Konnektivität und cytochemische Organisation des tecto-reticulären Systems im Gehirn von Amphibien

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
- Dr. rer. nat. –

vorgelegt dem Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

von
Sandra Landwehr
Bremen 2006

1. Gutachter: HD Dr. U. Dicke

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. G. Roth

Tag des Promotionskolloquiums: 21.07.2006

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Landwehr S, Dicke U (1999) Distribution of GABA- and glycine-like-immunoreactivities in the medulla oblongata of plethodontid salamanders. In: Göttingen Neurobiology Report 1999, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Landwehr SLG, Dicke U (2004) Modulatory systems of the tectum mesencephali in *Plethodon shermani*. 4th Eur Conf Comp Neurobiol, Oxford

Landwehr S, Dicke U (2005) Distribution of GABA, glycine, and glutamate in neurons of the medulla oblongata and their projections to the midbrain tectum in plethodontid salamanders. J Comp Neurol 490:145-162

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau HD Dr. Ursula Dicke für die Überlassung des Themas und ihrer Betreuung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhard Roth danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Herrn Dipl. Math. Werner Wosniok möchte ich mich für die hervorragende Beratung bei der statistischen Datenanalyse sowie für die Ermittlung der Korrekturformel bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Sabine Mühlenbrock-Lenter für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre freundschaftliche Unterstützung und die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Des weiteren danke ich Frau Marion Ahlbrecht für ihre kompetenten Ratschläge bei der Durchführung der immunhistochemischen Experimente.

Herrn Dipl. Biol. Peter Behrens und Herrn Dr. Martin Jordan danke ich für ihre freundschaftlichen und ermutigenden Worte während der Erstellung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit, sowie ihrer Liebe und Unterstützung.

1 EINLEITUNG 1

1.1 Relevanz immunhistochemischer Transmitterdetektionen bei Salamandern 1

1.2 Medulla oblongata 2

1.3 Tectum mesencephali 4

1.4 Fragestellung der Untersuchungen zum tecto-reticulären System 5

2 MATERIAL UND METHODEN 7

2.1 Versuchstiere 7

2.2 Herstellung histologischer Präparate 8

2.2.1 Narkotisierung 8

2.2.2 Tracerapplikation 8

2.2.2.1 Tracerapplikation von dorsal 9

2.2.2.2 Tracerapplikation von ventral 9

2.2.3 Perfusionsfixierung 10

2.2.4 Herstellung von Vibratomschnitten 11

2.2.5 Herstellung von EPON-Semidünnpräparaten 11

2.2.6 Vorbehandlung der EPON-Semidünnpräparate 12

2.2.7 Immunhistochemische Neurotransmitterdetektion mittels ABC-Methode 13

2.2.8 Immunhistochemische Neurotransmitterdetektion mittels PAP-Methode 16

2.2.9 Biocytindetektion an EPON-Semidünnschnitten 16

2.3 Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate 17

2.3.1 Herstellung immungolddoppelmarkierter EPON-Präparate 17

2.3.2 Herstellung von Ultradünnpräparaten für die Elektronenmikroskopie 20

2.4 Kontrollen zur Antikörperspezifität 20

2.4.1 Adsorptionstest 20

2.4.2 Kreuzreaktivitätstest 21

2.4.3 Negativkontrollen 22

2.5 Auswertung der Präparate 22

2.5.1 Auswertung der Vibratomschnitte 22

2.5.2 Auswertung der Semidünnpräparate 23

2.5.3 Statistische Auswertung 24

2.5.3.1 Statistische Analyse der Verteilung GABAerger und glycinerger Somata 24

2.5.3.2 Problematik der Mehrfachzählung von Zellen 25

2.5.3.3 Modellsimulation zur statistischen Analyse der Kolokalisationen 27

2.5.4 Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate 28

3 ERGEBNISSE 30

3.1 Spezifität der Antikörper und der Detektierungssysteme 30

3.2 Konnektivität und cytochemische Organisation der Medulla 32

3.2.1 Longitudinalzonen der Medulla oblongata 32

3.2.2 Verteilung von GABA und Glycin in der Medulla oblongata 34
3.2.3 Größe und Verteilung der Somata immunpositiver und -negativer Zellen 39
3.2.4 Verteilung GABA- und glycinerger Somata anhand von Vibratomschnitten 41
3.2.5 Verteilung immunreaktiver Somata anhand von Semidünnschnitten 44
3.2.6 Kolokalisation von GABA, Glycin und Glutamat 45
3.2.7 Immunnegative Somata 50
3.2.8 Verteilungsmuster der Kolokalisationen von Transmittern 51
3.2.9 Mauthner Neuron und Riesenneurone 54
3.2.10 Transmitterspezifität der in das Tectum aufsteigenden Projektionen 54
3.3 Konnektivität und cytochemische Organisation des Tectum mesencephali 58
3.3.1 Lagebeziehung und Schichtung 58
3.3.2 Verteilung GABA- und glycinerger Somata anhand von Vibratomschnitten 60
3.3.3 Unterschiede in der Verteilung GABA- und glycinerger Somata 66
3.3.4 Verteilung immunreaktiver Somata anhand von Semidünnschnitten 69
3.3.5 Kolokalisation von GABA, Glycin und Glutamat 70
3.3.6 Verteilungsmuster der Kolokalisationen von Transmittern 76
3.3.7 Neurone des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini 77
3.3.8 Transmitterspezifität tectaler Projektionsneurone 78
3.3.8.1 Neurone mit ipsilateral deszendierenden Projektionen 81
3.3.8.2 Neurone mit contralateral deszendierenden Projektionen 86
3.3.9 Subzelluläre Strukturen im Tectum mesencephali 89
3.3.9.1 Qualität der Immungolddoppelmarkierung 90
3.3.9.2 Synaptische Verschaltung von Neuronen mit deszendierenden Projektionen 90
3.3.9.3 Synaptische Verschaltung GABAerger Fasern 93
3.3.9.4 Synaptische Verschaltung 5-HT-positiver Axone 93
3.3.9.5 Synaptische Verschaltung glycinerger Axone 94
3.3.9.6 Unmarkierte axo-dendritische Kontakte 95
3.4 Konnektivität und cytochemische Organisation des ventralen Mesencephalon 96
3.4.1 Verteilung GABA- und glycinerger Somata anhand von Vibratomschnitten 96
3.4.2 Kolokalisationen von GABA, Glycin und Glutamat 97
3.4.2.1 Kolokalisationen im Torus semicircularis 100
3.4.2.2 Kolokalisationen im Tegmentum 100
3.4.3 Transmitterspezifität nicht tectaler mesencephaler Projektionsneurone 101
3.4.3.1 Neurone des Torus semicircularis mit deszendierenden Projektionen 101
3.4.3.2 Neurone des dorsalen Tegmentum mit deszendierenden Projektionen 103
3.4.3.3 Neurone des ventralen Tegmentum mit deszendierenden Projektionen 104

4 DISKUSSION 105

4.1 Anmerkungen zur Methode 105
4.1.1 Interpretation immunhistochemischer Detektierungen von Aminosäuren 105
4.1.2 Geringe Immungoldmarkierung myelinisierter Axone 106

4.2 Konnektivität und cytochemische Organisation der Medulla 107
4.2.1 Longitudinalzonen der Medulla oblongata 107
4.2.2 Verteilung der Transmitter in den Longitudinalzonen 107
4.2.2.1 Die mediane Zone 108
4.2.2.2 Die mediale Zone 109
4.2.2.3 Die laterale Zone 110
4.2.2.4 Die dorsale Zone 112
4.2.3 Funktionelle Betrachtung 113
4.2.4 Mauthner Neuron 114
4.3 Konnektivität und cytochemische Organisation des Tectum mesencephali 116
4.3.1 Anatomische und cytochemische Differenzierung der tectalen Bereiche 116
4.3.2 Laminierung des Tectum mesencephali 117
4.3.3 Immunreaktivität in den Faserschichten des Tectum mesencephali 117
4.3.4 Verteilung der Transmitter in den Zellkörperschichten des Tectum 119
4.3.5 Neurone des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini 120
4.3.6 Transmitterspezifität tecto-bulbarer Projektionsneurone 121
4.3.6.1 Tecto-bulbare Transmission 122
4.3.6.2 Tectale Projektionsneurone – Substrat für intratectale laterale Inhibition 122
4.3.7 Einfluss GABAerger Systeme bei der visuellen Verarbeitung 123
4.3.7.1 GABAerge Afferenzen im Tectum 123
4.3.7.2 Intratectales GABAerges System 124
4.3.7.3 Postsynaptische Wirkung von GABA 125
4.3.7.4 Modell zur intratectalen inhibitorischen Interaktion 126
4.3.8 Einfluss glycinerger Afferenzen des Nucleus reticularis medius im Tectum 127
4.3.8.1 Einfluss des NRM auf tectale Interneurone 128
4.3.8.2 Physiologische Wirkung von Glycin 130
4.3.9 Serotonerge Modulation im Tectum 131
4.3.9.1 Wechselwirkung zwischen Serotonin und GABA 132
4.3.9.2 Modell zum Einfluss der serotonergen Projektion der Nuclei raphes 133
4.3.10 Kontrolle von Aufmerksamkeitsprozessen im Tectum mesencephali 136
4.4 Konnektivität und cytochemische Organisation des ventralen Mesencephalon 137
4.4.1 Konnektivität und cytochemische Organisation des Torus semicircularis 137
4.4.2 Konnektivität und cytochemische Organisation des dorsalen Tegmentum 139
4.4.3 Konnektivität und cytochemische Organisation des ventralen Tegmentum 140
4.4.3.1 Das isthmische Tegmentum 141
4.4.3.2 Neurone mit deszendierenden Projektionen des ventralen Tegmentum 142

5 ZUSAMMENFASSUNG 143

6 LITERATUR 145

1 EINLEITUNG

Seit vielen Jahrzehnten ist die Untersuchung des visuellen und motorischen Systems der Vertebraten Gegenstand der Hirnforschung. Neben der langjährigen Forschung an Säugern, Vögeln und Fischen wurden Amphibien in den letzten Jahrzehnten verstärkt zu einem beliebten Forschungsobjekt. Diese Tiere besitzen im Vergleich zu höheren Vertebraten ein relativ kleines Gehirn mit rund einer Million Nervenzellen. Dennoch zeigen die Gehirne der Amphibien alle charakteristischen Hirnregionen des Vertebratengehirns. In den letzten Jahren zeigte sich, dass die grundlegenden Funktionen des Amphibiengehirns mit denen anderer Vertebraten vergleichbar sind. Bei der visuellen Objekterkennung und –bewertung, sowie bei visuell gesteuerten Aufmerksamkeitsprozessen wurden komplexe kognitive Leistungen bei Amphibien nachgewiesen (Schülert und Dicke, 2002, 2005; Schülert, 2004).

Eine generelle Schwierigkeit bei der Untersuchung von Amphibien besteht in der Aufklärung funktionell anatomischer Zusammenhänge. Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung ist daher die Aufklärung der funktionellen Anatomie des tecto-reticulären Systems bei Salamandern.

1.1 Relevanz immunhistochemischer Transmitterdetektionen bei Salamandern

Die in dieser Studie untersuchten Arten *Plethodon shermani* (ehemals *Plethodon jordani*; Highton und Peabody, 2000) und *Hydromantes genei* gehören zur Familie der Plethodontidae (lungenlose Salamander). Im Laufe der Evolution erfolgte im Hirn dieser terrestrisch lebenden Salamander eine anatomische „Vereinfachung“ der Hirngebiete durch sekundäre Simplifizierung (Roth et al., 1993), welche sich u. a. durch eine fehlende Zellmigration von Kerngruppen bei der ontogenetischen Entwicklung auszeichnet. Alle Hirngebiete zeigen einen einheitlichen Aufbau bestehend aus einer periventrikulären Zellkörperschicht und einer Faserschicht. Dem entgegen lassen sich bei Fröschen und anderen Vertebraten migrierte Kerngruppen in vielen Hirngebieten nachweisen (Nieuwenhuys und Opdam, 1976; Adli et al., 1999; Stuesse et al., 2001; Übersicht in Jones, 1995; Nieuwenhuys et al., 1998). Eine Identifizierung der verschiedenen Kerngruppen bei Salamandern der Familie Plethodontidae ist daher nur durch Verbindungsstudien oder immunhistochemische Neurotransmitter-detektionen möglich.

Spezifische Transmittersysteme bilden ein weitverzweigtes Netz von Neuronen und Zellgruppen, die einerseits weitreichende Projektionen in andere Hirnregionen haben,

andererseits jedoch auch lokal innerhalb der eigenen Region vernetzt sind. Hierzu zählen unter anderem die Systeme der Aminosäuretransmitter GABA, Glycin und Glutamat. Die Lokalisation dieser Aminosäuretransmitter und der anschließende Vergleich mit anderen Vertebraten ermöglicht somit die Identifizierung, Homologisierung und funktionelle Zuordnung bestimmter Kerngruppen in den periventrikulären Zellkörperschichten der Salamander.

Eine besonders wichtige Rolle spielt die Untersuchung der Transmittersysteme für das Verständnis visuomotorischer Prozesse. Mit ihrer Schleuderzunge können Salamander schnell und präzise Beute fangen. Dies setzt ein komplexes, visuell gesteuertes Beutefangverhalten voraus, bei dem sowohl visuelle Prozesse wie Objekterkennung und –lokalisation im dreidimensionalen Raum als auch assoziative und motivationale Prozesse wie Objektbewertung und visuell gesteuerte Aufmerksamkeitsprozesse beteiligt sind. Hierzu sind reziproke Verbindungen zwischen dem Tectum mesencephali, dem visuellen Zentrum der Amphibien, und der Medulla oblongata notwendig, in deren Motorkernen die Steuerung und Kontrolle der beim Beutefangverhalten beteiligten motorischen Prozesse erfolgt. Informationen zur Transmitterspezifität der Neurone dieser beiden Hirngebiete und besonders ihrer aszendierenden bzw. deszendierenden Projektionen ermöglichen zum einen ein besseres Verständnis der funktionellen Beziehung zwischen Tectum und Medulla und liefern zum anderen Kenntnisse über funktionelle Verarbeitungsprozesse innerhalb dieser beiden Hirngebiete.

1.2 Medulla oblongata

Die Medulla oblongata der Vertebraten ist ein anatomisch und funktionell sehr heterogenes Hirngebiet. Medulläre Neurone sind in einer Reihe funktionell unterschiedlicher Systeme involviert. Motorische Kerngebiete in der Medulla sind an der Steuerung von Bewegungen der Hals- und Nackenmuskulatur sowie an der Kontrolle vitaler Körperfunktionen wie Atmung und Herz-Kreislauf-Funktionen beteiligt. Ebenso befinden sich primäre und sekundäre Umschaltkerne für die Weiterleitung somato- und viszerosensorischer Informationen in der Medulla oblongata. Des weiteren sind viele reticuläre Kerne in der Medulla lokalisiert, welche an der Kontrolle von Wachheit und Aufmerksamkeitsprozessen beteiligt sind. Zudem bildet die Medulla die Konvergenzzone für absteigende Projektionsbahnen aus allen anderen Hirngebieten (Übersicht in Butler und Hodos, 1996; Nieuwenhuys et al., 1998).

In der Medulla oblongata der Amphibien wurden bereits die Anatomie und Verteilung der Motorkerne der Kranialnerven V-XII sowie die Nuclei des auditorischen, vestibulären und somatosensorischen Systems untersucht (Roth et al., 1988; Székely und Matesz, 1993; Muñoz et al., 1994; Strake et al., 1994; Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998; Straka und Dieringer, 2000), wie z. B. der Nucleus dorsalis (ND), welcher bei Salamandern der Familie Plethodontidae vermutlich an der Verarbeitung von Tiefenfrequenzen und Bodenvibrationen beteiligt ist (Roth et al., 1993), sowie der Nucleus vestibularis (NV), der vestibuläre Informationen des VIII. Kranialnerven verarbeitet. Des weiteren wurden einige reticuläre Kerne identifiziert, die in einer medianen, einer medialen und einer lateralen Zone lokalisiert sind. Hierzu zählen u. a. die median gelegenen Nuclei raphes (Dicke et al., 1997; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998) und der in der rostralen medialen Zone der Formatio reticularis lokalisierte Nucleus reticularis medius (NRM) (Nieuwenhuys und Opdam, 1976; Opdam und Nieuwenhuys, 1976; Finkenstädt et al., 1983). Die laterale reticuläre Formation ist bei Amphibien ein diffuses, parvozelluläres Gebiet (Herrick, 1948; Opdam und Nieuwenhuys, 1976; Nikundiwe und Nieuwenhuys, 1983; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998).

Eine Vielzahl aufsteigender und absteigender Verbindungen wurden zwischen der Medulla und anderen Hirngebieten durch Tracing-Experimente dokumentiert (ten Donkelaar et al., 1981; ten Donkelaar, 1982; Naujoks-Manteuffel und Manteuffel, 1988; Dicke et al., 1998; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998). Bei Salamandern der Familie Plethodontidae wurden reziproke Verbindungen der rostralen Medulla unter anderem mit mesencephalen Arealen wie dem Tectum mesencephali, dem Torus semicircularis und dem dorsalen Tegmentum beschrieben. Die aszendierenden Axone des ND, des NV und des NRM ziehen in die tieferen Faserschichten des Tectum ein (Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998; Dicke, 1999; Roth et al., 1999), wo sie vermutlich modulatorische Effekte des sensorischen Umfeldes bei der visuellen Integrationsverarbeitung erzeugen (Schülert und Dicke, 2002, 2005; Schülert, 2004). Die Transmitterspezifität dieser aszendierenden Projektionen ist jedoch ungeklärt. Durch eine cytochemische Charakterisierung dieser bulbo-tectalen Projektionen kann der Einfluss multimodaler und reticulärer Kerne auf die visuelle Integrationsverarbeitung bestimmt werden. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis der funktionellen Beziehung zwischen Tectum und Medulla.

Bislang wurden bei Amphibien eine Reihe von Nuclei im Hirnstamm hinsichtlich ihres Gehaltes an Neurotransmittern und –peptiden charakterisiert. Hierzu zählen die serotonergen Nuclei raphes (Dicke et al., 1997; Adli et al., 1999; Stuesse et al., 2001), der noradrenerge Locus coeruleus (Marín et al., 1996) und der cholinerge laterodorsale tegmentale Kern sowie

alle Motorkerne der Kranialnerven (Marín et al., 1997). Während die Verteilung der Aminosäuretransmitter in der Medulla oblongata der Säuger bereits genau untersucht wurde, wodurch eine charakteristische Verteilung von GABA, Glycin und Glutamat in den verschiedenen funktionellen Systemen beschrieben werden konnte (Adams und Mugnaini, 1990; Jones, 1995; Li et al., 1996, 1997; Rampon et al., 1996, 1999; Kobayashi et al., 1997; Suzuki et al., 1997), wurde eine vergleichbare Untersuchung in Amphibien bislang nur in den Vestibularkernen von *Rana* durchgeführt (Reichenberger et al., 1997).

1.3 Tectum mesencephali

Das Tectum mesencephali von Amphibien ist zum einen das Hauptzentrum für die visuelle Wahrnehmung der Umwelt zum anderen ein Integrationszentrum für die Verarbeitung multimodaler Informationen (Ewert, 1984; Roth, 1987; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998). Wie bei allen bislang untersuchten Vertebratenspezies ist das Tectum der Amphibien durch eine Laminierung in unterschiedliche Faser- und Zellkörperschichten gekennzeichnet (Székely und Lázár, 1976; Lázár, 1987; Dicke und Roth, 1996; Hilbig et al., 1998; Übersicht in Butler und Hodos, 1996). Retinale sowie isthmische Afferenzen ziehen in den oberflächlichen Faserschichten ein, während die tieferen Faserschichten einen Eingang multimodaler und reticulärer Afferenzen aus der Medulla erhalten (Roth, 1987; Wiggers, 1991, 1998, 1999; Wiggers und Roth, 1994; Mandon, 1997; Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998; Dicke, 1999; Roth et al., 1999). Zudem erhält das Tectum Eingänge aus dem Thalamus und dem Striatum, welche vermutlich assoziative und im Gedächtnis gespeicherte Informationen bei der Bewertung visueller Objekte beisteuern (Roth und Grunwald, 2000; Roth et al., 2003).

In den Zellkörperschichten des Tectum mesencephali von Amphibien wurden verschiedene Typen von Neuronen mit deszendierenden und/oder aszendierenden Projektionen sowie tectaler Interneurone identifiziert und anatomisch hinsichtlich ihrer zellulären Strukturen, Projektionen und elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisiert (Roth et al., 1990; Dicke, 1999; Roth et al., 1999). Neurone mit deszendierenden Projektionen in die Medulla sind an der Initiierung visuell gesteuerter motorischer Bewegungen wie z. B. die Steuerung der Hals- und Nackenmuskulatur beteiligt. Es wurde beobachtet, dass verhaltensrelevante Objekte eine Orientierungsbewegung des Kopfes bei Salamandern und Fröschen auslösen (Schülert und Dicke, 2002; Behrens und Dicke, 2003; Schülert, 2004). Hierbei spielt eine laterale Beeinflussung zwischen tectalen Neuronen eine Rolle (Roth et al., 1999; Schülert, 2004; Schülert und Dicke, 2005). Bislang fehlen jedoch Informationen über den

Transmittergehalt der verschiedenen tectalen Neuronentypen. Eine cytochemische Charakterisierung tectaler Neurone, insbesondere der tecto-bulbaren Projektionsneurone, ermöglicht eine funktionelle Bestimmung einer möglichen exzitatorischen und/oder inhibitorischen visuomotorischen Transmission.

Bei Amphibien wurde bislang eine Vielzahl GABAerger Neurone und Fasern in den einzelnen Schichten des Tectum mesencephali beschrieben (Franzoni und Morino, 1989; Antal, 1991; Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Wallstein und Dicke, 1996; Li und Fite, 1998; Wallstein, 1999; Hollis und Boyd, 2005). Die anatomische Verschaltung dieses intratectalen inhibitorischen Netzwerkes sowie die funktionellen Zusammenhänge bei der visuellen und/oder multimodalen Verarbeitung sind jedoch noch weitesgehend ungeklärt. Des weiteren wurden glycinerge Fasern in den tieferen Faserschichten und serotonerge Fasern in den intermediären Faserschichten beschrieben (Gruberg und Harris, 1981; Ueda et al., 1984; Fasolo et al., 1986; Clairambault et al., 1994; Liu und Debski, 1995; Dicke und Wallstein, 1996; Dicke et al., 1997; Wallstein, 1999). Neueste Untersuchungen an *Rana pipiens* zeigten, dass die serotonergen Fasern den median gelegenen Nuclei raphes entstammen (Zhao und Debski, 2005). Der Ursprung der glycinergen Faserprojektion ist bislang jedoch noch nicht geklärt. Untersuchungen zur Wirkung von Aminosäuretransmittern bei Amphibien zeigten, dass GABA und Glycin biphasische Effekte bei der tectalen Verarbeitung erzeugen (Sivilotti und Nistri, 1986, 1992; Kahl, 1999). Dem entgegen bewirkt Serotonin eine dosisabhängige Inhibition (Malayev und Debski, 1998; Kahl, 1999). Bislang ist jedoch noch weitesgehend unbekannt, wie und an welchen tectalen Neuronentypen diese Effekte ausgelöst werden.

1.4 Fragestellung der Untersuchungen zum tecto-reticulären System

Aufgrund fehlender Bestimmungen zur Transmitterspezifität der reziproken Verbindungen zwischen dem Tectum und der Medulla oblongata, gilt das tecto-reticuläre System nach wie vor als weitesgehend unverstanden. In der vorliegenden Untersuchung sollte mit Hilfe immunhistochemischer Neurotransmitterdetektionen, Tracing-Experimenten und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei Salamandern der Familie Plethodontidae wesentliche Fragestellungen zur Konnektivität und cytochemischen Organisation des tecto-reticulären Systems geklärt werden. Für die Untersuchung der Medulla oblongata standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Wie ist die Medulla oblongata cytochemisch organisiert? Gibt es Unterschiede in der Verteilung der Neurotransmitter und ihrer Kolokalisationen in den verschiedenen Longitudinalzonen entlang der rostrocaudalen Ausdehnung der Medulla?

2. Wie ist der Transmitterbestand der unterschiedlichen sensorischen und reticulären Kerngruppen, insbesondere der Neurone mit aszendierenden Projektionen ins Tectum mesencephali? Entstammt die glycinerge Faserprojektion im Tectum reticulären Neuronen aus der Medulla?

Die Untersuchung der Medulla bezweckt somit die Aufklärung der integrativen Rolle der Medulla von Amphibien im Zusammenhang mit visuomotorischen Verhalten, insbesondere in Hinblick auf die Interaktion zwischen Medulla und Tectum.

Bei der Untersuchung des Tectum sollten folgende Fragen vorangig geklärt werden:

1. Wie ist das Tectum mesencephali cytochemisch organisiert? Gibt es Unterschiede in der Verteilung der Neurotransmitter und ihrer Kolokalisationen in den Zellkörperschichten entlang der rostrocaudalen Ausdehnung des Tectum?
2. Welche Aminosäuretransmitter sind an der tecto-bulbaren Transmission beteiligt?
3. Wie ist das intratectale Netzwerk cytochemisch organisiert? Welche funktionelle Rolle spielen intratectale inhibitorische Interaktionen bei visuomotorischen Verarbeitungsprozessen?
4. Wie wirken die Afferenzen reticulärer Kerne auf das intratectale Netzwerk ein? Welche Rolle spielen Aufmerksamkeitsprozesse bei der Verarbeitung visueller und/oder multimodaler Reize?

Die Untersuchung des Tectum dient somit der Aufklärung intratectaler Verarbeitungsprozesse bei Amphibien besonders im Hinblick auf den Einfluss medullärer reticulärer Kerne. Die vorliegende Untersuchung soll somit zu einem besseren Verständnis der funktionellen Anatomie des tecto-reticulären Systems beitragen.

Ergänzend hierzu wurden Projektionsneurone anderer mesencephaler Areale cytochemisch charakterisiert, deren Axone ebenfalls in die Medulla oblongata deszendieren. Diese zusätzliche Untersuchung dient der weiteren Aufklärung der integrativen Rolle der Medulla bei der Initiierung motorischer Prozesse.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Bei den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Versuchstieren handelt es sich um lungenlose Salamander der Unterfamilie Plethodontinae. Zum Vergleich wurden bei der Untersuchung der Medulla zwei verschiedene Spezies der Gattungsgruppen Plethodontini (*Plethodon shermani*) und Bolitoglossini (*Hydromantes genei*) (Wake, 1966) untersucht (Tab. 1). Bei der Untersuchung des Mesencephalon wurden nur Tiere der Gattungsgruppe Plethodontini verwendet. Versuchstiere der Spezies *Plethodon shermani* (n = 41; 22 Männchen, 18 Weibchen; SVL = 55-60mm) entstammten Wildpopulationen aus der Umgebung der Highlands Biological Station in North Carolina (USA), während die Tiere der Spezies *Hydromantes genei* (n = 6; 2 Männchen, 4 Weibchen; SVL = 55-60mm) in der Umgebung von Domusnuovas (Sardinien, Italien) mit Genehmigung des zoologischen Institutes der Universität Cagliari gesammelt wurden. Die Tiere wurden in Terrarien bei ca. 18°C Raumtemperatur, einer Luftfeuchtigkeit von 80% und einem Licht-Dunkelrhythmus von jeweils 12h gehalten. Die Fütterung erfolgte einmal wöchentlich mit Grillen. Die Experimente unterstanden der Kontrolle des Veterinäramtes des Landes Bremen, Deutschland und entsprachen den NIH Richtlinien.

Tab. 1: Liste der Versuchstiere in den verschiedenen Untersuchungen

Nachweismethode	Medulla oblongata		Tectum mesencephali	
GABA (Vibratom 25µm)	*Plethodon shermani*	n = 7*	*Plethodon shermani*	n = 6*
	Hydromantes genei	n = 2		
Glycin (Vibratom 25µm)	*Plethodon shermani*	n = 13*	*Plethodon shermani*	n = 13*
	Hydromantes genei	n = 2		
Kolokalisation	*Plethodon shermani*	n = 4	*Plethodon shermani*	n = 2
	Hydromantes genei	n = 2		
Kolokalisation mit Tracing	*Plethodon shermani*	n = 4	*Plethodon shermani*	n = 4
Elektronenmikroskopie			*Plethodon shermani*	n = 7
Gesamtuntersuchung	*Plethodon shermani*	n = 28	*Plethodon shermani*	n = 32
	Hydromantes genei	n = 6		

* Der Nachweis von GABA bzw. Glycin erfolgte sowohl bei der Untersuchung der Medulla als auch des Tectum an den gleichen Versuchstieren der Spezies *Plethodon shermani* (Doppelzählung).

2.2 Herstellung histologischer Präparate

Im Folgenden wird die Herstellung der einzelnen immunhistochemischen Präparate für die Untersuchungen der Medulla und des Mesencephalon, sofern nicht anders erwähnt, gemeinsam beschrieben. Methodische Unterschiede, die sich aufgrund der unterschiedlichen Fragestellungen in den verschiedenen Untersuchungsgebieten ergeben, werden gesondert dargestellt. Einen Überblick über die verschiedenen Untersuchungsmethoden bietet die folgende Tabelle 2.

Tab. 2: Liste der Untersuchungen in den verschiedenen Gebieten

Medulla oblongata	Tectum mesencephali	Ventrales Mesencephalon
GABA (Vibratom 25µm)	**GABA** (Vibratom 25µm)	**GABA** (Vibratom 25µm)
Glycin (Vibratom 25µm)	**Glycin** (Vibratom 25µm)	**Glycin** (Vibratom 25µm)
Kolokalisation	**Kolokalisation**	**Kolokalisation**
Kolokalisation mit Tracing	**Kolokalisation mit Tracing**	**Kolokalisation mit Tracing**
	Elektronenmikroskopie	

2.2.1 Narkotisierung

Alle Tiere wurden vor Beginn einer Tracerapplikation bzw. einer Perfusionsfixierung mit einer 2%igen in Leitungswasser verdünnten Tricain-Methansulfonatlösung (MS 222; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) für 20 bis 25 Minuten narkotisiert. Darüber hinaus wurden die Tiere während des operativen Eingriffes bei der Perfusion fortlaufend mit einem mit MS 222 getränktem Filterpapier betäubt, das kurz vor der Injektion der Kanüle in den Ventrikel entfernt wurde. Diese fortlaufende Narkotisierung gewährleistet eine ausreichende Betäubung während des gesamten operativen Eingriffes.

Während der Tracerapplikation wurden bei den Tieren zusätzlich die Narkotika Carbostesin (AstraZeneca, Cheshire, UK) oder Xylocain (AstraZeneca) lokal angewandt.

2.2.2 Tracerapplikation

Vorab wurde den Tieren zur Immobilisierung ca. 50-70µl 0,04%iges Pancuronium (ratiopharm, Ulm, D) subkutan gespritzt. Zur Untersuchung der ins Tectum projizierenden medullären Kerne erfolgte die Applikation des Tracers von dorsal, während bei der Untersuchung der Tectumneurone mit in die Medulla oblongata absteigenden Projektionen eine Tracerapplikation von ventral durchgeführt wurde. Zur gezielten Markierung der tectalen

Neuronentypen TO1 und TO4 contralateral und TO3 ipsilateral, wurden Tracerapplikationen in den ventromedialen Trakt durchgeführt. Eine Applikation in den ventrolateralen Trakt erfolgte, um die Neuronentypen TO2 und TO4 ipsilateral zu markieren.

2.2.2.1 Tracerapplikation von dorsal

Zunächst wurden die Tiere (n = 4) für den Eingriff vorbereitet. Hierzu wurde als erstes der Kopf mit einer Gipsmanschette stabilisiert und die Tiere in feuchte Tücher eingewickelt, um ein Austrocknen der Haut zu verhindern.

Vor Beginn der Operation wurde die Kopfhaut der Tiere für einige Minuten mit Xylocain eingerieben. Anschließend wurde die Kopfhaut seitlich aufgetrennt, zur Seite geklappt und mit einem Froschringer durchtränktem Tuch feucht gehalten. Die sich unter der Kopfhaut befindliche Muskulatur der Tiere wurde mit stumpfen, speziell umgebogenen Nadeln zur Seite geklemmt. Die Muskulatur wurde dadurch nicht verletzt, so dass die Tiere nach Wiedererlangen der Bewegungsfähigkeit keine Beeinträchtigung bei Kopfbewegungen erleiden mussten. Nach dem Öffnen der Schädeldecke wurden die Dura mater und die Leptomeningen über dem Tectum entfernt. Mit einer sehr spitzen Glaselektrode (Durchmesser: 1µm) wurden die Faserschichten des lateralen Tectum läsioniert, so dass besonders die Schichten 3–5 verletzt wurden, um eine Aufnahme des Tracers in die absteigenden Axone der tectalen Neurone zu gewährleisten. Für die Kolokalisationsstudien in Kombination mit Tracing wurde kristallines Biocytin (Sigma-Aldrich Corp.) auf die Verletzung aufgetragen. Die Applikation erfolgte bei einem Tier bilateral, um eine möglichst große Ausbeute an markierten Projektionsneuronen in der Medulla oblongata zu erzielen. Für eine differenziertere Untersuchung der ipsi- und contralateralen Projektionen wurde bei drei Tieren Biocytin unilateral appliziert.

Nach einer vollständigen Aufnahme des gesamten kristallinen Biocytins wurde die Schädeldecke wieder geschlossen und die Muskulaturklemmen entfernt. Anschließend wurde die Kopfhaut wieder über die Muskeln gedeckt und die Kopfmanschette gelöst. Die Tiere überlebten bis zur Perfusion in separaten Kleinstterrarien 22–24 Stunden.

2.2.2.2 Tracerapplikation von ventral

Zur Vorbereitung des operativen Eingriffes wurden die Tiere (n = 11) in feuchte Tücher gewickelt und die Maulöffnung einige Minuten mit Carbostesin lokal betäubt. Für den Eingriff von ventral, wurden die Tiere auf den Rücken gelegt und das Maul der Tiere mit stumpfen, speziell umgebogenen Nadeln geöffnet. Die Zunge wurde mit feuchten Tüchern

und Klemmen vorsichtig an den Unterkiefer der Tiere befestigt. Anschließend wurde die Mundschleimhaut einige Minuten mit Carbostesin lokal anästhesiert, die Zahnleiste der Tiere entfernt und die Gaumenplatte auf Höhe der Medulla oblongata geöffnet. Die Dura mater und die Leptomeningen oberhalb der Faserschichten der Medulla oblongata wurden entfernt. Anschließend wurde mit einer sehr spitzen Glaselektrode (Durchmesser: 1µm) an insgesamt 10 Tieren der ventromedial aufsteigende Trakt unilateral läsioniert. An einem Tier wurde zusätzlich der ventrolateral aufsteigende Trakt läsioniert. Kristallines Biocytin (Sigma-Aldrich Corp.) wurde auf die verletzten Schichten aufgetragen. Nach vollständiger Aufnahme des Tracers wurde der Gaumen wieder geschlossen, die Zungen- und Kieferklemmen entfernt und das Maul geschlossen. Die Tiere überlebten bis zur Perfusion in separaten Kleinstterrarien 22–24 Stunden.

