichen, akustische Stimuli wahrzunehmen und zu interpretieren. Im Allgemeinen scheinen die medullären Hörbahnstationen für die Analyse und Lokalisation von Reizen zuständig zu sein. Der Torus semicircularis, eine Mittelhirnstruktur, dagegen fungiert nicht nur als Station für

die Erkennung von arteigenen Rufen, sondern auch für die audiomotorische Integration. Telencephale Strukturen sind beteiligt an der prämotorischen Modulation und der Kontrolle des Motivationszustandes (Hoke et al. 2007; Endepols 2005).

Das Ohr der Anuren ist permissiv für eine Bandbreite von akustischen Umweltreizen, wobei nur arteigene Signale zu einer Verhaltensantwort führen (Walkowiak 1988b; Luksch & Walkowiak 1998; Wilczynski & Ryan 2010; Hoke & Pitts 2012). Akustische Stimuli führen bei Anuren zu einer Erregung von Haarsinneszellen der zwei auditorischen Papillen, Papilla amphibiorum und Papilla basilaris, die sich in zwei Ausstülpungen des Sacculus befinden (Wilczynski & Endepols 2007). Jede Papille ist sensitiv für einen bestimmten Frequenzbereich, wobei die Papilla amphibiorum auf tiefe Frequenzen und die Papilla basilaris auf höhere Frequenzen reagiert. Die beiden auditorischen Papillen der Anuren werden wiederum von den Fasern des posterioren Astes des Nervus stato-acusticus (N. VIII) innerviert (Wilczynski & Endepols 2007). Der N. VIII terminiert in der ersten Hörbahnstation, dem Nucleus dorsomedullaris (DMN; homolog zum Nucleus cochlearis der Säugetiere). Der Nucleus dorsomedullaris wiederum hat drei Ausgänge: die Neurone projizieren zum contralateralen Nucleus dorsomedullaris, sowie bilateral zur Oliva superior und zum Torus semicircularis (Wilczynski & Endepols 2007).

Der primäre Ausgang der zweiten Hörbahnstation (Oliva superior) projiziert hauptsächlich ipsilateral zum Torus semicircularis (Wilczynski & Endepols 2007), zum Nucleus lemniscus laterale und zum Nucleus posterior thalami (Feng 1986a). Axone des Nucleus dorsomedullaris und der Oliva superior werden zum lateralen Lemniscus zusammengefasst (Wilczynski & Endepols 2007). Neben den aufsteigenden Bahnen sind alle Kerngebiete mit den unteren Kernen reziprok verbunden und können somit ihre eigenen auditorischen Eingänge modulieren.

Der Torus semicircularis ist homolog zum Colliculus inferior der Säugetiere und lässt sich im Gegensatz zu den unteren Kernen in verschiedene Subnuclei einteilen: den Nucleus principalis, Nucleus laminaris und Nucleus magnocellularis (Potter 1965a). Der Nucleus laminaris liegt unterhalb des tectalen Ventrikels, wobei seine Neurone in Laminae angeordnet sind. Der Nucleus principalis liegt caudoventral vom Nucleus

laminaris, und seine Zellkörper ordnen sich hauptsächlich dorsal an. Damit entsteht eine Zone mit geringerer Anzahl an Zellkörpern im Zentrum des Nucleus principalis, in der sich hauptsächlich die Dendriten der Laminaris- und Principalis-Neurone befinden. Hier terminieren die Fasern des Nucleus dorsomedullaris und der Oliva superior. Ventrolateral an den Nucleus principalis angrenzend liegen die großen Zellkörper des Nucleus magnocellularis (Wilczynski & Endepols 2007). Neben den auditorischen Subnuclei wurden noch zwei weitere nicht-auditorische Subnuclei beschrieben, deren Funktionen noch nicht bekannt sind: der Nucleus commissuralis und der Nucleus subependymalis (Potter 1965b; Wilczynski & Endepols 2007).

Bis zum Torus semicircularis weist das Hörsystem einen hohen Grad an Parallelität und akustischer Tonotopie auf (Pettigrew et al. 1981; Walkowiak & Luksch 1994). Jedoch verliert sich die tonotope Organisation im Bereich des Zwischenhirns komplett. Aszendierende torale Projektionen, hauptsächlich vom Nucleus laminaris und Nucleus magnocellularis, erreichen die Kerngebiete des Zwischenhirns und des Vorderhirns über einen periventriculären und einen ventrolateralen Weg (Endepols & Walkowiak 2001). Über beide Wege werden verschiedene thalamische Nuclei, das Striatum, das Pallium mediale und das Septum innerviert. Allerdings sind diese Strukturen keine rein auditorischen Zentren, da dort unterschiedliche sensorische Modalitäten verarbeitet werden und die Latenzen auf Hörstimuli eher lang sind bzw. die Neurone auch sehr schnell habituieren (Mudry & Capranica 1987a; Wilczynski & Capranica 1984; Walkowiak 1988b; Roden 2002; Wilczynski & Endepols 2007). Auch die höheren Zentren sind reziprok mit den unteren Hörbahnstationen verbunden und können somit die Schallwahrnehmungen und damit auch das Verhalten modulieren und beeinflussen (Endepols & Walkowiak 1999).

1.2.1 Audiomotorische Integration

Das akustisch gesteuerte Verhalten ist während des Reproduktionszyklus u.a. abhängig vom sozialen Kontext und der inneren Bereitschaft des jeweiligen Individuums. Männchen und Weibchen reagieren in Bezug auf einen konspezifischen Paarungsruf selektiv mit verschiedenen Verhaltensreaktionen, die in unterschiedlichen Zeitfenstern ablaufen. Es gibt dabei sehr schnelle Interaktionen,

wie z.B. bei dem Wechselruf von *Smilisca sila*, der eine Latenz von 40 ms aufweist, oder das evozierte Rufen eines Satellitenmännchens, dessen Reaktion in Sekunden- oder Minutenbereichen liegen kann (Ryan 1986; Walkowiak 1988a; Walkowiak 2007). Auch das antiphone Rufen vom *Bombina orientalis* wurde bezüglich seiner schnellen Antwortreaktionen im Rahmen des Wechselrufens eingehend untersucht (Mohr & Schneider 1993; Walkowiak 1988, 1992; Strake 1995; Walkowiak & Luksch 1994; Luksch & Walkowiak 1998; Endepols & Walkowiak 2001). Für die Anpassung der Rufphasen innerhalb eines Chores ist die Beeinflussung des vokalen Mustergenerators durch Eingänge aus der Hörbahn essentiell:

Eine wichtige Struktur für die audiomotorische Integration ist der Torus semicircularis. Dieses Areal erhält nicht nur auditorische Eingänge, sondern verarbeitet zusätzlich weitere sensorische Informationen, wie z.B. aus dem visuellen, vestibulären, somatosensorischen und auch aus dem Seitenliniensystem (Ewert & Borchers 1971; Comer & Grobstein 1981; Wilczynski 1981; Zittlau et al 1985; Luksch 1994). Walkowiak (1988b) konnte mit verhaltensphysiologischen Experimenten zwei unterschiedliche Filtersysteme nachweisen, die zur Erkennung von konspezifischen Rufen und für eine schnelle Rufunterdrückung von 120 - 130 ms nach Lautwahrnehmung verantwortlich waren – eine wichtige Voraussetzung für antiphones Rufen. Der Nucleus laminaris scheint innerhalb der audiomotorischen Integration eine wichtige Position einzunehmen, da seine deszendierenden Bahnen hauptsächlich in prämotorischen und motorischen Nuclei der Medulla und des Rückenmarks terminieren und er selbst u.a. Eingänge aus der Area praeoptica, dem vokalen Schrittmacher, erhält (Luksch & Walkowiak 1998). Außerdem werden die Laminarisneurone zusätzlich von Hormonen (Estradiol und Dihydrotestosteron) und Neuromodulatoren innerhalb der auditorischen und audiomotorischen Verarbeitung beeinflusst (Morrell et al. 1975; Kelley et al. 1978; Kelley 1980; Walkowiak & Luksch 1998; Endepols et al. 2000; Endepols 2005).

Das Tegmentum ist eine weitere Struktur, die bei der audiomotorischen Verarbeitung eine Rolle spielt (Luksch & Walkowiak 1998; Endepols et al. 2000; Endepols & Walkowiak 2001). Luksch & Walkowiak (1998) konnten durch elektrophysiologische und hodologische Studien bei *Discoglossus pictus* eine Ähnlichkeit bezüglich seiner Projektionsgebiete und seinen modulatorischen Eingängen zum Nucleus laminaris

feststellen. Beide Kerngebiete weisen zusätzlich eine starke reziproke Verbindung auf, so dass durch eine Integration verschiedener Modalitäten die prämotorischen und motorischen Nuclei entsprechend des inneren Status des Tieres modifiziert werden können (Endepols et al. 2000).

1.3 Die Vokalisationsbahn der Anuren

Anuren nehmen bezüglich des Vokalisations- und Hörsystems eine besondere Stellung im System ein, da sie als rezente Nachfahren der ersten landlebenden Wirbeltiere betrachtet werden (Duellmann & Trueb 1986; Irisarri et al. 2011) und somit evolutive Rückschlüsse hinsichtlich grundlegender neuronaler Mechanismen innerhalb der akustischen Kommunikation gezogen werden können. Im Laufe der Zeit haben sich innerhalb dieser Ordnung verschiedene Rufmechanismen entwickelt, die jedoch alle eine grundlegende Gemeinsamkeit besitzen, nämlich die Schallproduktion über einen Kehlkopf und häufig auch die Ausbildung von Stimmbändern (Schneider 1988; Strake 1995). Die unterschiedlichen anatomischen Ausprägungen des Kehlkopfes und der Stimmbänder führen u.a. zu einer Variation der Rufe innerhalb der Froschlurche (Gerhardt & Huber 2002). Mit Ausnahme der Pipiden (z.B. *Xenopus leavis*) ist die Vokalisation auch eng mit der Atmung verbunden.

Anuren nutzen neben der Hautatmung die Kehloszillation und Lungenventilation zum Gasaustausch. Während der Kehloszillation wird der Mundboden gleichmäßig gehoben und gesenkt, wobei die Nasenlöcher geöffnet und die Glottis geschlossen werden und die Atemgase werden dabei über die Mundschleimhaut ausgetauscht. Nach einer Serie von Kehloszillationen geht die Atmung in eine Lungenventilation über. Die Lungenventilation beginnt mit einer Aspiration, bei der sich die Mundhöhle mit frischer Luft füllt. Bei der anschließenden Expiration strömt die verbrauchte Luft in der Lunge über die geöffnete Glottis in den oberen Teil der Mundhöhle und anschließend über die geöffneten Nasenlöcher nach außen. Dieser Prozess erfolgt passiv durch die Eigenelastizität der Lunge (Strake 1995). Die folgende Inspiration erfolgt über einen Druckpumpenmechanismus, d.h. frische Luft wird gegen die noch vorhandene Luft in der Lunge gepresst, so dass Anuren letztendlich Mischluft atmen (DeJongh & Gans 1969; Duellmann & Trueb 1986; Strake 1995). Nachfolgend kann

wieder eine Serie von Kehloszillationen folgen. Die gleichen passiven und aktiven Elemente werden sowohl bei der Atmung als auch bei der Vokalisation benutzt: Als passive Elemente dienen die Schallblase, das Hyoid und die skelettalen Kehlkopfelemente. Die aktiven Elemente umfassen die Muskulatur des Mundbodens, des Hyoids, der Zunge, des Rachens, des Kehlkopfes und die Flankenmuskulatur (Martin 1971; Strake 1995).

Vier Rufmechanismen lassen sich unterscheiden: die inspiratorische, die expiratorisch-inspiratorische und die expiratorische Vokalisation, sowie der laryngeale Mechanismus der Vertreter der Familie der Pipidae, die im Folgenden beschrieben werden. Der Unterschied des inspiratorischen und expiratorischen Rufes liegt in der Richtung des Luftstromes und der motorischen Aktivität der Rumpfmuskulatur bei der Expiration, wobei der Unterwasserruf ohne einen Luftstrom durch das schnelle Auseinanderziehen zweier Knorpelscheiben erzeugt wird (Yager 1982; Strake 1995; Walkowiak 2007). Da der inspiratorische und expiratorisch-inspiratorische Vokalisationsmechanismus viele Übereinstimmungen aufweisen und ich in dieser Arbeit nur mit der inspiratorisch rufenden Art *Bombina orientalis* gearbeitet habe, werde ich nur auf den Mechanismus der inspiratorischen Vokalisation genauer eingehen.

1.3.1 Vokalisationsmechanismen

Inspiratorischer Vokalisationsmechanismus:

Männchen der inspiratorisch rufenden Art *Bombina orientalis* liegen während der Paarungszeit auf dem Wasser und rufen bei Tag und Nacht (Akef & Schneider 1985). Bei dem inspiratorischen Ruf wird anfangs eine Serie von Kehloszillationen und Lungenventilationen durchgeführt, um die Lunge mit Luft zu füllen. Die gefüllte Lunge dient zusätzlich als Resonator während der Vokalisation (Lörcher 1969; Akef & Schneider 1985; Walkowiak 2007). Durch eine gleichzeitige Aktivierung der Mundboden- und der Hyoidmuskulatur wird die Luft durch die geöffnete Glottis in die Lunge gedrückt. Die Mundbodenmuskulatur dient bei dem inspiratorischen Rufmechanismus als treibende Kraft. Wie bei der Atmung funktioniert dieser Prozess mittels eines Druckpumpenmechanismus (DeJongh & Gans 1969; Strake 1995).

Zuvor werden die Nasenlöcher durch eine Kontraktion des M. intermandibularis anterior und der Zungenmuskulatur verschlossen (indirekter Hebelmechanismus), so dass ein gewisser Druck aufgebaut werden kann (Regal & Gans 1976; Strake 1995). Die im Kehlkopf befindlichen Gewebewülste werden durch die aktive Luftbewegung zum Schwingen gebracht und erzeugen somit einen inspiratorischen Laut (Lörcher 1969; Akef & Schneider 1985). Der tonlose Rückstrom der Luft in die Mundhöhle erfolgt durch eine aktive Senkung des Mundbodens oder durch eine passive Entdehnung der Lunge (Strake 1995).

Verschiedene Muskeln spielen während der Atmungs- und Vokalisationsprozesse eine Rolle:

Im Mundboden, der den inspiratorischen Luftstrom generiert, liegen folgenden Muskeln: Der Musculus (M.) intermandibularis anterior liegt am distalen Ende des Mundbodens und verschließt bei Aktivierung die Nasenlöcher. Die Innervation erfolgt über den N. trigeminus (N. V). Der M. intermandibularis posterior ist zusammen mit dem M. interhyoideus für das Heben des Mundbodens zuständig. Der M. intermandibularis posterior wird ebenfalls vom N. V innerviert und der M. interhyoideus vom N. facialis (N. VII). Die nächsten beiden Muskeln sind ebenfalls für das Heben des Mundbodens zuständig, allerdings sind diese längslaufend orientiert: M. geniohyoideus und M. omohyoideus. Beide Muskelgruppen werden vom N. hypoglossus (N. XII) innerviert. Der M. geniohyoideus bewegt bei Kontraktion den anterioren Anteil des Hyoids nach oben (Walkowiak 2007). Der einzige Senker des Mundbodens ist der caudal liegende M. sternohyoideus, der durch einen weiteren Ast N. XII innerviert wird. Dieser Muskel senkt bei der Expiration den Mundboden oder stabilisiert bei der Inspiration zusammen mit dem M. geniohyoideus das Hyoid (Strake 1995). Auch der M. petrohyoideus unterstützt das Hyoid, indem der posteriore Anteil der Mundhöhle verengt wird. Seine Innervierung erfolgt über den N. IX-X Komplex. Weitere längslaufende Muskeln sind der Protraktor und Retraktor der Zunge: M. genioglossus und M. hyoglossus, die vom N. XII innerviert werden. Bei gleichzeitiger Aktivierung beider Muskeln trägt die Zunge zum Verschluss der Nasenlöcher von innen bei und schließt somit den Innenraum der Mundhöhle vom externen Milieu ab (Strake 1995). Der M. dilatator laryngis und der M. sphincter anterior, die beide durch den N. vagus (N. X) innerviert werden, sind für das Öffnen

und das Schließen der Glottis verantwortlich. Die Kontraktionen der Muskeln weisen während der Vokalisation eine sehr hohe Synchronität auf (Strake 1995).

Expiratorischer Vokalisationsmechanismus:

Der expiratorische Ruf ist weitestgehend bei den terrestrischen Neobatrachia (moderne Froschlurche) verbreitet und beruht ebenso auf einen Druckpumpenmechanismus (Strake 1995). Die rufaktiven Männchen nehmen Luft in die Lunge auf. Anschließend wird durch die treibende Kraft der Rumpfmuskulatur (M. rectus abdominis, M. transversus, M. obliquus externus und internus) der schallbildende expiratorische Ruf generiert, d.h. die in der Lunge befindliche Luft wird durch die Kontraktion der Rumpfmuskulatur hinaus forciert, passiert dabei den Kehlkopf und bringt die Stimmbänder zum schwingen (Strake 1995; Girgenrath & Marsh 1997). Von der Mundhöhle aus gelangt die Luft in die Schallblase, die als Resonator und Reservoir dient. Durch die Kontraktion der Schallblasenmuskulatur und des Mundbodens wird die Luft tonlos in die Lunge zurück gepresst (Schmidt 1966a; Schneider 1986). Bei dem expiratorischen Rufmechanismus werden neben den zuvor beschriebenen Hirnnerven noch die Spinalnerven für die Rumpfmuskulatur (Nn. spinales IV, V; VI; VII und VIII) benötigt (Gaupp 1899).

Atmungsunabhängige Rufe der Pipidae:

Die Familie der Pipiden zu denen *Xenopus laevis* gehört, umfasst rein aquatische Tiere, deren morphologische Strukturen sich den entsprechenden Lebensbedingungen angepasst haben. Sie leiten sich von terrestrischen Anuren ab (Trueb 1996) und weisen bezüglich ihrer Rufgenerierung eine starke Simplifizierung auf. Infolgedessen hat sich im Gegensatz zu den inspiratorisch und expiratorisch rufenden Arten ein komplett anderer Rufapparat entwickelt (Yager 1982; 1992,1996): Durch Kontraktion der Kehlkopfmuskeln werden zwei knorpelartige Scheiben (Stellknorpel) auseinandergezogen und erzeugen Klickfolgen, die durch einen vergrößerten Kehlkopf verstärkt werden. Der Kehlkopf dient somit als interne Schallblase bzw. Resonator (Yager 1982; Irisarri et al. 2011). Im Gegensatz zu den expiratorischen und inspiratorischen Rufmechanismen werden die Klickfolgen ohne einen Luftstrom erzeugt und infolgedessen werden keine Bewegungen des

Mundbodens und der Rumpfmuskulatur beobachtet. Die Innervation der Kehlkopfmuskulatur erfolgt nur über den Komplex des N. IX-X, was für eine Entkopplung zwischen der Rufgenerierung und Atmung spricht (Yager 1982, Tobias & Kelley 1987; Kelley 2004).

1.3.2 Zentralnervöse Steuerung

Die Generierung von konspezifischen Paarungsrufen erfordert ein koordiniertes Zusammenspiel von Mund-, Rachen- und gegebenenfalls Rumpfmuskulatur, die von prämotorischen und motorischen Kerngebieten der Vokalisationsbahn zentral gesteuert werden. Schmidt (1992) beschrieb in seiner früheren Studie zwei semi-unabhängige Rufgeneratoren im Bereich der Medulla oblongata - den vokalen Mustergenerator und einen Atmungsgenerator, während neuste Daten auf zwei Atmungsgeneratoren hinweisen, einen „buccal-oscillator“ und einen „lung-oscillator“ (Vasilakos et al. 2006).

Der Nucleus praetrigeminalis, auch bekannt als dorsales tegmentales Areal der Medulla (DTAM; Kelley et al. 1975), ist eine wichtige Komponente des vokalmotorischen Rufgenerators. Er ist unmittelbar caudal des Nucleus secundarius isthmi und anterior der Motoneuronen des Nervus trigeminus lokalisiert (Schmidt 1973, 1974). Seine Beziehung zur Vokalisation wurde erstmals auf der Basis von Läsions- und Stimulationsexperimenten bei verschiedenen expiratorisch rufenden Arten, z.B. bei *Rana pipiens*, *Hyla versicolor* und *Hyla cinerea*, beobachtet: Läsionen in diesem Areal unterdrückten jegliches Vokalisationsverhalten, das auch durch zusätzliche taktile oder elektrische Stimulation der Area praeoptica nicht mehr ausgelöst werden konnte, während Elektrostimulationen im intakten Nucleus praetrigeminalis fiktives Rufen sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen auslösten (Schmidt 1966, 1974, 1976, 1984). Die beiden Atmungsgeneratoren liegen in der Formatio reticularis, entlang der rostrocaudalen Achse, d.h. der „lung-oscillator“ liegt rostral der Motoneurone des N. IX-X, während der „buccal-oscillator“ weiter caudal liegt, und sind reziprok miteinander verschaltet (Vasilakos et al. 2004; Vasilakos et al. 2006). Eine adäquate Reizung des Nucleus praetrigeminalis, z.B. durch Elektrostimulationen der Area praeoptica, führt zu einer Aktivierung und

Modifizierung des Atmungsgenerators (Schmidt 1992). Bei ersten anatomischen Tracing-Studien konnten bei *Xenopus laevis* starke reziproke Verbindungen zwischen beiden Kerngebieten nachgewiesen werden (Wetzel et al. 1985; Brahic & Kelley 2003). Zusätzlich konnten noch weitere prämotorische Kerngebiete der Vokalisationsbahn identifiziert werden, z.B. der Nucleus secundarius isthmi, sowie der Nucleus reticularis inferior und medius (Schmidt 1973, 1974; Wetzel et al. 1985; Walkowiak 1992; Brahic & Kelley 2003). Einen modulierenden Effekt hat der Nucleus raphé, pars dorsalis, der serotonerge Neurone enthält und mit allen prämotorischen und sensomotorischen Vokalisationsarealen verbunden ist (Brahic & Kelley 2003; Zornik & Kelley 2007).

Als übergeordnetes Zentrum für die Initiierung der Rufbereitschaft und für die Auslösung von Paarungsrufen gilt die Area praeoptica, die im rostroventralen Diencephalon lokalisiert ist (Schmidt 1976, 1984; Urano & Gorbman 1980). Durch Stimulationsexperimente in diesem Areal konnte bei *Rana pipiens* und *Hyla arborea savignyi* männliches Rufverhalten induziert werden (Schmidt 1966a, 1984; Knorr 1976; Wada & Gorbmann 1977a,b). Brahic & Kelley (2003) konnten mit Fluoreszenzfärbungen bei *Xenopus laevis* robuste Konnektivitäten zu telencephalen Kerngebieten (Pallium, Septum und Striatum), zu diencephalen Kerngebieten (Infundibulum, Nucleus anterior thalami) und zum Nucleus raphé, pars dorsalis nachweisen, die eventuell im Vokalisationsnetzwerk mit eingeschlossen sind. Eine von Wetzel et al. (1985) beschriebene direkte Verbindung zum Nucleus praetrigeminalis konnte von Brahic & Kelley (2003) nicht bestätigt werden. Die Area praeoptica selbst umfasst drei wesentliche Kerngebiete: den Nucleus praeopticus anterior, den Nucleus praeopticus posterior und den Nucleus suprachiasmaticus. Wada & Gorbman (1977a) konnten das Rufverhalten von akustisch stimulierten Männchen durch intrakranielle Gabe von Testosteron in den Nucleus praeopticus anterior erhöhen und somit die Wichtigkeit des rostralen Anteils bezüglich der Rufauslösung nachweisen.

Die circannuale Periodik der Fortpflanzungsaktivität von Anuren wird durch exogene Faktoren, wie z.B. Temperatur und Lichtintensität, eingeleitet (Schneider 1966; Heinzmann 1970; Oseen & Wassersung 2002). Diese modulieren den endogenen

Zustand eines Individuums über das endokrine und das neuromodulatorische System und erhöhen somit die Paarungsbereitschaft sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen (Boyd 1997; Arch & Narins 2009). Das audiovisuelle Netzwerk von Anuren umfasst dabei Kerngebiete, die sowohl Androgene als auch Östrogene konzentrieren (Kelley et al. 1975; Morrell et al. 1975; Kelley 1980; Boyd & Ebersole 1997). Der hormonelle Einfluss wird hauptsächlich durch die HPG-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse) reguliert (Kelley & Tobias 1999; Wilczynski et al. 2005): Endogene Faktoren aktivieren dabei neurosekretorische Zellen im Hypothalamus und kontrollieren somit die Produktion und Sekretion von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH). Die Freisetzung von follikelstimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) aus der Hypophyse regt wiederum die Gonaden zur Produktion und Sekretion von Steroidhormonen an (Allison & Wilczynski 1991; Polzonetti-Magni et al. 1998; Tsai et al. 2005). Steroidhormone werden auch als Neurosteroid in tel- und diencephalen Kerngebieten synthetisiert, was letztendlich auf einen hormonellen Feedback-Mechanismus schließen lässt (Mensah-Nyagan et al. 1996). Dass Steroidhormone das Rufverhalten beeinflussen, konnte in klassischen Gonadoectomie-Studien erfolgreich nachgewiesen werden - Gonadoectomien unterdrücken Paarungsrufe, während sie durch die Behandlungen mit Androgenen facilitiert werden (Schmidt 1966b; Palka & Gorbman 1973; Kelley & Pfaff 1976; Wetzel & Kelley 1983). Das Vokalisationssystem von *Xenopus laevis* wird hauptsächlich durch Androgene gesteuert: Die beiden Rufgeneratoren (Nucleus praetrigeminalis / Motorkerne des N. IX-X) sowie auch der Nucleus reticularis inferior und medius enthalten Dihydrotestosteron-konzentrierende Neurone (Kelley et al. 1975; Kelley 1980, 1981). Höhere Zentren, wie z.B., das Septum, das Striatum, die Amygdala, der Thalamus das Infundibulum sowie die Area praeoptica enthalten hingegen Östrogenrezeptoren (Kelley et al. 1975, Morrell et al. 1975; Kelley 1980; Fischer & Kelley 1991; Chakraborty & Burmeister 2010). Die Sex-Steroide interagieren meistens mit anderen Hormonen und Neuromodulatoren, wie z.B. Gonadotropin, Arginin-Vasotocin und Prostaglandin, um das Reproduktionsverhalten zu beeinflussen. So kann das männliche Rufverhalten durch eine vorherige Behandlung mit humanem Choriongonadotropin verstärkt werden (Kelley & Pfaff 1976; Walkowiak 1988). Arginin-Vasotocin-Rezeptoren kommen hauptsächlich in

Kerngebieten des Tel- und Diencephalon vor, die u.a. auch sensorische Informationen integrieren, und stimulieren dort männliches Rufverhalten (Penna et al. 1992; Boyd 1994; Marler et al. 1995). Die Verhaltenseffekte von Arginin-Vasotocin werden teilweise von den Neurosteroid-bildenden Neuronen moduliert (Mensah-Nyagan et al. 1996).

1.4 Zielsetzung

Im Laufe der Evolution hat sich das vokalmotorische Netzwerk von Landwirbeltieren zu einem hochkomplexen Netzwerk entwickelt, das verschiedene afferente Eingänge und efferente Strukturen integriert und koordiniert. Um evolutive Rückschlüsse bezüglich des neuronalen Mechanismus zu erhalten und aufgrund der hohen Komplexität des Säugergehirns, bieten sich verschiedene Modellsysteme an, wie z.B. das der Anuren. Das Gehirn von Anuren weist den typischen Grundbauplan eines Wirbeltiergehirns auf, das sich insbesondere durch eine sekundäre Simplifizierung auszeichnet, d.h. eine Abnahme der Komplexität des zentralen Nervensystems während der Phylogenese (Roth & Wullimann 2001). Der Grad der Komplexität korreliert dabei negativ mit der Genom- und Zellgröße, d.h. Gehirne mit großen Neuronen entwickeln sich viel langsamer und weisen eine verzögerte Differenzierung auf, so dass diese im adulten Stadium pädomorph erscheinen (Roth et al. 1993, Roth et al. 1994). Pädomorphe Arten können demzufolge besonders gut mit den Embryonalstadien „höherer“ Wirbeltiere verglichen werden.

Der heutige Wissensstand des Vokalisationssystems bei Anuren bezieht sich hauptsächlich auf Daten von Neobatrachia und Pipidae (Schmidt 1973, 1974b, 1976, 1992; Wetzell et al. 1985; Knorr 1976; Wada & Gorbman 1977b; Brahic & Kelley 2003; Zornik & Kelley 2007). Beide Gruppen benutzen unterschiedliche Rufmechanismen zur Lautgenerierung, wobei die neuroanatomischen Daten bzw. der spezielle Larynxmechanismus hauptsächlich von der aberranten Art *Xenopus laevis* stammen (Yager 1992; Wetzell et al. 1985; Tobias & Kelley 1987; Brahic & Kelley 2003). Über die vokalisationsrelevante neuronale Verschaltung der Archaeobatrachia gibt es bisher nur wenige Daten. Diese Gruppe ist aber besonders interessant, da diese Tiere ursprüngliche Gehirne besitzen, auch wenn sie durch

eine sekundäre Simplifizierung entstanden sind. Walkowiak (1992) und Strake (1995) untersuchten u.a. die Lokalisation der Motoneurone von den beteiligten Rufmuskulaturen sowie deren Verschaltung zu einigen wenigen prämotorischen Kerngebieten bei *Bombina orientalis* und *Discoglossus pictus*. Die Aktivität des Nucleus praetrigeminalis ist essentiell für die Produktion von Rufen (Schmidt 1966a, 1976, 1992), wobei seine afferenten Eingänge von höheren Kerngebieten bisher noch nicht oder kaum aufgeklärt sind. Dies gilt auch für die Verbindung mit der Area praeoptica.

Das Ziel meiner Arbeit war es daher, die Vokalisationsbahn der pädomorphen Art *Bombina orientalis* aufzuklären, die im Vergleich mit den neuroanatomischen Untersuchungen der aberranten Art *Xenopus laevis* (Wetzel et al. 1985; Brahic & Kelley 2003) Rückschlüsse über die afferenten Eingänge des Nucleus praetrigeminalis erlauben soll.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1.) Welche Gehirnareale sind generell in die Vokalisation involviert? Welche Teile des zuvor postulierten vokalen Schrittmachers in der Area praeoptica sind in Paarungsruf auslösenden Situationen aktiv?

Hier wurde die neuronale Aktivität vokalisationsrelevanter Areale mit dem Aktivitätsmarker *c-fos* bestimmt.

2.) Wie ist die Verbindung zwischen dem vokalen Schrittmacher (Area praeoptica) und dem neuronalen Mustergenerator (Nucleus praetrigeminalis) organisiert: direkt oder indirekt?

Hierfür wurden hodologische Studien mit den Tracern Neurobiotin sowie Fluoreszenz-gekoppelten Dextranaminen durchgeführt.

3.) Welche Kerngebiete könnten im Fall einer indirekten Verschaltung als Relais- oder Zwischenstationen dienen? Welche anderen Areale beeinflussen die Aktivität des Mustergenerators?

Dafür wurden retrograde und anterograde Tracings in den vokalisationsrelevanten Arealen kombiniert.

4.) Gibt es Unterschiede zwischen der untersuchten pädomorphen Art und der Art *Xenopus laevis* bzw. wie sieht der Vergleich zu den Neobatrachia aus?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Alle Experimente dieser Arbeit wurden an der chinesischen Rotbauchunke *Bombina orientalis* (Boulenger 1890) durchgeführt, die zu den Archaeobatrachia gehört. Die Gattung *Bombina* gehört zur Familie der *Bombinatoridae* (Unken; Cannatella 1985) und der Ordnung der *Anura* (Froschlurche). Das Verbreitungsgebiet der chinesischen Rotbauchunke umfasst große Teile Asiens (Südostrafland, China, Vietnam und Korea). Die tag- und nachtaktiven Tiere leben bevorzugt an stehenden, flachen und sonnigen Gewässern, daher findet man sie oft an Tümpeln in Wiesen und Feldern (Hermann et al. 1987). Auffälligstes Merkmal ist die schwarz-rote Färbung der Bauchseite, welche vermutlich der Abschreckung von Feinden dient. Die Rückenseite kann braun bis grün gefärbt sein und ist bei Männchen mit ausgeprägten Warzen besetzt. Die Laichperiode erstreckt sich von Ende April bis September, wobei die Männchen der Gattung *Bombina orientalis* unter Laborbedingungen im Frühjahr starke Rufperioden haben (Akef & Schneider 1985). Weiterhin zeichnet sich diese Spezies durch ihre Simplifizierung im Hörsystem aus, u.a. im Mittelohr, im sensorischen Epithel und in den Hörkernen (Roth et al. 1992), was sich auch in der Einfachheit ihrer Rufe zeigt.

Die Experimente wurden ausschließlich an männlichen Adulttieren durchgeführt (Körpergröße von 4,0 bis 5,1 cm). Während der Paarungszeit entwickeln Männchen dunkle Schwielen an den Vorderextremitäten, so dass sich Männchen von Weibchen gut unterscheiden ließen. Die Versuchstiere entstammten entweder aus der laboreigenen Zucht oder von der Firma Import/Export Peter Hoch, Waldkirch. Geschlechtsreife Männchen wurden in einer Gruppe von bis zu zehn Individuen in artgerecht ausgestatteten Aquarien gehalten und einmal pro Woche mit Rinderherz und Heimchen gefüttert. Kaulquappen und postmetamorphe Tiere bewohnten separate Aquarien, wobei Kaulquappen mit abgebrühten Brennnesseln und Löwenzahn ernährt wurden und postmetamorphe Tiere mit Fliegen und Heimchen. Um natürliche Lebensbedingungen nachzuahmen, wurde die Lufttemperatur an die jeweilige Jahreszeit angepasst.

Alle Experimente befolgen den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes und den „Principles of Laboratory Animal Care“.

2.2 Hirnpräparation

2.2.1 Anästhesie

Vor einer Hirnisolation wurde eine Immersionsnarkose durchgeführt. Als Anästhetikum diente eine 0,2 %ige Tricain-Methansulfonat-Lösung (MS 222, Sigma-Aldrich, USA) in Leitungswasser, deren pH-Wert zuvor mit Natriumhydrogencarbonat (AppliChem, Deutschland) auf 7,4 gepuffert wurde (Ohr 1976). Die Tiere wurden 5 - 10 Minuten lang in diese Lösung eingesetzt, bis keine motorische Aktivität mehr auftrat. Anschließend wurde die Haut gründlich mit Leitungswasser abgespült. Zeigten sich keine Reaktionen mehr, wurden die Frösche für 10 Minuten auf Eis gelegt, was die Körpertemperatur auf ca. 5°C senkte, und die Stoffwechselrate entsprechend erniedrigte (Luksch et al. 1996).

2.2.2 Perfusion

Zur Präparation wurden die Tiere mit der dorsalen Seite auf Eis gelegt, so dass die Bauchdecke mit Pinzette und Schere geöffnet werden konnte. Da die Geschlechtsorgane sofort sichtbar waren, konnte man zu diesem Zeitpunkt der Präparation das Geschlecht feststellen. Mittels transcordialer Perfusion wurde das Blut aus dem Organismus entfernt. Dieser Schritt ist für die spätere DAB-Nachweisreaktion (2.5.2) wichtig, da sonst die in den Erythrozyten enthaltenen Peroxidasen eine Hintergrundfärbung verursachen (Horikawa & Armstrong 1988). Als Perfusat dienten 10 ml eisgekühlter Frosch-Ringer (Protokoll siehe 2.7.2), der mit Carbogengas (Air Products and Chemicals Inc., USA) auf einen pH-Wert von 7,4 - 7,6 eingestellt wurde (Straka & Dieringer 1993).

2.2.3 Isolation des Gehirns

Anschließend an die Perfusion folgte die Dekapitation des Tieres. Hierzu wurde mit einer Schere bilateral in die Mundwinkel eingeschnitten und der Schnitt dann dorsal der Vorderextremitäten bis in die Sakralregion weitergeführt. Dort wurde die

Wirbelsäule transversal durchtrennt. Das Präparat umfasste nun den Schädel (ohne Unterkiefer) sowie den größten Teil der Wirbelsäule. Die Haut wurde entfernt, da diese Giftdrüsen und möglicherweise Reste des Betäubungsmittels enthielt. Mit der dorsalen Seite nach unten wurde das Präparat in einer Petrischale fixiert. Diese war mit Sylgard (Wacker Silikon, Deutschland) ausgegossen, auf der sich eine Eisringerschicht befand. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Eisringerschicht angeschmolzen war, um Eiskristallbildung im Gehirn zu vermeiden. Das über dem Schädelknochen und Wirbelkanal liegende Muskel-, Fett- und Bindegewebe wurde entfernt, woraufhin der erste Wirbel mit einer Iridektomieschere geöffnet wurde. Von dort ausgehend wurde die Ventralseite mehrerer Wirbel sowie des Schädels abpräpariert und so das Gehirn und das Rückenmark freigelegt. War ein „back-fill“ des N. V vorgesehen, wurden dieser Nerv möglichst weit distal durchtrennt. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass der Nerv nicht überdehnt oder gequetscht wurde. Nach Durchtrennung einiger großer Blutgefäße sowie der Gehirn- und Spinalnerven konnte das Gehirn mit einem Teil des Rückenmarks isoliert werden. Das Gehirn wurde in ein ringergefülltes Blockschälchen überführt. Anschließend wurde die äußere Hirnhaut, die Dura mater, mittels zweier Pinzetten entfernt, um eine ausreichende Sauerstoff- und Glucose-Versorgung des Gehirns zu gewährleisten. Die Pia mater wurde über denjenigen Bereichen des Gehirns abgezogen, in denen Tracer-Applikationen geplant waren. Anschließend wurde das Präparat über Nacht bei 4°C in etwa 250 ml oxygeniertem Ringer aufbewahrt.

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen der *c-fos* Expression

2.3.1 *c-fos* als Aktivitätsmarker

Das zelluläre Proto-Onkogen *c-fos* ist zur Detektion von neuraler Aktivität im Nervensystem der Amphibien bereits erfolgreich getestet worden (Ubink et al. 1997; Cobellis et al. 1999; Yao et al. 2004; Burmeister et al. 2008; Laberge et al. 2008).

Die Aktivierung einer Nervenzelle durch einen extrinsischen Stimulus (physiologisch, elektrisch oder pharmakologisch) führt zu einer schnellen und vorübergehenden Expressierung des Proto-Onkogens, das wiederum das instabile nukleare

Phosphoprotein *c-fos* codiert. Das *c-fos*-Protein gehört zu der Familie der „immediated-early genes“ (IEG), dessen Induktion von der Aktivität postsynaptischer Rezeptoren abhängig ist (Armstrong & Montminy 1993; Clayton 2000; Velho et al. 2005). Die schnelle Signalübermittlung von der Zelloberfläche zum Zellkern wird über Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen ausgeführt, wodurch *c-fos* mRNA gebildet wird. Nach seiner Translation im Zytoplasma wird das *c-fos* Protein zurück in den Zellkern transportiert, wo es als Transkriptionsfaktor an der Regulation der Transkriptionsrate von Genen des Zellmetabolismus und zellulärer Funktionen beteiligt ist (siehe Abb.2; Morgan & Curran 1989, 1991).

Da die Expression von *c-fos* mit neuronaler Aktivierung korreliert (Sager et al. 1988), können mit Hilfe immunohistochemischer Untersuchungen distinkte Hirnregionen, die auf akustische Reize reagieren, topografiert werden.

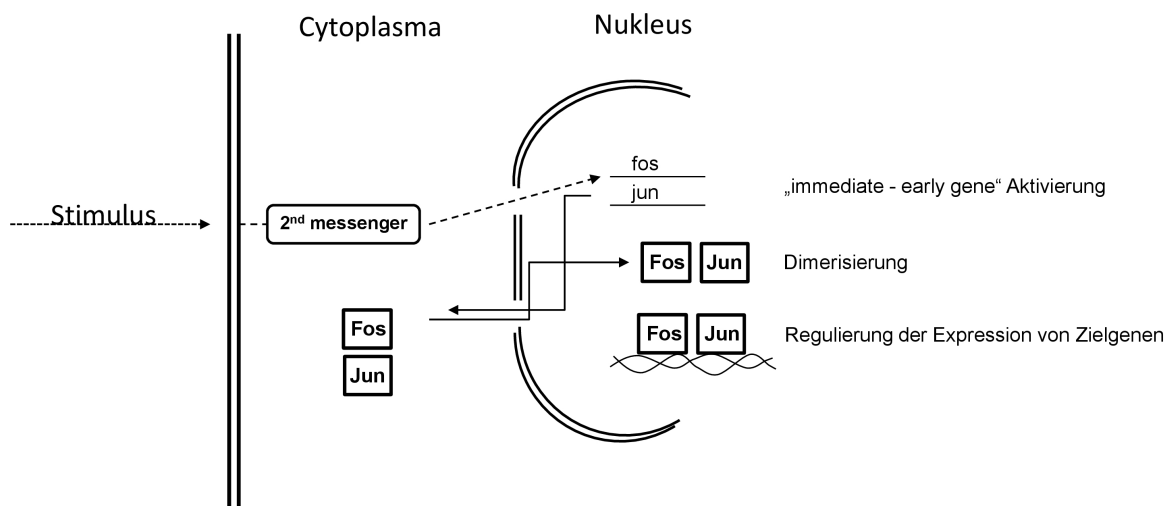


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion von Fos und Jun modifiziert nach Morgan & Curran 1989.

2.3.2 Versuchsaufbau

An 5 Versuchstieren wurde eine erfolgreiche *c-fos* Aktivierung durchgeführt. Dabei gab es ein Kontrolltier, drei akustisch stimulierte Tiere und ein akustisch stimuliertes Tier mit vorheriger Hormonbehandlung (2x 5000 Units humanes Choriongonadotropin, Sigma Deutschland).

Basierend auf früheren Experimenten, die eine Reduzierung der *c-fos* Produktion nach wiederholter Stimulierung von extrinsischen Reizen zeigten (Melia et al. 1994; Mello et al. 1995; Clayton 2000), wurden adulte Männchen eine Woche vor Versuchsbeginn in einen schallisierenden Raum gebracht. Hier wurden sie in einem 30 x 20 x 20 cm Aquarium gehalten, das mit Wasser gefüllt war. Künstliche Beleuchtung wurde von zwei Leuchtstoffröhren generiert, die in einem Tages- und Nachtrhythmus (14h/10h) arbeiteten und über dem Aquarium hingen. Ein Lautsprecher (WS 13 NG/MRS 13 NG 8Ω, VISATON, Deutschland) stand leicht versetzt zum Aquarium. Über diesen wurden während der akustischen Stimulation Rufattrappen präsentiert, die mit einer Software (RPvdsEx, V.5.4, Trucker-Davies Technologie, USA) synthetisiert wurden. Die digital-analog-Konvertierung erfolgte mittels eines externen Mikroprozessors (TDT, RM2). Die Signale wurden verstärkt (HVA-6060 CD, Renkforce) und zu dem Lautsprecher transferiert.

Schallaufnahmen wurden während des Experiments über ein Kondensatormikrofon (Typ 2235, Brüel & Kjaer, Deutschland) durchgeführt, das an ein Schallpegelmessgerät angeschlossen war. Somit konnten Schallattrappen im schallisierten Raum kontrolliert sowie mögliche Antwortrufe des Versuchstiers analysiert werden. Das Mikrofon hing über dem Aquarium. Um jegliche Störungen während der Versuche zu vermeiden, wurden die Vorgänge aus einem Nachbarraum aus kontrolliert.

2.3.3 Versuchsablauf

Die *c-fos* Immunhistochemie diente der Kartierung von Gehirnaktivität bei rufaktiven Männchen. Es sollte überprüft werden, welche Gehirnareale durch akustische Stimulation aktiviert und identifiziert werden können. Aus diesem Grund wurden die

Versuchstiere 30 Minuten mit artifiziellem konspezifischen Paarungsruf stimuliert (Ruffrequenz: 650 und 750 Hz; Rufdauer: 115 ms; Rufintervall: 900 ms; Schalldruckpegel: $70 \pm 0,5$ DB). Unterschiedliche Antwortreaktionen eines Versuchstieres, z.B. Einzelrufe, antiphones Rufen, Spontanrufe oder lediglich das Hören der Signale, sollten Aufschluss über das jeweilige Expressionsmuster geben und damit eventuelle Veränderungen der neuronalen Aktivität aufzeigen. Besonderes Interesse lag bei der Aktivierung von vokalisationsrelevanten Arealen, speziell der Area praeoptica.

Für die Markierung von *c-fos* wurde nach einem Protokoll von Prof. Dr. Ursula Dicke (Institut für Hirnforschung, Universität Bremen, persönliche Mitteilung) gearbeitet:

Nach einer Überlebenszeit von 120 Minuten wurden die Tiere dekapitiert und schließlich präpariert. Aufgrund der schnellen Expression des *c-fos* Gens und der geringen Halbwertszeit des Fos Proteins (Sheng & Greenberg 1990; Burmeister et al. 2008), wurde die Dekapitierung und die Präparation innerhalb von 15 Minuten durchgeführt. Nach 2 Stunden Immersionsfixierung wurde das Gehirn 2 x 10 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer (PB; siehe 2.7.1) gespült, um die Rückstände der Fixierung zu entfernen.

Für die Einbettung wurde das Gehirn für eine Stunde in 15% Saccharose-Lösung (AppliChem, Darmstadt) gegeben. Die Saccharose entzieht dem Gewebe Wasser, damit die Zellen beim späteren Gefrieren nicht durch die entstehenden Eiskristalle zerstört werden. Anschließend wurde das Gehirn für 30 Minuten in eine Saccharose-Lösung mit Einbettmedium (Tissue Freezing Medium, Leica, Deutschland; 1:1 Gemisch) überführt. Anschließend wurde das Gehirn mit Einbettmedium bedeckt und auf einen Messingblock mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren. Mit einem Gefriermikrotom (Leica CM 3050 S, Germany) wurden 30 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen, die mit 0,05 % Chromalaun und 0,5 % Gelatine beschichtet waren. Die Schnitte wurden auf einer Wärmeplatte (37°C - 40°C) für 30 Minuten angetrocknet und mit einem hydrophoben PAP-Pen (Science Services, Deutschland) umfahren, um die später aufgetragenen Lösungen auf dem Objektträger zu halten.

Nach 3 x 10 min Waschen in PB wurden 500 µl unspezifisches Blocking-Serum aufgetragen. Das Serum bestand aus 150 µl Ziegennormalserum (NGS, Vectastain ABC Rabbit-Kit, Linaris, Deutschland; siehe 2.7.4) in 10 ml PB. Nach einer Inkubation von 60 Minuten wurde das Serum abgeschlagen und 500 µl primäre Antikörper-Lösung aufgetragen. Das Rabbit Anti-c-fos (sc-253; polyclonal, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) wurde in 0,5 % Triton-X 100 + 0,5 % NGS + 0,3 % BSA (Rinderserumalbumin; AppliChem, Darmstadt) in PB 1:4000 verdünnt und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Triton-X 100 perforiert dabei die Zellmembran, so dass große Moleküle wie Antikörper und später der Avidin-Biotin-Komplex in die Zellen eindringen können. Nach 24 h wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten in PB gespült, um nicht die gebundenen primären Antikörper auszuwaschen. Der sekundäre Antikörper (biotinyliertes Goat anti-Rabbit IgG, Vectastain ABC Rabbit-Kit, Linaris, Deutschland) wurde in 10 ml TBS plus 50 µl NGS gelöst und 500 µl Antikörperlösung pro Objektträger aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Um die Schnitte von überschüssigen sekundären Antikörpern zu befreien, wurden diese 3 x 10 Minuten in PB gespült. Der Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC Rabbit-Kit, Linaris, Deutschland) besteht aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (Horse-Radish-Peroxidase HRP). Es wurden 10 µl Avidin und 10 µl Biotin-HRP pro ml in PB 30 Minuten vorher gemischt, um die Bildung des AB-Komplexes zu gewährleisten. Da der sekundäre Antikörper ebenfalls biotinyliert war, kam es dadurch zur hochaffinen Bindung zwischen noch freien Bindungsstellen am Avidin des AB-Komplexes und dem Biotin des sekundären Antikörpers. Die Schnitte wurden 60 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Nach 3 x 10 min spülen in PB wurden die Objektträger der DAB-Nachweisreaktion (siehe 2.5.2; Protokoll siehe 2.7.5) ausgesetzt.

2.4 Tracing-Experimente

2.4.1 Biotin-Tracing

2.4.1.1 Neurobiotin als neuronaler Tracer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tracings mit dem Marker Neurobiotin durchgeführt, das extrazellulär in den Nucleus praetrigeminalis, in das Tegmentum mesencephali und in die Nuclei habenulares appliziert wurde.

Neurobiotin ist ein Biotin-Derivat (N-(2-aminoethyl)biotinamide, Invitrogen, Deutschland), das sowohl für anterograde als auch für retrograde Färbung gut geeignet ist (Kita & Armstrong 1991; Lapper & Bolam 1991; Huang et al. 1992). Durch seine positive Ladung können die Moleküle über eine Glasmikroelektrode iontophoretisch ins Gewebe ausgetrieben werden, so dass eine selektive Markierung der gewünschten Areale gewährleistet wird. Seine positive Ladung in neutraler oder saurer Lösung verdankt Neurobiotin seinem hohen isoelektrischen Punkt, der zwischen 9,6 und 10,3 liegt (Kita & Armstrong 1991).

Bei einer retrograden Färbung wird der Farbstoff von efferenten Fasern, meist durch Endozytose, aufgenommen und ermöglicht eine Identifizierung von Ursprungsneuronen, die das jeweilige Areal innervieren. Der anterograde axonale Transport führt zur Färbung von Afferenzen und damit zur Identifizierung von Projektionsarealen. Hier wird der Farbstoff über das Soma oder seine Dendriten aufgenommen und entlang des axonalen Mikrotubulsystems zur Synapse transportiert (Köbber et al. 2000).

Im Vergleich zu anderen Markern ist Neurobiotin ein relativ kleines Molekül (MG 286 kDa). Das hat den Vorteil, dass Neurobiotin viel schneller aufgenommen und weiter axonal transportiert werden kann und somit auch kleinste Strukturen, wie z.B. Terminalien oder Varikositäten, markiert werden können. Dadurch kann auch die Laufzeit verkürzt werden (1 - 4 Tage, anstatt 3 - 5 Tage bei höhermolekularen Tracern). Die sehr gute Löslichkeit in hochkonzentrierten Elektrolytlösungen ermöglicht zusätzlich eine Kombination aus Markerapplikation und elektrophysiologischen Ableitungen.

Die Biotinkomponente von Neurobiotin hat außerdem eine hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin (Green 1990). Da Neurobiotin selbst kein Farbstoff ist, können z.B. Fluoreszenzfarbstoffe biotinyliert werden und an Avidin binden, so dass ein markiertes Neuron bzw. der axonale Transport in der jeweiligen Fluoreszenzfarbe leuchtet. Diese Präparate haben jedoch eine geringere Halbwertszeit als Peroxidase-Komplexe. In diesen Experimenten wurde Biotin mit einem Streptavidin-HRP-Diaminobenzidin-Nachweis (siehe 2.5.2) zur dauerhaften Haltbarkeit sichtbar gemacht, und mit einem Lichtmikroskop analysiert (Kita & Armstrong 1991, Kiernan 2006).

2.4.1.2 Versuchsaapparatur

Die Biotin-Tracings wurden an isolierten Hirnpräparaten durchgeführt (Luksch et al. 1996; verändert nach Schaffer 1983). Dabei wurden sowohl Ganzhirnpräparate als auch medio-sagittal getrennte Hirnhälften verwendet. Der Vorteil der getrennten Hirnhälften lag zum einen in der visuellen Identifizierung der zu untersuchenden Areale und zum anderen im erleichterten Zugang mit einer Stimulations- und Ableitelektrode. Die Generierung von Feldpotentialen diente der Lokalisation des Nucleus praetrigeminalis, so dass der Marker Neurobiotin exakt appliziert werden konnte.

Die Präparate wurden in eine mit Ringer gefüllten Durchflusskammer, dessen Boden mit Sylgard ausgegossen war, mit u-förmig gebogenen, rostfreien Insektennadeln fixiert – bei Ganzhirnpräparaten war die ventrale, bei medio-sagittal getrennten Hirnhälften die mediale Seite nach oben gerichtet. Oxygenierter Ringer floss durch einen Zuflussschlauch in die Kammer, während eine Peristaltikpumpe (Masterflex, 7518-60) dafür sorgte, dass die Absaugung gewährleistet war. Die Temperatur der Ringerlösung betrug $16^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (Straka & Dieringer 1993). Diese wurde durch einen Thermoregler (Peltron GmbH; Deutschland) kontrolliert. Die Durchflusskammer war auf einem Kreuztisch befestigt und konnte relativ zu der Ableitelektrode in X- und Y- Richtung bewegt werden.

Für Elektrostimulationen wurde eine konzentrische Elektrode benutzt (siehe 2.4.1.3.1), die über einen Stimulus-Isolator (Iso-Flex, A.M.P.I.; Israel) rechteckige Strompulse empfing. Die Amplitude des Strompulses konnte während der Versuche eingestellt werden. Die Ansteuerung des Stimulus-Isolators erfolgte über einen A/D-Wandler (CED Micro 1401 mkII mit Expansion ADC12). Parallel war der Impulsgenerator (Master-8, A.M.P.I., Israel) mit dem A/D-Wandler verbunden, mit dem unterschiedliche Stimulusparameter eingestellt werden konnten. Für die Messungen der Feldpotentiale wurden biotینگefüllte Ableitelektroden (siehe 2.4.1.3.2) benutzt. Die Ableitelektrode war über einen Elektrodenhalter direkt mit einer Probe (WPI; USA) eines Intrazellulärverstärkers (Cyto 721, WPI, USA) verbunden. Mithilfe des Verstärkers konnte der Widerstand der Elektrode gemessen werden. Das Signal wurde mit dem A/D-Wandler (CED Micro 1401 mkII mit Expansion ADC 12) digitalisiert und die Aufzeichnung mit einem Messrechner aufgenommen. Die Messungen wurden mittels des Programms „Spike 2“ (Ver.6.04; CED) gesteuert und registriert und auf einem Messrechner dargestellt. Für die Applikation von Neurobiotin konnte über die Probe positiver Gleichstrom mittels eines Intrazellulärverstärkers (Cyto 721, WPI, USA) eingespeist werden. Die Position der Elektrode konnte mithilfe des Kreuztisches in X-, Y- und Z-Achse variiert werden. Als Steuerungseinheit für den Elektrodenhalter diente ein Piezo-Meter, der über ein Steuerelement bedient wurde (PM10-1; Piezo-Manipulator; Märzhäuser; Deutschland). Mit einem Binokular (MZ 16 FA; Leica, Deutschland) wurde das Aufsetzen und die Positionierung der Elektrode beobachtet. Eine Fluoreszenzlampe (Leica, Deutschland) kam zum Einsatz, wenn die Ableitelektrode zusätzlich Fluoreszenzfarbstoff enthielt. Die Fluoreszenzfilter (siehe 2.4.2) waren im Binokular eingebaut und konnten während der Versuche eingestellt werden. Niederfrequente Störungen wurden vermieden, da die Durchflusskammer, die Mikromanipulatoren, die Simulations- und Ableitelektrode, der Stimulus-Isolator und ein Binokular auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC, USA) installiert waren. Als elektrische Abschirmung diente ein Faradayscher Käfig.

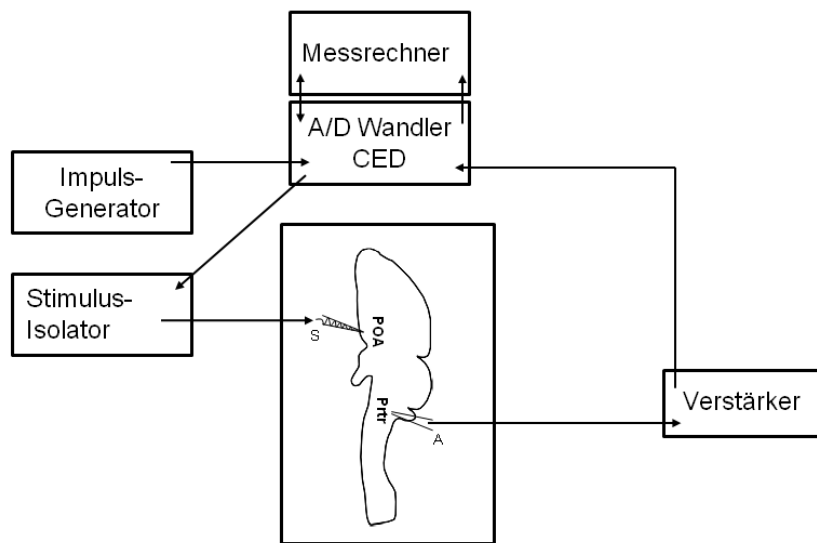


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus. A = Ableitelektrode; S = Stimulationselektrode.

2.4.1.3 Stimulations- und Ableitelektroden

2.4.1.3.1 Stimulationselektrode

Die direkte Stimulation der Area praeoptica erfolgte mit einer konzentrischen bipolaren Edelstahl-Elektrode (0,2 mm Kontakt-Ø (Spitze); 0,5 mm Kontakt-Ø (Mantel)) Rhodes Medical Instruments, USA). Die Elektrode wurde in eine Pasteur-Pipette (Brand GmbH, Deutschland) geschoben, so dass die Spitze ca. 7 mm herausschaute. Fixiert wurde die Elektrode mit warmem Wachs, das in den vorderen schmalen Teil der Pasteurpipette eingefüllt wurde und dort aushärtete, um somit ein Eindringen des Ringers von der Ableitkammer in die Pipette zu verhindern. Mit Hilfe eines Stimulationsprotokolls (siehe 2.4.1.4) konnte nun das gewünschte Areal stimuliert werden.

2.4.1.3.2 Ableitelektrode

Es wurden konventionelle Glasmikroelektroden verwendet, die aus Borosilikatglas mit Filament (Länge 70 mm, Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Filament 0,2 mm; Hilgenberg, Deutschland) bestanden. Das Filament

begünstigte die luftblasenfreie Befüllung der Elektrode mit Lösung. Gezogen wurden die Elektroden in einem horizontalen Mikropipetten-Puller (Modell P-87; Sutter Instruments Co., Flaming/Brown, USA), wobei die Parameter für den Ziehvorgang empirisch ermittelt wurden.

Für Messungen der Feldpotentiale wurden die Elektroden mit 3 M Na-Acetat-Lösung befüllt. Der Elektrodenhalter enthielt an der Basis ein Silberchlorid-Pellet und musste ebenfalls mit 3 M Na-Acetat-Lösung befüllt werden, damit ein Kontakt zwischen Elektrodenlösung und Verstärker hergestellt werden konnte. Der Widerstand der Elektroden lag zwischen 6 M Ω und 12 M Ω .

Bei extrazellulärer Färbung mit Neurobiotin wurden die Elektroden und der Elektrodenhalter mit einem Gemisch aus 0,3 M Na-Acetat-Lösung und 10 % Biotin befüllt. Im Fall von „back-fill“-Tracings der N. V Motoneurone wurde dem o.g. Gemisch entweder Alexa-Fluor 488 oder Tetramethylrhodamin hinzugefügt, damit die Elektrodenspitze unter Fluoreszenzlicht besser zu erkennen war. Der Elektrodenwiderstand lag hier ebenfalls bei 6 M Ω und 12 M Ω .

2.4.1.4 Versuchsablauf

Zur Identifizierung des Nucleus praetrigeminalis sollten evozierte Feldpotentiale registriert werden. Der Nucleus praetrigeminalis liegt ventrolateral des Cerebellum, caudal des Nuclues isthmi und rostromedial des Nucleus motorius nervi trigemini. Diese Gehirnareale dienten als Landmarke, da der Nucleus praetrigeminalis wenige Neurone enthält und im Gehirn nicht prominent sichtbar ist. Bei einigen Tracings wurde zusätzlich ein N. V Fluoreszenz-„back-fill“ durchgeführt (siehe 2.4.2.3.2), damit die Motoneurone als visuelle Landmarke dienen konnten. Da einige Färbungen eine starke Projektion zum Tegmentum mesencephali aufwiesen, sollte mit einer späteren Versuchsreihe aufgeklärt werden, ob das Tegmentum eventuell als Relaisstation zwischen der Area praeoptica und dem Nucleus praetrigeminalis fungiert.

Mit einer mit biotingefüllten Ableitelektrode wurde das Gebiet in 50 μ m-Abständen in rostrocaudaler und dorsoventraler Richtung untersucht. Die angegebene Schritttiefe der Piezo-Kontrolleinheit wurde auf null gesetzt, sobald die Elektrode auf dem

Gewebe aufsetzte. Dies wurde durch eine Spannungsänderung der Ableitspur angezeigt. Die erste Stimulation erfolgte direkt nach dem Aufsetzen auf die Geweboberfläche. Weitere Stimulationen folgten nach 60 µm-Abständen, um schließlich die stärkste Antwort zu ermitteln. Die maximale Tiefe der Messungen lag bei 600 µm. Da die Amplituden bei Feldpotentialmessungen relativ gering waren und im Rauschen der Ableitspur untergingen, wurden die Potentiale mit der Funktion „Waveform Average“ von der Software Spike 2 gemittelt. Bei jedem Messpunkt wurde die Area praeoptica zehnmal hintereinander mit einem Rechteckpuls von 1 ms Dauer und einer Reizstärke von 10 mA stimuliert. Das Interstimulus-Intervall betrug 2 Sekunden. Stärkere Stimulationen führten zu einer Verletzung des Gewebes, so dass keine Registrierung mehr möglich war.

Die extrazelluläre Applikation von 10 %igem Neurobiotin in den Nucleus praetrigeminalis wurde mit unterschiedlichen Stromstärken und Applikationszeiten durchgeführt. Abhängig von dem Elektrodenwiderstand wurde ein kontinuierlicher Strom zwischen +180 und 250 nA gegeben. Die Applikationszeit variierte zwischen 30 und 45 Minuten. Die Applikationstiefe lag zwischen 250 und 280 µm gemessen von der lateralen Oberfläche. In das Tegmentum mesencephali und in die Nuclei habenulares wurde ebenfalls 10 %iges Neurobiotin iontophoretisch appliziert. Hier wurde für 30 Minuten ein Strom von 250 nA gegeben. Die Applikationstiefe lag zwischen 30 und 80 µm.

Danach wurden die Gehirnhälften für zwei Tage bei 4°C in Ringer aufbewahrt. Um einen guten Transport des Farbstoffes zu gewährleisten, wurde täglich frisch oxygenierter Ringer hinzugefügt und für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Danach folgte die Fixierung (siehe 2.5.1). Die immersionsfixierten Hälften wurden 3 x 10 Minuten in PB gespült und in Agar-Agar (siehe 2.7.3) eingebettet. Nach Aushärtung des Einbettmediums wurden mit einem Vibratom (VT 1200 S, Leica, Deutschland) 50µm dicke Transversal- oder Sagittalschnitte angefertigt und diese auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger übertragen. Während des Schneidevorgangs befand sich das Gehirn fortwährend in PB. Die Schnitte wurden auf einer Wärmebank bei 37°C - 40°C für 30 Minuten getrocknet und mit einem PAP-Pen (Science Service, Deutschland) umrandet, damit die anschließend aufgetragene

Streptavidin-HRP-Lösung (Amersham Biosciences, UK; 2 %ig in PB + 0,5 % Triton-X 100) nicht von den Objektträgern herunterfließen konnte. Die Inkubationszeit betrug 14 bis 20 Stunden. Anschließend wurde die DAB-Nachweisreaktion (siehe 2.5.2) durchgeführt.

2.4.2 Fluoreszenz-Tracing

Neben den Biotin-Tracings wurden auch Fluoreszenzfarbstoffe für Einzel- und Doppelfärbungen am isolierten Hirnpräparat durchgeführt. Für die Experimente wurden Dextranamin-gekoppeltes Tetramethylrhodamin und Alexa Fluor® 488 verwendet. Beide Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit 0,1 M PB aliquotiert und bei - 20°C aufbewahrt.

Dextrane sind hydrophile Polysaccharide, die sich u.a. durch eine hohe Wasserlöslichkeit, geringe Toxizität und ein mäßiges bis hohes Molekulargewicht auszeichnen. Ihre poly-(α -D-1,6-glucose)-Verbindung schützt sie vor einer Aufspaltung durch endogene Glycosidasen (Haugland 1996). Als neuronale Tracer werden Dextrane meistens in konjugierter oder biotinylierter Form verwendet und für Fasertraktfärbungen (tract tracing), Transplantationen und Cell Fate Mapping eingesetzt (Glover et al. 1986; Vercelli et al. 2000; Gross & Hanken 2004).

2.4.2.1 Tetramethylrhodamin als neuronaler Tracer

Dextranamin-Tetramethylrhodamin ist ein Rhodaminderivat und wird sowohl anterograd als auch retrograd transportiert (Fritsch & Sonntag 1991; Akintunde & Buxton 1992; Schofield et al. 2007). Seine Laufeigenschaft ist so gut, dass Neurone in ihrer gesamten Form dargestellt werden können, einschließlich des Axons und Axonkollateralen, sowie der dendritischen Verzweigungen und Spines.

Das Maximum der Absorption von Dextranamin-Tetramethylrhodamin liegt bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{abs}} = 555 \text{ nm}$, das der Emission bei $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$. Eine besondere Eigenschaft ist zudem seine hohe Photostabilität. Für die Tracings wurden zwei verschiedene Molekulargewichte (MG) benutzt: Das 10 kDa und das 3 kDa Dextranamin (Life Technology, Deutschland). Beide tragen eine negative Ladung

und können mit Glutaraldehyd fixiert werden. Der Vorteil des kleineren MG ist nicht nur seine höhere Ausbreitungsgeschwindigkeit, sondern auch die bessere Detektierung feinsten Strukturen (Fritsch 1993).

2.4.2.2 Alexa Fluor[®] 488 als neuronaler Tracer

Die Alexa Fluor[®] Farbstoffe sind gegenüber den herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Lucifer Yellow, Fluorescein, Rhodamin) stärker fluoreszierend, photostabiler und unempfindlicher im pH Bereich von 4-10 (Panchuk-Voloshina et al. 1999). Ihre jeweilige Zahl am Ende des Namens steht für die optimale Absorptionswellenlänge in nm, angeregt durch einen Argon-Ionen-Laser bzw. ab einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Helium-Neon-Laser.