2.2.3 Perfusionsfixierung

Für die transkardiale Perfusion wurde das Herz von ventral freigelegt und das Perikard geöffnet. Anschließend wurde eine Injektionsnadel in den Ventrikel gesetzt und die Vena cavae herznah durchtrennt. Das Blut wurde mit kaltem, oxygeniertem Ca^{2+}-freien Froschringer ausgespült. Danach wurde die Ringerlösung durch eine Fixanzlösung, bestehend aus Paraformaldehyd (PFA; Riedel-de-Haën, Seelze, D), Glutaraldehyd (GA; Sigma-Aldrich Corp.) und 0,1M Phosphatpuffer (PB; pH 7,4), ersetzt. Die Zusammensetzung des Fixanz variierte je nach der sich anschließenden Nachweismethode (Tab. 3). Die Einwirkungsdauer des Fixanz betrug je nach Größe des Versuchstieres zwischen 15 und 25 Minuten.

Anschließend erfolgte die Präparation des Gehirnes unter dem jeweiligen Fixanz. Hierbei wurden die Tiere zunächst dekapitiert, die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn freigelegt. Danach wurde der Kopf bei Raumtemperatur unter gleichmäßiger Bewegung der Fixanzlösung für 60 Minuten immersionsfixiert. Nach Entnahme des Gehirnes aus der Kopfschale wurde dieses im Falle der immunhistochemischen Einzel- und Kolokalisationsuntersuchungen über Nacht bei 4°C immersionsfixiert. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde das Hirn entlang der Mittellinie halbiert, um eine Unterscheidung der jeweils ipsi- bzw. contralateral zur Applikationsstelle gelegenen Gehirnhälfte zu gewährleisten. Die beiden Hirnhälften wurden getrennt voneinander über Nacht in PB bei 4°C aufbewahrt.

Tab. 3: Zusammensetzung der Fixanzien in den verschiedenen Untersuchungen

Nachweismethode	Fixanzzusammensetzung
GABA (Vibratom 25µm)	3% PFA + 2% GA
Glycin (Vibratom 25µm)	1% PFA + 2% GA
Kolokalisation	3% PFA + 2% GA
Kolokalisation mit Tracing	3% PFA + 2% GA
Elektronenmikroskopie	2% PFA + 1% GA

2.2.4 Herstellung von Vibratomschnitten

Sowohl in der Medulla als auch im Tectum wurde die Lokalisation und Verteilung von GABA und Glycin immunhistochemisch anhand von transversalen Vibratomschnitten untersucht. Hierzu wurde das Gehirn nach gründlichem Spülen in 0,05M TRIS-Natriummetabisulfit Puffer (TrisMBS; pH 7,5) in 4,5%igem Agar, gelöst in PB eingebettet. Nach dem Aushärten wurden mit dem Vibratom (Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, D) unter TrisMBS 25µm dicke Querschnitte angefertigt, die direkt auf Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgezogen wurden.

Die Anfertigung der für die EPON-Semidünn- bzw. –Ultradünnpräparat-Herstellung notwendigen 100µm bzw. 30µm dicken transversalen Vibratomschnitte erfolgte gleichermaßen. Diese Schnittpräparate wurden in Schraubdeckelgläschen gefüllt mit 0,05M Sodiumphosphatpuffer (PBS; pH 7,2) bzw. in PB aufgefangen. Zur Kontrolle des Biocytin-Tracings wurden einige 25µm dicke Schnitte des jeweiligen Untersuchungsgebietes und der dazugehörigen Applikationsstelle auf Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Biocytindetektion erfolgte wie unter 2.2.9 beschrieben mittels Avidin-Biotin-HRP-Komplexes.

2.2.5 Herstellung von EPON-Semidünnpräparaten

Die für die Kolokalisationsstudien in der Medulla und im Tectum sowie für die Herstellung von Ultradünnpräparaten für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen notwendige Einbettung der Gewebeschnitte in Kunstharz (EPON 812; Serva, Heidelberg, D) erfolgte im Wesentlichen nach der von Reichenberger (1997) beschriebenen Methode. Dazu wurden die 100µm dicken Vibratomschnitte zunächst dehydriert (80% Ethanol / 96% Ethanol / 100% Ethanol) und in EPON 812 überführt. Als Intermedium diente 100%iges Propylenoxid bzw.

Aceton. Die Überführung erfolgte über Nacht in einem Gemisch aus EPON 812 und Propylenoxid bzw. Aceton (1 + 1) bei Raumtemperatur. Nach Verdunsten des Propylenoxids bzw. Acetons erfolgte die Einbettung der Gewebeschnitte in frischem EPON 812 für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Das Kunstharz-Gemisch wurde zuvor aus 440ml Glycidether 100, 370ml DDSA (2-Dodecenylsuccinic-acid anhydride), 190ml MNA (Methylnadic anhydride) und 15ml DMP-30 (2,4,6 Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol) angesetzt. Zur Herstellung von dünnen EPON-Folien wurden die Schnitte einzeln auf mit Repelcoat (Dichlordimethylsilan; Merck, Whitehouse Station, NJ) beschichtete Objektträger aufgetragen und mit gleichartig beschichteten Deckgläschen in EPON 812 eingebettet. Die Folien wurden über Nacht im Wärmeschrank unter leichtem Druck auspolymerisiert.

Nach dem Aushärten wurden die Schnitte der rostralen und caudalen Medulla oblongata sowie die des zentralen und caudalen Tectum mesencephali aus den Folien ausgeschnitten und mit EPON 812 auf EPON-Blindblöcke aufgeklebt. Die EPON-Präparate wurden über Nacht im Wärmeschrank auspolymerisiert.

2.2.6 Vorbehandlung der EPON-Semidünnpräparate

Die 100µm dicken EPON-Präparate wurden am Ultramikrotom (Leica Vertrieb GmbH) auf 900nm Dicke geschnitten. Diese Semidünnschnitte wurden aufeinander folgend auf vier bis sechs (je nach Anzahl der Nachweise und Kontrollen) Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 40°C auf der Wärmeplatte für 45–60 Minuten angetrocknet.

Die EPON-Schnitte wurden zunächst mit einer Ätzlösung bestehend aus 200ml Methanol + 100ml Propylenoxid + 40g Kalilauge (KOH) für vier bis sieben Minuten behandelt, um ein Eindringen der im folgenden aufzutragenden Stoffe zu ermöglichen. Anschließend wurden die Schnitte mit 100% Methanol, Methanol + PBS (1 + 1) und reinem PBS für jeweils fünf Minuten gereinigt.
Für den GABA- und Glycinnachweis wurden im Anschluss daran die durch die Fixierung ins Gewebe eingetragenen, überschüssigen Aldehydgruppen mit 756mg Natriumborhydrid ($NaBH_4$; Merck) in 200ml PBS gelöst für 10 Minuten reduziert.

Die weitere immunhistochemische Aufarbeitung der EPON-Semidünnschnitte erfolgte im Falle der reinen Kolokalisation von Neurotransmittern mittels Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Methode) nach Hsu und Kollegen (1981; siehe 2.2.7). Die immunhistochemische Neurotransmitterdetektion an Biocytin behandeltem Gewebe, wie dies bei der

Kolokalisationsstudie in Kombination mit Tracing der Fall war, erfolgte mittels Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (PAP-Methode) nach Sternberger und Kollegen (1970; siehe 2.2.8).

2.2.7 Immunhistochemische Neurotransmitterdetektion mittels ABC-Methode

Für die Kolokalisationsstudie wurden alle Antikörper in PBS gelöst, während bei den Vibratomschnitten TrisMBS als Inkubationspuffer des Normalserums und des primären Antikörpers, Trispufferlösung mit Natriumchlorid (TBS; 0,05M, pH 7,6) für den sekundären Antikörper und PBS für den Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) verwendet wurde (Tab. 4).

Zur Blockierung unspezifischer Gewebeproteine wurde zunächst an allen Schnitten eine unspezifische Blockade mit 1,5%igem Normalserum (*Normal Goat Serum, NGS* bzw. *Normal Horse Serum, NHS*) durchgeführt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte für 1–2 Stunden bei Raumtemperatur (Tab. 4).

Im Anschluss an die Blockade erfolgte die Bindung des primären Antikörpers. Für den Nachweis der GABA- bzw. Glycin-Derivate wurde jeweils ein polyklonaler, primärer Antikörper aus dem Kaninchen verwendet, während der Nachweis der Glutamat-Derivate mittels eines monoklonalen, primären Antikörpers aus der Maus erfolgte. Entsprechend des jeweiligen Nachweises wurden die Schnitte in Anti-GABA-Immunglobulin G, Anti-Glycin-IgG oder Anti-Glutamat-IgG gelöst in TrisMBS unter Zugabe von 0,5% Normalserum und 0,5% Triton-X 100 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 4).

Nach gründlichem Spülen (3 x 10min) in Puffer wurden die Schnitte zur Ankopplung des sekundären Antikörpers in einer Lösung aus biotinyliertem *Goat* Anti-*Rabbit*-Immunglobulin G (*Goat* Anti-*Rabbit*-IgG, 0,5%) bzw. *Horse* Anti-*Mouse*-Immunglobulin G (*Horse* Anti-*Mouse*-IgG, 0,5%), 0,5%igem Normalserum und TBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 4).

Die Markierung des Komplexes aus primären und sekundären Antikörper erfolgte mittels 1%igem Avidin-Biotin-HRP-Komplexes (AB-HRP-Komplex) gelöst in PBS. Die Schnitte wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit diesem Merrettichperoxidase (HRP) enthaltenden Komplex behandelt (Tab. 4).

Zur Visualisierung der HRP wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Sigma-Aldrich Corp.) als Chromogen verwendet. Eine Präinkubation der Schnitte erfolgte in 0,025% DAB, gelöst in PB für 20 Minuten bei 4°C. Zur Intensivierung des Reaktionsproduktes wurden je 2ml Kobaltchlorid ($CoCl_2$; 1%) und Nickelsulfat ($NiSO_4$; 1%) zugegeben (nach Adams, 1981).

Die Chromogenbildung wurde durch Zugabe von 600µl 0,3%iger H_2O_2-Lösung gestartet. Sie erfolgte bei Raumtemperatur für fünf bis zehn Minuten (je nach Schwarzfärbung der Schnitte).

Anschließend wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol gereinigt und mit Eukitt eingedeckelt.

Tab. 4: Liste der Antikörper, Verdünnungen und lichtmikroskopischen Methoden

Art des Experimentes	Schneide-technik	Blockade-system	Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper	Detektions-system
Immunhisto-chemische Lokalisation	Vibratom 25µm	NGS; Rabbit-Kit, 1:600 in Tris-MBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)	Rabbit **Anti-GABA**; polyklonal, 1:2000 in Tris-MBS (*Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO*) Rabbit **Anti-Glycin**; polyklonal, 1:250 in Tris-MBS (*Chemicon International Inc., Temecula, CA*)	Goat Anti-Rabbit-IgG; biotinyliert, Rabbit-Kit, 1:200 in TBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)	ABC; Rabbit-Kit, 1:100 in PBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)
Kolokalisation	Ultramikrotom 900nm	NGS; Rabbit-Kit, 1:600 in Tris-MBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)	Rabbit **Anti-GABA**; polyklonal, 1:2000 in PBS (*Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO*) Rabbit **Anti-Glycin**; polyklonal, 1:250 in PBS (*Chemicon International Inc., Temecula, CA*)	Goat Anti-Rabbit-IgG; biotinyliert, Rabbit-Kit, 1:200 in PBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)	ABC; Rabbit-Kit, 1:100 in PBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)
		NHS; Mouse-Kit, 1:600 in PBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)	Mouse **Anti-Glutamat**; monoklonal, 1:10000 in PBS (*Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO*)	Horse Anti-Mouse-IgG; biotinyliert, Mouse-Kit, 1:200 in PBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)	ABC; Mouse-Kit, 1:100 in PBS (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA*)
Kolokalisation mit Tracing	Ultramikrotom 900nm	NSS; 1:600 in PBS (*DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, D*)	Rabbit **Anti-GABA**; polyklonal, 1:2000 in PBS (*Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO*) Rabbit **Anti-Glycin**; polyklonal, 1:250 in PBS (*Chemicon International Inc., Temecula, CA*)	Swine Anti-Rabbit-IgG; 1:40 in PBS (*DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, D*)	PAP-Rabbit; 1:300 in PBS (*DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, D*)
		NRS; 1:600 in PBS (*DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, D*)	Mouse **Anti-Glutamat**; monoklonal, 1:10000 in PBS (*Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO*)	Rabbit Anti-Mouse-IgG; 1:40 in PBS (*DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, D*)	PAP-Mouse; 1:300 in PBS (*DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, D*)

Tris- MBS: TRIS-Natriummetabisulfit Puffer, 0,05 M, pH 7,5; TBS: Tris Base mit Natriumchlorid, 0,05 M, pH 7,6 , PBS: Phosphatpuffer mit Natriumchlorid, 0,05 M, pH 7,2; für weitere Abkürzungen siehe Text.

2.2.8 Immunhistochemische Neurotransmitterdetektion mittels PAP-Methode

Die immunhistochemische Neurotransmitterdetektion von GABA, Glycin und Glutamat an einem zuvor mit Biocytin behandeltem Tier erfolgte mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP-Methode), während der Nachweis des Biocytins mittels AB-HRP-Komplexes erfolgte (siehe 2.2.9).

Für die immunhistochemische Aufarbeitung wurden alle Lösungen in PBS angesetzt. Zur Blockierung aller unspezifischen Gewebeproteine wurden die Schnitte in einer 1,5%igen Normalserum-Lösung (*Normal Swine Serum, NSS* bzw. *Normal Rabbit Serum, NRS*) für 60min bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 4). Anschließend wurden, wie unter 2.2.7 beschrieben, die primären Antikörperlösungen für den Nachweis von GABA, Glycin und Glutamat hergestellt und auf die Schnitte aufgetragen (Tab. 4). Die Inkubation erfolgte ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur.

Nach gründlichem Spülen (3 x 10min) in PBS wurden die Schnitte zur Bindung des sekundären Link-Antikörpers in einer Lösung aus *Swine* Anti-*Rabbit*-Immunglobulin *G* (*Swine* Anti-*Rabbit*-IgG) bzw. *Rabbit* Anti-*Mouse*-Immunglobulin G (*Rabbit* Anti-*Mouse*-IgG), 0,5%igem Normalserum und PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 4).

Anschließend wurde der Komplex aus primären und sekundären Antikörpern mit Peroxidase-Antiperoxidase-Reagenz (PAP-Reagenz) unter Zugabe von 0,5% Normalserum in PBS markiert (Tab. 4). Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Die anschließende Visualisierung der Peroxidase und die Entwässerung und Eindeckung der Schnitte erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben.

2.2.9 Biocytindetektion an EPON-Semidünnschnitten

Der Nachweis des im Gehirngewebe gebundenen Biocytins erfolgte mittels AB-HRP-Technik. Die Schnitte wurden zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5%iger H_2O_2-Lösung verdünnt in PB behandelt, um die endogene Gewebeperoxidase zu blocken. Nach gründlichem Spülen (3 x 10min) wurde der Avidin-Biotin-HRP-Komplex (AB-HRP-Komplex; Standard-Kit, 1:100, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Die Visualisierung des Avidin-Biotin-HRP-Komplexes, sowie die Entwässerung und Eindeckung der Schnitte erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben und wurde zusammen mit den Schnitten der immunhistochemischen Nachweise durchgeführt.

2.3 Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate

Bei der Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate erfolgte die immunhistochemische Neurotransmitterdetektion sowie der Nachweis des im Gehirn gebundenen Biocytins vor der Einbettung in Kunstharz EPON 812 (pre-embedding).

2.3.1 Herstellung immungolddoppelmarkierter EPON-Präparate

Die Nachweise wurden frei flottierend an den 30µm dicken Vibratomschnitten vorgenommen. Hierzu wurde zunächst eine Vorbehandlung der Schnitte durchgeführt. Die durch die Fixierung ins Gewebe eingetragenen, überschüssigen Aldehydgruppen wurden mit 0,1%iger Natriumborhydridlösung in PB reduziert (Tab. 5). Anschließend wurden die Schnitte mit 0,05%igem Triton X-100 in PB für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler permeabilisiert, um ein Eindringen der im folgenden aufzutragenden Antikörperseren und Goldkonjugate zu gewährleisten (Tab. 5). Zur Blockade unspezifischer Gewebeproteine wurden alle Schnitte in einer Lösung aus 1,5%igem *Normal Goat Serum* (NGS) in Rinder-Serum-Albumin-Puffer (0,1% BSA-c in PB) für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler behandelt (Tab. 5).

Im Anschluss an die Blockade wurde in einem ersten Detektierungsschritt das im Gehirngewebe gebundene Biocytin immungold markiert. Hierzu wurden die Schnitte in einer Lösung aus *Goat* Anti-Biotin-Immunglobulin G, welches mit einem sehr kleinen Goldpartikel (ultra small) konjugiert war, für ~ 40 Stunden bei 4°C frei flottierend behandelt (Tab. 5).

Nach ausgiebigen Spülen in BSA-c-Puffer erfolgte die immungoldhistochemische Neurotransmitterdetektion. Die Schnitte wurden je nach Nachweis des Transmitters mit *Rabbit* Anti-GABA, *Rabbit* Anti-Glycin oder *Rabbit* Anti-5-HT gelöst in BSA-c-Puffer für ~ 72 Stunden bei 4°C inkubiert (Tab. 5). Hierbei wurde jeweils ein Drittel der ipsi- bzw. contralateralen Tectumhälften für je einen der drei Neurotransmitternachweise verwendet.

Vor der Immungoldmarkierung der Neurotransmitterderivate erfolgte eine erste Silberverstärkung der *Goat* Anti-Biotin-Ultra-Small-Goldpartikel. Durch Anlagerung von Silberionen wird der Durchmesser der Ultra-Small-Goldpartikel gleichmäßig vergrößert, wodurch sie im Elektronenmikroskop deutlicher erkennbar werden. Für die Silberverstärkung

wurden die Schnitte ausgiebig in BSA-c-Puffer und anschließend nochmals in Enhancement Conditioning Solution (ECS-Puffer) gespült (Tab. 5). Die Silberverstärkung erfolgte mit einem speziellen Silberverstärkungssystem für die Elektronenmikroskopie (R-EM-Gent Kit) für 90 Minuten bei Raumtemperatur und völliger Dunkelheit auf dem Schüttler (Tab. 5). Anschließend wurde mit 0,03M Natrium-Thiosulfat-Lösung in ECS-Puffer das angelagerte Silber für 10 Minuten terminiert (Tab. 5). Dieser Schritt ermöglicht ein Anlagern der im Folgenden aufzutragenden goldmarkierten Antikörper an die sich bereits im Gewebe befindlichen primären Antikörper der Neurotransmitterdetektion.

Nach gründlichem Spülen und Rücküberführen in BSA-c-Puffer wurden die primären Antikörper mit goldmarkierten, sekundären Antikörpern detektiert. Hierzu wurden die Schnitte in einer Lösung aus einem *Goat* Anti-*Rabbit*-Immunglobulin G, welches mit einem sehr kleinen Goldpartikel (ultra small) konjugiert war, für ~ 45 Stunden bei 4°C inkubiert (Tab. 5). Diese Immungolddoppelmarkierung für Tracer und Neurotransmitter wurde nach ausgiebigem Spülen mit 2,5%igem Glutaraldehyd im Gewebe fixiert (Tab. 5).

Bei der sich anschließenden zweiten Silberverstärkung, durchgeführt mit R-EM-Gent Kit, wurden sowohl die Goldpartikel der sekundären Antikörper der Neurotransmitterdetektion als auch die bereits bei der ersten Silberverstärkung vergrößerten Goldpartikel der Biocytindetektion gleichmäßig im Durchmesser vergrößert, so dass letztere etwa doppelt so groß wurden wie die Goldpartikel der Neurotransmitterdetektion. Die Verstärkung erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur und völliger Dunkelheit auf dem Schüttler (Tab. 5).

Zur abschließenden Fixierung und Kontrastierung des Gewebes wurden die Schnitte in einer Lösung aus 1%igem Osmiumtetroxid postfixiert (Tab. 5). Die sich anschließende Entwässerung und Einbettung der Schnitte in EPON 812, sowie die Herstellung von EPON-Präparaten erfolgte nach der unter 2.2.5 beschriebenen Methode.

Tab. 5: Liste der Arbeitsschritte und Behandlungen der Immungoldmarkierungen

Arbeitsschritt	Behandlung	Dauer
Reduktion von Aldehydgruppen	0,1% Natriumborhydrid in PB (*Merck, Whitehouse Station, NJ*)	10min
Permeabilisierung	0,05% Triton X-100	45min
Blockade unspezifischer Gewebeproteine	1,5% NGS in BSA-c-Puffer (*Aurion, Wageningen, NL*)	60min
Immungoldmarkierung des Biocytins	Goat **Anti-Biotin**; ultra small goldkonjugiert, 1:100 in BSA-c-Puffer (*Aurion, Wageningen, NL*)	40 Std.
Reinigung	BSA-c-Puffer (6x10min) (*Aurion, Wageningen, NL*)	60min
Primärer Antikörper (Neurotransmitter)	Rabbit **Anti-GABA**; polyklonal, 1:2000 in BSA-c-Puffer (*Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO*)	72 Std.
	Rabbit **Anti-Glycin**; polyklonal, 1:250 in BSA-c-Puffer (*Chemicon International Inc., Temecula, CA*)	
	Rabbit **Anti-5-HT**; polyklonal, 1:2000 in BSA-c-Puffer (*Serotec Ltd., Oxford, UK*)	
Reinigung	BSA-c-Puffer (6x10min)	60min
	ECS-Puffer (4x10min) (*Aurion, Wageningen, NL*)	40min
1. Silberverstärkung (Biocytin)	R-EM-Gent-Kit bei RT und Dunkelheit (*Aurion, Wageningen, NL*)	90min
Silbertermination	0,03M Natrium-Thiosulfat in ECS-Puffer	10min
Reinigung	ECS-Puffer (3x10min)	30min
	BSA-c-Puffer (6x10min)	60min
Goldmarkierung (Neurotransmitter)	Goat Anti-Rabbit-IgG; ultra small goldkonjugiert, 1:50 in BSA-c-Puffer (*Aurion, Wageningen, NL*)	45 Std.
Reinigung	BSA-c-Puffer (6x10min)	60min
	PB (2x10min)	20min
Fixierung der Goldmarkierung	2,5% Glutaraldehyd in PB (*Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO*)	10min
2. Silberverstärkung	R-EM-Gent Kit bei RT und Dunkelheit (*Aurion, Wageningen, NL*)	60min
Fixierung und Kontrastierung	1% Osmiumtetroxid in PB (*Plano GmbH, Wetzlar, D*)	5min

2.3.2 Herstellung von Ultradünnpräparaten für die Elektronenmikroskopie

Nach dem Zutrimmen der EPON-Präparate wurden diese am Ultramikrotom auf 70nm Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden jeweils auf kohlebedampfte mit Pioloform-Folien beschichtete Schlitz- oder Maschen-Grids aus Nickel aufgezogen. Zur Kontrastverbesserung der Gewebestrukturen im Elektronenmikroskop wurden die Ultradünnpräparate mit Uranylacetat für 10 Minuten und anschließend mit Bleizitrat für max. 8 Minuten bei Raumtemperatur und völliger Dunkelheit zusätzlich kontrastiert.

2.4 Kontrollen zur Antikörperspezifität

Die Spezifität der primären Antikörper gegen GABA, Glycin und Glutamat wurde durch Adsorptions- und Kreuzreaktivitätstests mittels Aminosäure-Glutaraldehyd-Komplex nach Storm-Mathisen und Ottersen (1990) und Spirou und Berrebi (1997) an Hirngewebeschnitten von *Plethodon shermani* (n = 4) kontrolliert. Hierzu wurde ein immunhistochemischer Neurotransmitternachweis an 25µm dicken Vibratomschnitten durchgeführt, bei dem der primäre Antikörper zuvor mit dem jeweils entsprechenden Antigen adsorbiert oder mit einer anderen Aminosäure inkubiert wurde. Die Antikörperspezifität des primären Antikörpers gegen 5-HT (*Rabbit* Anti-5-HT, Serotec Ltd., Oxford, UK) wurde bereits von Dicke und Kollegen (1997) an Hirngewebe von *Plethodon shermani* getestet.

2.4.1 Adsorptionstest

Um die Spezifität eines Antikörpers auf das sich im Gewebe befindende entsprechende Antigen zu testen, wurde ein Adsorptionstest durchgeführt. Das Prinzip dieses Testes beruht auf der Annahme, dass ein zuvor vollständig mit seinem Antigen abgesättigter Antikörper nicht an entsprechende Antigenderivate im Gewebe binden kann.

Für die Adsorption der primären Antikörper gegen GABA, Glycin und Glutamat wurde zunächst eine Aminosäurelösung der jeweiligen Aminosäure in Aqua bidest. hergestellt. Die Konzentration der jeweiligen Aminosäurelösung war dabei abhängig von der Konzentration der entsprechenden Antikörperlösung und beruhte auf der Annahme, dass jeder Antikörper jeweils zwei Anti-Aminosäure-Bindungsdomänen besitzt. Um ein späteres Absättigen sämtlicher Anti-Aminosäure-Bindungsdomänen der Antikörperlösung zu gewährleisten,

wurde jeweils eine Aminosäurelösung hergestellt, die eine 10-fache Konzentration an Aminosäure (Antigen) besitzt.[1]

Zur Bildung des Aminosäure-Glutaraldehyd (GA)-Komplexes wurde der jeweiligen Aminosäurelösung Glutaraldehyd (GA) im Molverhältnis 1 : 2 dazugegeben und für 60 Minuten auf dem Schüttler vermischt. Überschüssiges GA wurde mit Ethanolaminhydrochlorid (1,0M) für 60 Minuten reduziert, um ein evtl. Verklumpen und dadurch Inaktivieren der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurde diesem Komplex die entsprechende Antikörperlösung im Verhältnis 4 : 1 zugegeben, d.h. zu 400µl Glycin-GA-Komplex wurden 100µl Anti-Glycin-Lösung (siehe 2.2.7) hinzugegeben. Die Konzentration an Aminosäure-GA-Komplex entsprach damit einer achtfachen Konzentration an Anti-Aminosäure-Bindungsdomänen, wodurch eine hinreichende Absättigung der Antikörper-Bindungsdomänen gewährleistet wurde. Mit den Antikörpern Anti-GABA und Anti-Glutamat wurde ebenso verfahren. Die Adsorption erfolgte über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Vibratomschnitte mit der Lösung aus den adsorbierten Antikörpern inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Vibratomschnitte erfolgte gemäß der unter 2.2.7 beschriebenen ABC-Methode.

2.4.2 Kreuzreaktivitätstest

Um eventuelle Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen niedermolekularen Neurotransmittern untereinander auszuschließen, wurden zusätzlich Kreuzreaktivitätstests durchgeführt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Annahme, dass die Bindungsfähigkeit eines zuvor mit einem unspezifischen Antigen inkubierten Antikörpers nicht durch das unspezifische Antigen beeinträchtigt wird, so dass der Antikörper an sein spezifisches Antigenderivat im Gewebe binden kann. Hierzu wurden die unter 2.4.1 hergestellten Aminosäure-GA-Komplexe mit den jeweils nicht entsprechenden Antikörperlösungen im Verhältnis 4 : 1 vermischt, d. h. zu jeweils 400µl GABA-GA-Komplex wurden je 100µl Anti-Glycin- oder Anti-Glutamat-Lösung (siehe 2.2.7) gegeben. Die Konzentration an

[1] Als Beispiel wird die Berechnung der Glycinlösung für die Absättigung des Anti-Glycin-Antikörpers aufgestellt. Die bei der immuhistologischen Neurotransmitterdetektion von Glycin verwendete Konzentration an Anti-Glycin-Antikörper betrug 1:250. Es wurde also eine 0,4%ige Antikörperlösung verwendet, bei der jeder Antikörper 2 Anti-Glycin-Bindungsdomänen besitzt. Eine 10-fache Anti-Glycin-Antikörperlösung, die also 2 x 10 Anti-Glycin-Bindungsdomänen besitzt, entspricht somit einer 8%igen Glycinlösung (20 x 0,4%). Entsprechend wurde eine 0,05%ige GABA- und eine 0,01%ige Glutamatlösung hergestellt.

Aminosäure-GA-Komplex entsprach damit einer achtfachen Konzentration an Anti-Aminosäure-Bindungsdomänen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Vibratomschnitte mit der Lösung aus diesen vorbehandelten Antikörpern inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Vibratom-Schnitte erfolgte gemäß der unter 2.2.7 beschriebenen ABC-Methode.

2.4.3 Negativkontrollen

Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurden zusätzlich Negativkontrollen für die lichtmikroskopische Neurotransmitterdetektion durchgeführt. Hierzu wurde während der jeweiligen Detektionsmethode der primäre oder sekundäre Antikörper durch den entsprechenden Inkubationspuffer ersetzt.

Ebenso wurden Negativkontrollen für die elektronenmikroskopische Biocytin- und Neurotransmitterdetektion durchgeführt. Hierbei wurde die Immungoldmarkierung des Biocytins kontrolliert, indem das Anti-Biotin-US-Gold-Konjugat durch BSA-c-Puffer ersetzt wurde. Die Neurotransmitterdetektion wurde getestet, indem anstelle des primären oder sekundären Antikörpers BSA-c-Puffer aufgetragen wurde (Teil-Negativkontrollen). An einigen Präparaten wurden gleichzeitig Negativkontrollen für die Biocytinmarkierung und für die Markierung der Neurotransmitter durchgeführt (Gesamt-Negativkontrolle).

2.5 Auswertung der Präparate

Alle immunhisto- und cytochemischen Präparate wurden qualitativ beschreibend ausgewertet. Hierbei wurde zunächst anhand anatomischer Landmarken das zu untersuchende Hirngebiet in unterschiedliche Zonen bzw. Schichten eingeteilt. Zur Erhebung von statistischen Daten wurden einige Schnittserien quantitativ im Hinblick auf die Anzahl immunpositiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ausgewertet (Medulla: *Plethodon*, n = 4, *Hydromantes*, n = 2; Tectum: *Plethodon*, n = 3 je Transmitter). Somata, deren Grauwert 25% oberhalb des Grauwertes von immunnegativen Zellen lag, wurden als immunpositiv definiert. Der Grenzwert wurde mit Photo-Paint 10.0 (Corel Corp., USA) ermittelt.

2.5.1 Auswertung der Vibratomschnitte

Zur Bestimmung der Lokalisation und Verteilung von GABA und Glycin in der Medulla und im Tectum wurden Schnittserien von aufeinanderfolgenden Vibratomschnitten lichtmikroskopisch ausgewertet. Bei der Erhebung der quantitativen Daten wurden die einzelnen Schnitte einer Serie am Axiophot (Carl Zeiss AG, Jena, D) mittels einer digitalen

CCD-Kamera (Carl Zeiss AG) und der Computersoftware Axiovision (Carl Zeiss AG) in den Computer eingelesen. Hierbei wurde jeweils die obere Zelllage in den Focus gebracht. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend ausgedruckt und mit Hilfe einer Camera lucida unter dem Lichtmikroskop mit dem mikroskopischen Abbild zur Deckung gebracht, um eine Einteilung in die verschiedenen Zonen der Medulla bzw. Schichten des Tectum vorzunehmen. Immunpositive Zellen einer Hälfte der Medulla bzw. des Tectum wurden anschließend per Hand ausgezählt. Zudem wurde bei jedem zehnten Schnitt die Zellzahl aller Somata der oberen Zelllage in der Zellschicht einer Hälfte der Medulla bzw. des Tectum anhand von digitalen Bildern lichtmikroskopischer Interferrenz-Aufnahmen mit Hilfe des Computerzeichenprogramms Corel Draw 10.0 (Corel Corp.) per Hand am Computer ausgezählt, bei denen ebenfalls zuvor die einzelnen Zonen bzw. Schichten eingetragen wurden.

Die so erhobenen Daten wurden anschließend mittels eines Tabellenkalkulationsprogramms (Microsoft Excel 2000, Microsoft Corp., USA) und eines statistischen Datenanalyseprogramms (SPSS 12.0, SPSS Inc., USA) ausgewertet. Hierbei wurden sowohl die interzonale bzw. -laminare als auch die intrazonale bzw. -laminare Häufigkeit immunpositiver Somata in den Zellkörperschichten der Medulla oblongata und des Tectum mesencephali ermittelt. Die interzonale bzw. interlaminare Häufigkeit gibt den prozentualen Anteil immunpositiver Zellen bezogen auf die gesamte Zellkörperschicht einer Hälfte des jeweiligen Hirngebietes an. Hingegen gibt die intrazonale bzw. intralaminare Häufigkeit den prozentualen Anteil immunpositiver Zellen bezogen auf die einzelnen Zonen der Medulla bzw. Schichten des Tectum der Zellkörperschicht einer Hälfte des jeweiligen Hirngebietes an. Sie ist somit ein Maß für die Dichte immunpositiver Zellen in den einzelnen Zonen der Medulla oblongata bzw. den zwei Zellkörperschichten des Tectum mesencephali.

2.5.2 Auswertung der Semidünnpräparate

Als erstes wurden mikroskopische Bilder von drei bis vier (je nach Anzahl der Nachweise) aufeinander folgenden Schnittpräparaten unter dem Axiophot bei 200facher Vergrößerung mittels einer CCD-Kamera und der Bildaufnahmesoftware Axiovision eingescannt. Anschließend wurde mittels Corel Draw 10.0 von der ersten eingescannten Bitmap jeder Schnittserie eine Umrisszeichnung des Schnittes angefertigt und alle immunpositiven und –negativen Zellen eingetragen, indem die Position der einzelnen Somata jeweils durch ein Kreuz markiert wurde. Die einzelnen Bitmaps der Serie wurden nacheinander auf die Zeichnung projiziert, zur Deckung gebracht und die verschiedenen Transmitter (GABA,

Glycin und Glutamat) sowie ihre Kolokalisationen durch Farbkodierung der Positionskreuze gekennzeichnet. Die Kolokalisationsgrafiken wurden anschließend per Hand ausgezählt und die inter- und intrazonalen bzw. –laminaren Häufigkeiten ermittelt.

Die Kolokalisationsuntersuchungen in Kombination mit Tracing wurden gleichermaßen ausgewertet. Anschließend wurde die Gesamtheit aller retrograd markierter Somata einer Kerngruppe der Medulla oblongata bzw. einer bestimmten Klasse von Tectumneuronen hinsichtlich ihres spezifischen Transmittergehaltes untersucht.

2.5.3 Statistische Auswertung

Im Anschluss an die quantitative Datenerhebung und Ermittlung der inter- und intrazonalen bzw. –laminaren Häufigkeiten wurde eine deskriptive statistische Analyse mit Hilfe des statistischen Datenanalysesystems **SPSS** (**S**tatistical **P**roduct and **S**ervice **S**olutions, SPSS Inc., USA) durchgeführt. Im Folgenden wird die Durchführung der einzelnen statistischen Analyseverfahren beschrieben.