Das Absorptionsmaximum von Dextranamin Alexa Fluor[®] 488 liegt bei $\lambda_{em}=495$ nm und das Emissionsmaximum bei $\lambda_{em}=519$ nm. Färbungen mit Alexa Fluor[®] 488 (Life Technology, Deutschland) wurden mit einem MG von 10 kDa durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff ist negativ geladen und mit Glutaraldehyd fixierbar.

2.4.2.3 Versuchsaufbau

Für Einzel- und Doppelfärbungen wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mittels eines Nanoinjektors in das Gehirn appliziert, da diese Technik u.a. eine höhere Volumengenauigkeit ermöglicht, während für die Anfärbungen der Motoneurone des N. trigeminus (N. V) „back-fill“-Tracings dienen. Im Folgenden werden beide Techniken genauer beschrieben:

2.4.2.3.1 Nanoinjektion

Glaskapillaren (WPI, Deutschland) wurden mit einem horizontalen Mikropipetten-Puller (Modell P-87; Sutter Instruments Co., Flaming/Brown, USA) gezogen und anschließend mit Paraffinöl luftblasenfrei befüllt. Die Befüllung mit einer nicht komprimierbaren Flüssigkeit ist dabei sehr wichtig, um später den Fluoreszenzfarbstoff mit Druck aus der Mikropipette zu treiben. Unter einem Binokular (SZX7, Olympus, Deutschland) wurde die Elektrodenspitze mit einer Iridektomieschere gekürzt. Die optimale Öffnung der Elektrodenspitze betrug

10 - 30 µm. Das isolierte Gehirn wurde nach den Vorbereitungen in ein mit Ringer gefülltes Blockschälchen überführt. Da der Boden mit Sylgard ausgekleidet war, konnte das Gehirn mit Kaktusnadeln fixiert werden. Je nach Versuch wurde mit medio-sagittal getrennten oder an intakten Gehirnen gearbeitet. Der Nanoinjektor war an einem Mikromanipulator befestigt, mit dem die Mikropipette positioniert und in X-, Y- und Z-Richtung manuell bewegt werden konnte. Unter Beobachtung wurde die Pipette in das gewünschte Gehirnareal eingeführt. Die gewollte Menge konnte an einem Kontrollpanel zuvor eingestellt werden.

2.4.2.3.2 „back-fill“-Tracing

Als Vorarbeit des „back-fill“-Tracings wurden zwei kleine Schälchen aus Reaktionsgefäßen (Plastibrand, Deutschland) gebastelt. Dabei wurden die Enden mit einem Skalpell gekappt und vorsichtig eine v-förmige Einkerbung hineingeschnitten.

Das isolierte Gehirn wurde anschließend in ein Blockschälchen gelegt, so dass je ein Schälchen neben die Nn. V positioniert und mit Vaseline stabilisiert werden konnten. Das distale Ende der beiden Nervenäste wurde daraufhin in die Schälchen gelegt, so dass die Nervenenden frei lagen. Um ein Auslaufen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurde der proximale Anteil des Nervens mit Vaseline fixiert. Im Anschluss wurde das gesamte Gehirn mit Vaseline bedeckt, so dass keine Schädigungen durch das Austrocknen auftraten. Beide Schälchen wurden anschließend mit destilliertem Wasser gefüllt, damit zum einen die Nervenenden aufquellen und zum anderen die Dichtigkeit überprüft werden konnte. Nach einer Wartezeit von 3 - 5 Minuten wurde das destillierte Wasser durch den Fluoreszenzfarbstoff ersetzt. Für das „back-fill“-Tracing wurde Dextranamin-Alexa Fluor[®] 488 benutzt. Die Füllmenge lag bei 2 - 3 µl. Wichtig war hierbei, dass die Nervenenden komplett mit dem Farbstoff benetzt wurden. Zum Schluss wurde das Gehirn mit einer Box verdeckt, damit der Fluoreszenzfarbstoff vor Lichteinstrahlungen abgeschirmt wurde. Nach 25 Minuten Einwirkzeit wurde die Vaseline entfernt und das Gehirn in einen mit Ringer gefüllten Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

2.4.2.4 Versuchsablauf

Zur Aufklärung der Vokalisationsbahn bei *Xenopus laevis* wiesen erste anatomische Studien mittels Weizenkeim-Agglutinin gekoppelt an Meerrettich-Peroxidas (WGA-HRP) auf eine direkte Verbindung zur Area praeoptica hin (Wetzel et al. 1985). Da WGA-HRP wahrscheinlich ein transsynaptischer Tracer ist (Köbbert et al. 2000), kann nicht mit Sicherheit von einer monosynaptischen Verbindung ausgegangen werden. Bei späteren Experimenten mit Dextranamin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen wurde tatsächlich keine Verbindung zwischen beiden Arealen verifiziert. Allerdings wurden Verbindungen zum Infundibulum, pars dorsalis und zum Striatum ventrale nachgewiesen (Brahic & Kelley 2003). Mit Einzel- und Doppelfärbungen sollten die afferenten Verbindungen zum Nucleus praetrigeminalis, insbesondere die Organisation zur Area praeoptica, nachgewiesen werden.

Mit einer gefüllten Kapillare wurden Färbungen in der Area praeoptica, im Infundibulum, pars dorsalis und im Nucleus praetrigeminalis durchgeführt. In Abhängigkeit von der Sensitivität, der Pipettenöffnung und Einstichtiefe variierte die injizierte Konzentration der beiden Fluoreszenzfarbstoffe. Das Injektionsvolumen betrug pro Applikation 2,3 nL. Die Einwirkzeit betrug 25 - 45 Minuten. Doppelfärbungen wurden zwischen der Area praeoptica und dem Nucleus praetrigeminalis bzw. zwischen dem Infundibulum, pars dorsalis und dem Nucleus praetrigeminalis durchgeführt. Die Farbstoffe wurden nacheinander injiziert. Auch hier betrug die Einwirkzeit pro Fluoreszenzfarbstoff 25 - 45 Minuten.

Nach der Applikation wurde das Gehirn für zwei Tage bei 4°C in Ringer aufbewahrt. Damit der Farbstoff von den Neuronen gut aufgenommen und transportiert werden konnte, wurde täglich frisch oxygenierter raumtemperierter Ringer hinzugefügt und für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde das Gehirn für zwei Tage mit 4 % Paraformaldehyd+1,25 % Glutaraldehyd in PB fixiert. Nach der Immersionsfixierung wurde das Gehirn dreimal für 10 Minuten in PB gespült und in Agar-Agar eingebettet. Nach Aushärtung des Einbettmediums wurden mit einem Vibratom (VT 1200 S, Leica, Deutschland) 50µm dicke Transversal- oder Sagittalschnitte angefertigt und diese auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger übertragen. Während des Schneidevorgangs befand sich das Gehirn

fortwährend in PB. Die Schnitte wurden auf einer Wärmebank bei 37 - 40°C für 30 Minuten getrocknet. Nach wiederholter Waschung in PB wurden die Objektträger zur Reduktion der Glutaraldehyd-induzierten Autofluoreszenz für 15 Minuten in ein Bad aus 0,25%igem Natriumborhydrid überführt. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte dehydriert. Alle 8 Minuten kam es zu einem Wechsel des Alkoholbads, beginnend mit 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%. In 2-Propanol und Xylol wurden die Schnitte danach jeweils 10 Minuten aufbewahrt. Schließlich folgte das luftblasenfreie Eindecken mit Fluoromount (Serva, Deutschland).

2.5 Aufarbeitung der Präparate

2.5.1 Fixierung

Alle präparierten Gehirne wurden immersionsfixiert. Die Lösung bestand aus 4 % Paraformaldehyd (Serva, Deutschland) und 1,25 % Glutaraldehyd (Serva, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4. Dadurch wird das Gewebe gehärtet und Zellen behalten ihre Struktur und Form bei, indem einzelne Proteine und Aminosäuren vernetzt werden. Die Fixierung erfolgte über Nacht im Kühlschrank.

2.5.2 DAB-Nachweisreaktion

Bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid färbt 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Boehringer Ingelheim, Mannheim) Streptavidin- und Avidin-gekoppeltes HRP braun. Durch den Zusatz von Schwermetallen wird eine kontrastreichere Schwärzung erzielt (Adams et al. 1981). Das Wasserstoffperoxid entsteht langsam während der Reaktion von Glucose und Glucoseoxidase (Shu et al. 1988). Dies ermöglicht einen rechtzeitigen Abbruch der Färbung, wenn die Schnitte genügend geschwärzt erscheinen. Die Inkubationszeiten betragen zwischen 10 Minuten und 30 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für 10 Minuten in PB gespült, um die Reaktion zu stoppen und um DAB-Überschüsse zu entfernen. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte dehydriert. Alle 8 Minuten kam es zu einem Wechsel des Alkoholbads, beginnend mit 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%. In 2-Propanol und Xylol wurden die Schnitte danach

jeweils 10 Minuten aufbewahrt. Schließlich folgte das luftblasenfreie Eindecken mit Corbit.

2.6 Auswertung

2.6.1 Mikroskopische Aufnahmen

Unter einem Aufrecht-Fluoreszenz-Mikroskop (BX61, Olympus, Deutschland) wurden alle behandelten Schnitte bei 100 – 400 facher Vergrößerung visualisiert. Ausgewählte Schnitte wurden daraufhin mit Hilfe einer Digitalkamera (DP71, Olympus, Deutschland) abfotografiert, wobei ein motorisiertes Steuerelement plus Handschalter (BX-UCB) ein vereinfachtes Umschalten zwischen Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie ermöglichten. Für die Fluoreszenzfarbstoffe Dextranamin-Tetramethylrhodamin und Dextranamin-Alexa Fluor 488 wurden die Filter U-MNIBA (BP-Filter 510-550 nm) und U-MWG (LP-Filter 590 nm, Olympus, Deutschland) benutzt. Für die Analyse wurden mit dem Programm cell*f (Version 2.4; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Deutschland) Stapelaufnahmen mit einer „step-size“ von 1,5 µm angefertigt. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 4080x3072 Pixel erfasst, so dass insgesamt 11 Bilder entstanden. Mit Hilfe der Software Helicon Focus (Version 5.3; Helicon Soft Ltd., Kharkov, Ukraine) wurden die jeweiligen Bildserien zu einem Bild zusammengebaut, so dass die unterschiedlichen Schärfentiefen kombiniert wurden und ein scharfes und kontrastreiches Bild entstand. Die einzelnen Bilder wurden mit Adobe Photoshop (Photoshop CS4; Adobe System, USA) zusammengefügt und je nach Qualität der Färbungen konnte noch zusätzlich der Kontrast und die Helligkeit angepasst werden. Die Größe der Applikationsstelle wurde mit einem Objektmikrometer (0,01 mm, Wild Heerbrugg) ausgemessen.

2.6.2 Nomenklatur

Die Nomenklatur der dargestellten Fotos und der schematischen Übersichtszeichnungen beziehen sich bezüglich des Telencephalon hauptsächlich auf Northcutt & Kicliter (1980) und Endepols (2004a), des Diencephalon auf Neary & Northcutt (1983), des Torus semicircularis auf Potter (1965a) und für alle weiteren Gehirnabschnitte auf Ten Donklelaar (1988a).

2.6.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Mittels der *c-fos* Immunhistochemie sollte die Verteilung und Häufigkeit markierter Somata im Gesamthirn akustisch stimulierter Männchen bewertet werden. Um einen Überblick der aktivierten Kerngebiete zu erhalten, wurden die Schnittserien unter einem Mikroskop analysiert. Mit Hilfe des Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) konnte die Ausdehnung und Lage der Kerngebiete kontrastreich dargestellt werden ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Gegenfärbung.

Ausgewählte Schnitte wurden daraufhin abfotografiert und in das Programm Image J (Version 1.44p; entwickelt von Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) importiert. Da die Anzahl der Versuchstiere und der markierten Neurone relativ gering war, wurden die Zellkörper manuell ausgezählt. Mit dem Programm „Cell Counter“ wurde jedes markierte Neuron mit einer Zahl versehen und automatisch addiert. Die Anzahl markierter Neurone wurde dann in eine Schemazeichnung übertragen. Dafür wurden vergleichbare Nissl-Schnitte (Schnell-Nissl-Methode, Burck 1988) abfotografiert und mit dem Programm Corel Designer[®] X4 (Corel Corporation 2008) bearbeitet. Der Schnitt sowie die prominenten Kerngebiete wurden nachgezeichnet, so dass die Anzahl markierter Neurone übertragen werden konnten.

2.6.4 Tracing-Experimente

2.6.4.1 Neurobiotin-Tracing

Mittels der Tracing-Studien sollte die Konnektivität zwischen dem Nucleus praeopticus anterior und dem Nucleus praetrigeminalis ermittelt werden, sowie eventueller Zwischen- und/oder Relaisstationen. Folglich wurde die Verteilung von retrograd markierten Somata und anterograd markierten Fasern bewertet und dargestellt. Es wurden sowohl Sagittal- als auch Transversalschnitte angefertigt und analysiert.

Für die Darstellung ausgewählter Schnittserien wurden repräsentative Schemazeichnungen angefertigt, die alle wichtigen Bereiche, in denen markierte Strukturen beobachtet wurden, umfassen. Für die Darstellung der Sagittal- und

Transversalschnitte wurden die zuvor erstellten Fotografien ausgesuchter Schnittserien (siehe 2.6.1.) mit dem Programm Corel Designer[®] X4 (Corel Corporation 2008) weiter bearbeitet, wobei die jeweiligen Umrisse des gesamten Schnittes und der dazugehörigen Kerngebiete dargestellt wurden. Zur Bestimmung der einzelnen Kerngebiete dienten Nissl-Färbungen. Die angefärbten Strukturen wurden in die entsprechenden Gebiete eingezeichnet.

Zwei Biotin-Färbungen wurden zeichnerisch rekonstruiert. Alle Hirnschnitte, die markierte Strukturen aufwiesen, wurden mit Hilfe eines Zeichentubus auf Pauspapier nachgezeichnet, das wiederum auf einen Leuchtplatte befestigt war. Mittels eines Scanners (Konika Minolta; bizhub C220; Deutschland) wurden die Bilder als PDF umgewandelt und mit Adobe Photoshop CS4 entsprechend ihrer Reihenfolge zusammengefügt, so dass zweidimensionale Bilder entstanden. Die rekonstruierten Bilder wurden mit Corel Draw vektorisiert und in zuvor angefertigte Schemazeichnungen (s.o.) eingefügt.

2.6.4.2 Fluoreszenz-Tracing

Für die Darstellung der Fluoreszenzbilder wurden Übersichtsaufnahmen ausgewählter Tracings hergestellt (siehe 2.6.1). Die bearbeiteten Einzelbilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS4 zu einem Panoramabild zusammengesetzt. Hierbei war es wichtig, dass eine 25% Überlappung der jeweiligen Einzelbilder vorhanden war. Bestimmte Bildbereiche, wie z.B. der Applikationsort und markierte Strukturen, wurden daraufhin mit dem Programm Photoshop manuell vergrößert. Nach Bearbeitung der Bildqualität, mittels Tonwertkorrektur bzw. Kontrastanpassung, wurden die finalen Bilder mit dem Programm Corel Designer[®] X4 beschriftet und zusammengesetzt. Für die Doppelfärbungen wurden ausgewählte Einzelbilder mit unterschiedlichen Farbfiltern aufgenommen (siehe 2.6.1). Die Bilder sollten hauptsächlich Aufschluss über die Konnektivität zwischen der Area praeoptica und dem Nucleus praetrigeminalis geben. Um eine Überstrahlung beider Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, wurde zunächst der Kontrast minimiert. Anschließend wurden beide Farbebenen mit der Funktion „negativ multiplizieren“ verknüpft. Dies gewährleistet eine Erkennung beider

unterschiedlichen Farbstrukturen in einem Bild. Für eine bessere Bildqualität wurde eine Kontrastanpassung und Tonwertkorrektur durchgeführt, so dass im Anschluss bestimmte Bildbereiche manuell vergrößert werden konnten. Die Beschriftung und Darstellung der Doppelfluoreszenzbilder wurde ebenfalls mit dem Programm Corel Designer[®] X4 ausgeführt.

2.7 Verwendete Lösungen

2.7.1 Puffer

Phosphat-Puffer (PB): 0,1 M; 5,44 g KH_2PO_4 + 28,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 2 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$; pH 7,4.

2.7.2 Ringer

Frosch-Ringer:

Stammlösung A: 43,83 g NaCl + 21 g NaHCO_3 + 1,49 g KCl in 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Stammlösung B: 2,94 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Stammlösung C: 2,03 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

1. Schritt: 6,6 g Glucose in 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen
2. Schritt: 300 ml Stammlösung A in 700 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und zur Glucose-Lösung geben
3. Schritt: 30 ml Stammlösung B und 7,5 ml Stammlösung C zu 962,5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ geben, dies stellt den dritten Liter der Gesamtlösung dar
4. Schritt: die Gesamtlösung 30 Minuten über eine Glasfritte mit Carbogen begasen. Der Frosch-Ringer sollte einen pH-Wert von 7,4 – 7,5 haben

2.7.3 Medien

Agareinbettmedium (4 %): 2 g Agar-Agar in 50 ml Phosphatpuffer. Durch kurzes aufkochen wurde der Agar in Lösung gebracht

2.7.4 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Vectastain[®] ABC Kit: 3 ml Normal Serum + 1 ml biotinyliertes Goat anti-Rabbit Immunglobulin + 2 ml Avidin DH + 2 ml biotinylierte Meerrettich-Peroxidase

2.7.5 Sonstige Lösungen

Streptavidinlösung: 2 % biotinyliertes Streptavidin HRP + Phosphatpuffer +
0,5 % TritonX

DAB-Protokoll:

Lösung 1: 1,64 g Na-Acetat in 100 ml H₂O_{bidest} lösen
pH 6 mit 10%iger Essigsäure einstellen
darin 5 mg Ammonium-Nickel-Sulfat lösen.

80 mg Kobalt-Chlorid

80 mg Ammonium-Chlorid

3-5 mg Glucoseoxidase

400mg D(+) Glucose abwiegen,

» die ersten drei Substanzen zur Lösung dazugeben

Lösung 2: 100 mg DAB in 100ml H₂O_{bidest} lösen

1. Schritt: Lösung 1 und 2 zusammenschütten.

2. Schritt: Glucose zugeben, dann sofort die Objektträger hinein. Zuvor kurz
(1-2 Sekunden) in H₂O_{bidest} tauchen.

3. Schritt: Schnitte 15 - 30 Minuten inkubieren lassen.

4. Schritt: Objektträger in PB überführen und 3 x 10 min waschen.
Stoppt die Färbereaktion.

3. ERGEBNISSE

3.1 c-fos

3.1.1 Befunde zur Methode

Die Identifikationen von *c-fos* positiven Neuronen im Gehirn akustisch stimulierter Männchen der Gattung *Bombina orientalis* sollte Aufschluss über die Verknüpfung zwischen dem Hör- und Vokalisationssystem geben. Im Fokus stand dabei der Nucleus praeopticus anterior (vokaler Schrittmacher), dem eine wichtige Funktion bei der Initiierung von Paarungsrufen zugesprochen wird. Da sowohl seine Aktivitätskontrolle als auch seine Modulation durch Vorderhirnstrukturen weiterhin ungeklärt sind, sollten in rufbereiten Männchen verschiedene Antwortreaktionen evoziert werden, wie z.B. das Wechselrufen. Die unterschiedlichen *c-fos* Expressionsmuster sollten anschließend Auskünfte über die aktivierten neuronalen Korrelate im Gesamthirn geben und im Speziellen aufzeigen, ob der Nucleus praeopticus anterior bei allen evozierten Antwortreaktionen aktiv war.

Die markierten Neuronen der erfolgreich getesteten Versuchstiere waren in der Regel lichtmikroskopisch gut zu erkennen und zeigten eine leicht graue bis tiefschwarze Färbung (Abb. 4A/B). Es wurde sowohl das Zytoplasma als auch der Zellkern angefärbt. Bei zwei akustisch stimulierten Tieren wurden zusätzlich auch Fasern in der Medulla oblongata detektiert (Abb. 4C). Die Farbintensität der Zellen fluktuierte innerhalb der und zwischen den Schnittserien. Das lässt sich zum einen auf die Halbwertszeit des Fos-Proteins und zum anderen auf die Aufarbeitung der Gehirne zurückführen, beispielsweise auf die Beschaffenheit des Gewebes bei Gefrierschnitten oder durch ungleichmäßig dicke Hirnschnitte am Kryostat.

Beide Hirnhälften zeigten eine ähnliche Verteilung und Häufigkeit von markierten Neuronen innerhalb der Kernareale. Für die Vergleichbarkeit in der schematischen Darstellung wurden hauptsächlich die Werte der rechten Hirnhälfte verwendet, war die rechte Hirnhälfte defekt, wurden die Werte der linken Seite benutzt.

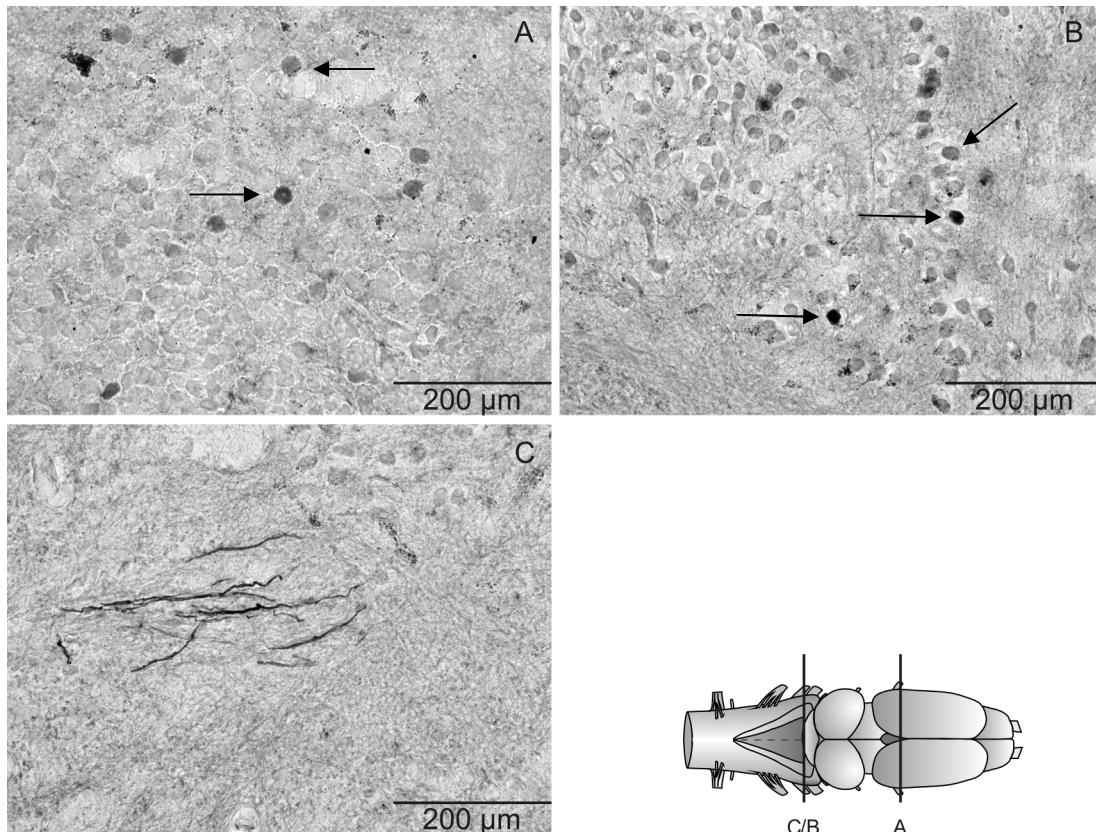


Abbildung 4: Mikrofotografien von immunreaktiven *c-fos* Neuronen und Fasern

Bild **A** und **B** zeigen markierte Neurone im Nucleus praeopticus anterior und im Nucleus raphé. Bild **C** repräsentiert angefärbte Fasern. Die Pfeile in Bild **A** und **B** weisen auf stark und schwach markierte Zellen hin. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

3.1.2 Durchgeführte Experimente

Insgesamt wurden in dieser Arbeit fünf erfolgreiche *c-fos* Experimente durchgeführt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der verwendeten Versuchstiere und deren Kategorisierung. Bedingung S2 erfüllen zwei Versuchstiere, die identisch behandelt und aus diesem Grund zusammengefasst wurden. Die markierten Neurone wurden zur besseren Übersicht mit unterschiedlichen Farbpunkten (schwarz/rot) dargestellt. Dadurch, dass der hormonelle Status eines Männchens einen Einfluss auf das akustisch gesteuerte Rufverhalten hat, wurden mit Ausnahme des hormonbehandelten Tieres (Bedingung S2+H) alle Experimente während der Paarungszeit durchgeführt. Das Versuchstier der Bedingung S2+H wurde vor Versuchsbeginn mit humanem Choriongonadotropin behandelt, so dass ähnliche Bedingungen bezüglich des endogenen Hormonspiegels vorlagen und das

Männchen ebenso in Rufbereitschaft war. Von den fünf Behandlungsgruppen führten ausschließlich die beiden Versuchstiere der Bedingung S2 Paarungsrufe aus.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Versuchstiere und deren Kategorisierung

Versuchstiere	Akustische Stimulation	Geschlecht	Versuchsbedingungen
Kontrolltier	-	♂	Bedingung K
Stimuliertes Tier	650 Hz	♂	Bedingung S1
Stimuliertes Tier	750 Hz	♂	Bedingung S2
Stimuliertes Tier	750 Hz	♂	Bedingung S2
Stimuliertes Tier + Hormonapplik.	750 Hz	♂	Bedingung S2+H

3.1.3 Lokalisation von *c-fos*-positiven Zellen im Gesamthirn

Telencephalon:

Im Bulbus olfactorius (Abb. 5A/B) wurde die höchste Anzahl an *c-fos*-bildenden Neuronen nachgewiesen. Die Granulärzellschicht (Gr) enthielt in rostrocaudaler Ausbreitung die höchste Zelldichte. Die Mitralzellschicht (Mi) und die Glomeruli (Gl) wiesen hingegen nur wenige oder keine gefärbten Zellen auf. Verglich man die Anzahl und Verteilung gefärbter Neurone zwischen den Versuchsbedingungen, so fiel auf, dass akustisch stimulierte Tiere viel mehr gefärbte Neurone aufwiesen als das Kontrolltier. Der Vergleich von beiden identisch behandelten Versuchstieren (Bedingung S2) zeigte eine heterogene Streuung und eine unterschiedliche Anzahl markierter Neurone. Das hormonbehandelte Tier (Bedingung S2+H) ähnelte mit seiner Anzahl und Verteilung gefärbter Neurone dem Kontrolltier. Da bei allen Versuchsbedingungen keine markierten Zellkörper im accessorischen olfaktorischen Bulbus (aob) beobachtet wurden, kann angenommen werden, dass das vomeronasale System nicht aktiviert war, sondern vielmehr nur das olfaktorische System. Über den medialen und lateralen olfaktorischen Trakt werden Kerngebiete im Telencephalon innerviert, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Die Verteilung und Häufigkeit von *c-fos* positiven Neuronen im caudalen Telencephalon wurde in Abb. 6A-C dargestellt. Die Gehirne akustisch stimulierter Männchen enthielten auch hier viel mehr markierte Neurone als das des Kontrolltieres. Das hormonbehandelte Tier (Bedingung S2+H) wies hingegen nur vereinzelt gefärbte Somata auf.

Bei den vier Versuchsbedingungen wurden markierte Neurone in allen dorsalen Arealen, im lateralen, dorsalen und medialen Pallium, detektiert. Die Zelldichte nahm insgesamt in rostrocaudaler Ausdehnung zu, wobei die Anzahl angefarbter Somata im Pallium mediale (PM) am höchsten war. Die gefärbten Zellkörper lagen größtenteils ventrikelnah. Die einzige Ausnahme war ein Versuchstier der Bedingung S2 (Abb. 6A; schwarze Punkte), bei dem die gefärbten Somata im gesamten Kerngebiet detektiert wurden.

Unterhalb des Pallium laterale (PL) liegt die „striato-pallidal transition area“ (SPTA), die von Moreno & González (2004) auch als Amygdala, pars lateralis bezeichnet wird. In diesem Areal konnten in rostrocaudaler Ausdehnung bei allen Versuchsbedingungen angefarbte Zellkörper nachgewiesen werden. Nach Roth et al. (2007) befindet sich die Amygdala, pars lateralis (LA) im caudalen Telencephalon (Abb. 6C). Auch in diesem Areal konnten in allen Versuchsbedingungen gefärbte Zellen identifiziert werden. Die Amygdala, pars lateralis wird auch als sekundäres olfaktorisches Zentrum betrachtet (Scalia et al. 1991). Die Amygdala, pars medialis (MA), die Eingänge aus dem vomeronasalen System erhält, wies dagegen nur vereinzelt oder keine markierten Zellkörper auf (Bedingung 1). Eine weitere Struktur ist der Bed Nucleus der pallialen Kommissur (BN; Abb. 6C). Mit Ausnahme von einem stimulierten Tier der Bedingung S2 (schwarze Punkte), wiesen alle anderen Tiere markierte Neurone auf. Dieses Areal ist unter anderem mit dem Pallium mediale reziprok verbunden (Northcutt & Ronan 1992). Ein weiterer Unterschied zwischen dem Kontrolltier und den stimulierten Tieren war das Auftreten Fos-positiver Neurone im Striatum und in den Subnuclei des Septum (Abb. 6B/C). Bei den stimulierten Tieren wurden im Striatum ausschließlich markierte Somata beobachtet, die hauptsächlich im rostralen Striatum lagen. Von den Subnuclei des Septum wurden angefarbte Somata hauptsächlich im dorsolateralen (Sld) und im dorsoventralen (Slv) Septum detektiert. Beide Tiere der Bedingung S2 enthielten

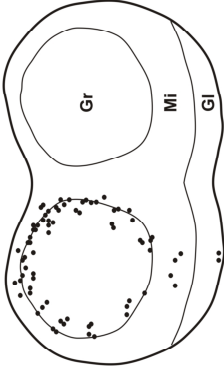
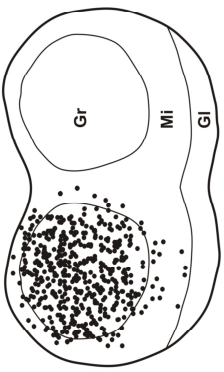
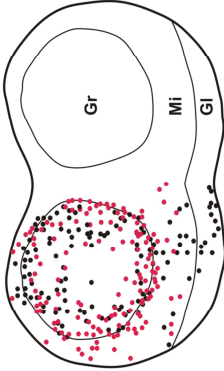
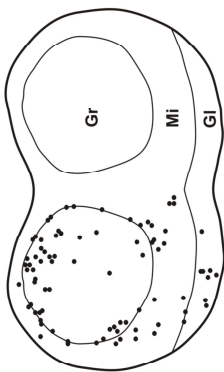
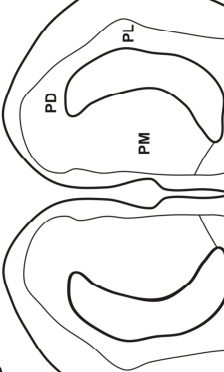
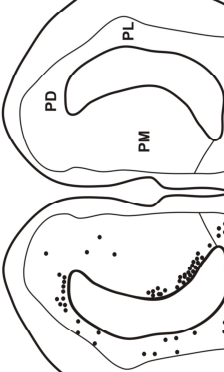
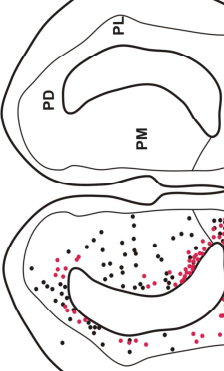
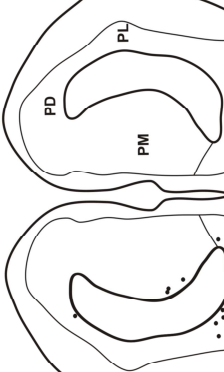
zudem gefärbte Neurone im Septum dorsale (Sd) und centrale (Sc). Das Septum mediale (Sm) enthielt sehr wenige angefärbte Zellkörper, allerdings konnten die vereinzelt Neurone in allen stimulierten Tieren nachgewiesen werden. Das Kontrolltier wies nur ein markiertes Neuron im Septum dorsale (Sd) auf. Der Nucleus praeopticus anterior (POa), der für die Rufinitiierung von Paarungsrufen zuständig ist (Schmidt 1984), wies nur bei den identisch behandelten Tieren der Bedingung S2 gefärbte Neurone auf, die im dorsalen Anteil lokalisiert waren (Abb. 6C). Alle anderen waren gänzlich frei von markierten Somata. Das Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den akustischen Stimulationsversuchen, denn lediglich die beiden Versuchstiere der Bedingung 2 haben auf die Stimulierung mit Paarungsrufen geantwortet. Die anderen stimulierten Tiere enthielten jedoch markierte Neurone im Nucleus praeopticus posterior (POp) und im Nucleus suprachiasmaticus (SC; siehe Abb. 7A), die ebenfalls zur Area praeoptica gehören (siehe 3.1.4).

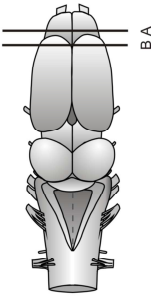
Abbildung 5: c-fos-Verteilung im olfaktorischen Bulbus von *Bombina orientalis*

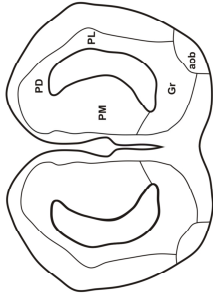
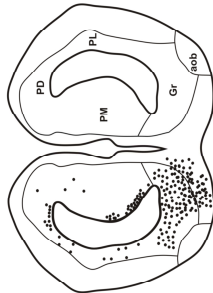
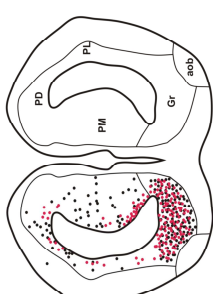
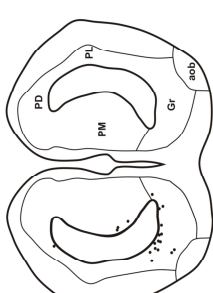
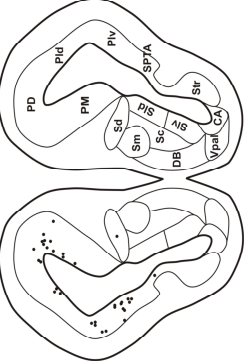
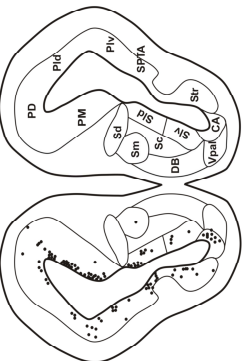
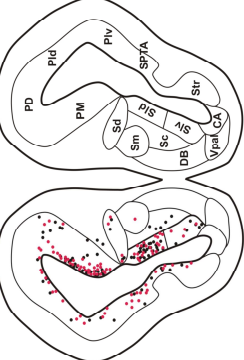
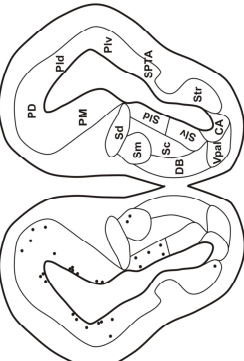
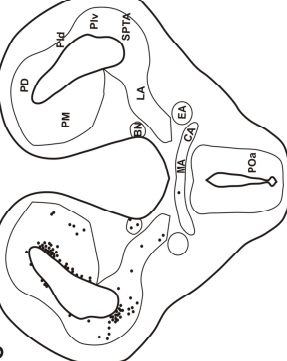
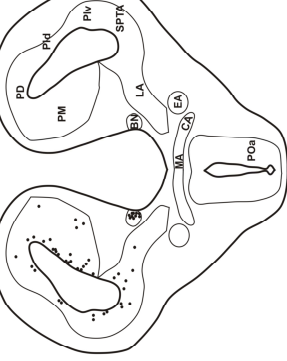
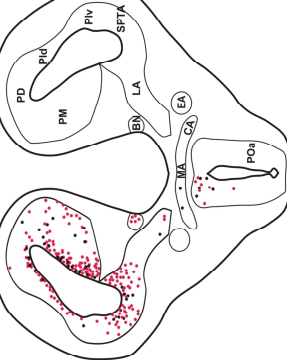
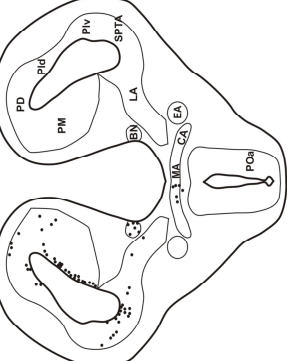
Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn. Die Schnittebene ist in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

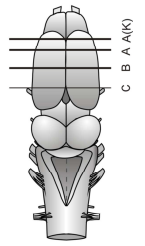
Abbildung 6: c-fos Verteilung im übrigen Telencephalon von *Bombina orientalis*

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

Bedingung K/ keine Vokalisation	Bedingung S1/ keine Vokalisation	Bedingung S2/ Vokalisation	Bedingung S2+H/ keine Vokalisation
<p>A</p> 			
<p>B</p> 			



Bedingung K/ keine Vokalisation	Bedingung S1/ keine Vokalisation	Bedingung S2/ Vokalisation	Bedingung S2+H/ keine Vokalisation
<p>A</p> 			
<p>B</p> 			
<p>C</p> 			



Diencephalon:

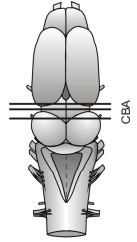
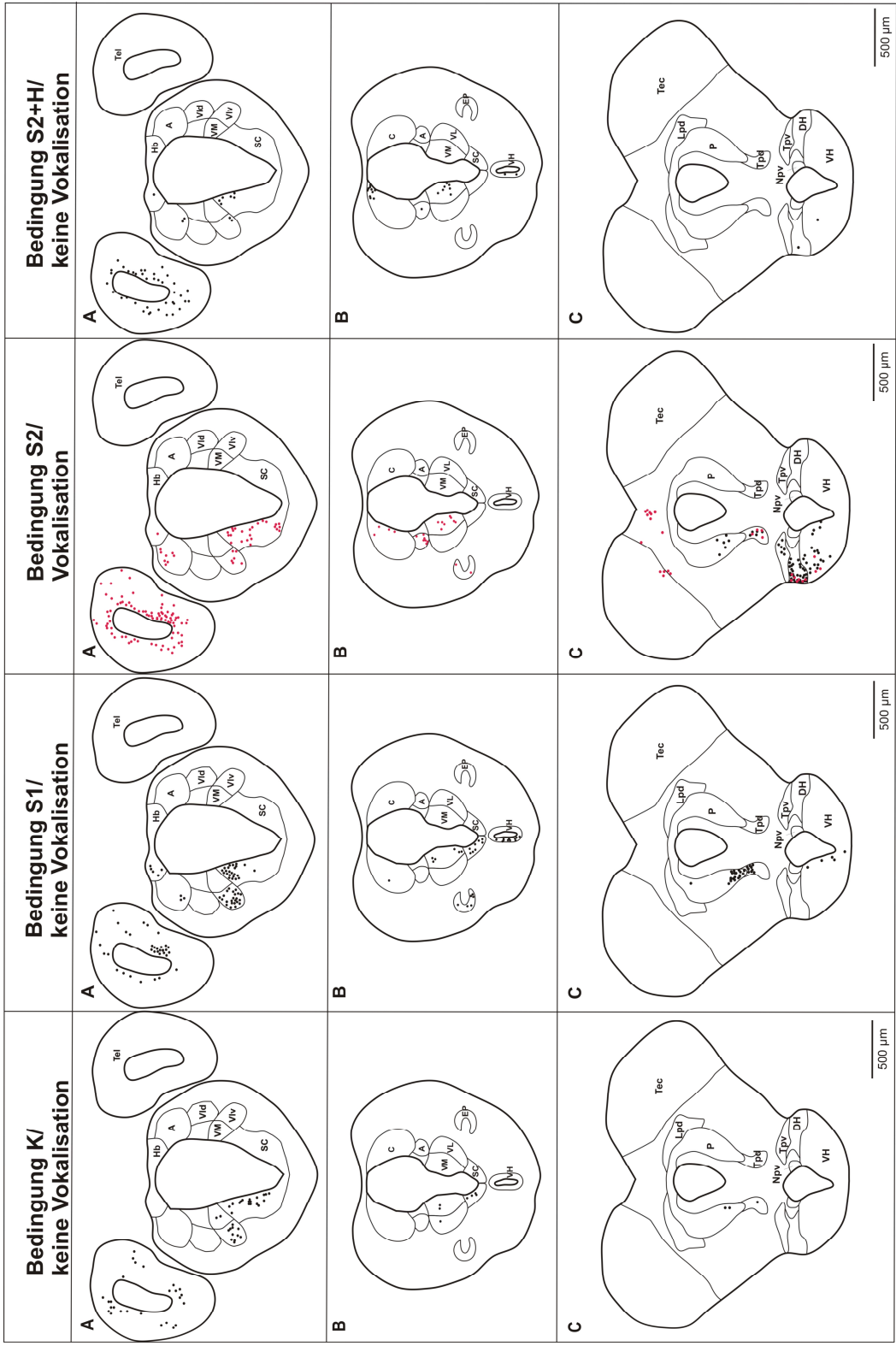
Abbildung 7 repräsentiert das *c-fos*-Expressionsmuster im Diencephalon. Auch hier konnten viel mehr gefärbte Neurone in den stimulierten Versuchstieren nachgewiesen werden als im Kontrolltier. Eine Gemeinsamkeit der vier Versuchsbedingungen war unter anderem die Lokalisation markierter Zellkörper im rostralen Nucleus suprachiasmaticus (SC). Diese wurden hauptsächlich im dorsalen Anteil identifiziert (Abb. 7A), der in Kombination mit dem Nucleus entopeduncularis posterior (EP) und den ventralen Anteilen des Thalamus (VM/VL) als homologe Struktur des Nucleus subthalamicus betrachtet wird und ein Teil des indirekten Weges der Basalganglien ist (Maier et al. 2010). Im caudalen Anteil konnten nur in Bedingung K und S1 markierte Zellkörper identifiziert werden, wobei die Anzahl markierter Neurone in Bedingung S1 höher war. Weiterhin erhält der Nucleus suprachiasmaticus auditorische Eingänge von aufsteigenden Fasern des Nucleus laminaris (TI), einem Subnucleus des Torus semicircularis (Endepols & Walkowiak 2001), der in Bedingung S1 die meisten markierten Zellkörper aufwies (Abb. 8A). Im Nucleus entopeduncularis posterior (EP; Abb. 8B) wurden ausschließlich markierte Somata in den Bedingungen S1 und S2 identifiziert. Die thalamischen Subnuclei enthielten größtenteils markierte Somata.

Bei allen Versuchstieren konnten gefärbte Zellkörper auch in den ventralen Anteilen (VM/VL) beobachtet werden. Die stimulierten Tiere enthielten zusätzlich gefärbte Somata sowohl im Nucleus anterior thalami (A) und im Nucleus centralis thalami (C), die ebenfalls aufsteigende Eingänge aus dem Torus semicircularis erhalten, als auch teilweise im Nucleus posterior thalami (P). In den posterioren Subnuclei wurden die markierten Neurone hauptsächlich im ventralen Abschnitt bzw. im Übergang zum Tuberculum posterior, pars dorsalis (Tpd, Abb. 7C) lokalisiert. Bis auf das hormonbehandelte Tier wiesen alle anderen Versuchstiere auch im Tuberculum gefärbte Zellkörper auf, wobei die Anzahl markierter Neurone in den stimulierten Tieren viel größer war. Das Tuberculum, das in Anuren als homologe Struktur der Substantia nigra, pars compacta betrachtet wird, moduliert mit seinen dopaminergen Efferenzen das Striatum und gehört zu den Basalganglien (Marin et al. 1997a,b). Auch die Nuclei habenulares (Hb; Abb. 7A) wiesen bei den stimulierten Tieren einige markierte Somata auf. Bei der Modulation des vokalen Mustergenerators ist davon

auszugehen, dass der Hypothalamus, speziell der dorsale Anteil eine Rolle spielt, (DH; Abb. 7C), da von dort aus afferente Verbindungen zum Nucleus praetrigeminalis nachgewiesen wurden (Brahic & Kelley 2003). Vergleicht man das Kontrolltier mit den stimulierten Tieren, so fällt auf, dass hauptsächlich die beiden identisch behandelten Tiere der Bedingung S2 und das hormonbehandelte Tier (Bedingung S2+H) markierte Neurone im dorsalen Infundibulum aufweisen. Im Nucleus hypothalamicus ventralis (VH) konnte man aber bei allen stimulierten Versuchstieren markierte Neurone beobachten, jedoch mit sehr unterschiedlicher Verteilung. Bei Bedingung S1 lagen die Neurone direkt am Ventrikel, während bei Bedingung S2 eine Zellgruppe am Ventrikel und eine andere dorsolateral im Kerngebiet lokalisiert werden konnte. Das hormonbehandelte Tier wies nur einen markierten Zellkörper auf, während das Kontrolltier dagegen gänzlich frei von *c-fos*-positiven Somata im gesamten Hypothalamus war.

Abbildung 7: *c-fos* Verteilung im Diencephalon von *Bombina orientalis*

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.



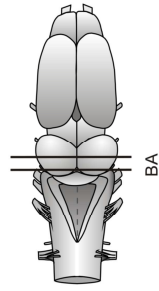
Mesencephalon:

Abbildung 8 repräsentiert das *c-fos*-Expressionsmuster im Mesencephalon, speziell in den Subnuclei des Torus semicircularis und des Tegmentum. Im Kontrolltier konnten nur im rostralen Anteil des Nucleus principalis (Tp) und im caudalen Anteil des Nucleus laminaris (Tl) markierte Neurone identifiziert werden, wobei Alle anderen Kerngebiete keine angefärbten Zellkörper enthielten. Bedingung S1 und S2 enthielten hingegen eindeutig mehr gefärbte Somata, obgleich die Verteilung unterschiedlich war. Bedingung S1 enthielt eine erhöhte Anzahl angefärbter Somata im Nucleus laminaris (Tl) und eine größere Anzahl markierter Neurone im rostroventralen Nucleus principalis (Tp), im Übergang zum anterioren Tegmentum, pars dorsalis (Ad). Bedingung S2 dagegen wies vereinzelte Neurone in rostrocaudaler Ausbreitung im Nucleus laminaris (Tl) und mehrere gefärbte Zellkörper im Nucleus principalis (Tp) auf. Der Unterschied innerhalb der Bedingung S2 lag darin, dass bei einem Tier gefärbte Zellkörper im Nucleus magnocellularis (Tm; rote Punkte) identifiziert wurden und bei dem anderen Tier im Nucleus laminaris (Tl; schwarze Punkte). Insgesamt gab es eine auffällig gute Übereinstimmung der markierten Hirnareale. Im Tegmentum konnte bei Bedingung S1 und S2 markierte Somata im anterodorsalen Subnucleus, pars dorsalis (Ad) identifiziert werden. Dieses Areal wird als homologe Struktur der Substantia nigra, pars reticulata beschrieben, da dieser Abschnitt glutamaterge Neurone und Eingänge aus dem Striatum erhält (Maier et al. 2010). Beide Gruppen wiesen auch im caudalen posterodorsalen (Pd) und posteroventralen Tegmentum (Pv) vereinzelt markierte Neurone auf. Bedingung S2 enthielt zudem im rostralen posteroventralen Tegmentum (Pv) gefärbte Zellkörper, die hauptsächlich ventral auftraten. Das Tectum und der Nucleus interpeduncularis (Ip; Abb. 8B) waren bei allen Versuchsgruppen frei von gefärbten Zellkörpern.

Abbildung 8: *c-fos* Verteilung im Mesencephalon von *Bombina orientalis*

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

<p>Bedingung K/ keine Vokalisation</p>	<p>Bedingung S1/ keine Vokalisation</p>	<p>Bedingung S2/ Vokalisation</p>	<p>Bedingung S2+H/ keine Vokalisation</p>
<p>A</p>			
<p>B</p>			



BA

Metencephalon:

Im Metencephalon (Abb. 9) sieht die Verteilung und Anzahl markierter Somata von Bedingung K, S1 und S2 ähnlich aus. Gefärbte Neurone wurden im caudalen Nucleus secundarius isthmi (Si), im Locus coeruleus (Lc) und im Nucleus praetrigeminalis (Prtr) identifiziert. Die Aktivierung von *c-fos* positiven Neuronen im Nucleus praetrigeminalis, dem Areal, das als Mustergenerator für Paarungs- und Befreiungsrufe gilt (Schmidt 1973,1974,1981), könnte als Hinweis auf eine Antwortreaktion der stimulierten Versuchstiere gedeutet werden, da speziell bei Bedingung S2 bei beiden Versuchstieren markierte Neurone im Nucleus praeopticus anterior (POa; Abb. 6C) beobachtet wurden. Das hormonbehandelte Tier (Bedingung S2+H) war gänzlich frei von markierten Neuronen.

Medulla oblongata:

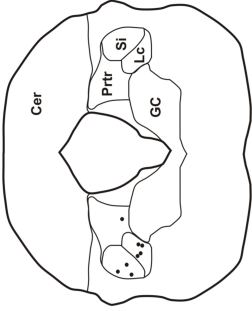
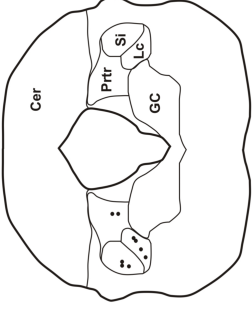
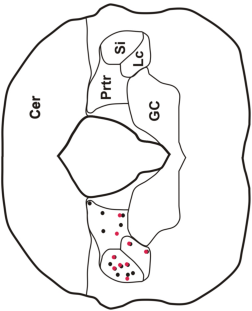
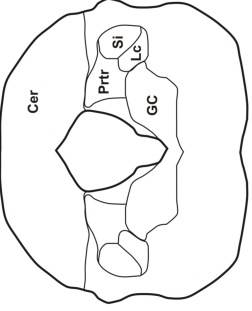
Bedingung S2 enthielt als einzige Versuchsgruppe mehrere markierte Somata innerhalb der Medulla oblongata. Im rostralen Bereich wurden gefärbte Zellen in der Formatio reticularis (Fr) und im Nucleus raphé (Ra; Abb. 10A) detektiert und im caudalen Anteil konnten hingegen zwei gefärbte Zellkörper in der Oliva superior (SO; Abb. 10B) nachgewiesen werden. Der Nucleus raphé (Ra) besitzt serotonerge Zellkörper und moduliert unter anderem den Torus semicircularis, das ventrale Tegmentum und das Septum centrale und dorsale (Endepols et al. 2000; Roden et al. 2005). Von den hier dargestellten Versuchsgruppen wies einzig Bedingung S2 in allen drei Hirnarealen markierte Zellkörper auf. Die gefärbten Zellkörper in der Oliva superior (SO) weisen auf eine Aktivität der Hörbahn hin.

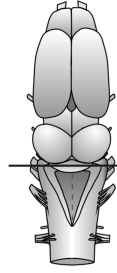
Abbildung 9: *c-fos* Verteilung im Metencephalon von *Bombina orientalis*

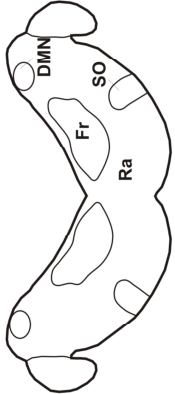
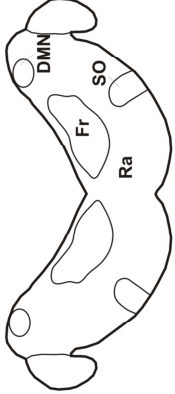

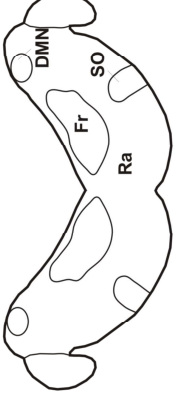



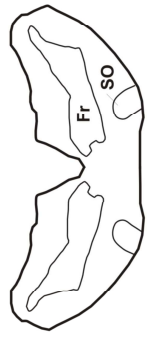
Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der vertikale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts

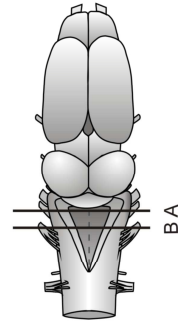
Abbildung 10: *c-fos* Verteilung in der Medulla oblongata von *Bombina orientalis*

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

<p>Bedingung K/ keine Vokalisation</p>	<p>Bedingung S1/ keine Vokalisation</p>	<p>Bedingung S2/ Vokalisation</p>	<p>Bedingung S2+H/ keine Vokalisation</p>
			



Bedingung K/ keine Vokalisation	Bedingung S1/ keine Vokalisation	Bedingung S2/ Vokalisation	Bedingung S2+H/ keine Vokalisation
<p>A</p> 			
<p>B</p> 			



3.1.4 Vergleich der *c-fos*-positiven Neurone in den Subnuclei der Area praeoptica

Abbildung 11 - 13 präsentieren markierte Zellen in den prominenten Subnuclei der Area praeoptica: Nucleus praeopticus anterior, Nucleus praeopticus posterior und Nucleus suprachiasmaticus. Die Gegenüberstellung der Subnuclei dient der Aufklärung, welche Untereinheit(en) der Area praeoptica in Paarungsruf auslösenden Situationen aktiv sind.

Abbildung 11 stellt den Vergleich von *c-fos* positiven Neuronen im Nucleus praeopticus anterior der fünf Versuchstiere dar. In Bedingung K (Abb. 11A) wurden keine angefärbten Neurone beobachtet. Auch Bedingung S1 und S2+H wiesen keine markierten Zellkörper auf (Abb. 11B/E). Nur bei den beiden Versuchstieren der Bedingung S2 (Abb. 11C/D) konnten angefärbte Neurone im dorsalen Anteil des Nucleus praeopticus anterior detektiert werden.

Im caudalen Anteil der Area praeoptica veränderte sich die Verteilung markierter Neurone. Abbildung 12 stellt die Distribution von *c-fos* positiven Zellen im Nucleus praeopticus posterior dar. Das Kontrolltier enthielt keine markierten Somata (Abb. 12A). In allen stimulierten Versuchstieren konnten jedoch markierte Zellen identifiziert werden, wobei sich die Häufigkeit der gefärbten Zellkörper unterschied. Versuchstiere 2 und 5 enthielten nur ein bis zwei markierte Neurone, die im Kerngebiet dorsal positioniert waren (Abb. 12B/E). Versuchstiere 3 und 4 wiesen im gesamten Areal einige gefärbte Neurone auf (Abb. 12C/D).

Abbildung 13 zeigt die Verteilung im Nucleus suprachiasmaticus. Hier fehlt der Schnitt von Versuchstier 3, der bei der Aufarbeitung des Gehirns verloren gegangen ist. Sowohl das Kontrolltier als auch die Versuchstiere 2 und 4 enthielten im dorsalen Part des Kerngebiets einige markierte Somata (Abb. 13A-C). Der ventrale Anteil enthielt bei den Versuchstieren 2 und 4 wenige angefärbte Zellkörper. Im Versuchstier 5 konnten keine markierten Zellkörper detektiert werden (Abb. 13D).

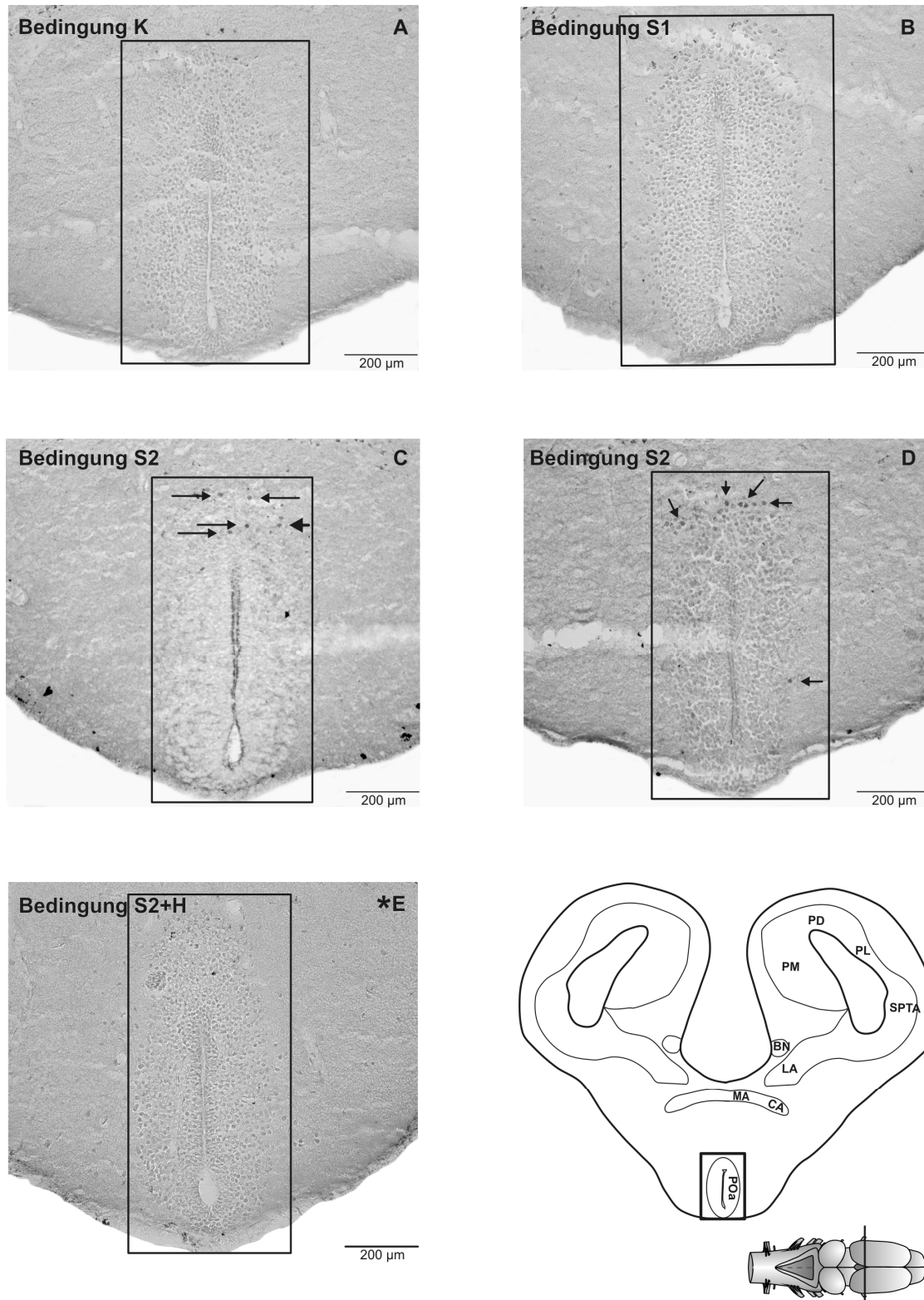


Abbildung 11: Überblick über *c-fos* positive Zellen im Gehirn von *Bombina orientalis*

Abb. 11A-E geben einen Überblick der markierten Neuronen im Nucleus praeopticus anterior. Schwarze Rechtecke grenzen die betreffende Region ein, wobei die schwarzen Pfeile auf angefärbte Somata hinweisen. Das hormonstimulierte Tier ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die Dicke der Querschnitte betrug 30 μm . Die Lage der Querschnitte ist in der Ganzhirndarstellung zu erkennen. Der vertikale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

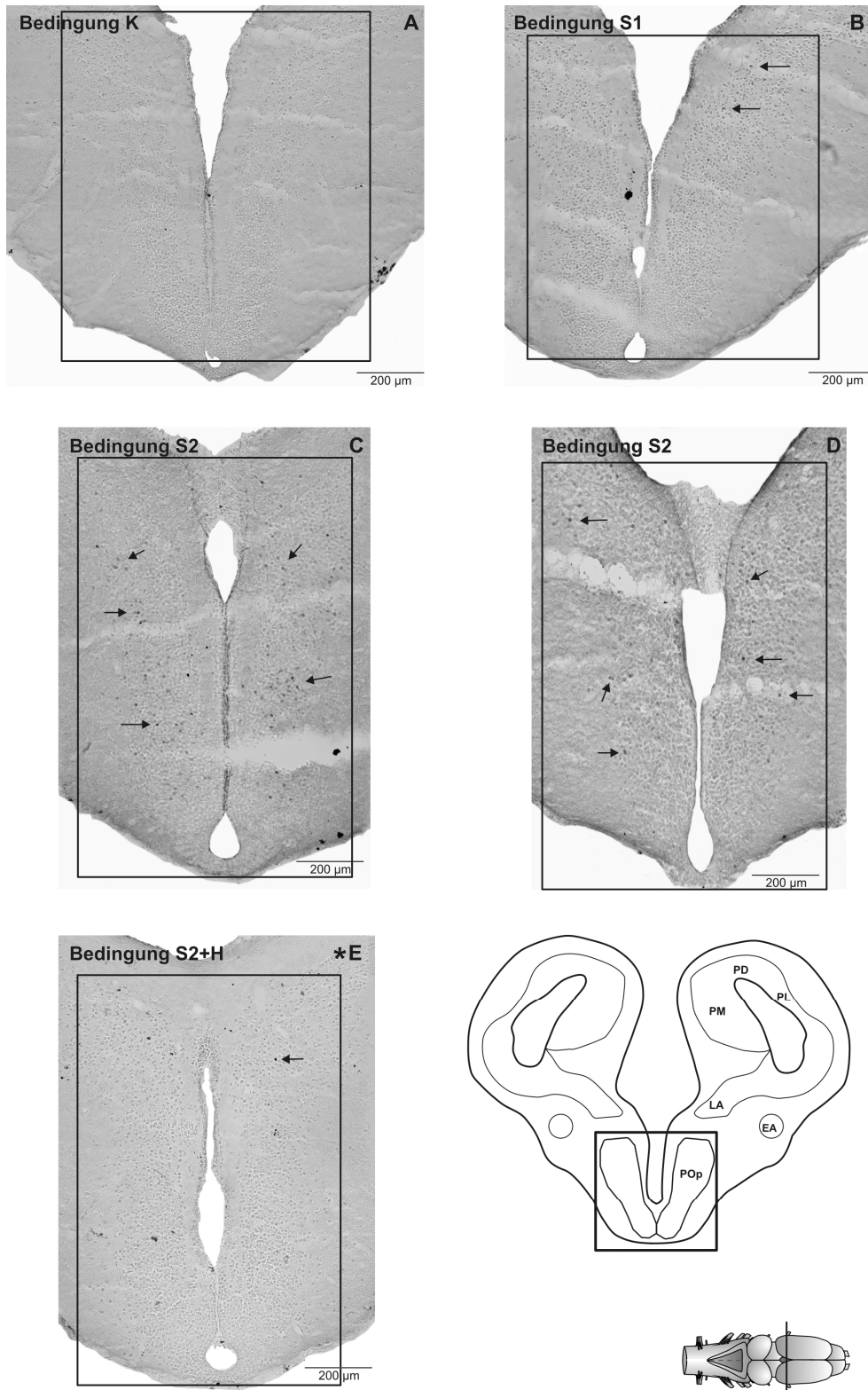


Abbildung 12: Überblick über *c-fos* positive Zellen im Gehirn von *Bombina orientalis*

Abb. 12A-E geben einen Überblick der markierten Neuronen im Nucleus praeopticus posterior. Schwarze Rechtecke grenzen die betreffende Region ein, wobei die schwarzen Pfeile auf angefärbte Somata hinweisen. Das hormonstimulierte Tier ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die Dicke der Querschnitte betrug 30 µm. Die Lage der Querschnitte ist in der Ganzhirndarstellung zu erkennen. Der vertikale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

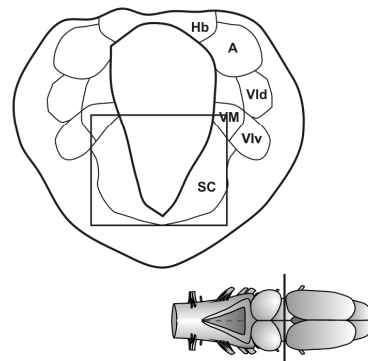
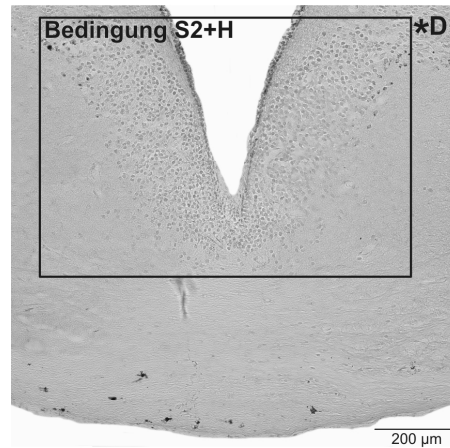
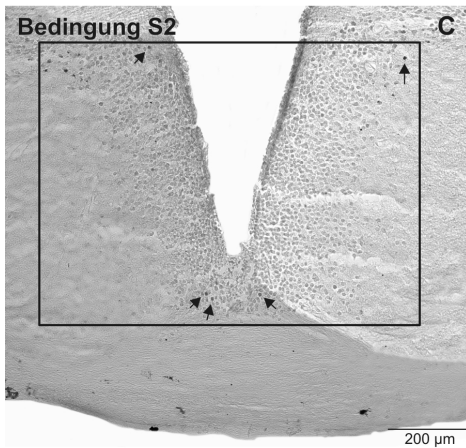
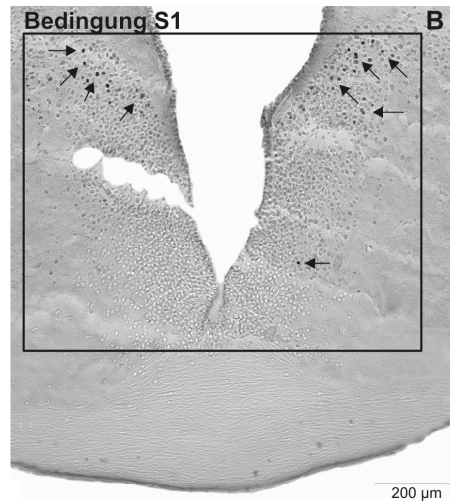
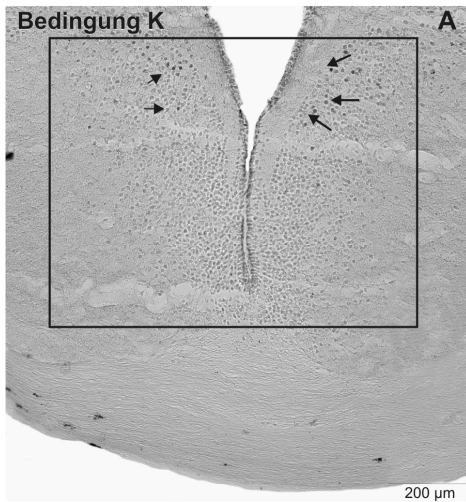


Abbildung 13: Überblick über *c-fos* positive Zellen im Gehirn von *Bombina orientalis*

Abb. 13A-D geben einen Überblick der markierten Neuronen im Nucleus suprachiasmaticus. Schwarze Rechtecke grenzen die betreffende Region ein, wobei die schwarzen Pfeile auf angefärbte Somata hinweisen. Das hormonstimulierte Tier ist mit einem Stern gekennzeichnet Die Dicke der Querschnitte betrug 30 µm. Die Lage der Querschnitte ist in der Ganzhirndarstellung zu erkennen. Der vertikale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

3.2 Afferenzen /Efferenzen des Nucleus praetrigeminalis

3.2.1 Befunde zur Methode

Um Aufschluss über die neuronale Organisation sowie die Verschaltung der Kerngebiete des Nucleus praeopticus anterior (vokaler Schrittmacher) und des Nucleus praetrigeminalis (vokaler Mustergenerator) zubekommen, wurde mittels hodologischer Versuche untersucht, ob der Nucleus praetrigeminalis auf direktem oder indirektem Weg moduliert wird. Die Tracings wurden an der pädomorphen Art *Bombina orientalis* vorgenommen, da bezüglich der Konnektivität dieser Areale sich widersprüchliche Daten existieren, die aber zur Gänze von der aquatischen Art *Xenopus laevis* stammen (Wetzel et al. 1985; Brahic & Kelley 2003). Aus diesem Grund wurde der Marker Neurobiotin iontophoretisch in den Nucleus praetrigeminalis injiziert. Einige Färbungen zeigten eine starke Verbindung zwischen dem Nucleus praetrigeminalis und dem Tegmentum, so dass zuvor durchgeführte Tracing-Experimente mit tegmental Injektionsstellen neu reevaluiert wurden. Berücksichtigt wurden Färbungen, die sowohl Somata als auch Fasern im Nucleus praetrigeminalis und im Nucleus praeopticus anterior aufwiesen (siehe Tabelle 6).

Die Kombination aus optimalem Widerstand der Elektrode und richtiger Stromeinprägung hatte einen großen Einfluss auf die Qualität der Tracings. Bei einer guten Aufnahme des Tracers konnte sowohl ein retrograder als auch ein anterograde Transport beobachtet werden. Dabei waren axonale Strukturen, Terminalien, Dendriten und Somata lichtmikroskopisch gut zu erkennen und zeigten eine graue bis tiefschwarze Färbung. In vielen Fällen konnten auch Varikositäten und Spines lokalisiert werden. Bei kleineren Applikationsgebieten war die Konzentration des applizierten Tracers so gering, dass eher ein lokaler Transport stattgefunden hat. Weiterhin wurde auch eine Anfärbung von „Fibers of Passages“ beobachtet, die sich durch Schädigung von Fasersystemen, die durch den Bereich des Applikationsortes zogen, entstanden sind.

Eine ergänzende Methode zur Untersuchung der neuronalen Organisation sowie der Verschaltung des vokalen Schrittmachers und des vokalen Mustergenerators war die Verwendung von Dextranamin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen. Hierfür wurden

Alexa Fluor 488 und/oder Tetramethylrhodamin verwendet. Beide Substanzen wurden sowohl anterograd als auch retrograd transportiert und führten zu einer Anfärbung von Somata und Fasern.

3.2.2 Durchgeführte Experimente

Insgesamt wiesen 21 männliche Versuchstiere markierte Fasern und Somata auf. Tabellen 2-4 geben eine Übersicht über die durchgeführten Applikationen im Bereich des Nucleus praetrigeminalis und über die Kerngebiete, die markierte Afferenzen und Efferenzen enthielten. Es wurden folgende Unterteilungen vorgenommen: Tabelle 2 und 3 enthalten alle Tracings, die zum einen in der Nähe der Somata und zum anderen im Dendritenfeld des Nucleus praetrigeminalis lagen (Abb. 14). Tabelle 4 stellt alle Kontrollapplikationen dar, die in unmittelbarer Umgebung des Nucleus praetrigeminalis lagen (Abb. 15).

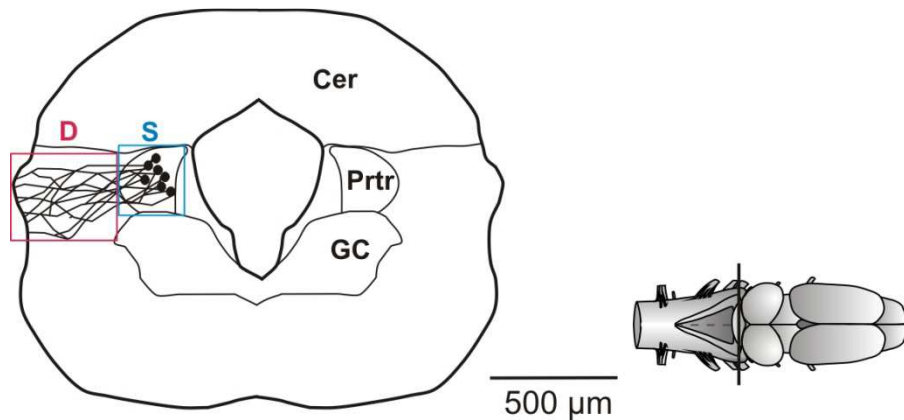


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Applikationsgebiete des Nucleus praetrigeminalis

Die farblichen Felder präsentieren die Injektionsstellen im Bereich der Somata (blau; **S**) und des Dendritenfeldes (rot; **D**). Die jeweiligen durchgeführten Tracings sind in Tabelle 2 und 3 aufgelistet. Die Schnittebene ist in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der vertikale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

Tab. 2: Übersicht der durchgeführten Neurobiotin-Tracings nahe der **Somata** des Nucleus praetrigeminalis. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste. Afferenzen (A) beziehen sich auf retrograd markierte Zellkörper, Efferenzen (E) auf anterograd markierte Fasern. Rote Sterne (*) weisen auf die dargestellten Tracings hin.

Spezies/Datum	Applikationsort	Afferenzen (A)	Efferenzen (E)
Bo/20090414	Prtr	Thal, Teg, Si, Cer	Thal, Teg, Si, Fr
*Bo/20120530 (1)	cPrtr	Ad, Fr	Str, EP, Tp, Ad, Pv, Cb, Si, Lc, Fr
Bo/20120530 (2)	rPrtr	Fr	Ip, Fr
Bo/20120711 (1)	cPrtr	Fr	Pv, Fr
*Bo/20120711 (2)	rPrtr	Ad, Fr	Pv, Si, Lc, Fr

Tab. 3: Übersicht der durchgeführten Neurobiotin-Tracings im **Dendritenfeld** des Nucleus praetrigeminalis.

Spezies/Datum	Applikationsort	Afferenzen (A)	Efferenzen (E)
Bo/20100525	Dendritenfeld des Prtr	Str, POa, Inf, Thal, Teg	Str, Inf, Thal, Ts, Teg
*Bo/20100621	Dendritenfeld des Prtr	POa, SC, Inf, Thal, Illm, Ts, Teg, Ni, Si, Fr	PM, PL, Sep, Str, Inf, Thal, PtG, Illm, Ts, Tec, Teg, SO, Fr
Bo/20120312 (1)	Dendritenfeld des Prtr	lokaler Transport	

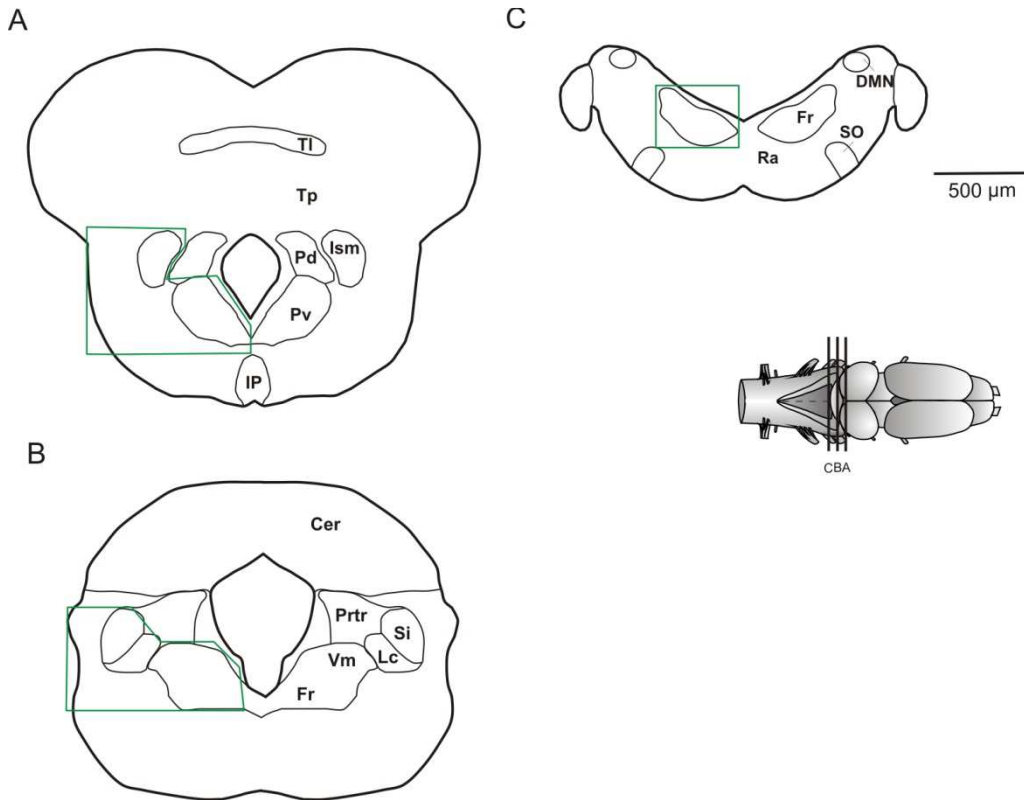


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Kontrollapplikationen

Die grünen Felder präsentieren die Injektionsbereiche der jeweiligen Kontrollapplikation. Die durchgeführten Tracings sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Schnittebene ist in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

Tab. 4: Übersicht der durchgeführten **Kontrollfärbungen** im Bereich des Nucleus praetrigeminalis.

Spezies/Datum	Applikationsort	Afferenzen (A)	Efferenzen (E)
Bo/20100503	Si	Str, Inf, Thal, Illm, Teg, Vm	Str, Thal, Illm, Teg, Vm
*Bo/20100511 (1)	ventrales Teg	POa, POp, Inf, Thal, TP	POp, Inf, Thal, TP, Hb
Bo/20100606	multiple Applikation, Teg, Ni, Si	POp, Thal, Tec, Cb	Thal, Tec
Bo/20100729	Ni, Si, Fr	Str, SC, Thal, Ts, Tec, Cb	Tec, Teg
Bo/20100809	multiple Applikation- Teg, Prtr, Si, Fr	alles gefärbt	
*Bo/20100818	multiple Applikation	POp, SC, Thal,	Thal, Tec, Si, Fr

	- ventrales Neuropil des Teg	PtG, Ts, Tec, Teg, Si, Cb, Prtr, Fr	
Bo/20120312 (1)	Fr	Inf	Str, Amyg, Inf, Cb,
Bo/20120312 (2)	Fr	Si, Cb	Str, Si, Cb
Bo/20120321(2)	Fr	Teg, Cb, Si	Teg, Si
Bo/20120327 (1)	Fr	Inf	Str, Amyg, Inf, Cb
Bo/20120327 (2)	Fr, Cb	Str, Teg	Str, Teg, Si
Bo/20120402 (1)	Fr (Vm)	Prtr	Prtr
Bo/20120402 (2)	Fr	SC, Inf, Si, Prtr	Ip, Si, Prtr

3.2.3 Extrazelluläres Tracing im Bereich der Somata des Nucleus praetrigeminalis

3.2.3.1 Applikation in den rostralen Anteil des Nucleus praetrigeminalis

Die folgenden beiden Neurobiotin-Tracings wurden an medio-sagittal getrennten Gehirnhälften durchgeführt – ohne vorherige Stimulierung des Nucleus praetrigeminalis anterior. Die Applikationen erfolgten auf der medialen Seite, wobei zuvor ein Fluoreszenz-„back-fill“ des Nervus trigeminus durchgeführt wurde, so dass durch eine Anfärbung der Motoneurone die Region des Nucleus praetrigeminalis eingegrenzt werden konnte (Abb 16A/B). Als zusätzliche visuelle Landmarke bzw. zur Eingrenzung des Applikationsgebietes dienten der prominente Nucleus isthmi, das Cerebellum und der Aquaeductus sylvii.

Abbildung 17 repräsentiert die Daten eines Neurobiotin-Tracings nach Applikation in den rostralen Anteil des Nucleus praetrigeminalis. Retrograd markierte Somata waren im Telencephalon und im Diencephalon nicht zu finden. Im Mesencephalon wurden markierten Zellkörper im anterioren Tegmentum, pars dorsalis (Ad; Abb. 17I) beobachtet. Des Weiteren konnten im rostralen und caudalen Nucleus praetrigeminalis (Prtr; Abb. 17L/M) und ebenso im Nucleus motorius nervi trigemini (Vm; Abb. 17/M) und im Nucleus motorius nervi facialis (VIIIm; Abb. 17N) gefärbte Neurone verifiziert werden.

Efferenten Verbindungen des Nucleus praetrigeminalis konnten bis zum Telencephalon beobachtet werden. Hier lagen gefärbte Fasern hauptsächlich im Striatum (Str; Abb. 17A). Abb. 17A-H veranschaulichen den Faserverlauf, der sich entlang des lateralen Vorderhirnbündels bewegte. Im Mesencephalon waren angefärbte Fasern im lateralen Neuropil zu erkennen, die bis in den Nucleus principalis (Tp) und ins anteriore Tegmentum, pars dorsalis (Ad) projizierten (Abb. 17I). Weiter caudal konnten auch vereinzelte markierte Fasern im posterioren Tegmentum, pars ventralis (Pv; Abb. 17J-K) beobachtet werden. Auf Höhe des Applikationsortes, im rostralen Anteil des Nucleus praetrigeminalis (Prtr; Abb. 17L), konnten sehr viele axonale und dendritische Strukturen verifiziert werden. Wie die Abbildung 17L zeigt, ziehen viele Fasern ventrolateral zwischen die absteigenden Faserbahnen und bilden dort ein starkes Geflecht. Gerade die charakteristischen Dendriten des Nucleus praetrigeminalis (Prtr) konnten sehr gut nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden markierte Fasern im Nucleus secundarius isthmi (Si) und im Locus coeruleus (LC) detektiert (Abb. 17L), was sich auch im caudalen Anteil des Nucleus praetrigeminalis beobachtet ließ. Erwartungsgemäß wurden auch im Bereich des Nucleus motorius nervi trigemini (Vm) einige markierte Fasern angefärbt, sowie im ventralen Anteil der Formatio reticularis (Abb. 17M). Auch im medialen Neuropil liefen viele Fasern entlang (Abb. 17L-M). Auch eine starke, aber diffuse Projektion vom rostralen Anteil des Nucleus praetrigeminalis in die Medulla oblongata konnte beobachtet werden, wobei einige Fasern in der Oliva superior (SO) und auf Höhe des Nucleus motorius nervi facialis lagen (Abb. 17N-O).

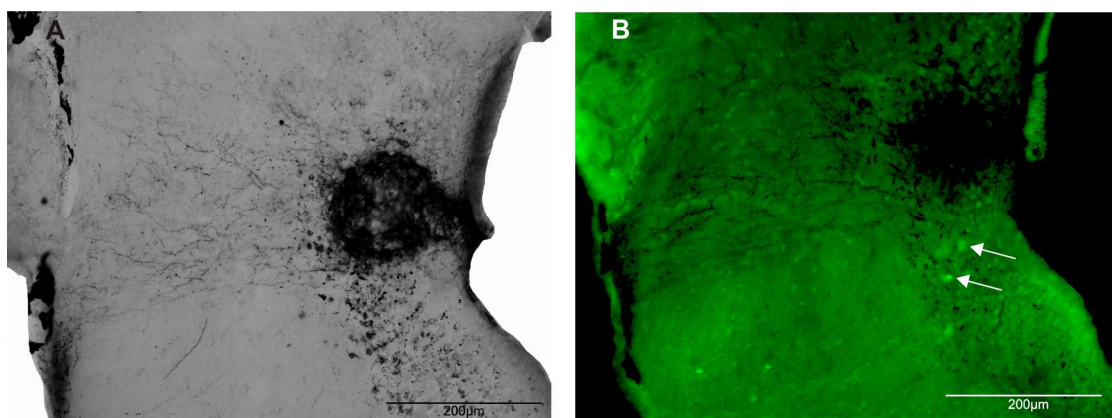
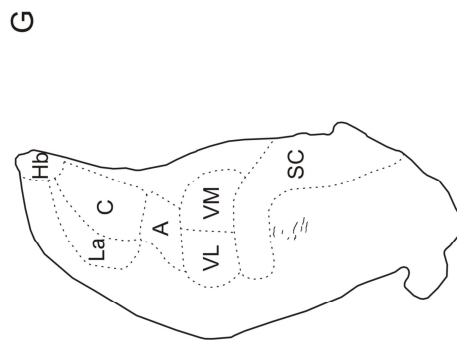
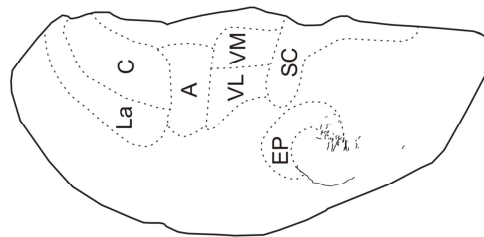
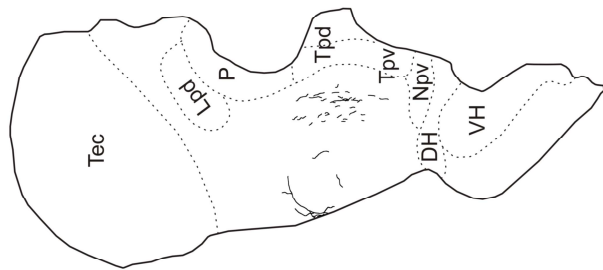
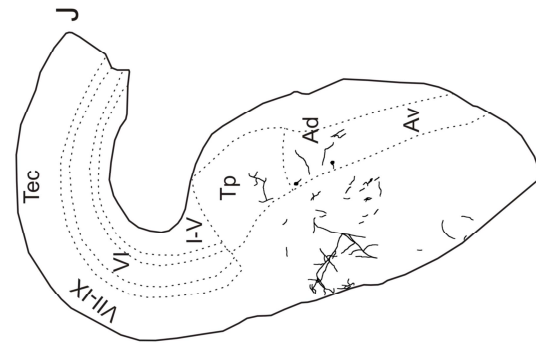
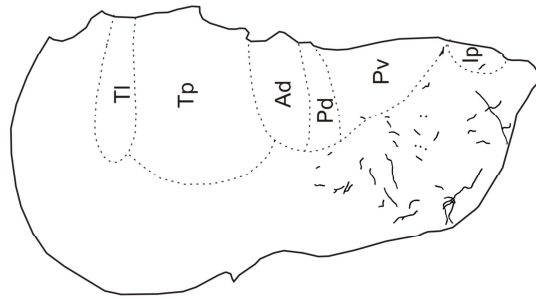
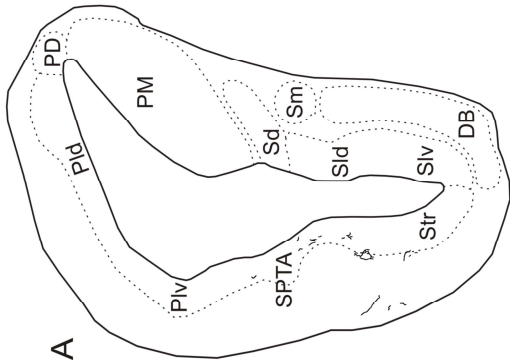
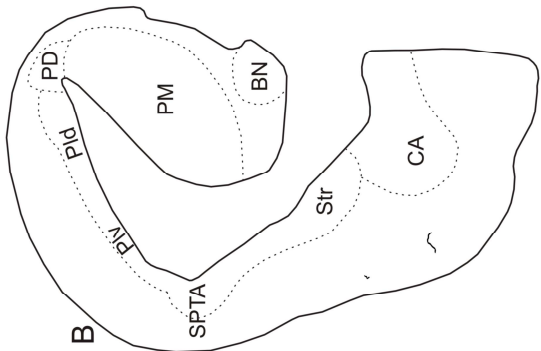
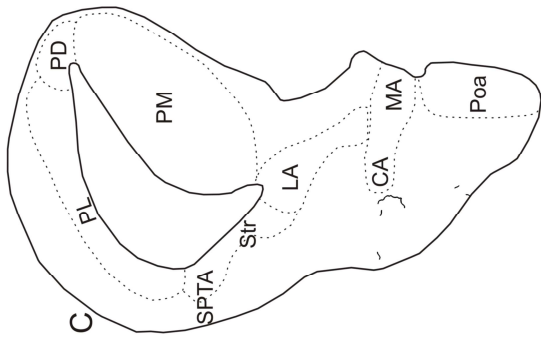
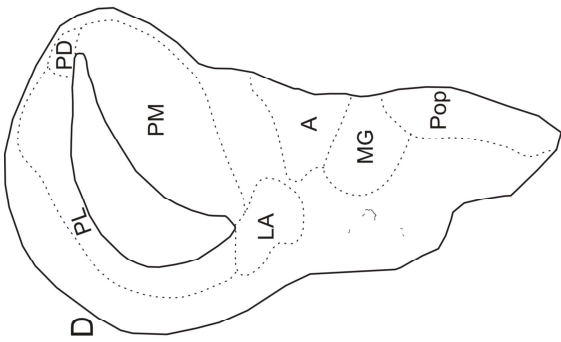
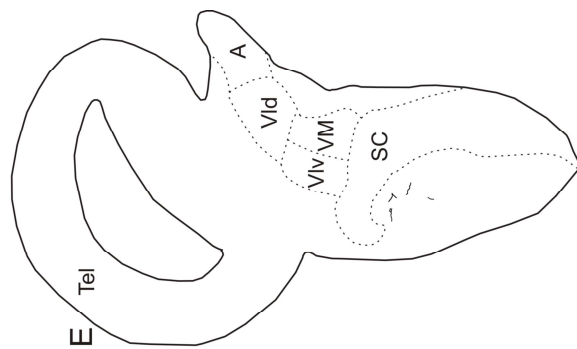


Abbildung 16: (A) Mikrofotografie der Einstichstelle im rostralen Anteil des Nucleus praetrigeminalis und dessen dendritischen Projektionen. (B) Mikrofotografie der markierten Motorneurone des Nervus trigeminus (weiße Pfeile).



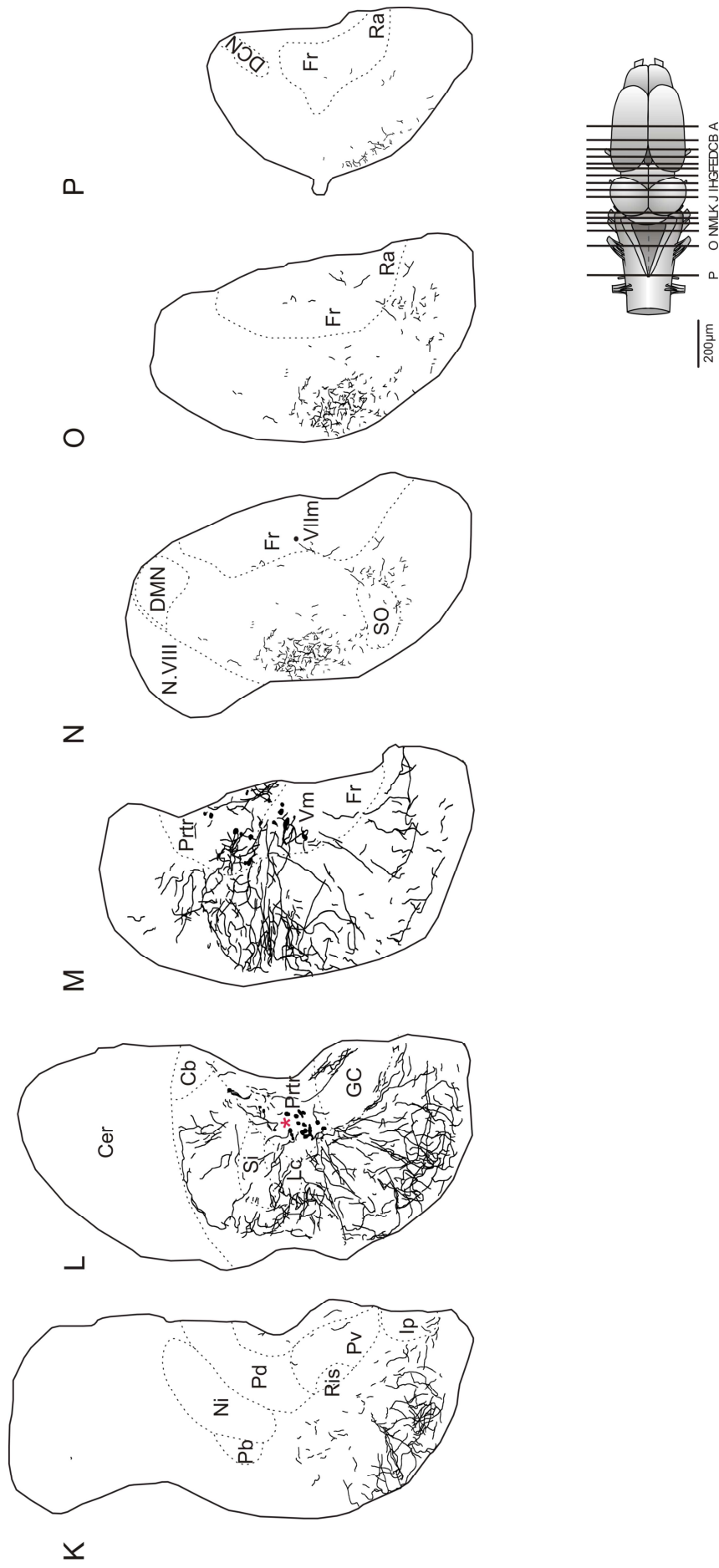


Abbildung 17: Rekonstruktion eines extrazellulären Tracings mit Applikationsort im rostralen Nucleus praetrigeminalis

Dargestellt sind die Somata (**L, M, N**), die Dendriten (**L, M**) und axonalen Projektionen (**A-P**). Die Einstichstelle ist mit einem roten Stern gekennzeichnet (**L**). Die Schnitt Ebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentiert die Höhe der Querschnitte.

3.2.3.2 Applikation in den caudalen Anteil des Nucleus praetrigeminalis

Abbildung 18 stellt eine Rekonstruktion dar, bei der der Applikationsort im medialen Neuropil des caudalen Anteils des Nucleus praetrigeminalis liegt. Auch hier wurde zuvor ein „back-fill“-Tracing des Nervus trigeminus durchgeführt. Im Gegensatz zum vorherigen Tracing wurde viel weniger Neurobiotin aufgenommen, so dass die Färbung insgesamt schwächer ausfiel.

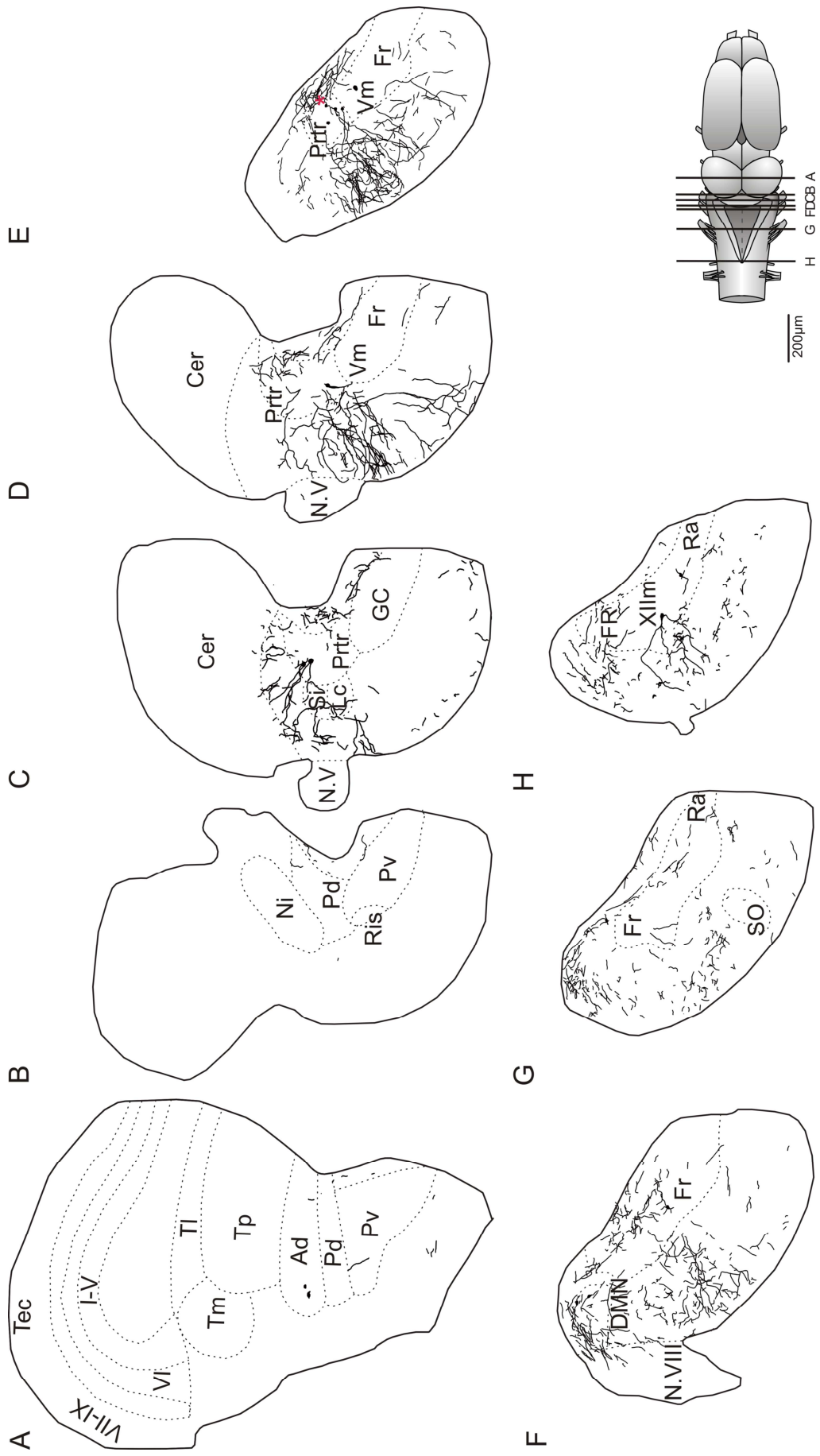
Kerngebiete im Tel- und Diencephalon enthielten keine markierten Zellen. Im Mesencephalon lagen gefärbte Somata im anterioren Tegmentum, pars dorsalis (Ad) (Abb. 18A). Weiterhin lagen im rostralen und caudalen Anteil des Nucleus praetrigeminalis markierte Neurone (Prtr; Abb. 18C/D). Im rostralen Anteil lagen die Somata dorsal, während im caudalen Anteil die gefärbten Zellkörper ventral lagen. Intrazelluläre Tracings von anterioren und posterioren Tegmentumneuronen wiesen Efferenzen in der Area praeoptica auf. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass das Tegmentum eine Funktion als Relaisstation bei Vokalisationsprozessen hat (Luksch 1994). Auch im Bereich des Nucleus motorius nervi trigemini Vm; Abb. 18E) konnten vereinzelt markierte Somata detektiert werden. Zwei markierte Neurone lagen im Nucleus dorsomedullaris (DMN) und ein markiertes Neuron im Nucleus motorius nervi hypoglossi (XII_m; Abb. 18H).

Efferente Projektionen vom caudalen Anteil des Nucleus praetrigeminalis zogen bis zum Mesencephalon. Hier waren vereinzelte Fasern im anterioren Tegmentum, pars dorsalis (Ad) und im posterioren Tegmentum, pars ventralis bzw. dorsalis (Pv/Pd) zu sehen (Abb. 18A/B). Im Metencephalon konnten markierte axonale und dendritische Strukturen im Nucleus secundarius isthmi (Si) und im Locus coeruleus (Lc) detektiert werden. Die Efferenzen des rostralen Nucleus praetrigeminalis (Prtr) zogen, im Gegensatz zum caudalen Anteil, dorsolateral in Richtung Cerebellum (Abb. 18C). Die markanten Dendriten des Nucleus praetrigeminalis waren im caudalen Anteil gut zu erkennen (Abb. 18D/E). Sie projizierten ventrolateral zum Geflecht der absteigenden Fasern. Zudem konnten vereinzelte Fasern im Nervus trigeminus (N. V; Abb. 18D) und im Nervus stato-acusticus (N. VIII; Abb. 18F) detektiert werden. Auch der Nucleus dorsomedullaris (DMN) enthielt viele markierte Fasern, die weiter caudal in Richtung Formatio reticularis (Fr) zogen (Abb. 18F/G). Weiterhin projizierte der

caudale Anteil des Nucleus praetrigeminalis stark in die caudale Medulla oblongata. Die Fasern waren teils diffus, bis auf den Bereich des Nucleus motorius nervi hypoglossi (XII_m). Das Tracing könnte sowohl vokalisationsrelevante als auch auditorische Kerngebiete im Mesencephalon und in der Medulla oblongata markiert haben, wobei die Oliva superior (SO, Abb. 18G) nur vereinzelte Efferenzen enthielt.

Abbildung 18: Rekonstruktion eines extrazellulären Tracings mit Applikationsort im caudalen Nucleus praetrigeminalis

Dargestellt sind die Somata (**A,C,D,E,F,H**), die Dendriten (**C-E**) und axonalen Projektionen (**A-H**). Die Einstichstelle ist mit einem roten Stern gekennzeichnet (**L**). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentiert die Höhe der Querschnitte.



3.2.4 Extrazelluläres Tracing im Bereich des Dendritenfeldes des Nucleus praetrigeminalis

Abbildung 19 (Schnittebene 1-5) stellt den Verlauf eines Neurobiotin-Tracings in einem Gesamthirn der chinesischen Rotbauchunke dar. Unterstützt wurde die Färbung durch Stimulierung der Area praeoptica, die zur elektrophysiologischen Kartierung des Nucleus praetrigeminalis diente. Da beide Hirnareale für die Initiierung und Kontrolle der Vokalisation zuständig sind, sollte mittels evozierter Feldpotentiale die Position des Nucleus praetrigeminalis ermittelt werden, um anschließend Neurobiotin exakt zu applizieren. Mit dem Neurobiotin-Tracing sollte primär die Organisation beider vokalisationsrelevanten Strukturen detektiert werden. Allerdings konnten keine Feldpotentiale im Nucleus praetrigeminalis registriert werden, auch nicht mit erhöhter Stromeinprägung in der Area praeoptica, was meistens zu einer großflächigen Zerstörung der umliegende Neuronen und Fasern führte (Abb. 19-S5/C). Der Marker Neurobiotin wurde daraufhin in den Bereich des Nucleus praetrigeminalis appliziert. Die Schwierigkeit des Tracings lag darin, dass der Nucleus praetrigeminalis wenige Neurone enthält und in ein großes, komplexes Fasergeflecht eingebettet ist (Abb. 19-S2/C und 19-S3/C; Fuller & Ebbesson 1973; Schmidt 1974b, 1982).

Abbildung 19-S1 repräsentiert die Applikationsstelle, die in Abb. 19-S1/C nochmals vergrößert dargestellt wurde. Sie lag rostrolateral vom Nucleus praetrigeminalis im Neuropil. Man erkennt, dass ausgehend von der Gewebepenetration bis hin zur Applikationsstelle Neurobiotin in das Gewebe geflossen ist und somit umliegende Fasern und Somata zusätzlich angefärbt wurden. Demzufolge wurden mehrere Kerngebiete und Fasertrakte angefärbt, die nicht unmittelbar in die Generierung von Paarungsrufen involviert sind, z.B. der obere Olivenkomplex (SO; Abb. 19-S2/C).

Abbildung 19-S1 und 19-S2 präsentieren markierte Neurone und die charakteristisch ventrolateral verlaufenden Dendriten des Nucleus praetrigeminalis (Prtr). Das Kerngebiet befindet sich rostral des Nucleus motorius nervi trigemini (Vm) und posteromedial zum Nucleus isthmi (Ni). Abb. 19-S2/A und 19-S3/A zeigen schematisch die Lokalisation der drei Kerngebiete, die in Abb. 19-S2/C und 19-S3/C vergrößert dargestellt wurden. Betrachtet man die Abbildung 19-S5, den

Stimulationsort, so erkennt man ein angefärbtes Neuron im Nucleus praeopticus anterior (POa; Abb. 19-S5/C und 19-S5/D). Der Marker Neurobiotin wurde retrograd bis in den Zellkörper transportiert. Basierend darauf stellt sich die Frage, ob der synaptische Kontakt direkt an den Somata oder an den dendritischen Arborisationen stattfindet. Dadurch, dass die Einstichstelle relativ groß ist, kann keine eindeutige Aussage über den direkten Kontakt zum Nucleus praetrigeminalis gemacht werden. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit eines indirekten Weges. Die letztgenannte Möglichkeit steht in Übereinstimmung mit den Daten von Brahic & Kelley (2003), die auch keine direkte Verbindung beider Areale bestätigen konnten.

Falls ein indirekter Weg existiert, so kommen Kerngebiete in Frage, die sowohl gefärbte Somata und Fasern im Nucleus praetrigeminalis und im Nucleus preopticus anterior enthalten. Ein Gebiet, das nach Brahic & Kelley (2003) bei *Xenopus laevis* zum Nucleus praetrigeminalis projiziert, ist das Infundibulum, pars dorsalis (dInf). Tatsächlich konnten auch hier vereinzelt gefärbte Somata detektiert werden (Abb. 19-S2/E, 19-S3/E und 19-S4/C). Da sowohl der Nucleus praetrigeminalis, die Area praeoptica als auch das Infundibulum hormonsensitive Zentren enthalten (Kelley et al. 1975; Morrell et al 1975b; Urano 1988) und eine starke Verbindung zwischen der Area praoptica und dem Infundibulum besteht (siehe 3.3; Abb. 26-S3/A und Abb. 26-S3/B), könnte dieses Areal als Zwischenstation beider Vokalisationszentren fungieren.

Eine weitere Relaisstation könnte das Tegmentum (Teg) sein, denn ausgehend von der Applikationsstelle fielen sofort dicke Faserbündel auf, die sich durch das gesamte Areal zogen (Abb. 19-S1/C). Weiter medial wurden zudem viele markierte Zellkörper im Tegmentum beobachtet, die hauptsächlich im rostralen Anteil lagen (Abb. 19-S2/D und 19-S3/D). Zusätzliche Neurobiotin-Tracings im Tegmentum (siehe 3.5) bestärken die Annahme, dass dieses Areal eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Vokalisationsprozessen spielt.

Auch der Thalamus ist eine wichtige sensorische Relaisstation. Hier erfolgt die Weiterleitung von auditorischen, visuellen und somatosensorischen Informationen über aufsteigende und absteigende Bahnen. Wetzel et al. (1983) konnten nach

Injektion von HRP-WGA in das dorsale tegmentale Areal der Medulla (DTAM) bei *Xenopus laevis* retrograd markierte Zellen im Nucleus thalami ventrolateralis (VL), im Nucleus thalami ventromedialis (VM) und im Nucleus centralis thalami (C) nachweisen. Abb. 19-S1/D, 19-S2/F und 19-S4/D zeigen gefärbte Somata und Fasern genau in diesen Subnuclei des Thalamus auf. Die Mehrheit gefärbter Somata lag im Nucleus thalami ventrolateralis und im Nucleus thalami ventromedialis. Neurobiotin-Färbungen im Nucleus centralis thalami bei *Bombina orientalis* weisen efferente Verbindungen zum Nucleus praeopticus anterior und dem Nucleus praetrigeminalis auf (Roden 2002). Der Nucleus centralis thalami enthielt in der vorliegenden Arbeit nur wenige markierte Zellkörper auf, ebenso der posteriore und die lateralen Subnuclei. Der Nucleus anterior thalami (A) war gänzlich frei von gefärbten Zellkörpern. Außerdem wurden im Nucleus motorius nervi oculomotorii (III_m; Abb. 19-S5/E) markierte Somata detektiert.

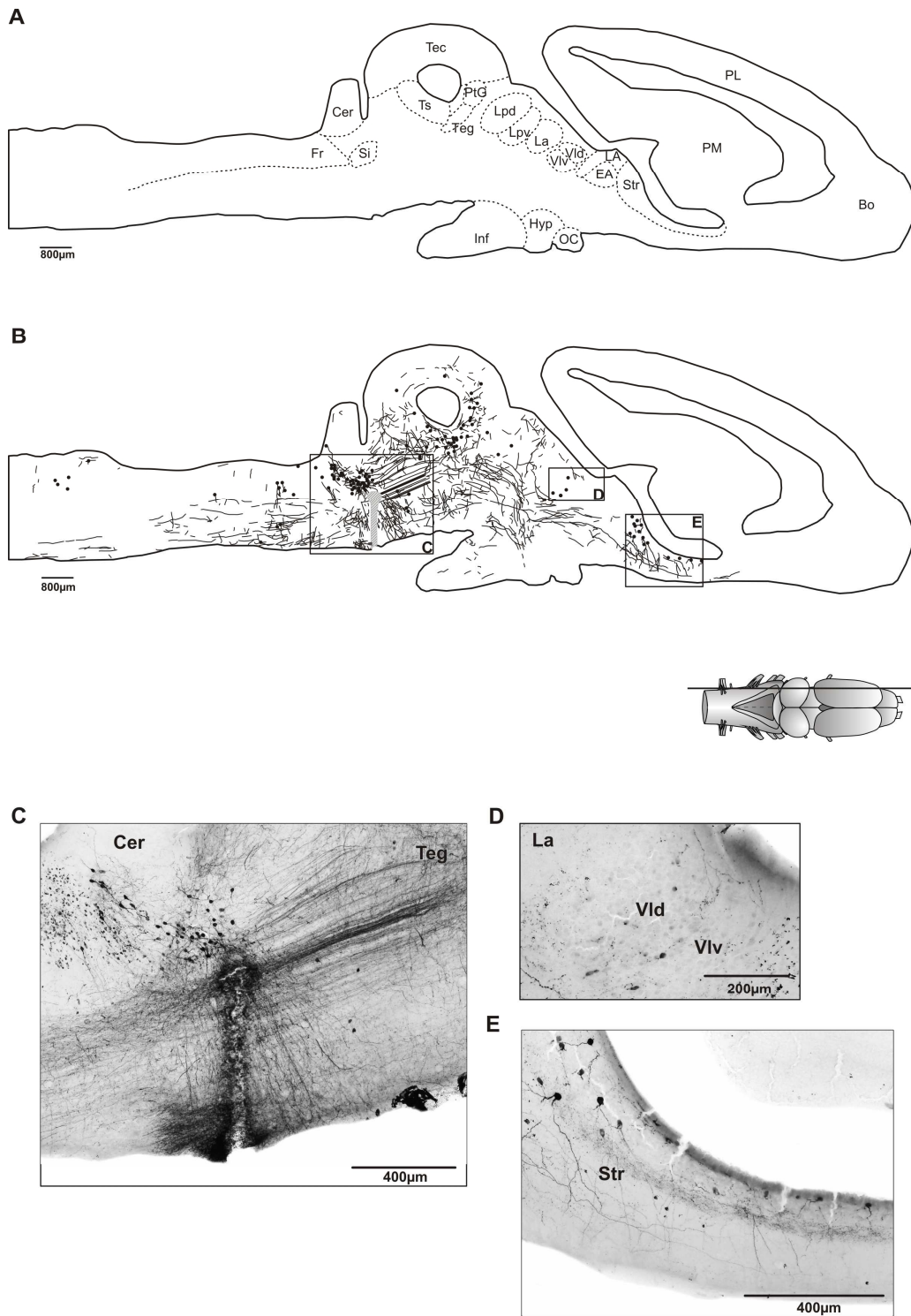


Abbildung 19-S1: Einstichstelle im Bereich des Dendritenfeldes des Nucleus praetrigeminalis

Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (A), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien; die Einstichstelle ist grau/schraffiert dargestellt) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin in das Dendritenfeld darstellen (B). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen die Einstichstelle (Abb. C), den ventralen Thalamus (Vlv/Vld; Abb. D) und das Striatum (Str; Abb. E). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

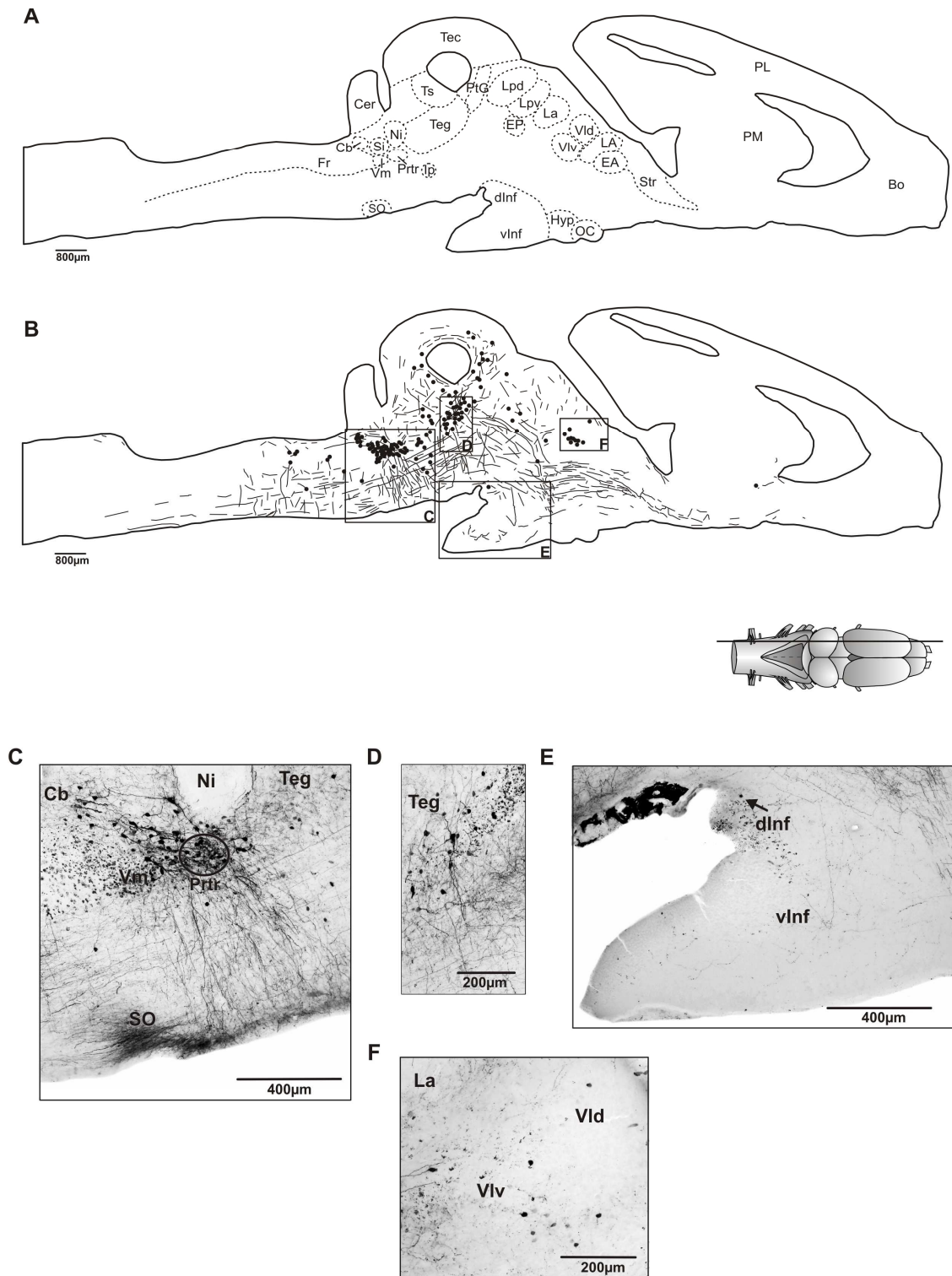


Abbildung 19-S2: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (**A**), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins Metencephalon darstellen (**B**). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen den Bereich des Nucleus praetrigeminalis (Prtr; Abb. **C**, schwarzer Kreis), des rostralen Tegmentum (Teg; Abb. **D**), des Infundibulum (Inf; Abb. **E**, schwarzer Pfeil weist auf ein markiertes Neuron hin) und Subnuclei des Thalamus (Vlv/Vld; Abb. **F**). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

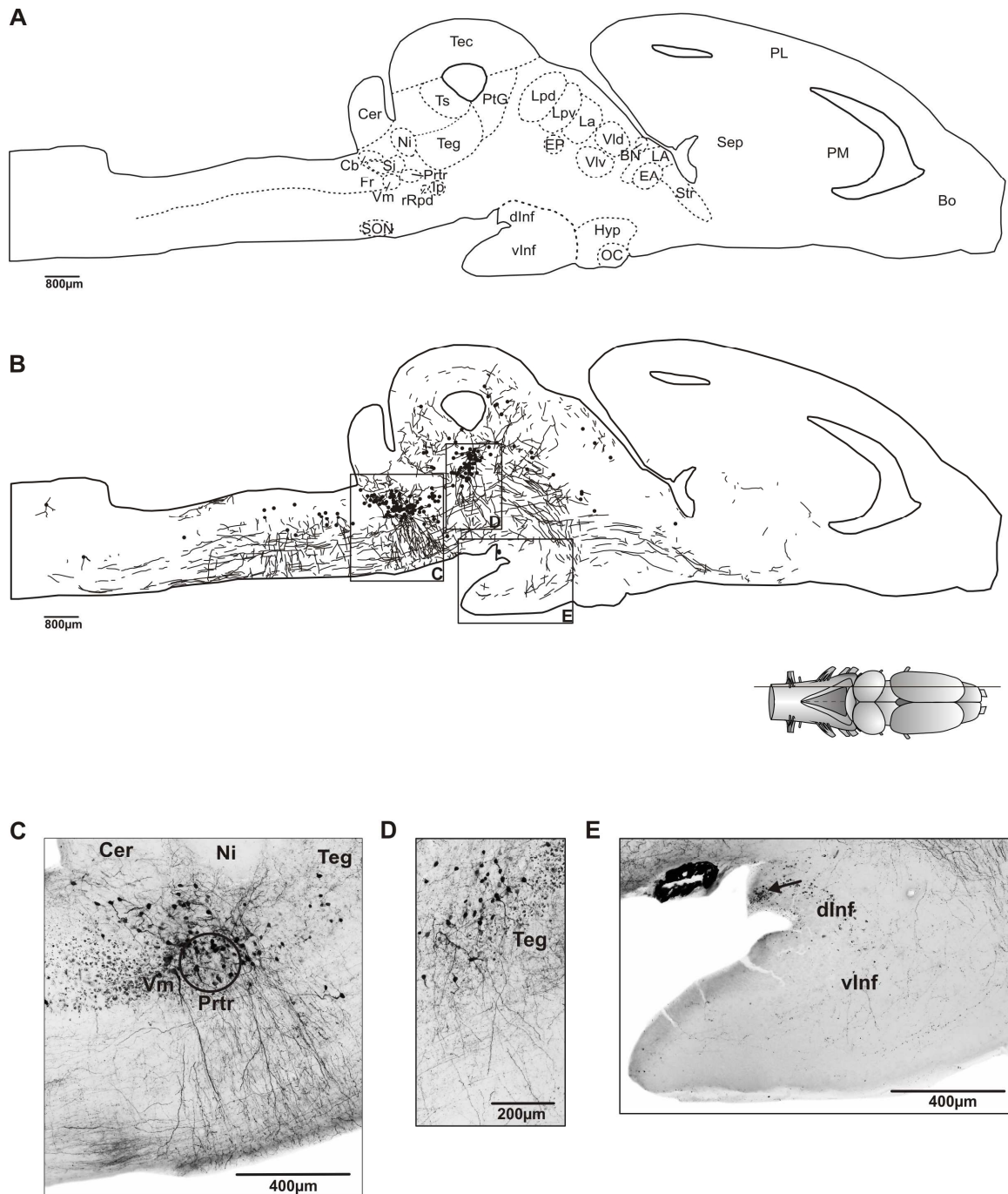


Abbildung 19-S3: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (**A**), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins Metencephalon darstellen (**B**). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen den Bereich des Nucleus praetrigeminalis (Prtr; Abb. **C**, schwarzer Kreis), des rostralen Tegmentum (Teg, Abb. **D**) und des Infundibulum (Inf; Abb. **E**, schwarzer Pfeil weist auf ein markiertes Neuron hin). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

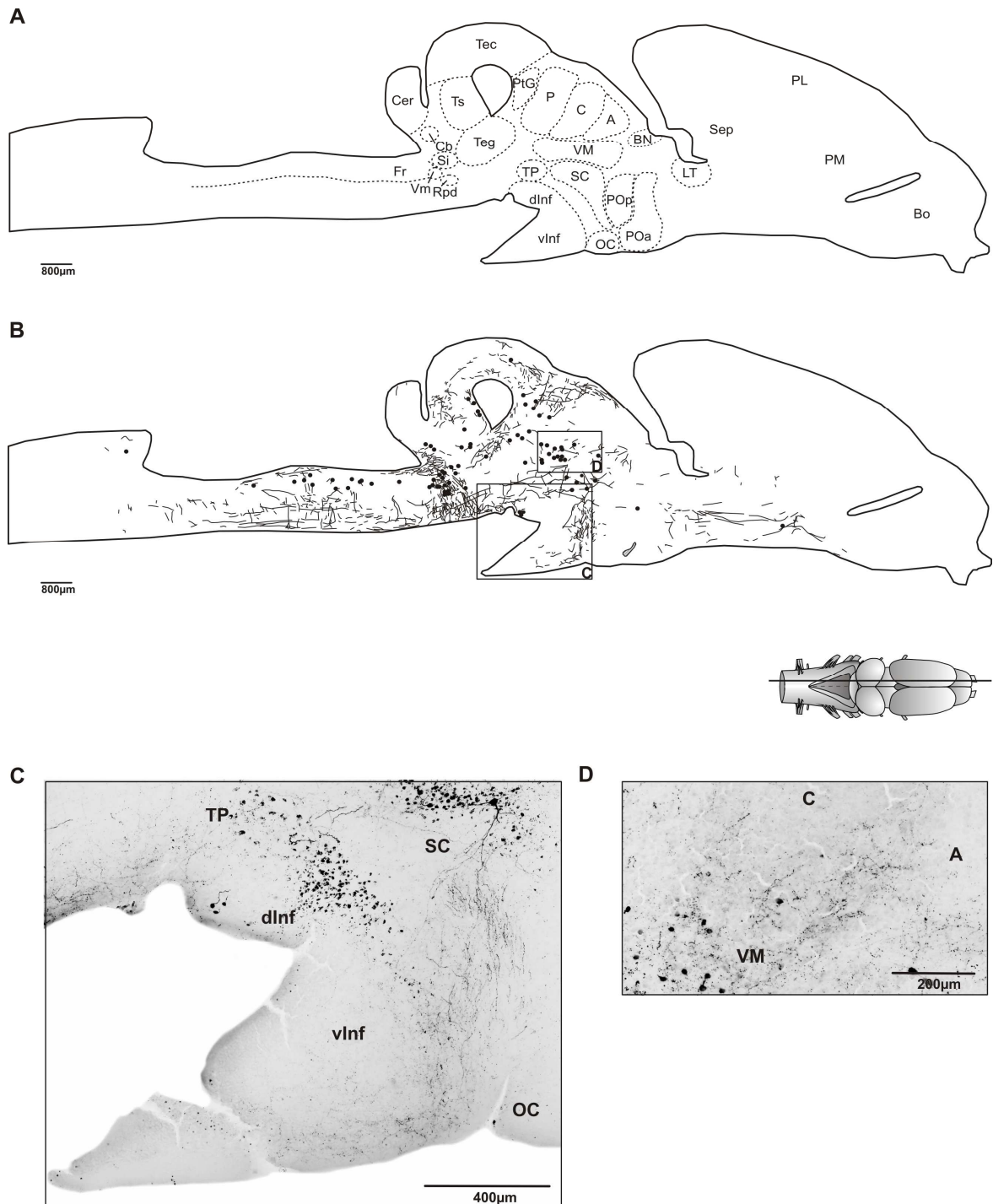


Abbildung 19-S4: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (A), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins Metencephalon darstellen (B). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen den Bereich des Infundibulum (Inf; Abb. C) und Subnuclei des Thalamus (VM/C; Abb. D). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

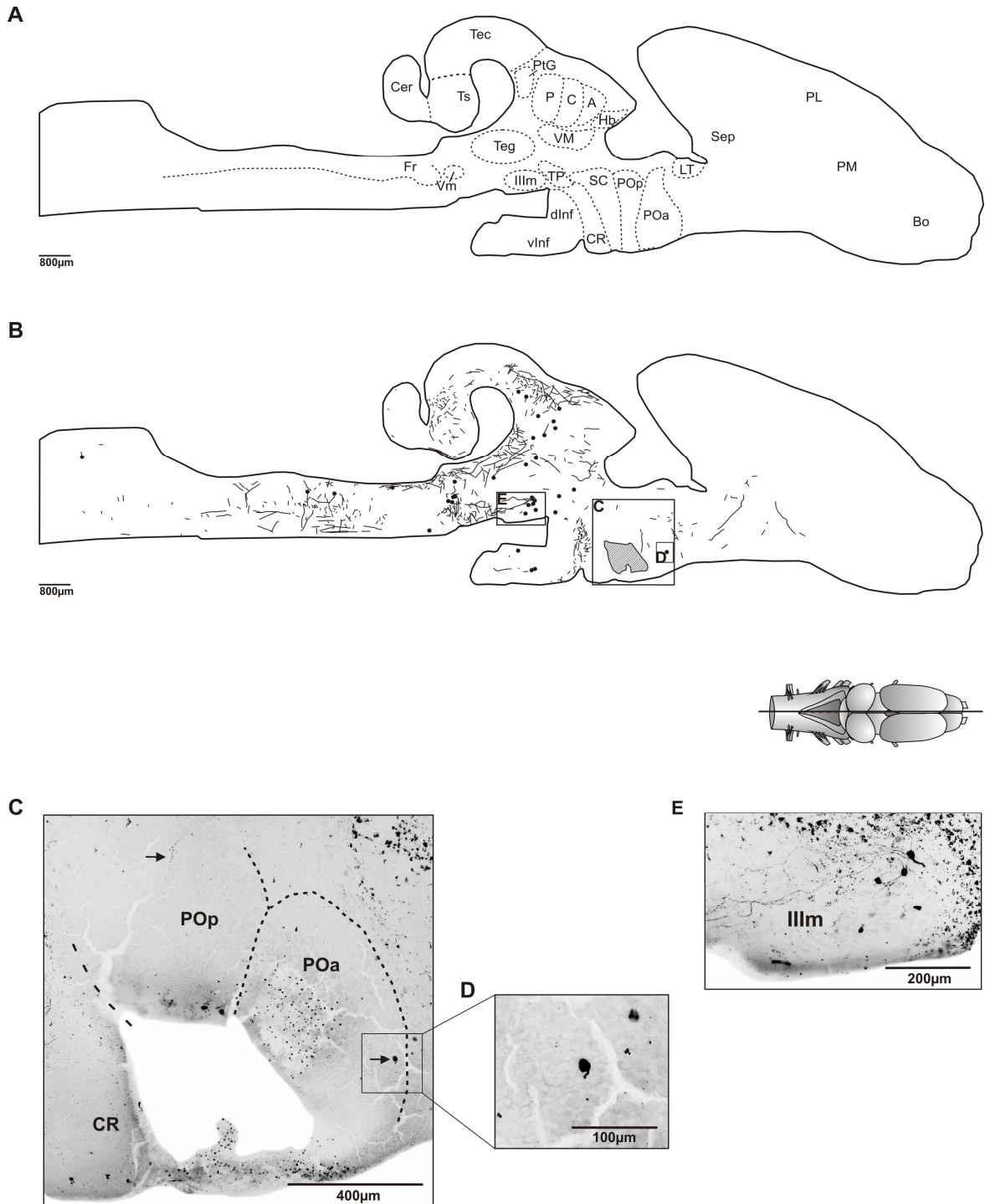


Abbildung 19-S5: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (**A**), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins Metencephalon darstellen (**B**). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen den Stimulationsbereich in der Area praeoptica (Abb. **C**, schwarzer Pfeil weist auf ein markiertes Neuron hin), ein gefärbtes Neuron im Nucleus praeopticus anterior (POa; Abb. **D**) und Motoneurone des N.III (IIIIm; Abb. **E**). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balken repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

Abbildung 20 repräsentiert ein Fluoreszenz-Tracing innerhalb des Dendritenfeldes des Nucleus praetrigeminalis. Die Applikation von Dextranamin-Alexa Fluor 488 erfolgte an einem medio-sagittal getrennten Gehirn ohne Stimulierung der Area praeoptica. Für gewöhnlich sahen Tracings im Bereich des Nucleus praetrigeminalis ähnlich aus.

Die Färbung zeigte den charakteristischen Verlauf der Dendriten und Axone in das ventrale Neuropil. Auch feine Strukturen, wie Varikositäten und Terminalien waren gut zu erkennen (Abb. 20-S1-3/A). Die Einstichstelle lag auf Höhe des Nucleus praetrigeminalis (Prtr) und des Nucleus secundarius isthmi (Si; Abb. 20-S1/A; weißer Pfeil). Abb. 20-S3/A demonstriert Neurone des Nucleus praetrigeminalis (Prtr; weißer Kreis). Generell stand die Färbung und folglich deren Projektionen in guter Übereinstimmung mit dem oben dargestellten Neurobiotin-Tracing. Das Neurobiotin-Tracing wies allerdings eine stärkere Färbung auf, weil wesentlich mehr Neurobiotin injiziert worden war und entsprechend des Applikationsortes auch Fasertrakte verletzt worden sind.

Ebenfalls in guter Übereinstimmung standen die verifizierten Somata im Tegmentum (Teg). In den Abb. 20-S2/A und Abb. 20-S3/A konnten Projektionen entlang eines Fasertraktes beobachtet werden, und es konnten auch vereinzelte markierte Neurone identifiziert werden (Abb. 20-S1/B; Abb. 20-S3/A). Es ließ sich jedoch nicht ermitteln, ob die tegmentalen Neurone direkt mit dem Nucleus praetrigeminalis verbunden waren.

Auch im Infundibulum, pars dorsalis (dInf) konnte ein gefärbtes Neuron detektiert werden (Abb. 20-S3/B; weißer Pfeil), speziell auf den Abb. 20-S2/A und Abb. 20-S3/A können rostroventrale Projektionen beobachtet werden.

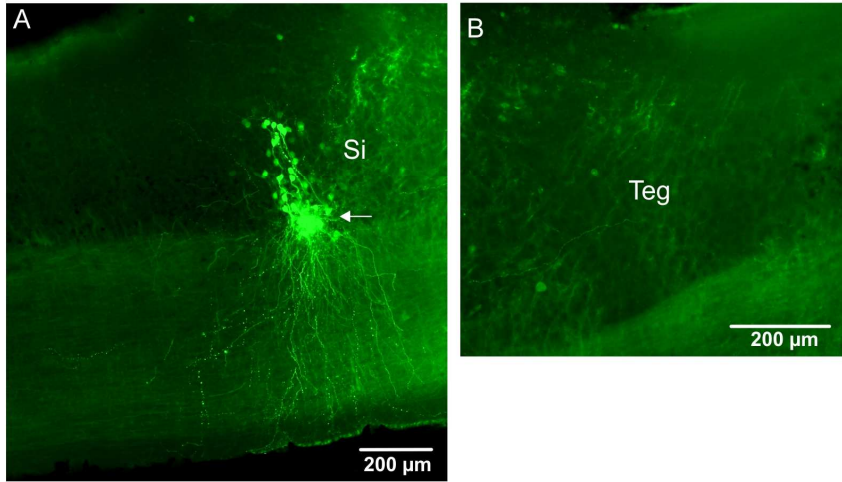
Auch der ventrale Anteil des Nucleus laminaris (Ts) und der Nucleus cerebelli (Cb) enthielten einige markierte Neurone (Abb. 20-S3/C; Abb. 20-S2/A), was mit der Neurobiotin-Färbung übereinstimmt (siehe 3.2.3.1; Abb. 19-S2/C). Weitere Kerngebiete enthielten keine markierten Neurone und Fasern. In caudaler Richtung konnte man einzelne markierte Fasern bis auf Höhe des Nervus hypoglossus beobachten.

Übereinstimmend mit den Fluoreszenzdaten von Brahic & Kelley (2003) wiesen auch hier Fluoreszenzfärbungen im Bereich des Nucleus praetrigeminalis keine angefärbten Somata und Fasern in der Area praeoptica auf.