2.5.3.1 Statistische Analyse der Verteilung GABAerger und glycinerger Somata

Die statistische Analyse zur Ermittlung signifikanter Unterschiede in den vier Longitudinalzonen der rostralen und caudalen Medulla bzw. in den beiden Zellkörperschichten des rostralen, zentralen und caudalen Tectum basiert auf der Anzahl immunpositiver Somata im Vergleich zur Anzahl immunnegativer Zellkörper. Ein Vergleich der individuellen Gebietsgrößen der vier Longitudinalzonen bzw. der beiden tectalen Zellkörperschichten zwischen den verschiedenen Versuchstieren, sowie die inter- und intrazonalen bzw. –laminaren Häufigkeiten wurde mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt (SPSS 12.0). Zur genaueren Bestimmung eines möglichen Tierfaktors, d.h. eines Unterschiedes hinsichtlich der einzelnen Individuen, bzw. eines zonalen/laminaren Unterschiedes wurde ein Post hoc Tukey Test durchgeführt (SPSS 12.0). Die Ermittlung signifikanter Unterschiede innerhalb einer Zone bzw. einer tectalen Zellkörperschicht hinsichtlich der rostralen und caudalen Medulla bzw. des rostralen, zentralen und caudalen Tectums erfolgte mittels Student's T-Test für unabhängige Stichproben (SPSS 12.0). Ebenso wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellkörperschichten des Tectum in den drei Bereichen mittels Student's T-Test für unabhängige Stichproben ermittelt (SPSS 12.0). Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn der *P*-Wert unter 0,05 lag. Ein *P*-Wert von höchstens 0,01 wurde als hoch signifikant unterschiedlich definiert.

2.5.3.2 Problematik der Mehrfachzählung von Zellen

Bei der quantitativen Datenerhebung der Kolokalisationen und der Untersuchung der Transmitterspezifität der Projektionsneurone ergibt sich aufgrund der Schnittdicke von 900nm das Problem einer ungewollten Mehrfachzählung von Zellen bei aufeinanderfolgenden Schnittserien. Die Abbildung 1 verdeutlicht die Problematik der ungewollten Mehrfachzählung für einen Transmitter. In der oberen Abbildung ist modellhaft ein Ausschnitt aus einem EPON-Gewebe-Präparat der Medulla von *Plethodon shermani* mit einer Breite und Dicke von je 50µm graphisch dargestellt. In diesem Gewebemodell befinden sich immunpositive (grau) und immunnegative (weiß) Zellkörper mit einem Durchmesser von 10-14µm, was einer mittleren Somagröße bei *Plethodon* entspricht (siehe 3.2.3). Motorneurone mit einer durchschnittlichen Somagröße von 18-24µm sind in dem Gewebemodell ebenso berücksichtigt (z. B. Zelle 5). Auf der rechten Seite des Gewebemodells ist die Schnittdicke der einzelnen transversalen Schnittserien dargestellt. Wie in der Abbildung 1 ersichtlich, ist die Entfernung der einzelnen Schnittserien ausschlaggebend für die Zusammensetzung der einzelnen Zellen im Querschnitt. Die untere Abbildung zeigt, dass bei einer Analyse der Schnittserien A und B die Zellen 1, 2, 3 und 5 mehrfach hinsichtlich ihrer Immunreaktivität für einen Transmitter ausgewertet werden, während die Zellen 4, 6, 7 und 8 nur einmal in den beiden Schnittserien ausgewertet werden. Aufgrund dieser ungewollten Mehrfachzählung ist eine standardisierte statistische Analyse der Kolokalisationen mittels Chi^2-Test nicht möglich.

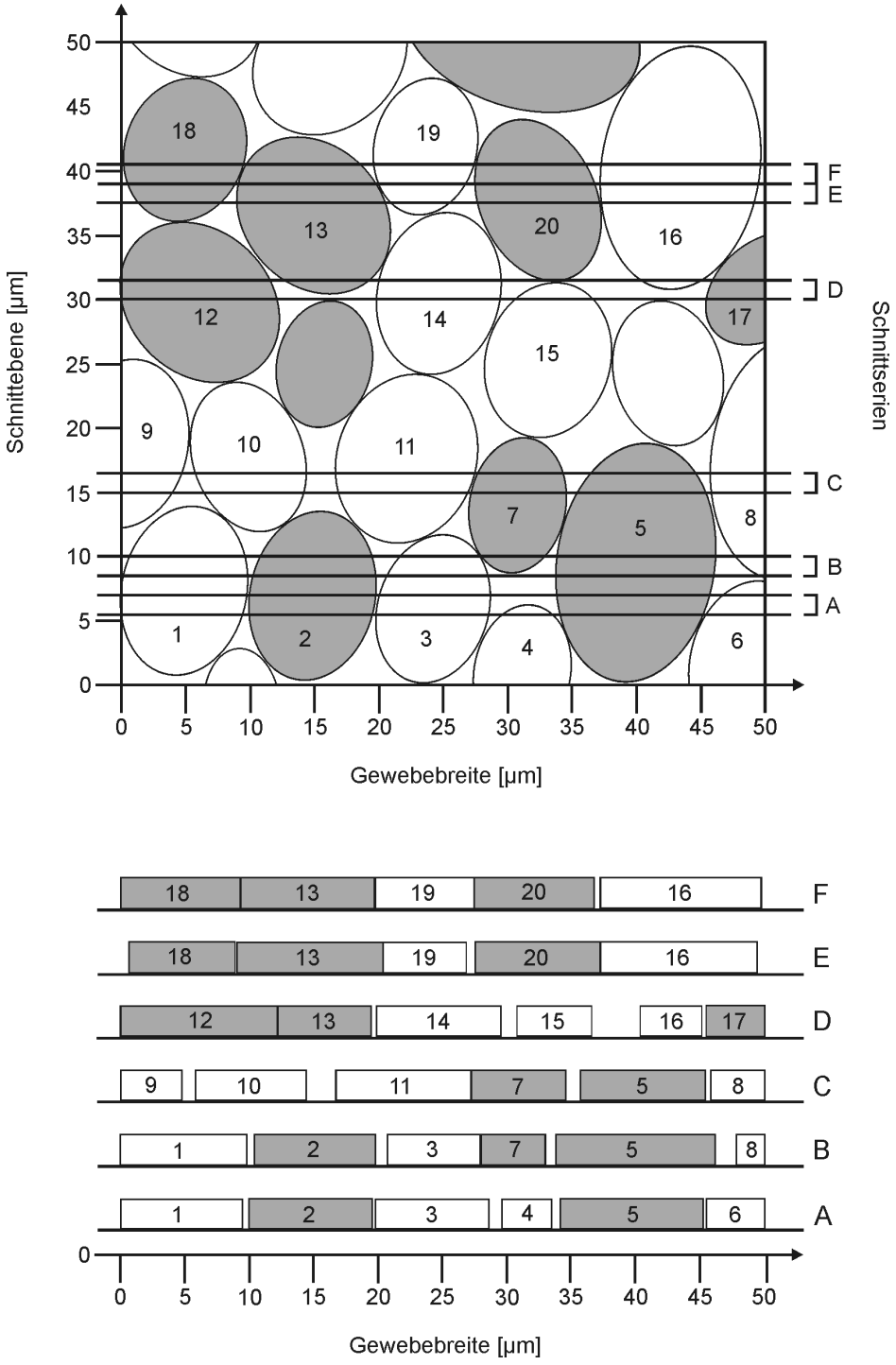


Abb. 1: Modell zum Problem der Mehrfachzählungen. Die obere Graphik zeigt das Modell eines Ausschnittes aus einem EPON-Gewebe-Präparat der Medulla oblongata von *Plethodon shermani* mit einer Breite und Dicke von je 50µm. Die ellyptischen Kreise symbolisieren die einzelnen zufällig verteilten immunpositiven (grau) und immunnegativen (weiß) Somata. Die untere Abbildung stellt die einzelnen Markierungen immunpositiver Somata im Semidünnschnitt und die resultierenden ungewollten Mehrfachzählungen der Somata dar.

Um das Problem der ungewollten Mehrfachzählung zu umgehen, bieten sich zwei verschiedene Möglichkeiten der weiteren Auswertung an. Zum einen ist es möglich, nur diejenigen Schnittserien für eine Ermittlung der mittleren inter- und intrazonalen bzw. –laminaren Häufigkeiten heranzuziehen, die zu keiner ungewollten Mehrfachzählung führen können, also mindestens 25µm voneinander entfernt sind, wie dies in dem oben beschriebenen Beispiel für die Schnittserien C und D zutrifft. Dies führt jedoch zu einem Verlust von ungefähr 70% aller möglichen Schnittserien und damit zu einem größeren Standardfehler der Mittelwerte. Um den Standardfehler des Mittelwertes möglichst gering halten zu können, also statistisch möglichst genaue Mittelwerte für die jeweiligen Häufigkeiten der einzelnen Kolokalisationen zu erzielen, ist es notwendig, möglichst viele Schnittserien in die Auswertung einzubeziehen. Hierfür ist eine Modellsimulation zur Ermittlung einer Korrekturformel für die Auftrittswahrscheinlichkeit des Merkmales einer Zelle notwendig.

2.5.3.3 Modellsimulation zur statistischen Analyse der Kolokalisationen

Die Programmierung zur Ermittlung einer Korrekturformel zum Ausgleich möglicher ungewollter Mehrfachzählungen wurde freundlicherweise von Herrn Dipl. Math. W. Wosniok durchgeführt. Hierbei wurde das oben beschriebene Gewebemodell am Computer simuliert und die Zellzusammensetzung des Gewebes randomisierend variiert. Anhand der einzelnen simulierten Gewebestücke wurde die Auftrittswahrscheinlichkeit der einzelnen Zellen in zufällig verteilten transversalen Schnittserien pro Durchlauf ermittelt. Insgesamt wurden 1000 Durchläufe am Computer simuliert. Anschließend wurde anhand der einzelnen Auftrittswahrscheinlichkeiten eine Korrekturformel zur Ermittlung eines Korrekturfaktors der Fallzahlen (= Anzahl der ermittelten Zellen) erstellt. Diese Korrekturformel ist abhängig vom jeweiligen Abstand [gemessen in µm] der Schnittserien zueinander und ist gültig für alle Schnittserien deren Abstand zwischen 0µm und 60µm beträgt. Sie lautet wie folgt:

$$k_i = 1/(1+EXP\ (-1{,}4\ -0{,}042*Abstand_i + 0{,}000323*Abstand_i^2))$$

Hierbei ergibt k_i den jeweiligen Korrekturfaktor für die einzelnen erhobenen Fallzahlen einer Schnittserie mit dem entsprechenden $Abstand_i$. Die ermittelten Korrekturfaktoren bei der Analyse der Kolokalisationen in der Medulla nahmen einen Wert zwischen 0,82 und 0,92 an. Das Mittel lag bei 0,835. Bei der Analyse der Kolokalisationen im Tectum wurden Korrekturfaktoren zwischen 0,82 und 0,93 ermittelt. Hier lag das Mittel bei 0,854.

Anschließend wurden die einzelnen Fallzahlen [r] der Zellen mit einer Einfach-, Ko- oder Dreifachlokalisation der Neurotransmitter bzw. der immunnegativen Zellen sowie die Summe aller Zellen [n] einer Schnittserie mit dem jeweiligen Korrekturfaktor multipliziert, wodurch die einzelnen Fallzahlen um etwa 10-20% verringert wurden. Diese Korrektur hat keine Auswirkung auf die Berechnung der inter- und intrazonalen bzw. –laminaren Häufigkeiten, da sowohl die Anzahl der einzelnen cytochemischen Zelltypen korrigiert wurde als auch die Anzahl (= Summe) aller Zellen. Bei der Berechnung des jeweiligen Vertrauensbereiches einer Auftrittswahrscheinlichkeit einer Einzel-, Ko- oder Dreifachlokalisation wurde aufgrund der Korrektur ein jeweils größerer Vertrauensbereich ermittelt. Bei der anschließenden statistischen Analyse der korrigierten Fallzahlen mittels Chi^2-Test wurde folglich der Vertrauensbereich der einzelnen cytochemischen Zelltypen erweitert, so dass es häufiger zu Überlappungen bei der Breite der Auftrittswahrscheinlichkeiten der einzelnen Neurotransmitter und ihrer Kolokalisationen kam. Dementsprechend gab es in der Medulla und im Tectum eine Vielzahl von Zelltypen, die sich in ihrer Auftrittswahrscheinlichkeit nicht signifikant unterschieden. Im Folgenden werden bei der Darstellung der Ergebnisse nur die korrigierten Fallzahlen bzw. Neuronenanzahlen und ihre jeweilige prozentuale Häufigkeit angegeben.

2.5.4 Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate

Vorab wurden die für die Elektronenmikroskopie angefertigten 30µm dicken immungolddoppelmarkierten Präparate lichtmikroskopisch hinsichtlich der Qualität ihrer immunhistochemischen Anfärbung untersucht.

Die immungolddoppelmarkierten Ultradünnschnittpräparate wurden unter dem Elektronenmikroskop EM 420 (Philips, Eindhoven, NL) bei 120kV hinsichtlich ihrer Immungoldmarkierung ausgewertet. Dabei wurden die Körnergröße der jeweiligen Goldpartikel bestimmt. Bei insgesamt 2 Tieren erfolgte eine genauere Untersuchung der Ultradünnschnittpräparate. Hierbei wurden die tectalen Schichten der immungoldmarkierten neurotransmitterspezifischen Fasern bestimmt. Ebenso wurde – soweit möglich – der Verlauf Biocytin haltiger Fasern im elektronenmikroskopischen Bild untersucht. Synaptische Kontakte zwischen Biocytin haltigen Fasern und neurotransmitterspezifischen Fasern, sowie zwischen Biocytin haltigen Fasern bzw. neurotransmitterspezifisch markierten Fasern und unmarkierten Fasern und Biocytin haltigen Fasern bzw. neurotransmitterspezifischen Fasern untereinander wurden hinsichtlich ihrer subzellulären Strukturen (Axon, Dendrit etc.) bestimmt und im Hinblick auf die tectalen Faserschichten beschrieben. Zur Dokumentation

wurde eine Reihe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen synaptischer Kontakte zwischen markierten bzw. unmarkierten Fasern fotografiert, anhand derer die Größe und Art des synaptischen Kontaktes bestimmt wurde. Die einzelnen elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in den Computer eingelesen. Zur detailgenauen Rekonstruktion der einzelnen subzellulären Strukturen wurde von jeder Bitmap mittels Corel Draw 10.0 eine Umrisszeichnung der einzelnen subzellulären Strukturen angefertigt und die synaptischen Kontakte zwischen den verschiedenen immungoldmarkierten bzw. unmarkierten Fasern eingetragen.

Zur Beschreibung der unterschiedlichen Terminalien im Tectum mesencephali von Amphibien wurde die Nomenklatur von Székely und Lázár (1976) verwendet und entsprechend der eigenen Daten erweitert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Spezifität der Antikörper und der Detektierungssysteme

Alle Antikörper zeigten eine hohe Bindungsspezifität für ihr jeweiliges Antigen getestet an Hirngewebe von *Plethodon shermani*. Hierfür sprechen folgende Befunde:

1) Es wurden keine Markierungen für GABA, Glycin und Glutamat im Adsorptionstest nachgewiesen. Während die drei verschiedenen Antikörper bei der Immunfärbung jeweils ein spezifisches Verteilungsmuster von immunpositiven Somata im Hirngewebe von *Plethodon* zeigten (Abb. 2A-C, linke Seite), wurden im Test keine Markierungen an entsprechenden Hirnschnitten nach der Absättigung der Antikörper mit ihrem jeweiligen Antigen-GA-Komplex nachgewiesen (Abb. 2A-C, rechte Seite).

2) Bei den Kreuzreaktivitätstests wurden alle Schnitte spezifisch markiert, d.h. Schnitte, die mit Anti-GABA, welches zuvor mit Glycin- bzw. Glutamat-GA-Komplex abgesättigt wurde, behandelt wurden, zeigten eine typische Markierung der Verteilung GABAerger Somata und Fasern im Hirngewebe von *Plethodon* (Abb. 2D). Eine ebensolche Antikörper spezifische Markierung zeigten auch die Kreuzreaktivitätstests für Anti-Glycin (Abb. 2E) und Anti-Glutamat.

3) Alle Negativkontrollen an Hirngewebe von *Plethodon* waren unmarkiert. Demzufolge waren die verwendeten Detektierungssysteme für die einzelnen immunhistochemischen Nachweismethoden sehr spezifisch.

4) Die Gesamt-Negativkontrollen der Immungolddoppelmarkierung an Ultradünnschnitten von *Plethodon* zeigten keine Goldpartikel unter dem Elektronenmikroskop. Die Teil-Negativkontrollen, bei denen entweder die Goldmarkierung des Biocytins oder die immunhistochemische Goldmarkierung der Neurotransmitter getestet wurden, zeigten nur die entsprechende Einzelmarkierung des jeweils vollständig durchgeführten Nachweises.

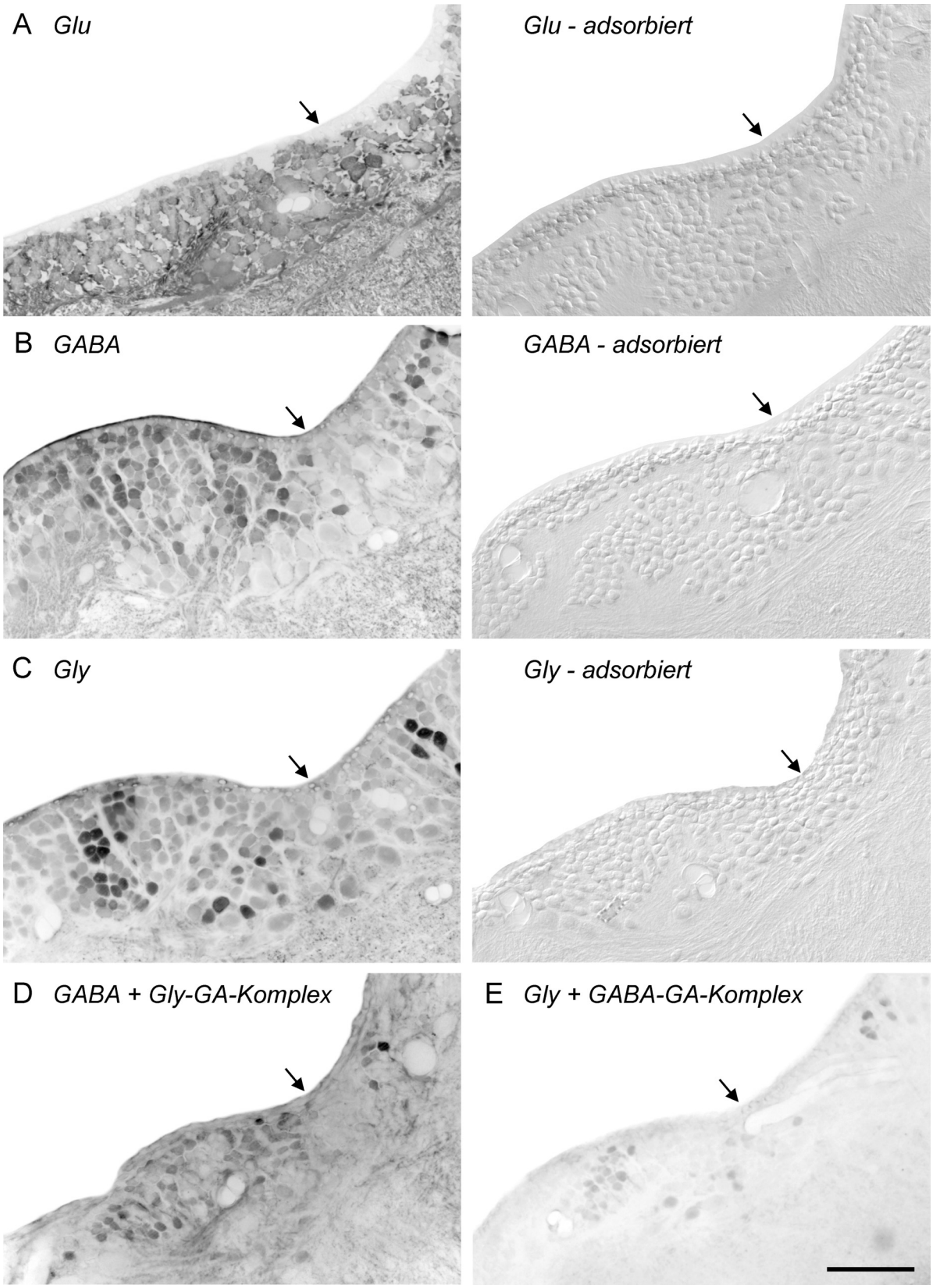


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahmen der gleichen Region in der rostralen Medulla zur Darstellung der Antikörperspezifität gegen Glutamat, GABA und Glycin in der nicht adsorbierten (**A-C**, linke Seite) und adsorbierten (**A-C**, rechte Seite) Bedingung. **D:** Die Markierung für GABA ist kreuzadsorbiert gegen Glycin und zeigt das gleiche Markierungsmuster wie in der nicht adsorbierten Bedingung. **E:** Die Markierung für Glycin nach einer Kreuzadsorbtion mit GABA demonstriert das gleiche Markierungsmuster wie in der nicht adsorbierten Bedingung. Die Pfeile zeigen auf den Sulcus limitans of His. Medial ist links, dorsal ist oben. Vergrößerungsbalken = 100µm in E bezieht sich auf A-E.

3.2 Konnektivität und cytochemische Organisation der Medulla

Die Anatomie der Medulla und die immunhistochemischen Daten der Neurotransmitter GABA, Glycin und Glutamat in der Medulla oblongata von *Plethodon shermani* und *Hydromantes genei* sind sehr ähnlich, obwohl diese beiden Arten zwei verschiedenen Gattungsgruppen angehören und sich hinsichtlich ihres Beutefangverhaltens unterscheiden. Aus diesem Grund werden die anatomischen und immunhistochemischen Ergebnisse sowie die statistisch ermittelten Daten nur für *Plethodon shermani* dargestellt. Unterschiede zwischen den beiden Spezies werden im Text erläutert.

3.2.1 Longitudinalzonen der Medulla oblongata

Bei Salamandern der Familie Plethodontidae lässt sich die Medulla oblongata entlang der Längsachse in eine rostrale und eine caudale Medulla einteilen. Die rostrale Medulla erstreckt sich von der Höhe des Eintrittes des V. Kranialnerven bis zur Höhe des Eintrittes des IX. Hirnnerven. Im Anschluss daran erstreckt sich die caudale Medulla bis zum Obex (Abb. 3).

In *Plethodon shermani* wie auch in allen anderen Salamanderspezies lässt sich die Medulla oblongata anhand anatomischer Landmarken in vier verschiedene longitudinale Zonen einteilen (Abb. 3). Die mediane Zone (mn) erstreckt sich entlang der Mittellinie und ist charakterisiert durch die serotonergen Nuclei raphes (Dicke et al., 1997). Lateral hierzu liegt die mediale Zone (ml), welche durch den Sulcus limitans of His von der lateralen Zone (la) getrennt wird. Letztere wird wiederum durch den Fasciculus solitarius von der dorsalen Zone (do) getrennt.

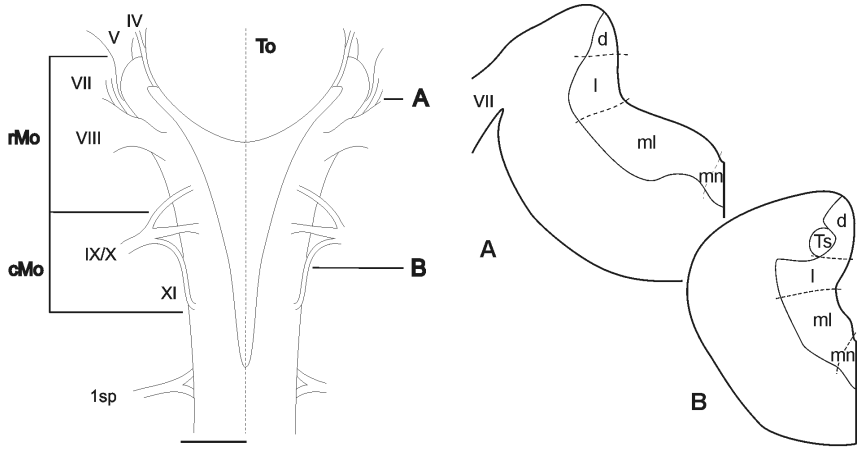


Abb. 3: Schematisches Diagramm der gesamten Medulla oblongata und von Querschnitten einer Hemisphäre zur Darstellung der Untergliederung in die Longitudinalzonen. **A:** Rostrale Medulla auf Höhe des Eintrittes des VII. Kranialnerven (VII). **B:** Caudale Medulla zwischen dem Eintritt des X. und des XI. Kranialnerven. mn = median; ml = medial; l = lateral; d = dorsal; Ts = Tractus solitarius. Maßstab entspricht 500µm.

Die Medulla oblongata besteht aus einer dicken periventrikulären Zellkörperschicht und einer Faserschicht. Nur wenige Zellen sind in die Faserschicht migriert. In *Plethodon shermani* wurden mittels einer Klüver-Barrera-Anfärbung in der rostralen Medulla oblongata 279 migrierte Zellen lokalisiert und in der caudalen Medulla 631 Zellen. Somit wurden rund 910 Somata in einer migrierten Position lokalisiert.

Eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Untersuchung der Gebietsgröße der einzelnen Longitudinalzonen zwischen den Individuen und den Geschlechtern beider Arten. Es gab also keinen spezifischen Tiereffekt hinsichtlich der Gebietsgröße der Longitudinalzonen.

Bei beiden Spezies ist die mediane Zone die kleinste Longitudinalzone der Medulla. Sie umfasst in etwa 5% aller Somata in der periventrikulären Zellkörperschicht (Abb. 4). Die sich anschließende mediale Zone hingegen umfasst in der rostralen Medulla rund 59% aller Somata der Zellkörperschicht und in der caudalen Medulla 47% aller Zellkörper (Abb. 4). Sie ist demzufolge die größte Longitudinalzone der Medulla oblongata. In der lateralen Zone nimmt die Größe der Zellkörperschicht von 24% aller Somata in der rostralen Medulla auf 29% in der caudalen Medulla zu (Abb. 4). Ebenso ist eine Zunahme in der Gebietsgröße der dorsalen Zone von rostral 13% auf caudal 19% aller Zellkörper zu verzeichnen (Abb. 4).

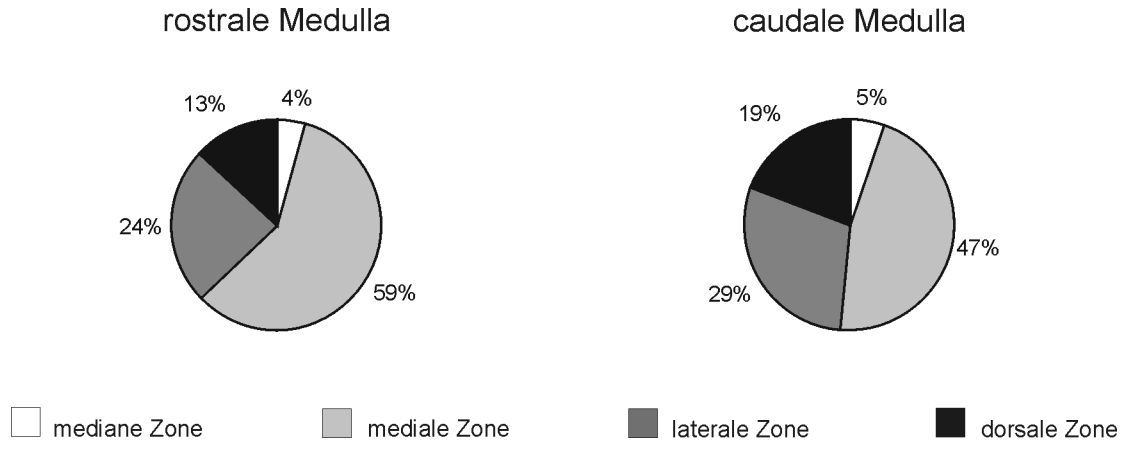


Abb. 4: Prozentuale Darstellung der Gebietsgröße der vier Longitudinalzonen in der rostralen und caudalen Medulla oblongata gemittelt über alle Versuchstiere.

3.2.2 Verteilung von GABA und Glycin in der Medulla oblongata

Die rostrocaudale Ausdehnung der Medulla oblongata aller Versuchstiere variierte zwischen 1600 und 2000µm in *Plethodon shermani* und betrug 2000 bis 2600µm für Tiere der Spezies *Hydromantes genei*. Im Gewebeschnitt betrug die gemittelte Gesamtzellzahl der Neurone pro Zellebene in einer Hälfte der rostralen Medulla 505 (Standardfehler [SF] ± 35) Somata in *Plethodon* und 591 (SF ± 31) Zellen in *Hydromantes.* In der caudalen Medulla wurden im Schnitt 420 (SF ± 21) Somata bei *Plethodon* und 416 (SF ± 11) Zellen bei *Hydromantes* gezählt. Die gemittelte Gesamtzellzahl aller Neurone in einer Hälfte der gesamten Medulla oblongata betrug rund 28700 (SF ± 3200) in *Plethodon* und rund 39600 (SF ± 2400) in *Hydromantes*. Die gesamte Medulla oblongata von *Hydromantes* enthielt also rund 30% mehr Neurone als die Medulla von *Plethodon.*

Bei beiden Spezies unterschieden sich die rostrale und die caudale Medulla oblongata nicht hinsichtlich der Gesamthäufigkeit GABAerger Neurone. Die gemittelte Gesamthäufigkeit GABAerger Somata betrug rund 23% bei *Plethodon shermani* (Tab. 6) und 25% bei *Hydromantes genei*. Die Gesamtzellzahl glycinerger Neurone in der Medulla nahm nach caudal zu. Bei *Plethodon* waren im Mittel 11% (SF ± 1,01) aller Neurone in der rostralen Medulla glycinerg, wohingegen in der caudalen Medulla bis zu 19% (SF ± 3,06) aller Zellen immunpositiv für Glycin waren. Bei *Hydromantes* nahm die Gesamthäufigkeit glycinerger Neurone von rostral 14% (SF ± 1,16) auf caudal 17% (SF ± 5,09) zu.

Tab. 6: Mittlere Zellzahl und prozentualer Anteil GABAerger Somata in der Medulla

Zone		median	medial	lateral	dorsal	Medulla
rostral	n	87	1928	612	331	2958
	%	0,7	14,5	3,9	2,4	22,8
	SF	0,07	0,58	0,24	0,15	3,59
caudal	n	75	797	660	368	1899
	%	0,9	10,1	8,3	4,4	22,3
	SF	0,09	0,48	0,36	0,22	2,51

Die Zellzahlen geben die mittlere Gesamtzellzahl GABAerger Somata gemittelt über alle Versuchstiere in den einzelnen Longitudinalzonen sowie der gesamten rostralen bzw. caudalen Medulla bei *Plethodon* an. Die Prozentwerte zeigen den prozentualen Anteil GABAerger Somata bezogen auf die mittlere Gesamtzellzahl aller Somata der Medulla oblongata (interzonale Häufigkeit). SF gibt den Standardfehler des mittleren prozentualen Anteils an.

Die Mehrheit aller immunpositiver Somata wurde innerhalb der periventrikulären Zellkörperschicht lokalisiert. In der Faserschicht der Medulla oblongata wurden von rostral nach caudal im Mittel 89 GABAerge und 185 glycinerge Somata in *Plethodon* lokalisiert. Bei *Hydromantes* hingegen wurden 17 GABAerge Neurone in der Faserschicht detektiert.

Die interzonalen Häufigkeiten beider Neurotransmitter, also das Verhältnis immunreaktiver Somata einer Longitudinalzone zur Gesamtzellzahl aller Somata der periventrikulären Zellkörperschicht einer Hälfte der Medulla, unterschieden sich deutlich innerhalb der rostrocaudalen Ausdehnung der Medulla oblongata. (Abb. 5A, C). In der rostralen Medulla, wurden die meisten immunreaktiven Somata in der medialen Zone gefunden. Bei *Plethodon* betrug die interzonale Häufigkeit GABAerger Neurone in diesem Gebiet im Mittel 15% (Tab. 6), glycinerge Somata wurden mit einer mittleren Häufigkeit von 9% (SF ± 0,24) nachgewiesen. In den anderen drei Longitudinalzonen wurden weniger als 5% GABA- und glycinerger Somata detektiert. Dem entgegen wurden in allen vier Longitudinalzonen der caudalen Medulla für beide Transmitter interzonale Häufigkeiten von maximal 10% ermittelt.

Ein Vergleich zwischen den intrazonalen Häufigkeiten immunmarkierter Zellen, die das Verhältnis immunreaktiver Somata zur Anzahl aller Somata innerhalb einer Longitudinalzone angeben, zeigt eine differenziertere Verteilung GABA- und glycinerger Somata in den einzelnen Zonen (Abb. 5B, D). In der rostralen Medulla oblongata ist die Dichte immunpositiver Zellen in der medialen Zone am höchsten, gefolgt von der lateralen und dorsalen Zone. In der medianen Zone hingegen variiert die intrazonale Häufigkeit sehr stark. In der caudalen Medulla ist die intrazonale Häufigkeit für GABAerge Somata in der lateralen und dorsalen Zone weitaus höher als in der medialen und medianen Zone (Abb. 5B). Dem entgegen sind die intrazonalen Häufigkeiten glycinerger Somata in der lateralen und medialen Zone am höchsten, gefolgt von der dorsalen Zone (Abb. 5D). In der medianen Zone lassen sich nahezu keine glycinergen Neurone nachweisen.