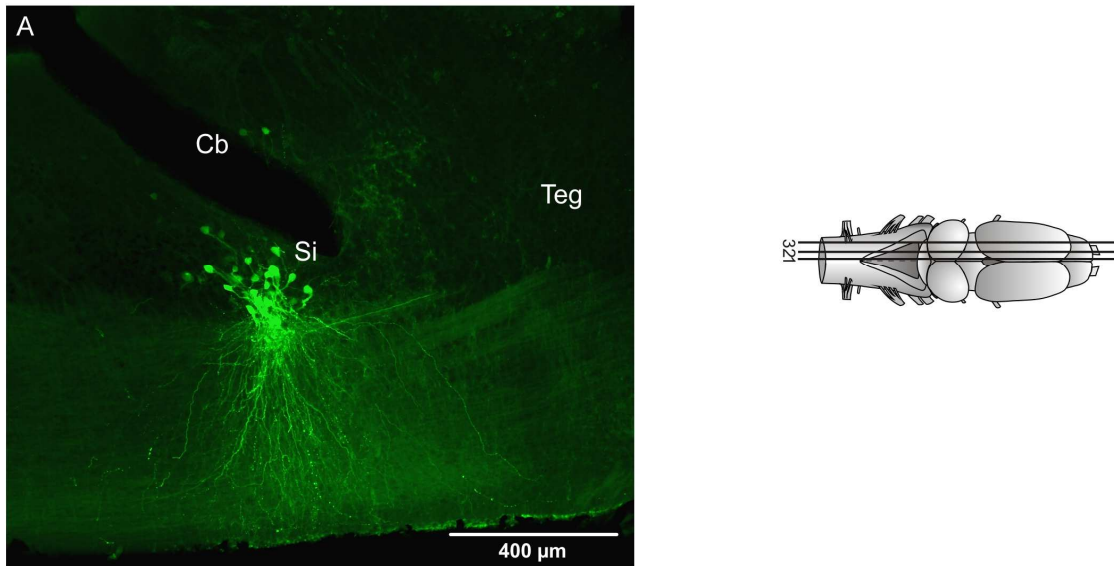
Abbildung 20: Einstichstelle im Bereich des Dendritenfeldes des Nucleus praetrigeminalis

Dargestellt sind Mikrofotografien einzelner Schnittebenen, welche die Verteilung von markierten Somata und Fasern nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs Dextranamin-Alexa Fluor 488 (MG 10000 kDa) darstellen. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt, wobei die horizontalen Balken die Höhe der Querschnitte repräsentieren.

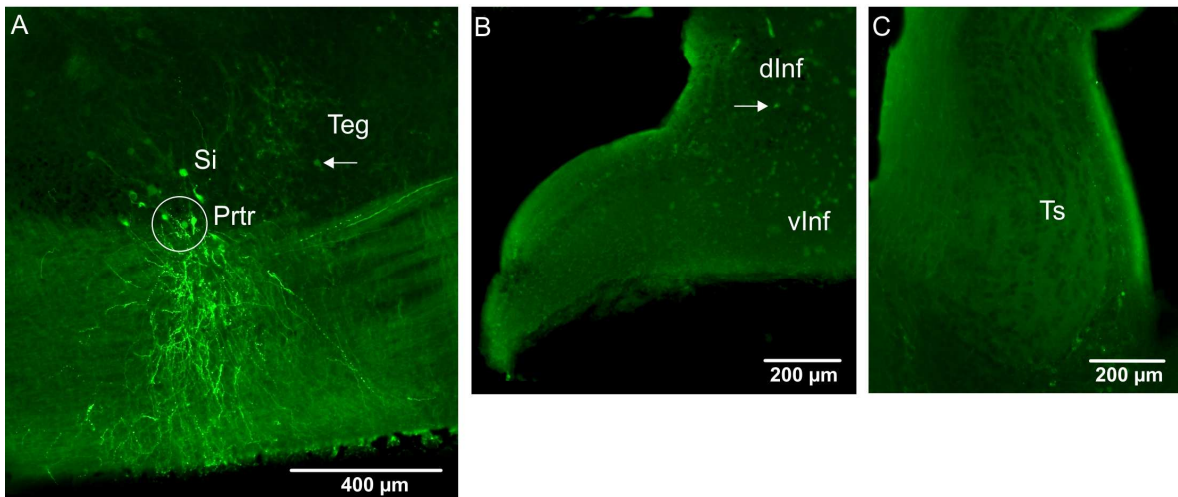
Schnittebene 1



Schnittebene 2



Schnittebene 3



3.2.5 Extrazelluläre Tracings von Kontrollapplikationen

3.2.5.1 Tracing im ventralen Neuropil mittels multipler Injektionen

In Abbildung 21 (Schnittebene 1-3) wird ein Neurobiotin-Tracing aufgezeigt, das mehrere Einstichstellen im ventralen Neuropil enthielt (Abb. 21-S1/C). Diese entstanden durch mehrfaches Einstechen einer Mikroelektrode in das neuronale Gewebe, während der Detektierung von Feldpotentialen. Auch bei diesem Versuch konnten keine extrazellulären Potentiale gemessen werden und folglich wurde der neuronale Marker Biotin in das umliegende Gebiet appliziert. Auch ohne Stromeinprägung wurde von den verletzten Fasern und Neuronen Neurobiotin aufgenommen, so dass die Bereiche der Einstichstellen stark markiert wurden.

Die Einstichstellen lagen im ventralen Neuropil des Mesencephalon und Metencephalon (Abb. 21-S1/B). Hier laufen wichtige aufsteigende und absteigende Bahnen entlang, die u.a. das Vorderhirn mit dem Hirnstamm verbinden, und es führen auch die Dendriten des Nucleus praetrigeminalis in dieses Areal hin. Abb. 21-S1/D zeigt markierte Neurone des Nucleus praetrigeminalis (Prtr), jedoch keine angefärbten Dendriten bzw. keine dendritische Arborisationen. Sollte jedoch die Verbindung von der Area praeoptica zu den medullären Vokalisationszentren direkt sein, so könnte eine Projektion über das ventrale Neuropil laufen. Es konnten jedoch keine markierten Neurone im Nucleus praeopticus anterior bzw. posterior (POa; POp) nachgewiesen werden (Abb. 21-S2/C und 21-S3/C). Im ventralen Zipfel des Nucleus praeopticus posterior (POp) wurden nur vereinzelt markierte Fasern gefunden (Abb. 21-S3/E). Mit großer Wahrscheinlichkeit wurden durch repetitive Stimulation der Area praeoptica viele Neurone und Fasern zerstört. Im Bereich des Nucleus supraquiasmaticus (SC) wurden gefärbte Somata detektiert (Abb. 21-S2/C und Abb. 21-S3/C), die in den Abbildungen 21-S2/D und 21-S3/D nochmals vergrößert dargestellt sind.

In allen Schnittebenen konnten markierte Somata im Tegmentum (Teg) nachgewiesen werden, die in Abb. 21-S1/E nochmals vergrößert dargestellt werden. Dass in diesem Kerngebiet markierte Neurone und Fasern aufgefunden wurden, lässt sich dadurch erklären, dass einige Einstichstellen in der weißen Substanz des

Tegmentum liegen. Viele Neurone projizieren in das ventrale Neuropil (siehe Abb. 19-S3/D). Daher kann mit diesem Neurobiotin-Tracing keine genaue Aussage über die Rolle des Tegmentum während Vokalisationsprozessen gemacht werden.

Das Infundibulum, pars dorsale (dInf) wies ebenfalls einige markierte Somata auf (Abb. 21-S2/E). Dass einige Fasern die medullären Vokalisationszentren erreichen, konnte auch durch Brahic & Kelley (2003) nachgewiesen werden. Das wiederum unterstützt die Annahme, dass der Nucleus praeopticus anterior seine Informationen über das Infundibulum projizieren kann und somit Informationen verstärkt oder unterdrückt werden. Beide Areale weisen zudem eine starke reziproke Verbindung auf (siehe Abb. 26; Schnittebene 3A/B).

Auch Subnuclei des Thalamus wiesen einige markierte Zellkörper auf. In der latero-sagittalen Schnittebene wurden hauptsächlich im Nucleus thalami ventrolateralis (VL) angefärbten Somata und Fasern detektiert (Abb. 21-S1/F). Weiter medial konnten gefärbte Fasern und Somata im Nucleus posterior thalami (P), im Nucleus centralis thalami (C) und im Nucleus anterior thalami (A) identifiziert werden. Zusätzlich wurden auch im Nucleus thalami ventromedialis (VM) Somata und Fasern markiert (Abb. 21-S2/F).

Da auch die deszendierenden Bahnen des Striatum (Str) über das laterale Vorderhirnbündel entlang des ventralen Neuropil verlaufen, konnten auch hier gefärbte Somata beobachtet werden (Abb. 21-S1/G). Wie auch im vorherigen Neurobiotin-Tracing (Abb. 14-S5/E) wurden auch im Nucleus motorius nervi oculomotorii (III_m; Abb. 21-S3/F) markierte Somata detektiert.

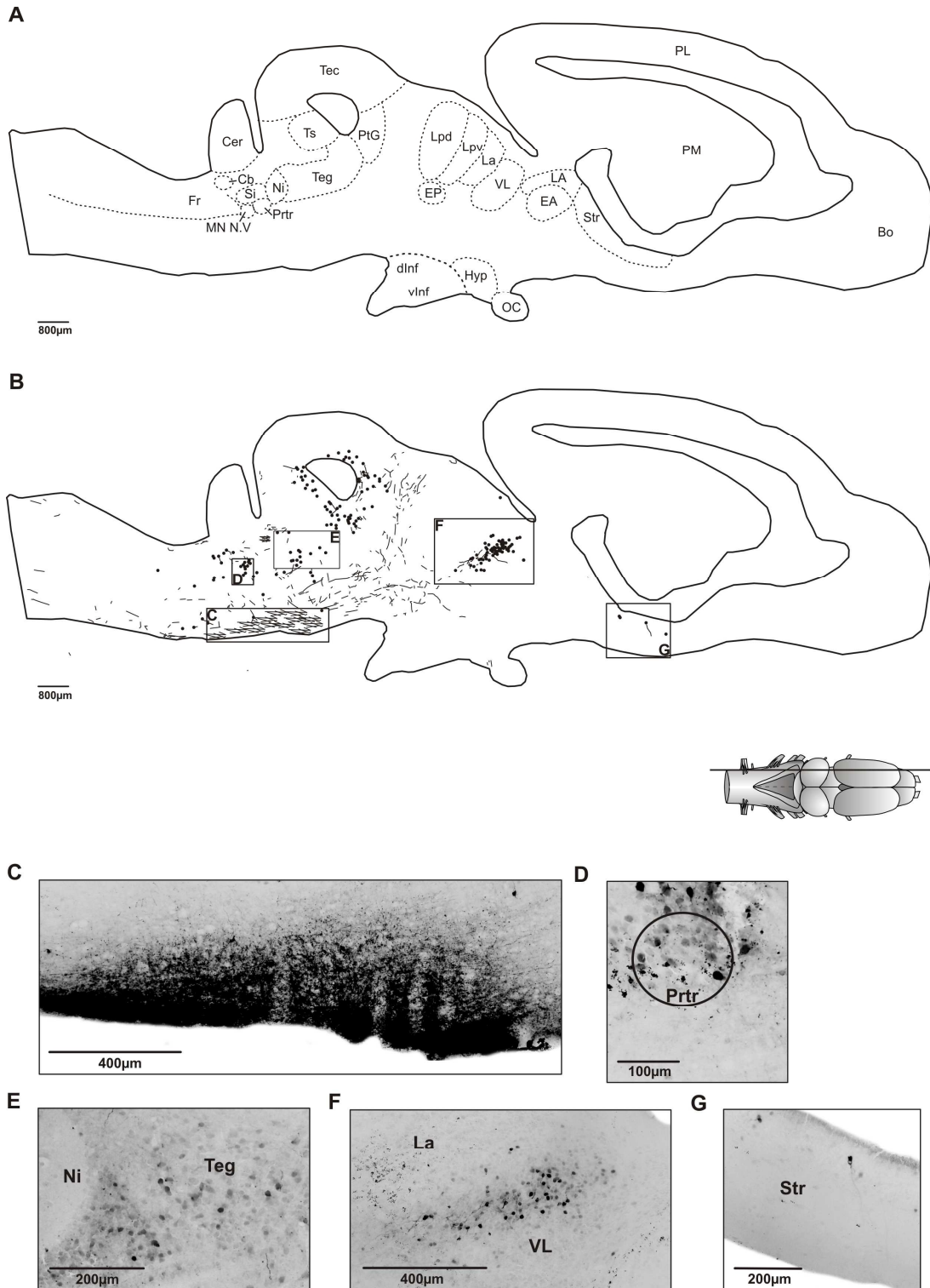


Abbildung 21-S1: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (A), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins ventrale Neuropil darstellen (B). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen die multiplen Applikationsorte im ventralen Neuropil (Abb. C), gefärbte Neurone im Nucleus praetrigeminalis (Prtr; Abb. D, schwarzer Kreis), gefärbte Neurone im Tegmentum (Teg; E), gefärbte Neurone im Nucleus thalami ventrolateralis (VL; Abb. F) und gefärbte Neurone im Striatum (Str; Abb. G). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balke repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

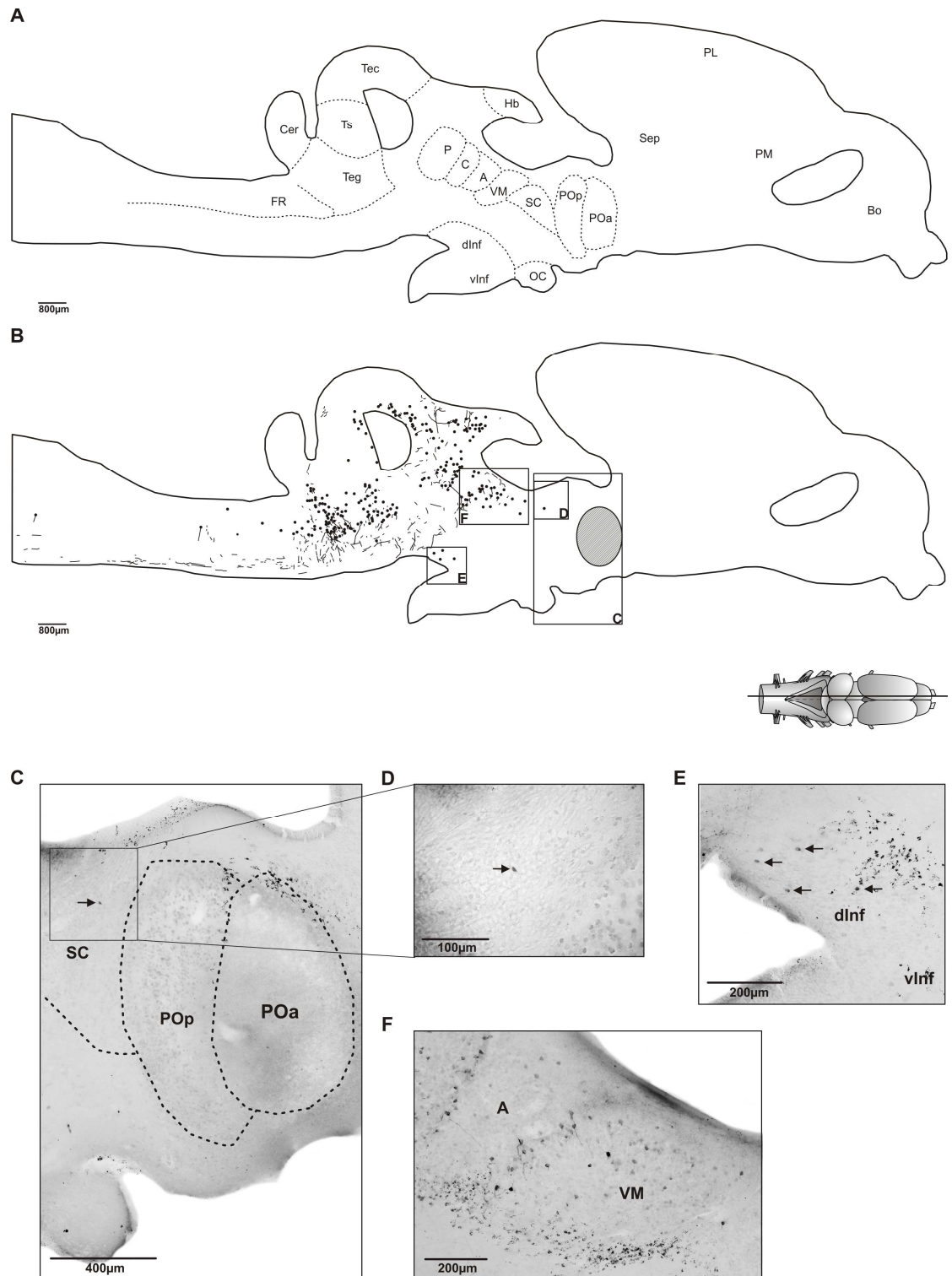


Abbildung 21-S2: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (**A**), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins ventrale Neuropil darstellen (**B**). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen den Stimulationsbereich in der Area praeoptica (Abb. **B-C**, graue Fläche), ein gefärbtes Neuron im Nucleus suprachiasmaticus (SC; Abb. **D**, schwarzer Pfeil), im Infundibulum, pars dorsalis (Abb. **E**) und im Nucleus thalami ventromedialis (VM; Abb. **F**). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balke repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

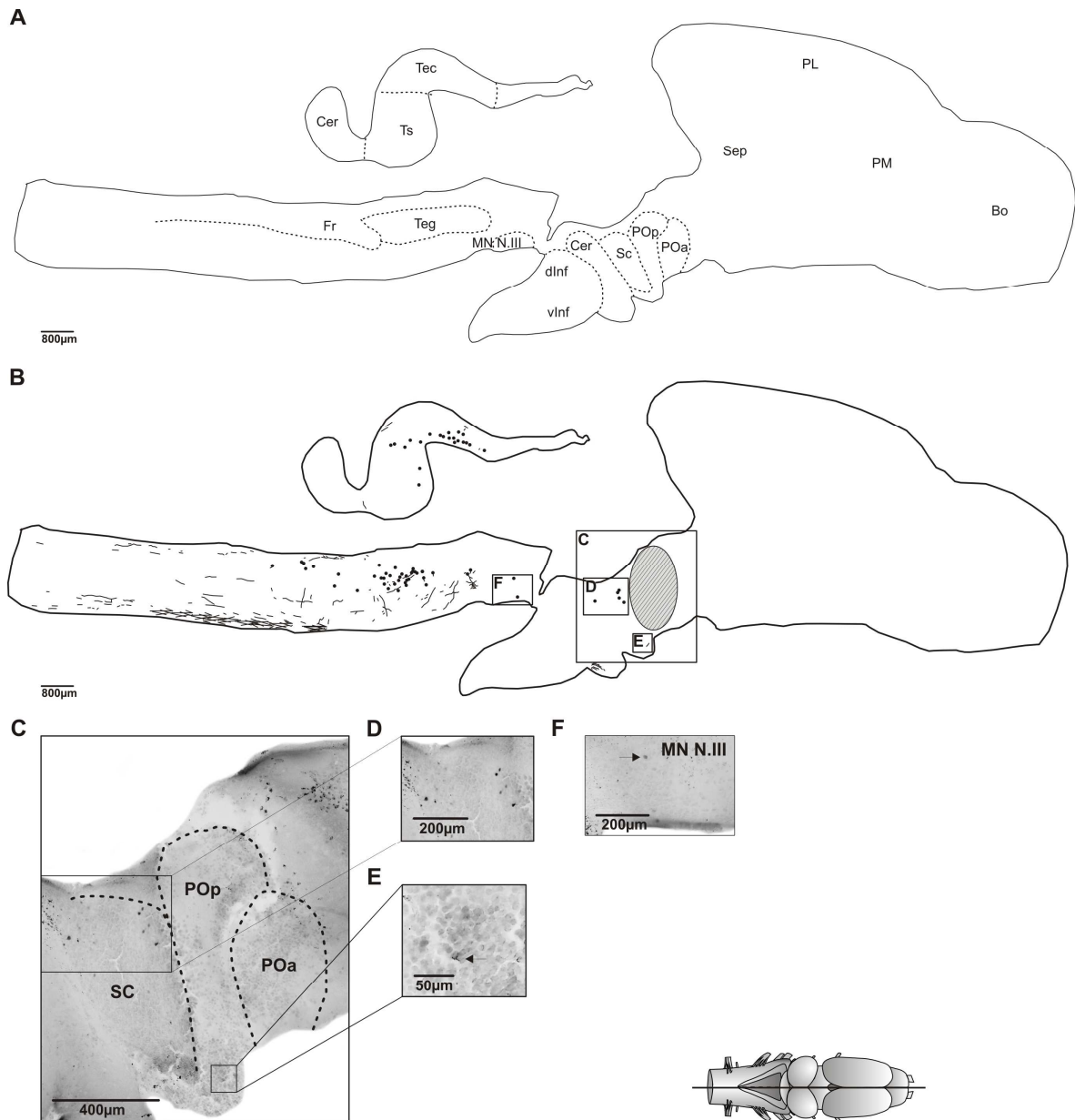


Abbildung 21-S3: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (A), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins ventrale Neuropil darstellen (B). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen den Stimulationsbereich in der Area praeoptica (Abb. B-C, graue Fläche), gefärbte Neurone im Nucleus suprachiasmaticus (SC; Abb. D), gefärbte Fasern im ventralen Zipfel des Nucleus praeopticus posterior (POp; Abb. E) und gefärbte Motoneurone des N.III (III_m; Abb. F, schwarze Pfeile weisen auf gefärbte Neurone hin). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balke repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

3.2.5.2 Applikation in das ventrale Tegmentum

Abbildung 22 (Schnittebene 1-4) repräsentiert den Verlauf eines Neurobiotin-Tracings nach Applikation in das ventrale Tegmentum, wobei hier die starke Färbung im Bereich des Einstichortes auffällt (Abb. 22-S1/C). Insgesamt konnte ein starker retrograder Transport beobachtet werden, der im Wesentlichen eine erhöhte Anzahl markierter Somata und Fasern in rostraler Ausdehnung aufwies. Im Bereich der Medulla oblongata konnten nur sehr wenige Fasern detektiert werden, was durch die Läsion neben der Einstichstelle begründet sein könnte (Abb. 22-S1/C).

Im Vergleich mit dem vorherigen Tracing (3.2.5.1) konnte an dieser Stelle ein angefärbtes Neuron im Nucleus praeopticus anterior (POa) nachgewiesen werden (Abb. 22-S4/C). Da der Marker Neurobiotin sowohl von Strukturen des Neuropils als auch vom Tegmentum aufgenommen wurde, könnten möglicherweise efferente Fasern des Nucleus praeopticus anterior durch beide Areale laufen. Die Tatsache, dass der Transport hier geringer ausfiel als im vorherigen Tracing, bestärkt eher den Verlauf der Projektionen durch das Tegmentum, wenngleich die Stimulation in der Area praeoptica wesentlich kleiner war als in dem Tracing zuvor (Abb. 21-S2/C und 21-S3/C). Der Nucleus praetrigeminalis (Prtr) war gänzlich frei von angefärbten Strukturen (Abb. 22-S1/E), was ebenfalls durch die größere Läsion neben der Einstichstelle bedingt sein könnte.

Im Infundibulum, pars dorsalis (dInf) konnten nur vereinzelt markierte Neurone nachgewiesen werden (Abb. 22-S2/C und 22-S3/C). Die Verteilung der detektierten Somata entsprach den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Tracings (Abb. 19-S4/C und 21-S2/E). Im Tuberculum posterior (Tp, Abb. 22-S3/E), das mit der Substantia nigra, pars compacta der Säugetiere homologisiert wird und zu den Basalganglien gehört, konnten weitere markierte Neurone registriert werden. Eine Beteiligung der Basalganglien während des Vokalisationsprozesses wurde bereits bei verschiedenen Vertebraten nachgewiesen (Kao et al. 2005; Schwartz et al. 2011). Im Thalamus wurden gefärbte Somata im Nucleus thalami ventrolateralis (Vlv), Nucleus thalami ventrodorsalis (Vld) und im Nucleus thalami ventromedialis (VM) nachgewiesen (Abb. 22-S1/D und Abb. 22-S2/D). Dies bestätigt die Ergebnisse der

vorliegenden Neurobiotin-Tracings, ebenso die angefärbten Somata im Tegmentum (Teg; Abb. 22-S2/E).

Eine Besonderheit war der markierte Bereich der Nuclei habenulares (Hb; Abb. 22-S4/E). Bei Säugetieren spielen die Nuclei habenulares eine wesentliche Rolle als motor-limbisches Interface, da sie hauptsächlich Informationen von pallialen, limbischen und hypothalamischen Afferenzen erhalten und selbst über den Fasciculus retroflexus zum Nucleus interpeduncularis und zum Nucleus raphé projizieren (Harris et al. 1996). Es ist anzunehmen, dass der Nucleus interpeduncularis oder der Fasciculus retroflexus durch die Mikroelektrode verletzt wurden, so dass der neuronale Marker retrograd bis zu den Nuclei habenulares transportiert wurde.

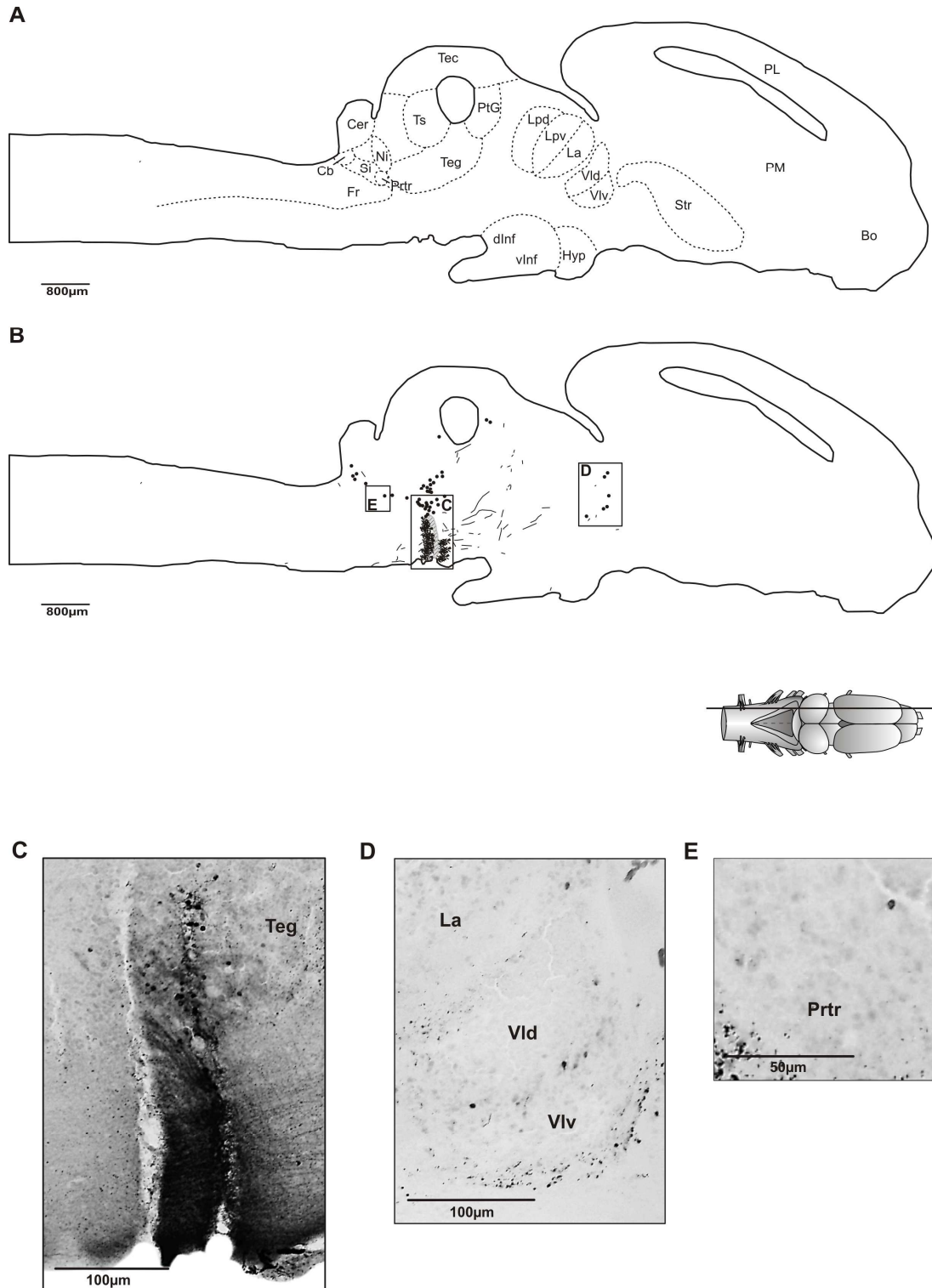


Abbildung 22-S1: Einstichstelle im Bereich des ventralen Tegmentum und Neuropil

Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (A), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien; die Einstichstelle ist grau/schraffiert dargestellt) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins Metencephalon darstellen (B). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen die Einstichstelle (Abb. C), den ventralen Thalamus (Vlv/Vld; Abb. D) und den Nucleus praetrigeminalis (Prtr; Abb. E). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balke repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

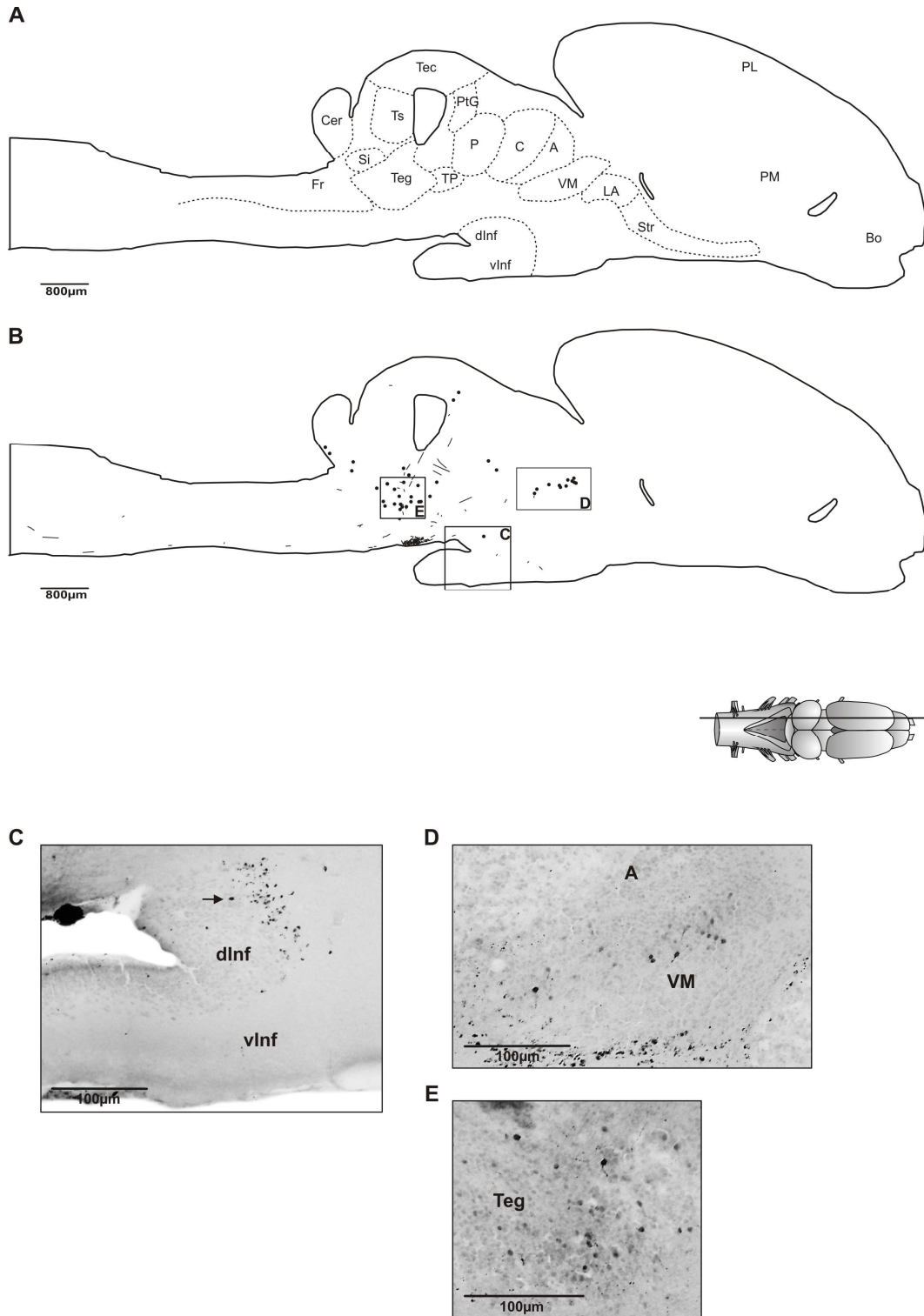


Abbildung 22-S2: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (**A**), die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins Metencephalon darstellen (**B**). Die Mikrofotografien präsentieren markierte Neurone zum einen im Bereich des Infundibulum (Inf; Abb. **C**, schwarze Pfeile), im Thalamus (VM; Abb. **D**) und im Tegmentum (Teg; Abb. **E**). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balke repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

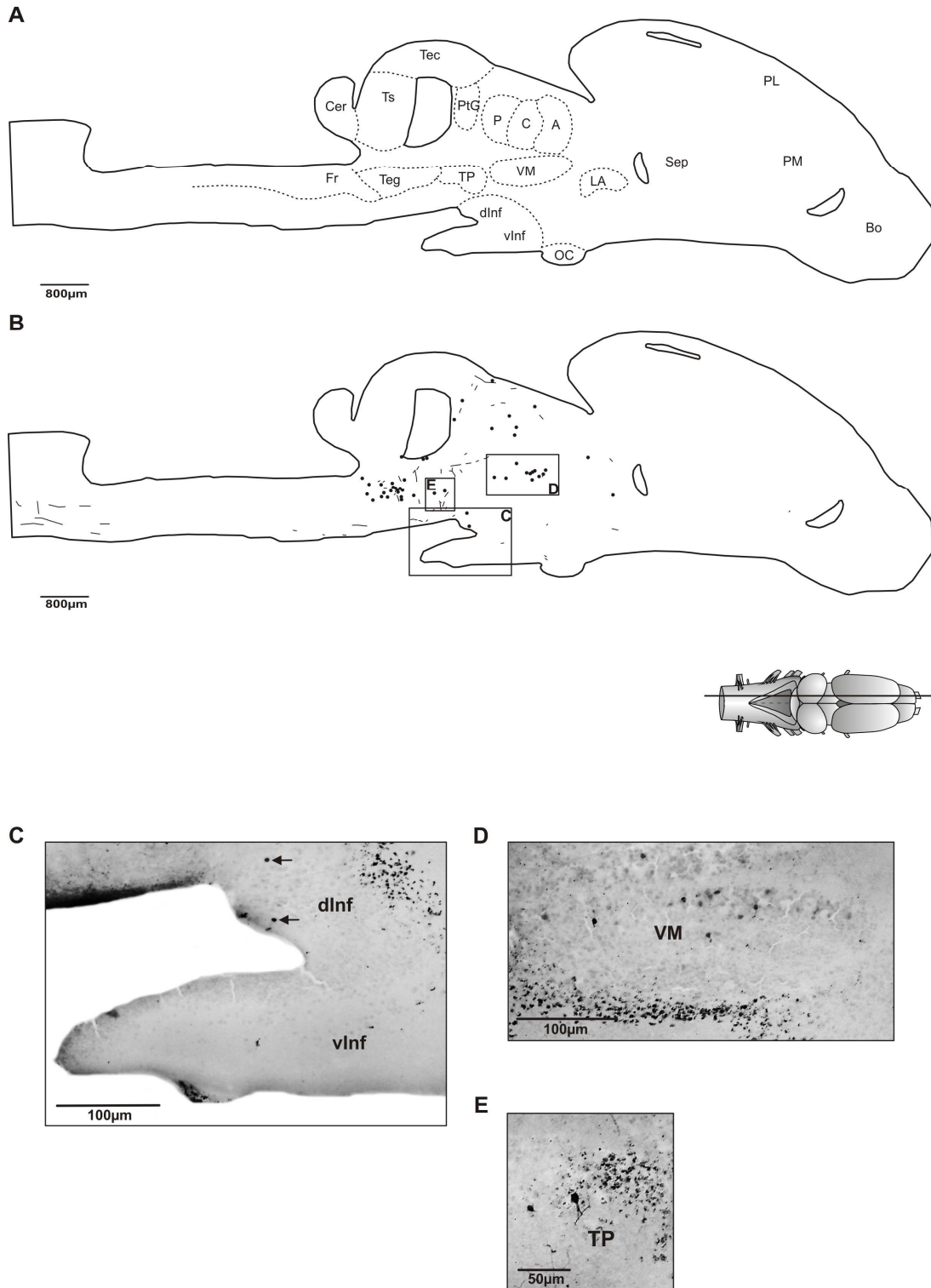


Abbildung 22-S3: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (**A**) und die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin, ins Metencephalon darstellen (**B**). Die Mikrofotografien präsentieren markierte Neurone im Bereich des Infundibulum (Inf; Abb. **C**, schwarze Pfeile), im Thalamus (VM; Abb. **D**) und im Tuberculum (TP; Abb. **E**). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balke repräsentiert die Höhe des Querschnitts.

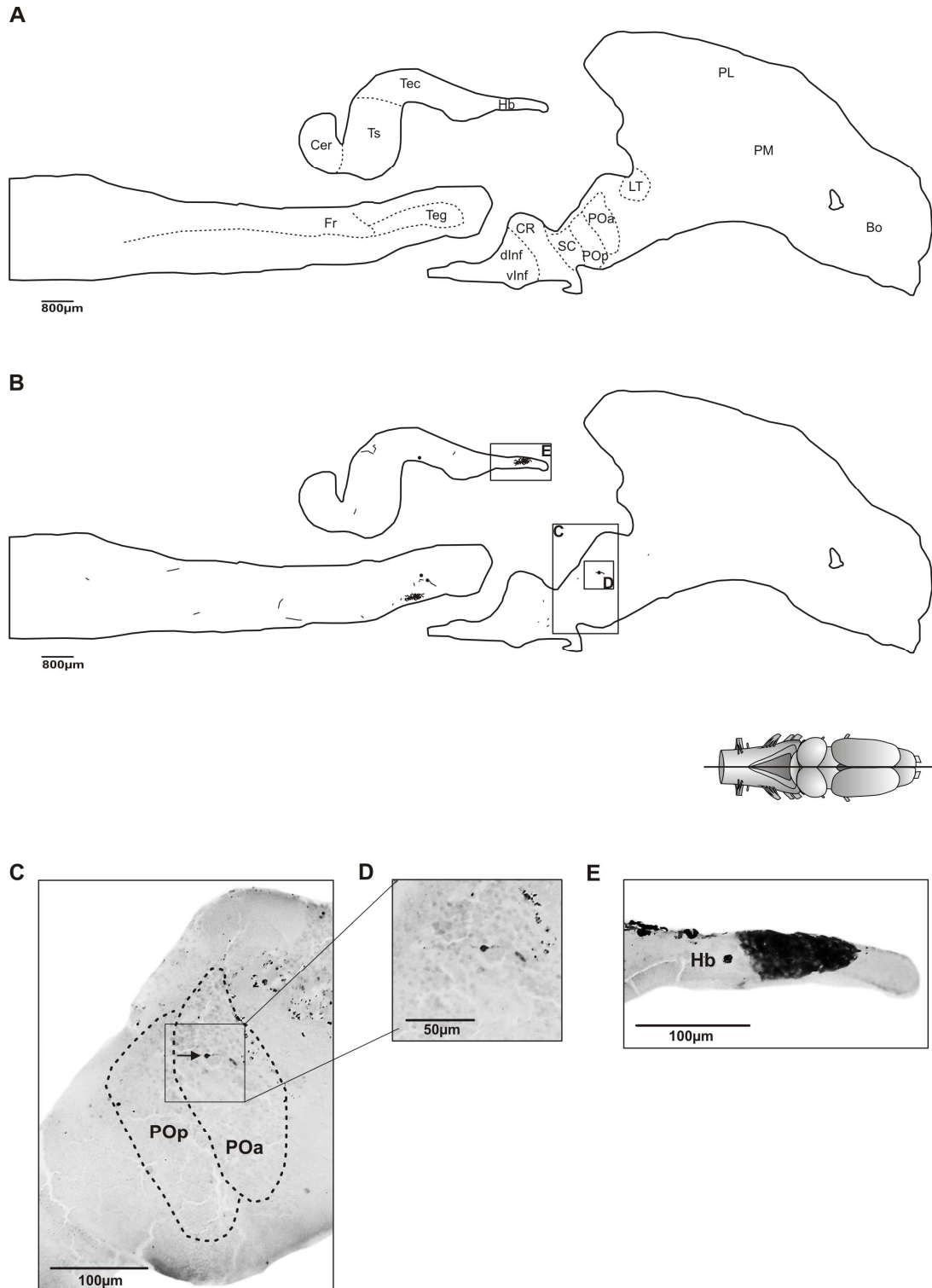


Abbildung 22-S4: Dargestellt sind schematische Sagittalschnitte durch das Gehirn, welche zum einen den Überblick der jeweiligen Kerngebiete im Schnitt (**A**) und die Verteilung von markierten Somata (Kreise) und markierten Fasern (feine schwarze Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin ins Metencephalon darstellen (**B**). Die Mikrofotografien präsentieren zum einen den Stimulationsbereich in der Area praeoptica (Abb. **C**, schwarzer Pfeil weist auf ein markiertes Neuron hin), ein gefärbtes Neuron im Nucleus praeopticus anterior (POa; Abb. **D**) und markierte Fasern in den Nuclei habenulares (Hb; Abb. **E**). Die Schnitt Ebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Der horizontale Balke repräsentiert die Höhe des Querschnitts

3.2.6 Verbindungen des Nucleus praetrigeminalis

Die folgenden Schemazeichnungen repräsentieren eine Übersicht der afferenten (rot) und efferenten (schwarz) Verbindungen der oben beschriebenen Tracer-Applikation im Bereich des Nucleus praetrigeminalis.

3.2.6.1 Applikation nahe der Somata

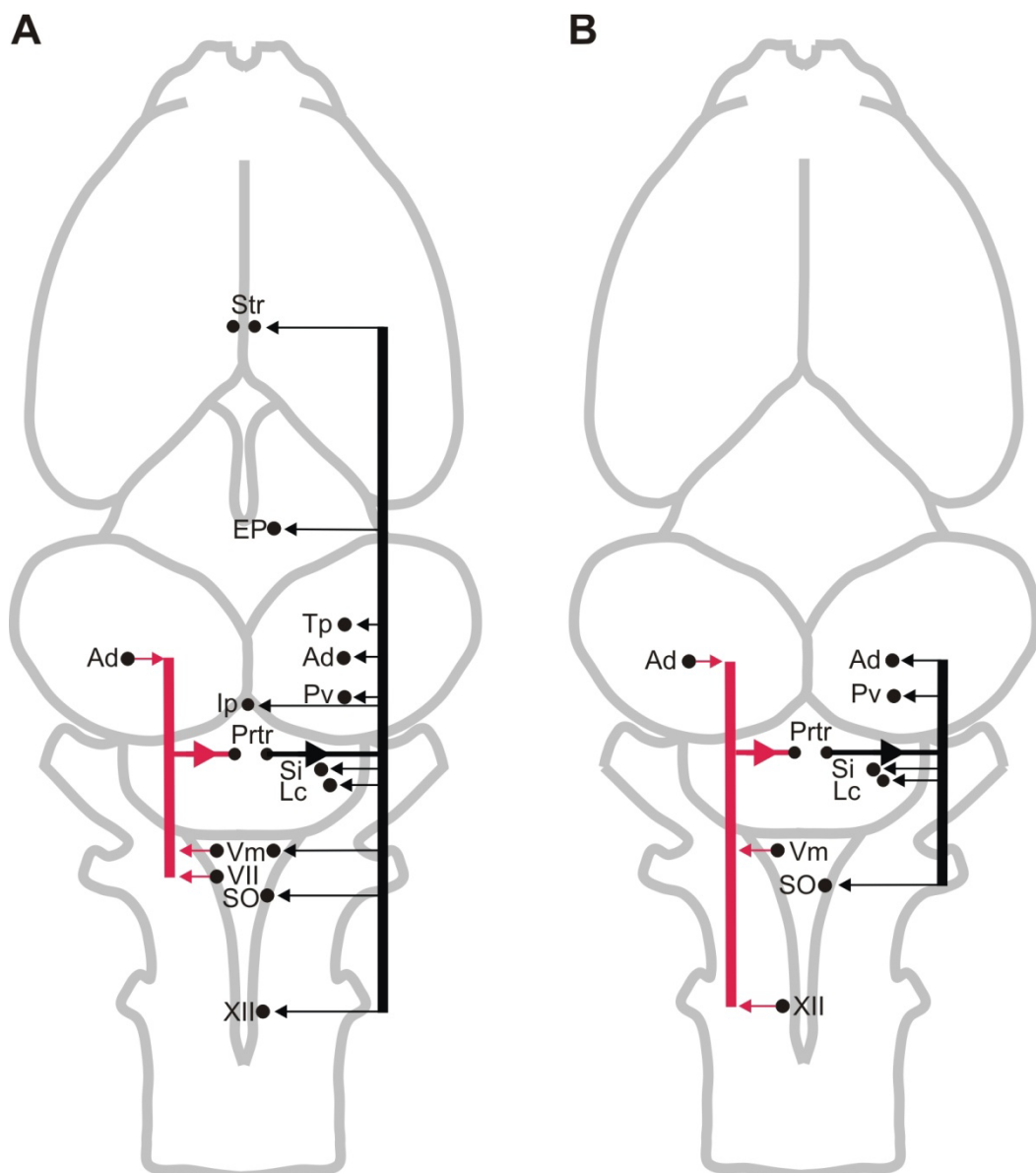


Abbildung 23: Afferente (rot) und efferente (schwarz) Verbindungen nach Applikation nahe der Somata des Nucleus praetrigeminalis

Abbildung A repräsentiert ein Neurobiotin-Tracing im rostralen Anteil des Nucleus praetrigeminalis und Abbildung B im caudalen Anteil des Nucleus praetrigeminalis.

3.2.6.2 Applikation im Dendritenfeld des Nucleus praetrigeminalis

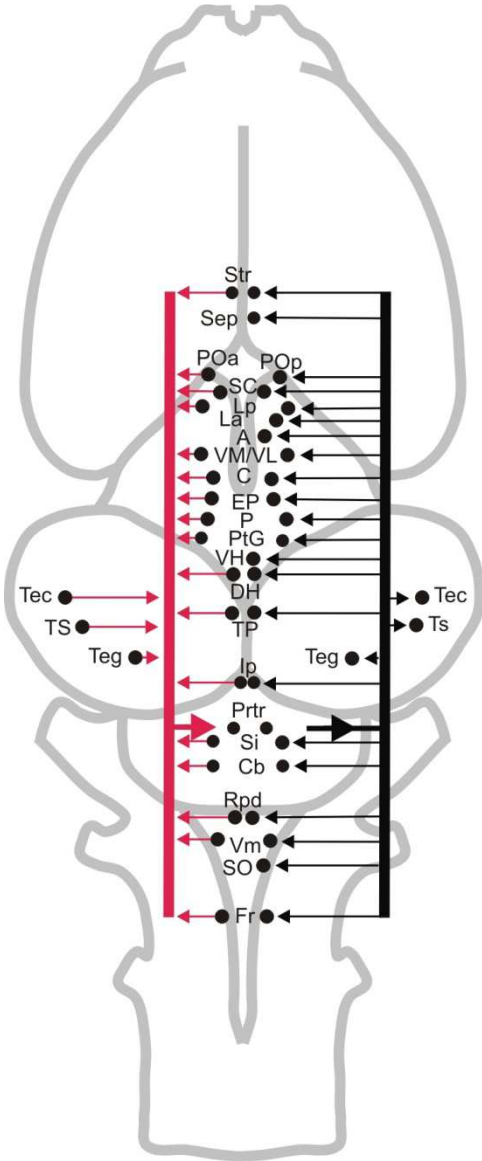


Abbildung 24: Afferente (rot) und efferente (schwarz) Verbindungen nach Applikation im Dendritenfeld des Nucleus praetrigeminalis

3.2.6.3 Kontrollapplikation im ventralen Tegmentum

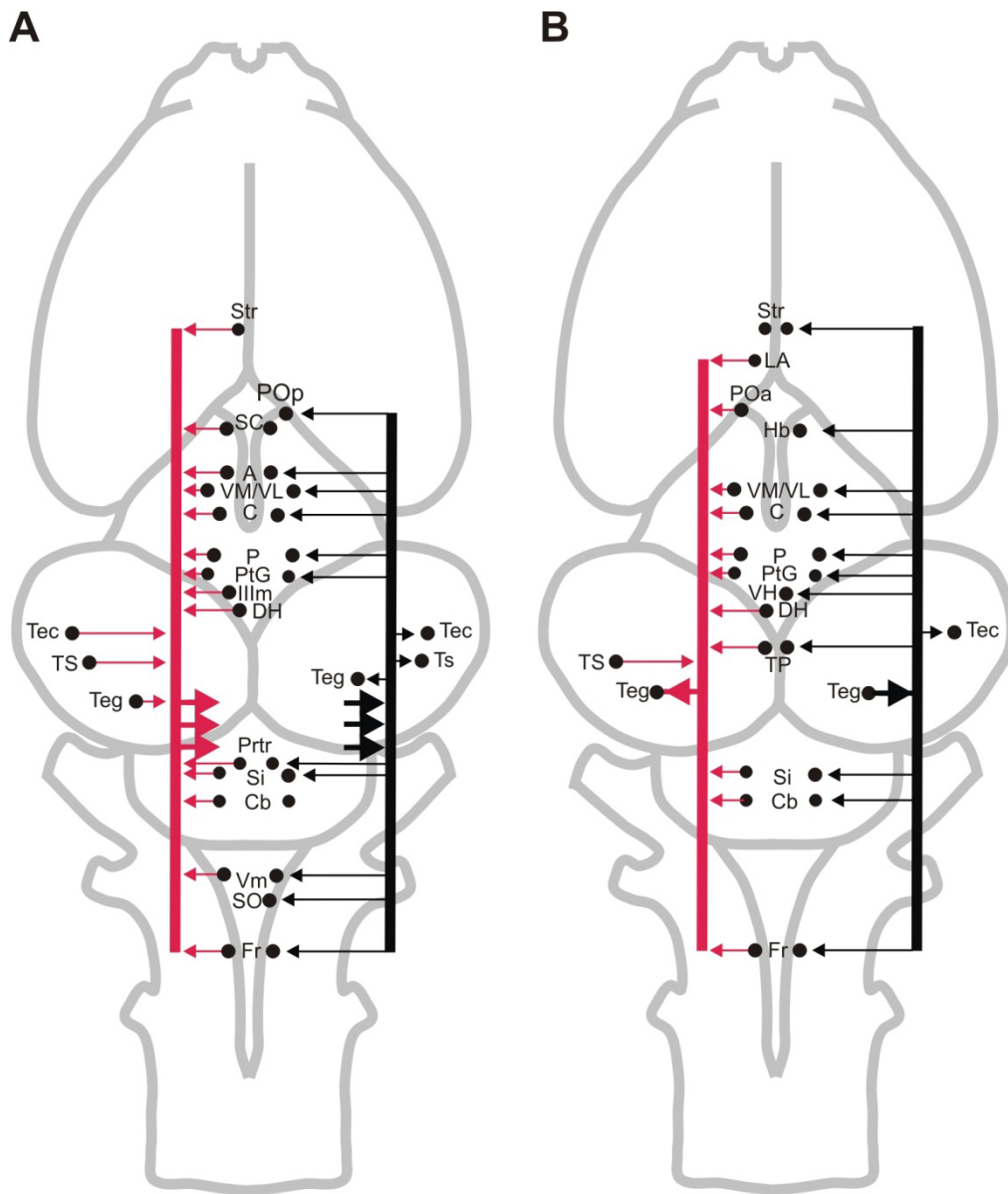


Abbildung 25: Afferente (rot) und efferente (schwarz) Verbindungen der Kontrollapplikationen
 Abbildung A repräsentiert ein multiples Neurobiotin-Tracing im ventralen Neuropil und Abbildung B im ventralen Tegmentum.

3.3 Afferenzen/ Efferenzen der Area praeoptica

3.3.1 Durchgeführte Experimente

Für die Aufklärung der Verschaltung zwischen der Area praeoptica, dem vokalen Schrittmacher, und dem Nucleus praetrigeminalis, dem vokalen Mustergenerator, wurden insgesamt zwanzig Doppel- und fünf Einzelfärbungen durchgeführt, die jedoch aufgrund des geringen Farbstofftransportes keine repräsentablen Ergebnisse bezüglich der angefärbten Somata und Fasern aufwiesen. Von den fünf Einzelfärbungen konnte ein Fluoreszenz-Tracing ausgewertet werden.

3.3.2 Applikation in die Area praeoptica

Abbildung 26 stellt ein Fluoreszenz-Tracing in der Area praeoptica dar. Für eine genauere Untersuchung der Konnektivität zwischen dem Nucleus praetrigeminalis und dem Nucleus praeopticus anterior war eine reziproke Färbung angestrebt – auch im Hinblick auf eventueller Zwischenstationen.

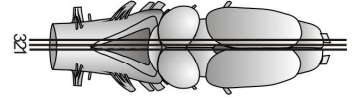
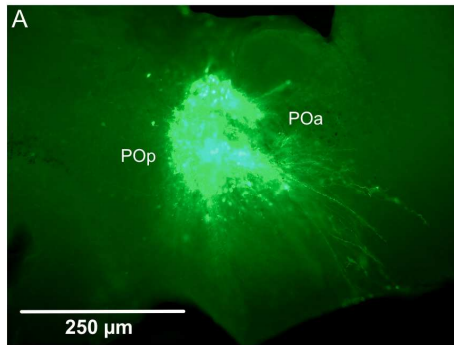
Die Einstichstelle lag im Bereich des Nucleus praeopticus anterior (POa) und des Nucleus praeopticus posterior (POp; Abb. 26-S1/A). Vorhergehende Versuche mit geringeren Farbstoffinjektionen zeigten meistens keinen Transport, weshalb bei weiterführenden Versuchen mehr Farbstoff injiziert wurde. Allerdings wurde auch hier größtenteils nur ein lokaler Transport beobachtet. Obwohl das Areal eine wichtige Rolle innerhalb des Reproduktionszyklus spielt und aus diesem Grund viele Eingänge aus dem gesamten Gehirn erhält, konnten in dieser Arbeit nur wenige Afferenzen und Efferenzen mit dieser Methode ermittelt werden.

Abbildung 26-S2/B und Abbildung 26-S3/B demonstrieren den Verlauf angefärbter Fasern und Terminalien zum Infundibulum. Außerdem konnte ein gefärbtes Neuron im Infundibulum, pars dorsalis (dInf) detektiert werden (Abb. 26-S2/B, weißer Pfeil). Sowohl die Area praeoptica als auch das Infundibulum sind wichtige endokrine Zentren und konzentrieren Sexualhormone (Kelley et al. 1975; Kelley 1980, 1981). Im Reproduktionszyklus modulieren akustische Signale beiden Strukturen, so dass das Infundibulum wahrscheinlich eine wichtige Funktion innerhalb des Vokalisationsnetzwerkes einnimmt.

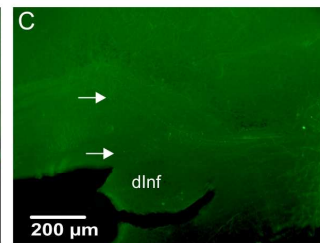
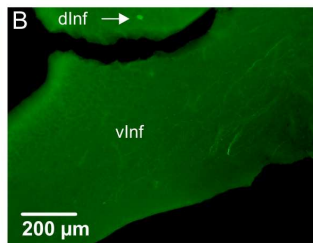
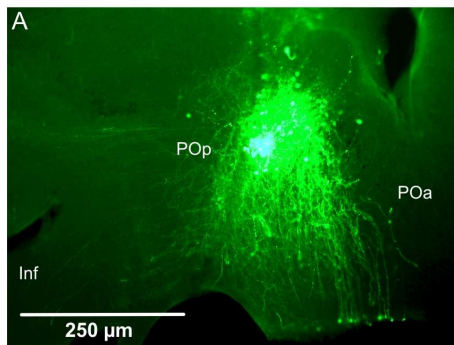
In guter Übereinstimmung mit den Tracing-Experimenten von Moreno & González (2004), konnten auch markierte Fasern in der Amygdala, pars lateralis (LA), verifiziert werden (Abb. 26-S3/A). Weitere Verbindungen mit limbischen Strukturen, wie z.B. dem Septum, konnten jedoch nicht beobachtet werden, obwohl diese neuroanatomisch und elektrophysiologisch nachgewiesen wurden (Walkowiak 1999; Endepols et al. 2005; Roden et al. 2005). Das Striatum (Str) und der Nucleus anterior thalami (A) enthielten auch einige markierte Somata und Fasern (Abb. 26-S3/A).

Insgesamt stimmen die hier ermittelten Daten mit den Ergebnissen von Brahic & Kelley (2003) überein, die ebenso Fluoreszenzfarbstoffe in den Nucleus praeopticus anterior von *Xenopus laevis* injizierten. Jedoch wies ihre Studie noch zusätzlich markierte Afferenzen/Efferenzen im Septum, im Pallium mediale und Nucleus raphé, pars dorsalis auf. Abb. 26-S2/C und Abb. 26-S3/C (weiße Pfeile) demonstrieren markierte Fasern, die in Richtung Tegmentum und eventuell zur Medulla oblongata ziehen. Wie weit diese Fasern ziehen und ob ein synaptischer Kontakt mit dem Nucleus praetrigeminalis vorhanden ist, konnte nicht ermittelt werden. Die markierten Kerngebiete geben jedoch einen Einblick über die Komplexität der akustischen Kommunikation, da viele Systeme involviert sind, wie z.B. das neuroendokrine System, das limbische System, sowie die Basalganglien.

Schnittebene 1



Schnittebene 2



Schnittebene 3

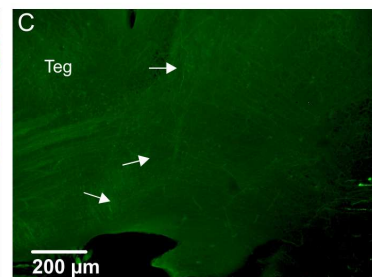
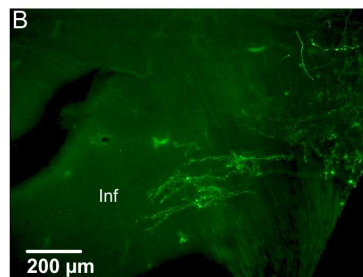
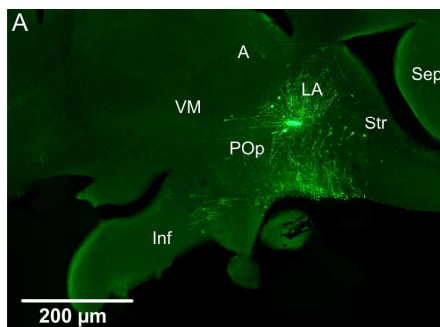


Abbildung 26: Einstichstelle in die Arera praeoptica

Dargestellt sind Mikrofotografien einzelner Schnittebenen, welche die Verteilung von markierten Somata und Fasern nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs Dextranamin-Alexa Fluor 488 (MG 10000 kDa) darstellen. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die horizontalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

3.3.3 Verbindungen der Area preoptica

Die folgende Schemazeichnung repräsentiert eine Übersicht der afferenten (rot) und efferenten (schwarz) Verbindungen nach Tracer-Applikation in die Area preoptica.

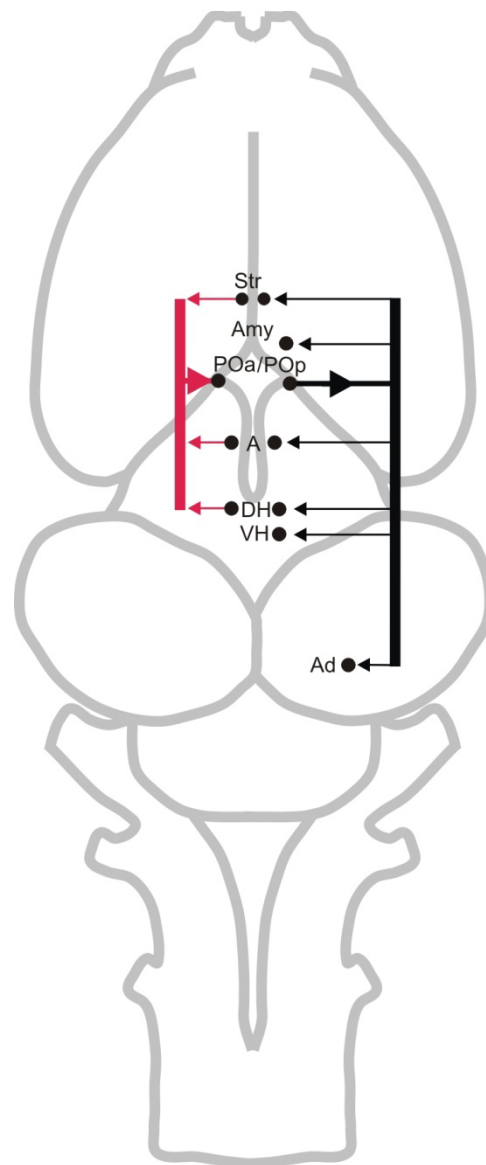


Abbildung 27: Afferente (rot) und efferente (schwarz) Verbindungen nach Applikation in der Area preoptica

3.4 Afferenzen/ Efferenzen des Infundibulum

3.4.1 Durchgeführte Experimente

Eine mögliche Zwischenstation ist das Infundibulum. Brahic & Kelley (2003) konnten mit ihrer anatomischen Studie zur Aufklärung der Vokalisationsbahn bei *Xenopus laevis* verschiedene Verbindungen zu vokalisationsrelevanten Kerngebieten nachweisen, z.B. zum vokalen Mustergenerator (DTAM), Nucleus raphé, pars dorsalis und zum Striatum. Es konnten ebenso starke reziproke Verbindungen zur Area praeoptica nachgewiesen werden (siehe 3.3). Um Aufschluss über seine Afferenzen und Efferenzen zu erhalten, wurden Fluoreszenzfarbstoffe in das Infundibulum appliziert. Insgesamt wiesen sechs männliche Versuchstiere markierte Fasern und Somata auf. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die erfolgreich durchgeführten Einzelfärbungen im Infundibulum. Die durchgeführten Doppelfärbungen wurden aufgrund des mangelnden Transportes nicht aufgelistet.

Tab. 5: Übersicht der durchgeführten Neurobiotin-Tracings im Infundibulum und über die Kerngebiete, die Afferenzen und Efferenzen enthielten. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste. Rote Sterne (*) weisen auf die dargestellten Tracings hin.

Spezies/Datum	Applikationsort	Afferenzen	Efferenzen
*Bo/20110503 (2)	vInf/dInf	POa, Pop, Str, LA, Ad, Vm	POa, POp, VM, VL
Bo/20110614	Inf	minimale Färbung	
Bo/20120122	dInf und SC im Neuropil	vInf, VH, EP, POp, POa	vInf, Av
Bo/20120128	dInf/vInf	lokale Färbung	
*B0/20120131	vInf/dInf	POa, POp; SC, Ad, Pd	POa (NP), SC, VH, Av; Ad
Bo/20120223	dInf im Neuropil	SC, P; Tpd	SC, vInf, VH

3.4.2 Applikation in das dorsale Infundibulum

Abbildung 28 präsentiert eine Fluoreszenzfärbung im Infundibulum. Die Einstichstelle (Abb. 28-1S/A; weißer Pfeil) liegt im Bereich des Terminationsgebietes von Fasern aus dem Nucleus praeopticus anterior, das in Abb. 28-S3/B dargestellt wurde. Angefärbte Somata und Fasern konnten sowohl im Infundibulum, pars ventralis (vInf) als auch im Infundibulum, pars dorsalis (dInf; Abb. 28-S1-3/A) verifiziert werden. Jedoch fehlte der distale Bereich, der bei der Präparation verloren ging.

Wie erwartet, wurden markierte Somata und Fasern im Nucleus praeopticus anterior (POa) und im Nucleus praeopticus posterior (POp) detektiert (Abb. 28-S1/A und Abb. 28-S2/A). Ein schwach gefärbtes Neuron in der Amygdala, pars lateralis (LA) und im Striatum (Str) konnte ebenso beobachtet werden (Abb. 28-S2/A und Abb. 28-S2/B). Von den thalamischen Subnuclei wurden einige Efferenzen im Nucleus thalami ventromedialis (VM; weißer Pfeil; Abb. 28-S2/A) und im Nucleus thalami ventrolateralis (VL; weißer Pfeil; Abb. 28-S3/A) beobachtet.

Zwei markierte Somata konnten im anterioren Tegmentum, pars dorsalis (Ad) identifiziert werden (Abb. 28-S2/C; weißer Pfeil), was mit den Neurobiotin-Tracings im Tegmentum übereinstimmt. Sowohl das dargestellte Tracing im posterioren Tegmentum als auch Tracings im anterioren Tegmentum (siehe Tabelle 5) wiesen markierte Somata und Fasern im Infundibulum, pars ventralis sowie im Infundibulum, pars dorsalis auf.

Interessanterweise konnten markierte Motoneurone des Nervus trigeminus (Vm) detektiert werden (Abb. 28-S3/B), während der Nucleus praetrigeminalis keine angefarbten Strukturen enthielt.

3.4.3 Applikation in das dorsoventrale Infundibulum

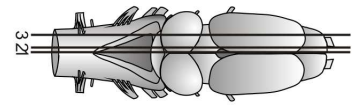
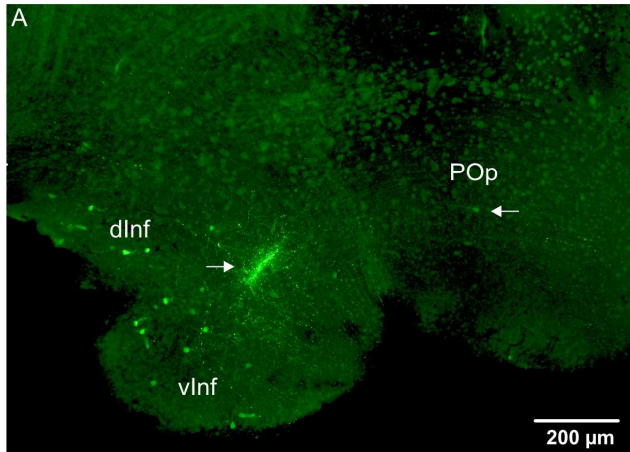
Das in Abbildung 29 dargestellte Fluoreszenz-Tracing wies ebenfalls markierte Neurone und schwach gefärbte Fasern im anterioren Tegmentum, pars dorsalis und im posterioren Tegmentum, pars dorsalis (Ad, Pd; Abb. 29G/H/I) auf. Die Einstichstelle lag hier im Grenzgebiet beider Subnuclei (Abb. 29F; weißer Pfeil). Das Infundibulum, pars ventralis (vInf) wies in caudaler Ausdehnung mehr markierte Somata auf, wohingegen angefärbte Fasern bis zum Nucleus hypothalamicus ventralis (VH; Abb. 29G/D) liefen. Im Infundibulum, pars dorsalis konnten gefärbte Strukturen vermehrt im rostralen Anteil detektiert werden, wobei die Fasern größtenteils im lateralen Neuropil lagen (Abb. 29E).

Es wurden auch vereinzelte Neurone sowohl im Nucleus praeopticus anterior (POa), Nucleus praeopticus posterior (POp) als auch im Nucleus suprachiasmaticus (SC) angefärbt (Abb. 29A/B/C), aber auch hier konnten keine gefärbten Neurone und Fasern im Nucleus praetrigeminalis beobachtet werden.

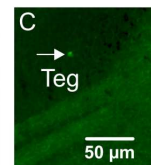
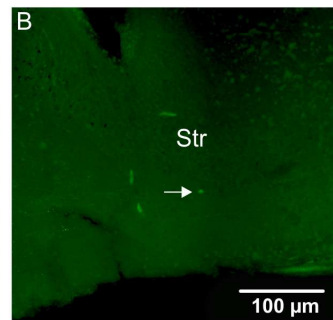
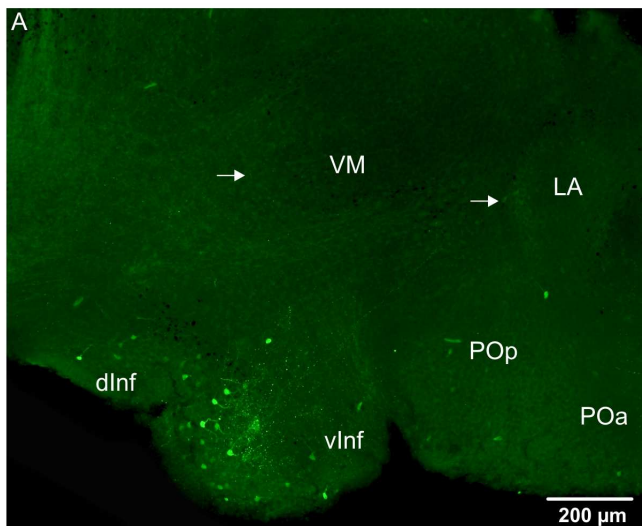
Abbildung 28: Einstichstelle in das Infundibulum

Dargestellt sind Mikrofotografien einzelner Schnittebenen, welche die Verteilung von markierten Somata und Fasern nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs Dextranamin-Alexa Fluor 488 (MG 10000 kDa) darstellen. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die horizontalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

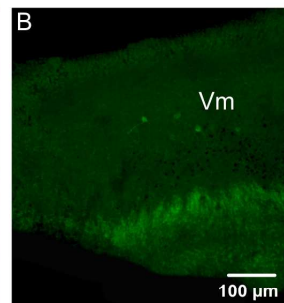
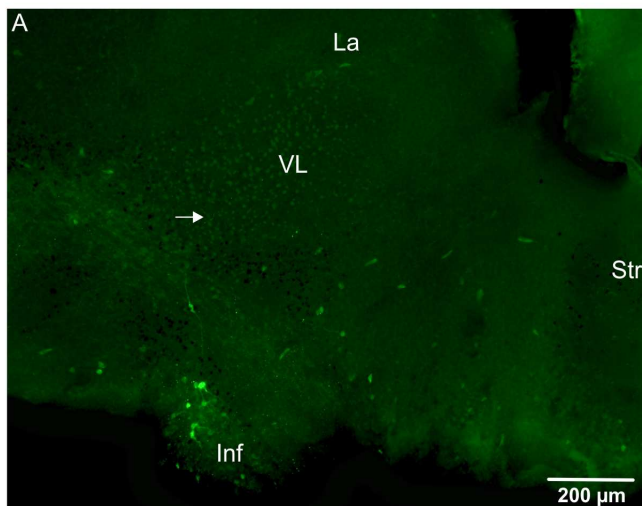
Schnittebene 1



Schnittebene 2



Schnittebene 3



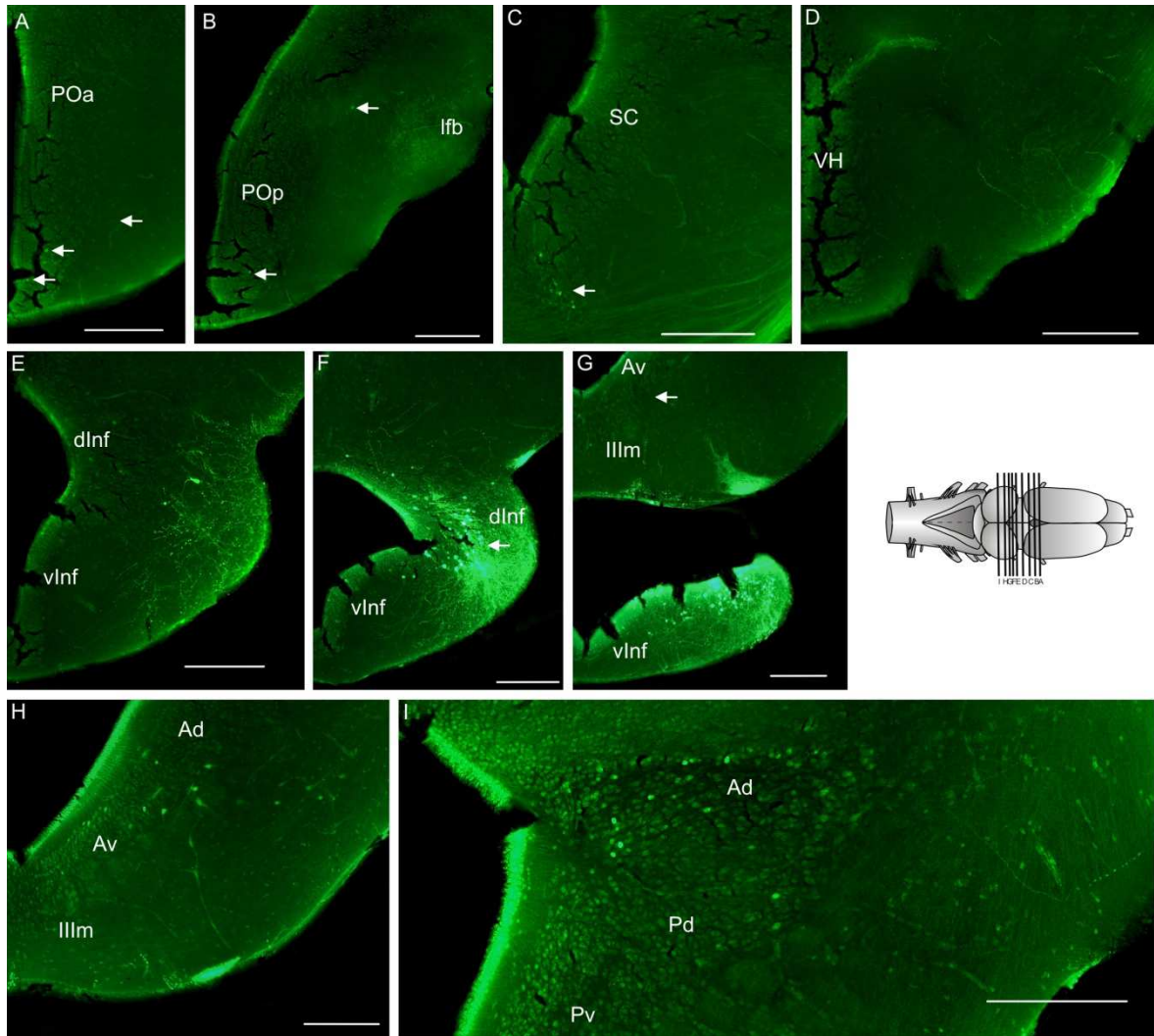


Abbildung 29: Einstichstelle in das Infundibulum

Dargestellt sind Mikrofotografien einzelner Schnittebenen, welche die Verteilung von markierten Somata und Fasern nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs Dextranamin-Alexa Fluor 488 (MG 10000 kDa) darstellen. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte. Maßstab= 200 µm

3.4.4 Verbindungen des Infundibulum

Die folgenden Schemazeichnungen repräsentieren eine Übersicht der afferenten (rot) und efferenten (schwarz) Verbindungen nach Tracer-Applikation in das dorsale Infundibulum (A), und in das dorsoventrale Infundibulum (B).

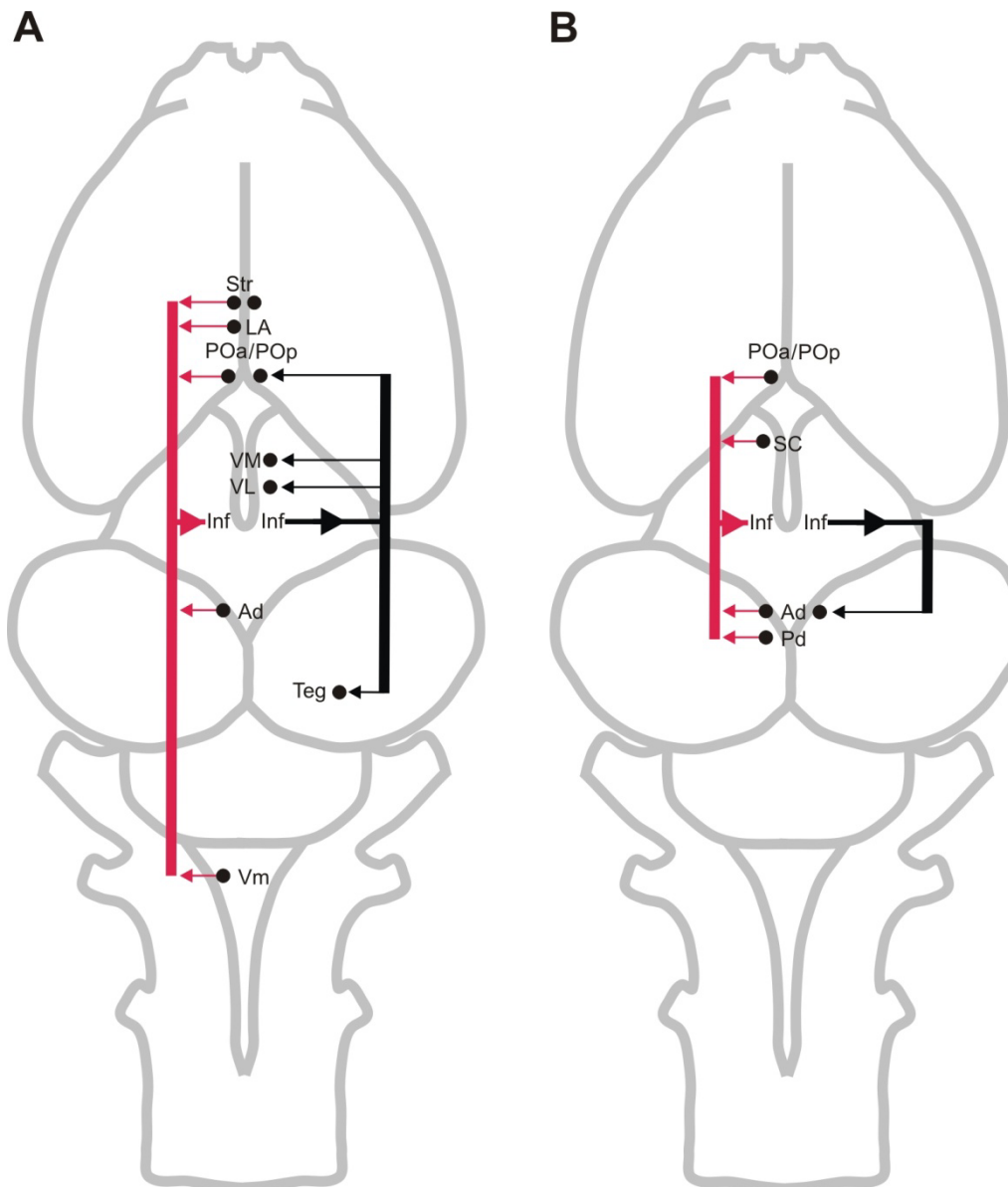


Abbildung 30: Afferente (rot) und efferente (schwarz) Verbindungen nach Applikation in das Infundibulum

3.5 Afferenzen/ Efferenzen des Tegmentum

3.5.1 Durchgeführte Experimente

Insgesamt wurden elf männliche chinesische Rotbauchunken für die Tegmentum-Färbungen verwendet (Applikationsorte, siehe Abb. 31). Alle Neurobiotin-Tracings wurden an medio-sagittal getrennten Gehirnen durchgeführt, weil dadurch die Applikation des Markers präziser ausgeführt werden konnte. Die in Tabelle 6 erfassten Versuchstiere enthielten alle markierte Somata im Nucleus praeopticus anterior und markierte Efferenzen im Nucleus praetrigeminalis – eine Voraussetzung für die Funktion als Zwischenstation innerhalb der Vokalisationsbahn. Sowohl im Nucleus praeopticus als auch im Nucleus praetrigeminalis gab es reziproke Verbindungen zum Tegmentum, die auf einen Feedback-Mechanismus schließen lassen. Die reziproke Verbindung zwischen dem Nucleus praetrigeminalis und dem Tegmentum war stärker als die zwischen dem Nucleus praeopticus anterior und dem Tegmentum und nicht in allen Versuchen konnten markierte Efferenzen im Nucleus praeopticus anterior lokalisiert werden.

Alle exemplarischen Gesamtdarstellungen enthielten sowohl im Nucleus praeopticus anterior als auch im Nucleus praetrigeminalis markierte Somata und Fasern (Abb. 37).

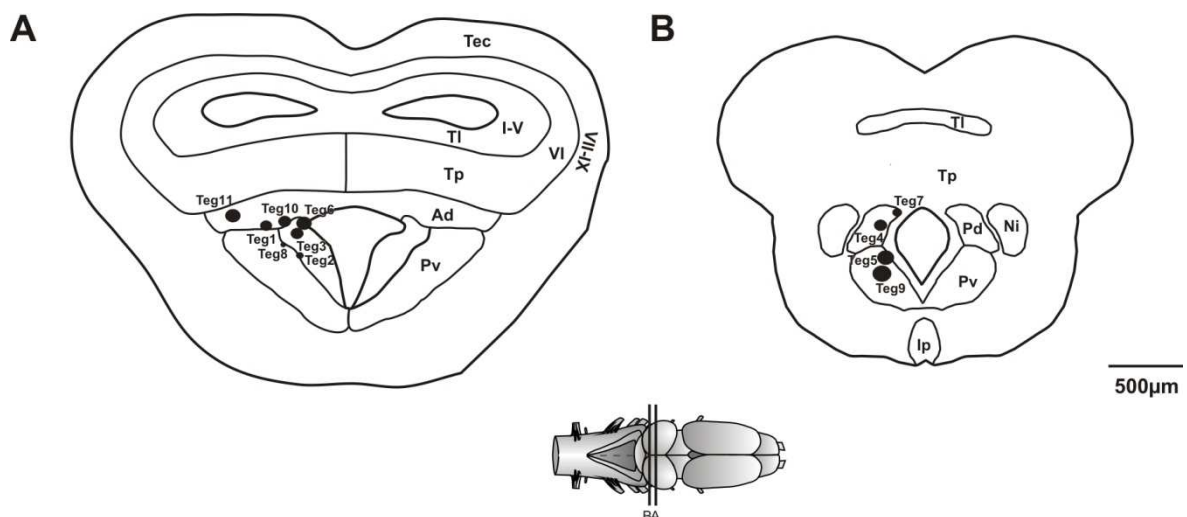


Abbildung 31: Übersichtszeichnung der Tegmentum-Applikationen

Tab. 5: Übersicht der durchgeführten Neurobiotin-Tracings im Tegmentum und über die Verteilung von Afferenzen/Efferenzen im Nucleus praetrigeminalis, im Nucleus praeopticus anterior und im Infundibulum. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste. Rote Sterne (*) weisen auf die dargestellten Tracings hin.

Applikations- ort	Spezies/ Datum	Lage des Applikations- ortes	Ø (µm)	Bemerkung
Teg1	Bo/m/20060220 (1)	adTeg	127	POa: Zellen, Fasern Prtr: Zellen, Fasern Inf: Zellen, Fasern
Teg2	Bo/m/20060328 (2)	mNP; vTeg	57	POa: Zelle preV: Fasern
Teg3	Bo/m/20060626 (2)	Ad/pvTeg;	115	POa: wenige Zellen Prtr: Zelle, Fasern Inf: Zellen Schnitte defekt
Teg4	Bo/m/20060712 (1)	mNP; pd/pV Teg	115	POa: Zellen Prtr: Zellen; Fasern
*Teg5	Bo/w/20061206 (2)	pvTeg	150	POa: Zellen Prtr: Zellen, Fasern Inf: Zellen, Fasern
Teg6	Bo/m/20061219 (1)	mNP; pvTeg	189	POa: Zellen Prtr: Zellen, Faser Inf: Zellen, Fasern Schnitte defekt
Teg7	Bo/w/20070221 (1)	pdTeg	59	POa: Zellen Prtr: Zellen, Fasern
*Teg8	Bo/m/20070228 (1)	pvTeg	30	POa: Zellen Prtr: Zellen, Faser Inf: Zellen
Teg9	Bo/m/20070307 (1)	pvTeg	162	POa: Zellen, Fasern Prtr: Zellen, Fasern Inf: Zellen, Fasern
Te10	Bo/m/20070307 (2)	ad/pvTeg	157	POa: Zellen, Fasern Prtr: Zellen, Fasern Inf: Zellen, Fasern
*Te11	Bo/m/2007	adTeg		POa: Zellen Prtr: Zellen; wenige Fasern Inf: Zellen, Fasern

3.5.2 Applikation in das posteriore Tegmentum, pars ventralis

Das posteriore Tegmentum, pars ventralis war mit einigen Kerngebieten des Telencephalon, Diencephalon, Metencephalon sowie mit der Medulla oblongata verschaltet. Abbildung 32 und Tabelle I (siehe Anhang) geben einen Gesamtüberblick über die Verbindungen.

Afferenzen:

Im Telencephalon waren wenige Neurone retrograd markiert. Im Striatum (Str) konnten vereinzelt gefärbte Somata beobachtet werden, wobei diese entweder im dorsalen oder im ventralen Anteil lagen. Die intermediäre Zone war gänzlich frei von gefärbten Zellkörpern. Auch das Septum lateralis, pars dorsalis (Sld) und das Septum lateralis, pars ventralis (SIV) enthielten einige gefärbte Somata (Abb. 32A). Die Amygdala enthielt in den drei Subnuclei pars centralis (CA), pars lateralis (LA) und in der pars medialis (MA) jeweils ein markiertes Neuron. Die stärksten telencephalen Eingänge erhielt das posteriore Tegmentum, pars ventralis (Pv) aus dem Nucleus praeopticus anterior (POa; Abb. 32B). Der Nucleus praeopticus magnocellularis (MG; Abb. 32C) wies hingegen nur ein markiertes Neuron auf. In den pallialen Kerngebieten und im Bed Nucleus der pallialen Kommissur konnten keine markierten Somata verifiziert werden.

Im Diencephalon konnte eine hohe Anzahl gefärbter Somata im Nucleus suprachiasmaticus (SC) nachgewiesen werden, von denen die meisten im rostralen Anteil zu finden waren, und nur ein angefärbtes Neuron wurde weiter caudal detektiert (Abb. 32C-D).

Innerhalb des Thalamus wurde die geringste Anzahl gefärbter Neurone im Nucleus lateralis thalami, pars anterior (La) detektiert. Im rostralen Anteil des Nucleus anterior thalami (A) konnten eine höhere Anzahl markierter Neurone identifiziert werden. Der Nucleus centralis thalami (C) enthielt jeweils drei angefärbte Neurone im dorsalen und im ventralen Teil. Der ventrale Thalamus wies rostral weniger markierte Neurone auf als caudal. Hier konnte die Mehrheit gefärbter Neurone im Nucleus thalami ventromedialis (VM) detektiert werden. Auch der Nucleus thalami ventrolateralis (VL) wies afferente Verbindungen zum posterioren Tegmentum, pars ventralis auf: Im

rostralen Bereich lagen die Neurone sehr zerstreut im Kerngebiet, wohingegen die gefärbten Neurone im caudalen Anteil dorsolateral angeordnet waren. Im Nucleus posterior thalami (P) wurden sehr viele markierte Somata beobachtet, die im gesamten Kerngebiet verteilt waren (Abb. 32E). Die Anzahl markierter Somata nahm im gesamten Thalamus von rostraler bis caudaler Ausrichtung zu. Afferenzen aus dem Hypothalamus erhielt das posteriore Tegmentum, pars ventralis aus dem dorsalen Bereich des Nucleus hypothalamicus ventralis (VH). Im Nucleus hypothalamicus dorsalis (DH) wurden markierte Zellkörper beobachtet, die hauptsächlich medial lagen. Auch im Tuberculum posterior, pars dorsalis (Tpd) und im Tuberculum posterior, pars ventralis (Tpv) gab es nur wenig gefärbte Somata (Abb. 32E).

Im Mesencephalon konnte wiederum eine große Anzahl markierter Neurone detektiert werden. Im rostralen Tectum (Tec) lagen medial sehr viele angefärbte Somata, deren Anzahl in caudaler Richtung abnahm (Abb. 32E-F). In den Subnuclei des Torus semicircularis und des Tegmentum konnte ebenfalls eine hohe Anzahl retrograd markierter Neurone lokalisiert werden. Im Nucleus laminaris (TI) wurde in rostrocaudaler Ausdehnung eine Vielzahl markierter Neurone identifiziert, wo die Zellkörper im rostralen Anteil relativ medial und im intermediären Bereich lateral lagen und der caudale Anteil nur zwei markierte Somata enthielt. Der Nucleus principalis (Tp) enthielt lediglich im rostralen Anteil angefärbte Somata, die dorsolateral lokalisiert waren. Der caudale Bereich war gänzlich frei von markierten Zellen. Tegmentale Afferenzen zum posterioren Tegmentum, pars ventralis kamen sowohl aus dem anterioren Tegmentum, pars dorsalis und ventralis (Ad, Av) als auch aus dem posterioren Tegmentum, pars dorsalis (Pd; Abb. 32F-H), nur der Nucleus interpeduncularis (Ip) war frei von gefärbten Zellkörpern.

Afferente Verbindungen aus dem Metencephalon waren hauptsächlich im Nucleus praetrigeminalis (Prtr) lokalisiert. Innerhalb des Nucleus isthmi (Ni) zeigten sich markierte Afferenzen, die wahrscheinlich aus Verletzungen der Fibers of Passage resultierten. Im Griseum centrale rhombencephali (GC) konnten ebenfalls markierte Neurone beobachtet werden (Abb. 32I).

Die Medulla oblongata zeigte nur schwache Projektionen zum posterioren Tegmentum, pars ventralis. In diesem Areal lagen gefärbte Somata größtenteils in der Formatio reticularis (Fr). Auch die erste und zweite Hörbahnstation, der Nucleus dorsomedullaris (DMN) und die Oliva superior (SO), enthielten jeweils ein markiertes Neuron (Abb. 32J-K), und vermutlich wurden auch hier Fibers of Passage angefärbt.

Efferenzen:

Im Telencephalon konnten schwache efferente Verbindungen im ventralen Anteil des Striatum (Str) beobachtet werden. Diese Axone erreichen das Striatum über das laterale Vorderhirnbündel. Sie enthielten jedoch keine Varikositäten und es konnte nicht festgestellt werden, ob die Fasern in andere telencephale Kerngebiete projizierten. Weiterhin wurden im Septum laterale, pars dorsalis (Sld) vereinzelte Axone detektiert, die lateral lokalisiert waren (Abb. 32A). Weiter caudal wurden hingegen viele varikose Axone beobachtet, die sich im Neuropil zwischen dem Nucleus praeopticus anterior und dem lateralen Vorderhirnbündel befanden. Die Fasern verzweigten sich zahlreich, auch innerhalb der Somata des Nucleus praeopticus anterior. Innerhalb des Kerngebietes wurden vereinzelte Axone detektiert, von denen Fasern in den Bereich der Amygdala, pars lateralis (LA) zogen. Es konnten jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, ob Faser von dem Nucleus praeopticus anterior zur Amygdala projizierten (Abb. 32B).

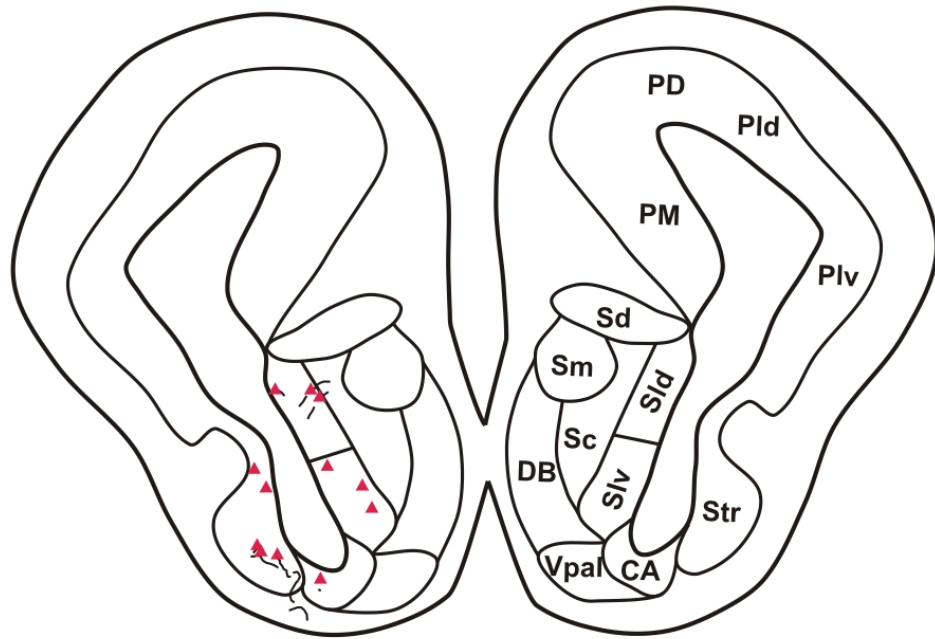
Im rostralen Diencephalon zogen über die gesamte rostrocaudale Ausdehnung markierte axonale Fasern am Ventrikel entlang, die sehr viele Varikositäten aufwiesen. Einige Fasern wurden auch im Neuropil markiert, die jedoch nicht so stark ausgeprägt waren. Innerhalb des Thalamus konnten in allen Subnuclei markierte Efferenzen detektiert werden. Die Faserdichte war dabei im Nucleus posterior thalami (P) und im caudalen Anteil des Nucleus anterior thalami am höchsten (Abb. 32C-E). Entlang des Nucleus entopeduncularis posterior (EP) lag ein dichtes Netz varikoser axonaler Fasern, die teilweise zum Nucleus anterior thalami (A) und zum Nucleus thalami ventrolateralis (VL) projizierten. Der Hypothalamus wie auch das posteriore Tuberculum enthielten in allen Kerngebieten vereinzelte efferente Fasern (Abb. 32D-E).

Das Praetectum enthielt eine relativ hohe Faserdichte: Die Axone zogen über die Commissura tecti zum Tectum opticum (Tec). Im Tectum opticum wurden hauptsächlich in den Schichten I-V efferente Verbindungen nachgewiesen, zudem konnte in rostrocaudaler Ausrichtung ein Fasertrakt entlang des Ventrikels beobachtet werden. Die Axone waren stark verzweigt und wiesen zahlreiche Varikositäten auf. Im Torus semicircularis wurden einige axonale Terminalien im Nucleus laminaris (TI) und im Nucleus principalis (PI) gefunden. Der Nucleus magnocellularis war frei von markierten Fasern. Im Tegmentum war die Faserdichte sehr hoch. Die Einstichstelle lag größtenteils im caudalen posteroventralen Tegmentum (Abb. 32H, Pfeil) und im ventrikulären Neuropil. Das gesamte Kerngebiet wies sehr viele varikose Axone und Terminalien auf. Im anterioren Tegmentum konnten relativ wenige markierte Fasern detektiert werden, von denen die meisten jedoch im anterioren Tegmentum, pars dorsalis lagen (Ad; Abb. 32G).

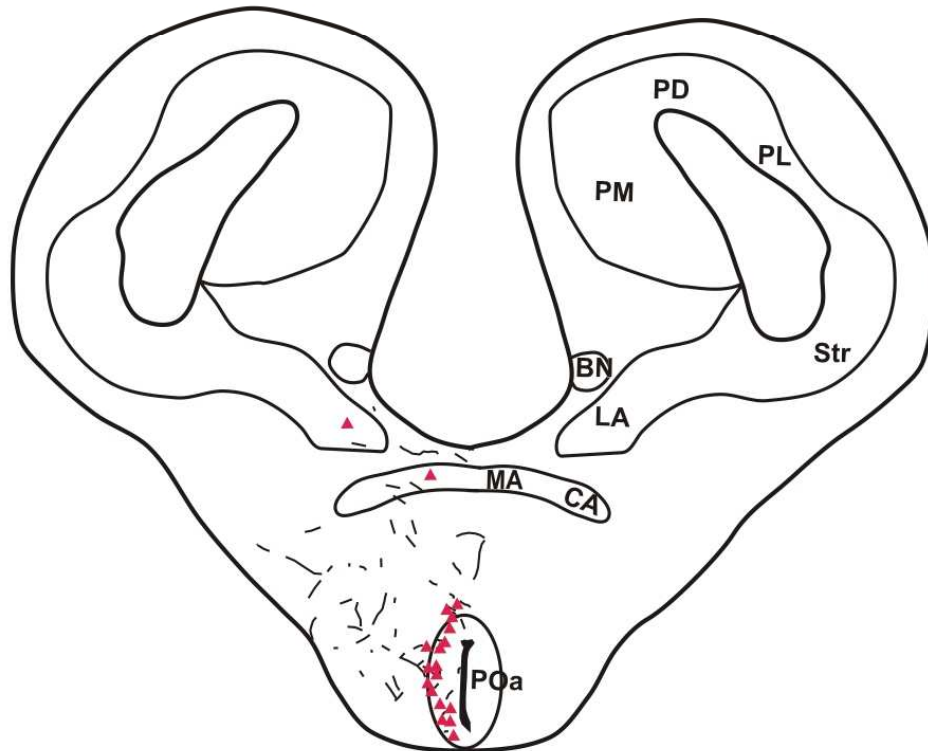
Viele efferente Fasern wurden im Hirnstamm beobachtet. Eine relativ hohe Anzahl von markierten Axonen, Varikositäten und Terminalien konnten im Nucleus praetrigeminalis (Prtr) verifiziert werden, die sich teilweise bis ins laterale Neuropil zogen. Ebenso enthielten der Nucleus secundarius isthmi (Si) und das Griseum centrale rhombencephali (GC) viele markierte Axone. Caudal des Griseum centrale rhombencephali lag ein relativ diffuses und dichtes Fasernetzwerk. Vereinzelt Fasern wurden auch im Locus coeruleus (LC) beobachtet (Abb. 32I).

Auch die ersten beiden Hörbahnstationen, Nucleus dorsomedullaris (DMN) und die Oliva superior (SO) wiesen einige efferente Fasern auf. Die Markierung war in rostrocaudaler Ausdehnung zu beobachten, ebenso wie in der Formatio reticularis (Fr), die auch varikose Axone enthielt (Abb. 32J-K).

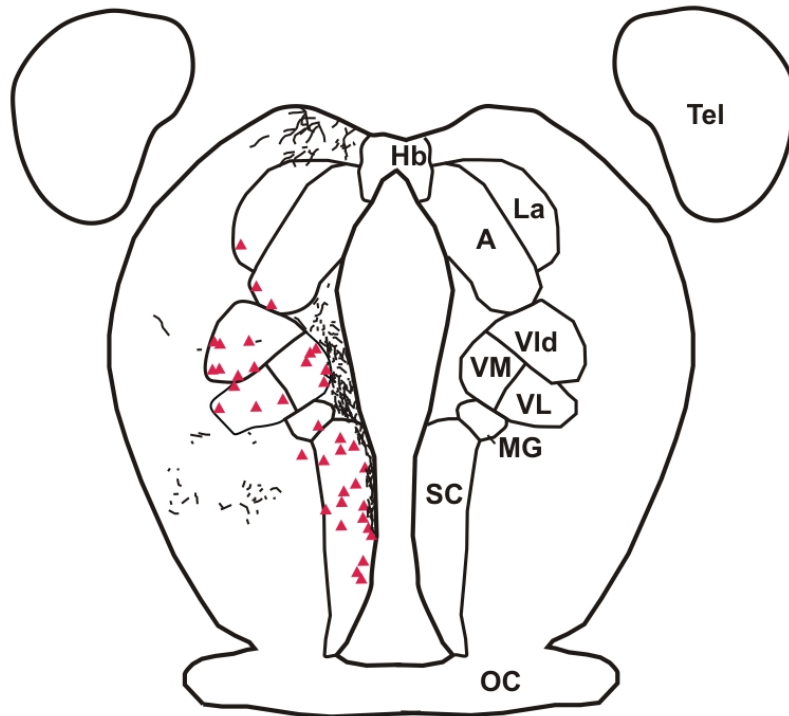
A



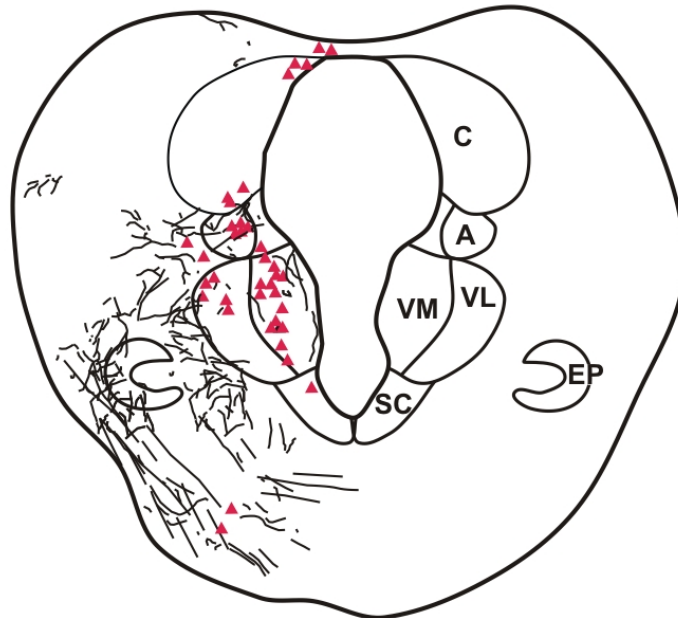
B



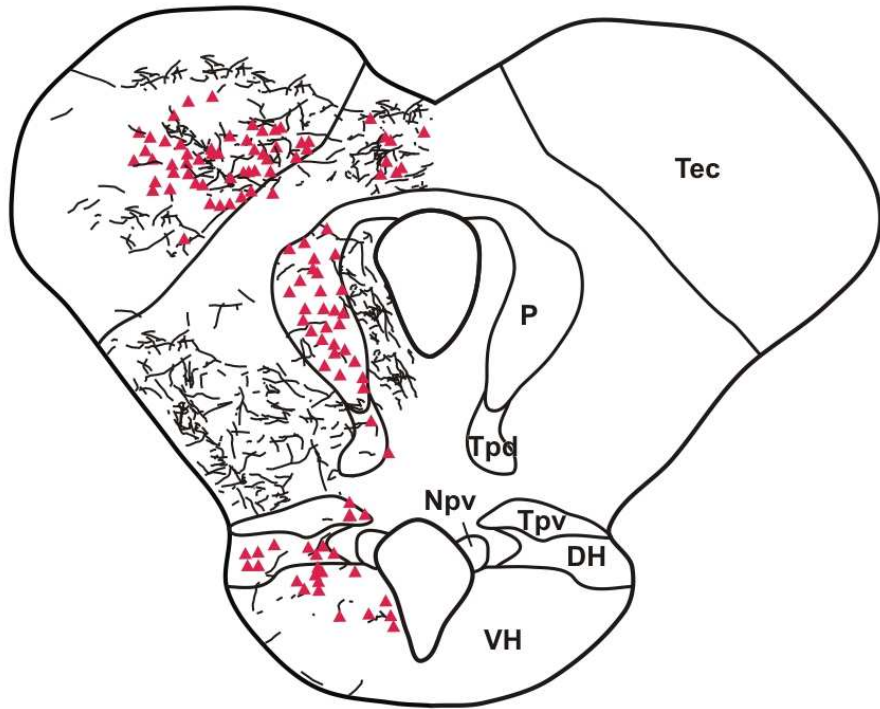
C



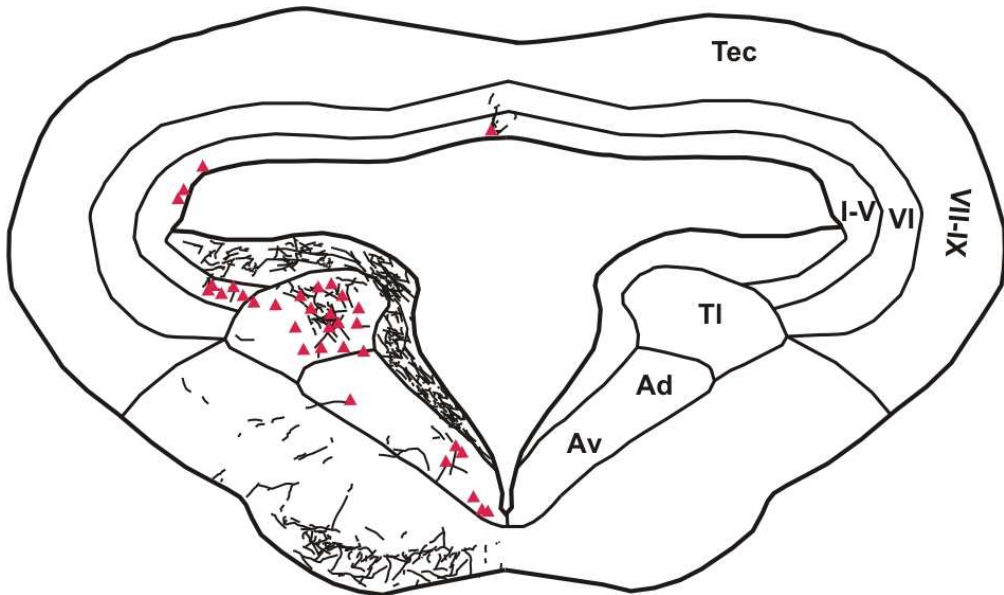
D



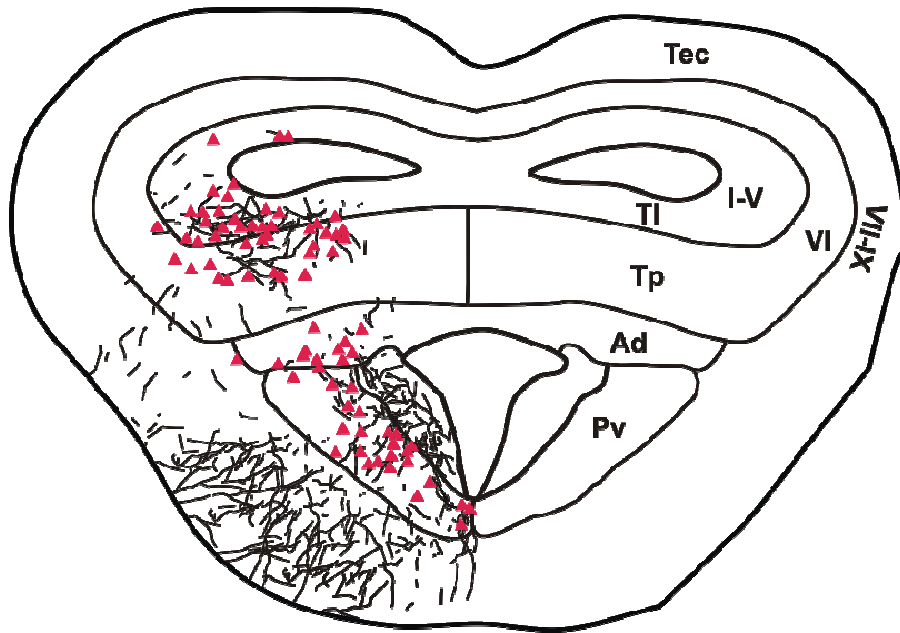
E



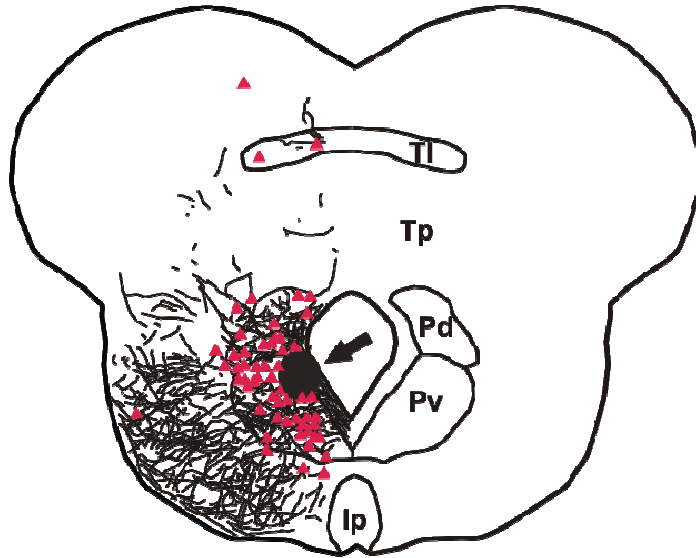
F



G



H



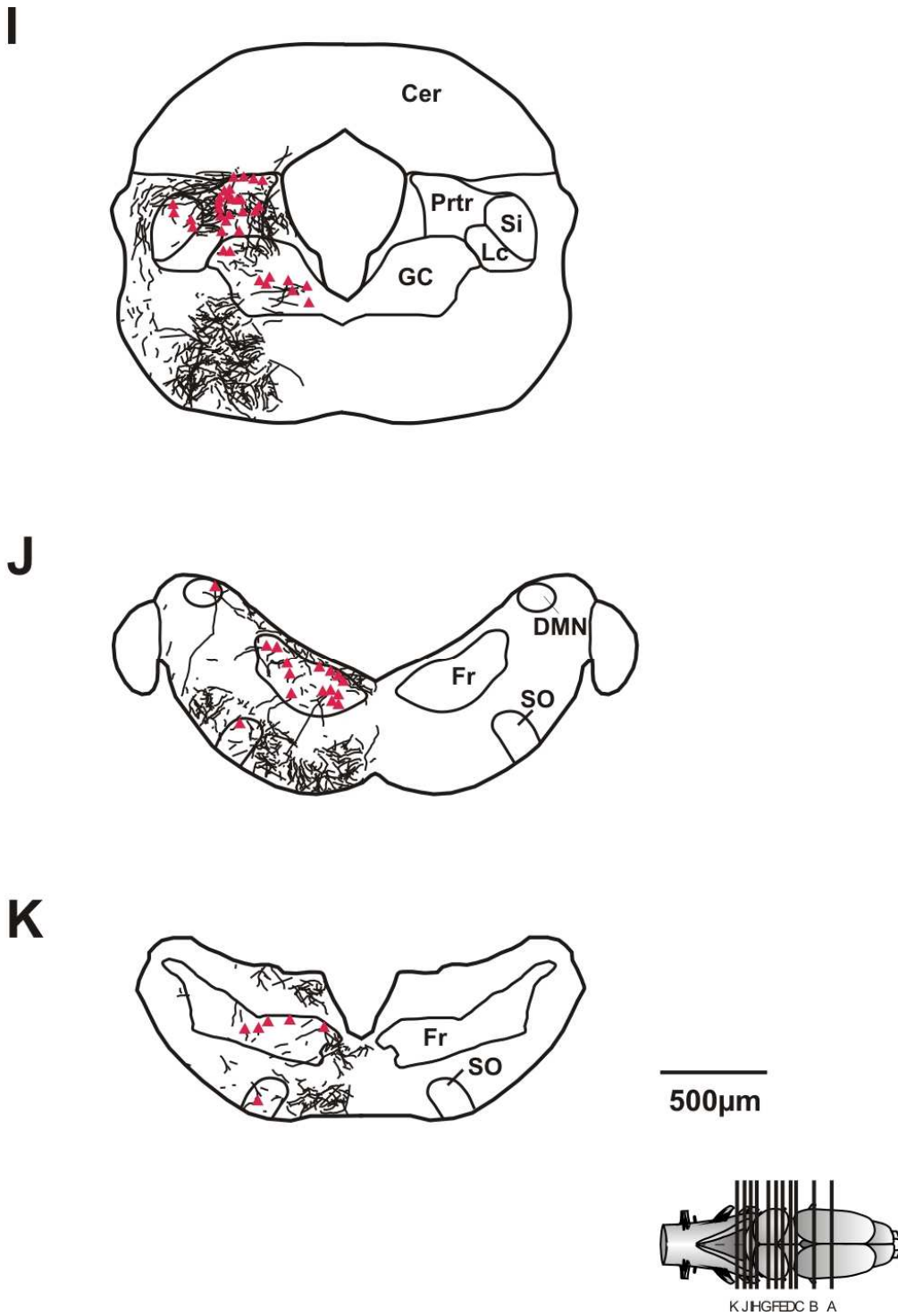


Abbildung 32: Tracing-Studie in das posteriore Tegmentum, pars ventralis

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn, welche die Verteilung von markierten Somata (Dreiecke) und markierten axonalen Fasern (feine Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin im Mesencephalon darstellen. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

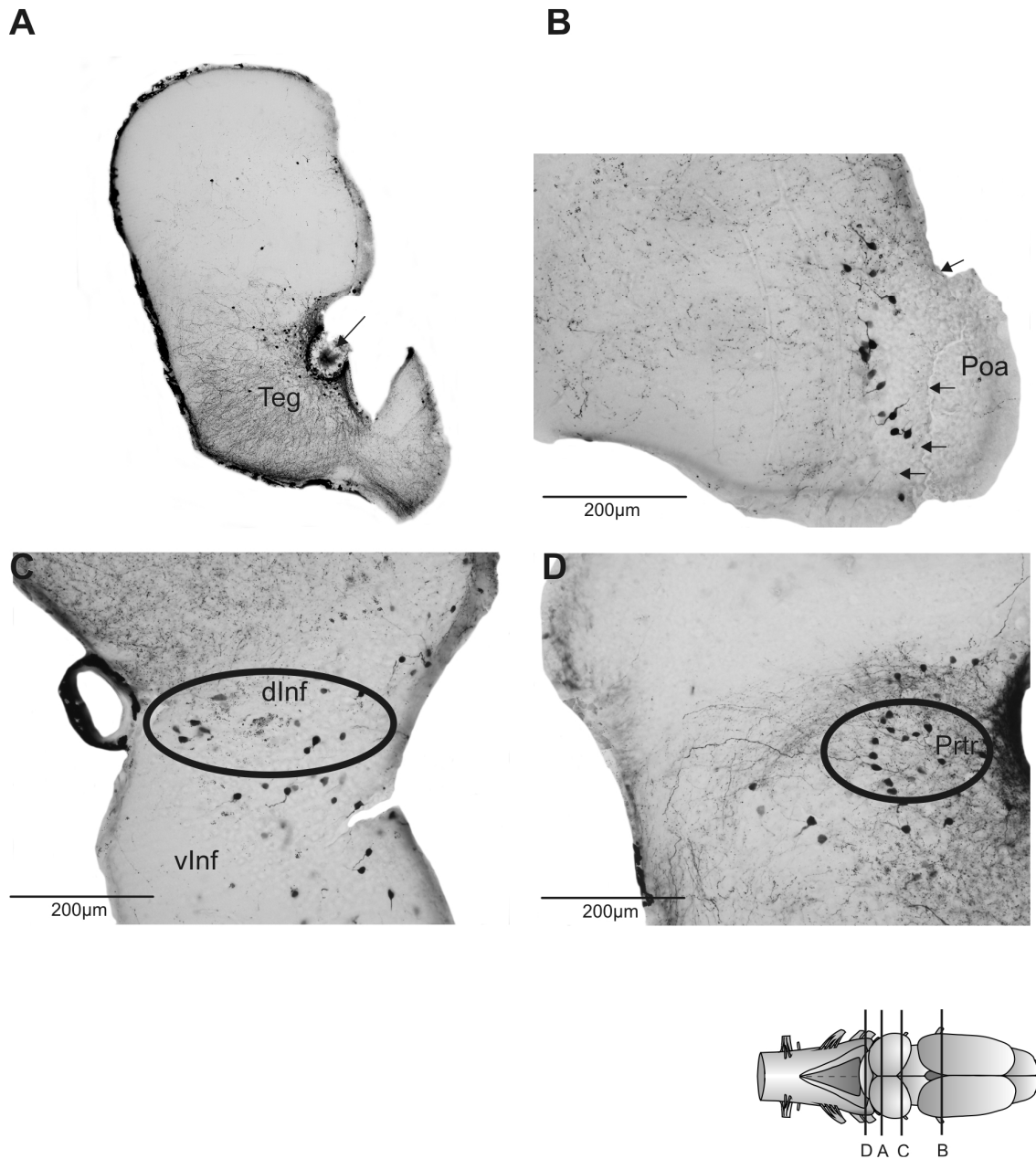


Abbildung 33: Mikrofotografien von Transversalschnitten nach einer Neurobiotin-Applikation in das posteriore Tegmentum, pars ventralis

A: Einstichstelle (Pfeil). **B:** Markierte Neurone und Fasern (Pfeile) im Nucleus praeopticus anterior. **C:** Markierte Neurone und Fasern im Nucleus hypothalamicus dorsalis (Kreis). **D:** Markierte Neurone und Fasern im Nucleus praetrigeminalis (Kreis). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirnaufsicht gekennzeichnet. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte. Für die Abkürzungen siehe Liste.

3.5.3 Applikation in das posteriore Tegmentum, pars dorsalis

Die hier dargestellte Tegmentum-Färbung lag im posterioren Tegmentum, pars dorsalis. Der Applikationsort befand sich im dorsomedialen Anteil des Kerngebietes. Aufgrund der geringeren Farbstoffapplikation und der kleineren Injektionsstelle wurden viel weniger Somata und Fasern markiert als in 3.5.2. Abbildung 34 und Tabelle II (siehe Anhang) geben einen Gesamtüberblick über die Verbindungen.

Afferenzen:

Im rostralen Telencephalon wurde ein markiertes Neuron im Striatum (Str) detektiert, welches im intermedären Bereich des Kerngebietes lag. Auch im Nucleus praeopticus anterior (POa) konnten afferente Verbindungen zum posterioren Tegmentum, pars dorsalis detektiert werden, die jedoch sehr schwach waren. Des Weiteren wurde jeweils ein markiertes Neuron in der Amygdala, pars centralis (CA) und pars lateralis (LA) beobachtet., während alle anderen telencephalen Kerngebiete frei von markierten Somata waren (Abb. 34A-B).

Die stärksten diencephalen Afferenzen erhielt das posteriore Tegmentum, pars dorsalis aus den thalamischen Subnuclei. Hier wurden retrograd markierte Neurone im Nucleus anterior thalami (A), Nucleus thalami ventrolateralis, pars dorsalis (Vld), Nucleus thalami ventromedialis (VM), Nucleus centralis thalami (C), Nucleus thalami lateralis, pars posterodorsalis (Lpd) und Nucleus posterior thalami (P) detektiert. Auch der Nucleus suprachiasmaticus (SC) wies vereinzelt gefärbte Somata auf. Im Hypothalamus wurden nur im rostralen Anteil vereinzelt markierte Neurone detektiert, die in allen drei dargestellten Kerngebieten lagen. Ebenso war im Tuberculum posterior, pars dorsalis (Tpd) und im Nucleus des periventriculären Organs (Npv) jeweils ein Neuron markiert (Abb. 34C-F).

Im Mesencephalon nahm die Dichte markierter Somata in rostrocaudaler Ausdehnung zu - sowohl in den tectalen als auch in den toralen Kerngebieten konnten einige gefärbte Neurone verifiziert werden. Afferente Projektionen zum posterioren Tegmentum, pars dorsalis konnten in den Schichten I-V identifiziert werden. Im Torus semicircularis war der Anteil markierter Somata im Nucleus laminaris (TI) am höchsten, wobei diese hauptsächlich dorsolateral zu finden waren.

Im caudalen Nucleus principalis (Tp) lag auch ein markiertes Neuron. Im Tegmentum wurden sowohl in den anterioren als auch in den posterioren Kerngebieten retrograd markierte Neurone detektiert (Abb. 34F-I).

Im Hirnstamm konnte die höchste Anzahl gefärbter Neurone im Nucleus praetrigeminalis beobachtet werden, die im Kerngebiet diffus verteilt waren. Ebenfalls wurden vereinzelt Somata im Nucleus secundarius isthmi (Si), Locus coeruleus (LC) und in der Formatio reticularis (Fr) detektiert. Das posteriore Tegmentum, pars dorsalis erhielt afferente Verbindungen auch von der zweiten Hörbahnstation, der Oliva superior (SO; Abb. 34J-L).

Efferenzen:

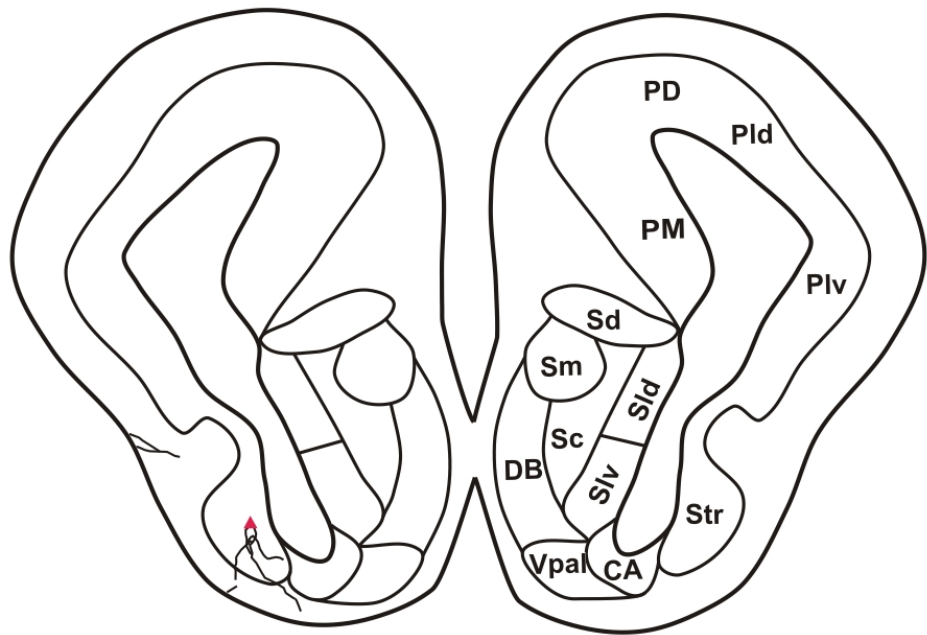
Zum Telencephalon zogen Efferenzen des posterioren Tegmentum, pars dorsalis über das laterale Vorderhirnbündel direkt in das Striatum. Im Nucleus praeopticus anterior konnten nur vereinzelt, nicht stark ausgeprägte Fasern beobachtet werden. Die anderen telencephalen Kerngebiete waren gänzlich frei von angefärbten Axonen (Abb. 34A-B).

Im Diencephalon nahm die Faserdichte in rostrocaudaler Ausdehnung zu. Im rostralen Nucleus suprachiasmaticus (SC) lagen wenige markierte Fasern diffus im Kerngebiet, wobei im caudalen Bereich markierte Fasern entlang des Ventrikels lokalisiert waren. In den thalamischen Kernen waren Fasern hauptsächlich im Nucleus anterior thalami (A) und im Nucleus posterior thalami (P) zu finden. Varikose Axone wurden meistens im lateralen und medialen Neuropil beobachtet. Im Nucleus posterior thalami waren die Fasern größtenteils ventral und im intermediären Nucleus thalami ventromedialis (VM) dorsal lokalisiert. Der Nucleus centralis thalami (C) wies im rostralen Anteil markierte Fasern im dorsalen Bereich und im caudalen Anteil im ventralen Bereich auf. Ebenso konnten vereinzelt gefärbte Axone im Nucleus thalami ventrolateralis, pars dorsalis und im Nucleus thalami lateralis, pars posterodorsalis (Lpd) detektiert werden. Von den hypothalamischen Subnuclei wiesen lediglich der Nucleus hypothalamicus ventralis (VH) und der Nucleus hypothalamicus lateralis (LH) varikose Axone auf. Auch der rostrale Nucleus entopeduncularis posterior (EP) enthielt wenige angefärbte Fasern (Abb. 34C-F).

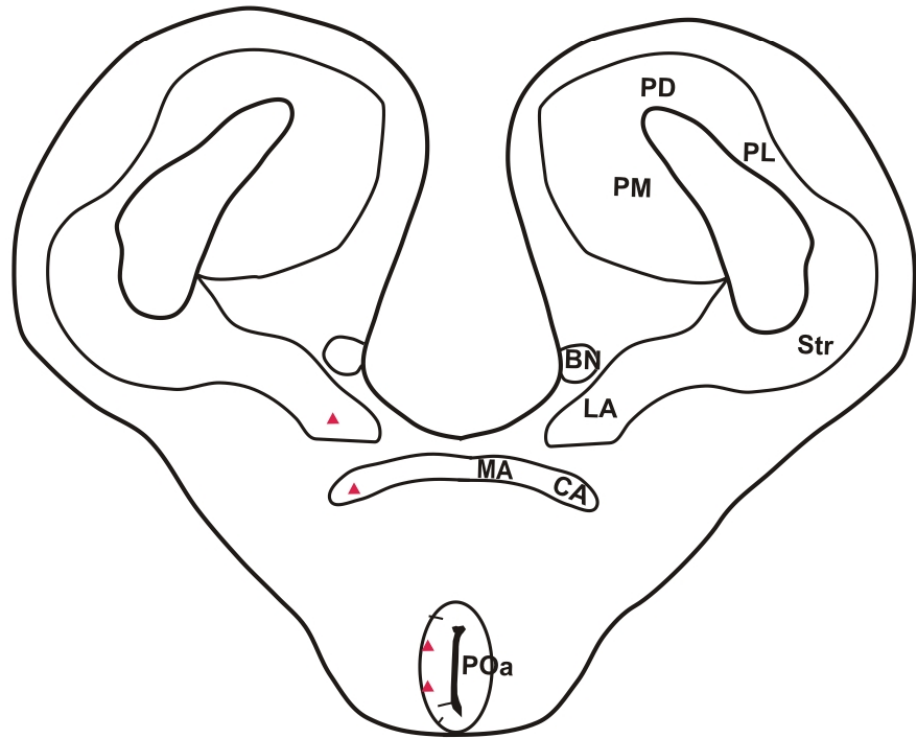
Im Mittelhirn, nahe der Applikationsstelle, war die Dichte des Fasernetzwerkes am höchsten. Hier konnten im lateralen und medialen Neuropil viele Axone, Varikositäten und Terminalien detektiert werden. Im Tectum (Tec) konnte ein kleiner Bereich von varikosen Axonen, die relativ medial lagen, in den Schichten I-V und VI beobachtet werden. Im Torus semicircularis wurde die höchste Faserdichte im rostralen Nucleus laminaris (TI) detektiert, während der caudale Nucleus principalis (Tp) nur kleine vereinzelte Axone aufwies. Im Tegmentum wurden sehr viele Efferenzen im anterioren Kerngebiet angefärbt, speziell im rostralen Bereich. Das posteriore Gebiet enthielt vor allem im Bereich des Applikationsgebietes viele gefärbte Fasern. Efferente Verbindungen kamen auch aus dem Nucleus interpeduncularis (IP), die allerdings sehr schwach waren. Der Nucleus isthmi (Ni) war frei von gefärbten Axonen (Abb. 34G-I).