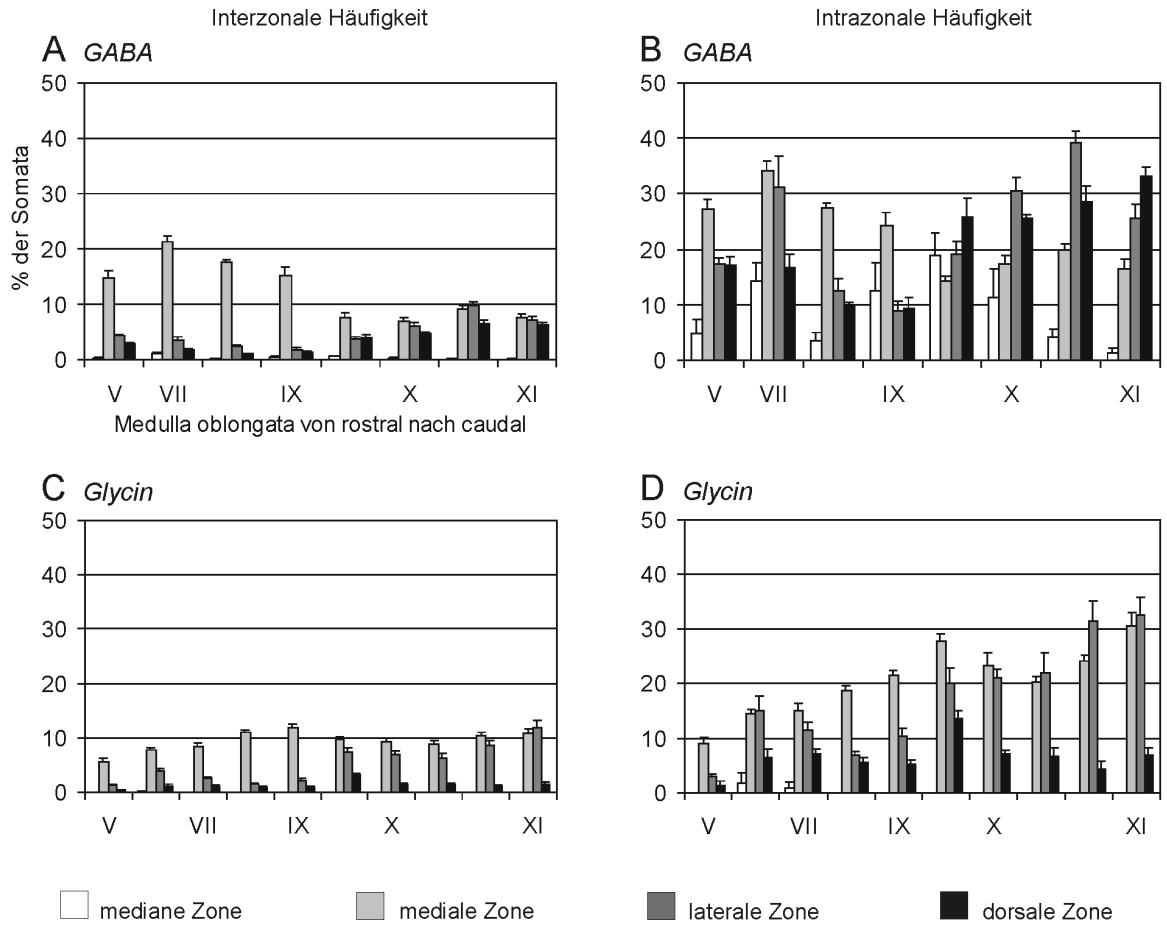


Abb. 5: Mittlere interzonale (**A, C**) und mittlere intrazonale Häufigkeit (**B, D**) von GABA und Glycin immunreaktiven Somata in einem Individuum von *Plethodon shermani*. Jede Kolumne repräsentiert 1) Zellzählungen über eine Distanz von 200µm in einer Hälfte der Medulla oblongata, 2) im Fall der interzonalen Häufigkeiten die Anzahl der markierten Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der gesamten Zellzahl und 3) im Fall der intrazonalen Häufigkeiten die Anzahl markierter Neurone bezogen auf die Gesamtzellzahl innerhalb der gleichen Zone. Die römischen Zahlen zeigen den Eintritt der Kranialnerven V-XI an; vertikale Balken geben den Standardfehler an.

Im Folgenden wird die über alle Versuchstiere gemittelte intrazonale Häufigkeitsverteilung GABA- und glycinerger Somata in den einzelnen Zonen entlang der rostrocaudalen Ausdehnung der Medulla oblongata dargestellt. Einzelbeispiele von Versuchstieren sind in den Abbildungen 5 bis 7 gegeben.

In der medianen Zone der Medulla nahm die intrazonale Häufigkeit GABAerger Somata von rostral 13% (SF ± 1,46) auf caudal 16% (SF ± 1,47) unregelmäßig zu (Abb. 5B, 6). Glycinerge Zellkörper hingegen wurden nur sehr vereinzelt (weniger als 1%) in der medianen Zone gefunden. Beide Neurotransmitter waren gleichmäßig in dieser Zone verteilt (Abb. 6).

In der medialen Zone der Medulla war eine Häufigkeitsabnahme GABAerger Somata von rostral 25% (SF ± 1,05) auf caudal 22% (SF ± 0,96) zu verzeichnen (Abb. 5B, 6). Diese

GABAergen Zellen lagen vorwiegend ventrikelnah unterhalb der Ependymzellschicht (Abb. 6, 7A). Dem entgegen nahm die mittlere intrazonale Häufigkeit glycinerger Zellen in der medialen Zone von rostral 16% (SF ± 0,46) auf caudal 18% (SF ± 0,54) zu (Abb. 5D). Diese glycinergen Zellen wurden in der rostralen Medulla oblongata in zwei Zellklustern, einem medialen und einem lateralen Kluster, lokalisiert, während sie in der caudalen Medulla gleichmäßig im ventralen Bereich der Zellkörperschicht verteilt vorkamen (Abb. 6, 7B, D).

In der lateralen Zone der Medulla oblongata wurde für beide Transmitter eine Häufigkeitszunahme nach caudal ermittelt. Die gemittelte intrazonale Häufigkeit GABAerger Neurone nahm von rostral 17% (SF ± 1,03) auf caudal 30% (SF ± 1,35) zu (Abb. 5B). Für glycinerge Neurone wurde eine Zunahme der intrazonalen Häufigkeit von rostral 11% (SF ± 0,52) auf caudal 22% (SF ± 0,62) ermittelt (Abb. 5D). Während GABAerge Somata gleichmäßig verteilt im periventrikulären Bereich der Zellkörperschicht der gesamten Medulla vorkamen, wurden glycinerge Neurone in der rostralen Medulla innerhalb eines Zellklusters lokalisiert (Abb. 6, 7A-D).

In der rostralen dorsalen Zone ließen sich im Mittel 19% (SF ± 1,06) GABAerge und 9% (SF ± 1,06) glycinerge Zellen detektieren (Abb. 5B, D, 6). Während die intrazonale Häufigkeit GABAerger Zellen in der caudalen dorsalen Zone bis zu 25% (SF ± 1,26) zunahm, blieb die Anzahl glycinerger Somata in dieser Zone konstant (Abb. 5B, D). Zellen mit diesen Neurotransmittern waren in der gesamten dorsalen Zone gleichmäßig innerhalb der Zellkörperschicht verteilt (Abb. 6, 7A-D).

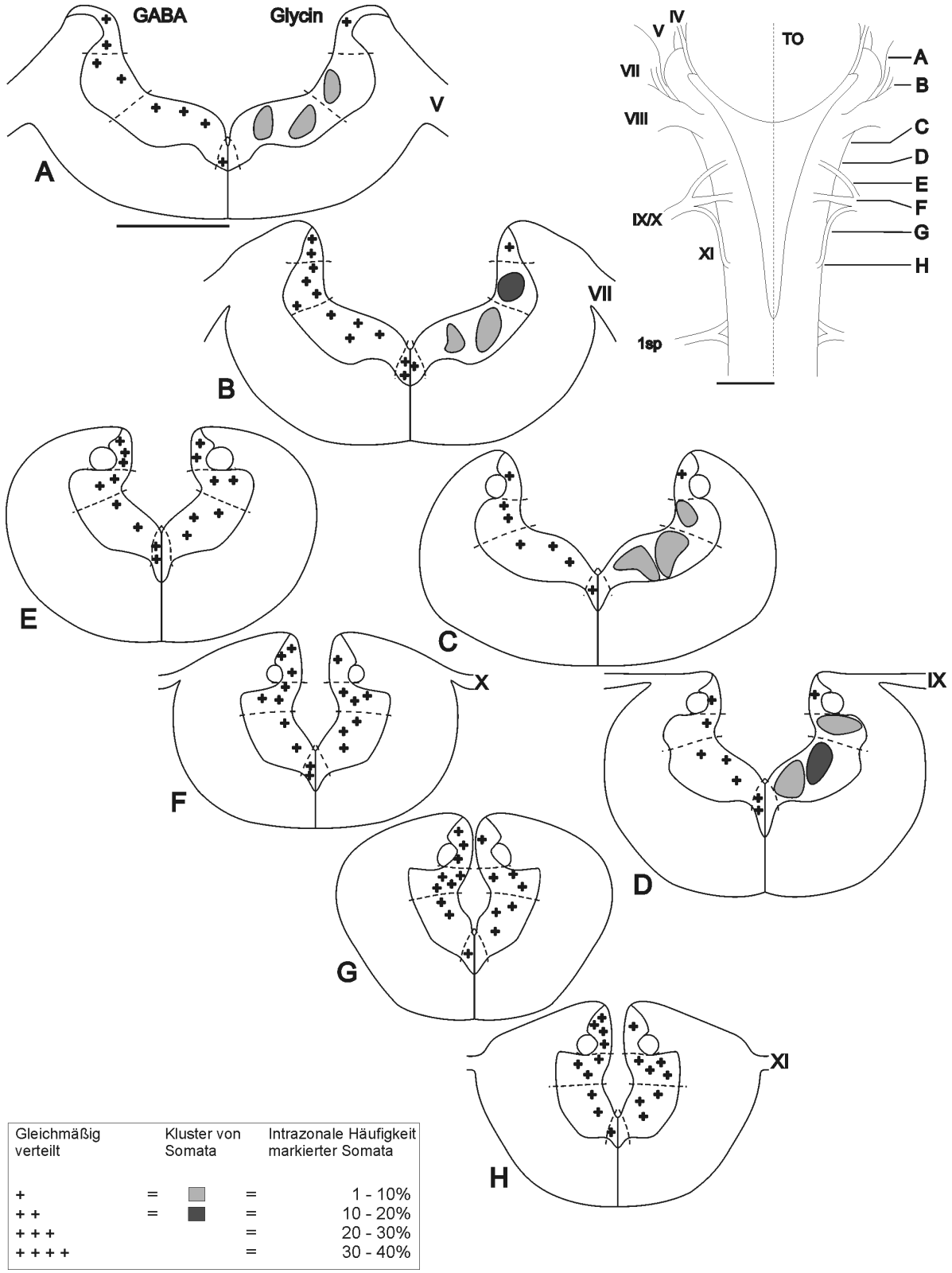


Abb. 6: Die schematischen Zeichnungen transversaler Schnitte durch die Medulla oblongata (**A-H**) von *Plethodon shermani* (linke und rechte Seite kombiniert von zwei Individuen) illustrieren die intrazonalen Häufigkeiten GABAerger (links) und glycinerger (rechts) Somata in der Zellkörperschicht. Die jeweilige Schnittebene wird durch die schematische Darstellung des Hirnstammes von dorsal angezeigt. Die römischen Zahlen geben die Kranialnerven an; gestrichelte Linien zeigen die Grenze zwischen den Longitudinalzonen; die ungefüllten Kreise begrenzen den Tractus solitarius (**C-H**). TO = Tectum opticum. Maßstab entspricht 500µm.

3.2.3 Größe und Verteilung der Somata immunpositiver und -negativer Zellen

Die Somata immunpositiver Neurone hatten im Mittel einen Durchmesser von 10x14µm in *Plethodon shermani* und 15x18µm in *Hydromantes genei*. Gleichmäßig verteilte immunnegative Zellen in der periventrikulären Zellkörperschicht hatten häufig die gleiche Somagröße wie die immunpositiven Zellen. Häufig wurden immunnegative Zellen jedoch in Zellklustern in der medialen und lateralen Zone lokalisiert. Diese Zellen hatten einen mittleren Durchmesser von 18x24µm in *Plethodon shermani* und 21x30µm in *Hydromantes genei*; sie hatten also deutlich größere Somata als GABAerge und glycinerge Zellen. Vermutlich handelt es sich bei diesen immunnegativen Zellen um Motorneurone der Kranialnerven. Die Mehrheit aller Ependymzellen der Medulla war immunnegativ für GABA und Glycin. Nur vereinzelt wurden in der caudalen medianen Zone für GABA immunhistochemisch markierte Ependymzellen gefunden (Abb. 7C).

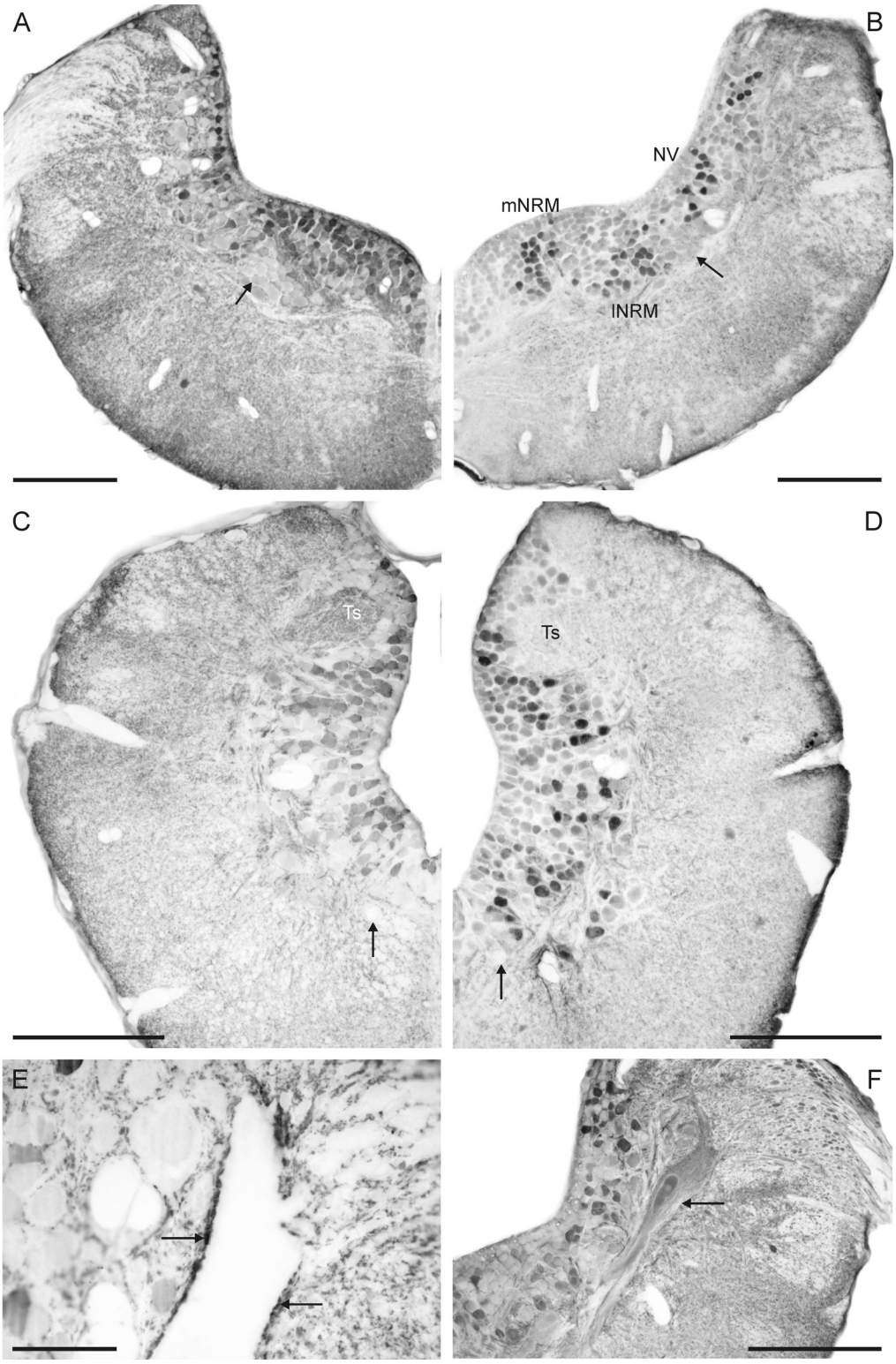


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahmen transversaler Vibratomschnitte zur Illustration GABAerger (**A, C, E**) und glycinerger (**B, D, F**) Somata in *Plethodon shermani*. Die Verteilung immunmarkierter Somata ist in der rostralen (A, B) und caudalen Medulla (C, D) gezeigt. Die Pfeile in A und B markieren immunnegative Zellkluster, die in C und D das Axon des Mauthner Neurons. **E:** Hohe Vergrößerung des Somas eines Mauthner Neurons, welches an der Oberfläche GABAerge Terminalien aufweist (Pfeile). **F:** Das Soma eines Mauthner Neurons (Pfeil) an der Grenze zwischen Faser- und Zellkörperschicht in der lateralen Medulla oblongata ist schwach immunreaktiv für Glycin. mNRM = medialer Subnucleus; lNRM = lateraler Subnucleus des Nucleus reticularis medius; NV = Nucleus vestibularis; Ts = Tractus solitarius. Maßstab entspricht 200µm in A-D, F; 50µm in E.

3.2.4 Verteilung GABA- und glycinerger Somata anhand von Vibratomschnitten

Eine statistische Analyse mittels ANOVA zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich der inter- und intrazonalen Häufigkeiten der Medulla oblongata zwischen den Individuen beider Arten. Diese biologische Varianz wird im Folgenden durch den Standardfehler (SF) bei der Analyse der inter- und intrazonalen Häufigkeiten GABAerger und glycinerger Somata angegeben.

Eine statistische Analyse der Häufigkeitsverteilungen mittels T-Test zeigte signifikante Unterschiede innerhalb der vier verschiedenen Longitudinalzonen zwischen der rostralen und caudalen Medulla sowohl bei *Plethodon shermani* (Abb. 8) als auch bei *Hydromantes genei* (Abb. 9). Bei beiden Tierspezies unterschied sich die mittlere interzonale Häufigkeit GABA- und glycinerger Somata signifikant innerhalb aller Longitudinalzonen (Abb. 8A, C, 9A, C). Lediglich bei *Hydromantes* wurde kein signifikanter Unterschied bei der Verteilung glycinerger Somata zwischen der rostralen und caudalen medianen Zone gefunden (Abb. 9C).

Bei *Plethodon* zeigten sich für die interzonalen Häufigkeiten beider Transmitter hoch signifikante Unterschiede (P<0,01) zwischen der rostralen und caudalen Medulla in der medialen, lateralen und dorsalen Zone (Abb. 8A, C). Während in der rostralen medialen Zone vermehrt immunreaktive Somata nachgewiesen wurden, beruht dieser Unterschied in der lateralen und dorsalen Zone auf einer erhöhten Anzahl immunreaktiver Zellen in der caudalen Medulla. In der medianen Zone wurde ein hoch signifikanter (P<0,01) Unterschied hinsichtlich der interzonalen Häufigkeit glycinerger Somata nachgewiesen, welcher auf einem vermehrten Auftreten glycinerger Somata in der rostralen Medulla beruht (Abb. 8C). Dem entgegen wurden GABAerge Neurone vermehrt in der caudalen medianen Zone nachgewiesen (Abb. 8A). Dieser Unterschied war signifikant (P<0,035).

Das Verteilungsmuster der mittleren interzonalen Häufigkeiten GABAerger und glycinerger Somata in der medialen, lateralen und dorsalen Zone bei *Hydromantes* entspricht dem bei *Plethodon* (Abb. 9A, C). In der medianen Zone existiert jedoch ein hoch signifikanter Unterschied (P<0,01) für GABAerge Somata zwischen der rostralen und caudalen Medulla, welcher auf einer erhöhten Anzahl GABAerger Zellen in der rostralen Medulla beruht (Abb. 9A).

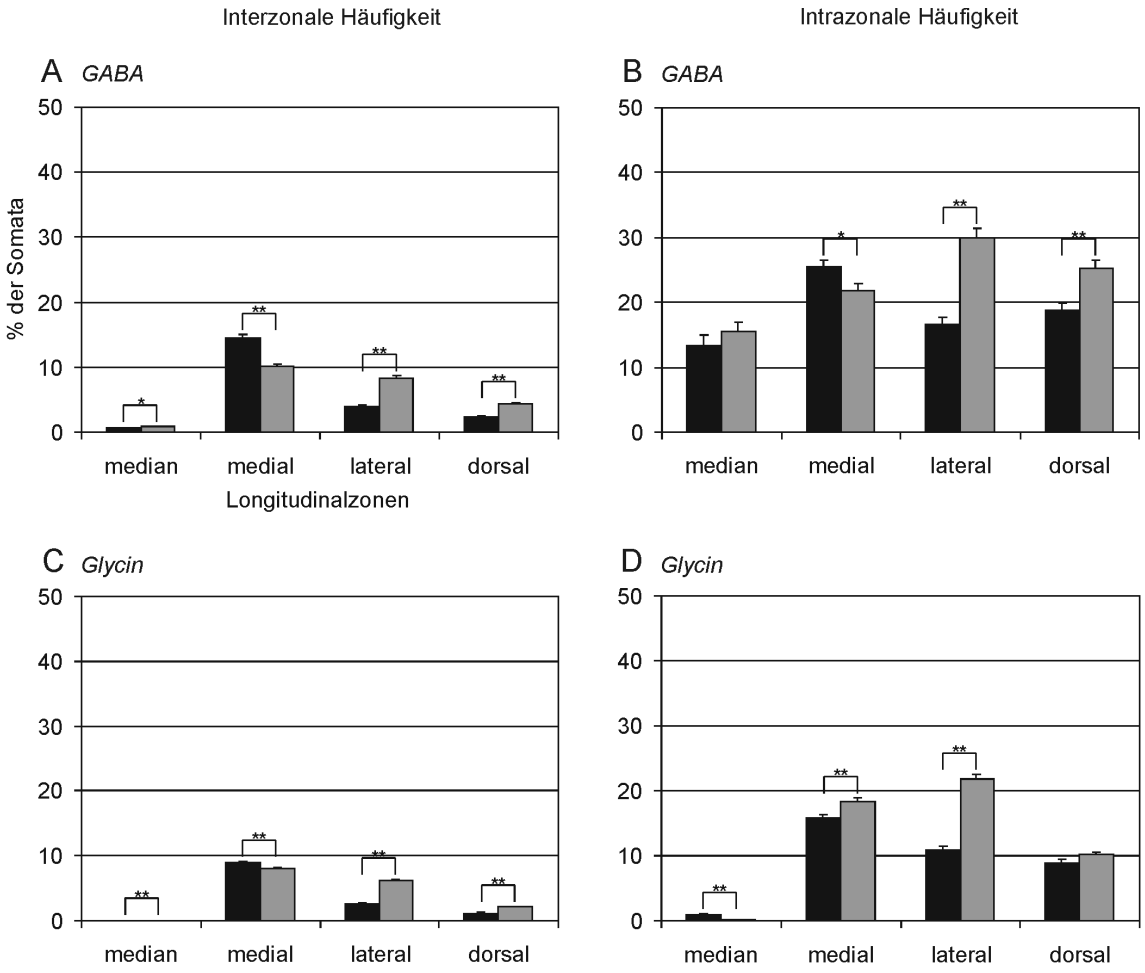


Abb. 8: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der rostralen (schwarz) und caudalen (grau) mittleren inter- und intrazonalen Häufigkeit GABA- (**A, B**) und glycinerger Somata (**C, D**) in den vier Longitudinalzonen bei *Plethodon shermani* (n = 4 für jeden Transmitter). Jede Kolumne repräsentiert 1) Zellzählungen über eine Hälfte der rostralen und caudalen Medulla, 2) im Fall der interzonalen Häufigkeiten der mittleren Anzahl markierter Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der Gesamtzellzahl und 3) im Fall der intrazonalen Häufigkeiten der mittleren Anzahl markierter Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der Gesamtzellzahl der gleichen Zone. Vertikale Balken zeigen den Standardfehler. * $P < 0{,}05$; ** $P < 0{,}01$.

Bei *Plethodon* entsprach das Verteilungsmuster der mittleren intrazonalen Häufigkeiten immunreaktiver Somata im Wesentlichen dem Verteilungsmuster der mittleren interzonalen Häufigkeiten (Abb. 8B, D), ausgenommen in der Anzahl glycinerger Somata in der medialen Zone. Hier wurden vermehrt glycinerge Zellen in der caudalen Medulla lokalisiert (Abb. 8D). Für GABAerge Somata in der medianen Zone und für glycinerge Somata in der dorsalen Zone wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der rostralen und caudalen Medulla ermittelt. Die Unterschiede waren signifikant für GABAerge Zellen in der medialen Zone ($P<0{,}02$).

Bei *Hydromantes* entsprach das Verteilungsmuster der mittleren intrazonalen Häufigkeiten immunreaktiver Somata im Wesentlichen dem Verteilungsmuster der mittleren interzonalen Häufigkeiten (Abb. 9B, D). Abweichungen hierzu zeigte die Verteilung der intrazonalen Häufigkeiten glycinerger Somata in der medialen und dorsalen Zone (Abb. 9D). Beide Zonen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

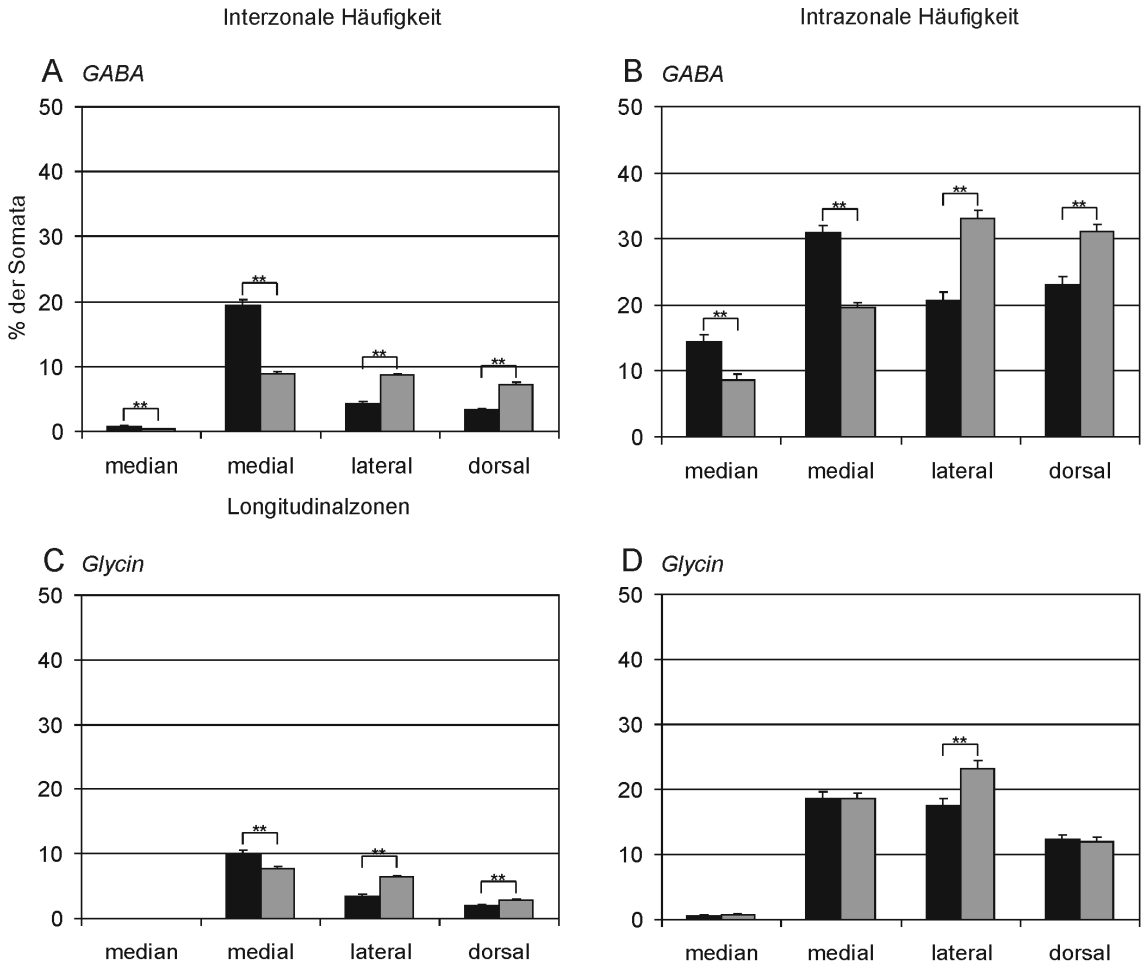


Abb. 9: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der rostralen (schwarz) und caudalen (grau) mittleren inter- und intrazonalen Häufigkeit GABA- (**A, B**) und glycinerger Somata (**C, D**) in den vier Longitudinalzonen bei *Hydromantes genei* (n = 2 für jeden Transmitter). Jede Kolumne repräsentiert 1) Zellzählungen über eine Hälfte der rostralen und caudalen Medulla, 2) im Fall der interzonalen Häufigkeiten der mittleren Anzahl markierter Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der Gesamtzellzahl und 3) im Fall der intrazonalen Häufigkeiten der mittleren Anzahl markierter Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der Gesamtzellzahl der gleichen Zone. Vertikale Balken zeigen den Standardfehler. * $P < 0{,}05$; ** $P < 0{,}01$.

3.2.5 Verteilung immunreaktiver Somata anhand von Semidünnschnitten

Anhand der Semidünnschnitte wurden ebenfalls die inter- und intrazonalen Häufigkeiten GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata bestimmt. Die Verteilung von GABA und Glycin entsprach im Wesentlichen der unter 3.2.2 beschriebenen Verteilung und Lokalisation dieser beiden Transmitter in der rostralen und caudalen Medulla und lässt sich wie folgt gemeinsam zusammenfassen: Die mittleren interzonalen Häufigkeiten aller drei Transmitter sind in der rostralen medialen Zone deutlich am höchsten, während in der caudalen Medulla die meisten Zellen in der medialen Zone, dicht gefolgt von der lateralen Zone gefunden wurden (Abb. 10A, C). Ein Vergleich der mittleren intrazonalen Häufigkeiten zeigte, dass in der rostralen Medulla die Mehrheit aller GABAergen und glutamatergen Somata in der medialen Zone und die meisten glycinergen Neurone in der medialen und lateralen Zone gefunden wurde, während in der caudalen Medulla die Mehrheit aller GABAergen und glycinergen Zellen in der lateralen Zone lokalisiert wurden (Abb. 10B, D). Glutamaterge Neurone wurden in der caudalen Medulla am häufigsten in der dorsalen Zone nachgewiesen.

Die mittlere inter- und intrazonale Häufigkeit glutamaterger Somata wurde ausschließlich anhand von Semidünnschnitten ermittelt. Die Anzahl glutamaterger Neurone war allgemein höher als die der beiden anderen Transmitter (Abb. 10). Die mittlere interzonale Häufigkeit war in der medianen und lateralen Zone entlang der gesamten rostrocaudalen Ausdehnung der Medulla relativ konstant (Abb. 10A ,C). In der medialen Zone nahm die interzonale Häufigkeit von rostral 36% (SF ± 0,43) nach caudal auf 20% (SF ± 0,90) ab, während in der dorsalen Zone eine Zunahme der Häufigkeit von rostral 6% (SF ± 0,24) auf caudal 10% (SF ± 0,67) zu verzeichnen war. Die mittlere intrazonale Häufigkeit glutamaterger Neurone war in der rostralen medialen Zone am höchsten (61%, SF ± 0,64). In der dorsalen, lateralen und medianen Zone wurde eine intrazonale Häufigkeit von 49-53% aller Somata ermittelt (Abb. 10B). In der caudalen Medulla betrug die mittlere intrazonale Häufigkeit glutamaterger Somata 21% (SF ± 4,23) in der medianen, 43% (SF ± 1,66) in der medialen, 45% (SF ± 2,05) in der lateralen und 52% (SF ± 2,65) in der dorsalen Medulla oblongata (Abb. 10D).

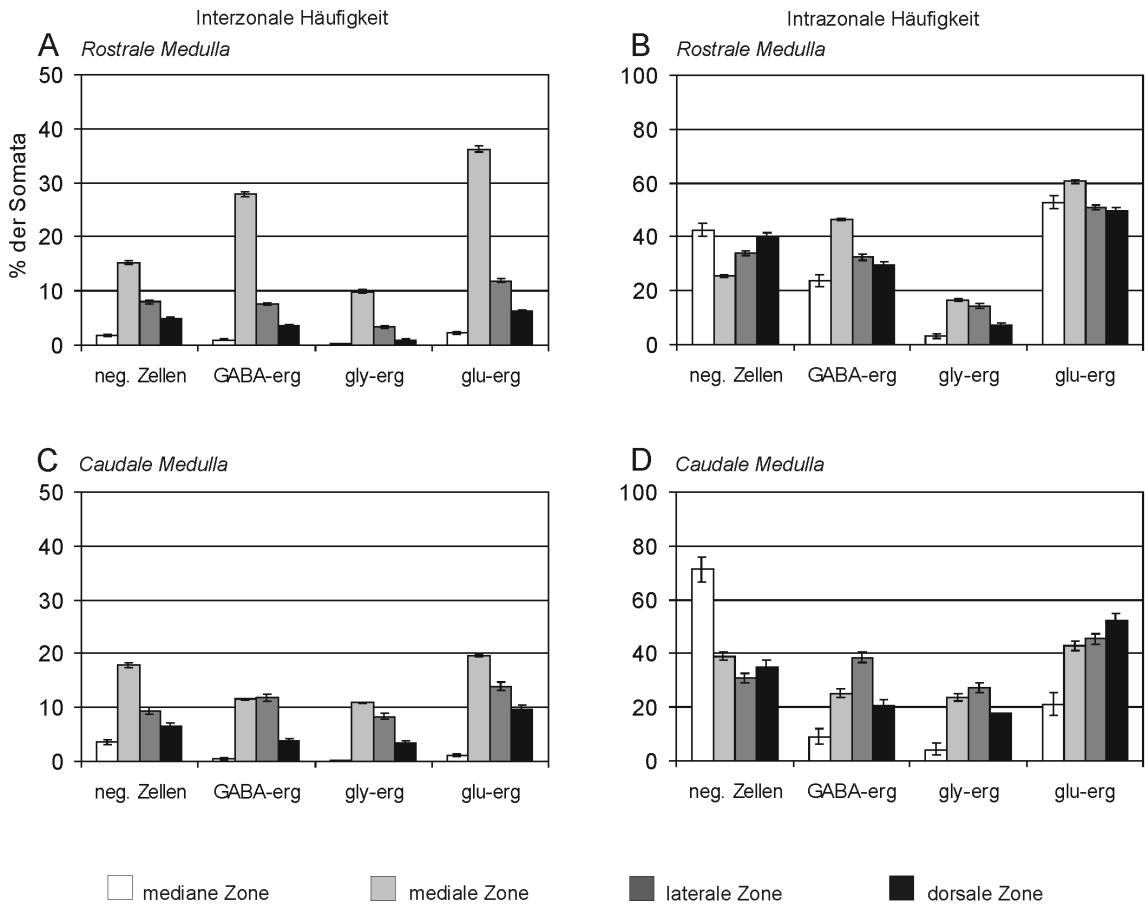


Abb. 10: Verteilung der mittleren inter- (**A, C**) und intrazonalen Häufigkeiten (**B, D**) GABAerger, glycinerger, glutamaterger und immunnegativer Somata in der rostralen (**A, B**) und caudalen (**C, D**) Medulla bei *Plethodon shermani*. Jede Kolumne repräsentiert 1) Zellzählungen über eine Hälfte der rostralen und caudalen Medulla, 2) im Fall der interzonalen Häufigkeiten der mittleren Anzahl markierter Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der Gesamtzellzahl und 3) im Fall der intrazonalen Häufigkeiten der mittleren Anzahl markierter Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der Gesamtzellzahl der gleichen Zone. Vertikale Balken zeigen den Standardfehler.