Im Hirnstamm konnten markierte Fasern im Nucleus praetrigeminalis (Prtr) und vor allem in der Oliva superior (SO) gezeigt werden. Auch das laterale Neuropil enthielt Axone, die markiert waren (Abb. 34J-L)

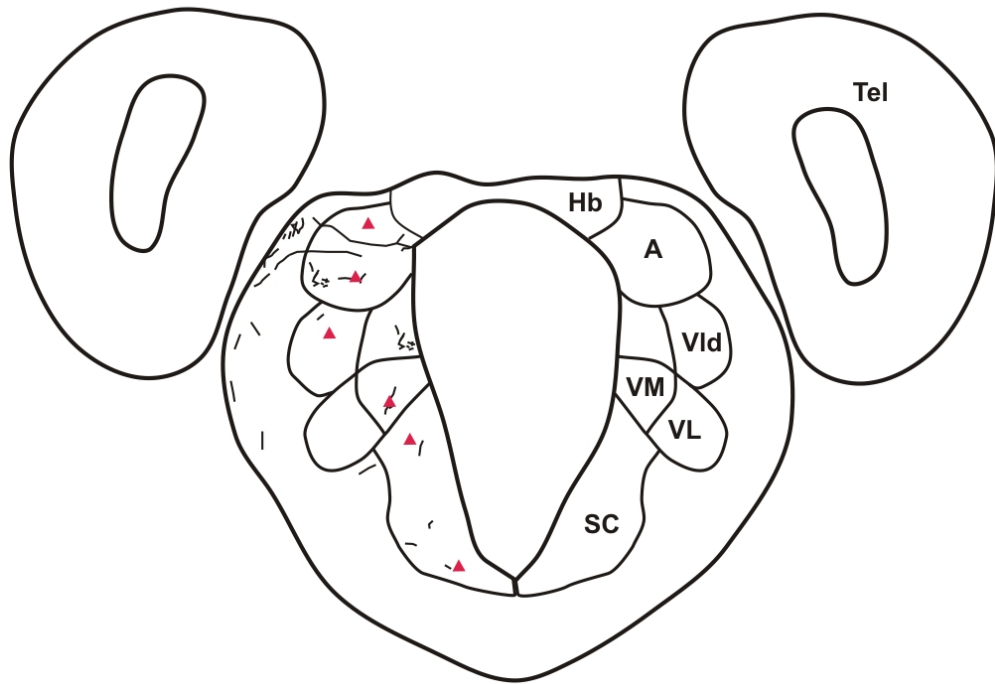
A



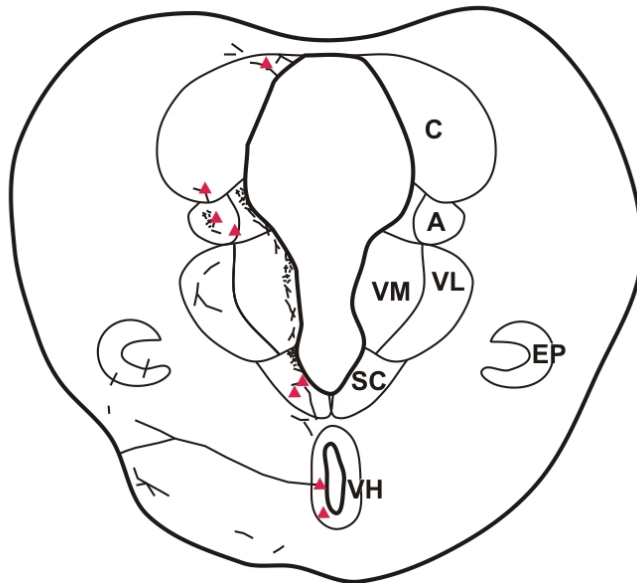
B



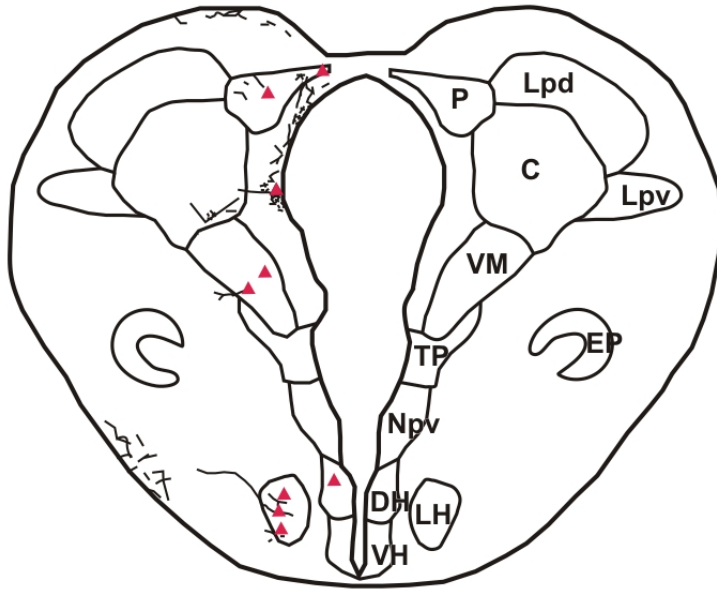
C



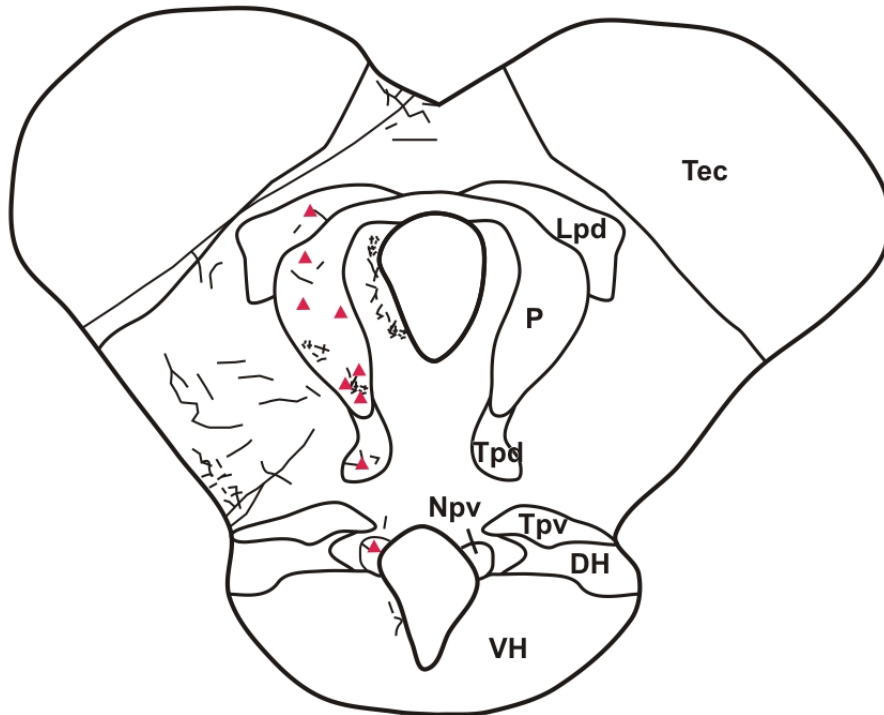
D



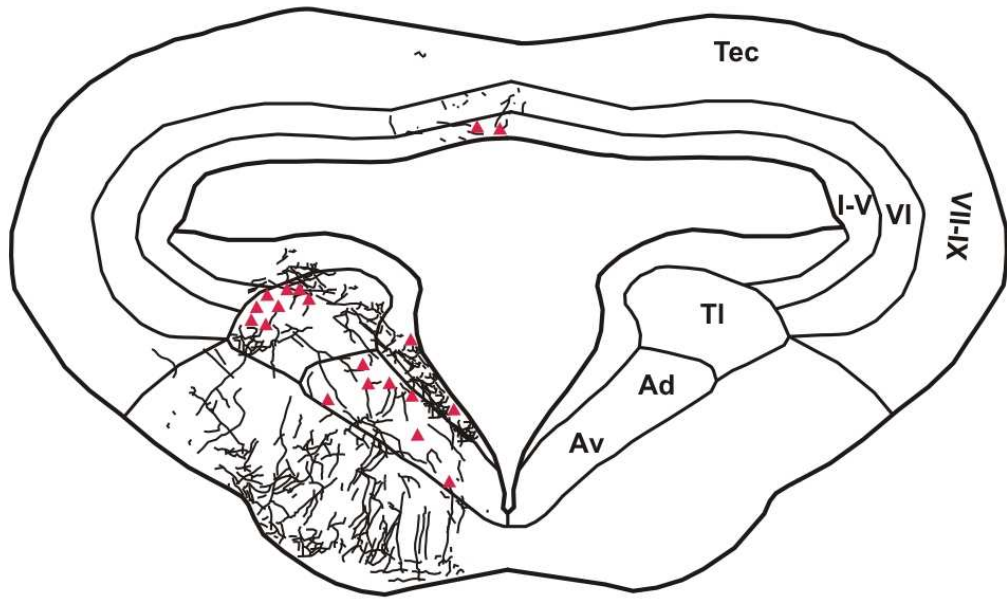
E



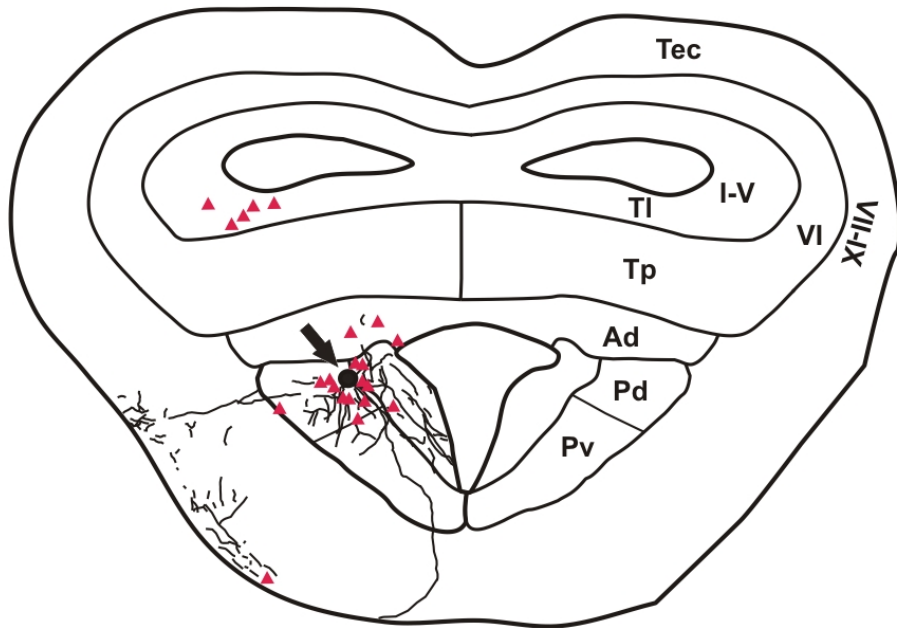
F



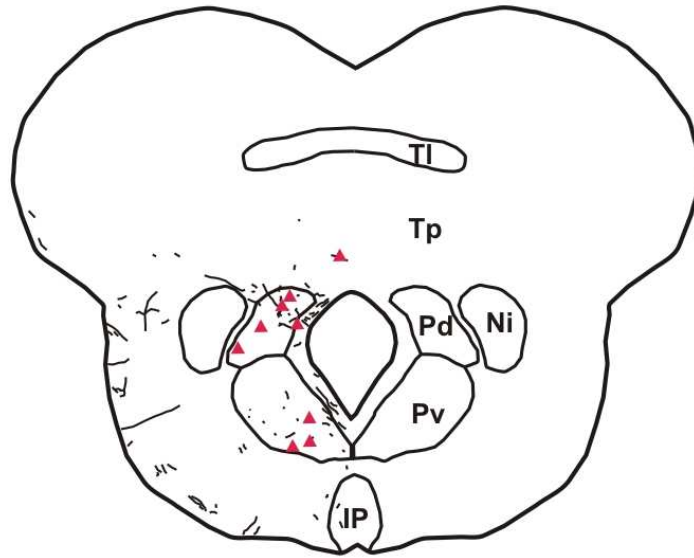
G



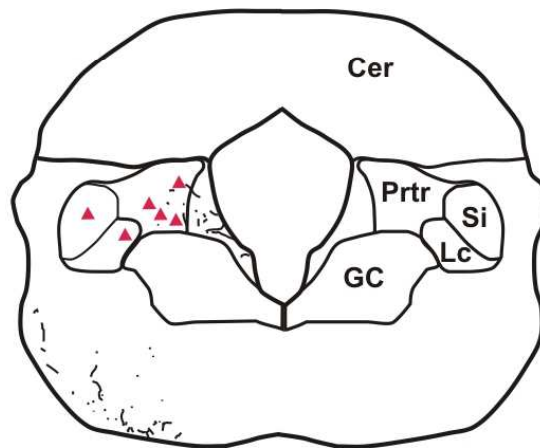
H



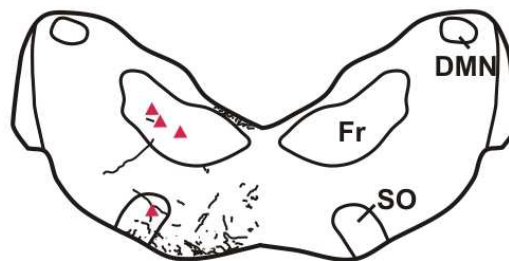
I



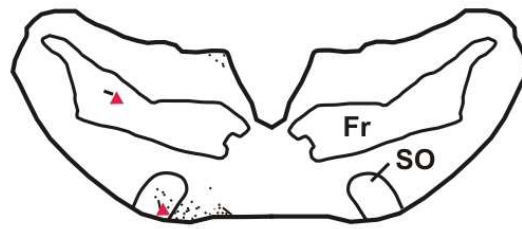
J



K



L



500µm



Abbildung 34: Tracing-Studie in das posteriore Tegmentum, pars dorsalis

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn, welche die Verteilung von markierten Somata (Dreiecke) und markierten axonalen Fasern (feine Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin im Mesencephalon darstellen. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte.

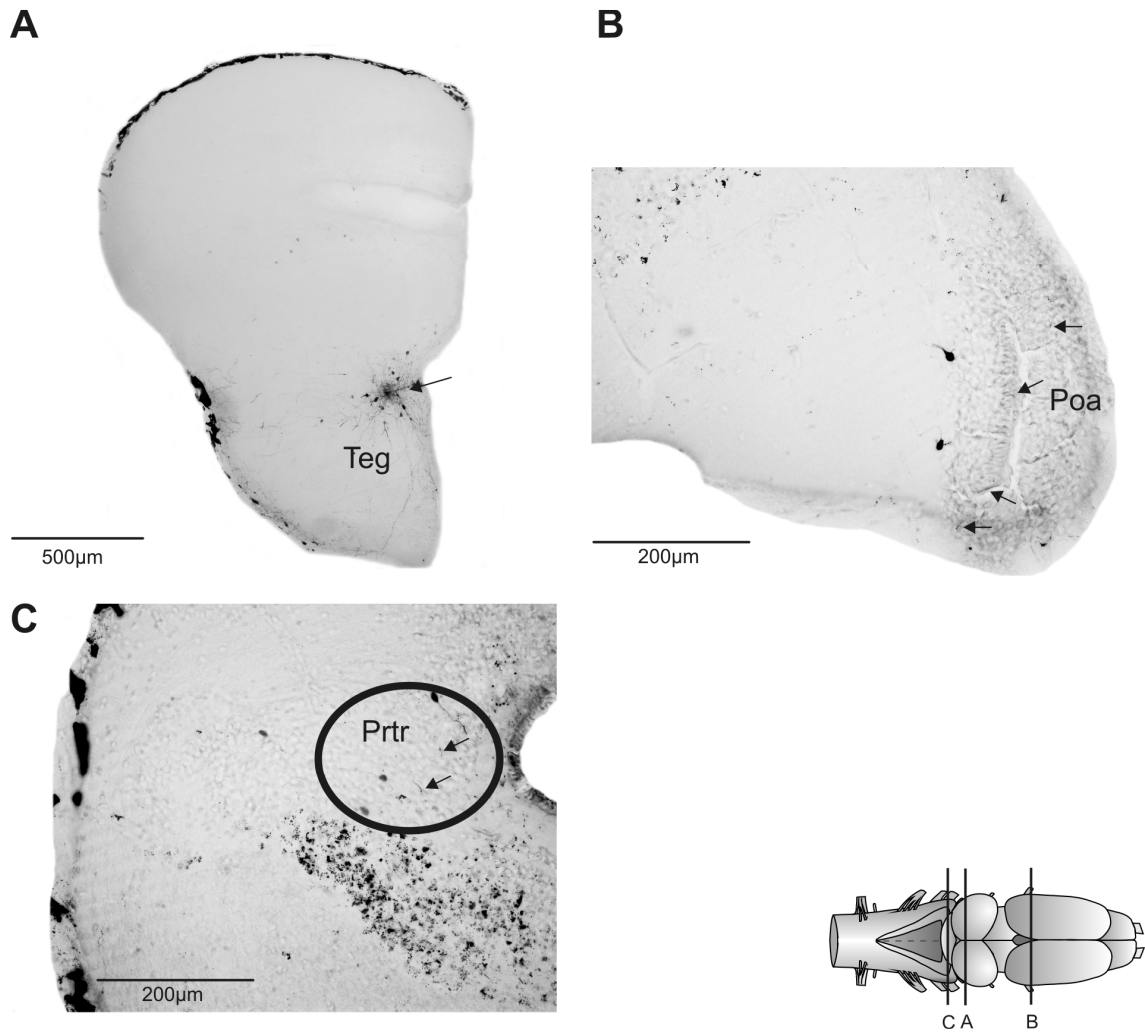


Abbildung 35: Mikrofotografien von Transversalschnitten nach einer Neurobiotin-Applikation in das posteriore Tegmentum, pars dorsalis.

A: Einstichstelle (Pfeil). **B:** Markierte Neurone und Fasern (Pfeile) im Nucleus praeopticus anterior. **C:** Markierte Neurone und Fasern (Pfeile) im Nucleus praetrigeminalis (Kreis). Die Schnittebenen sind in der Ganzhirnaufsicht gekennzeichnet. Die vertikalen Balken repräsentieren die Höhe der Querschnitte. Für die Abkürzungen siehe Liste.

3.5.4 Applikation in das anteriore Tegmentum, pars dorsalis

Die hier dargestellte Tegmentum-Färbung lag im anterioren Tegmentum, pars dorsalis. Der Applikationsort befand sich im lateralen Anteil des Kerngebietes. Abbildung 36 und Tabelle III (siehe Anhang) geben einen Gesamtüberblick über die Verbindungen.

Afferenzen:

Im Telencephalon wurden innerhalb der pallialen Subnuclei markierte Afferenzen hauptsächlich im Pallium mediale (PM) und ein einzeln gefärbtes Neuron im Pallium laterale, pars ventralis detektiert (Abb. 36A), während in caudaler Ausdehnung keine weiteren markierten Zellkörper identifiziert werden konnten. Die höchste Dichte markierter Somata lag im Striatum (Str), während im Septum vereinzelt Zellen im lateralen Anteil, pars dorsalis und ventralis (SI_d; SI_v) markiert wurden (Abb. 36B). Des Weiteren wurden in rostrocaudaler Ausdehnung angefärbte Neurone in der Amygdala, pars centralis (CA) detektiert, während alle anderen Subnuclei frei von markierten Zellen waren (Abb. 36B-C). Im Nucleus praeopticus anterior (POa) konnten afferente Verbindungen zum anterioren Tegmentum, pars dorsalis beobachtet werden, die jedoch sehr schwach waren. Alle anderen telencephalen Kerngebiete waren frei von markierten Somata.

Das Diencephalon enthielt im Vergleich zum Telencephalon sehr viele angefärbte Zellkörper. Der Nucleus suprachiasmaticus (SC) wies in rostrocaudaler Ausrichtung hauptsächlich markierte Zellen im dorsalen Anteil auf (Abb. 36D-E). Zusätzlich wurden auch markierte Somata im Nucleus thalami ventromedialis (VM), Nucleus thalami ventrolateralis (VL) und im Nucleus entopeduncularis posterior angefärbt, ein Komplex, der homolog zum Nucleus subthalamicus der Säugetiere ist (Abb. 36E-F; Maier et al. 2010). Weitere thalamische Subnuclei enthielten ebenfalls retrograd markierte Somata: der Nucleus anterior thalami (A), Nucleus centralis thalami (C), Nucleus lateralis thalami, pars anterior (La) und der Nucleus posterior thalami (P; Abb. 36D-G). Im rostralen Anteil des Nucleus hypothalamicus dorsalis (DH) konnten angefärbte Somata identifiziert werden, während im Nucleus hypothalamicus dorsalis (VH) in der gesamten rostrocaudalen Ausdehnung markierte Zellkörper detektiert

werden konnten (Abb. 36E-G). Der Nucleus hypothalamicus lateralis (LH) war gänzlich frei von angefärbten Zellen. Ebenso wurden im Tuberculum (TP) und im Nucleus des periventriculären Organs (Npd, Npv) markierte Somata markiert (Abb. 36F-G).

Im Mittelhirn konnten afferente Projektionen zum anterioren Tegmentum, pars dorsalis sowohl in den Subnuclei des Tectum als auch des Torus semicircularis detektiert werden. In den tectalen Subnuclei lag die höchste Dichte angefärbter Somata in der Schicht I-V und ein kleiner Anteil in der Schicht IV. Die Schicht VII-IX war gänzlich frei von markierten Zellkörpern. Von den toralen Subnuclei wurden sehr viele angefärbte Neurone im Nucleus laminaris (TI) identifiziert, während der Nucleus principalis (Tp) nur wenige retrograd markierte Zellen enthielt (Abb. 36H). Dass das Tegmentum mit dem Torus, insbesondere mit dem Nucleus laminaris (TI) verbunden ist, konnte schon in früheren Studien gezeigt werden (Luksch & Walkowiak 1998).

Im Hirnstamm konnten gefärbte Neurone im Nucleus praetrigeminalis (Prtr) detektiert werden, die hauptsächlich ventral lokalisiert waren. Die höchste Anzahl markierter Somata lagen im Nucleus secundarius isthmi (Si), wobei auch der Locus coeruleus (LC) einige angefärbte Zellkörper enthielt (Abb. 36I). Das Griseum centrale rhombencephali (GC) wies ebenfalls angefärbte Somata auf, die größtenteils ventromedial lokalisiert waren. Das anteriore Tegmentum, pars dorsalis enthielt außerdem afferente Verbindungen aus der Formatio reticularis (Fr) und dem Nucleus raphé (Ra; Abb. 36J).

Efferenzen:

Zum Telencephalon zogen Efferenzen des anterioren Tegmentum, pars dorsalis über das laterale Vorderhirnbündel direkt in das Striatum (Str) und vereinzelt in die Amygdala, pars centralis (CA) sowie in die Amygdala, pars lateralis (LA). Die anderen telencephalen Kerngebiete waren gänzlich frei von angefärbten Axonen (Abb. 36A).

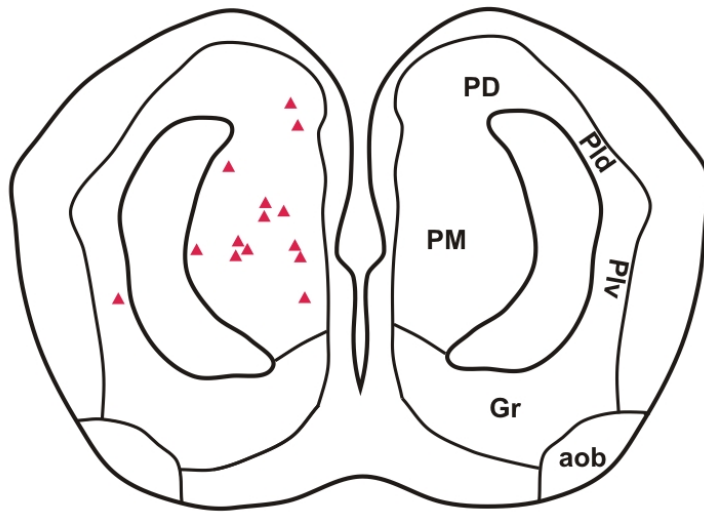
Im Diencephalon konnte in rostrocaudaler Ausdehnung sowohl der Fasertrakt vom lateralen Vorderhirnbündel als auch vom medialen Fasertrakt detektiert werden. Der

Nucleus suprachiasmaticus (SC) enthielt sowohl in seinem rostralen als auch seinem caudalen Anteil markierte Fasern (Abb. 36D-E). In den thalamischen Kernen waren Fasern hauptsächlich im Nucleus anterior thalami (A), Nucleus thalami ventromedialis (VM), Nucleus thalami ventrolateralis (VL) zu finden (Abb. 36D-F). Der Nucleus centralis thalami (C) und auch der Nucleus posterior thalami (P) enthielten in ihren rostralen Anteilen angefärbte Fasern, die hauptsächlich dorsal lokalisiert waren (Abb. 36E-F). Die Verteilung von markierten axonalen Strukturen im Hypothalamus ähnelte der Verteilung angefärbter Somata: Der Nucleus hypothalamicus dorsalis (DH) wies lediglich im rostralen Anteil gefärbte Strukturen auf, wohingegen der Nucleus hypothalamicus ventralis (VH) in seiner gesamten rostrocaudalen Ausdehnung markierte Fasern enthielt (Abb. 36E-G). Ebenso wies der Nucleus entopeduncularis posterior (EP), das Tuberculum (TP) sowie die Nuclei des periventriculären Organs (Npd, Npv) gefärbte Fasern auf (Abb. 36F-G).

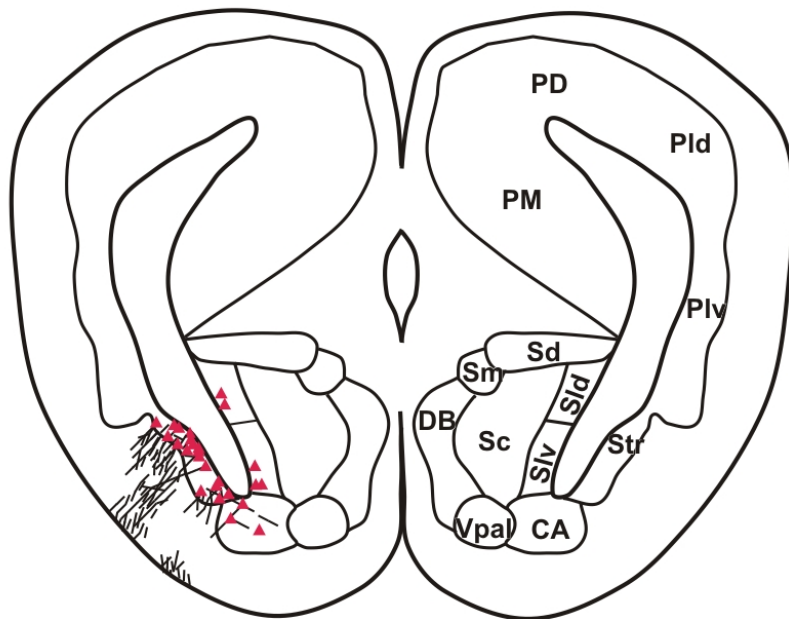
Das Mittelhirn enthielt die meisten angefärbten Fasern, insbesondere nahe der Applikationsstelle. Hier konnten sowohl im lateralen Neuropil als auch entlang des Ventrikels viele Axone und Varikositäten beobachtet werden. Im Tectum konnte in rostrocaudaler Ausdehnung in allen Schichten markierte Fasern beobachtet werden, wobei die höchste Dichte im caudalen Anteil der Schicht VII-IX lag. In den Schichten I-V konnten hingegen markierte Axone identifiziert werden, die teilweise bis in das dorsale Neuropil projizierten. Im Torus semicircularis wurden hauptsächlich im Nucleus laminaris (TI) axonale Strukturen detektiert, während der Nucleus principalis (Tp) sehr wenige markierte Fasern enthielt (Abb. 36H).

Im Hirnstamm konnten markierte Fasern entlang des Ventrikels beobachtet werden, die vereinzelt in den Nucleus praetrigeminalis (Prtr) projizierten. Das Griseum centrale rhombencephali (GC) enthielt zwei kleine Fasernetzwerke im dorsalen Anteil und im ventromedialen Bereich, wobei das laterale Neuropil die höchste Dichte markierter Strukturen aufwies (Abb. 36I). Efferente Verbindungen kamen auch aus der Oliva superior (SO), dem Nucleus raphé (Ra) und dem Nucleus dorsomedullaris (DMN; Abb. 36J).

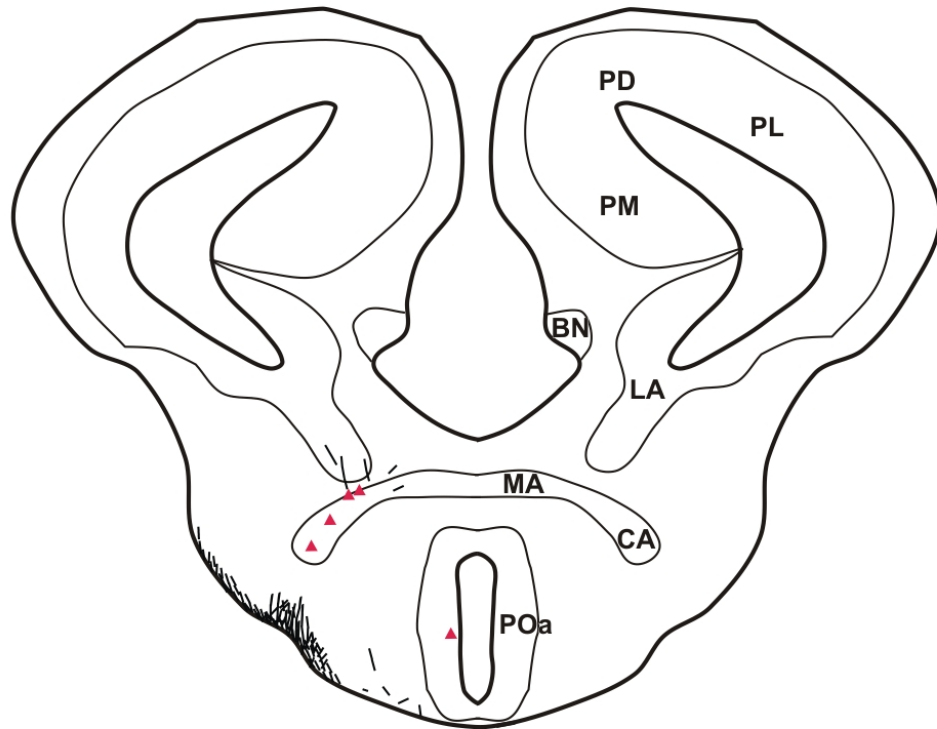
A



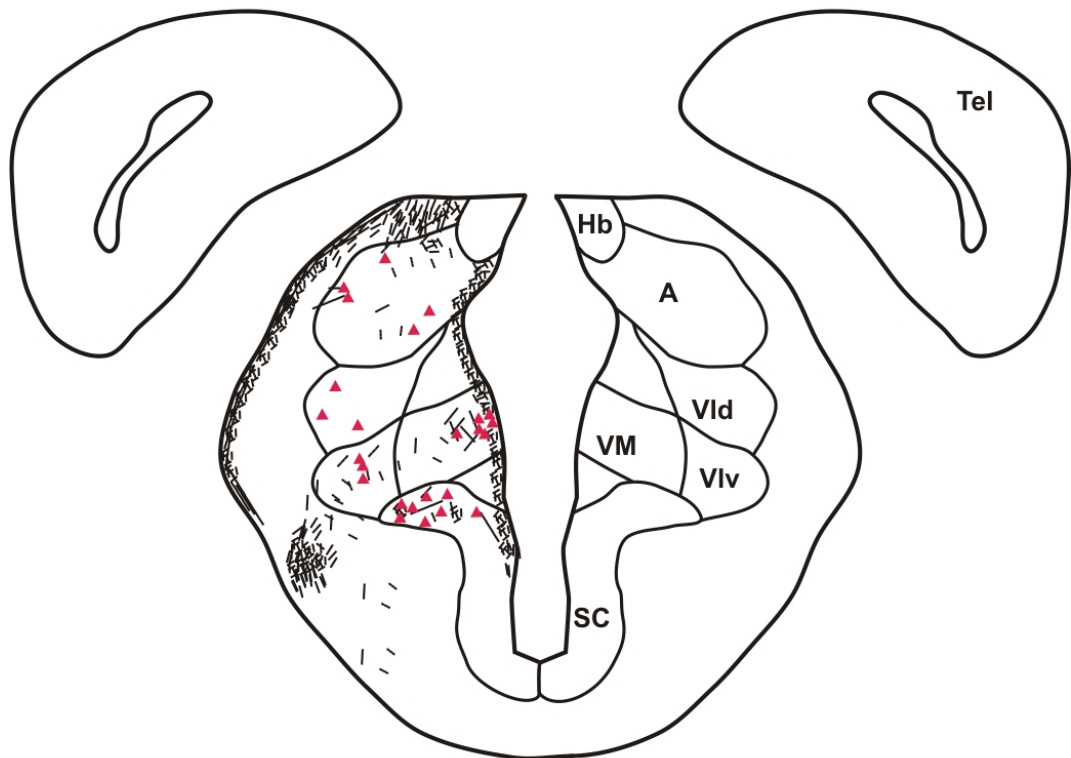
B



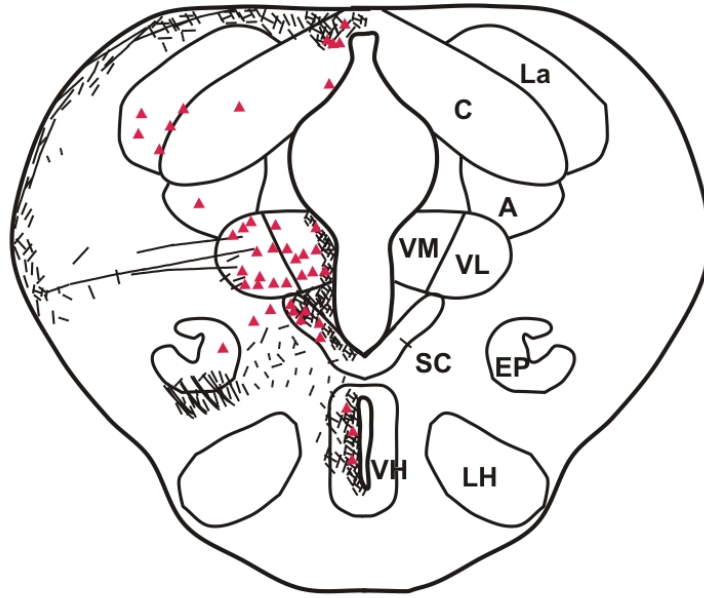
C



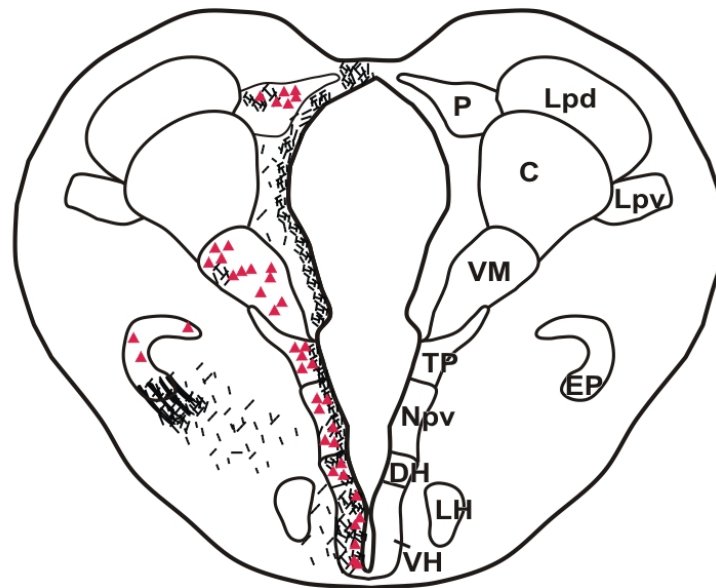
D



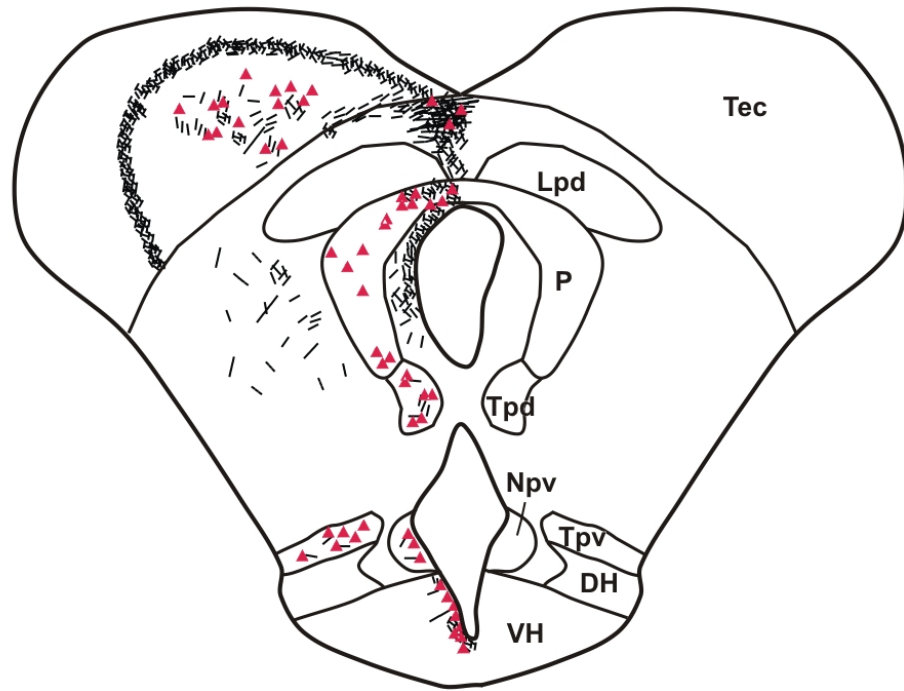
E



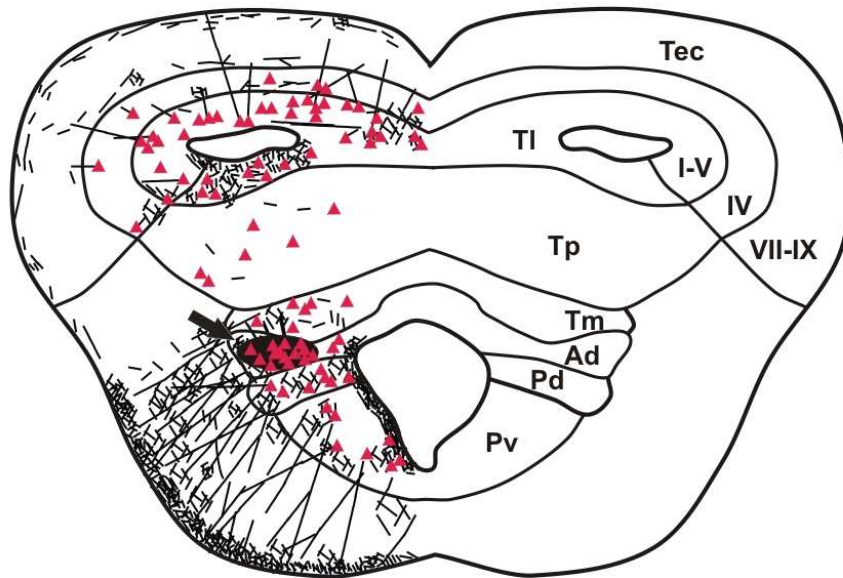
F



G



H



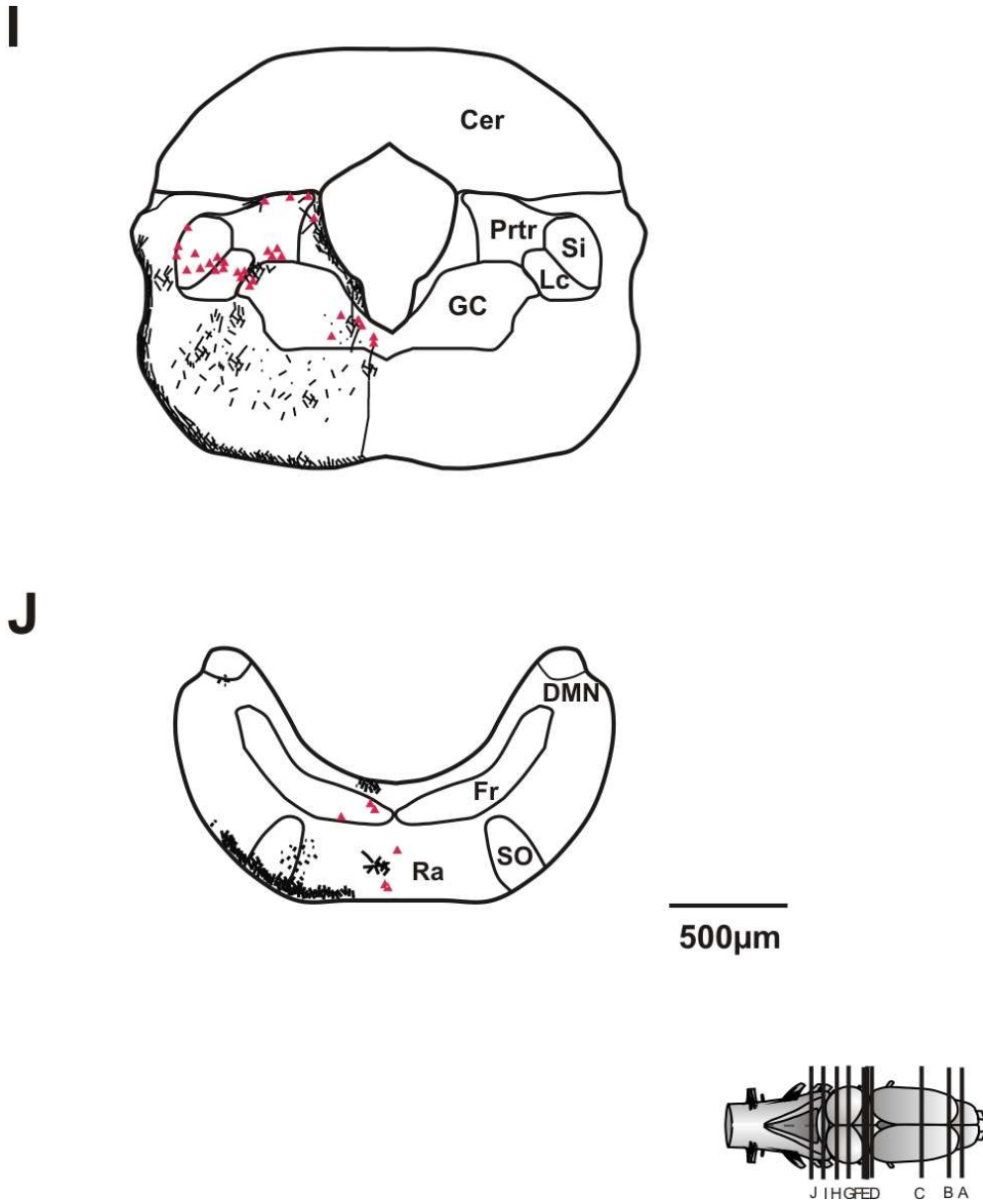


Abbildung 36: Tracing-Studie in das anteriore Tegmentum, pars dorsalis

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn, welche die Verteilung von markierten Somata (Dreiecke) und markierten axonalen Fasern (feine Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin im Mesencephalon darstellen. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt, wobei die vertikalen Balken die Höhe der Querschnitte repräsentieren.

3.5.5 Verbindungen des Tegmentum

Die folgenden Schemazeichnungen repräsentieren eine Übersicht der afferenten (rot) und efferenten (schwarz) Verbindungen nach Tracer-Applikation in das posteriore Tegmentum, pars ventralis (A), in das posteriore Tegmentum, pars dorsalis (B) und in das anteriore Tegmentum, pars dorsalis (C).

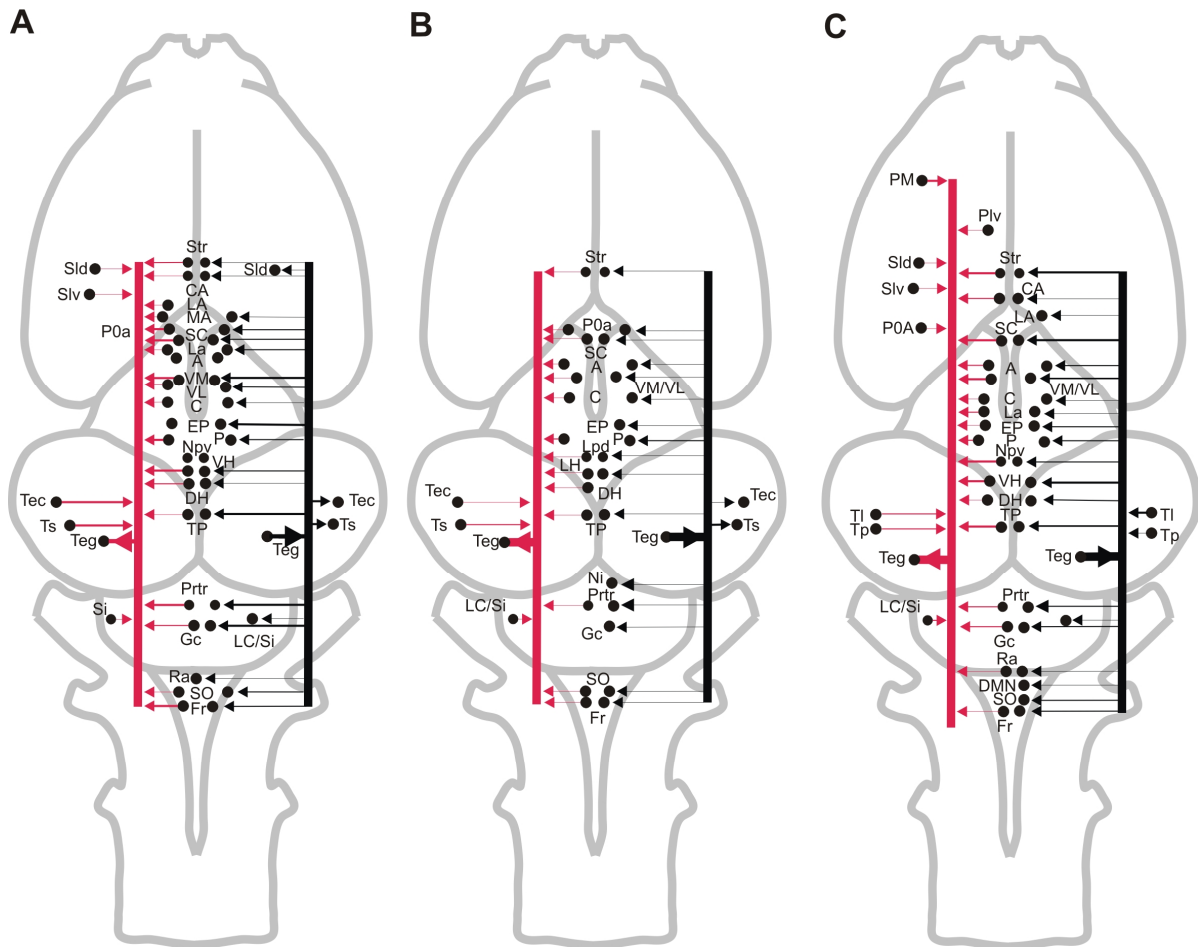


Abbildung 37: Afferente (rot) und efferente (schwarz) Verbindungen des Tegmentum

3.6 Afferenzen/ Efferenzen der Nuclei habenulares

3.6.1 Durchgeführte Experimente

Bei den Kontrollapplikationen im ventralen Tegmentum (siehe 3.2.5.2 Abb. 22-S4) wurden markierte Fasern in den Nuclei habenulares detektiert. Die Nuclei habenulares sind ein limbisches Zentrum, das reziprok mit der Area praeoptica verschaltet ist und eine Volumenveränderung während der Reproduktionsphase durchläuft (Kemali et al. 1980; Harris et al. 1996). Diesem Areal wird eine wichtige Funktion bezüglich der Initiierung von Reproduktionsverhalten zugesprochen, sowie auch bei kognitiven und motorischen Prozessen. Um Aufschluss über seine Afferenzen und Efferenzen zu bekommen, wurden bei vier männlichen Versuchstieren (Applikationsorte siehe Abb. 38) der neuronale Marker Neurobiotin und der Fluoreszenzfarbstoff Dextranamin-Tetramethylrhodamin appliziert.

Tab. 6: Übersicht der durchgeführten Neurobiotin-Tracings und der Applikationsorte. Die Abkürzungen der jeweiligen Kerngebiete stehen in der Abkürzungsliste.

Applikationsort	Spezies/Datum	Lage des Applikationsortes	Bemerkung
*Hb1	Bo/m/20070621	d/vHb; evtl. aThal	Neurobiotin
Hb2	Bo/m/20070627	dHb; geringer Transport	Neurobiotin
Thal1	Bo/m/20070710	dNP des cThal	Neurobiotin
Thal2	Bo/m/20070916	cThal	Fluoreszenz

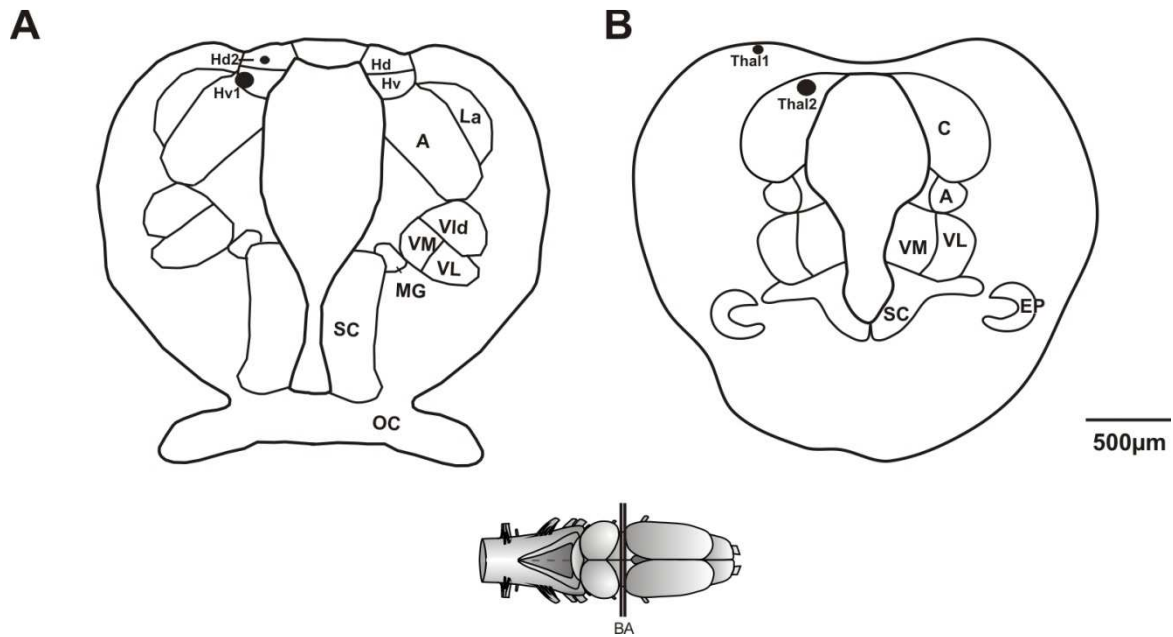


Abbildung 38: Übersichtszeichnung der Nuclei habenulares-Applikationen

3.6.2 Applikationen in die Nuclei habenulares

Es wurden einige retrograd markierte Somata und Fasern im Tel-, Di-, Mes- und Metencephalon und in der Medulla oblongata angefärbt. Im Allgemeinen war zu erkennen, dass viel mehr Fasern als Somata markiert wurden. Abb. 39 und Tab. IV (siehe Anhang) geben einen Gesamtüberblick über die Verbindungen.

Afferenzen:

Im Telencephalon wurden hauptsächlich in den limbischen Kerngebieten markierte Somata detektiert. Hier lagen angefärbte Zellkörper in verschiedenen Subnuclei des Septum. Von den septalen Arealen wurden die meisten Zellkörper im Septum laterale, pars ventralis (Slv) beobachtet. Weiterhin konnten im Septum laterale, pars dorsalis (Sld), im Septum centrale (Sc), im Septum mediale (Sm), sowie im Septum dorsale (Sd) und im Nucleus des diagonalen Bandes von Broca (DB) vereinzelte Somata verifiziert werden (Abb. 39B-C). Eine weitere limbische Struktur ist die Amygdala. Bei allen drei Kerngebieten konnten angefärbte Neurone nachgewiesen werden. Dabei konzentrierten sich die meisten Somata in der Amygdala, pars centralis (CA; Abb. 39D-E). Auch Afferenzen aus der Area praeoptica konnten nachgewiesen werden (Abb. 38E; Herkenham & Nauta 1977; Harris et al. 1996). Von

den pallialen Kerngebieten konnten zwei markierte Neurone im Pallium mediale (PM; Abb. 38B) lokalisiert werden, alle anderen Subnuclei waren frei von markierten Zellkörpern. Striatale Projektionen konnten nicht verifiziert werden, auch keine vom ventralen Anteil, der homolog zum Globus pallidus internus ist (Roden 2005).

Im Diencephalon wurden im Bereich der Injektionsstelle sehr viele markierte Neurone lokalisiert (Abb. 39F). Da die Mikroelektrode vermutlich auch die dorsale Kante des Nucleus anterior thalami (A) verletzt hat, wurden in diesem Areal auch sehr viele angefärbte Somata identifiziert. Ansonsten konnten in den thalamischen Subnuclei nur wenige angefärbte Zellkörper beobachtet werden (Abb. 39F-H), jedoch im dorsocaudalen Nucleus suprachiasmaticus (SC) und im Nucleus entopeduncularis posterior (EP; (Abb. 39G). Der dorsocaudale Nucleus suprachiasmaticus und der Nucleus entopeduncularis posterior werden zusammen mit dem ventralen Anteil des Nucleus ventralis thalami (VM/VL) als homologe Struktur des Nucleus subthalamicus der Säuger betrachtet (Maier et al. 2010), in denen auch vereinzelte Neurone detektiert werden konnten (Abb. 39G). Weiterhin wurden viele markierte Somata in den hypothalamischen Kerngebieten detektiert, dabei lagen im Nucleus hypothalamicus ventralis (VH) viel mehr markierte Somata als im Nucleus hypothalamicus dorsalis (DH; Abb. 39H-I). Das posteriore Tuberculum enthielt nur im dorsalen Anteil zwei markierte Neurone.

Das Mittelhirn wies viele gefärbte Neurone im praetectalen Grau (PtG) und im rostralen Tectum auf (Abb. 39H), weiter caudal wurden in den Schichten I-V und VI markierte Somata beobachtet (Abb. 39I-J). In den Subnuclei des Torus semicircularis konnten gefärbte Zellkörper im Nucleus laminaris (TL; Abb. 39J) beobachtet werden. Die anderen Subnuclei waren gänzlich frei von markierten Somata. Im Tegmentum konnten wiederum in allen Unterkernen gefärbte Neurone detektiert werden (Abb. 39I-K). Auch im Nucleus interpeduncularis (Ip), dem Homologon zur VTA (Area tegmentalis ventralis) der Säugetiere, konnte ein angefärbtes Neuron lokalisiert werden (Abb. 39J). Dies entspricht der reziproken Verbindung zwischen den Nuclei habenulares und dem Nucleus interpeduncularis.

Im Metencephalon konnte ein markiertes Neuron im medialen Griseum centrale rhombencephali (GC; Abb. 39L) beobachtet werden.

Efferenzen:

Im Telencephalon konnten in rostraler Richtung verschieden stark markierte efferente Verbindungen beobachtet werden. Im Neuropil des Pallium zog ein charakteristisches Fasergeflecht, ausgehend vom Pallium mediale (PM) bis hin zum dorsalen Anteil des Pallium laterale (PL; Abb. 39A-C). Auch im lateralen Neuropil des ventralen Striatum (Str; Abb. 39B-C) wurden starke efferente Projektionen sowie Terminalien verifiziert und es konnten auch einige markierte Fasern im Kerngebiet selbst detektiert werden. Auch die limbischen Kerngebiete empfangen efferente Verbindungen von den Nuclei habenulares. In den Subnuclei des Septum konnten vor allem markierte Fasern und Terminalien im Nucleus des diagonalen Bandes von Broca (DB) verifiziert werden (Abb. 39B-C). Weiterhin waren im Septum laterale, mediale und dorsale vereinzelte Fasern zu erkennen. Auch die Amygdala enthielt markierte Fasern, besonders die Amygdala, pars centralis (CA; Abb. 39C-D). Ein weiteres Areal, das zur Amygdala zählt, ist der Bed Nucleus der pallialen Kommissur (BN). Auch hier wurden vereinzelt gefärbte Fasern lokalisiert (Abb. 39E). Der Nucleus praeopticus anterior wies nur im rostralen Anteil markierte Fasern auf, in caudaler Richtung konnten keine weiteren Fasern detektiert werden (Abb. 39E), stattdessen war das laterale Neuropil sehr stark markiert.

Im rostralen Diencephalon, auf Höhe der Injektionsstelle, konnten sowohl in den Kerngebieten als auch im Neuropil starke Färbungen aufgezeigt werden (Abb. 39F). Die Nuclei habenulares projizieren unter anderem entlang des Fasciculus retroflexus, der im lateralen Neuropil liegt (Abb. 39G-M). Über diesen Fasertrakt werden vor allem der Nucleus interpeduncularis (Ip) und der Nucleus raphé (Ra) angesteuert, die dopaminerge bzw. serotonerge Neurone enthalten. Im Nucleus entopeduncularis posterior (EP; Abb. 39G) und im Nucleus suprachiasmaticus (SC) konnten auch viele gefärbte Fasern und Terminalien identifiziert werden. Zusätzlich konnten auch aufsteigende und absteigende Fasern, die entlang des lateralen Vorderhirnbündels laufen, gefärbt werden. Der Fasertrakt liegt auf Höhe des Nucleus entopeduncularis posterior. Auch entlang des medialen Neuropils laufen viele markierte Fasern (Abb. 39F-H). In den Subnuclei des Thalamus wurden vereinzelt gefärbte Fasern detektiert (Abb. 39G-H), während die hypothalamischen Kerngebiete

einen stärkeren Input von den Nuclei habenulares enthielten (Abb. 39H-I). Ebenso sah die Färbung im posterioren Tuberculum, pars ventralis (Tpv) aus, wohingegen im dorsalen Anteil (Tpd) viel weniger markierte Fasern beobachtet wurden (Abb. 39H).

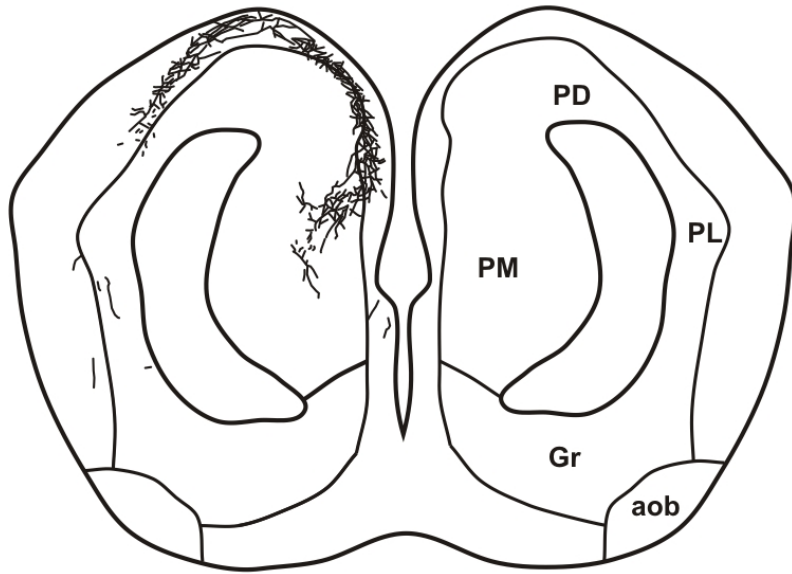
Weiter caudal, im Mesencephalon, konnten sowohl in den tectalen als auch in den tegmentalen Subnuclei markierte Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 39H-J). Der Torus semicircularis enthielt hingegen nur im Nucleus laminaris gefärbte Fasern (Abb. 39I-J). Ein Hauptprojektionsgebiet der Nuclei habenulares, der Nucleus interpeduncularis (Ip), enthielt viele markierte Fasern, die im caudalen Bereich stärker gefärbt waren, als im rostralen (Abb. 39J-K).

Im Metencephalon und in der Medulla oblongata lagen wenige markierte Strukturen im lateralen Neuropil, im Nucleus praetrigeminalis (Prtr), im Cerebellum (Cer) und in der Formatio reticularis (Fr; Abb. 39L-M).

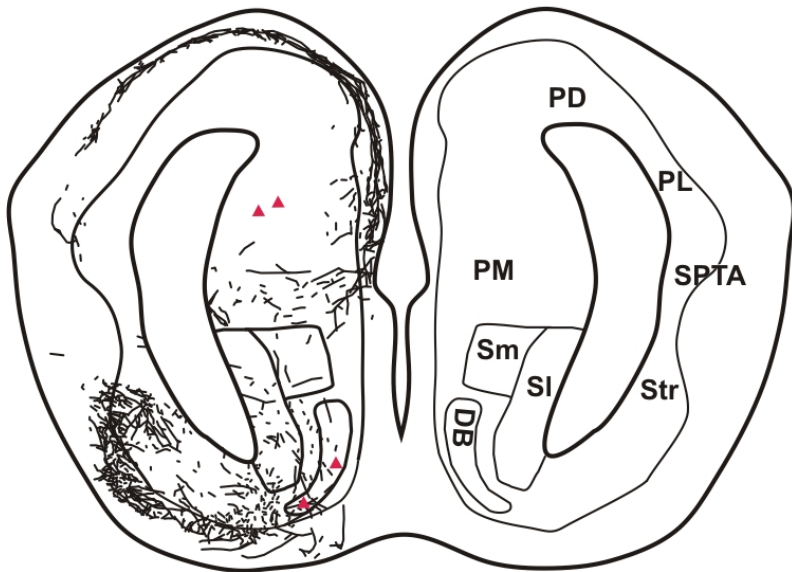
Abbildung 39: Tracing-Studie in die Nuclei habenulares

Dargestellt sind schematische Transversalschnitte durch das Gehirn, welche die Verteilung von markierten Somata (Dreiecke) und markierten axonalen Fasern (feine Linien) nach einer iontophoretischen Applikation mit dem Marker Neurobiotin im Diencephalon darstellen. Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt, wobei die vertikalen Balken die Höhe der Querschnitte repräsentieren.