3.2.6 Kolokalisation von GABA, Glycin und Glutamat

Die Kolokalisation der drei Transmitter wurde an Semidünnschnitten der rostralen (auf Höhe des V.–IX. Kranialnerven) und der caudalen Medulla oblongata (auf Höhe des X.–XI. Kranialnerven) untersucht. Insgesamt wurden 37615 Somata in der rostralen Medulla hinsichtlich ihres Transmittergehaltes untersucht, in der caudalen Medulla waren es 7587 Zellen. Im Folgenden werden die gemittelten intrazonalen Häufigkeiten der Kolokalisationen der drei verschiedenen Transmitter beschrieben (Abb. 11). Beispiele für die Verteilung dieser Kolokalisationen in der rostralen Medulla geben die Abbildungen 12 und 13. In der Abbildung 14 ist ein Beispiel für die Verteilung der Kolokalisationen in der caudalen Medulla dargestellt. In allen untersuchten Bereichen der rostralen und caudalen Medulla oblongata kamen zwei- und dreifach Lokalisationen der Transmitter GABA, Glycin und/oder Glutamat

vor. Somata mit nur einem Transmitter sowie immunnegative Zellen wurden ebenfalls in den einzelnen Bereichen lokalisiert.

In der rostralen Medulla (Abb. 11A) wurden rein glutamaterge Somata am häufigsten detektiert. Ihre gemittelte intrazonale Häufigkeit betrug in der medialen Zone 20% (SF ± 0,52) und 27-33% in der lateralen, dorsalen und medianen Zone. Rein GABAerge Somata wurden in allen vier Zonen mit einer Häufigkeit von 5-10% nachgewiesen, während rein glycinerge Somata in allen vier Zonen mit einer intrazonalen Häufigkeit von 1-3% detektiert wurden. Neurone, die immunreaktiv für GABA und Glutamat waren, wurden am häufigsten (28%, SF ± 0,59) in der medialen Zone nachgewiesen, während 15-20% dieser Zellen in den anderen drei Longitudinalzonen lokalisiert wurden. Kolokalisationen von GABA und Glycin ebenso wie von Glycin und Glutamat sowie die Dreifachlokalisation wurden in allen vier Longitudinalzonen bis zu 7% gefunden.

In der caudalen Medulla (Abb. 11B) kamen rein glutamaterge Somata am häufigsten vor. Diese Neurone wurden bis zu 23% in der medianen, medialen und lateralen Zone detektiert, während sie am häufigsten (35%, SF ± 2,41) in der dorsalen Zone nachgewiesen wurden. Die mittlere intrazonale Häufigkeit für rein GABAerge und rein glycinerge Somata, sowie für alle Ko- und Dreifachlokalisationen der Transmitter variierte zwischen 0% und 13% in den vier Longitudinalzonen.

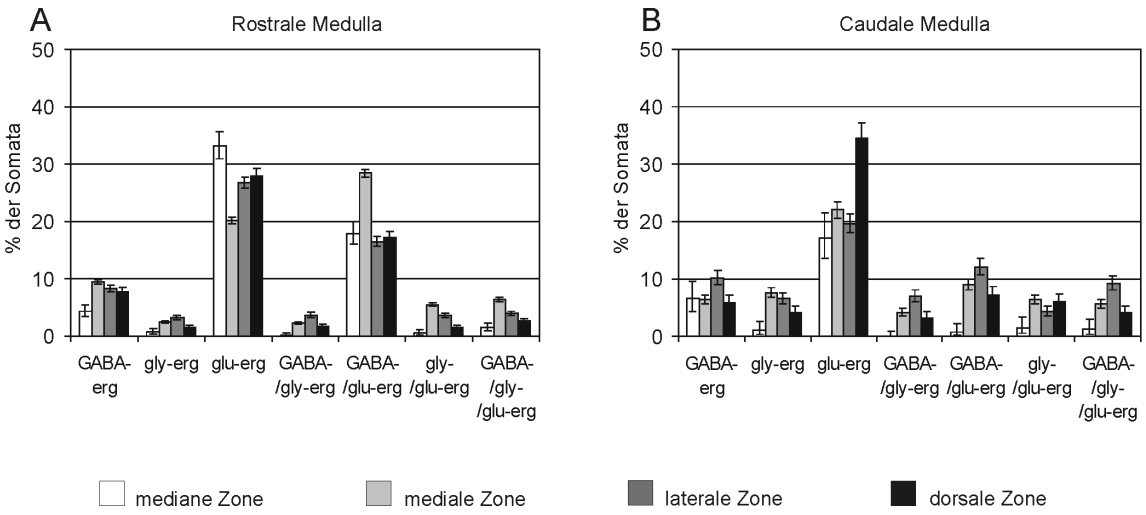


Abb. 11: Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata in der rostralen (**A**) und caudalen (**B**) Medulla oblongata bei *Plethodon shermani* (n = 6). Es sind die mittleren Häufigkeiten der einzelnen Transmitter und ihrer zweier und dreier Lokalisationen mit anderen Transmittern dargestellt. Jede Kolumne repräsentiert die Anzahl der markierten Somata in einer Longitudinalzone als Prozent der Gesamtzellzahl in der gleichen Zone. Vertikale Balken geben den Standardfehler an.

Das Verteilungsmuster der Kolokalisationen der drei Transmitter innerhalb der Zellkörperschicht unterschied sich deutlich entlang der dorsoventralen Achse in der rostralen (Abb. 12, 13) und caudalen Medulla (Abb. 14). GABAerge Somata wurden hauptsächlich im periventrikulären Bereich der Zellkörperschicht aller vier Longitudinalzonen gleichmäßig verteilt lokalisiert, während glutamaterge Neurone vorwiegend in einem mittleren Bereich der Zellkörperschicht gleichmäßig verteilt nachgewiesen wurden. Folglich wurden Kolokalisationen von GABA und Glutamat hauptsächlich im dorsalen und mittleren Überlappungsbereich dieser beiden Verteilungsmuster lokalisiert. Glycinerge Somata wurden vorwiegend im ventralen Bereich der Zellkörperschicht gefunden. Dies war besonders in der medialen Zone ausgeprägt, in der sich die glycinergen Neurone in zwei Zellkluster lokalisieren ließen, einem medialen und einem lateralen Kluster. Dies entspricht der unter 3.2.2 beschriebenen allgemeinen Verteilung glycinerger Somata. Kolokalisationen von Glycin und Glutamat wurden daher vorwiegend im Überlappungsbereich der ventralen und mittleren Zellschichten gefunden.

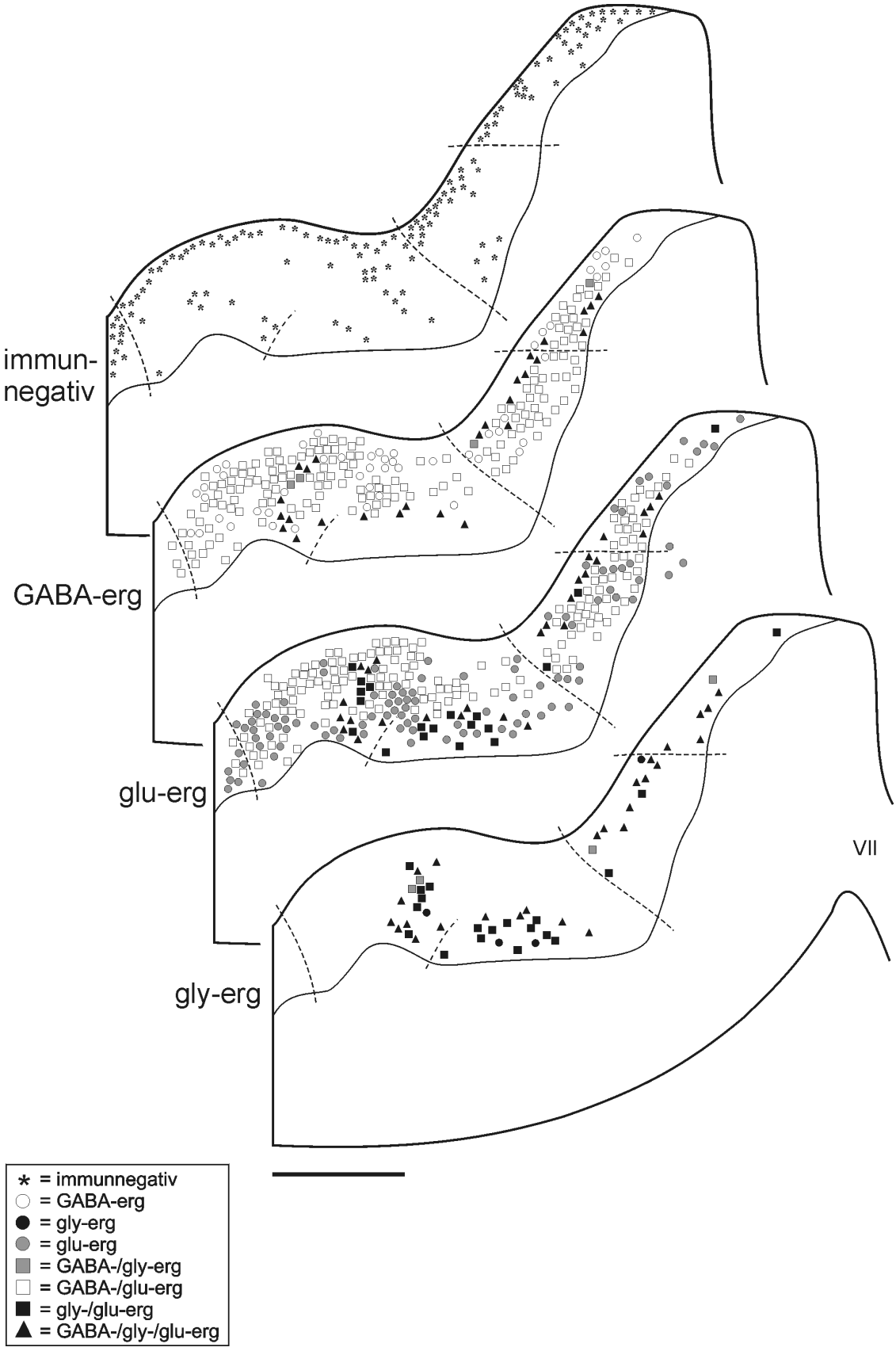


Abb. 12: Schemata aufeinander folgender transversaler Schnitte zeigen die Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata und ihrer Kolokalisationen ebenso wie die Verteilung immunnegativer Somata in der Zellkörperschicht der rostralen Medulla oblongata bei *Plethodon shermani*. Die gestrichelten Linien geben die Grenze zwischen den Longitudinalzonen an. VII = Eintritt des VII. Kranialnerven. Maßstab entspricht 200µm.

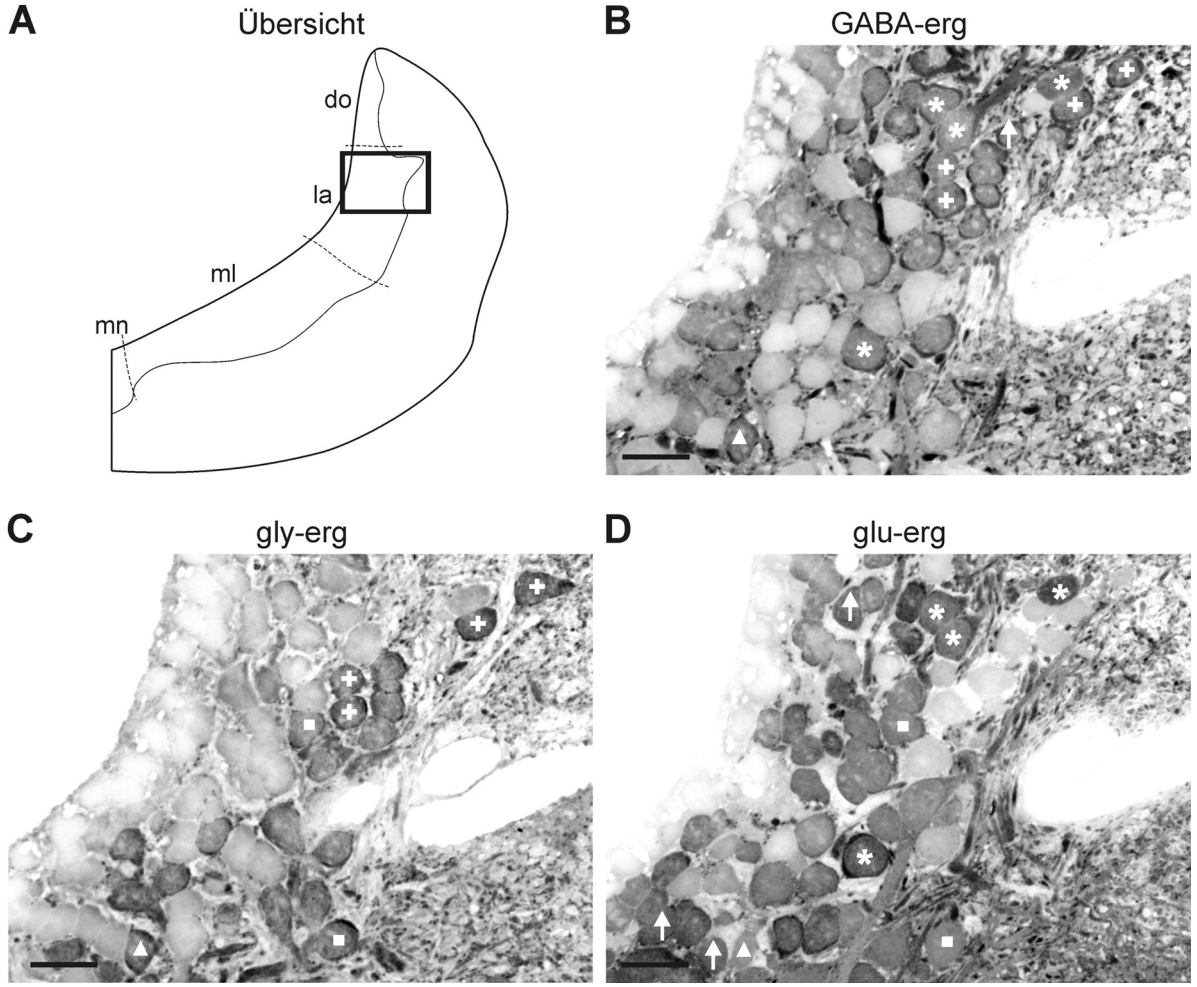


Abb. 13: Mikroskopische Aufnahmen aufeinander folgender Semidünnschnitte zur Illustration der Verteilung und Kolokalisation GABAerger (**B**), glycinerger (**C**) und glutamaterger (**D**) Somata in der lateralen Zone der rostralen Medulla oblongata auf Höhe der Area octavolateralis bei *Plethodon shermani*. Der gezeigte Ausschnitt wird durch das Rechteck in der schematischen Darstellung der Medulla angegeben (**A**); die gestrichelten Linien geben die Grenze zwischen den Longitudinalzonen an. Weiße Pfeile charakterisieren Somata, die nur immunreaktiv für Glutamat sind; Kreuze repräsentieren die Kolokalisation von GABA und Glycin und Rechtecke die von Glycin und Glutamat. Sternchen demonstrieren Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat. Pfeilspitzen geben die Lokalisation aller drei Transmitter an. Maßstab entspricht 20µm.

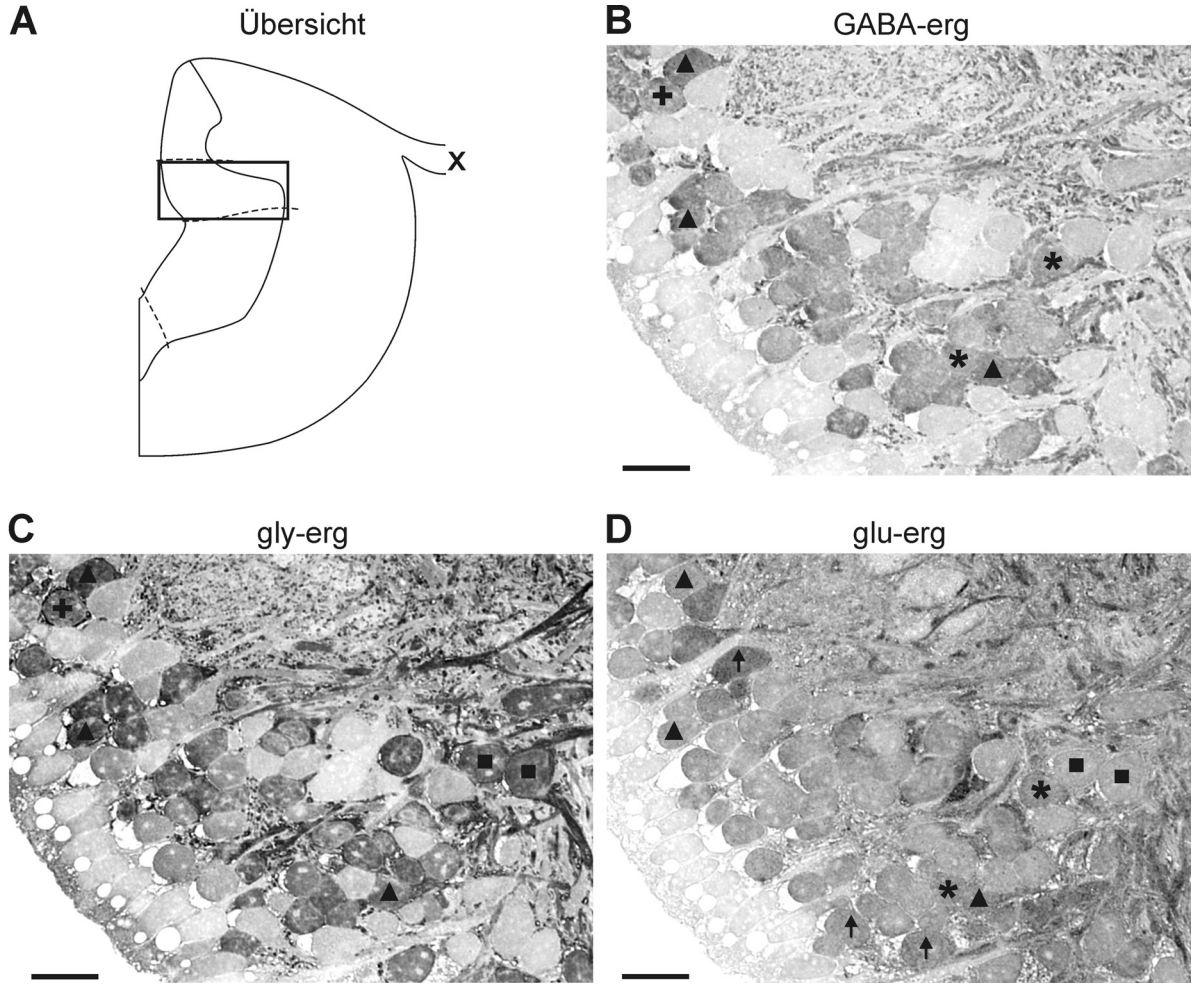


Abb. 14: Mikroskopische Aufnahmen aufeinander folgender Semidünnschnitte zur Illustration der Verteilung und Kolokalisation GABAerger (**B**), glycinerger (**C**) und glutamaterger (**D**) Somata in der lateralen Zone der caudalen Medulla oblongata bei *Plethodon shermani*. Der gezeigte Ausschnitt wird durch das Rechteck in der schematischen Darstellung der Medulla angegeben (**A**); die gestrichelten Linien geben die Grenze zwischen den Longitudinalzonen an. Schwarze Pfeile charakterisieren Somata, die nur immunreaktiv für Glutamat sind; Kreuze repräsentieren die Kolokalisation von GABA und Glycin und Rechtecke die von Glycin und Glutamat. Sternchen demonstrieren Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat. Pfeilspitzen geben die Lokalisation aller drei Transmitter an. Maßstab entspricht 20µm.

3.2.7 Immunnegative Somata

Immunnegative Somata wurden in allen Schnittebenen und Zonen der Medulla gefunden. Die mittlere interzonale Häufigkeit immunnegativer Zellen war in allen Longitudinalzonen entlang der rostrocaudalen Ausdehnung der Medulla konstant. Die meisten immunnegativen Zellen wurden in der medialen Zone der rostralen und caudalen Medulla nachgewiesen (Abb. 10A, C). In der rostralen Medulla war die mittlere intrazonale Häufigkeit aller immunnegativer Somata in der medianen und dorsalen Zone am höchsten (~40%), gefolgt von der lateralen (34% [SF ± 1,00]) und medianen Zone (25% [SF ± 0,57]) (Abb. 10B). In der

caudalen Medulla wurden immunnegative Somata am häufigsten mit einer mittleren intrazonalen Häufigkeit von bis zu 71% (SF ± 4,69) in der medianen Zone gefunden. In den anderen drei Longitudinalzonen lag die mittlere intrazonale Häufigkeit immunnegativer Zellen zwischen 30% und 40% (Abb. 10D).

Fast alle Ependymzellen waren immunnegativ für GABA, Glycin und Glutamat (Abb. 12, 13, 14). Nur sehr vereinzelt wurden GABA immunreaktive Ependymzellen in der medianen Zone lokalisiert. Immunnegative Zellen kamen hauptsächlich im ventralen Bereich der Zellkörperschicht der medianen, medialen und lateralen Zone vor, während sie in der dorsalen Zone vorwiegend ventrikelnah nachgewiesen wurden (Abb. 12). Immunnegative Zellen in der medianen, medialen und lateralen Zone waren häufig in Zellklustern lokalisiert. Die immunnegativen Zellen der medialen und lateralen Zellkluster besaßen große Somata mit einem mittleren Durchmesser von 18x24µm in *Plethodon shermani* und 21x30µm in *Hydromantes genei* (Abb. 12).

3.2.8 Verteilungsmuster der Kolokalisationen von Transmittern

Eine statistische Analyse der Kolokalisationen mittels Chi^2-Test zeigte Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren. Diese biologische Varianz wurde durch den Standardfehler (SF) bei der Analyse der mittleren intrazonalen Häufigkeiten der drei Neurotransmitter und ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen angegeben. Trotz der biologischen Varianz der Neurotransmitterverteilung bei den verschiedenen Individuen zeigte ein statistischer Vergleich der Auftrittswahrscheinlichkeiten der einzelnen Kolokalisationen mittels Chi^2-Test signifikante Unterschiede im Verteilungsmuster der verschiedenen Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen sowohl hinsichtlich der rostrocaudalen Ausdehnung der Medulla als auch in Hinblick auf die vier verschiedenen Longitudinalzonen untereinander (Abb. 15). Signifikante Unterschiede zwischen den Auftrittswahrscheinlichkeiten der einzelnen Transmitter und ihrer zwei- und dreifach Lokalisationen traten in der gesamten rostralen Medulla nur zwischen immunnegativen und GABAergen Zellen sowie Zellen, die Glycin und Glutamat oder alle drei Transmitter enthielten, auf (Abb. 15A). In der gesamten caudalen Medulla oblongata traten signifikante Unterschiede nur zwischen den Auftrittswahrscheinlichkeiten von immunnegativen und rein glutamatergen Neuronen, sowie der Auftrittswahrscheinlichkeit von Zellen mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat auf (Abb. 15B).

Anhand der Verteilungsmuster lässt sich erkennen, dass immunnegative Zellen mit einer Auftrittswahrscheinlichkeit von über 30% am häufigsten in der rostralen und caudalen

Medulla vertreten waren, während Neurone, die Glycin enthielten, nur unter 10% vorkamen (Abb. 15A, B). GABA enthaltene Somata kamen in der rostralen Medulla häufiger vor als in der caudalen Medulla, während Neurone mit Glutamat häufiger in der caudalen Medulla nachgewiesen wurden.

Ein Vergleich der Verteilungsmuster der Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen in den vier verschiedenen Longitudinalzonen der rostralen Medulla zeigt, dass das Verteilungsmuster der medialen Zone dem Muster der Auftrittswahrscheinlichkeiten in der gesamten rostralen Medulla gleicht (Abb. 15A, G), während die dorsale, laterale und mediane Zone ein deutlich anderes Verteilungsmuster aufweist (Abb. 15C, E und I). Demzufolge ist das Verteilungsmuster der gesamten rostralen Medulla geprägt durch das Verteilungsmuster der medialen Zone. In der caudalen Medulla zeigt die laterale und mediale Zone ein ähnliches Verteilungsmuster der Auftrittswahrscheinlichkeiten, das im Wesentlichen dem Verteilungsmuster der gesamten caudalen Medulla entspricht (Abb. 15B, F und H). Die dorsale und mediane Zone hingegen zeigen ein deutlich anderes Verteilungsmuster. Folglich ist die Verteilung der Auftrittswahrscheinlichkeiten der caudalen Medulla durch die Verteilung der Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen in der lateralen und medialen Zone geprägt.

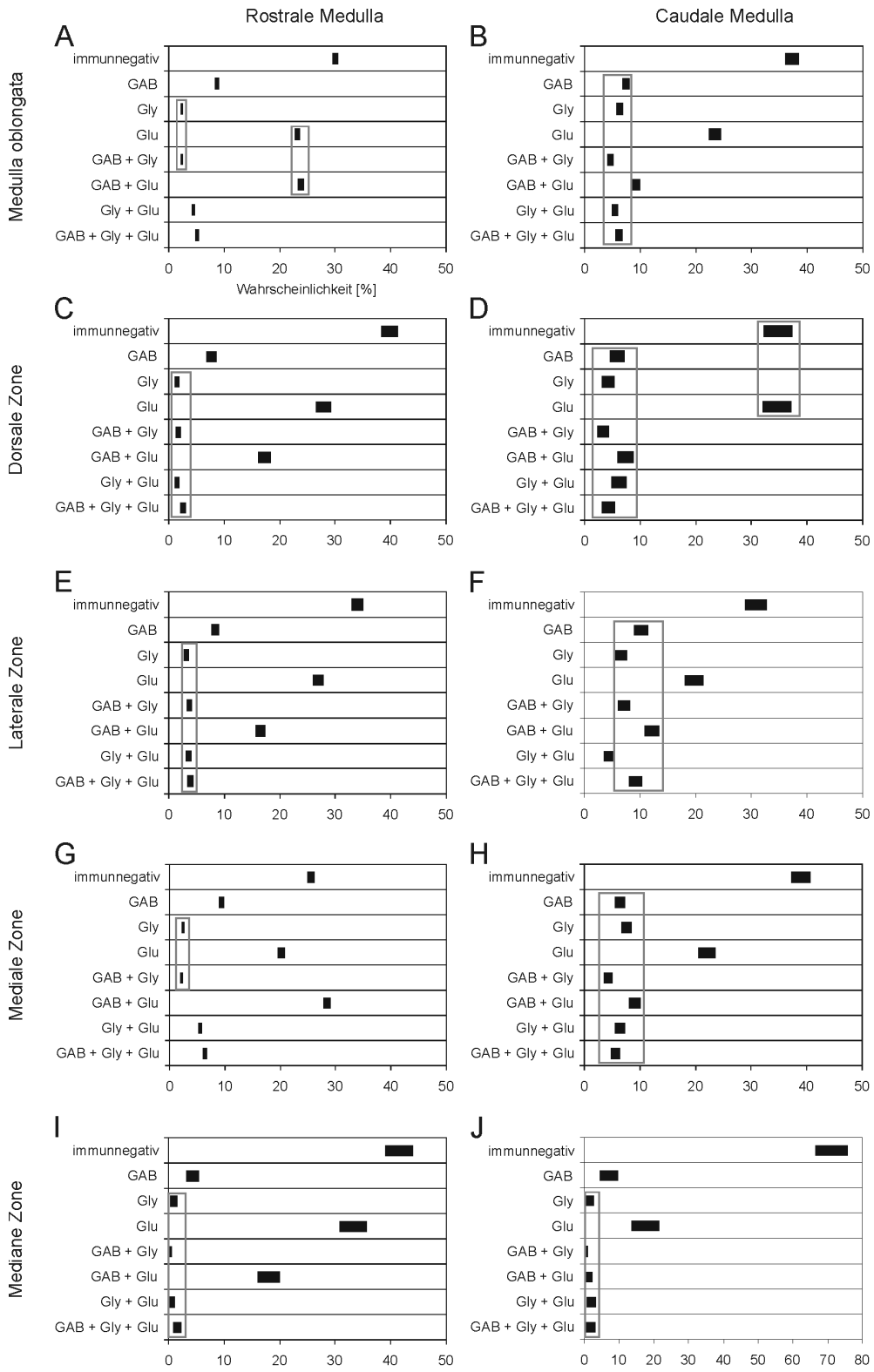


Abb. 15: Eine statistische Analyse der Auftrittswahrscheinlichkeiten der einzelnen Transmitter und ihrer Kolokalisationen in der gesamten rostralen (**A**) und caudalen (**B**) Medulla oblongata sowie der einzelnen rostralen (**C, E, G, I**) und caudalen (**D, F, H, J**) Longitudinalzonen zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Transmitterlokalisationen bei *Plethodon shermani*. Die vertikalen Balken geben die Auftrittswahrscheinlichkeit der einzelnen Transmitter und ihrer Kolokalisationen sowie der immunnegativen Somata an. Die grauen Kolumnen gruppieren Einfach- Ko- und Dreifachlokalisationen, deren Auftrittswahrscheinlichkeiten sich nicht signifikant unterschieden.

3.2.9 Mauthner Neuron und Riesenneurone

Bei *Plethodon shermani* wurde auf Höhe des Eintrittes des VIII. Kranialnerven bilateral in der Zellkörperschicht ein Mauthner Neuron lokalisiert, dessen Axon medial in die contralaterale Medulla absteigt (Abb. 7). Die Größe des Soma betrug 136x32µm. Dieses Riesenneuron war leicht immunpositiv für Glycin (Abb. 7F) und immunnegativ für GABA. GABAerge und glycinerge Terminalien wurden vermehrt an der Membranoberfläche des Soma und distalen lateralen Dendriten und in geringerem Ausmaß an der Oberfläche des distalen ventralen Dendriten lokalisiert (Abb. 7E). Ein flächenmäßiger Vergleich der innervierten Membranbereiche zeigte jedoch, dass glycinerge Terminalien einen kleineren Bereich der Membranoberfläche des Mauthner Neurons einnehmen. Bei *Hydromantes genei* wurde kein Mauthner Neuron gefunden.

In der medianen Zone der Medulla oblongata wurde das absteigende Axon des Mauthner Neurons identifiziert. Dieses Axon war immunreaktiv für Glutamat und schwach immunpositiv für Glycin. GABA konnte nicht im Axon lokalisiert werden.

Anhand von Semidünnschnitten wurden Riesenneurone (giant neurons) mit einem mittleren Durchmesser von 16x24µm auf Höhe der Area octavolateralis unterhalb des Eintrittes des VIII. Kranialnervens in der lateralen Zone der rostralen Medulla oblongata lokalisiert. Sie befanden sich im ventralen Bereich der Zellkörperschicht an der Grenze zur Faserschicht. In diesen Riesenneuronen wurden ausschließlich Kolokalisationen von Glycin und Glutamat nachgewiesen.

3.2.10 Transmitterspezifität der in das Tectum aufsteigenden Projektionen

Nach der Applikation von Biocytin in eine Tectumhemisphäre, wurden Neurone in der Medulla oblongata retrograd bei *Plethodon* markiert. Die Mehrheit der markierten Neurone wurde ipsilateral zur Applikationsstelle in der medialen Zone der rostralen Medulla gefunden. Diese Zellen waren in einem medialen und lateralen Zellkluster arrangiert. Contralateral zur Applikationsstelle wurden nur wenige Zellen in der medialen Zone markiert. In der medianen Zone wurden nur sehr vereinzelt Neurone ipsilateral markiert, während in der lateralen und dorsalen Zone einige Neurone ipsi- und contralateral markiert wurden. In der lateralen Zone lagen die markierten Neurone verteilt innerhalb der Zellkörperschicht. Markierte Neurone der dorsalen Zone waren in einem Kluster arrangiert. Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Anzahl aller Biocytin markierter Projektionsneurone und ihres spezifischen Transmittergehaltes in drei der vier medullären Kerne.

Tab. 7: Transmittergehalt medullärer Neurone mit aszendierenden Projektionen ins Tectum

Kerngebiet		GABA	Gly	Glu	GABA + Gly	GABA + Glu	Gly + Glu	GABA + Gly + Glu	Summe
mNRM	N	2	8	4	1	15	12	20	62
	%	3,2	12,9	6,5	1,6	24,2	19,4	32,3	100,0
lNRM	N	0	28	8	11	6	37	61	151
	%	0,0	18,5	5,3	7,3	4,0	24,5	40,4	100,0
NV	N	2	2	59	0	17	5	9	94
	%	2,1	2,1	62,8	0,0	18,1	5,3	9,6	100,0
ND	N	1	0	87	0	2	1	0	91
	%	1,1	0,0	95,6	0,0	2,2	1,1	0,0	100,0

N gibt die Anzahl der aszendierenden Projektionsneurone bei *Plethodon shermani* an. Der Prozentwert gibt die prozentuale Häufigkeit der Anzahl immunhistochemisch charakterisierter Projektionsneurone innerhalb des jeweiligen Kernes an. mNRM = medialer Subnucleus, lNRM = lateraler Subnucleus des Nucleus reticularis medius; NV = Nucleus vestibularis; ND = Nucleus dorsalis.

Im kombinierten tracing-immunhistochemischen Experiment waren 84% der markierten Projektionsneurone des Nucleus reticularis medius (NRM) in der rostralen medialen Zone immunreaktiv für Glycin. Annähernd 17% dieser Neurone war rein glycinerg, während 23% der glycinergen Projektionsneurone kolokalisiert mit Glutamat waren. In 38% der Zellen ließen sich alle drei Neurotransmitter nachweisen. Nur 6% der Projektionsneurone war immunreaktiv für GABA und Glycin.

Der NRM war in einen medialen und einen lateralen Subnucleus geteilt, welche sich hinsichtlich des Transmittergehaltes ihrer Projektionsneurone unterschieden. Neurone des lateralen Unterkerns waren zu 91% immunreaktiv für Glycin (Abb. 16). 19% dieser Zellen war rein glycinerg, während 25% zusätzlich Glutamat enthielten (Tab. 7). 40% der Somata zeigte eine Dreifachlokalisation der Transmitter. Nur 7% der Projektionsneurone war gleichzeitig immunreaktiv für GABA und Glycin. Im medialen Subnucleus des NRM wurden glycinerge Neurone mit einer vergleichsweise geringen Häufigkeit von 66% nachgewiesen. Davon waren 13% der Zellen rein glycinerg (Tab. 7). Mit einer Häufigkeit von 82% bildet daher Glutamat den Haupttransmitter des medialen Unterkerns. Diese Neurone wiesen häufig eine Dreifachlokalisation der Transmitter auf (32%). Neurone mit einer Kolokalisation von GABA und Glutamat wurden bis zu 24% im medialen Subnucleus lokalisiert, während 19%

der Zellen eine Kolokalisation von Glutamat und Glycin aufwiesen. Nur 6% der Projektionsneurone war rein glutamaterg.

In der rostralen lateralen Zone waren 96% der Biocytin markierten Projektionsneurone des Nucleus vestibularis (NV) glutamaterg (Tab. 7). Die meisten dieser Zellen (63%) waren rein glutamaterg. Kolokalisationen von Glutamat und GABA wurden bis zu 18% nachgewiesen, während Somata mit einer Kolokalisation von Glutamat und Glycin nur bis zu 5% in den Neuronen des NV vorkamen. 10% der Projektionsneurone zeigte eine Dreifachlokalisation der Transmitter. In der rostralen dorsalen Zone waren nahezu alle Biocytin markierten Neurone des Nucleus dorsalis (ND) rein glutamaterg. Kolokalisationen mit GABA und/oder Glycin wurden in den Zellen des ND nur sehr vereinzelt gefunden.

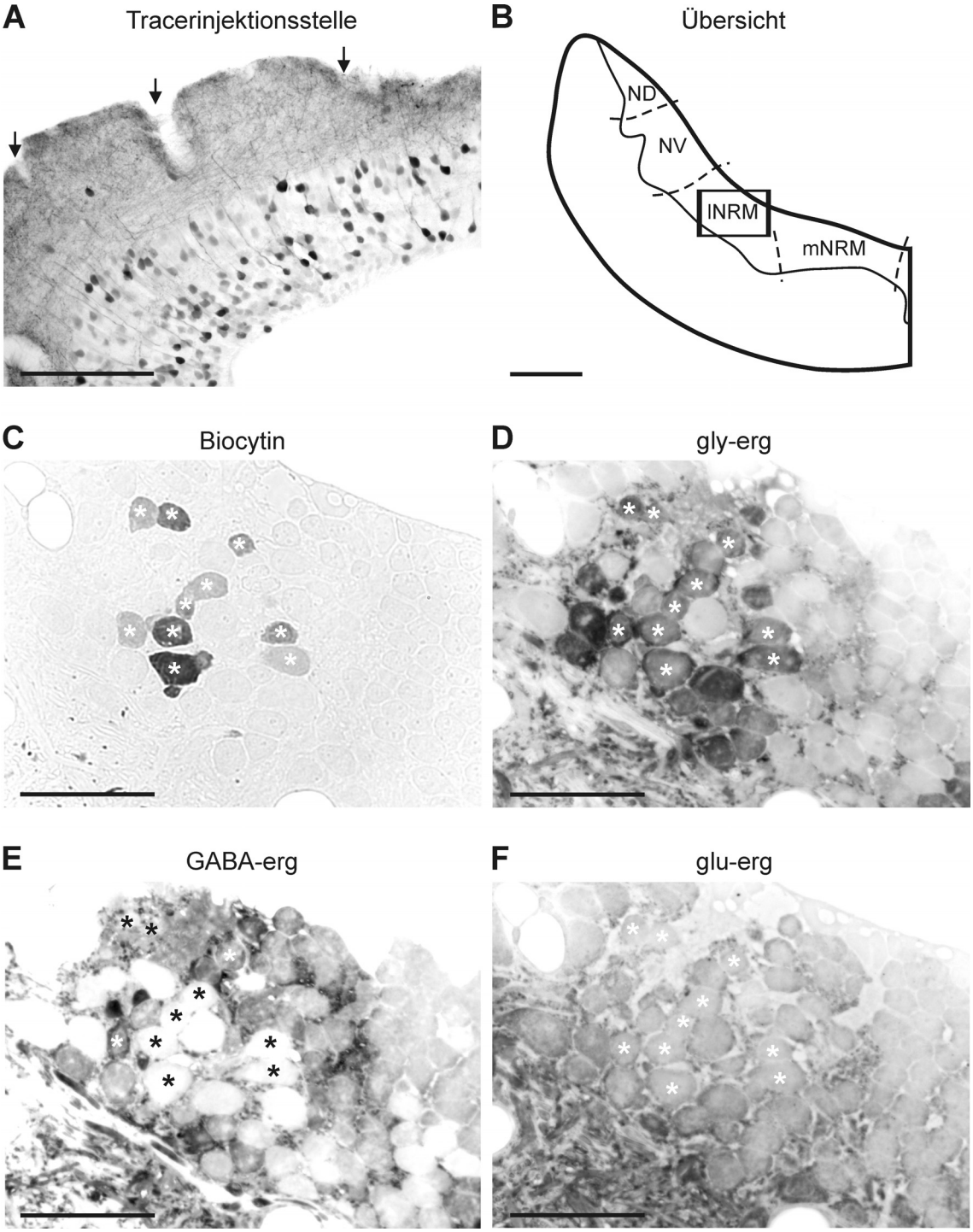


Abb. 16: Die mikroskopischen Aufnahmen transversaler Semidünn- und Vibratomschnitte durch das Tectum mesencephali und der rostralen Medulla oblongata bei *Plethodon shermani* zeigen retrograd markierte Neurone ipsilateral zur Applikationsstelle von Biocytin und ihren jeweiligen Transmittergehalt. **A:** Der Vibratomschnitt illustriert die Applikationsstelle von Biocytin im Tectum. Die Pfeile zeigen auf die Läsionsstellen. **B:** Der Ausschnitt mit dem lateralen Subnucleus des Nucleus reticularis medius (lNRM), welcher in **C-F** gezeigt wird, ist im schematischen Querschnitt der Medulla oblongata angezeigt. Die mikroskopischen Aufnahmen **C-F** zeigen aufeinander folgende Semidünnschnitte, die für Biocytin (**C**), Glycin (**D**), GABA (**E**) und Glutamat (**F**) markiert sind. Weiße Sternchen demonstrieren Biocytin markierte immunpositive Somata, schwarze Sternchen illustrieren Biocytin markierte immunnegative Somata. mNRM = medialer Subnucleus des Nucleus reticularis medius; NV = Nucleus vestibularis; ND = Nucleus dorsalis. Medial ist rechts, dorsal ist oben. Maßstab entspricht 200µm in A und B, 50µm in C-F.

3.3 Konnektivität und cytochemische Organisation des Tectum mesencephali

Bei der cytochemischen Untersuchung des Tectum mesencephali wurden nur Versuchstiere der Spezies *Plethodon shermani* verwendet. Zunächst werden die anatomischen und immunhistochemischen Ergebnisse sowie die statistisch ermittelten Daten zur Verteilung der Neurotransmitter GABA, Glycin und Glutamat im Tectum dargestellt. Anschließend wird der Transmittergehalt von tectalen Neuronen mit deszendierenden Projektionen in die Medulla analysiert, und die synaptische Verschaltung GABAerger, glycinerger und serotonerger Fasern auf diese Tectumneurone beschrieben.

3.3.1 Lagebeziehung und Schichtung

Das Tectum mesencephali von Amphibien erstreckt sich von der Commissura posterior bis auf die Höhe der Commissura tecti. Bei Salamandern der Familie Plethodontidae lässt sich das Tectum entlang der Längsachse in einen rostralen, einen zentralen und einen caudalen Bereich einteilen. Das rostrale Tectum beginnt auf der Höhe der Commissura posterior und erstreckt sich ~200µm in caudale Richtung. Im Anschluss daran erstreckt sich das zentrale Tectum, das mit einer Ausdehnung von ~800µm das größte tectale Gebiet umfasst. In diesem Bereich ist die Laminierung des Tectum deutlich ausgebildet. Das caudale Tectum umfasst ~200µm und definiert den tectalen Bereich auf Höhe der Commissura tecti. Das gesamte Tectum mesencephali umfasst somit einen Bereich von ~1200µm.

Bei *Plethodon shermani* zeigt das Tectum insbesondere im zentralen Bereich die für Salamander typische Laminierung in drei verschiedene Faserschichten und zwei unterschiedliche neuronale Zellkörperschichten (Roth, 1987; Dicke, 1999; Roth et al., 1999). Die Somata der meisten tectalen Neurone befinden sich in den beiden Zellkörperschichten des Tectum. Nur eine sehr geringe Anzahl tectaler Zellen befindet sich in einer migrierten Position in den Faserschichten des Tectum. Anhand einer Klüver-Barrera-Anfärbung ließen sich in jeweils einer tectalen Hälfte im rostralen Bereich 39 migrierte Somata detektieren, im zentralen Bereich 94 und im caudalen Bereich 120 migrierte Zellen. Die Anzahl migrierter Somata nahm somit von rostral nach caudal deutlich zu. Insgesamt wurden 254 Somata in einer migrierten Position innerhalb einer gesamten Tectumhälfte lokalisiert.

Eine statistische Analyse mittels ANOVA, welche im caudalen Bereich nur an Schnitten durchgeführt wurde, bei denen noch eine deutliche Untergliederung in die beiden Zellkörperschichten zu erkennen war, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren bei *Plethodon shermani* hinsichtlich der prozentualen Schichtgröße

der einzelnen Zellkörperschichten. Es gab also keinen spezifischen Tiereffekt hinsichtlich der Gesamtzellzahl der beiden Zellkörperschichten.

Ein Vergleich der Schichtgröße zeigt, dass sich das caudale Tectum deutlich vom rostralen und zentralen Tectum unterscheidet. Im rostralen und zentralen Tectum beträgt die gemittelte Schichtgröße der Schicht 6 47%, während im caudalen Tectum die Schicht 6 aus 56% (SF ± 1,12) aller Zellen besteht. Dem entgegen lassen sich in der Schicht 8 des rostralen und zentralen Tectum 53% aller Zellen lokalisieren. Caudal beträgt die prozentuale Schichtgröße der Schicht 8 nur noch 42% (SF ± 1,20) (Abb. 17). Unterschiede zwischen den beiden Schichten waren in allen drei tectalen Bereichen hochsignifikant (P<0,001) (Abb. 17A). Zudem zeigte sich jeweils ein hochsignifikanter Unterschied (P<0,001) innerhalb der einzelnen Schichten zwischen dem caudalen Tectum und dem rostralen bzw. zentralen Tectum (Abb. 17B). Demzufolge unterschied sich das caudale Tectum hochsignifikant vom rostralen und zentralen Tectum hinsichtlich der Schichtgröße der beiden Zellkörperschichten.

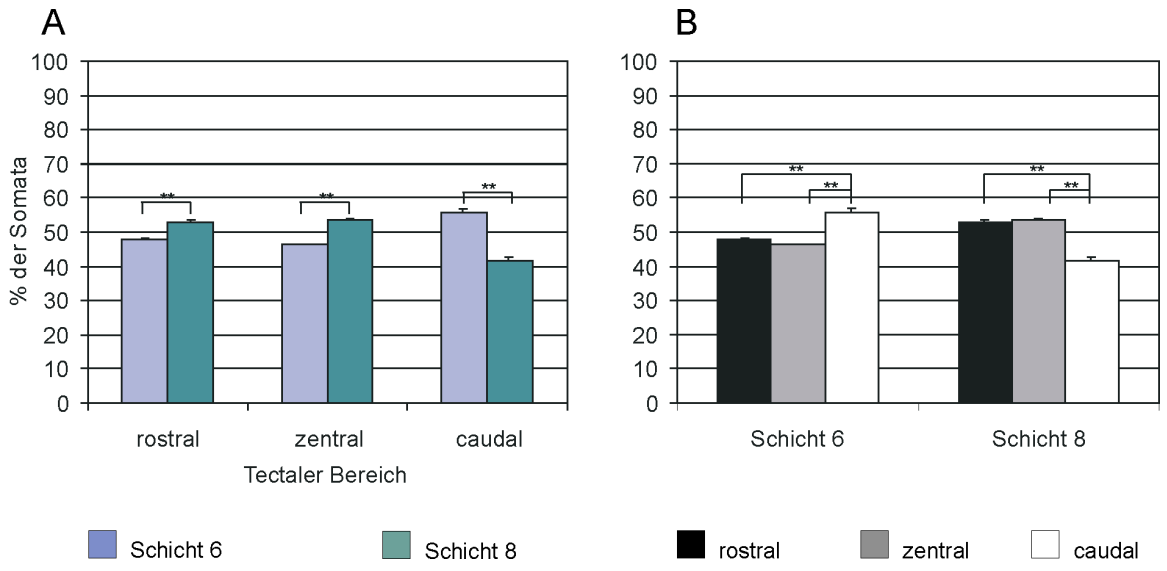


Abb. 17: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellkörperschichten in den drei verschiedenen tectalen Bereichen (**A**) und zwischen den tectalen Bereichen innerhalb einer Zellkörperschicht (**B**) bei *Plethodon shermani* gemittelt über alle Versuchstiere. Jede Kolumne gibt die mittlere Anzahl aller Somata einer Schicht als Prozent der mittleren Gesamtzellzahl des Tectum an. ** P<0,01.

3.3.2 Verteilung GABA- und glycinerger Somata anhand von Vibratomschnitten

Im Tectum mesencephali von *Plethodon shermani* wurden sowohl GABAerge als auch glycinerge Somata nachgewiesen. Die immunpositiven und immunnegativen Zellen hatten einen mittleren Durchmesser von 11x15µm und waren gleichmäßig in den beiden Zellkörperschichten des Tectum verteilt. Nur vereinzelt wurden Neurone mit deutlich größeren Somata im Tectum lokalisiert (siehe 3.3.7).

Die Verteilung GABAerger und glycinerger Somata im Tectum von *Plethodon* unterschied sich deutlich sowohl hinsichtlich der prozentualen Gesamthäufigkeit der beiden Neurotransmitter als auch hinsichtlich ihrer inter- und intralaminaren Häufigkeiten entlang der gesamten rostrocaudalen Ausdehnung des Tectum. Während GABAerge Somata sehr häufig im gesamten Tectum nachgewiesen wurden, kamen glycinerge Zellen nur vereinzelt (<10%) im Tectum vor. Die mittlere Gesamthäufigkeit GABAerger Neurone nimmt kontinuierlich von rostral 32% (SF ± 1,92) nach caudal 18% (SF ± 2,17) ab (Abb. 18), während die mittlere Gesamthäufigkeit glycinerger Somata kontinuierlich von rostral 2% (SF ± 0,18) nach caudal 9% (SF ± 1,26) zunimmt (Abb. 18). Ein Vergleich der Häufigkeiten mittels T-Test zeigte hochsignifikante Unterschiede (P<0,001) in der Verteilung der beiden Transmitter zwischen den einzelnen Bereichen des Tectum.

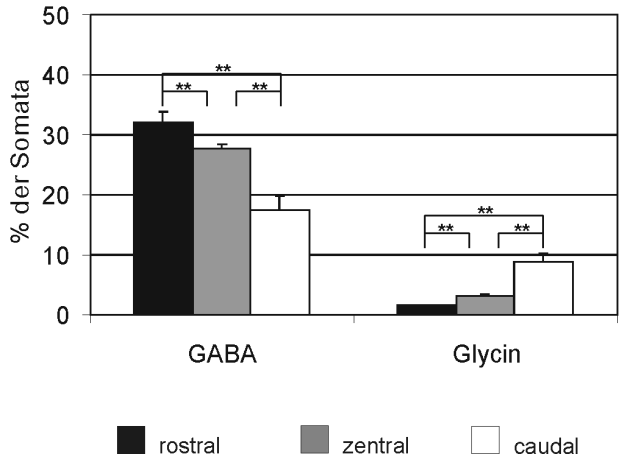


Abb. 18: Statistisch signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung GABAerger und glycinerger Somata in den drei Bereichen des Tectum mesencephali bei *Plethodon shermani*. Jede Kolumne gibt die mittlere Anzahl aller immunreaktiver Somata als Prozent der mittleren Gesamtzellzahl des Tectum in den drei verschiedenen Bereichen an. ** P<0,01.

Im Folgenden wird die inter- und intralaminare Häufigkeitsverteilung GABAerger und glycinerger Somata gemittelt über alle Versuchstiere in den beiden tectalen Schichten des Tectum beschrieben. Beispiele hierfür sind in den Abbildungen 19, 20 und 21 gegeben. Die mittlere interlaminare Häufigkeit GABAerger Somata ist mit 7-9% entlang des gesamten Tectum in der Schicht 6 relativ konstant, während sie in der Schicht 8 kontinuierlich von rostral 24% (SF ± 1,29) über zentral 18% (SF ± 0,49) nach caudal 10% (SF ± 1,11) abnimmt (Abb. 19A). Die mittlere interlaminare Häufigkeit glycinerger Somata hingegen zeigte in beiden Schichten eine leichte Zunahme von rostral 1% (SF ± 0,17) nach caudal 5% (SF ± 0,86) (Abb. 19C).

Ein Vergleich der mittleren intralaminaren Häufigkeiten GABAerger bzw. glycinerger Somata, die den prozentualen Anteil immunpositiver Neurone im Vergleich zur Gesamtzellzahl einer Schicht angeben, zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster wie die interlaminaren Häufigkeiten. Die mittlere intralaminare Häufigkeit GABAerger Neurone in der Schicht 6 schwankte im rostralen und zentralen Bereich zwischen 18% und 21% und nahm nach caudal hin auf 13% (SF ±1,59) ab, während in der Schicht 8 eine kontinuierliche Abnahme von rostral 44% (SF ± 2,89) nach caudal 27% (SF ± 3,70) zu verzeichnen war (Abb. 19B). Die mittlere intralaminare Häufigkeit glycinerger Somata hingegen nahm in der Schicht 6 von rostral 2% (SF ± 0,34) nach caudal 8% (SF ± 1,39) und in der Schicht 8 von 1% (SF ± 0,13) nach 11% (SF ± 2,30) zu (Abb. 19D).

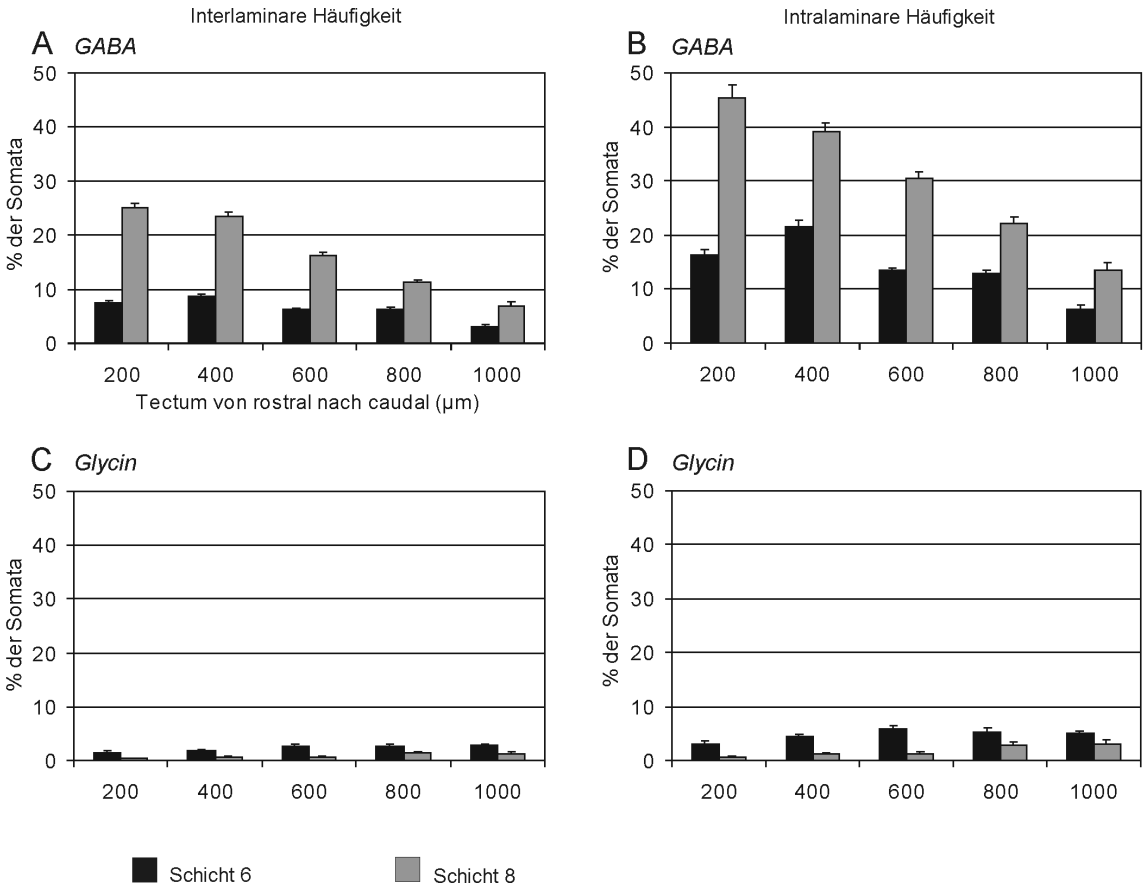


Abb. 19: Verteilung der inter- (**A, C**) und intralaminaren Häufigkeiten (**B, D**) GABAerger und glycinerger Somata im Tectum mesencephali bei zwei unterschiedlichen Individuen von *Plethodon shermani*. Jede Kolumne repräsentiert 1) Zellzählungen über eine Hälfte des Tectum, 2) im Fall der interlaminaren Häufigkeiten markierter Somata einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl und 3) im Fall der intralaminaren Häufigkeiten markierter Somata einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl der gleichen Schicht. Vertikale Balken zeigen den Standardfehler.

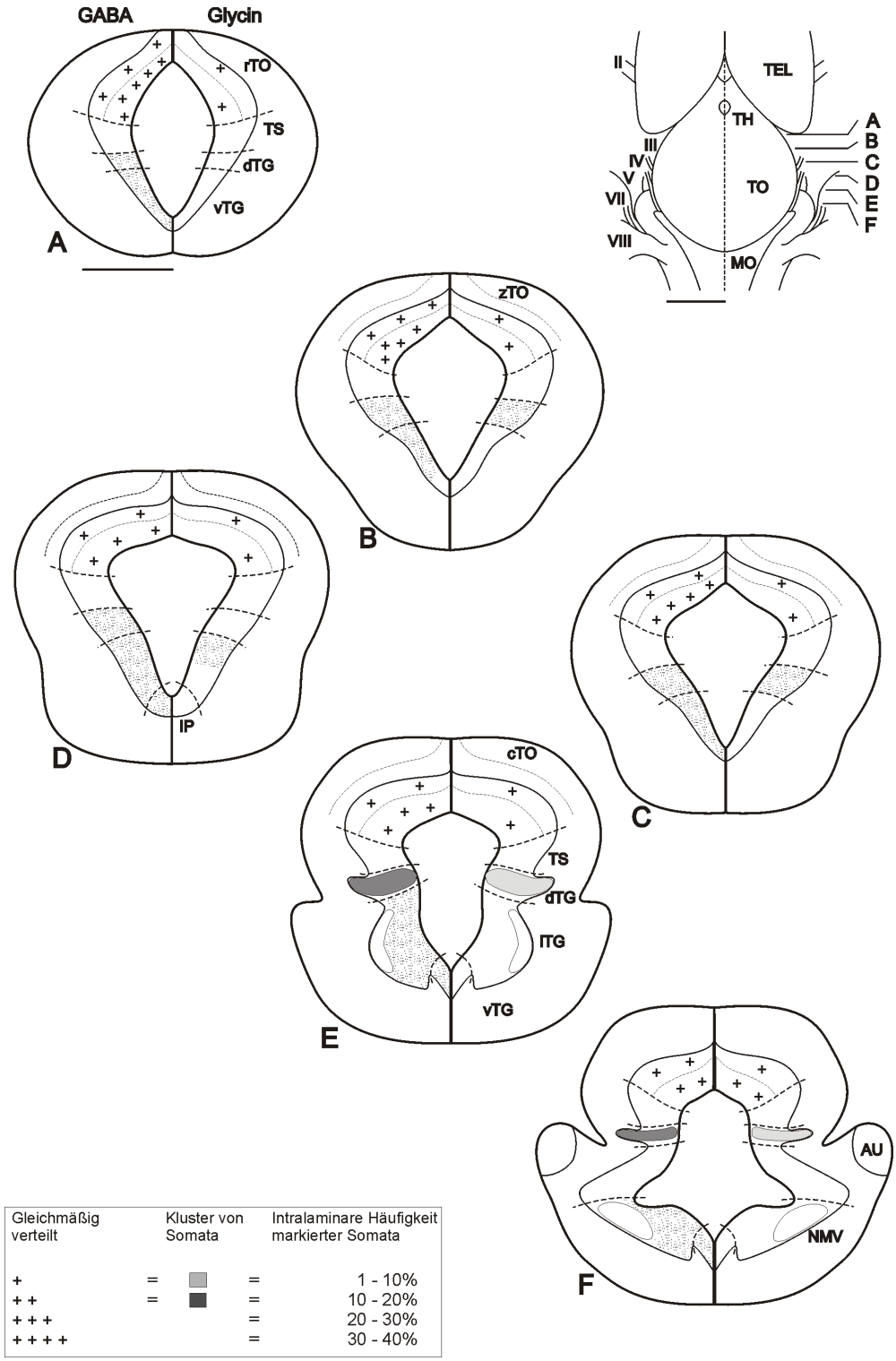


Abb. 20: Die schematischen Zeichnungen transversaler Schnitte durch das Mesencephalon (**A-F**) von *Plethodon shermani* (linke und rechte Seite kombiniert von zwei Individuen) illustrieren die intralaminaren Häufigkeiten GABAerger (links) und glycinerger (rechts) Somata in den beiden Zellkörperschichten des Tectum. Die jeweilige Schnittebene wird durch die schematische Darstellung des Mesencephalon von dorsal angezeigt. Die grau schraffierten Bereiche illustrieren eine gleichmäßige Verteilung immunreaktiver Somata im Tegmentum; die ungefüllten Strukturen geben immunnegative Gebiete an (**E-F**). Die gestrichelten Linien zeigen die Grenze zwischen den einzelnen Gebieten des Mesencephalon sowie die Laminierung des Tectum. rTO = rostraler, zTO = zentraler, cTO = caudaler Bereich des Tectum; TS = Torus semicircularis; dTG = dorsales Tegmentum; vTG = ventrales Tegmentum; iTG = Tegmentum isthmi; IP = Nucleus interpeduncularis; AU = Aurikel; NMV = Nucleus motorius nervi trigemini. Maßstab entspricht 500µm.

GABAerge Somata wurden in beiden Zellkörperschichten des Tectum relativ gleichmäßig verteilt lokalisiert (Abb. 20, 21A, E). Glycinerge Zellen wurden vorwiegend im dorsalen Bereich der Zellkörperschicht 6 an der Grenze zur Faserschicht 5 gefunden (Abb. 21B, D, F). Diese Zellen lagen in einem relativ gleichmäßigen Abstand voneinander entfernt. Nur vereinzelt ließ sich der Primärdendrit bis in die retinalen Faserschichten verfolgen (Abb. 21D). In der Schicht 8 waren die glycinergen Somata gleichmäßig verteilt.

GABAerge Fasern ließen sich in allen Faserschichten des gesamten Tectum nachweisen. Die Dichte GABAerger Fasern war in den retinalen Schichten 1-3 stärker als in den tieferen Faserschichten 4, 5 und 7 (Abb. 21A, E). Parallel zur Tectumoberfläche verlaufende GABAerge Fasern wurden vorwiegend in den retinalen Faserschichten lokalisiert, während in den tieferen Faserschichten häufig radial verlaufende GABAerge Fasern detektiert wurden (Abb. 21C). Eine massive, parallel zur Tectumoberfläche verlaufende glycinerge Faserprojektion, die sich über die gesamte rostrocaudale Ausdehnung des Tectum erstreckte, wurde in den tieferen Faserschichten 4, 5 und 7 des Tectum nachgewiesen (Abb. 21B, D).

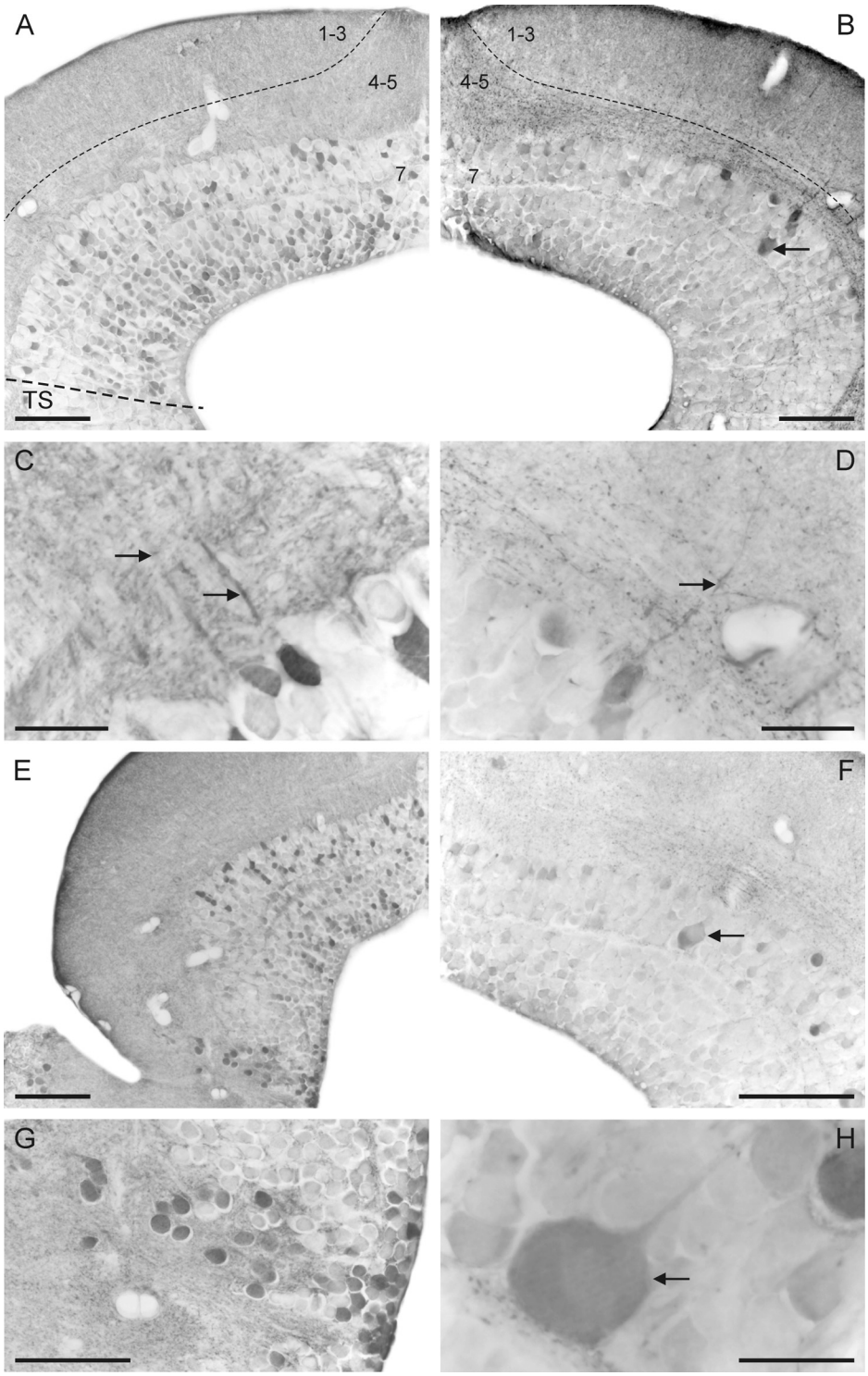


Abb. 21: Mikroskopische Aufnahmen transversaler Schnitte zur Illustration GABAerger (**A, C, E, G**) und glycinerger (**B, D, F, H**) Somata in *Plethodon shermani*. Die Verteilung immunmarkierter Somata ist im zentralen (A-D) und caudalen Tectum (E, F) gezeigt. Die fein gestrichelten Linien in A und B grenzen die retinalen Faserschichten (1-3) von den tieferen multimodalen Faserschichten (4-5) ab. Die stärker gestrichelte Linie in A zeigt die Grenze zum Torus. Die Pfeile in C und D markieren radial verlaufende Primärdendriten der immunreaktiven Tectumneurone, die in B, F und H zeigen auf die Somata von glycinergen Mesencephalicusneuronen. **G:** Hohe Vergrößerung des magnozellulären Subnucleus des Torus im caudalen Bereich des dorsalen Tegmentum. **H:** Das Soma eines Mesencephalicusneuron (Pfeil) in den tieferen Zellreihen der Zellkörperschicht 6 an der Grenze zur Faserschicht 7 ist schwach immunreaktiv für Glycin. TS = Torus semicircularis. Maßstab entspricht 100µm in A, B, F und G; 30µm in C und D; 200µm in E und 20µm in H.

3.3.3 Unterschiede in der Verteilung GABA- und glycinerger Somata

Bei der statistischen Analyse (ANOVA) der inter- und intralaminaren Häufigkeiten GABAerger und glycinerger Somata im Tectum mesencephali wurden kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen nachgewiesen. Nur ein Tier unterschied sich von den anderen Versuchstieren. Ein Beleg dafür, dass die Verteilung GABAerger bzw. glycinerger Somata im Tectum von *Plethodon shermani* über die Gesamtheit der Population relativ konstant ist. Die biologische Varianz wird im Folgenden durch den Standardfehler (SF) bei der Analyse der inter- und intralaminaren Häufigkeiten GABAerger und glycinerger Somata angegeben.

Ein statistischer Vergleich der mittleren inter- und intralaminaren Häufigkeiten immunpositiver Somata mittels T-Test zeigte Unterschiede zwischen den beiden tectalen Zellkörperschichten entlang der gesamten rostrocaudalen Ausdehnung des Tectum (Abb. 22). Die interlaminaren Häufigkeiten GABAerger und glycinerger Somata im rostralen und zentralen Tectum unterschieden sich hochsignifikant (P<0,001) zwischen den beiden Zellkörperschichten (Abb. 22A, C). Während diese Unterschiede in einer höheren interlaminaren Häufigkeit für GABAerge Somata in der Schicht 8 im Vergleich zur Schicht 6 begründet liegen, erklärt sich der Unterschied für glycinerge Somata in einer erhöhten Anzahl dieser Neurone in der Schicht 6. Im caudalen Tectum wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zellkörperschichten nachgewiesen.

Das Verteilungsmuster der intralaminaren Häufigkeiten GABAerger und glycinerger Somata in den beiden tectalen Zellkörperschichten entspricht weitgehend dem Verteilungsmuster der interlaminaren Häufigkeiten (Abb. 22B, D). Demzufolge wurden GABAerge Somata in allen drei tectalen Bereichen vermehrt in der Schicht 8 nachgewiesen. Die Unterschiede waren hochsignifikant (P<0,001). Die intralaminare Häufigkeit glycinerger Somata im rostralen und zentralen Tectum unterschied sich hochsignifikant (P<0,001) zwischen den beiden Zellkörperschichten, was auf einer vermehrten Anzahl glycinerger Zellen in der Schicht 6 beruhte. Die Verteilung GABA- und glycinerger Somata war in den beiden Zellkörperschichten des caudalen Tectum annähernd gleich.