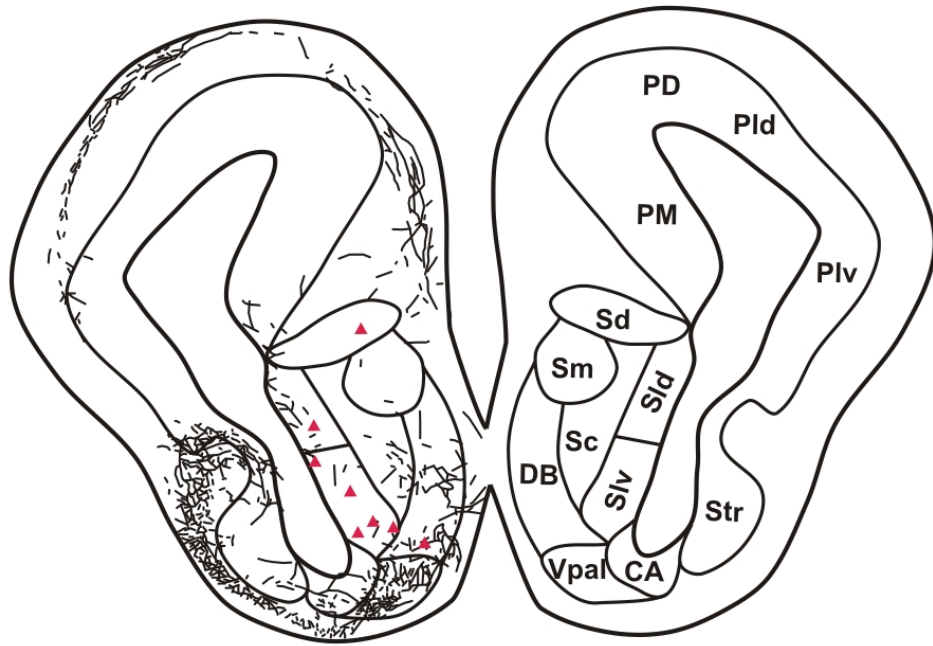
A



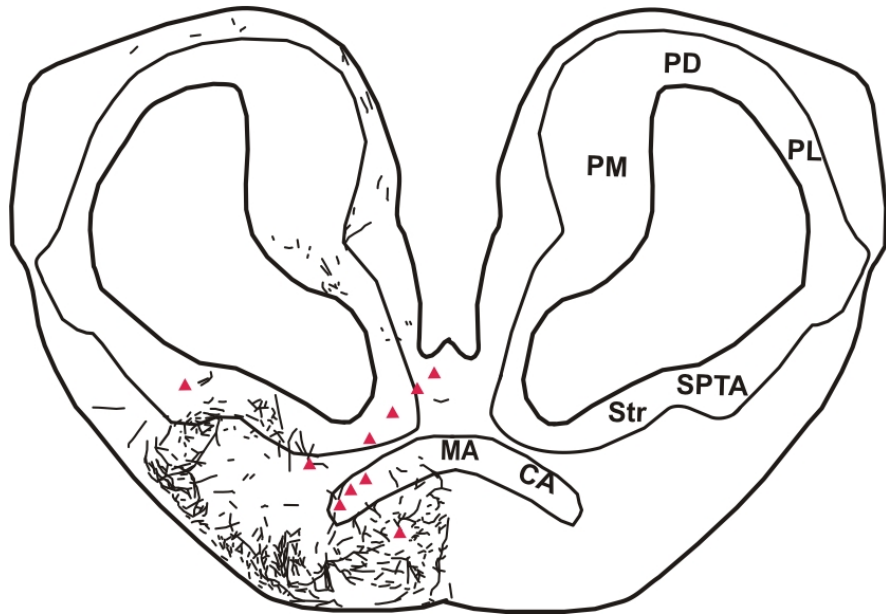
B



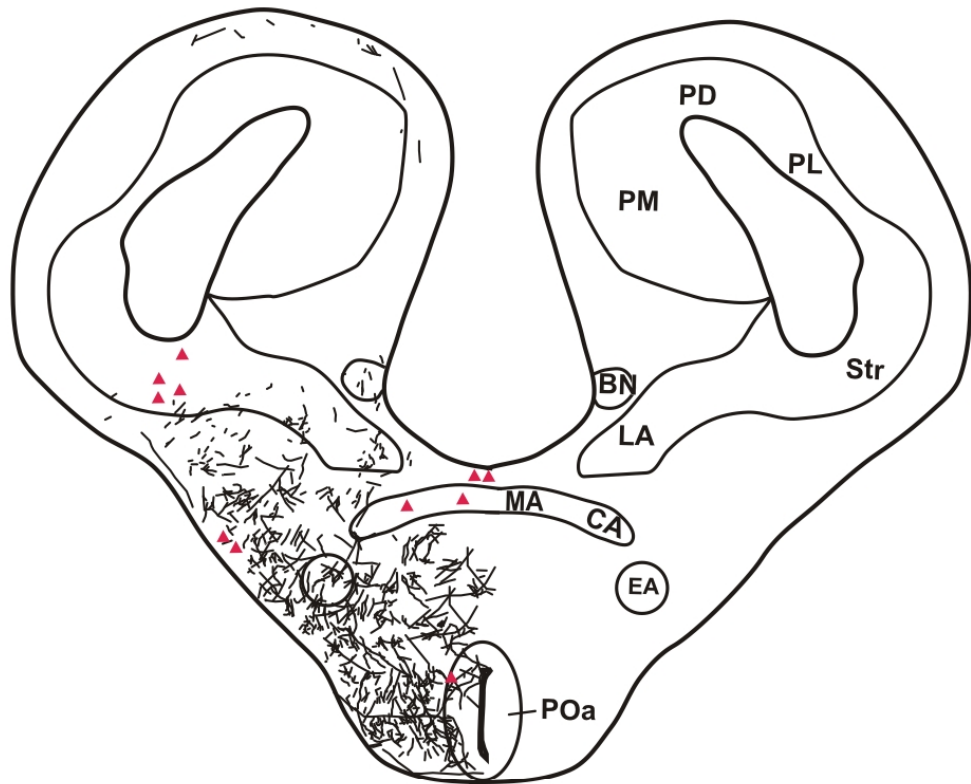
C



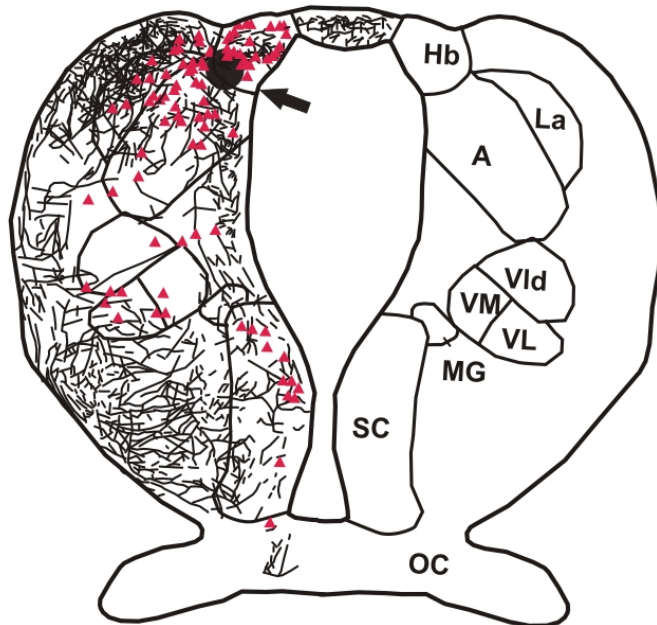
D



E



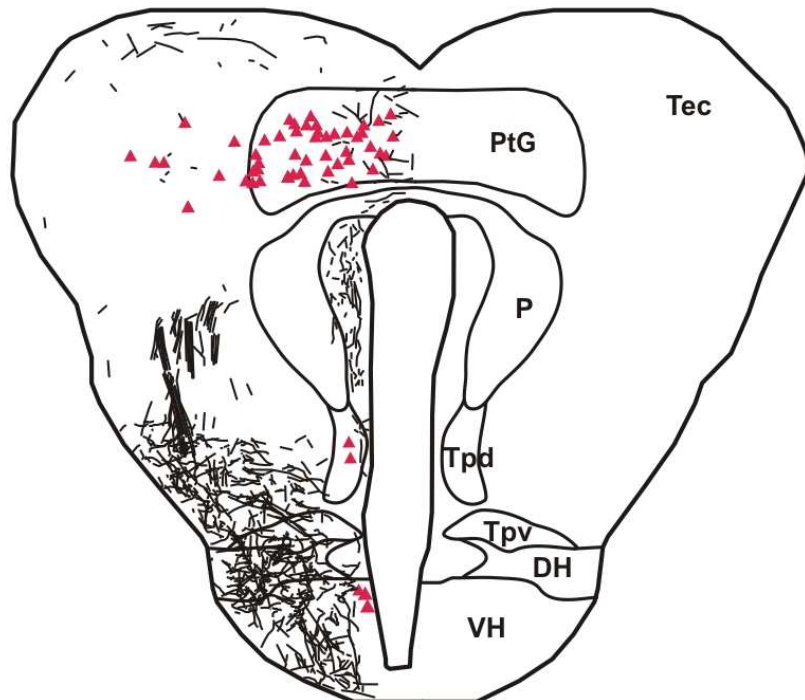
F



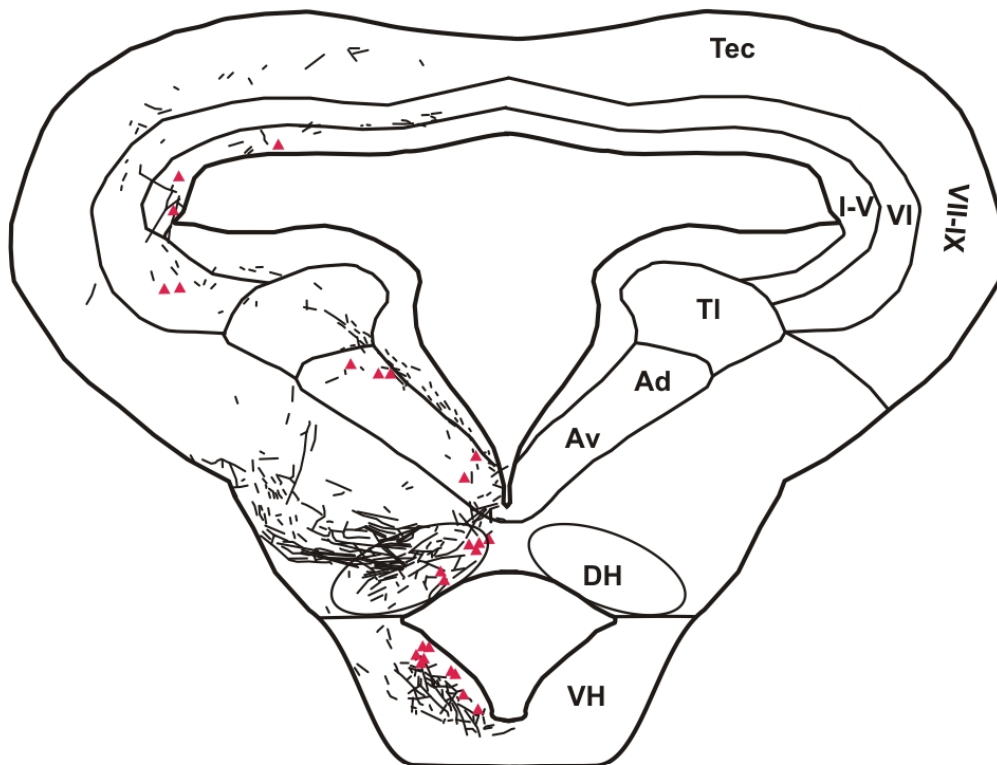
G



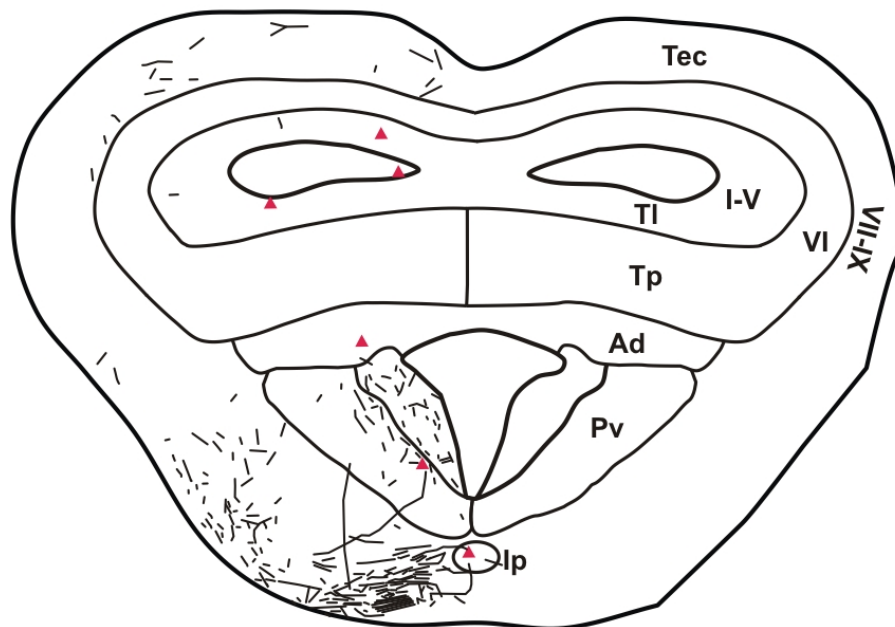
H



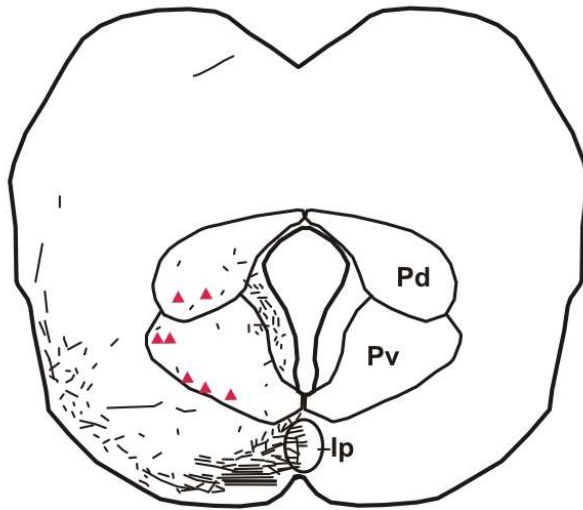
I



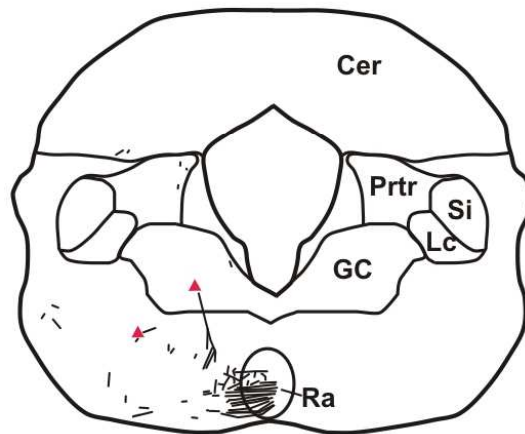
J



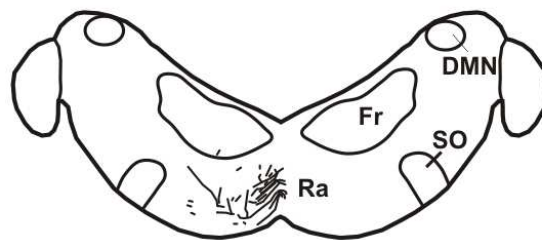
K



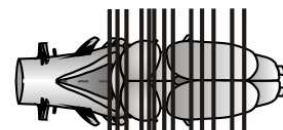
L



M



500µm



MLKJIHGF EDC BA

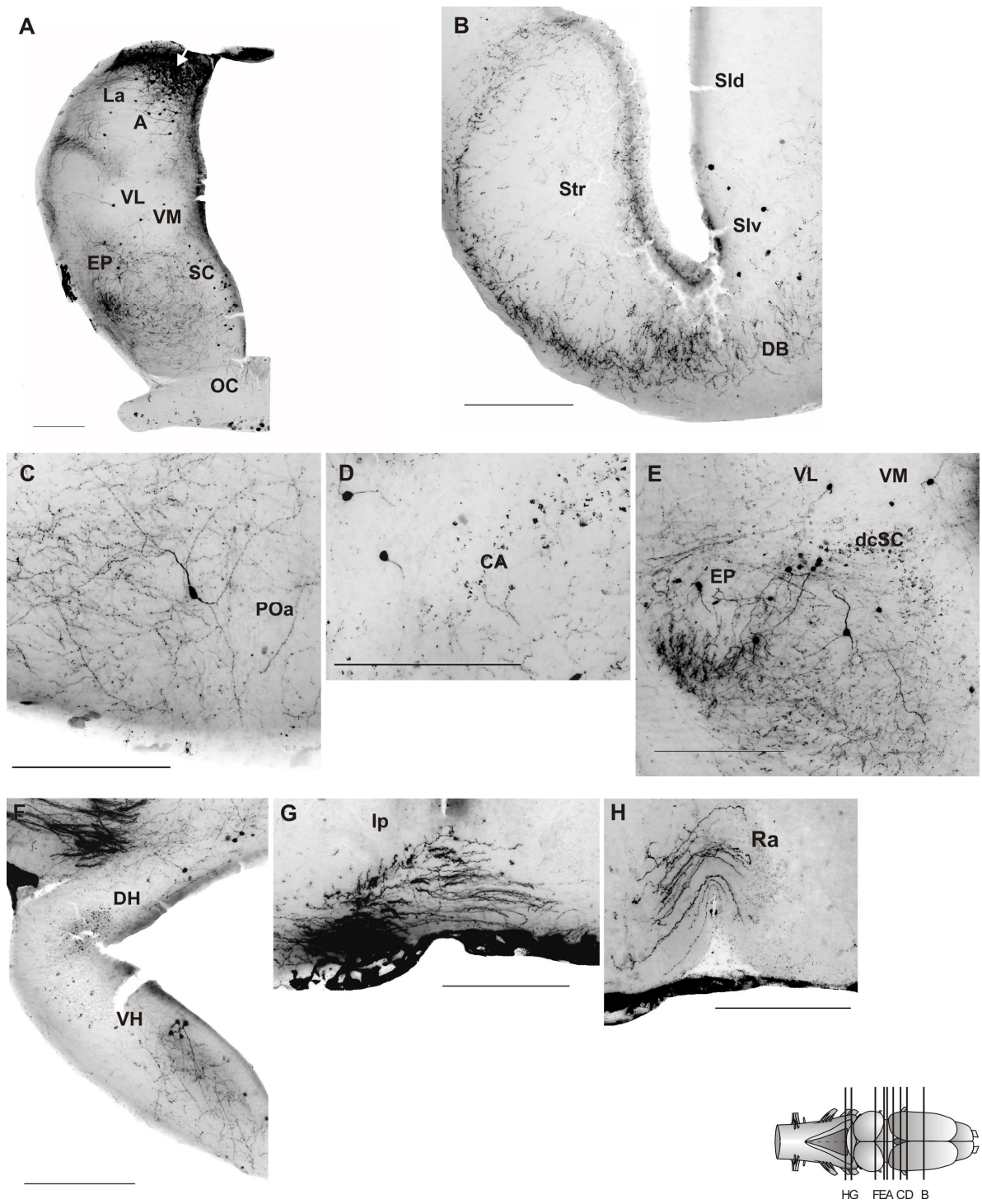


Abbildung 40: Mikrofotografien von markierten Afferenzen und Efferenzen nach Applikation von Neurobiotin in die Nuclei habenulares (weißer Pfeil in A)
 Die Schnittebenen sind in der Ganzhirn-Übersicht dargestellt, wobei die vertikalen Balken die Höhe der Querschnitte repräsentieren, wobei die vertikalen Balken die Höhe der Querschnitte repräsentieren.
 Maßstab= 200 µm

3.6.3 Verbindungen der Nuclei habenulares

Die folgende Schemazeichnung repräsentiert eine Übersicht der afferenten (rot) und efferenten (schwarz) Verbindungen nach Tracer-Applikation in die Nuclei habenulares.

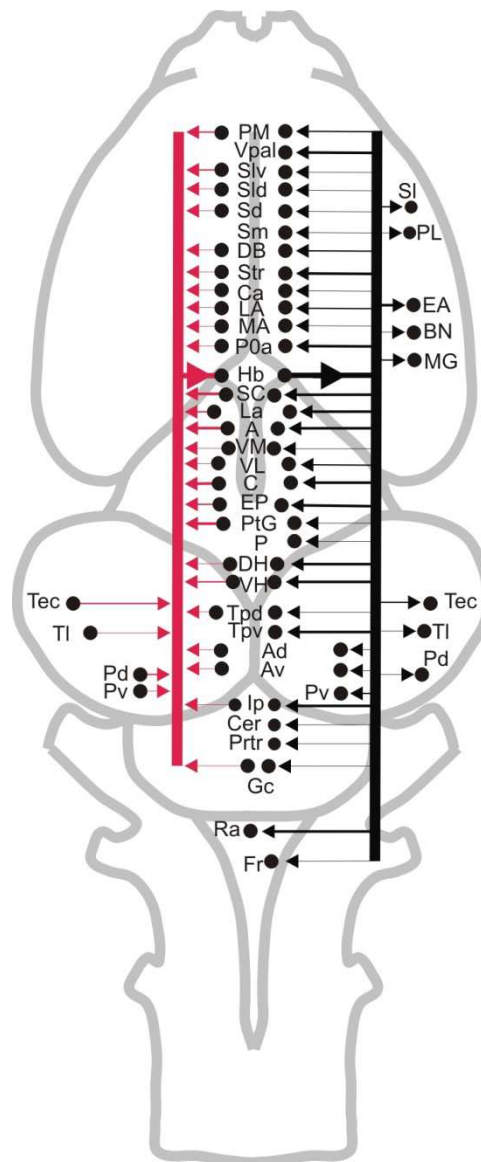


Abbildung 41: Afferente (rot) und efferente (schwarz) Verbindungen nach Applikation in der Nuclei habenulares

4. DISKUSSION

4.1 Isoliertes Hirnpräparat

In dieser Arbeit wurde für die Versuche hauptsächlich das isolierte Ganzhirnpräparat ausgewählt, da dieses je nach Versuch für mehrere Tage in einem Nährmedium aufbewahrt werden konnte - ohne Einleitung von degenerativen Prozessen - und für hodologische Untersuchungen distinkter Areale sehr gut zugänglich war (Luksch et al. 1996; Roden 2002). *In vitro*-Präparationen von Anurengehirnen konnten schon zuvor in zahlreichen elektrophysiologischen und hodologischen Studien erfolgreich durchgeführt werden (Schmidt 1976; Luksch 1994; Luksch et al. 1998; Brahic & Kelley 2003). Zu den Vorteilen dieser Methode zählt, neben einer Reduzierung der Zahl von Versuchstieren, dass durch die Isolierung des Gehirns gleichzeitig Stimulations- und Ableitelektroden an unterschiedlichen Bereichen des Gehirns angebracht und stabile Ableitungen registriert werden können, da Schwankungen des Blutdruckes nicht mehr auftreten (Luksch et al. 1996). Die Kontrolle des extrazellulären Milieus ermöglicht zusätzlich eine Untersuchung pharmakologischer Substanzen, die sowohl systemisch als auch lokal appliziert werden können. Bei hodologischen Studien ermöglicht das isolierte Ganzhirnpräparat ein großflächiges sowie gezieltes Applizieren verschiedener Marker und Farbstoffe. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber Slice- und Blockpräparaten, die nur wenige Stunden haltbar sind, nicht das gesamte neuronale Netzwerk umfassen und bei denen meistens durch Schnittverfahren relevante präsynaptische Eingänge entfernt werden, während im isolierten Hirnpräparat alle Verbindungen in ihrer ursprünglichen Form vorliegen. Für die Untersuchung der Konnektivität von vokalisationsrelevanten Strukturen war das isolierte Ganzhirnpräparat aufgrund der obengenannten Vorteile besonders gut geeignet. Aufgrund der Tatsache, dass jede Hirnhälfte als Rufgenerator fungiert (Schmidt 1976), wurden in dieser Arbeit auch einige anatomische Studien an medio-sagittal getrennten Hirnhälften durchgeführt.

Den Untersuchungen am isolierten Ganzhirnpräparat sind aber auch Grenzen gesetzt, da die sensomotorischen Eingänge fehlen. Aus der Aktivität des Gehirns kann daher nicht exakt auf das Verhalten des Tieres geschlossen werden, so dass

die ermittelten Daten keine unmittelbaren Rückschlüsse zulassen. Aus diesem Grunde wurden *c-fos* Untersuchungen am intakten Tier durchgeführt, um eine Korrelation von distinkten Verhaltensweisen und neuronaler Aktivität in den entsprechenden Arealen überprüfen zu können.

4.2 *c-fos*

4.2.1 Methodische Befunde

Die *c-fos* Immunhistochemie ist eine bewährte Methode für die funktionelle Kartierung von neuronaler Aktivität im Gehirn. Die Erregung von Neuronen führt über sekundäre Botenstoffe oder Membrandepolarisierung zu einer erhöhten Expression von *c-fos* mRNA. Das Translationsprodukt *Fos* wird nach seiner Synthese in den Zellkern zurücktransportiert, bindet dort als Transkriptionsfaktor an spezifische DNA-Bindungsstellen und reguliert somit die Expression bestimmter Gene. Auf diese Weise können Aktivitäten zu Langzeitänderungen innerhalb der Genexpression führen. Die Kartierung von „*immediated early genes*“ (IEGs), wozu auch *c-fos* gehört, wurde bereits bei Studien über die akustische Kommunikation bei Vögeln und Säugetieren erfolgreich durchgeführt (Kimpo & Doupe 1997; Mello 2002; Heimovices & Riters 2005; Sadananda et al. 2008, Miller 2010; Schwartz & Smotherman 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde nach akustischer Stimulation mit artifiziellen Paarungsrufen eine erhöhte Anzahl *c-fos* positiver Neuronen im Gesamthirn festgestellt. Aufgrund der kleinen Stichprobe lässt sich jedoch keine statistische Signifikanz ableiten, weshalb die vorliegenden Ergebnisse zumindest einen positiven Trend erkennen lassen.

Es gibt verschiedene Parameter, die einen Einfluss auf die Qualität und Quantität der *c-fos* Nachweise haben. Eine adäquate Reizung der Neurone spielt dabei eine wesentliche Rolle, da die Erhöhung der *c-fos* Expression von der Feuerrate der synaptischen Eingänge abhängt (Jarvis 2004). Die Aktivierungsstärke der spezifischen postsynaptischen Rezeptoren kann wiederum durch den Neugierkeitseffekt (novelty effect) und den Stimulationskontext moduliert werden (Mello et al. 1995; Zhu et al. 1995; Jarvis et al. 1998; Sockman et al. 2002; Maney et al. 2003). Aufgrund dieser Tatsache wurden die Versuchstiere eine Woche vor

Versuchsbeginn in einem schallisolierten Raum akklimatisiert. Die Akklimatisation diene dazu, den IEG-Level auf ein Minimum zu bringen, um damit die stimulationsbedingte Aktivität optimal detektieren und das Stressniveau der Versuchstiere reduzieren zu können (Burmeister et al. 2008). Stress hat u.a. einen negativen Effekt auf die synaptische Plastizität, indem die Anzahl dendritischer Spines reduziert wird und damit auch die postsynaptische Erregung. Das wiederum beeinflusst die Rezeptordichte und das synaptische Potential, so dass es zu einer Abnahme der *c-fos* Induktion kommen kann (Kennedy et al. 2005; Chen et al. 2008). Ein erhöhter Cortisol-Level kann außerdem die Rufbereitschaft reduzieren (Moore & Rose 2002). Welche Akklimatisierungszeit optimal gewesen wäre, konnte aufgrund der geringen Anzahl erfolgreich durchgeführter Versuche nicht eindeutig ermittelt werden. In Bezug auf das hormonbehandelte Tier wäre wahrscheinlich eine kürzere Phase besser gewesen, da innerhalb einer Woche der Hormonspiegel wieder abnehmen kann und somit auch die innere Bereitschaft zur Vokalisation. Das hormonbehandelte Versuchstier wies insgesamt weniger *c-fos* positive Somata auf als das Kontrolltier. Die Sensitivität für konspezifische Rufe war bei diesem Tier wahrscheinlich geringer, so dass nur wenige Hirnareale aktiviert wurden.

Die Sensitivität für akustische Signale wird bei Anuren hauptsächlich durch Hormone und Neuromodulatoren reguliert. Dabei korrelieren die saisonalen Änderungen des Hormonspiegels mit der saisonalen Rufaktivität (Kelley & Pfaff 1976; Obert 1977a; Yamaguchi & Kelley 2002; Gordon & Gerhardt 2009; Arch & Narins 2009). In dieser Arbeit wurden die Versuche mit dem Kontrolltier sowie der Stimulationstiere 1 und 2 (Bedingung K S1 und S2) im Juli und mit dem hormonbehandelten Tier (Bedingung S2+H) im Oktober durchgeführt. Beim Vergleich der Expressionsmuster mit der Rufaktivität, die im Frühjahr am höchsten ist (Akef & Schneider 1985), fällt auf, dass das hormonbehandelte Tier wesentlich weniger *c-fos* positive Neurone aufweist. Cobellis et al. (1999) konnte bei freilebenden *Rana esculenta* keine Korrelation zwischen der Fos- und GnRH-Aktivität im Gehirn nachweisen, so dass vermutlich andere Faktoren, wie z.B. Temperaturunterschiede, eine Rolle für den erhöhten *c-fos* Level spielen. Temperatur- und Lichtunterschiede spielen jedoch bei den hier verwendeten Labortieren keine wesentliche Rolle, da alle Versuchstiere unter gleichen Bedingungen getestet worden sind. Es bleibt weiterhin offen, ob letztendlich

Hormone, Neuromodulatoren, Neurotransmitter oder eine Kombination aus allen drei Faktoren für den Unterschied bzw. die Intensität der Expressionsmuster verantwortlich sind.

Die Intensitätsunterschiede der verschiedenen markierten Hirnregionen hängen weiterhin von dem Zeitverlauf der RNA- und Proteinsynthese der IEGs des jeweiligen Neurons ab (Sheng & Greenberg 1990; Friauf 1994; Morgan et al. 1987; Clayton 2000; Burmeister et al. 2008). Für die Aktivierung vokalisationsrelevanter Hirnregionen hat sich bei Vögeln und Säugetieren eine Stimulationszeit von 30 Minuten am effektivsten erwiesen, da innerhalb von 15-30 Minuten nach Stimulationsbeginn der höchste mRNA-Spiegel bzw. nach 1-1,5 Stunden der höchste *Fos*-Spiegel nachgewiesen wurde (Clayton 2000; Burmeister et al. 2008). In Anlehnung an die Ergebnisse von Clayton (2000) und Burmeister et al. (2008) konnten auch in den hier vorliegenden Experimenten nach einer Stimulationszeit von 30 Minuten und einer Überlebenszeit von 120 Minuten markierte Neurone in vokalisationsrelevanten Arealen beobachtet werden (siehe 4.2.2.3). Allerdings antworten nicht alle Neurone nach einer Exzitation mit einer *c-fos* Expression bzw. nicht alle *c-fos* exprimierende Neurone wurden depolarisiert (Dragunow & Faull 1986; Morgan & Curran 1989; Hoffman & Lyo 2002), was als Parameter bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss.

Ein weiteres Problem war die Spezifität des primären Antikörpers, da bisher keine *c-fos* Untersuchungen im Gehirn von *Bombina orientalis* durchgeführt wurden, so dass keine Vergleichsmöglichkeiten bestehen. Die Entscheidung, dennoch den *c-fos* Antikörper zu verwenden, war dadurch begründet, dass er sowohl bei Vögeln, Säugetieren, Fischen und auch bei Amphibien erfolgreich eingesetzt wurde, u.a. auch, um die Repräsentation auditorischer Signale zu analysieren (Ubink et al. 1997; Matsuoka et al. 1998; Cobellis 1999; Yao et al. 2004; Calle et al. 2006; Burmeister et al. 2008; Laberge et al. 2008). Es bleibt jedoch unklar, ob die nicht gelungenen Färbungen durch Fixierungs- oder Behandlungsunterschiede oder eventuell durch den primären Antikörper bedingt waren.

4.2.2 Verteilung von *c-fos* positiven Neuronen im Gesamthirn

4.2.2.1 Basale *c-fos* Aktivität

Eine basale *c-fos* Expression wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben (Dragunow & Faul 1989; Sadananda & Bischof 2002; Yao et al. 2004; Sadananda et al. 2008). Yao et al. (2004) wiesen u.a. bei Kontrolltieren der Art *Xenopus laevis* eine geringe Anzahl *c-fos* positiver Neurone in der Granulärzellschicht des Bulbus olfactorius, im Pallium laterale, im Nucleus accumbens, im Striatum laterale und im Nucleus hypothalamicus ventralis nach. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein basaler *c-fos* Spiegel in telencephalen Kerngebieten beobachtet, insbesondere in der Granulärzellschicht und im Pallium mediale. Allerdings wurden auch markierte Neurone in limbischen und thalamischen Strukturen sowie im Torus semicircularis und im Locus coeruleus detektiert. Das Expressionsmuster ist vergleichbar mit stressgetesteten Krallenfröschen in der Studie von Yao et al. (2004).

Die markierten Neurone im Torus semicircularis, Nucleus principalis und laminaris, legen eine Wahrnehmung von Geräuschen nahe, die wahrscheinlich aus den Versuchsbedingungen, wie z.B. durch Versuchsvorbereitungen und/oder auch selbstinduzierte Wassergefälle der Versuchstiere, resultierten. Diese Hypothese wird unterstützt durch markierte Neurone im Locus coeruleus, die u.a. bei aufmerksamkeitsgesteuertem Verhalten, wie z.B. der Orientierung hin zu neuen Reizen, oder auch bei Stresssituationen aktiv sind (Vankov et al. 1995; Cirelli et al. 1996). Eine Möglichkeit zur Reduzierung von Geräuschquellen wäre z.B. eine leise Beschallung mit weißem Rauschen während der Akklimationszeit, so dass kein Neugierigkeitseffekt bei den Versuchsvorbereitungen entstehen könnte und die Versuchstiere somit adaptiert wären. Dass eine basale Expression von IEGs im Torus semicircularis vorkommen kann, konnte auch in der Studie von Hoke et al. (2004) bei männlichen Túngara-Fröschen nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum Kontrolltier enthielt das hormonbehandelte Tier der Bedingung S2+H viel weniger markierte Neurone. Jedoch muss hier berücksichtigt werden, dass dieses Tier im Oktober gemessen wurde und die Hormongabe möglicherweise nicht ausreichte, um die fehlenden intrinsischen Hormone zu substituieren. Ein Grund hierfür könnte sein, dass außerhalb der Paarungszeit nicht nur die Hormone,

sondern auch deren Rezeptoren herunterreguliert sind. Dafür spricht die Tatsache, dass Hormone ausschließlich während der Reproduktionsphase einen starken Einfluss auf die Filtereigenschaften des auditorischen Systems ausüben (Brzoska & Obert 1980; Walkowiak 1980; Penna et al. 1992; Miranda & Wilczynski 2009). Brzoska & Obert (1980) konnten eine Beeinflussung der art eigenen Rufe auf die Hormonsynthese nachweisen, die schließlich zu einer Erhöhung der Reproduktionsaktivität von Männchen und Weibchen führt.

4.2.2.2 Akustisch basierte *c-fos* Aktivität

Das Versuchstier der Bedingung S1 hat während der Stimulation nicht geantwortet und ist daher der Gruppe der „Zuhörer“ zuzuordnen. Im Gegensatz zu den Versuchstieren der Bedingung S2 konnten keine markierten Neurone in den ersten beiden Hörbahnstationen detektiert werden, sondern erst im Torus semicircularis. Hier konnten speziell im Nucleus laminaris und im Nucleus principalis *c-fos* positive Neurone beobachtet werden. Die unterschiedlichen Expressionsmuster beider Subnuclei wurden ebenfalls bei Hoke et al. (2007) beschrieben, wobei der Nucleus laminaris bei Túngara-Fröschen mit einer erhöhten *egr-1* Expression auf konspezifische Rufe reagierte. Aufgrund der niedrigen Anzahl von getesteten Versuchstieren lassen sich allerdings keine Aussagen über die Funktionalität der jeweiligen toralen Neuronenpopulation machen. Bei den vorliegenden Untersuchungen der Bedingung S1 wurden zusätzlich prämotorische und sensomotorische Zentren (z.B. Nucleus praetrigeminalis, Tegmentum, Nucleus posterior thalami) angefärbt, was teilweise auch von Hoke et al. (2007) berichtet wurde. Das Anfärben von Vorderhirn-Neuronen, z.B. im Striatum, Septum und der Amygdala, weist vermutlich auf einen modulierenden Effekt auf die prämotorischen Areale und letztendlich auch auf den motorischen Ausgang hin (Walkowiak et al. 1999). Da keine markierten Neurone im Nucleus praeopticus anterior detektiert wurden, bezieht sich diese Aktivierung nicht auf die Vokalisation. Das zusätzliche Anfärben der Basalganglien unterstützt jedoch die Hypothese einer lokomotorischen Aktivität, die z.B. durch Hin – oder Abwendung zum Reiz.

4.2.2.3 Vokalisations-basierte *c-fos* Aktivität

Die beiden Versuchstiere der Bedingung S2 wiesen gegenüber den anderen Behandlungsgruppen markierte Hirnareale auf, die in die Rufgenerierung involviert sind: hierzu gehören der Nucleus praeopticus anterior und der Nucleus hypothalamicus dorsalis. Dass beide Areale in der Generierung von Paarungsrufen involviert sind, konnte schon in früheren elektrophysiologischen, hodologischen und Läsionsstudien erfolgreich nachgewiesen werden (Schmidt 1966a, 1968, 1976, 1984; Knorr 1976; Brahic & Kelley 2003). Außerdem wurde im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen eine leicht erhöhte Dichte *c-fos* positiver Neurone im Nucleus praetrigeminalis, dem vokalen Mustergenerator, festgestellt.

Im Bereich der Motoneurone des N. V, VII, IX-X und XII, die für die Innervation des Rufapparates zuständig sind (Walkowiak 2007), konnte keine *c-fos* Aktivität festgestellt werden, was wiederum auf einen fehlenden „novelty effect“ zurückzuführen ist, da die Motoneurone z.B. im Rahmen der Atmung permanent aktiv sind. Weiterhin konnten bei einem rufaktiven Tier markierte Neurone in der zweiten Hörbahnstation, der Oliva superior, identifiziert werden. Die differierenden *c-fos* Aktivitäten innerhalb der unteren Hörbahnstationen resultiert wahrscheinlich auch aus einer permanenten Neuronenaktivität, wobei auch Unterschiede in den Eigenschaften des Trommelfells, Mittel- und Innenohrs eines Individuums mit verantwortlich sein können (Friauf 1995). Die Erklärung der Unterschiede bleibt jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Versuchstieren eher spekulativ. Auch bei dieser vokalisierenden Behandlungsgruppe S2 wurden sowohl prämotorische, sensomotorische und limbische Hirnareale markiert. Bei den limbischen Strukturen spielt das Septum eine wesentliche Rolle beim Rufverhalten der Männchen. Walkowiak et al. (1999) konnten durch Läsionsstudien inhibitorische Effekte auf den vokalen Schrittmacher (Nucleus praeopticus anterior) nachweisen. Das Septum und auch andere vokalisationsrelevante Kerngebiete erhalten außerdem serotonerge Eingänge aus dem Nucleus raphé (Roden et al. 2002), der ebenfalls bei beiden Versuchstieren markiert wurde.

4.2.2.4 Funktionelle Bedeutung

Zusammenfassend kann man sagen, dass die *c-fos* Methode einen guten Überblick über die Gesamtaktivität nach einem spezifischen Reiz gibt. Eine Korrelation mit dem Verhalten, die anzeigt, ob eine erhöhte *c-fos*-Expression z.B. das Ergebnis eines neuartigen Reizes oder vielmehr die Konsequenz einer verstärkten motorischen Aktivität ist, kann eindeutig nur mit Hilfe einer größeren Stichprobe ermittelt werden. Störfaktoren, wie z.B. die Konstitution des Tieres (Hormonspiegel, generelle Rufbereitschaft etc.), können die Analyse zusätzlich erschweren, da die Expression von IEGs maßgeblich von der Reizschwelle des jeweiligen Neurons abhängig ist.

4.3 Hodologische Untersuchungen der Vokalisationsbahn

4.3.1 Methodische Befunde

4.3.1.1 Elektrische Stimulation

Bei einer extrazellulären elektrischen Reizung werden Neuronenpopulationen eines Hirnareals über eine Elektrode stimuliert. Die induzierte neuronale Aktivität kann bei nachgeschalteten Zellen sowohl zu Exzitation als auch zu Inhibition führen. Diese Signale können mit einer Ableitelektrode registriert und für elektrophysiologische oder hodologische Fragestellungen genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde die extrazelluläre Stimulation in der Area praeoptica verwendet, um anhand der generierten Potentiale den Nucleus praetrigeminalis zu lokalisieren, so dass eine präzise Positionierung der Neurobiotin-gefüllten Ableitelektrode möglich war. Dass die Area praeoptica als vokaler Schrittmacher fungiert und einen Einfluss auf den vokalen Mustergenerator hat, konnte schon in zahlreichen Stimulations-, Läsions- und Ablationsversuchen erfolgreich nachgewiesen werden (Schmidt 1966, 1968, 1971, 1973; Knorr 1976; Wada & Gorbman 1977a,b; Urano 1988). Es konnten jedoch bei allen hier durchgeführten Stimulationsversuchen keine extrazellulären Potentiale im Nucleus praetrigeminalis registriert werden, so dass der Marker Neurobiotin ohne elektrophysiologische Verifizierung im Umfeld des Nucleus praetrigeminalis appliziert wurde.

Über die Verbindung zwischen der Area praeoptica und dem Nucleus praetrigeminalis gibt es widersprüchliche Aussagen: Wetzel et al. (1985) wiesen mittels WGA-HRP eine direkte Verbindung beider Areale bei der Art *Xenopus laevis* nach, wohingegen Brahic & Kelley (2003) diese Verbindung mit Fluororuby nicht bestätigen konnten. In Anbetracht dessen, dass WGA-HRP transneuronal auch über synaptische Verbindungen transportiert werden kann (Köbber 2000), scheint es sowohl eine indirekte Verbindung als auch eine schwache direkte Verbindung zu geben, was bei meinen Versuchen die Notwendigkeit einer hohen Reizstärke erforderlich gemacht hat. Die möglicherweise zu hohe Stromapplikation und/oder mechanische Beschädigungen der Stimulationselektrode könnte allerdings zu einer Zerstörung der Neurone in der Area praeoptica geführt haben (vgl. POa; Abb. 19-S5, 21-S2, 21-S3), was wiederum die fehlenden evozierten Potentiale im Nucleus praetrigeminalis erklären würde.

4.3.1.2 Neurobiotin

Die Untersuchung von neuronalen Verbindungen im Nervensystem mit dem Marker Neurobiotin ist eine etablierte Methode (Kita & Armstrong 1990; Lapper & Bolam 1991; Hunag et al. 1992; Maier et al. 2010). In Kombination mit einer DAB-Reaktion konnte eine hohe Nachweisbarkeitsrate bzw. eine tiefschwarze und lichtstabile Markierung erreicht werden (Adams 1981; Shu et al. 1988; Luksch 1994).

Der Marker Neurobiotin wurde bei extrazellulärer Applikation insgesamt sehr gut von den umliegenden Neuronen aufgenommen. Entsprechend der Applikationsmenge konnte bei den durchgeführten Versuchen sowohl ein anterograde als auch ein retrograde Transport beobachtet werden. Ein guter anterograde Transport wurde schon in früheren Tracingstudien erfolgreich nachgewiesen (Kita & Armstrong 1990; Lapper & Bolam 1991; Huang et al. 1992), wobei retrograd nur bedingt transportiert wurde (Kita & Armstrong 1990; Barnes et al. 1994). Neurobiotin kann durch Druckapplikation, in kristalliner Form oder auch iontophoretisch appliziert werden (Köbber et al. 2000). Im Zusammenhang mit elektrophysiologischen Untersuchungen hat sich jedoch die iontophoretische Form als effizienter erwiesen (Lapper & Bolam 1991). Mit einem entsprechenden Elektrodenwiderstand kann diese

Technik sowohl für intrazelluläre als auch für extrazelluläre Färbungen genutzt werden. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methode ist eine genaue Lokalisation der Elektrodenspitze vor der Stromeinprägung. In dieser Arbeit hing die Qualität des retrograden Transportes u.a. von der Amplitude des Applikationsstromes, der Konzentration des applizierten Tracers, der Traceraufnahme der Neuronen und den entsprechenden Hirnarealen ab. Bei den meisten durchgeführten Experimenten hat sich eine Applikationsstromstärke von 180 – 250 nA, eine Neurobiotin-Konzentration von 10% und eine Applikationszeit von 30 Minuten als effektiv erwiesen. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichts wird Neurobiotin sehr schnell aufgenommen und transportiert, so dass eine kurze Laufzeit von 1-2 Tagen zu einem großen Detailreichtum von neuronalen Strukturen führen sollte. Jedoch wurden oft keine axonalen und dendritischen Arborisationen angefärbt bzw. weiter entfernte Strukturen waren zuweilen schwach markiert, was eventuell an einer schnellen Metabolisierung von Neurobiotin, einer Ausscheidung der Substanz in den Extrazellulärraum oder an der Faserqualität der untersuchten Neurone liegen könnte (Kita & Armstrong 1990; van Haeften & Wouterlood 2000; Roden 2002). Eine geringe Läsion konnte bei den medio-sagittal getrennten Gehirnen beobachtet werden, allerdings nicht bei den Ganzhirnpräparaten. Das hohe Verletzungspotential entstand anfangs durch das mehrfache Einstechen der Ableitelektrode in das Gewebe (siehe Abb. 19-S1).

Ein weiterer Faktor, der bei der Interpretation von Neurobiotinfärbungen berücksichtigt werden muss, ist ein transneuronaler Transport über die Synapsen bzw. über Gap Junctions (Huang et al. 1992; Peinado et al. 1993; Luo & Dessem 1996; Kirnan 2006). Außerdem gibt es widersprüchliche Aussagen über die Farbstoffaufnahme via Fibers of Passage: Während Barnes et al. (1994) und Huang et al. (1992) keine Markeraufnahme beobachten konnten, berichtete Pinauld (1996) von Anfärben der Fibers of Passage nach extrazellulärer Iontophorese. Auch bei Anuren konnte ein Anfärben nach iontophoretischer Applikation detektiert werden (Luksch 1994; Roden 2002), was ich in meinen Experimenten ebenfalls beobachtet und bezüglich meiner Auswertung berücksichtigt habe.

4.3.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Eine ergänzende Methode für die Aufklärung neuronaler Verbindungen spezifischer Hirnareale war die Verwendung fluoreszenzgekoppelter Dextranamine (Glover et al. 1986; Schmued et al. 1990; Brahic & Kelley 2003). Diese Tracer werden ebenfalls antero- und retrograd mit hoher Geschwindigkeit (ca. 2mm/h) transportiert und sind im Gegensatz zum Marker Neurobiotin direkt sichtbar (Schmued et al. 1990; Fritsch 1993). Aufgrund verschiedener Absorptionsspektren können multiple Fluoreszenzfarbstoffe auch gleichzeitig eingesetzt werden, so dass synaptische Konnektivitäten besser untersucht werden können. Bei multiplen Färbungen spielen gerade die Laufeigenschaften der jeweiligen Tracer eine wichtige Rolle, um eine adäquate Färbung zu erhalten (Novikova et al. 1997). Da sowohl Dextranamin-Tetramethylrhodamin als auch Dextranamin Alexa Fluor® 488 in meinen Tracings unterschiedliche Laufeigenschaften aufwiesen, konnte ich keine qualitativ gute Doppelfärbung erzielen. Möglicherweise hängt eine gute retrograde Färbung ebenfalls von der Faserqualität der zu untersuchenden Neurone oder auch von der Faserdichte der jeweiligen Kerngebiete ab.

In meiner Arbeit wurden die beiden Dextranamin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Tetramethylrhodamin und Alexa Fluor® 488 verwendet, wobei das Rhodamin-gekoppelte Dextranamin eine wesentlich höhere Fotostabilität aufwies. In den ersten Versuchen hatten beide Fluorophore ein Molekulargewicht von 10.000 kD, was letztendlich einen negativen Effekt auf den Transport hatte, weshalb hauptsächlich ein lokaler Transport beobachtet wurde. Fritsch (1993) und Kaneko et al. (1996) konnten nachweisen, dass Fluorophore mit einem Molekulargewicht von 3.000 kDa viel schneller vom Gewebe aufgenommen und transportiert werden, wobei weitere Faktoren, wie z.B. die Konzentration und Laufzeit des jeweiligen Tracers, auch entscheidend waren. Ein weiterer Faktor, von dem ein gutes Tracing abhing und der sich erst zum Schluss meiner experimentellen Arbeit herausgestellt hat, war die Lösung der Farbstoffkristalle in destilliertem Wasser und nicht in Phosphatpuffer.

Die Fluoreszenzfarbstoffe können sowohl über Kristall- als auch Druckapplikation injiziert werden (Glover et al. 1986; Fritsch & Wilm 1990; Köbbert 2000). In meiner Arbeit hat sich die Druckapplikation als bessere Methode bewährt, weil dadurch eine

bessere Positionierung der Applikationskapillare möglich war, die Applikationsmenge besser kontrolliert werden konnte und die fluoreszenzgekoppelten Dextranamine besser transportiert wurden. Die Farbstoffaufnahme kann sowohl an Axonterminalien als auch an zerstörten Zellstrukturen erfolgen, wobei die letztgenannte Variante effektiver ist (Glover et al. 1986; Kaneko 1996). Fritsch (1993) konnte außerdem erfolgreich nachweisen, dass der Transport primär über Diffusion erfolgt und sekundär über einen langsamen axonalen Transport, während ein transneuronaler Transport über die chemische Synapse nicht beobachtet werden konnte (Köbber 2000). Aufgrund ihrer Sensitivität bei der Kryo- und Paraffin-Schnitttechnik wurden alle fluoreszenzbehandelten Gehirne mit einem Vibratom geschnitten (Luksch 1994; Köbber 2000).

4.3.2 Verbindungen des Nucleus praetrigeminalis (vokaler Mustergenerator)

Die neuroanatomische Aufklärung der Vokalisationsbahn von Anuren basierte bisher hauptsächlich auf Untersuchungen der Art *Xenopus laevis* (Wetzel et al. 1985; Brahic & Kelley 2003). Aufgrund seines abweichenden Rufmechanismus (siehe 1.3.1) und der widersprüchlichen Aussage bezüglich der Verschaltung zwischen der Area praeoptica und dem Nucleus praetrigeminalis, wurden in dieser Arbeit hodologische Studien bei der pädomorphen Art *Bombina orientalis* durchgeführt. Diese sollten primär Aufschluss über die Verschaltung des Nucleus praetrigeminalis geben.

4.3.2.1 Eingänge des Nucleus praetrigeminalis

Die vorliegenden Tracings ausgehend vom Nucleus praetrigeminalis zeigen, dass der vokale Mustergenerator (Nucleus praetrigeminalis) und der vokale Schrittmacher (Area praeoptica) nicht direkt verschaltet sind, sondern dass Informationen vielmehr über parallele Zwischen- bzw. Relaisstationen laufen. Diese Befunde stehen zwar im Widerspruch mit den Daten von Wetzel et al. (1985), die nach WGA-Tracings in den Nucleus praetrigeminalis (DTAM) bei *Xenopus laevis* markierte Zellkörper in dem Nucleus praeopticus anterior nachweisen konnten. Brahic & Kelley (2003) hingegen konnten bei *Xenopus laevis* auch keinen direkten Weg zwischen dem Nucleus praetrigeminalis und der Area praeoptica nachweisen. Darüberhinaus wurden meine

Ergebnisse, die in Übereinstimmung mit den Angaben von Brahic & Kelley (2003) stehen, jüngst durch die Befunde von Domínguez et al. (2013) bestätigt, die biotinylierte Dextranamine (BDA) in die Area praeoptica bei *Xenopus laevis* injizierten und keine deszendierenden Efferenzen im Nucleus praetrigeminalis, jedoch im Nucleus raphé nachweisen konnten.

Extrazelluläre Tracings, die im Dendritendfeld des Nucleus praetrigeminalis durchgeführt wurden, wiesen außerdem vereinzelt retrograd gefärbte Neurone in de Nucleus praeopticus anterior auf. Diese gelegentlichen Markierungen wurden auch von Brahic & Kelley (2003) beobachtet, jedoch gingen die Autoren von einer indirekten Innervierung des vokalen Mustergenerators aus. Im Falle einer schwachen direkten Verbindung würde diese über synaptische Kontakte an den dendritischen Arborisationen des Nucleus praetrigeminalis erfolgen, die ich mit Doppelfärbungen jedoch nicht bestätigen konnte. Es ist also wahrscheinlich, dass die retrograde Markierung in der Area praeoptica über Traceraufnahme vorbeiziehender Fasern zustande kam. Dass der Nucleus praeopticus anterior bis in die Medulla oblongata projiziert, konnten „back-fill“-Tracings im Bereich des N. X und XII von Schneider (2012) zeigen, die retrograd markierte Zellkörper in diesem Areal nachweisen konnte.

Aufgrund der geringen retrograden Markierung in dem Nucleus praeopticus anterior scheint in *Bombina orientalis* eine indirekte Verschaltung zwischen beiden Vokalisationsarealen zu existieren. Es stellt sich die Frage, welches Kerngebiet letztendlich die Aktivität des vokalen Mustergenerators bezüglich konspezifischer Paarungsrufe beeinflusst.

4.3.2.2 Mögliche Relaisstationen

Der Nucleus praetrigeminalis erhielt afferente Eingänge aus dem Infundibulum. In meinen Präparaten wurden nach Applikationen im Dendritenfeld des Nucleus praetrigeminalis retrograd markierte Zellkörper im Infundibulum, pars dorsalis nachgewiesen, während markierte Fasern hauptsächlich im Infundibulum, pars ventralis beobachtet wurden. Tracer-Applikationen im Somabereich des Nucleus praetrigeminalis erzeugten jedoch keine Färbung im gesamten Infundibulum, was auf

einen synaptischen Kontakt an den dendritischen Arborisationen schließen lässt. Über die afferenten Eingänge aus dem Infundibulum existieren in der Literatur widersprüchliche Aussagen: Während Wetzell et al. (1985) keine markierten Neurone im Infundibulum detektierten, fanden Brahic & Kelley (2003) angefärbte Somata im Infundibulum, pars dorsalis und im Infundibulum, pars ventralis, was teilweise mit meinen Ergebnissen übereinstimmt. Da das Infundibulum starke reziproke Verbindungen zum Nucleus praeopticus anterior und zum Nucleus raphé, pars dorsalis bei *Xenopus laevis* aufweist (Brahic & Kelley 2003), wurden im Infundibulum von *Bombina orientalis* Tracing-Applikationen durchgeführt, die Auskünfte über seine Eingänge und Ausgänge geben sollten (siehe 4.3.4).

Eine weitere Relaisstation ist das Tegmentum, das bei den bisherigen Untersuchungen der Vokalisationsbahn von Anuren wenig beachtet worden ist. Tracer-Applikationen im Soma des Nucleus praetrigeminalis führten zu retrograd markierten Zellkörpern im anterodorsalen Tegmentum, pars dorsalis, während Injektionen im Dendritenfeld meistens das gesamte Areal markierten, was aufgrund des Fasergeflechts auch zu erwarten war. Auffällig waren dabei stark markierte Fasertrakte, die zwischen beiden Kerngebieten beobachtet wurden und auf robuste Verbindungen hinweisen. Das Tegmentum ist ein Integrationszentrum, das u.a. in sensomotorische Prozesse involviert ist und einen Einfluss auf die Vokalmotorik ausüben kann. Um Aufschluss über seine Eingänge und Ausgänge zu erhalten, insbesondere zur Area praeoptica, wurden in meiner Arbeit zusätzliche Tracer-Applikationen im Tegmentum durchgeführt (siehe 4.3.5).

Meine Befunde zeigten ebenfalls afferente Eingänge aus dem Striatum ventrale und dem Nucleus raphé, pars dorsalis, wobei die unterschiedlichen Applikationsstellen im Bereich des Nucleus praetrigeminalis auch hier eine wichtige Rolle spielten: Beide Nuclei enthielten retrograd markierte Zellkörper und Fasern nach Tracer-Applikationen in das Dendritenfeld, während Applikationen im Somabereich nur aufsteigende Efferenzen aus dem Nucleus praetrigeminalis im Striatum anfärbten. Brahic & Kelley (2003) beschrieben einen möglichen indirekten Weg von der Area praeoptica zum Nucleus praetrigeminalis über das Striatum ventrale und/oder über den Nucleus raphé, pars dorsalis, was auch von Domínguez et al (2013) vermutet

wird. Weitere Literaturangaben weisen auf eine reziproke Verbindung zwischen dem Striatum und dem Nucleus praetrigeminalis hin (Wetzel et al. 1985; Roden 2002), so dass eine direkte Beeinflussung der basalen Vorderhirnstruktur auf den vokalen Mustergenerator und damit auf die Vokalmotorik existieren könnte. Sowohl das Striatum als auch die Area praeoptica enthalten auditorische Neurone, so dass eine Beeinflussung des Rufverhaltens durch akustische Informationen aus dem Striatum, wie z.B. konspezifische Paarungsrufe, möglich ist (Aitken & Capranica 1984; Wetzel et al. 1985). Der Nucleus raphé ist reziprok sowohl mit dem Nucleus praeopticus anterior, sowie allen prämotorischen und sensomotorischen Vokalisationsarealen, wie z.B. dem N. IX-X, dem Striatum ventrale oder auch dem Infundibulum, pars dorsalis, verbunden (Marín et al. 1997a; Brahic & Kelley 2003) und übt einen modulierenden Einfluss mittels Serotonin auf das Rufverhalten bei *Xenopus laevis* aus (Rhodes et al. 2007; Yu & Yamaguchi 2010). Die von Brahic & Kelley (2003) beschriebenen afferenten Eingänge vom Striatum und vom Nucleus raphé, pars dorsalis konnten auch in meinen Präparaten beobachtet werden. Beide Areale sind an der Modulierung des vokalen Mustergenerators beteiligt und kämen damit als geeignete Gebiete für eine indirekte Verschaltung bei *Bombina orientalis* in Frage.

4.3.3 Verbindungen der Area praeoptica (vokaler Schrittmacher)

Die vorliegenden Tracings in der Area praeoptica sollten Aufschluss über seine efferenten Ausgänge, insbesondere im Bezug auf mögliche Zwischen- und/oder Relaisstation im Vokalisationssystem, geben.

Die durchgeführten Tracings in der Area praeoptica führten zu keiner Anfärbung von retrograd markierten Somata und/oder anterograd markierten Fasern im Nucleus praetrigeminalis. Es wurden zwar Fasern beobachtet, die in Richtung Hirnstamm zogen, jedoch konnte in meinen Präparaten kein direkter Kontakt nachgewiesen werden, auch nicht an den dendritischen Arborisationen des Nucleus praetrigeminalis. Diese Befunde stehen weiterhin in Übereinstimmung mit den Daten von Brahic und Kelley (2003) und Domínguez et al. (2013), die auch keine Afferenzen und retrograd markierte Zellen im Nucleus praetrigeminalis nachweisen konnten, stattdessen aber im Nucleus raphé, pars dorsalis, was eventuell den caudal

ziehenden Fasern in meiner Arbeit entsprechen könnte. Dass im Nucleus raphé, pars dorsalis keine markierten Faser und/oder Zellkörper detektiert wurden, liegt wahrscheinlich am schlechten Transport des Fluoreszenzfarbstoffes. Ob der Nucleus praeopticus anterior bei der Art *Bombina orientalis* ebenfalls reziproke Verbindungen zum Nucleus raphé, pars dorsalis aufweist, könnte durch weitere Tracing-Applikationen mit längeren Laufzeiten oder Stimulationsexperimente verifiziert werden.

Es wurden auch Fasern und Zellkörper im Striatum ventrale markiert, was in guter Übereinstimmung mit den Literaturangaben von Wetzel et al. (1985), Fujita & Urano (1986), Brahic & Kelley (2003) und Domínguez et al. (2013) steht. Widersprüchliche Ergebnisse erzielten die Tracing-Studien von Allison & Wilczynski (1991) und Marín et al. (1997c), die sowohl bei *Hyla cinerea*, *Rana perezi* als auch *Xenopus laevis* nach Tracer-Applikationen in die Area praeoptica anterior keine retrograd markierten Zellkörper im Striatum beobachten konnten. Diese unklaren hodologischen Befunde resultieren wahrscheinlich aus der Verwendung unterschiedlicher Tracer, differierender Applikationsorten bzw. -techniken und aus Artunterschieden, da insbesondere bei *Xenopus laevis* widersprüchliche Daten nachgewiesen wurden. Dass auch eine reziproke Verbindung zwischen dem Striatum und dem Nucleus praeopticus anterior existiert, konnten Roden (2002) und Endepols et al. (2004) bei *Bombina orientalis* und *Hyla versicolor* nachweisen.

Weiterhin konnten in meinen Präparaten sowohl markierte Neurone als auch Fasern im Nucleus anterior thalami detektiert werden, die ebenso von Brahic & Kelley (2003) beschrieben wurden. Der Nucleus praeopticus anterior erhält auditorische Informationen über den Nucleus anterior thalami (Mudry & Capranica 1980; Allison & Wilczynski 1991). Diese Eingänge können wiederum das endokrine System beeinflussen, so dass paarungsbereite Männchen zur Vokalisation angeregt werden (Allison & Wilczynski 1991; Wilczynski et al. 1993). Die Area praeoptica und auch das Infundibulum regulieren zusammen die Sekretion von Steroidhormonen und Gonadotropin (Allison & Wilczynski 1991; Wilczynski et al. 1993; Burmeister & Wilczynski 2000; Brahic & Kelley 2003; Domínguez et al. 2013): Im Infundibulum, pars ventralis wurden hauptsächlich Fasern und Terminalien detektiert, während das

Infundibulum, pars dorsalis ein markiertes Neuron aufwies. Hodologische Untersuchungen an Raniden und Bufoiden weisen ebenfalls auf eine reziproke Verbindung zwischen der Area praeoptica und dem Infundibulum hin (Neary 1980; Fujita & Urano 1986).

Das Tegmentum erhält ebenfalls efferente Eingänge aus der Area praeoptica, die ausschließlich im anteriodorsalen Subnucleus detektiert wurden. In dem gleichen Areal konnten wiederum auch markierte Afferenzen aus dem Nucleus praetrigeminalis sowie dorthin projizierende efferente Neurone nachgewiesen werden. Das anteriore Tegmentum, pars dorsalis ist u.a. in komplexe sensomotorische Schaltkreise involviert, wie z.B. in das System der Basalganglien, und wird mit der Substantia nigra, pars reticulata homologisiert, die Ausgangsstruktur der Basalganglien (Marin et al. 1997b; Smeets et al. 2000).

Die Tracer-Applikationen in die Area praeoptica belegen, dass kein direkter Kontakt zum Nucleus praetrigeminalis existiert. Die Informationen zwischen dem vokalen Schrittmacher und dem vokalen Mustergenerator werden vielmehr über verschiedene indirekte Wege geleitet, wie z.B. das Infundibulum oder das Tegmentum.

4.3.4 Verbindungen des Infundibulum

Die Tracer-Applikationen in den Nucleus praetrigeminalis und in die Area praeoptica zeigten, dass beide Areale mit dem Infundibulum, pars dorsalis und pars ventralis verbunden sind. Aufgrund seiner weiteren Konnektivitäten zu sensomotorischen und prämotorischen Arealen ist eine Relais-Funktion über das Infundibulum sehr wahrscheinlich, weshalb ich weitere Untersuchungen in diesem Areal vorgenommen habe.

Die Tracings in das dorsale und dorsoventrale Infundibulum wiesen starke reziproke Verbindungen zur Area praeoptica auf, was durch angefärbte Zellkörper und Fasern im Nucleus praeopticus anterior, Nucleus praeopticus posterior sowie im Nucleus suprachiasmaticus belegt werden konnte, während der Nucleus praetrigeminalis keine Verbindung aus dem Infundibulum enthielt. Die afferenten Eingänge aus dem

Infundibulum in den Nucleus praeopticus stehen in guter Übereinstimmung mit den Angaben von Fujita & Urano (1986) bei *Bufo japonicus*. Ein Grund für das Fehlen unmarkierter Strukturen im Nucleus praetrigeminalis könnte am schlechten Transport der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe gelegen haben, da „back-fill“-Tracings im Bereich des N. X bzw. N. XII retrograd markierte Zellkörper bis zum Infundibulum, pars dorsalis bei *Bombina orientalis* aufzeigten (Schneider 2012). Die Markierung der Motoneurone des N. V kann dadurch entstanden sein, dass Fluoreszenzfarbstoffe ausgelaufen sind. McGregor et al. (2005) beschrieben allerdings eine direkte Verbindung zwischen dem Hypothalamus und den Motoneuronen des N. V bei Meerschweinchen und bezeichnen den Hypothalamus aufgrund der afferenten Eingänge der Motoneurone des N. V als ein weiteres prämotorisches Areal, so dass die angefärbten Motoneurone in meiner Studie möglicherweise eine reziproke Verbindung darstellen. Unterstützt wird dieser Befund von „back-fill“-Tracings im Bereich des N. X bzw. N. XII, die retrograd markierte Zellkörper im Infundibulum, pars dorsalis aufzeigten (Schneider 2012), wobei der Kontakt dann über Axonkollaterale der Motoneuronen des N. V laufen würde.

Reziproke Verbindungen konnten auch zum Tegmentum beobachtet werden, wobei markierte Fasern und Zellkörper des Infundibulum hauptsächlich im anterioren Tegmentum, pars dorsalis und im posterioren Tegmentum, pars dorsalis lagen. Das Tegmentum ist an vielen Integrationsprozessen beteiligt, u.a. auch an der akustischen Verarbeitung (Luksch 1994; Luksch & Walkowiak 1998). Innerhalb des Vokalisationssystems könnten die akustischen Signale durch Hormone oder Neuromodulatoren des Infundibulum und/oder der Area praeoptica im Tegmentum moduliert werden, so dass diese die Aktivität des vokalen Mustergenerators auf ein bestimmtes Rufverhalten adaptieren. Dass der Nucleus praetrigeminalis auf akustische Stimuli reagiert, konnte z.B. durch Aitken & Capranica (1984) gezeigt werden.

Eine reziproke Verbindung zum Nucleus raphé, pars dorsalis konnte ich in meinen Präparaten nicht beobachten, was wahrscheinlich mit dem schlechten Farbstofftransport zusammenhing, denn sowohl Neary (1995) als auch Brahic & Kelley (2003) konnten mit unterschiedlichen Tracer-Applikationen in das

Infundibulum markierte Zellkörper im Nucleus raphé, pars dorsalis bei *Xenopus laevis* und *Rana catesbeiana* nachweisen. Es konnten auch striatale Eingänge im Infundibulum nachgewiesen werden, die wiederum mit den Literaturangaben von Allison & Wilczynski (1991) bei *Hyla cinerea* übereinstimmen.

Das Infundibulum nimmt innerhalb des Vokalisationssystems eine wichtige Rolle ein, da über dieses Kerngebiet und die Area praeoptica die Synthese von Hormonen reguliert wird, welche für die Auslösung von Paarungsrufen bedeutsam sind. Über welchen Weg die hormonelle Beeinflussung des vokalen Mustergenerators stattfindet konnte ich mit meinen Tracings nicht eindeutig bestimmen. Sicher ist, dass das Tegmentum eine zentrale Rolle spielt, da sowohl das Infundibulum, die Area praeoptica als auch der Nucleus praetrigeminalis mit dem Tegmentum verbunden sind.

4.3.5 Verbindungen des Tegmentum (Relaisstation)

Die Verbindungen des Tegmentum mesencephali zeigten, dass dieses Kerngebiet eine zentrale Stellung im Gehirn von Anuren einnimmt und aufgrund seiner multimodalen Funktionen auch als ein sensomotorisches Interface betrachtet werden kann. Das Tegmentum erhält nicht nur Eingänge aus auditorischen Arealen und den Basalganglien, sondern verarbeitet auch endokrine, limbische und visuelle Eingänge und projiziert wiederum zu sensomotorischen, prämotorischen und motorischen Kerngebieten.

Die vorliegenden neuroanatomischen Befunde im Tegmentum zeigen reziproke Verbindungen zum Nucleus praeopticus anterior und zum Nucleus praetrigeminalis auf, wobei die Verbindungen sowohl im posterioren Tegmentum, pars dorsalis als auch im posterioren Tegmentum, pars ventralis beobachtet wurden, während das anteriore Tegmentum, pars dorsalis nur afferente Eingänge aus dem Nucleus praeopticus anterior aufwies. Die Unterschiede im Detailreichtum markierter Strukturen in den tegmental Subnuclei können bei den hier durchgeführten Tracings eindeutig auf die verschiedenen Konzentrationen des Tracers zurückgeführt werden (Vgl. Abb. 28 und 31). Die Verbindungen beider Vokalisationsareale zum Tegmentum deuten auf eine Verarbeitung audio-vokaler Informationen in

verschiedenen tegmantalen Subnuclei hin. Luksch & Walkowiak (1998) konnten in ihrer Studie tegmentale Neurone bei *Discoglossus pictus* anfärben, die auf elektrische Reizungen des Hörnervs reagierten und zum Nucleus praetrigeminalis projizierten. Außerdem wies Luksch (1994) efferente Verbindungen aus dem anterioren Tegmentum bis zur Area praeoptica nach, was mit meinen Ergebnissen nach Tracer-Applikationen in das posteriore Tegmentum, pars dorsalis übereinstimmt. Möglicherweise kann das Tegmentum ein ausgelöstes Rufverhalten entsprechend der verschiedenen Eingänge selbst regulieren und somit schließlich auch die Vokalmotorik modulieren, was u.a. auch durch die reziproken Verbindungen zum Infundibulum und zum Nucleus raphé erklärt werden könnte. Bei den Tracer-Applikationen in den Nucleus praetrigeminalis wurden teilweise auch tegmentale Areale getroffen, die zu markierte Fasern in den Nuclei habenulares führten, wahrscheinlich durch Verletzungen des Fasciculus retroflexus (siehe 3.2.5.2). Dass die Nuclei habenulares über den Fasciculus retroflexus in das Tegmentum projizieren, speziell in den Nucleus interpeduncularis (eine homologe Struktur zur Area tegmentalis ventralis (VTA) der Säugetiere), wurde bereits in der Literatur beschrieben (Kemali et al. 1980; Guglielmotti & Fiorino 1997). Die Verbindungen aus der Oliva superior und dem Torus semicircularis weisen auf parallele Eingänge des Tegmentum aus unterschiedlichen Hörbahnstationen hin, wobei die spezifische Verarbeitung von konspezifischen Paarungsrufen in höheren Hirnarealen erfolgt, wie z.B im Torus semicircularis, Thalamus, Striatum, Area praeoptica oder Hypothalamus (Allison & Wilczynski 1991; Walkowiak et al. 1999).

Das Tegmentum ist zusätzlich auch in weit komplexere sensomotorische Schaltkreise einbezogen, wie z.B. in das System der Basalganglien. Das anteriore Tegmentum, pars dorsalis, eine homologe Struktur zur Substantia nigra, pars reticulata, ist die sog. Ausgangsstruktur der Basalganglien. Das anteriore Tegmentum, pars dorsalis erhält direkten Eingang aus dem Striatum, der Eingangsstruktur der Basalganglien, oder über einen indirekten Weg, der über den Globus pallidus und dem Nucleus subthalamicus läuft. Der Nucleus subthalamicus der Anuren umfasst den dorsocaudalen Anteil des Nucleus suprachiasmaticus, den Nucleus entopeduncularis posterior und den ventralen Anteil des Nucleus thalami ventralis (Maier et al. 2010). In meinen Präparaten konnten sowohl striatale

Eingänge als auch retrograd markierte Zellkörper im Nucleus subthalamicus detektiert werden. Meine Befunde stimmen mit den Daten von Roden (2002) überein, die ebenfalls striatale Eingänge in das anteriore Tegmentum, pars dorsalis beschrieb. Dass das Striatum einen Einfluss auf die Vokalisation hat, konnten Walkowiak et al. (1999) mittels Läsionsstudien bei *Hyla versicolor* zeigen, worauf Männchen nicht mehr in der Lage waren, Paarungsrufe auszuführen. Außerdem konnte Schneider (2012) mittels elektrophysiologischer Untersuchungen eine striatale Modulation auf auditorische Eingänge im Tegmentum beobachten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Basalganglien das akustisch gesteuerte Verhalten über das Tegmentum modulieren können und dass das Tegmentum eine wichtige Rolle im motorischen System spielt.

In meinen Präparaten wiesen das posteriore Tegmentum, pars dorsalis und pars ventralis reziproke Verbindungen sowohl zum Nucleus praeopticus anterior als auch zum Nucleus praetrigeminalis auf. In den gleichen Arealen konnten Gargaglioni et al. (2007) mittels Stimulationsversuchen die Lungenatmungsrate bei *Rana catesbeiana* erhöhen. Da die Vokalisation hauptsächlich mit Hilfe des Atemluftstroms erzeugt wird (siehe 1.3.1), scheint das Tegmentum weiterhin eine wichtige Rolle in der Koordination miteinander verflochtener Verhaltensweisen zu spielen.

4.3.6 Verbindungen der Nuclei habenularum

Die Nuclei habenulares sind eine wichtige Relaisstation im diencephalen Leitungssystem und üben einen indirekten Einfluss auf das Vokalisationsverhalten bei Anuren aus. Dies geschieht speziell durch die Regulation der Dopaminfreisetzung im Nucleus interpeduncularis und Tuberculum posterior, sowie die Serotoninfreisetzung im Nucleus raphé, die wiederum sensomotorische, prämotorische und motorische Kerngebiete im Vokalisationssystem beeinflusst.

Die Nuclei habenulares erhielten in meinen Präparaten afferente Eingänge aus vielen Nuclei im Tel-, Di-, Mes- und Metencephalon, während die efferenten Fasern der Nuclei habenulares bis in die Formation reticularis projizierten. Insgesamt beruht die Vielzahl markierter Strukturen auf eine hohe Konzentration des injizierten Markers Neurobiotin in beide Subnuclei der linken Habenula (siehe Abb. 39A). Im Telencephalon konnten retrograd markierte Neurone hauptsächlich in limbischen

Arealen, wie z.B. im Pallium mediale, Septum und in der Amygdala, detektiert werden, die Kemali et al. (1980) bei *Rana esculenta* ebenfalls, mit Ausnahme Zellkörper in der Amygdala, beschrieben. Moreno & González (2003) konnten hingegen bei *Rana perezi* und *Xenopus laevis* nach Applikationen in die Amygdala, pars medialis markierte Fasern in den Nuclei habenulares beobachten, was wiederum mit meinen Daten übereinstimmt. Die limbischen Strukturen haben einen starken Einfluss auf das akustisch gesteuerte Verhalten der Anuren und werden unter anderem mit Motivation und Sexualverhalten in Verbindung gebracht: mittels Läsionsversuchen konnte z.B. dem Septum eine wichtige Rolle im Rufverhalten von Männchen zugesprochen werden (Walkowiak et al. 1999). Die Nuclei habenulares integrieren diese limbischen Eingänge und leiteten die Informationen an das Mittelhirn und der Medulla oblongata weiter. Reziproke Verbindungen konnten auch zum Nucleus praeopticus anterior und Infundibulum beobachtet werden. Diese Verbindungen wurden auch von Bianco & Wilson (2009) bei Ratten beschrieben. Die Area preoptica und das Infundibulum sind an vielen entscheidenden Funktionen beteiligt, wie z.B. zirkadiane Rhythmik und Schlaf, Regulation von Sexual- und Fortpflanzungsfunktionen und Hormonregulation. Um diese Aufgaben zu erfüllen, haben beide Areale Kontakt zu unterschiedlichen Kerngebieten, insbesondere aber zu telencephalen Regionen und zu den Nuclei habenulares.