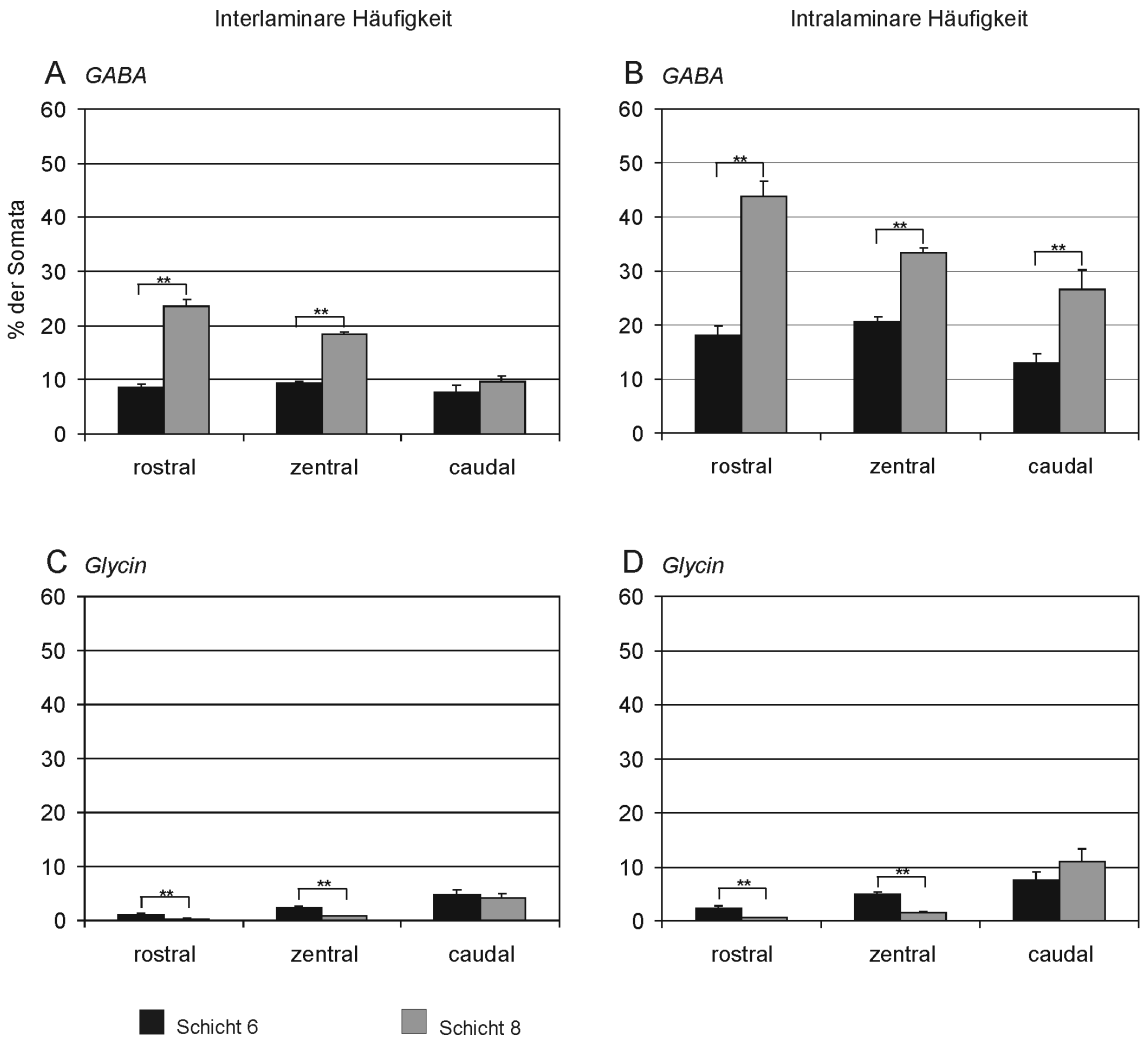


Abb. 22: Statistisch signifikante Unterschiede der mittleren inter- (**A, C**) und intralaminaren Häufigkeiten (**B, D**) GABAerger (**A, B**) und glycinerger Somata (**C, D**) zwischen den beiden Zellkörperschichten in den drei tectalen Bereichen bei *Plethodon shermani* (n = 6). Jede Kolumne zeigt 1) im Fall der interlaminaren Häufigkeiten die mittlere Anzahl immunreaktiver Somata einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl des Tectum, 2) im Fall der intralaminaren Häufigkeiten die mittlere Anzahl immunreaktiver Somata einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl der gleichen Schicht. Vertikale Balken geben den Standardfehler an. ** P<0,01.

Die inter- und intralaminaren Häufigkeiten GABAerger und glycinerger Somata der Schicht 8 unterschieden sich hochsignifikant (P<0,001) zwischen dem rostralen, zentralen und caudalen Tectum (Abb. 23). Während diese Unterschiede in einer Abnahme GABAerger Somata von rostral nach caudal begründet liegen (Abb. 23A, B), lässt sich für glycinerge Somata in der Schicht 8 eine deutliche Zunahme nachweisen (Abb. 23C, D). Innerhalb der Schicht 6 wurden nur signifikante Unterschiede hinsichtlich der interlaminaren Häufigkeiten glycinerger Somata zwischen dem rostralen, zentralen und caudalen Tectum ermittelt (Abb. 23C). Diese Unterschiede beruhten auf einer konstanten Zunahme der Häufigkeit glycinerger Somata entlang der rostrocaudalen Ausdehnung des Tectum. Die intralaminaren Häufigkeiten GABA- und glycinerger Somata der Schicht 6 unterschieden sich hochsignifikant (P<0,001) zwischen

dem caudalen und dem rostralen bzw. zentralen Tectum (Abb. 23B, D). Diese Unterschiede beruhten auf einer Abnahme der Häufigkeit GABAerger Somata bzw. einer Zunahme der Häufigkeit glycinerger Somata nach caudal. Folglich unterscheidet sich das caudale Tectum auch im Hinblick auf die Verteilung GABAerger und glycinerger Somata vom rostralen und zentralen Tectum.

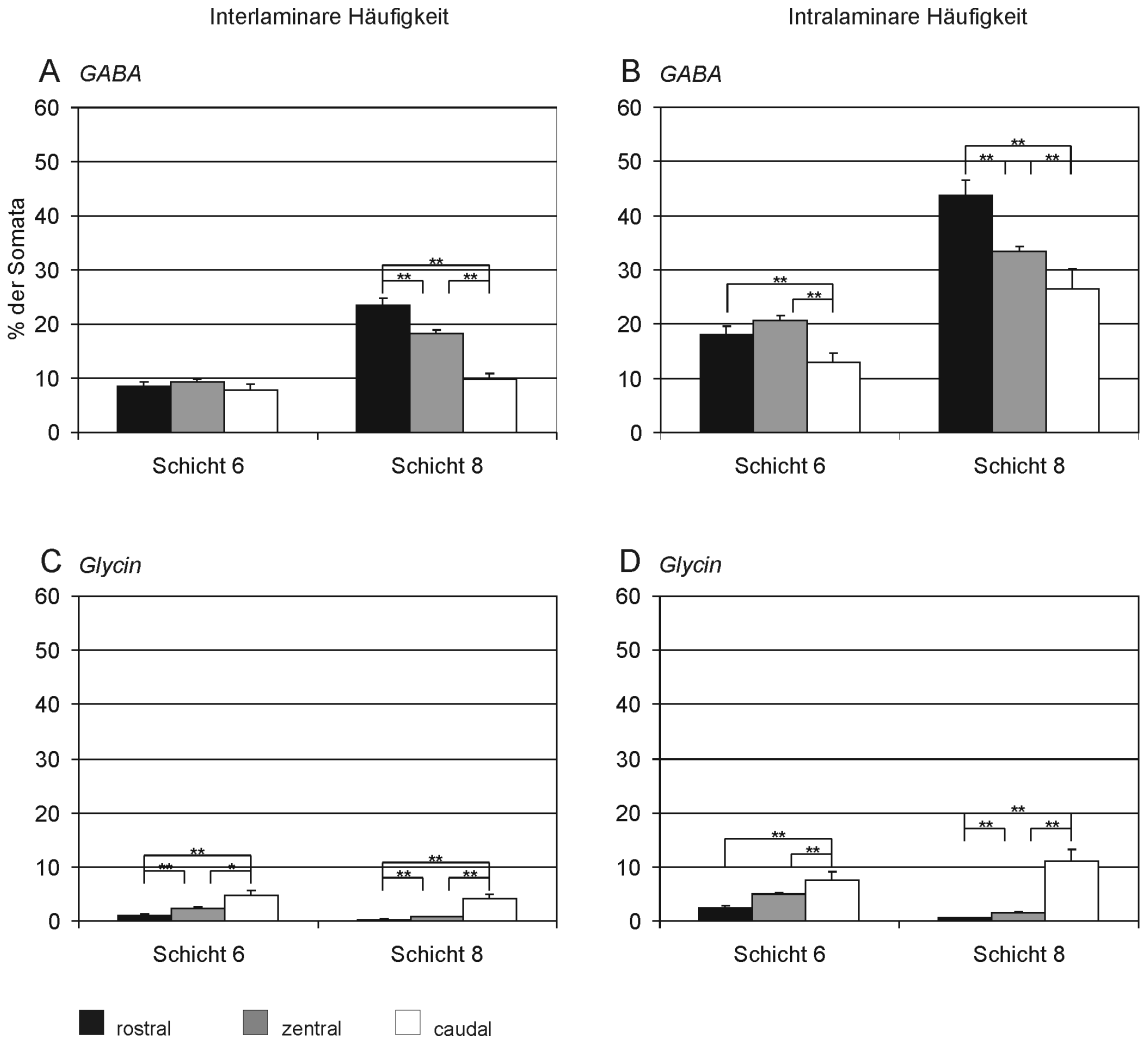


Abb. 23: Statistisch signifikante Unterschiede der mittleren inter- (**A, C**) und intralaminaren Häufigkeiten (**B, D**) GABAerger (**A, B**) und glycinerger Somata (**C, D**) zwischen den drei tectalen Bereichen bei *Plethodon shermani* (n = 6). Jede Kolumne zeigt 1) im Fall der interlaminaren Häufigkeiten die mittlere Anzahl immunreaktiver Somata einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl des Tectum, 2) im Fall der intralaminaren Häufigkeiten die mittlere Anzahl immunreaktiver Somata einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl der gleichen Schicht. Vertikale Balken geben den Standardfehler an. ** P<0,01.

3.3.4 Verteilung immunreaktiver Somata anhand von Semidünnschnitten

Anhand von Semidünnschnitten wurde ebenfalls die Verteilung der inter- und intralaminaren Häufigkeiten immunreaktiver und immunnegativer Somata im Tectum ermittelt. Die Abbildung 24 zeigt die gemittelten inter- und intralaminaren Häufigkeiten immunreaktiver und immunnegativer Zellen im zentralen und caudalen Tectum. Die Verteilung der inter- und intralaminaren Häufigkeiten glycinerger Somata entsprach im Wesentlichen der unter 3.3.2 beschriebenen Verteilung. Glycin ist mit einer Häufigkeit von unter 5% der am geringsten vorkommende Neurotransmitter im Tectum. GABAerge Somata wurden im Semidünnschnitt im Vergleich zum Vibratomschnitt vermehrt nachgewiesen. Besonders in der Schicht 6 des zentralen Tectum und der Schicht 6 und 8 des caudalen Tectum wurde ein größerer Anteil GABAerger Somata ermittelt. Ein Vergleich der interlaminaren Häufigkeiten dieser beiden Transmitter zeigte, dass GABAerge Somata besonders in der Schicht 8 lokalisiert wurden, während glycinerge Zellen häufiger in der Schicht 6 nachgewiesen wurden.

Die Verteilung der inter- und intralaminaren Häufigkeiten glutamaterger Somata in den beiden Schichten des Tectum wurde ausschließlich anhand der Semidünnschnitte ermittelt. Glutamaterge Zellen waren ebenso wie in der Medulla die häufigsten Zellen im Tectum. Die interlaminare Häufigkeit glutamaterger Somata war über die gesamte rostrocaudale Ausdehnung des Tectum für beide Schichten konstant und betrug zwischen 32% und 34% (Abb. 24A, C). Ein Vergleich der intralaminaren Häufigkeiten zeigte ein vermehrtes Auftreten glutamaterger Somata in der Schicht 6 des Tectum. Glutamaterge Zellen wurden sowohl im zentralen als auch im caudalen Tectum mit einer Häufigkeit von 74% (SF ± 1,36) in der Schicht 6 nachgewiesen, während in der Schicht 8 nur 58% (SF ± 1,36) der Zellen Glutamat enthielten (Abb. 24B, D).

Der Anteil immunnegativer Somata im Tectum war relativ gering. Die inter- und intralaminaren Häufigkeiten immunnegativer Zellen waren entlang der rostrocaudalen Ausdehnung des Tectum konstant und betrugen innerhalb der Schicht 6 interlaminar 6% (SF ± 0,24) bzw. intralaminar 14% (SF ± 0,52) und innerhalb der Schicht 8 interlaminar 13% (SF ± 0,33) bzw. intralaminar bis zu 25% (SF ± 1,22) (Abb. 24).

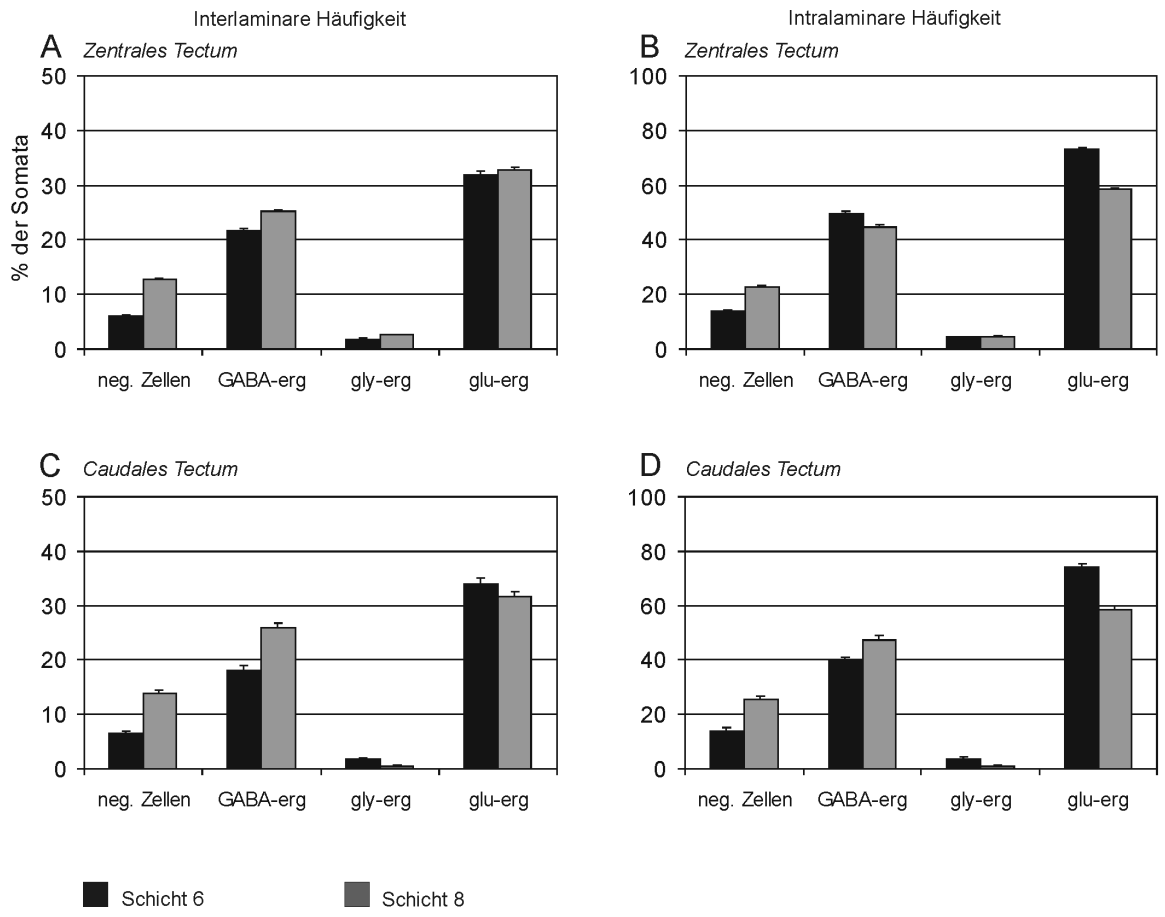


Abb. 24: Verteilung der mittleren inter- (**A, C**) und intralaminaren Häufigkeiten (**B, D**) GABAerger, glycinerger, glutamaterger und immunnegativer Somata im zentralen (**A, B**) und caudalen (**C, D**) Tectum bei *Plethodon shermani*. Jede Kolumne repräsentiert 1) Zellzählungen über eine Hälfte des zentralen und caudalen Tectum, 2) im Fall der interlaminaren Häufigkeiten den Anteil markierter Somata in einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl und 3) im Fall der intralaminaren Häufigkeiten den Anteil markierter Somata in einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl der gleichen Schicht. Vertikale Balken zeigen den Standardfehler.

3.3.5 Kolokalisation von GABA, Glycin und Glutamat

Die Kolokalisationen der drei verschiedenen Transmitter wurden an Semidünnschnitten des zentralen und caudalen Tectum untersucht. Insgesamt wurden 38601 Somata im zentralen Bereich des Tectum hinsichtlich ihres Transmittergehaltes untersucht. Im caudalen Bereich wurden insgesamt 9042 Zellen cytochemisch charakterisiert. Im Folgenden werden die gemittelten intralaminaren Häufigkeiten der Kolokalisationen der drei verschiedenen Transmitter beschrieben (Abb. 25). Beispiele für die Verteilung dieser Kolokalisationen im zentralen Tectum geben die Abbildungen 26 und 27. Die Abbildung 28 gibt ein Beispiel für die Verteilung der Kolokalisationen im caudalen Tectum. In allen untersuchten Bereichen des zentralen und caudalen Tectum kamen zweier und dreier Lokalisationen zwischen den drei Neurotransmittern GABA, Glycin und Glutamat vor. Somata mit nur einem Transmitter sowie immunnegative Zellen wurden ebenfalls in den einzelnen Bereichen lokalisiert.

Im zentralen Tectum (Abb. 25A) wurden rein glutamaterge Somata sehr häufig detektiert. In der Schicht 6 betrug ihre gemittelte intralaminare Häufigkeit 34% (SF ± 0,71) und 29% (SF ± 0,45) in der Schicht 8. Rein GABAerge Somata wurden häufiger (13%; SF ± 0,45) in der Schicht 8 nachgewiesen, während in der Schicht 6 nur 11% (SF ± 0,47) der Zellen rein GABAerg waren. Rein glycinerge Somata waren in beiden Schichten selten (2%). Neurone, die sowohl GABA als auch Glutamat enthielten, wurden am häufigsten im zentralen Tectum nachgewiesen. Ihre gemittelte intralaminare Häufigkeit betrug in der Schicht 6 37% (SF ± 0,73) und in der Schicht 8 31% (SF ± 0,61). Kolokalisationen von GABA und Glycin bzw. Glycin und Glutamat ebenso wie Neurone, in deren Somata alle drei Neurotransmitter nachgewiesen wurden, wurden nur vereinzelt in beiden Schichten detektiert (Häufigkeit unter 3%).

Im caudalen Tectum (Abb. 25B) wurden rein glutamaterge Somata in der Schicht 6 mit einer mittleren intralaminaren Häufigkeit von 46% (SF ± 1,52) detektiert, während in der Schicht 8 nur 27% (SF ± 1,25) der Somata rein glutamaterg waren. Die Verteilung rein GABAerger und rein glycinerger Somata entsprach im Wesentlichen der Verteilung im zentralen Tectum. Neurone, die immunreaktiv für GABA und Glutamat waren, wurden in der Schicht 8 mit einer Häufigkeit von 31% (SF ± 1,30) lokalisiert, während in der Schicht 6 nur 26% (SF ± 1,34) der Zellen GABA und Glutamat enthielten. Neurone mit einer Kolokalisation von GABA und Glycin bzw. Glycin und Glutamat sowie Zellen, in deren Somata alle drei Neurotransmitter lokalisiert wurden, waren in beiden Schichten mit einer Häufigkeit bis zu 2% selten.

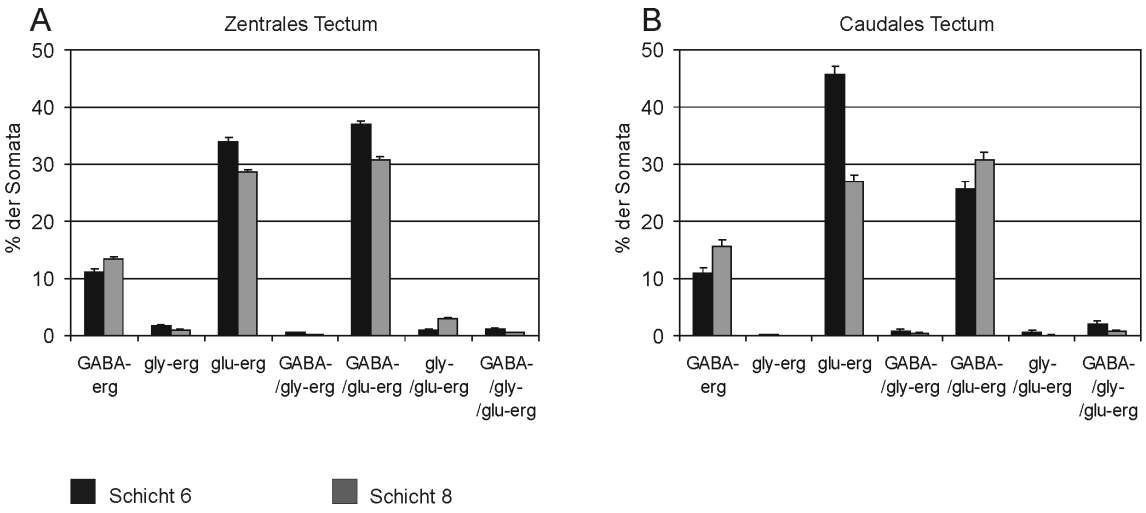


Abb. 25: Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata im zentralen (**A**) und caudalen (**B**) Tectum mesencephali bei *Plethodon shermani* (n = 4). Es sind die mittleren intralaminaren Häufigkeiten der einzelnen Transmitter und ihrer zweier und dreier Lokalisationen mit anderen Transmittern dargestellt. Jede Kolumne repräsentiert den Anteil der markierten Somata in einer Zellkörperschicht als Prozent der Gesamtzellzahl in der gleichen Schicht. Vertikale Balken geben den Standardfehler an.

Das Verteilungsmuster der Kolokalisationen der drei Transmitter innerhalb der beiden Zellkörperschichten unterschied sich teilweise entlang der dorsoventralen Achse des zentralen (Abb. 26) und caudalen Tectum. Wie bereits unter 3.3.2 beschrieben wurden GABAerge Somata gleichmäßig verteilt in beiden Zellkörperschichten des Tectum lokalisiert. Glutamaterge Zellen waren ebenso gleichmäßig in beiden Zellkörperschichten verteilt. Folglich kamen auch Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat gleichmäßig verteilt in beiden Schichten des zentralen und caudalen Tectum vor. Glycinerge Somata hingegen wurden vorwiegend im dorsalen Bereich der Zellkörperschicht 6 an der Grenze zur Faserschicht 5 lokalisiert (Abb. 26). Dem entsprechend kamen Kolokalisationen von glycinergen Zellen mit GABA und/oder Glutamat sehr häufig in diesem Bereich vor. Immunnegative Zellen waren in der Zellkörperschicht 6 relativ gleichmäßig verteilt, während sie in der Zellkörperschicht 8 vorwiegend im ventralen, periventrikulären Bereich lokalisiert wurden. Ependymzellen der Schicht 9 des Tectum mesencephali waren vorwiegend immunnegativ.

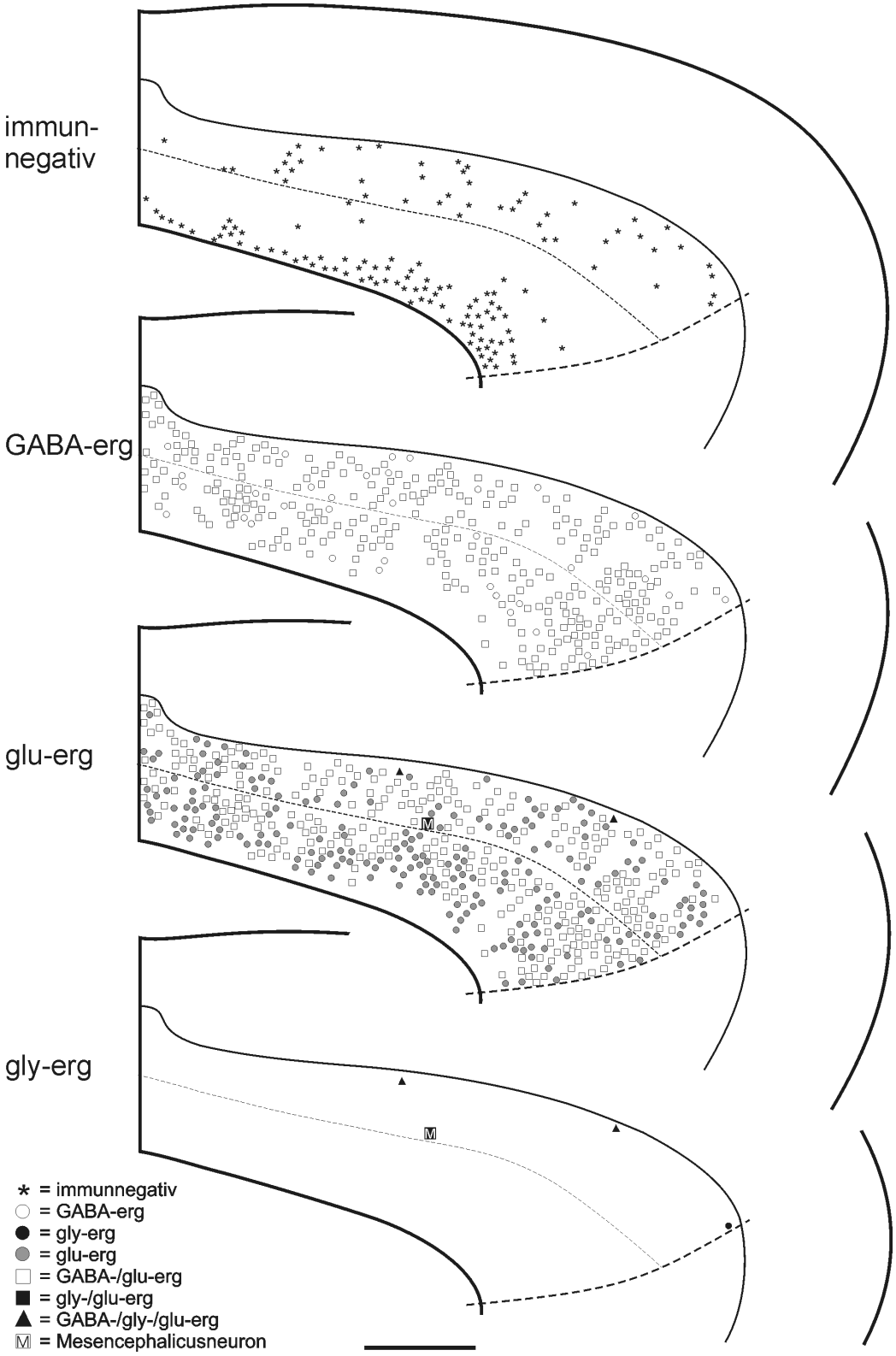


Abb. 26: Schemata aufeinander folgender transversaler Schnitte zeigen die Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata und ihrer Kolokalisationen ebenso wie die Verteilung immunnegativer Somata in den beiden Zellkörperschichten des zentralen Tectum bei *Plethodon shermani*. Die fein gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen den beiden Zellkörperschichten; die stärker gestrichelte Linie zeigt die Grenze zum Torus semicircularis. Maßstab entspricht 100µm.

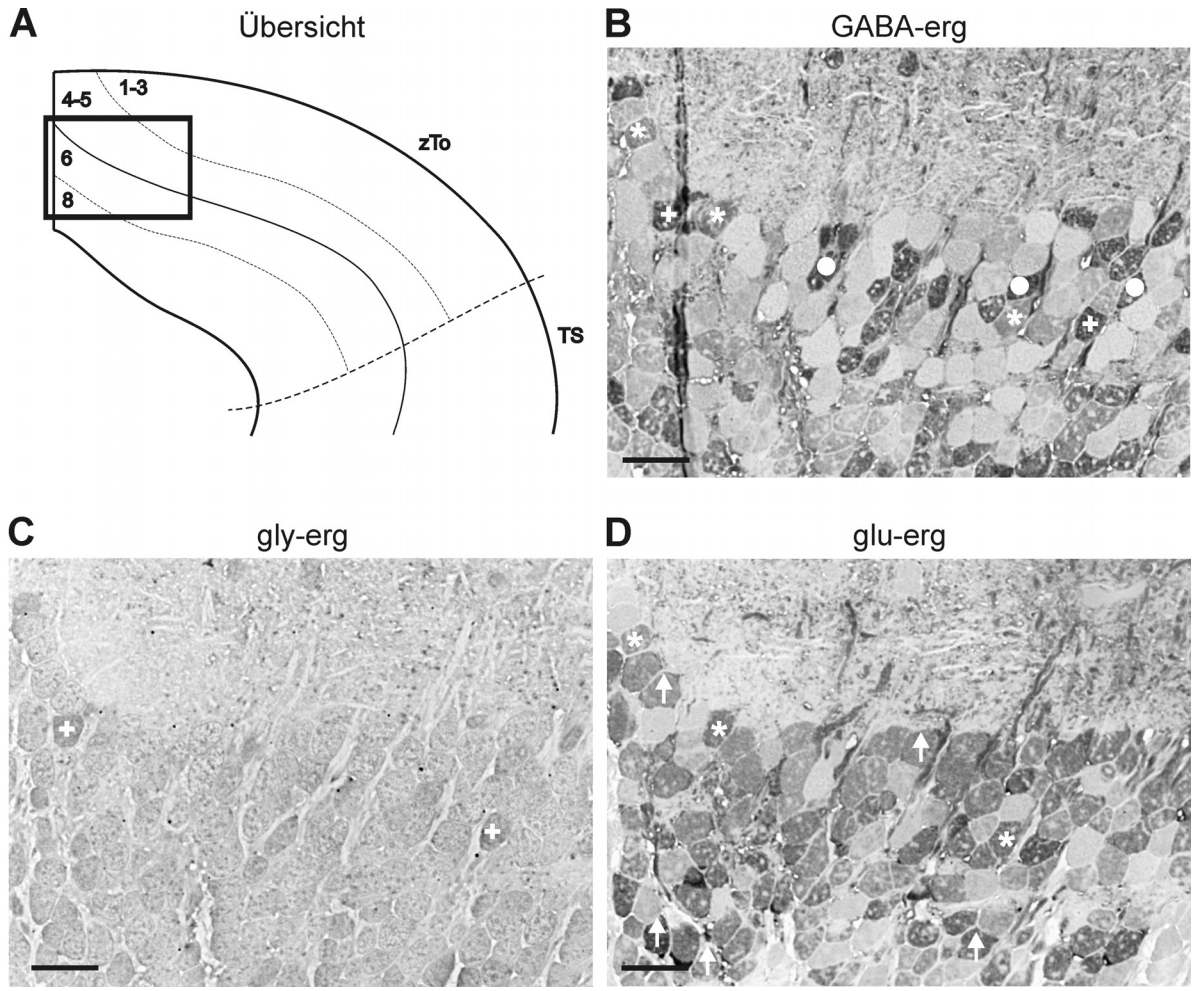


Abb. 27: Mikroskopische Aufnahmen aufeinander folgender Semidünnschnitte zur Illustration der Verteilung und Kolokalisation GABAerger (**B**), glycinerger (**C**) und glutamaterger (**D**) Somata im zentralen Tectum bei *Plethodon shermani*. Der gezeigte Ausschnitt wird durch das Rechteck in der schematischen Darstellung des Tectum angegeben (**A**); die fein gestrichelten Linien geben die Grenze zwischen den beiden Zellkörperschichten bzw. den beiden Faserschichten an; die stärker gestrichelte Linie zeigt die Grenze zum Torus semicircularis. Weiße Pfeile charakterisieren Somata, die nur immunreaktiv für Glutamat sind; Kreise markieren rein GABAerge Somata; Kreuze repräsentieren die Kolokalisation von GABA und Glycin und Sternchen demonstrieren Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat. zTo = zentrales Tectum; TS = Torus semicircularis. Maßstab entspricht 20µm.

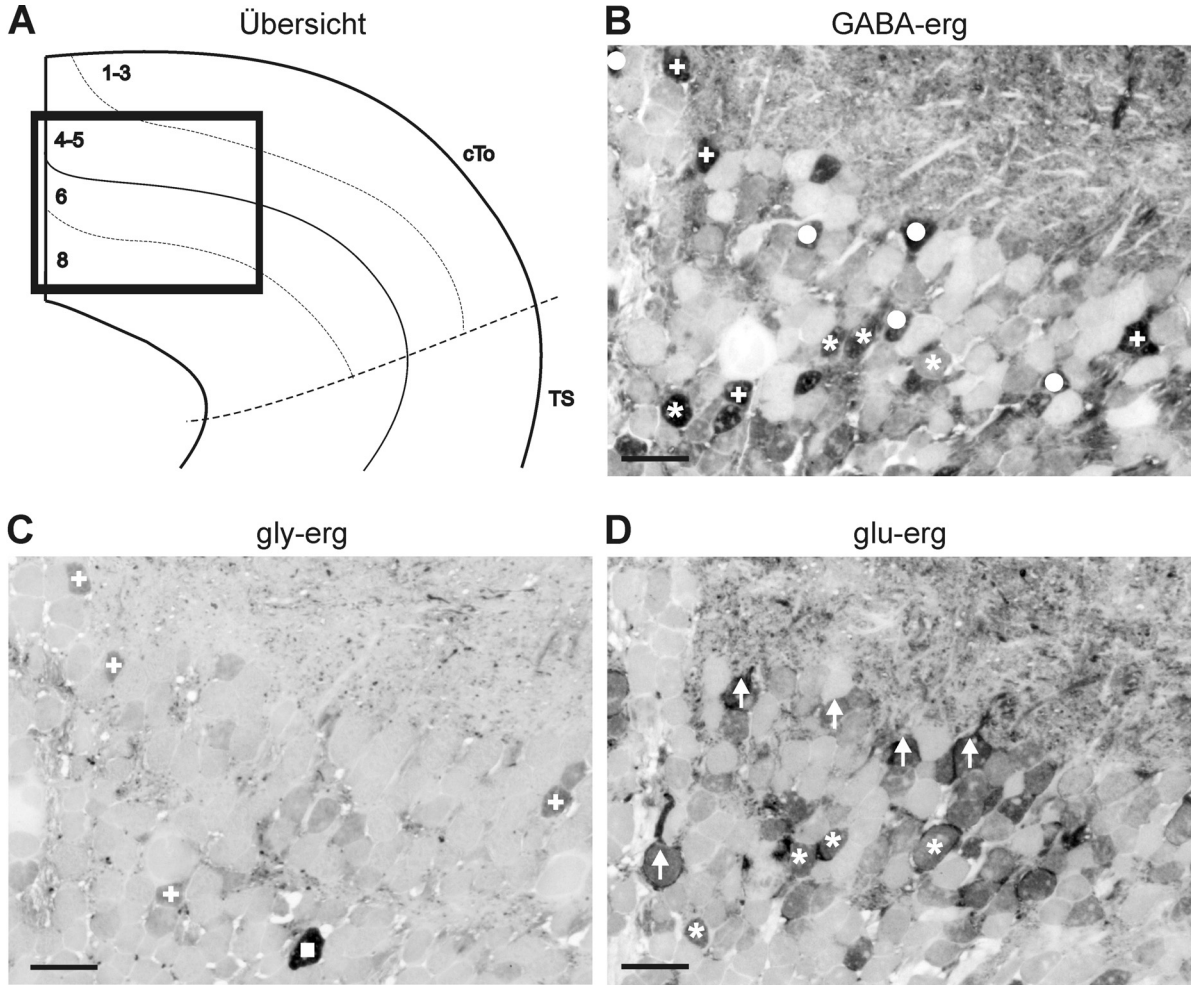


Abb. 28: Mikroskopische Aufnahmen aufeinander folgender Semidünnschnitte zur Illustration der Verteilung und Kolokalisation GABAerger (**B**), glycinerger (**C**) und glutamaterger (**D**) Somata im caudalen Tectum bei *Plethodon shermani*. Der gezeigte Ausschnitt wird durch das Rechteck in der schematischen Darstellung des Tectum angegeben (**A**); die fein gestrichelten Linien geben die Grenze zwischen den beiden Zellkörperschichten bzw. den beiden Faserschichten an; die stärker gestrichelte Linie zeigt die Grenze zum Torus semicircularis. Weiße Pfeile charakterisieren Somata, die nur immunreaktiv für Glutamat sind; Kreise markieren rein GABAerge und Rechtecke rein glycinerge Somata; Kreuze repräsentieren die Kolokalisation von GABA und Glycin und Sternchen demonstrieren Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat. cTo = caudales Tectum; TS = Torus semicircularis. Maßstab entspricht 20µm.