Weiterhin konnten in meinen Präparaten retrograd markierte Zellkörper und Fasern in Kerngebieten des direkten und indirekten Weges der Basalganglien detektiert werden. Bei den Säugetieren erhalten die Nuclei habenulares einen starken Eingang über den indirekten Weg der Basalganglien, insbesondere vom Nucleus entopeduncularis (eine homologe Struktur des Globus pallidus bei höheren Säugetieren). Bei Anuren entspricht der Globus pallidus dem caudalen Striatum, das in meinen Tracings zwar habenulare Efferenzen enthielt, aber nicht zu den Nuclei habenulares zurück projizierte. Es konnten jedoch retrograd markierte Zellkörper im dorsocaudalen Anteil des Nucleus suprachiasmaticus, im Nucleus entopeduncularis posterior und im ventralen Anteil des Nucleus thalami ventralis detektiert werden (eine homologe Struktur zum Nucleus subthalamicus). Meine Befunde zeigten ebenfalls markierte Zellkörper und Fasern im Nucleus interpeduncularis (eine homologe Struktur zum ventralen tegmentalen Areal) sowie im Tuberculum posterior

(eine homologe Struktur zur Substantia nigra, pars compacta). Dass die Nuclei habenulares mit dem Nucleus interpeduncularis über den Fasciculus retroflexus reziprok verbunden sind, konnte auch von Kemali et al. (1980) und Kemali & Guglielmotti (1982) bei *Rana esculenta* beobachtet werden. In der Literatur von Säugetieren wird der habenuläre Einfluss auf das Striatum hauptsächlich indirekt über eine Dopaminfreisetzung der Substantia nigra, pars compacta beschrieben. Das Striatum reguliert hierüber die Eingänge des indirekten Weges in die Nuclei habenulares (Bianco & Wilson 2009).

Efferente Verbindungen der Nuclei habenulares konnten auch im Nucleus raphé identifiziert werden, einer Struktur, die serotonerge Zellen enthält und einen stimulierenden Effekt auf die Motoneurone ausübt, u.a. auch auf die vokalen Motoneurone, wobei die Serotoninfreisetzung von den Nuclei habenulares reguliert wird (Tan & Miletic 1990; Rhodes et al. 2007; Yang et al. 2008; Yu & Yamaguchi 2010). Der Nucleus raphé projiziert u.a. in telencephale Kerngebiete, insbesondere in das Septum. Roden et al. (2005) konnten bei *Hyla versicolor* starke Verbindungen vom Nucleus raphé in das Septum centrale und dorsale nachweisen, wobei die Funktion innerhalb des Vokalisationssystems unklar ist.

4.4 Synopsis

Die vorliegenden Ergebnisse der immunhistochemischen und hodologischen Untersuchungen geben einen Überblick über die zentralnervöse Verschaltung der Vokalisationsbahn der pädomorphen Art *Bombina orientalis*. Mittels des Aktivitätsmarkers *c-fos* konnte gezeigt werden, dass während der Rufaktivität paarungsbereiter Männchen sowohl akustische, prämotorische, sensomotorische, modulierende und limbische Kerngebiete aktiv sind. Die Aktivität des vokalen Schrittmachers (Nucleus praeopticus anterior) konnte lediglich bei vokalisierenden Männchen beobachtet werden, wobei angefärbte Zellkörper nur im dorsalen Anteil lokalisiert waren. Vergleiche innerhalb der Area praeoptica zeigten bei vokalisierenden Männchen ebenso eine Zunahme von markierten Somata im Nucleus praeopticus posterior, wobei keine präzise Aussage über eine mögliche Funktion bei der Rufinitiierung gemacht werden kann, während der Nucleus suprachiasmaticus unspezifische *c-fos* Aktivität aufwies. Anschließende Tracer-

Applikationen in den Nucleus praetrigeminalis und in die Area praeoptica implizieren eine indirekte Verbindung zwischen dem vokalen Mustergenerator und dem vokalen Schrittmacher. Als Relais- und Zwischenstationen konnte das Infundibulum und das Tegmentum identifiziert werden, während die Nuclei habenulares als ein modulierendes Zentrum die Aktivität des vokalen Mustergenerators indirekt beeinflussen. Die zuvor beschriebenen Relais- und Zwischenstationen, das Striatum und der Nucleus raphé, konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Insgesamt deuten die Färbungen eher auf einen Kontakt an den dendritischen Arborisationen des Nucleus praetrigeminalis hin. Eine Ausnahme stellt das Tegmentum dar. Hier wurden Faserbündel angefärbt, die vermutlich auch direkten Kontakt zu den Somata bildeten. Die Unterschiede zwischen den neuroanatomischen Untersuchungen an der aberranten Art *Xenopus laevis* und einigen Neobatrachia, wie z.B. Raniden und Hyliden, zeigten überwiegend Übereinstimmungen, während einige Unstimmigkeiten eher auf methodische Verschiedenheiten als auf Artunterschiede zurückzuführen sind.

4.5 Schlussbetrachtung zur Vokalisation

Basierend auf den erhobenen Daten kann im Folgenden versucht werden, ein Gesamtnetzwerk der Vokalisationsbahn von Anuren aufzustellen, mit Fokus auf die ursprüngliche Art *Bombina orientalis* (siehe Abb. 41).

Der Nucleus praetrigeminalis und die beiden Atmungszentren (Mundboden- und Lungen-Oszillator) fungieren gemeinsam als semi-unabhängige Mustergeneratoren, die die somatischen Muskeln des Mundbodens, des Rachens und in einigen Spezies auch die Flankenmuskulatur rhythmisch aktivieren. Bei den Archaeobatrachia läuft die Ansteuerung des Rufapparates über die Motoneurone des N. V, N. VII, N. IX-X, N. XII, was letztendlich ein simplifiziertes Modell der Säugetiere darstellt. Bei Säugetieren wird die Frage nach dem möglichen vokalen Mustergenerator kontrovers diskutiert; hier werden insbesondere die Substantia grisea periaquaeductalis und der Nucleus parabrachialis, sowie diverse reticuläre Kerngebiete, wie z.B. der Nucleus retroambiguus, untersucht (Zhang et al. 1994; Jürgens 1994, 2008; Smotherman et al. 2006; Jürgens & Hage 2007; Kelley & Bass

2010). Die Substantia grisea periaquaeductalis und der Nucleus parabrachialis projizieren beide zum Nucleus ambiguus und retroambiguus, die wiederum motorische Kerne der Larynx-, Rachen-, Intercostal- und Abdominalmuskeln ansteuern, Muskeln, die für die Generierung von Vokalisation essentiell sind (Thoms & Jürgens 1987; Holstege et al. 1997). Welches Kerngebiet letztendlich als vokaler Mustergenerator fungiert ist noch unklar, wobei die Substantia grisea periaquaeductalis aufgrund ihrer Initiierung von Vokalisationsreaktionen eher die Rolle eines Triggers einnimmt (Jürgens 2008). Für die Auslösung von Paarungsrufen wird die Aktivität des Mustergenerators von höheren Vokalisationsarealen beeinflusst. Dabei spielt die Area praeoptica bei den Wirbeltieren eine zentrale Rolle, da dieses Areal aufgrund seiner Hormonregulation wichtig für die Initiierung der Rufbereitschaft und Rufauslösung ist. Ein direkter Kontakt zum Nucleus praetrigeminalis konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden, vielmehr läuft die Verbindung über parallele Zwischen- und Relaisstationen. Die beteiligten Elemente müssen in diesem Gesamtnetzwerk afferente Eingänge aus dem Nucleus praeopticus anterior erhalten und zum Nucleus praetrigeminalis projizieren. Ein weiterer Parameter ist die Konzentrierung von Hormonen bzw. die Ansteuerung entsprechender Regulationszentren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Tegmentum ein audio-vokales Interface darstellt, das sowohl reziproke Verbindungen zum vokalen Schrittmacher als auch zum vokalen Mustergenerator aufweist. Weiterhin integriert das Areal Informationen aus unterschiedlichen Hörbahnstationen und Regulationszentren, wie z.B. den unteren Hörbahnstationen, dem Torus semicircularis, dem Infundibulum, den Nuclei habenulares, dem Nucleus raphé und den Basalganglien. Aufgrund seiner multimodalen Funktion scheint das Tegmentum sensorische und nicht-sensorische Information zu integrieren, um letztendlich mit einer adäquaten Reaktion auf bestimmte Reize zu reagieren sowie bestimmte Verhaltensantworten zu verstärken, wie z.B. antiphones Rufen oder Agressionsrufe.

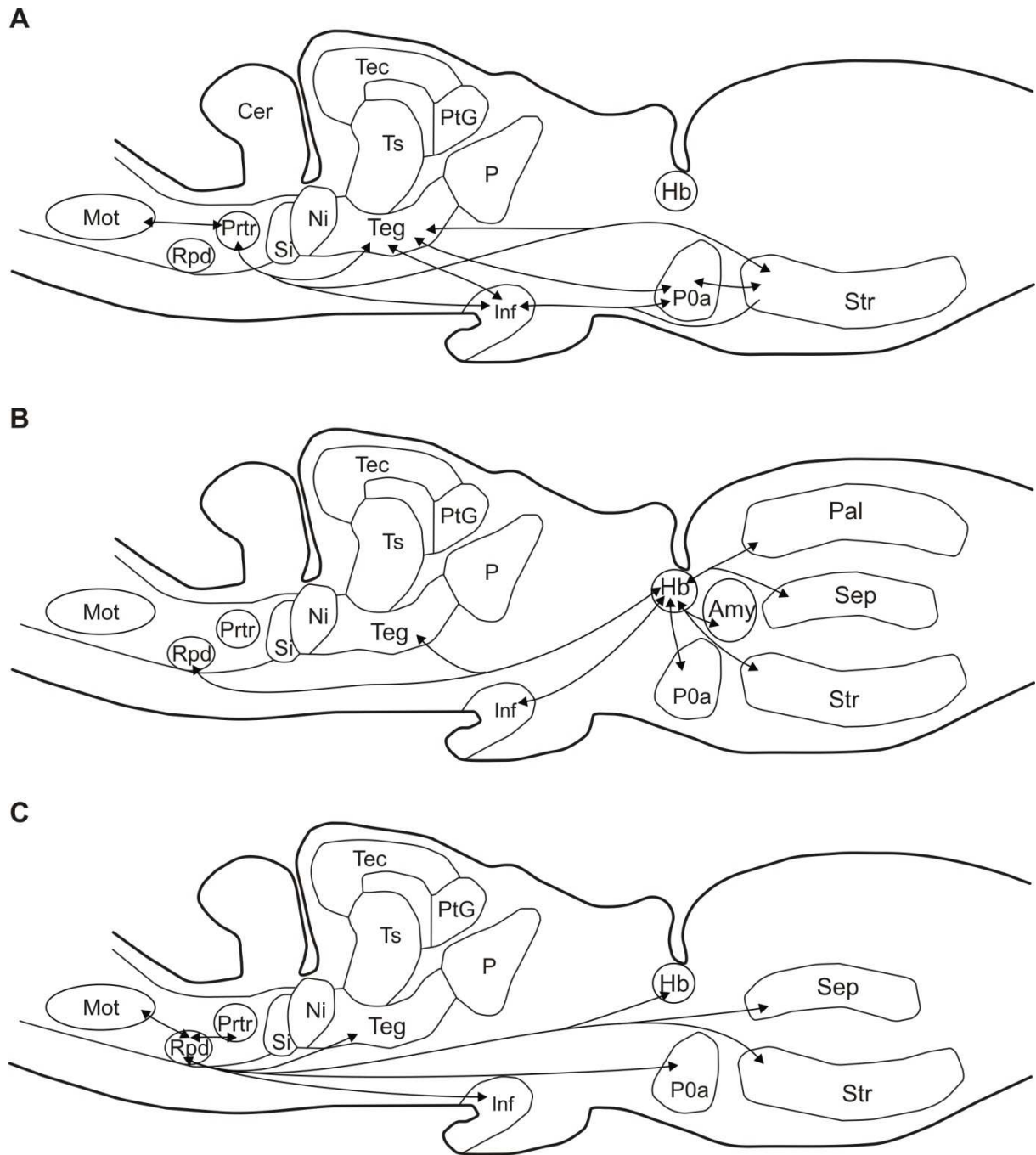


Abbildung 42: Verschaltung von der Vokalisationsbahn von *Bombina orientalis*

5. LITERATUR

- Adams JC** (1981). Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J Histchem Cytochem* 29(6):775
- Aitken PG, Capranica RR** (1984). Auditory input to a vocal nucleus in the frog *Rana pipiens*: hormonal and seasonal effects. *Exp Brain Res* 57:33-39
- Aizawa H, Amo R, Okamoto H** (2011). Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Frontiers in Neuroscience* 138(5):1-7
- Akef MSA, Schneider H** (1985). Vocalization, courtship and territoriality in the Chinese fire-bellied toad *Bombina orientalis* (Anura, Discoglossidae). *Zool Jb Physiol* 89:119-136
- Akintunde A, Buxton DF** (1992). Quadruple labeling of brain-stem neurons: a multiple retrograde fluorescent tracer study of axonal collateralization. *J Neurosci Methods* 45:15-22
- Allison JD, Wilczynski W** (1991). Thalamic and Midbrain Auditory Projections to the Preoptic Area and Ventral Hypothalamus in the Green Treefrog (*Hyla Cinerea*). *Brain Behav Evol* 38:322-331
- Arch VS, Narins PM** (2009). Sexual hearing: The influence of sex hormones on acoustic communication in frogs. *Hear Res* 252:15-20
- Armstrong RC, Montminy MR** (1993). Transsynaptic Control Of Gene Expression. *Annu Rev Neurosci* 16:17-29
- Barnes KL, McQueeney AJ, Barrett WR, Knowles WD** (1994). Morphology and Projections of Neurobiotin-Labeled Nucleus Tractus Solitarii Neurons Recorded In Vitro. *Brain Res Bull* 34(4):339-348
- Bianco IH, Wilson SW** (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Phil Trans R Soc B* 364:1005-1020
- Boatright-Horowitz SL, Horowitz SS, Simmons AM** (2000). Patterns of vocal interactions in a bullfrog (*Rana catesbeiana*) chorus: Preferential responding to far neighbors. *Ethology* 106:701-712
- Boulenger** (1896). *The Tailless Batrachians of Europe. Pt. 1.* Ray Society Publication, London, U.K.
- Boyd SK, Ebersole TJ** (1997). Distribution of androgen receptors in the brain of two anuran amphibians. *Soc Neurosci Abstr* 23:2381

- Boyd SK** (1997). Brain Vasotocin Pathways and the Control of Sexual Behaviors in the Bullfrog. *Brain Res Bull* 44(4):345-350
- Boyd SK** (1994). Arginine Vasotocin Facilitation of Advertisement Calling and Call Phonotaxis in Bullfrogs. *Horm Behav* 28:232-240
- Brahic CJ, Kelley DB** (2003). Vocal Circuitry in *Xenopus laevis*: Telencephalon to Laryngeal Motor Neurons. *J Comp Neurol* 464:115-130
- Brzoska J** (1980). Quantitative Studies on the Elicitation of the Electrodermal Response by Calls and Synthetic Acoustical Stimuli in *Rana Lessonae* Camerano, *Rana R. Ridibunda* Pallas and the Hybrid *Rana "Esculenta"* L. (Anura, Amphibia). *Behav Process* 5:113-141
- Brzoska J, Obert HJ** (1980). Acoustic Signals Influencing the Hormone Production of the Testes in the Grass Frog. *J Comp Physiol* 140:25-29
- Burmeister SS, Mangiamele LA, Lebonville CL** (2008). Acoustic modulation of immediate early gene expression in the auditory midbrain of female túngara frogs. *Brain Res* 1109:105-114
- Burmeister SS, Wilczynski W** (2000). Social signals influence hormones independently of calling behavior in the treefrog (*Hyla cinerea*). *Horm Behav* 38:201-209
- Bush SL** (1997). Vocal behavior of males and females in the majorcan midwife toad. *J Herpetol* 31:251-157
- Calle M, Kozicz T, van der Linden E, Desfeux A, Veening JG, Barendregt HP, Roubos EW** (2006). Effect of starvation on Fos and neuropeptide immunoreactivities in the brain and pituitary gland of *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* 147(3):237-246
- Cannatella DC** (1985). A phylogeny of primitive frogs (archaeobatrachians). PhD Dissertation, University of Kansas, Lawrence
- Caprancia RR** (1965). The evoked vocal response of the bullfrog: a study of communication by sound. *Res Monogr* 33, MIT Press, Cambridge, MA
- Chakraborty M, Burmeister SS** (2010). Sexually dimorphic androgen and estrogen receptor mRNA expression in the brain of túngara frogs. *Horm Behav* 58:619-627
- Chen Y, Dubé CM, Rice CJ, Baram TZ** (2008). Rapid Loss of Dendritic Spines after Stress Involves Derangement of Spines Dynamics by Corticotropin-Releasing Hormone. *J Neurosci* 28:2903-2911
- Cirelli C, Pompeiano M, Tononi G** (1996). Neuronal Gene Expression in the Waking State: A Role for the Locus Coeruleus. *Science* 274:1211-1215

- Clayton DF** (2000). The Genomic Action Potential. *Neurobiol. Learn Mem* 74:185-216
- Cobellis G, Vallarino M, Meccareillo R, Pierantoni R, Masini MA, Mathieu M, Pernas Alonso R, Chieffi P, Fassano S** (1999). Fos Localization in Cytosolic and Nuclear Compartments in Neurones of the Frog, *Rana esculenta*, Brain: An Analysis Carried Out in Parallel with GNRH Molecular Forms. *J Neuroendocrinol* 11:725-735
- Comer C, Grobstein P** (1981). Organization of sensory inputs to the midbrain of the frog, *Rana pipiens*. *J Comp Phys* 142:161-168
- DeJong HJ, Gans C** (1969). On the mechanisms of respiration in the bullfrog, *Rana catesbeiana*: A reassessment. *J Morphol* 127:259-290
- Domínguez L, Morona R, González A, Moreno N** (2013). Characterization of the Hypothalamus of *Xenopus Laevis* During Development. I. The Alar Region. *J Comp Neurol* 521:725-759
- Dragunow M, Faull R** (1989). The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 29:261-65
- Duellman WE, Trueb L** (1986). *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company New-York, St. Louis, San Francisco
- Emerson SB, Boyd SK** (1999). Mating Vocalization of Female Frogs: Control and Evolutionary Mechanisms. *Brain Behav Evol* 53:187-197
- Endepols H** (2005). Struktur und Funktion audiomotorischer Interfacestrukturen im Gehirn von Froschlurchen (Amphibia: Anura). Habilitationsschrift; Universität zu Köln
- Endepols H, Roden K, Walkowiak W** (2005). Hodological characterization of the septum in anuran amphibians. II. Efferent connection. *J Comp Neurol* 483:437-457
- Endepols H, Roden K, Luksch H, Dicke U, Walkowiak W** (2004a). Dorsal Striatopallidal System in Anurens. *J Comp Neurol* 468:229-310
- Endepols H, Walkowiak W** (2001). Integration of ascending and descending inputs in the auditory midbrain of anurans. *J Comp Physiol A* 186:1119-1133
- Endepols H, Walkowiak W, Luksch H** (2000). Chemoarchitecture of the anuran auditory midbrain. *Brain Res Rev* 33:179-198
- Endepols H, Walkowiak W** (1999). Influence of descending forebrain projections on processing of acoustic signals and audiomotor integration in the anuran midbrain. *Eur J Morphol* 37:182-184

- Ewert JP, Borchers HW** (1971). Reaktionscharakteristik von Neuronen aus dem Tectum opticum und Subtectum der Erdkröte *Bufo bufo* (L.). *Z vergl Phys* 71:165-189
- Feng AS** (1986a). Afferent and efferent innervation patterns of the superior olivary nucleus of the leopard frog. *Brain Res* 364:167-171
- Fischer LM, Kelley DB** (1991). Androgen receptor expression and sexual differentiation of effectors for courtship song in *Xenopus laevis*. *Neurosci* 3:469-480
- Foster WA** (1967). Chorus structure and vocal response in the Pacific treefrog, *Hyla regilla*. *Herpetologica* 23:100-104
- Friauf E** (1995). *C-fos* immunocytochemical evidence for acoustic pathway mapping in rats. *Behav Brain Res* 66:217-224
- Fritzsich B** (1993). Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods* 50:95-103
- Fritzsich B, Sonntag R** (1991). Sequential double labeling with different fluorescent dyes coupled to dextran amines as a tool to estimate the accuracy of tracer application and of regeneration. *J Neurosci Methods* 39:9-17
- Fritsch B, Wilm C** (1990). Dextran amines in neuronal tracing. *TINS* 13(1)
- Fujita Y, Urano A** (1986). The Afferent Projections to the Anterior Part of the Preoptic Nucleus in Japanese Toad, *Bufo japonicas*. *Zool Sci* 3:677-686
- Fuller PM, Ebbesson SOE** (1973). Central projections on the trigeminal nerve in the bull frog (*Rana catesbeiana*). *J Comp Neurol* 2(152):193-199
- Gaupp E** (1896a). Zur Lehre von Atmungsmechanismen beim Frosch. *Arch Anat Physiol Anat Abth* pp 239-268
- Gargaglioni LH, Meier JT, Branco LGS, Milson WK** (2007). Role of midbrain in the control of breathing in anuran amphibians. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:447-457
- Gerhardt HC, Dyson ML, Tanner SD** (1996). Dynamic properties of the advertisement calls of gray tree frogs: Patterns of variability and female choice. *Behav Ecol* 7:7-18
- Gerhardt HC, Huber F** (2002). Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions. The University of Chicago Press, Chicago, London

- Gerhardt HC** (1994). The Evolution of Vocalization in Frogs and Toads. *Annu Rev Ecol Syst* 25:293-324
- Girgenrath M, Marsh RL** (1997). *In vivo* performance of trunk muscles in tree frogs during calling. *J. Exp. Biol* 200:3101-3108
- Glover JC, Petursdottir G, Jansen JKS** (1986). Fluorescent dextran-amines used as axonal tracers in the nervous system of the chicken embryo. *J Neurosci Methods* 18:243-254
- Gordon HM, Gerhardt HC** (2009). Hormonal modulation of phonotaxis and advertisement call preferences in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *Horm Behav* 55(1):121-127
- Grafe TU, Steffen JO, Stoll C** (2000). Vocal repertoire and effect of advertisement call intensity on calling behaviour in the West African tree frog, *Leptopelis viridis*. *Amph-Rep* 21:13-23
- Green MN** (1990). Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* 184:51-67
- Gross JB, Hanken J** (2004). Use of Fluorescent Dextran Conjugates as a Long-Term Marker of Osteogenic Neural Crest in Frogs. *Dev Dyn* 230:100-106
- Guglielmotti V, Fiorino L** (1998). Asymmetry in the Left and Right Habenulo-Interpeduncular Tracts in the Frog. *Brain Res Bull* 45(1):105-110
- Harris JA, Guglielmotti V, Bentivoglio M** (1996). Diencephalic asymmetries. *Neurosci Biobehav Rev* 20:637-634
- Haugland RP** (1996). Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Eugene, OR: Molecular Probes Inc.
- Heimovices SA, Riters L** (2005). Immediate Early Gene Activity in Song Control Nuclei and Brain Areas Regulating Motivation Relates Positively to Singing Behavior during, but Not outside of, a Breeding Context. *J Neurobiol* 65(3):207-224
- Heinzmann U** (1970). Untersuchungen zur Bio-Akustik und Ökologie der Geburtshelferkröte, *Alytes o. obstetricans*. *J Comp Physiol* 158:157-165
- Herkenham M, Nauta WJH** (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 Neur* 173:123-146
- Herrmann HJ, Koepernik U, Matz W, Bech R, Gassel R, Utjeshov V** (1987). Systematik, Verbreitung, Biologie, Ökologie und Terrarienhaltung der Discoglossidae, Günther1859, (Amphibia, Anura). *Veröff Naturhist Mus Schleusingen* 2:1-95

- Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L, Shepard PD** (2008). Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci* 28:11825-9
- Hoffman GE, Lyo D** (2002). Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all "Fos-ed out"? *J Neuroendocrinol* 14:259-268
- Holstege G, Kerstens L, Moes MC, Vanderhorst VGJM** (1997). Evidence for a Periaqueductal Gray-Nucleus Retroambiguus-Spinal Cord Pathway in the Rat. *Neuroscience* 80(2):587-598
- Hoke KL, Pitts NL** (2012). Modulation of sensory-motor integration as a general mechanism for context dependence of behavior. *Gen Comp Endocrinol* 176:465-471
- Hoke KL, Ryan MJ, Wilczynski W** (2007). Integration of sensory and motor procession underlying social behavior in túngara frogs. *Proc R Soc B* 274:641-649
- Hoke KL, Burmeister S, Fernald RD, Stanley Rand A, Ryan MJ, Wilczynski W** (2004). Functional Mapping of the Auditory Midbrain during Mate Call Reception. *J Neurophysiol* 24(50):11246-11272
- Horikawa K, Armstrong WE** (1988). A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25:1-11
- Huang Q, Zhou D, DiFiglia M** (1992). NeurobiotinTM, a useful neuroanatomical tracer for vivo anterograde, retrograde and transneuronal tract-tracing and for in vitro labeling of neurons. *J Neurosci Methods* 41:31-43
- Irisarri I, Vences M, Mauro DS, Glaw F, Zardoya R** (2011). Reversal to air-driven sound production revealed by a molecular phylogeny of tongueless frogs, family *Pipidae*. *BMC Evol Biol* 11:114
- Jarvis ED** (2004). Brains and Birdsong. In: *Nature's Music: The Science of Birdsong* (Marler P, Slabberkoorn H, eds) pp. 226-271. New York: Elsevier-Academic Press.
- Jarvis ED, Scharff C, Grossman M, Ramos J, Nottebohm F** (1998). For whom the bird sings: context-dependent gene expression. *Neuron* 21:775-788
- Jürgens U** (2008). The Neural Control of Vocalization in Mammals: A Review. *Journal of Voice*
- Jürgens U, Hage SR** (2007). On the role of the reticular formation in vocal pattern generation. *Behav Brain Res* 182:308-314
- Jürgens U** (1994). The role of the periaqueductal grey in vocal behavior. *Behav Brain Res* 62:107-117

- Kaneko T, Saeki K, Lee T, Mizuno N** (1996). Improved retrograde axonal transport and subsequent visualization of tetramethylrhodamine (TMR)-dextran amine by means of an acidic injection vehicle and antibodies against TMR. *J Neurosci Methods* 65:157-165
- Kao MH, Doupe AJ, Brainard MS** (2005). Contributions of an avian basal ganglia-forebrain circuit to real-time modulation of song. *Nature* 433:638–643
- Karin M, Hunter T** (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 5:747-757
- Kiernan JA** (2006). Dyes and other colorants in microtechnique and biomedical research. *Color Technol* 122:1-21
- Kelley DB, Bass AH** (2010). Neurobiology of vocal communication: mechanisms for sensorimotor integration and vocal patterning. *Curr Opin Neurol* 20:1-6
- Kelley DB** (2004). Vocal communication in frogs. *Curr Opin Neurobiol* 14:751–757
- Kelley DB, Pfaff DW** (1976). Hormone effects on male sex behavior in South African clawed frogs, *Xenopus laevis*. *Horm Behav* 7:159–182
- Kelley DB** (1981). Locations of androgen-concentrating cells in the brain of *Xenopus laevis*: Autoradiography with ³H-dihydrotestosterone. *J Comp Neurol* 199:221-231
- Kelley DB** (1980). Auditory and Vocal Nuclei in the Frog Brain Concentrate Sex Hormones. *Science* 207(4430):553-555
- Kelley DB, Lieberburg I, McEwen BS, Pfaff DW** (1978). Autoradiographic and Biochemical Studies of Steroid Hormone-Concentrating Cells in the Brain of *Rana pipiens*. *Brain Res* 140:287-305
- Kelley DB, Pfaff DW** (1976). Hormone Effects on Male Sex Behavior in Adult South African Clawed Frogs, *Xenopus laevis*. *Horm Behav* 7:159-182
- Kelley DB, Morrell JI, Pfaff DW** (1975). Autoradiographic localization of hormoneconcentrating cells in the brain of an amphibian, *Xenopus laevis*. I. Testosterone. *J Comp Neurol* 164:47-59
- Kemali M, Guglielmotti V** (1982). The Connections of the Frog Interpeduncular Nucleus (ITP) Demonstrated by Horseradish Peroxidase (HRP). *Exp Brain Res* 45:349-356
- Kemali M, Guglielmotti V, Gioffré D** (1980). Neuroanatomical Identification of the Frog Habenular Connections using Peroxidase (HRP). *Exp Brain Res* 38:341-347
- Kennedy MB, Beale HC, Carlisle HJ, Washburn LR** (2005). Intergration of biochemical signaling in spines. *Nat Rev Neurosci* 6:423-434

- Kimpo RR, Doupe AJ** (1997). Fos Is Induced by Singing in Distinct Neuronal Populations in a Motor network. *Neuron* 18:315-325
- Kita H, Armstrong W** (1991). A biotin-containing compound *N*-(2-aminoethyl)biotinamide for intracellular labeling and neuronal tracing studies: comparison with biocytin. *J Neurosci Methods* 37:141-150
- Knorr A** (1976). Central control of mating call production and spawning in the tree frog *Hyla arborea savignyi* (Audouin): Results of electrical stimulation of the brain. *Behav Process* 1:295-317
- Köbbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S** (2000). Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327-351
- Laberge F, Feldhoff RC, Feldhoff PW, Houck LD** (2008). Courtship Pheromone-induced *c-Fos*-Like Immunolabeling in the female salamander brain. *Neurosci* 151:329-339
- Lapper SR, Bolam JP** (1991). The anterorade and retrograde transport of neurobiotin in the central nervous system of the rat: comparison with biocytin. *J Neusosci Methods* 39:136-174
- Lörcher K** (1969). Vergleichende bio-akustische Untersuchungen an der Rot- und Gelbbauchunke, *Bombina bombina* (L.) und *Bombina variegata* (L.). *Oecologia* 3:84-124
- Lucas JR, Howard RD, Palmer JG** (1996). Callers and satellites: Chorus behaviour in anurans as a stochastic dynamic game. *Anim Behav* 51: 501-518
- Luksch H, Walkowiak W** (1998). Morphology and axonal projection patterns of auditory neurons in the midbrain of the painted frog, *Discoglossus pictus*. *Hear Res* 122:1-17
- Luksch H, Walkowiak W, Munoz A, Donklelaar HJT** (1996). The use of in vitro preparations of the isolated amphibian central nervous system in neuroanatomy and electrophysiology. *J Neurosci Methods* 70:91-102
- Luksch H** (1994). Das auditorische Mittelhirn von *Discoglossus pictus*: Neuroanatomische und -physiologische Untersuchungen zu audio-motorischen Interaktionen. Dissertation, Universität zu Köln
- Luo P, Dessem D** (1996). Transneuronal Transport of Intracellularly Injected Biotinamide in Primary Afferent Axons. *Brain Res Bull* 39(6):323-334
- Maier S, Walkowiak W, Luksch H, Endepols H** (2010). An indirect basal ganglia pathway in anuran amphibians? *J Chem Neuroanat* 40:21-35

- Maney DL, MacDougall-Shackelton EA, MacDougall-Shackleton SA, Ball GF, Hahn TP** (2003). Immediate early gene response to hearing song correlates with receptive behavior and depends on dialect in a female songbird. *J Comp Physiol A* 189:667-674
- Marín O, González A, Smeets WJ** (1997c). Basal ganglia organization in amphibians: efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 380:23-50
- Marler CA, Chu J, Wilczynski W** (1995). Arginine Vasotocin Injection Increases Probability of Calling in Cricket Frogs, but Causes Call Changes Characteristics of Less Aggressive Males. *Horm Behav* 29:554-570
- Martin WF** (1971). Mechanics of sound production in toads of the genus *Bufo*: passive elements. *J Exp Zool* 176:273-293
- Matsuoka I, Fuyuki K, Shoji T, Kurihara K** (1998). Identification of *c-fos* related genes and their induction by neural activation in rainbow trout brain. *Biochim Biophys Acta* 1395:220-227
- Marín O, Smeets WJ, González A** (1997a). Basal ganglia organization in amphibians: catecholaminergic innervation of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378:50-69
- Marín O, González A, Smeets WJ** (1997b). Basal ganglia organization in amphibians: Afferent connections to the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378:16-49
- Marín O, González A, Smeets WJ** (1997c). Basal ganglia organization in amphibians: efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 380:23-50
- McGregor R, Damián A, Fabbiani G, Torterolo P, Pose I, Chase M, Morales FR** (2005). Direct Hypothalamic Innervation of the Trigeminal Motor Nucleus: A Retrograde Tracer Study. *Neuroscience* 136:1073-1081
- Megela-Simmons A, Moss CF, Daniel KM** (1985). Behavioral audiograms of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) and the green tree frog (*Hyla cinerea*). *J Acoust Soc Am* 78:1236-1244
- Melia KR, Ryabinin AE, Schroeder R, Bloom FE, Wilson MC** (1994). Induction and Habituation of Immediate Early Gene Expression in Rat Brain by Acute and Repeated Restraint Stress. *J Neurosci* 14(10):5929-5938
- Mello CV** (2002). Mapping vocal communication pathways in birds with inducible gene expression. *J Comp Physiol* 188:943-959

- Mello CV, Clayton DF** (1995). Differential induction of the ZENK gene in the avian forebrain and song control circuit after metrazole-induced depolarization. *J Neurobiol* 26:145-161
- Mensah-Nayagan AG, Do-Rego JL, Feuilloley M, Marcual A, Lange C, Pelletier G, Vaudry H** (1996). In Vivo and In Vitro Evidence for the Biosynthesis of Testosterone in the Telencephalon of the Female Frog. *J Neurochem* 67:413-422
- Miller CT, DiMauro A, Pistorio A, Hendry S, Wang X** (2010). Vocalization induced cFos expression in marmoset cortex. *Front Integr Neurosci* 4:128
- Miranda JA, Wilczynski W** (2009). Sex differences and androgen influences on midbrain auditory thresholds in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Hear Res* 252:79-88
- Mohr S, Schneider H** (1993). Analysis of the call pacemaker in the chinese firebellied toad, *Bombina orientalis* (Boulenger, 1890) (Amphibia, Anura), and its operation during auditory stimulation. *Zool Jb Physiol* 97:215-231
- Moore FL, Rose JD** (2002). Sensorimotor Processing Model: How Vasotocin and Corticosterone Interact and Control Reproductive Behaviors in an Amphibian. In: *Hormones, Brain and Behavior*; Paff DW, Arnold AP, Fahrbrech SE, Etgen AM, Rubin RT (eds); 2:515-544
- Moreno N, González A** (2004). Localization and Connectivity of the Lateral Amygdala in Anuran Amphibians. *J Comp Neurol* 479:130-148
- Moreno N, González A** (2003). Hodological Characterization of the Medial Amygdala in Anuran Amphibians. *J Comp Neurol* 466:380-408
- Morgan JI, Curran T** (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421-451
- Morgan JI, Curran T** (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *TINS* 12:459-462
- Morgan JL, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T** (1987). Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192-197
- Morrell JI, Kelley DB, Pfaff DW** (1975). Autoradiographic Localization of Hormone-concentrating Cells in the Brain of an Amphibian, *Xenopus laevis*. II. Estradiol. *J Comp Neurol* 164:63-78
- Mudry KM, Capranica RR** (1987a). Correlation between auditory evoked responses in the thalamus and species-specific call characteristics. I. *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *J Comp Physiol A* 160:477-489

- Neary TJ** (1995). Afferent Projections to the Hypothalamus in Ranid Frogs. *Brain Behav Evol* 46:1-13
- Neary TJ, Northcutt RG** (1983). Nuclear organization of the bullfrog diencephalon. *J Comp Neurol.* 213:262-278
- Neary TJ** (1980). Hypothalamic afferents in ranid frogs. *Anat Rec* 196:135A
- Northcutt RG, Ronan M** (1992). Afferent and Efferent Connections of the Bullfrog Medial Pallium. *Brain Behav Evol* 40:1-16
- Northcutt RG, Kicliter E** (1980). Organization of the amphibian telencephalon. In: Ebesson SOE (ed): *Comparative neurology of the telencephalon*. Plenum Press, New York, pp. 203-255
- Novikova L, Novikov L, Kellerth JO** (1997). Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers: a comparison between Fast Blue, Fluoro-Gold and various dextran conjugates. *J Neurosci Methods* 74:9-15
- Obert HJ** (1977a). Hormonal influence on calling and reproductive behavior in anurans. In: *The reproductive biology of amphibians*. Taylor, D.H. Guttman, S.I. (eds), pp. 357-366. New York: Plenum Press
- Ohr EA** (1976). Tricaine methanesulfonate-1.pH and its effect on anesthetic potency. *Comp Biochem Physiol C* 54 (1):13-17
- Oseen KL, Wassersug RJ** (2002). Environmental factors influencing calling in sympatric anurans. *Oecologia* 133:616-625
- Palka YS, Gorbman A** (1973). Pituitary and Testicular Influenced Sexual Behavior in Male Frogs, *Rana pipiens*. *Gen Comp Endocrinol* 21:148-151
- Panchuck-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Steward J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung WY, Haugland R** (1999). Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J Histochem Cytochem* 47:1179-1188
- Peinado A, Yuste R, Katz LC** (1993). Extensive Dye Coupling between Rat Neocortical Neurons during the Period of Circuit Formation. *Neuron* 10:103-114
- Penna M, Capranica RR, Somers J** (1992). Hormone-induced vocal behavior and midbrain auditory sensitivity in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *J Comp Physiol* 170:73-82
- Perrill SA, Gerhardt CH, Daniel R** (1978). Sexual Parasitism in the Green Tree Frog (*Hyla cinerea*). *Science* 200(4346):1179-1180

- Pettigrew AG** (1981). Brainstem afferents to the torus semicircularis of the Queensland cane toad (*Bufo marinus*). *J Comp Neurol* 202:59-68
- Piechaczyk M, Blanchard JM** (1994). *c-fos* proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hermatol* 17:93-131
- Pinault D** (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113-136
- Polzonetti-Magni AM, Mosconi G, Carnevali O, Yamamoto K, Hanaoka Y, Kikuyama S** (1998). Gonadotropins and Reproductive Function in the Anuran Amphibian, *Rana esculenta*. *Biol Reprod* 58:88-93
- Potter HD** (1965b). Patterns of acoustically evoked discharges of neurons in the mesencephalon of the bullfrog. *J Neurophysiol* 28:1155-1185
- Potter HD** (1965a). Mesencephalic auditory region of the bullfrog. *J Neurophysiol* 28:1132-1154
- Regal PJ, Gans C** (1976). Functional aspects of the evolution of frog tongues. *Evolution* 30:718-734
- Rhodes HJ, Yu J, Yamaguchi A** (2007). *Xenopus* Vocalization Are Controlled by a Sexually Differentiated Hindbrain Central Pattern Generator. *J Neurosci* 27 (6):1485-1497
- Roden K, Endepols H, Walkowiak W** (2005). Hodological Characterization of the Septum in Anuran Amphibians: I. Afferent Connections. *J Comp Neurol* 488:415-436
- Roden K** (2002). Bedeutung des Vorderhirns für die audiomotorische Integration bei Froschlurchen (Anura). Dissertation
- Rosenthal GG, Rand AS, Ryan MJ** (2004). The vocal sac as a visual cue in anuran communication: an experimental analysis using video playback. *Anim Behav* 68: 55-58
- Roth G, Laberge F, Mühlenbrock-Lenter S, Grunwald W** (2007). Organization of the Pallium in the Fire-bellied Toad *Bombina orientalis*. I: Morphology and Axonal projection Pattern of Neurons Revealing by Intracellular Biocytin Labeling. *J Comp Neurol* 501:443-464
- Roth G, Wullimann MF** (2001). Evolution der Nervensysteme und der Sinnesorgane. In: Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (Hrsg): *Neurowissenschaft: Vom Molekül zur Kognition*. Springer-Verlag, Berlin

- Roth G, Blanke J, Wake DB** (1994). Cell size predicts morphological complexity in the brains of frogs and salamanders. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4796-4800
- Roth G, Nishikawa KC, Naujoks-Manteuffel C, Schmidt A, Wake DB** (1993). Paedomorphosis and simplification in the nervous system of salamanders. *Brain Behav Evol* 42:137-170
- Roth G, Dicke U, Nishikawa K** (1992). How Do Ontogeny, Morphology, and Physiology of Sensory Systems Constrain and Direct the Evolution of Amphibians? *Am Nat* Vol. 139 pp 105-124
- Ryan MJ** (1986). Synchronized calling in a treefrog (*Smilisca sila*). *Brain Behav Evol* 29:196-206.
- Sager SM, Sharp FR, Curran T** (1988). Expression of *c-fos* Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level. *Science* 240:1328-1331
- Satananda M, Wöhr M, Schwarting RKW** (2008). Playbach of 22-kHz ultrasonic vocalization induces differential *c-fos* expression in the rat brain. *Neurosci Lett* 435:17-23
- Sadananda M, Bischof HJ** (2002). Enhanced Fos Expression in the Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*) Brain Following First Courtship. *J Comp Neurol* 448:150-164
- Scalia F, Gallousis G, Roca S** (1991). The differential projections of the main and accessory olfactory bulb in the frog. *J Comp Neurol* 305:443-461
- Schaffer DD** (1982). Comparative and descriptive aspects of neural correlates of mating calling in the isolated brainstem of *Rana p. pipiens*. *Comp Biochem Physiol* 72:371-375
- Schmidt RS** (1992). Neural correlates of frog calling: production by two semi-independent generators. *Behav Brain Res* 50:17-30
- Schmidt RS** (1984). Neural correlates of frog calling: Preoptic area trigger of mating calling. *J Comp Physiol* 92:229-254
- Schmidt RS** (1982). Masculinization of toad pretrigeminal nucleus by androgens. *Brain Res* 244:190-192
- Schmidt RS** (1981). Pretrigeminal nucleus of leopard frog concentrates 2-deoxy-D-glucose during releasing calling. *Exp Brain Res* 42:212-214
- Schmidt RS** (1976). Neural Correlates of Frog Calling – Isolated Brainstem. *J Comp Physiol* 108:99-113
- Schmidt RS** (1974b). Neural correlates of frog calling-trigeminal. Trigeminal tegmentum. *J Comp Physiol A* 92:229-244

- Schmidt RS** (1973). Central mechanism of frog calling. *Amer Zool* 13:1169-1177
- Schmidt RS** (1971). A Model of the Central Mechanisms of Male Anuran Acoustic Behavior. *Behaviour* 39(2/4):288-317
- Schmidt RS** (1968). Preoptic activation of frog mating behavior. *Behaviour* 30:239-257
- Schmidt RS** (1966b). Hormonal mechanisms of frog calling. *Copeia* 4:637-644
- Schmidt RS** (1966a). Central mechanism of frog calling. *Behaviour* 26:251-285
- Schmued L, Kyriakidis K, Heimer L** (1990). *In vivo* anterograde and retrograde axonal transport of the fluorescent rhodamine-dextran-amine, Fluoro-Ruby, within the CNS. *Brain Res* 526:127-134
- Schneider AC** (2012). Tegmental Auditory Responses and Their Modulation by Telencephalic and Diencephalic Centres in Anuran Amphibians. Masterthesis
- Schneider H** (1988). Peripheral and central mechanisms of Vocalization. In: *Evolutions of the amphibian auditory system*, Fritsch B, Ryan MJ, Wilczynski W, Hetherington TE, Walkowiak W (eds) Wiley & Sons NY pp 537-558
- Schneider H** (1986). Structure and function of the calling mechanism in anurans. *Zool Jb Physiol* 90:317-328
- Schneider H** (1982). Phonotaxis bei Weibchen des kanarischen Laubfrosches, *Hyla Meridionalis*. *Zoo Anz Jena* 208:161-174
- Schneider H** (1966). Die Paarungsrufe Einheimischer Froschlurche (Discoglossidae, Pelobatidae, Bufonidae, Hylidae). *Z Morph Ökol Tiere* 57:119-136
- Schofield BR, Schofield RM, Sorensen KA, Motts SD** (2007). On the use of retrograde tracers for identification of axon collaterals with multiple fluorescent retrograde tracers. *Neurosci* 146:773-783
- Schwartz CP, Smotherman MS** (2011). Mapping vocalization-related immediate early gene expression in echolocating bats. *Behav Brain Res* 224:358-368
- Schwartz JJ, Buchanan BW, Gerhardt HC** (2001). Female mate choice in the gray treefrog (*Hyla versicolor*) in three experimental environments. *Behav Ecol Sociobiol* 49:443-455
- Shanon CE, Weaver W** (1949). *The mathematical Theorie of Communication*. Urbana, Ill.: Univ. Illinois Press. 117 pp
- Sheng M, Greenberg ME** (1990). The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485

- Shu SY, Ju G, Fan LZ** (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel-method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85(2):169-71
- Smeets WJAJ, Marín O, Gonzáles A** (2000). Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *J Anat* 196:501-517
- Smotherman M, Kobayasi K, Ma J, Zhang S, Metzner W** (2006). A Mechanism for Vocal-Respiratory Coupling in the Mammalian Parabrachial Nucleus. *J Neurosci* 26(18):4860-4869
- Sockman KW, Gentner TQ, Ball GF** (2002). Recent experience modulates forebrain gene-expression in response to mate-choice cues in European starlings. *Proc R Soc Lond B* 269:2479-2485
- Straka H, Dieringer N** (1993). Electrophysiological and pharmacological characterization of vestibular inputs to identified frog abducens motoneurons and internuclear neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 5:251-260
- Strake J** (1995). Atmung und Rufgenerierung bei *Bombina orientalis* und *Discoglossus pictus* (Discoglossoidae, Anura: Morphologische und physiologische Untersuchungen. Dissertation
- Tan H, Miletic V** (1990). Bulbospinal serotonergic pathways in the frog *Rana pipiens*. *J Comp Neurol* 292:291-302
- Ten Donkelaar HJ** (1998a). Anurans. In: Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C (eds): *The central nervous system of vertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 1151-1314
- Thoms G, Jürgens U** (1987). Common Input of the Cranial Motor Nuclei Involved in Phonation in Squirrel Monkey. *Exp Neurol* 95:85-99
- Tobias ML, Viswanathan SS, Kelley DB** (1998). Rapping, a female receptive call, initiates male-female duets in the South African clawed frog. *Proc Natl Acad Sci* 95:1870-1875
- Tobias ML, Kelley DB** (1987). Vocalization by Sexually Dimorphic Isolated Larynx: Peripheral Constraints on Behavioral Expression. *J Neurosci* 7 (10):3191-3197
- Trueb L** (1996). Historical constraints and morphological novelties in the evolution of the skeletal system of pipid frogs (Anura: Pipidae). In: *The Biology of Xenopus* (eds. R. C. Tinsley and H. R. Kobel), pp. 349-376. Oxford: Clarendon Press
- Tsai PS, Kessler AE, Jonas JT, Wahr KB** (2005). Alteration of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen- and androgen-treated adult male leopard frog, *Rana pipiens*. *Reproduction Biology & Endocrinology* 3:2

- Ubink KR, Jenks BG, Roubos EW** (1997). Physiologically Induced Fos Expression in the Hypothalamo-Hypophyseal System of *Xenopus laevis*. *Neuroendocrinology* 65:413-422
- Udin SB** (1987). A projection from the mesencephalic tegmentum to the nucleus isthmi in the frogs, *Rana pipiens* and *Acris crepitans*. *J Neurosci* 21:631-637
- Urano A** (1988). Neuroendocrine Control of Anuran Anterior Preoptic Neurons and Initiation of Mating Behavior. *Zool Sci* 5:925-937
- Urano A, Gorbman A** (1981). Effects of pituitary hormonal treatment of responsiveness of anterior preoptic neurons in male leopard frogs, *Rana pipiens*. *J Comp Physiol* 141:163-171
- Van Haefen T, Wouterlood FG** (2000). Neuroanatomical tracing at high resolution. *J Neurosci Methods* 103:107-116
- Vankov A, Hervé-Minvielle A, Sara SJ** (1995). Response to Novelty and its Rapid Habituation in Locus coeruleus Neurons of the Freely Exploring Rat. *Eur J Neurosci* 7:1180-1187
- Vasilakos K, Kimura N, Wilson RJA, Remmers JE** (2006). Lung and Buccal Ventilation in the Frog: Uncoupling Coupled Oscillators. *Physiological and Biochemical Zoology* 79(6):1010-1018
- Vasilakos K, Wilson RJA, Kimura N, Remmers JE** (2004). Ancient Gill and Lung Oscillators May Generate the Respiratory Rhythm of Frogs and Rats. *J Neurobiol* 62:369-385
- Velho TA, Pinaud R, Rodrigues PV, Mello CV** (2005). Co-induction of activity-dependent genes in songbirds. *Eur J Neurosci* 22:1667-1678
- Vercelli A, Repici M, Garbossa D, Grimaldi A** (2000). Techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull* 51:11-28
- Wada M, Gorbman A** (1977b). Mate calling induced by electrical stimulation in freely moving leopard frogs, *Rana pipiens*. *Horm Behav* 9:141-149
- Wada M, Gorbman A** (1977a). Relation of mode of administration of testosterone to evocation of male sex behaviour in frogs. *Horm Behav* 8:310-319
- Walkowiak W** (2007). Call Production and Neural Basis of Vocalization. In: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Pooper AN (editors); *Hearing and Sound Communication in Amphibians*, pp 87-112, Springer, New York
- Walkowiak W, Berlinger M, Schul J, Gerhardt HC** (1999). Significance of forebrain structures in acoustically guided behavior in anurans. *Eur J Morphol* 37:177-181

- Walkowiak W, Luksch H** (1994). Sensory motor interfacing in acoustic behavior of anurans. *Amer Zool* 34:158-173
- Walkowiak W** (1992). Acoustic communication in the fire-bellied toad: an integrative neurobiological approach. *Ethology Ecology & Evolution* 4:63-74
- Walkowiak W** (1988b). Two auditory filter systems determine the calling behavior of the fire-bellied toad. A behavioural and neurophysiological characterization. *J Comp Physiol A* 164:31-41
- Walkowiak W** (1980). The coding of Auditory Signals in the Torus semicircularis of the Fire-Bellied Toad and the Grass Frog: Responses to Simple Stimuli and to Conspecific Calls. *J Comp Physiol* 138:131-148
- Welsh AM, Semlitsch RD, Gerhardt HC** (1998). Call Duration as an Indicator of Genetoc Quality in the Male Gray Tree Frogs. *Science* 280:1928-1930
- Wells KD, Schwartz JJ** (2007). The Behavioral Ecology of Anuran Communication. In: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Pooper AN (editors); *Hearing and Sound Communication in Amphibians*, pp 44-86, Springer, New York
- Wells KD** (1988). The Effect of Social Interactions on Anuran Vocal Behavior. In: Fritszch B, Wilczynski W, Ryan MJ, Hetherington T, Walkowiak W (eds) *The Evolution of the Amphibian Auditory System*. New York: Wiley, pp. 433-454
- Wells KD, Greer BJ** (1981). Vocal Responses to Conspecific Calls in a Neotropical Hylid Frog, *Hyla ebraccata*. *Copeia* 3:615-624
- Wells KD** (1977b). The courtship of frogs. In: Tylor D, Guttman S (eds) *The Reproductive Biology of Amphibians*. New York: Plenum, pp. 233-26
- Wetzel DM, Haerter UL, Kelley DB** (1985). A proposed neural pathway for vocalization in South African clawed frogs, *Xenopus laevis*. *J Comp Physiol A* 157:749-761
- Wetzel DM, Kelley DB** (1983). Androgen and gonadotropin effects on male mate calls in South African clawed frogs, *Xenopus laevis*. *Horm Behav* 17(4):388-404
- Wilczynski W, Ryan MJ** (2010). The behavioral neuroscience of anuran social signal processing. *Curr Opin Neurobiol* 20:754-763
- Wilczynski W, Endepols H** (2007). Central Auditory Pathways in Anuran Amphibians: The Anatomical Basis of Hearing and Sound Communication. In: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Pooper AN (editors); *Hearing and Sound Communication in Amphibians*, pp 221-249, Springer, New York

- Wilczynski W, Lynch KS, O`Bryant EL** (2005). Current research in amphibians: Studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Horm Behav* 48:440-450
- Wilczynski W, McClelland BE, Rand AS** (1993). Acoustic, auditory, and morphological divergence in three species of neotropical frog. *J Comp Physiol* 172:425-438
- Wilczynski W, Capranica RR** (1984). The Auditory System of Anuran Amphibians. *Prog Neurobiol* 22:1-18
- Wilczynski W** (1981). Afferents to the midbrain auditory center in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J Comp Neurol* 198:421-433
- Yager DD** (1996). Sound production and acoustic communication in fishes and frogs. In: Tinsley RC, Kobel HR (eds) *The Biology of Xenopus*. New York: Oxford University Press
- Yager DD** (1992). A unique sound production mechanism in the pipid anuran *Xenopus borealis*. *Zool J Linnean Soc* 104: 351-375
- Yager DD** (1982). A novel mechanism for underwater sound production in *Xenopus borealis*. *Am Zool* 122:87
- Yamaguchi A, Kelley DB** (2002). Hormonal mechanisms of acoustic communication. A Megela-Simmons, AN Propper, RRF Fay (Eds.). *Acoustic communication*, Springer Verlag, New York, pp. 275-323
- Yang L, Hu B, Zia Y, Zhang B, Zhao H** (2008). Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing serotonin level in dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res* 188:84-90
- Yao M, Westphal NJ, Denver RJ** (2004). Distribution and Acute Stressor-Induced Activation of Corticotrophin-Releasing Hormone Neurones in the Central Nervous System of *Xenopus laevis*. *J Neuroendocrinol* 16:880-89
- Yu HJ, Yamaguchi A** (2010). Endogenous Serotonin Acts on 5-HT_{2C}-Like Receptors in Key Vocal Areas of the Brain Stem to Initiate Vocalization in *Xenopus laevis*. *J Neurophysiol* 103:648-658
- Zittlau KE, Claas B, Münz H, Görner P** (1985). Multisensory interaction in the torus semicircularis of the clawed toad *Xenopus laevis*. *Neurosci Lett* 60:70-81
- Zhang JS, Haenggeli CA, Tempini A, Vischer MW, Moret V, Rouiller EM** (1996). Electrically Induced Fos-Like Immunoreactivity in the Auditory Pathway of the Rat: Effects of Survival Time, Duration, and Intensity of Stimulation. *Brain Res Bull* 39(2):75-82

Zhang SP, Davis PJD, Bandler R, Carrive P (1994). Brain Stem Integration of Vocalization: Role of the Midbrain Periaqueductal Gray. *J Neurophysiol* 72 (3):1337-1356

Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, Aggleton JP (1995). Effects Of The Novelty Or Familiarity Of Visual Stimuli On The Expression Of The Immediate Early Gene *c-fos* In The Rat Brain. *Neuroscience* 3:821-829

Zornik E, Kelley DB (2007). Breathing and Calling: Neuronal Networks in the *Xenopus laevis* Hindbrain. *J Comp Neurol* 501:303-315

6. ANHANG

Tab. I: Applikation in das posteriore Tegmentum (Teg5)		
Kerngebiet	Afferenzen (Zellen)	Efferenzen (Fasern)
PM	-	-
PD	-	-
Pld	-	-
Plv	-	-
Str	++	+
Ca	+	+
Vpal	-	-
Sc	-	-
Slv	+	-
Sld	+	+
Sd	-	-
Sm	-	-
DB	-	-
BN	-	-
LA	+	-
CA	-	-
MA	+	+(NP)
POa	+++	+/(+++)(NP)
Hb	-	-
La	+	++(NP)
Vld	++	+/(+++)(NP)
VL	+(r)/++(c)	+(r-NP)/+(c)/++(c-NP)
VM	++(r)/+++ (c)	+++ (r-NP)/+(c)
SC	+++ (r)/+(c)	++(r-NP)
OC	-	-
C	+/(+(NP)	+(NP)
EP	-	+/(+++)(NP)
VH	+++	++
P	+++	+/(+++)(NP)
Npv	-	-
DH	++	+
Tpd	+	+/(+++)(NP)
Tpv	+	+/(+++)(NP)
Tec	+++	+++

I-V	++(r)/+++ (C)	+(r)/+++ (r-NP)/++(c)
VI	+(c)	+(c)
VII-IX	-	-
TI	+++ (r)/+++ (c)	++(r)/+++ (r-NP)/+++ (c)
Tp	++(r)	+(r)/+(c)
Ad	+(r)	+(c)/+++ (c-NP)/
Av	++	+ / +++ (NP)
Pd	+++	+++
Pv	+++ (r)/+++ (c)	++(r)/+++ (r-NP)/+++ (c)/+++ (c-NP)
Ip	-	-
Cer	-	+
Prtr	+++	+++ / +++ (NP)
Si	+	+ / +++ (NP)
Lc	-	+
Gc	++	++ / +++ (NP)
Fr	+++ (r)/++(c)	++(r)/++(r-NP)/++(c)/++(c-NP)
Os	+(r)/+(c)	+(r)/+++ (r-NP)/+(c)/++(c-NP)
Ra	-	+

Tab. II: Applikation in das posteriore Tegmentum (Teg8)		
Kerngebiet	Afferenzen	Efferenzen
	(Zellen)	(Fasern)
PM	-	-
PD	-	-
PI _d	-	-
PI _v	-	-
Str	+	+
Ca	-	-
Vpal	-	-
Sc	-	-
SI _v	-	-
SI _d	-	-
S _d	-	-
Sm	-	-
DB	-	-
BN	-	-
LA	-	-
CA	-	-
MA	-	-
PO _a	+	+/+(NP)
H _b	-	-
A	+(r)/+(c)	+(r)/+(c)/++(c-NP)
VI _d	+	+/+(NP)
VL	-	+(c)
VM	+(r)	+(r)/++(c-NP)
SC	+(r)/+(c)	+(r)/+(c)/+(c-NP)
C	+(r)	+(r)/+(r-NP)/+(c-NP)
EP	-	+(r)
VH	+	+/+(c)
P	++(r)/++(c)	+(r)/++(r-NP)/++(c)/++(c-NP)
Lp _d	+(c)	+(c)
Lp _v	-	-
TP	-	-
Np _v	-	-
DH	+	-
LH	+	+
Tp _d	+	+
Tp _v	-	-
Tec	-	-

I-V	+(r)	+(r)
VI	-	+(r)
VII-IX	-	+(r)
Tl	++(r)/(c)	+++ (r)/+++ (r-NP)
TP	-	-
Ad	++(r)/(c)	++(r)/+++ (r-NP)/(c)
Av	+	+ /+++ (NP)
Pv	+++ (r)/(c)	++(r)/++ (r-NP)/(c)/+(c-NP)
Pd	++	+ /+(NP)
Ni	-	+(NP)
Ip	-	+
Cer	-	-
Prtr	+	+ /+(NP)
Si	+	-
Lc	+	-
Gc	-	+(NP)
Fr	+(r)/(c)	+(r)/+(r-NP)/(c)
Os	+(r)/(c)	+(r)/++ (r-NP)/(c)/+C-NP)

Tab. III: Applikation in das anterioren Tegmentum (Teg11)		
Kerngebiet	Afferenzen	Efferenzen
	(Zellen)	(Fasern)
PM	+++	-
PD	-	-
Pld	-	-
Plv	-+	-
Str	+++	+++
Ca	-	-
Vpal	-	-
Sc	-	-
Slv	+	-
Sld	+	-
Sd	-	-
Sm	-	-
DB	-	-
BN	-	-
LA	-	+
CA	++	+
MA	-	-
POa	+	-
Hb	-	-
A	++	++
Vld	+	-
Vlv	+	+
VL	+++	-
VM	+++	++
SC	+++	+++
C	+	++
La	++	+(d-NP)
EP	+	++/++(NP)
VH	+++	+++
P	++	++
Lpd	-	-
Lpv	-	-
TP	++	++
Npv	+++	++
DH	+	++
LH	-	-
Tpd	++	+

Tpv	+	+
Tec	+++	+++
I-V	++	++
VI	++	+
VII-IX	-	+++
TI	++	+++
Tp	++	+
Ad	+++	+++
Av	-	-
Pv	++	+++ / +++ (I-NP)
Pd	++	+++ / +++ (I-NP)
Ni	-	-
Ip	-	-
Cer	-	-
Prtr	++	+ / +++ (m-NP)
Si	++	-
Lc	++	-
Gc	++	++
Fr	+	+(NP)
DMN	-	+
SON	-	++
Ra	+	+

Tab. IV: Applikation in die Nuclei habenulares		
Kerngebiet	Afferenzen (Zellen)	Efferenzen (Fasern)
PM	+	++/++(r-NP)
PD	-	-
PL	-	+
Pld	-	-
Plv	-	-
Str	+	+++
Vpal	-	+++
Sc	-	-
Sl		++
Slv	++	+
Sld	+	+
Sd	+	+
Sm	-	+
DB	+	++++-
BN	-	+
LA	+	++
CA	+	+
MA	+	+
POa	+	++/+++ (NP)
EA	-	+++
Hb	+++	+++
La	++	+++/+++ (NP)
A	+++	+++/+++ (NP)
MG	-	++
Vld	+	+
VL	+	++
VM	+	+
SC	+++ (r)/++ (c)	+++ (r)/+++ (r-NP); ++(c)
OC	-	+
C	+++	+++
EP	++	+++/+++ (NP)
PtG	+++	+
VH	-	-
P	-	+
Npv	-	-
DH	+	+++ (r)/+(c)
VH	+ (r)/++(c)	+++ (r)/++ (c)

Tpd	+	+
Tpv	-	+++
Tec	++	++
I-V	+	+
VI	+	-+
VII-IX	-	+
TI	+	+
Tp	-	-
Ad	+ (r)/+ (c)	+ (r)
Av	+ (r)	+ (r)
Pd	+ (r)/++ (c)	+
Pv	+	++
Ip	+	+ / +++ (NP)
Cer	-	+
Prtr	-	+
Si	-	-
Lc	-	-
Gc	+	+
Fr	-	+
Os	-	-
Ra	-	+++

Legende:

- c caudal
- d dorsal
- r rostral
- NP Neuropil
- +++ sehr hohe Zell- und Faserdichte
- ++ geringe Zell- und Faserdichte
- + sehr geringe Zell- und Faserdichte

7. ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Fachterminus
A	Nucleus anterior thalami
Ad	anteriores Tegmentum, pars dorsalis
aob	accessorischer olfactorischer Bulbus
Bo	Bulbus olfactorius
BN	Bed Nucleus der pallialen Kommissur
C	Nucleus centralis thalami
CA	Amygdala, pars centralis
Ca	Nucleus caudalis
Cb	Nucleus cerebelli
Cer	Cerebellum
CN	Nucleus cerebelli
DB	Nucleus des diagonalen Bandes von Broca
DH	Nucleus hypothalamicus dorsalis
dInf	Infundibulum, pars dorsalis
DMN	Nucleus dorsomedullaris
EA	Nucleus entopeduncularis anterior
EP	Nucleus entopeduncularis posterior
Fr	Formatio reticularis
GC	Griseum centrale rhombencephali
Gl	Glomeruli
Gr	Granulärzellschicht des Bulbus olfactorius
Hb	Nuclei habenulares
Inf	Infundibulum
Ip	Nucleus interpeduncularis
LA	Amygdala, pars lateralis
La	Nucleus lateralis thalami, pars anterior
Lc	Locus coeruleus

LH	Nucleus hypothalamicus lateralis
Lpd	Nucleus thalami lateralis, pars posterodorsalis
Lpv	Nucleus thalami lateralis, pars posteroventralis
LT	Lamina Terminalis
MA	Amygdala, pars medialis
MG	Nucleus praeopticus magnocellularis
Mi	Mitralzellschicht des Bulbus olfactorius
Ni	Nucleus isthmi
Npd	Nucleus des periventriculären Organs, pars dorsalis
Npv	Nucleus des periventriculären Organs, pars ventralis
OC	Chiasma opticum
P	Nucleus posterior thalami
Pb	Nucleus parabrachialis
PD	Pallium dorsale
Pd	posteriores Tegmentum, pars dorsalis
PL	Pallium laterale
Pld	Pallium laterale, pars dorsalis
Plv	Pallium laterale, pars ventralis
PM	Pallium mediale
POa	Nucleus praeopticus anterior
POp	Nucleus praeopticus posterior
Prtr	Nucleus praetrigeminalis
PtG	praetectales Grau
Pv	posteriores Tegmentum, pars ventralis
Ra	Nucleus raphé
Ris	Nucleus reticularis inferior
rRpd	Nucleus raphé, pars dorsalis
SC	Nucleus suprachiasmaticus
Sc	Septum centrale

Sd	Septum dorsale
Sep	Septum
Si	Nucleus secundarius isthmi
Sl	Septum laterale
Sld	Septum laterale, pars dorsalis
Slv	Septum laterale, pars ventralis
Sm	Septum mediale
SO	Oliva superior
SPTA	Striato-pallial transition area
STN	Nucleus subthalamicus
Str	Striatum
Tec	Tectum
Tel	Telencephalon
Teg	Tegmentum
TI	Torus semicircularis, Nucleus laminaris
Tm	Torus semicircularis, Nucleus magnocellularis
Tp	Torus semicircularis, Nucleus principalis
TP	Tuberculum
Tpd	Tuberculum posterior, pars dorsalis
Tpv	Tuberculum posterior, pars ventralis
Ts	Torus semicircularis
VH	Nucleus hypothalamicus ventralis
vlInf	Infundibulum, pars ventralis
VL	Nucleus thalami ventrolateralis
Vld	Nucleus thalami ventrolateralis, pars dorsalis
Vlv	Nucleus thalami ventrolateralis, pars ventralis
VM	Nucleus thalami ventromedialis
Vm	Nucleus motorius nervi trigemini
Vmes	Nucleus mesencephalicus nervi trigemini
VN	Nucleus vestibulare
Vpal	Pallidum ventrale

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. W. Walkowiak betreut worden.

Köln, den 03.September 2013