3.3.6 Verteilungsmuster der Kolokalisationen von Transmittern

Trotz der biologischen Varianz der Neurotransmitterverteilung bei den verschiedenen Individuen zeigte ein statistischer Vergleich der Auftrittswahrscheinlichkeiten der einzelnen Kolokalisationen mittels Chi^2-Test signifikante Unterschiede im Verteilungsmuster der verschiedenen Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen sowohl hinsichtlich der rostrocaudalen Ausdehnung des Tectum als auch im Hinblick auf die zwei verschiedenen Zellkörperschichten innerhalb eines tectalen Bereichs (Abb. 29).

Im zentralen Tectum unterschieden sich die Auftrittswahrscheinlichkeiten aller Einfach-, Ko- und Dreifachlokalisationen signifikant voneinander (Abb. 29A). In diesem Bereich war die Auftrittswahrscheinlichkeit von Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat am höchsten, gefolgt von der Auftrittswahrscheinlichkeit rein glutamaterger Zellen. Immunnegative und GABAerge Zellen lagen in einem mittleren Bereich der Auftrittswahrscheinlichkeiten, während das Auftreten rein glycinerger Zellen, sowie aller Kolokalisationen mit Glycin, ebenso wie die Dreifachlokalisation jeweils eine Auftrittswahrscheinlichkeit von unter 2% aufwiesen. Das Verteilungsmuster der Auftrittswahrscheinlichkeiten in der Schicht 8 entsprach im Wesentlichen dem Verteilungsmuster im gesamten zentralen Tectum (Abb. 29E), während das Verteilungsmuster in der Schicht 6 Unterschiede zum Verteilungsmuster des gesamten zentralen Tectum aufwies. Demzufolge ist das Verteilungsmuster des gesamten zentralen Tectum geprägt durch das Verteilungsmuster der Schicht 8.

Das Verteilungsmuster der Auftrittswahrscheinlichkeiten im caudalen Tectum unterschied sich teilweise vom Verteilungsmuster im zentralen Tectum (Abb. 29B). So war die Auftrittswahrscheinlichkeit rein glutamaterger Somata am höchsten, gefolgt von der Auftrittswahrscheinlichkeit von Zellen mit einer Immunreaktivität von GABA und Glutamat. Zudem wurde im caudalen Tectum kein signifikanter Unterschied zwischen den Auftrittswahrscheinlichkeiten der beiden Kolokalisationen GABA-Glycin und Glycin-Glutamat nachgewiesen. Das Verteilungsmuster der Auftrittswahrscheinlichkeiten in der Schicht 6 entsprach im Wesentlichen dem Verteilungsmuster im gesamten caudalen Tectum (Abb. 29D), während sich das Verteilungsmuster in der Schicht 8 von dem Verteilungsmuster im gesamten caudalen Tectum unterschied (Abb. 29F). Folglich ist die Verteilung der Auftrittswahrscheinlichkeiten des caudalen Tectum durch die Verteilung der Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen in der Schicht 6 geprägt.

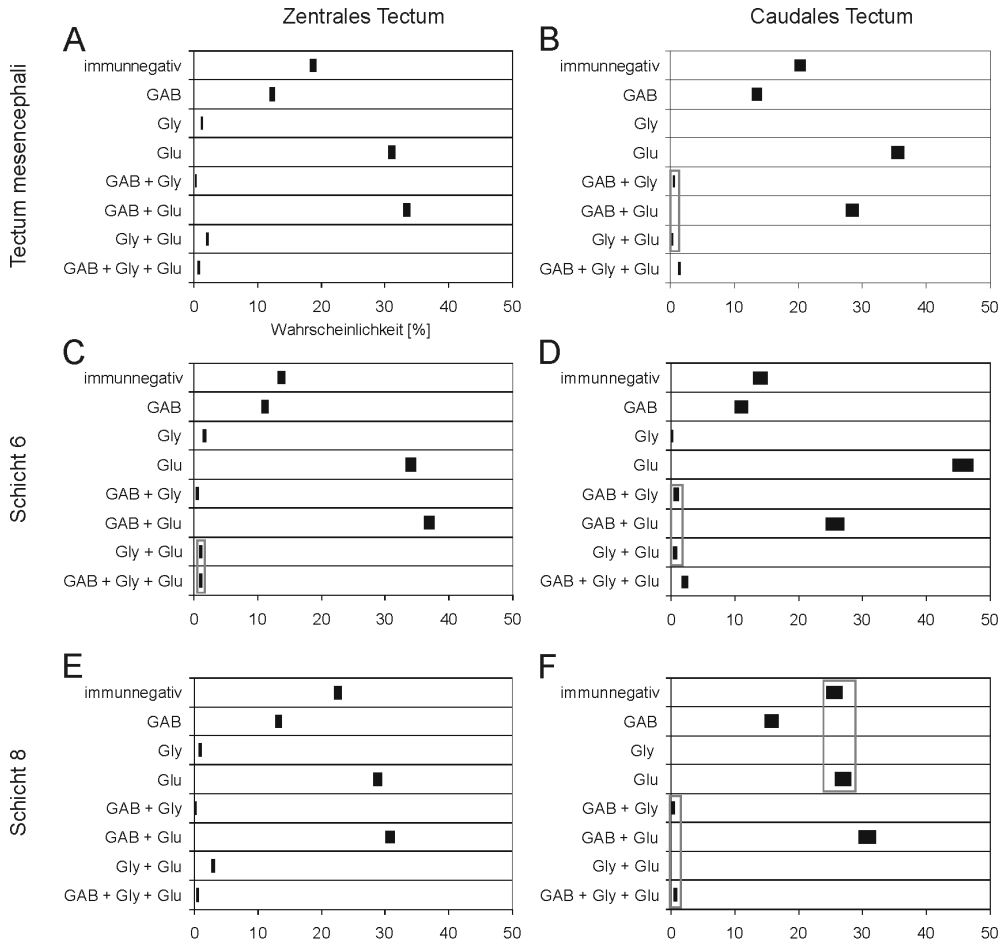


Abb. 29: Eine statistische Analyse der Auftrittswahrscheinlichkeiten der einzelnen Transmitter und ihrer Kolokalisationen im gesamten zentralen (**A**) und caudalen (**B**) Tectum sowie der einzelnen zentralen (**C, E**) und caudalen (**D, F**) Zellkörperschichten zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Transmitterlokalisationen. Die vertikalen Balken geben die Auftrittswahrscheinlichkeit der einzelnen Transmitter und ihrer Kolokalisationen sowie der immunnegativen Somata an. Die grauen Rahmen gruppieren Einfach-, Ko- und Dreifachlokalisationen mit nicht signifikant unterschiedlichen Auftrittswahrscheinlichkeiten.

3.3.7 Neurone des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini

Im Tectum mesencephali von *Plethodon shermani* lassen sich vereinzelt in den tieferen Schichten der Zellkörperschicht 6 bzw. in der oberen Zellreihe der Zellkörperschicht 8 an der Grenze zur Faserschicht 7 Neurone des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini lokalisieren (Abb. 21, 26). Die Identifizierung dieser Neurone ist anhand ihrer sehr großen Somata möglich. In *Plethodon* wurde für Mesencephalicusneurone ein mittlerer Durchmesser der Somata von 25x31µm ermittelt. Alle identifizierten Mesencephalicusneurone waren immunreaktiv für Glutamat und Glycin (Abb. 21, 26). GABA wurde in den Somata der Neurone nicht nachgewiesen (Abb. 26).

3.3.8 Transmitterspezifität tectaler Projektionsneurone

Nach unilateraler Applikation von Biocytin im ventromedial bzw. ventrolateral absteigenden Trakt der Medulla oblongata (n = 4) wurde eine Vielzahl tecto-bulbarer Projektionsneurone im Tectum mesencephali retrograd markiert. In der vorliegenden Stichprobe wurden nach einer Applikation im ventromedial absteigenden Trakt sehr viele Neurone im zentralen Tectum detektiert, während im caudalen Tectum weniger Zellen nachgewiesen wurden (Abb. 30). Dem entgegen wurden nach einer Applikation im ventrolateral absteigenden Trakt sehr viele Neurone im caudalen Tectum (Abb. 31) und weniger Zellen im zentralen Tectum markiert.

Die Mehrheit aller Projektionsneurone des Tectum befand sich ipsilateral zur Applikationsstelle in den beiden Zellkörperschichten. Im contralateralen Tectum wurde nur ein Viertel der retrograd markierten Neurone lokalisiert. Insgesamt wurde eine Stichprobe von 236 Neuronen in den beiden Zellkörperschichten des ipsilateralen Tectum auf ihren Transmittergehalt untersucht. Davon wurden 110 Zellen im zentralen und 126 Somata im caudalen Tectum lokalisiert. Das Verhältnis der Anzahl der markierten Projektionsneurone der Schicht 6 zur Schicht 8 betrug 1,5 : 1 im gesamten ipsilateralen Tectum. In den beiden Zellkörperschichten des contralateralen Tectum wurde eine Stichprobe von insgesamt 84 Neuronen cytochemisch charakterisiert. Davon befanden sich 69 Zellen im zentralen und 15 Somata im caudalen Tectum. Das Verhältnis der Anzahl der Projektionsneurone der Schicht 6 zur Schicht 8 betrug 9 : 1 im zentralen Bereich des contralateralen Tectum. Im caudalen contralateralen Tectum wurden kaum Neurone in der Schicht 8 retrograd markiert. Folglich befinden sich in der Schicht 6 vorwiegend Projektionsneurone, deren Axone contralateral im ventromedialen Trakt absteigen.

Im kombinierten tracing-immunhistochemischen Experiment waren 87% aller retrograd markierten Somata immunreaktiv für Glutamat. Diese Zellen waren entweder rein glutamaterg (45%) oder kolokalisiert mit GABA (42%). Glycin hingegen wurde nur in einer einzigen Zelle des contralateralen Tectum nachgewiesen (Abb. 30A).

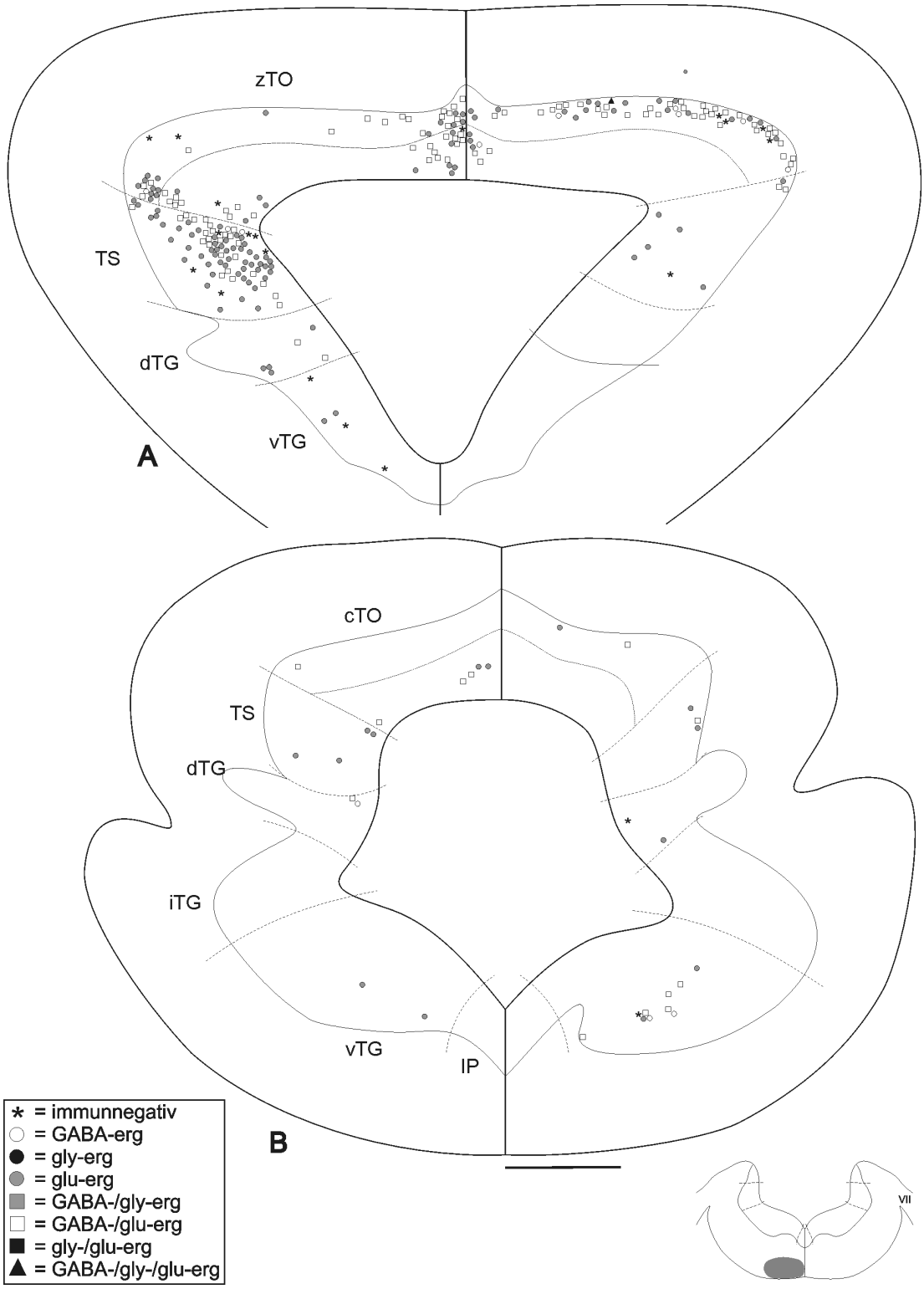


Abb. 30: Schematische Darstellung ventromedial deszendierender Projektionsneurone des zentralen (**A**) und caudalen (**B**) Mesencephalon und ihres Transmittergehaltes bei *Plethodon shermani*. Die eingetragenen Neurone umfassen die Summe aller detektierten Neurone innerhalb eines 100µm dicken zentralen bzw. caudalen Teilstückes eines Individuums. Der schematische Querschnitt der rostralen Medulla zeigt den Bereich der Biocytin-Applikation im ventromedialen Trakt. Die gestrichelten Linien begrenzen die einzelnen mesencephalen Areale. zTO = zentraler Bereich, cTO = caudaler Bereich des Tectum opticum; TS = Torus semicircularis; dTG = dorsales Tegmentum; vTG = ventrales Tegmentum; iTG = Tegmentum isthmi; IP = Nucleus interpeduncularis; VII = Eintritt des VII. Kranialnerven. Maßstab entspricht 200µm.

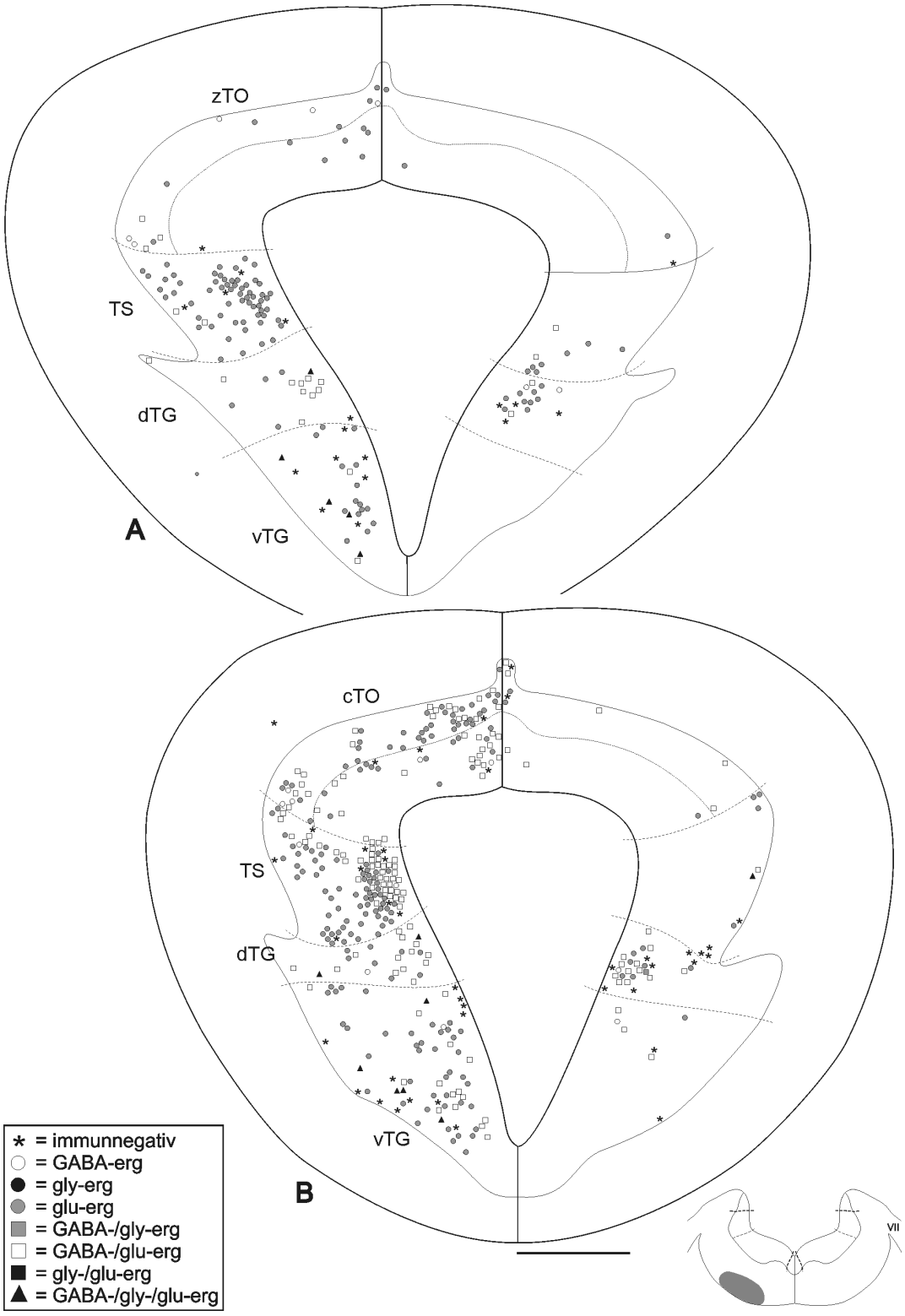


Abb. 31: Schematische Darstellung ventrolateral deszendierender Projektionsneurone des zentralen (**A**) und caudalen (**B**) Mesencephalon und ihres Transmittergehaltes bei *Plethodon shermani*. Die eingetragenen Neurone umfassen die Summe aller detektierten Neurone innerhalb eines 100µm dicken zentralen bzw. caudalen Teilstückes eines Individuums. Der schematische Querschnitt der rostralen Medulla zeigt den Bereich der Biocytin-Applikation im ventrolateralen Trakt. Die gestrichelten Linien begrenzen die einzelnen mesencephalen Areale. zTO = zentraler Bereich, cTO = caudaler Bereich des Tectum opticum; TS = Torus semicircularis; dTG = dorsales Tegmentum; vTG = ventrales Tegmentum; iTG = Tegmentum isthmi; IP = Nucleus interpeduncularis; VII = Eintritt des VII. Kranialnerven. Maßstab entspricht 200µm.

Im Folgenden werden die einzelnen Neurone mit ipsi- bzw. contralateral deszendierenden Projektionen in die Medulla oblongata hinsichtlich ihrer Lage innerhalb der tectalen Zellkörperschichten, ihrer axonalen Projektionen in den unterschiedlichen deszendierenden Trakte und ihres spezifischen Transmittergehaltes charakterisiert und den durch Dicke (1999) und Roth und Kollegen (1999) bestimmten Typen tectaler Projektionsneurone zugeordnet. Der Verlauf der Dendritenbäume der einzelnen Neurone konnte im Semidünnschnitt nicht verfolgt werden.

3.3.8.1 Neurone mit ipsilateral deszendierenden Projektionen

Die Mehrzahl aller tectalen Projektionsneurone mit deszendierenden Projektionen wurde im ipsilateralen Tectum gefunden. In der vorliegenden Untersuchung wurden in der Zellkörperschicht 6 des ipsilateralen Tectum die Neuronentypen TO2 und TO3 anhand der Lokalisation ihrer Somata und ihrer unterschiedlichen deszendierenden Trakte identifiziert. In der Schicht 8 des ipsilateralen Tectum wurden tiefliegende TO3-Neurone und TO4-Neurone nachgewiesen. Die mittlere Somagröße aller TO2-, TO3- und TO4-Neurone betrug 10x13µm im Semidünnschnitt. Dies entspricht annähernd der bei Dicke und Kollegen (1998) und Roth und Kollegen (1999) beschriebenen Somagröße dieser Neuronentypen.

Nach einer Applikation von Biocytin im **ventromedial absteigenden Trakt** wurden TO3-Neurone besonders im zentralen Tectum in zwei verschiedenen Populationen innerhalb der Schicht 6 markiert (Abb. 30A, 32). Die mediane Population entlang der Mittellinie des Tectum zeigte ein erhöhtes Auftreten von GABA und Glutamat in den Somata der TO3-Neurone, während in der lateralen Population, die im lateralen Tectum an der Grenze zum Torus semicircularis lag, vermehrt rein glutamaterge Neurone vorkamen. In der Schicht 8 wurden tiefliegende TO3-Neurone ebenfalls in einer medianen und einer lateralen Population markiert (Abb. 30A, 32). In beiden Populationen wurde häufig eine Kolokalisation von GABA und Glutamat nachgewiesen.

In einer Stichprobe wurden im zentralen Tectum insgesamt 71 (Tab. 8) und im caudalen Tectum 7 Projektionsneurone nach einer Applikation von Biocytin im ventromedialen Trakt lokalisiert und immunhistochemisch charakterisiert. Im gesamten ipsilateralen Tectum wurden insgesamt 40 TO3-Neurone in der Schicht 6 untersucht. Die Mehrheit aller TO3-Neurone der Schicht 6 war immunreaktiv für Glutamat. Etwa die Hälfte (46%; SF ± 16,36) dieser Zellen war zusätzlich immunreaktiv für GABA.

In der Zellkörperschicht 8 wurde eine Stichprobe von insgesamt 37 tiefliegenden TO3-Neuronen im ipsilateralen Tectum nach einer Applikation von Biocytin im ventromedialen Trakt immunhistochemisch untersucht. Die Mehrheit aller tiefliegenden TO3-Neurone war immunreaktiv für Glutamat. Der Anteil von Neuronen mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat betrug im gesamten ipsilateralen Tectum 59% (SF ± 17,83). Demzufolge waren tiefliegende TO3-Neurone vorwiegend immunreaktiv für GABA und Glutamat.

Tab. 8: Transmittergehalt von Neuronen mit ventromedial absteigenden Projektionen

Neurone		neg	GABA	Glu	GABA + Glu	Summe
TO3 in 6	N	2	2	17	18	39
	%	5,1	5,1	43,6	46,2	100,0
TO3 in 8	N	2		11	19	32
	%	6,3		34,4	59,4	100,0

N gibt die Anzahl der ipsilateral retrograd markierten Projektionsneurone nach einer Applikation von Biocytin im ventromedial absteigenden Trakt im zentralen Tectum an. Der Prozentwert gibt die prozentuale Häufigkeit der Anzahl immunhistochemisch charakterisierter Projektionsneurone bezogen auf den jeweiligen Neuronentyp an.

Nach einer Applikation von Biocytin im **ventrolateral absteigenden Trakt** wurden die Somata der TO2- und TO3-Neurone in einer jeweils weitläufigeren medianen und lateralen Population markiert (Abb. 31). Eine Unterscheidung dieser beiden Neuronentypen war aufgrund der identischen Lage und der gleichen ventrolateral absteigenden Projektionen im Semidünnschnitt nicht möglich, da der für diese Neurone charakteristische Verlauf der Dendriten nicht verfolgt werden konnte. Während die mediane Population viele rein glutamaterge Neurone und besonders im caudalen Tectum auch einige Neurone mit GABA und Glutamat enthielt, wurden in der lateralen Population vorwiegend Neurone mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat und rein GABAerge Neurone gefunden. In der Schicht 8 wurden TO4-Neurone im zentralen Tectum nur vereinzelt in einer medianen Population identifiziert. Diese Zellen waren überwiegend rein glutamaterg. Im caudalen Tectum wurden in einer jeweils weitläufigeren medianen und lateralen Population TO4-Neurone markiert, die sehr häufig immureaktiv für GABA und Glutamat waren. Einige Zellen waren rein glutamaterg.

Bei einer quantitativen Stichprobe wurden nach einer Applikation von Biocytin im ventrolateralen Trakt insgesamt 100 TO2- und TO3-Neurone in der Zellkörperschicht 6 immunhistochemisch charakterisiert, von denen 27 Neurone im zentralen (Tab. 9) und 73 Somata im caudalen Tectum (Tab. 10) lokalisiert wurden. Die Mehrheit aller TO2- bzw. TO3-Neurone war immunreaktiv für Glutamat. Der Anteil rein glutamaterger TO2- bzw. TO3-Neurone betrug 56% (SF ± 19,60) im zentralen und 64% (SF ± 11,47) im caudalen Tectum. Rein GABAerge TO2- bzw. TO3-Neurone wurden nur im zentralen Tectum (22%; SF ± 16,82) lokalisiert, während im caudalen Tectum 26% (SF ± 10,85) der TO2- und TO3-Neurone immunreaktiv für GABA und Glutamat waren.

In der Zellkörperschicht 8 wurde eine Stichprobe von insgesamt 59 TO4-Neurone nach einer Applikation von Biocytin im ventrolateralen Trakt ipsilateral zur Applikationsstelle untersucht. Die Mehrheit dieser Zellen war immunreaktiv für Glutamat. Der Anteil von TO4-Neuronen mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat betrug im zentralen Tectum 17% (SF ± 23,16) (Tab. 9) und 45% (SF ± 14,86) im caudalen Tectum (Tab. 10).

Tab. 9: Transmittergehalt von Neuronen mit ventrolateral absteigenden Projektionen

Neurone		neg	GABA	Glu	GABA + Glu	Summe
TO2 & TO3 in 6	N	2	6	15	4	27
	%	7,4	22,2	55,6	14,8	100,0
TO4 in 8	N	1		9	2	12
	%	8,3		75,0	16,7	100,0

N gibt die Anzahl der ipsilateral retrograd markierten Projektionsneurone nach einer Applikation von Biocytin im ventrolateral absteigenden Trakt im zentralen Tectum an. Der Prozentwert gibt die prozentuale Häufigkeit der Anzahl immunhistochemisch charakterisierter Projektionsneurone bezogen auf den jeweiligen Neuronentyp an.

Tab. 10: Transmittergehalt von Neuronen mit ventrolateral absteigenden Projektionen

Neurone		neg	GABA	Glu	GABA + Glu	Summe
TO2 & TO3 in 6	N	5	2	47	19	73
	%	6,9	2,7	64,4	26,0	100,0
TO4 in 8	N	5	2	19	21	47
	%	10,6	4,3	40,4	44,7	100,0

N gibt die Anzahl der ipsilateral retrograd markierten Projektionsneurone nach einer Applikation von Biocytin im ventrolateral absteigenden Trakt im caudalen Tectum an. Der Prozentwert gibt die prozentuale Häufigkeit der Anzahl immunhistochemisch charakterisierter Projektionsneurone bezogen auf den jeweiligen Neuronentyp an.

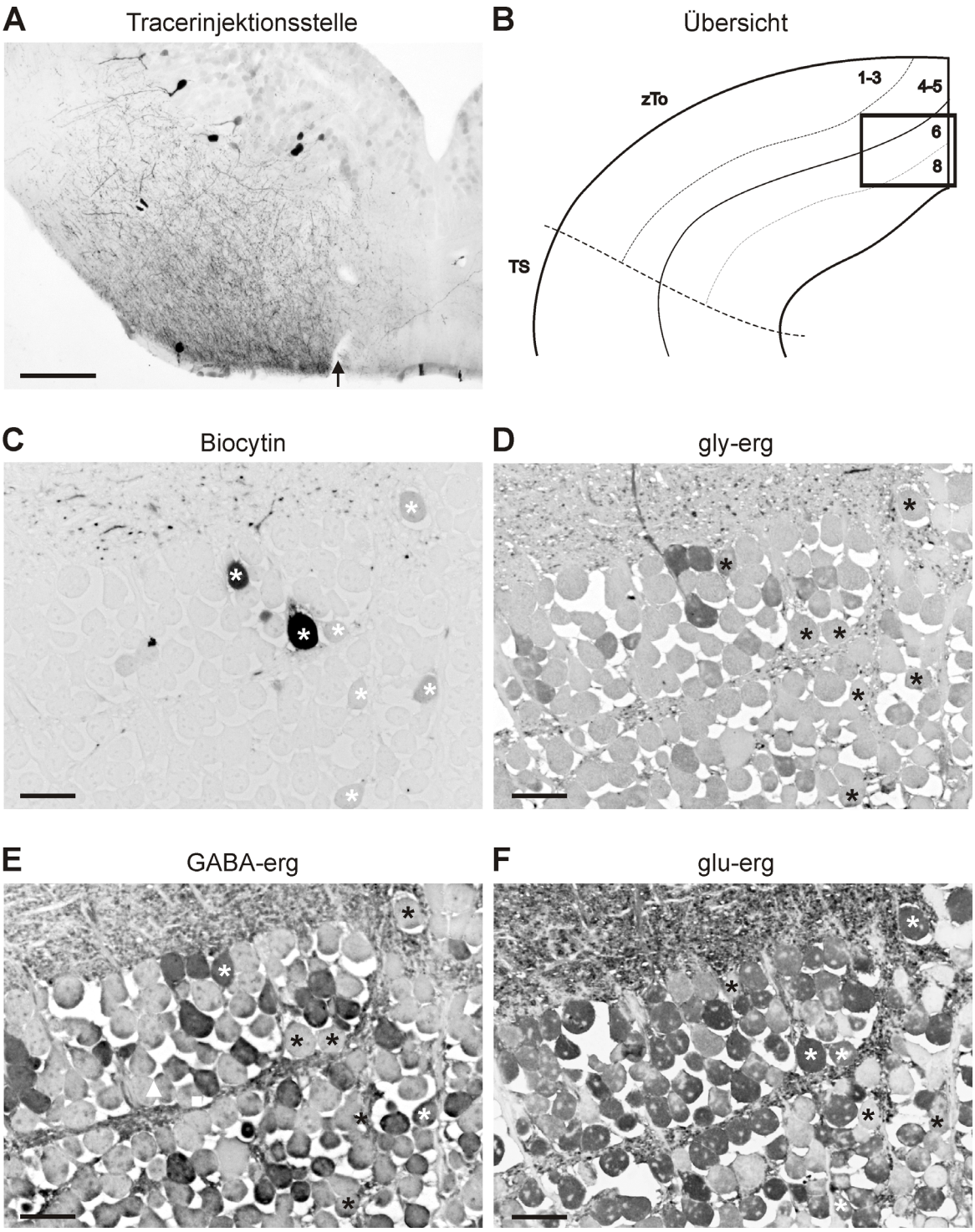


Abb. 32: Die mikroskopischen Aufnahmen transversaler Semidünn- und Vibratomschnitte durch das Tectum mesencephali und die rostrale Medulla oblongata bei *Plethodon shermani* zeigen retrograd markierte Neurone ipsilateral zur Applikationsstelle von Biocytin und ihren jeweiligen Transmittergehalt. **A:** Der Vibratomschnitt illustriert die Applikationsstelle von Biocytin in der Medulla. Der Pfeil zeigt auf die Läsionsstelle. **B:** Der Ausschnitt der medianen Population im ipsilateralen zentralen Tectum (zTo), welche in **C-F** gezeigt wird, ist im schematischen Querschnitt des Tectum angezeigt. Die mikroskopischen Aufnahmen **C-F** zeigen aufeinander folgende Semidünnschnitte, die für Biocytin (**C**), Glycin (**D**), GABA (**E**) und Glutamat (**F**) markiert sind. Weiße Sternchen demonstrieren Biocytin markierte immunpositive Somata, schwarze Sternchen illustrieren Biocytin markierte immunnegative Somata. Medial ist rechts, dorsal ist oben. TS = Torus semicircularis. Maßstab entspricht 100µm in A, 20µm in C-F.

3.3.8.2 Neurone mit contralateral deszendierenden Projektionen

Nach einer Applikation von Biocytin im ventromedial absteigenden Trakt wurden sehr viele Neurone im zentralen Tectum contralateral zur Applikationsstelle retrograd markiert (Abb. 30), während eine Applikation von Biocytin im ventrolateral absteigenden Trakt nur sehr vereinzelt zu einer Markierung contralateraler tectaler Projektionsneurone führte (Abb. 31). In der Schicht 6 des Tectum waren contralateral markierte Zellen gleichmäßig über die gesamte mediolaterale Ausdehnung im dorsalen Bereich der Zellkörperschicht verteilt. Es handelt sich somit vermutlich um TO1-Neurone, welche im dorsalen Bereich der Zellkörperschicht 6 an der Grenze zur Faserschicht 5 lokalisiert sind (Dicke et al., 1998; Dicke, 1999; Roth et al., 1999). Diese Zellen wiesen sehr häufig die Kolokalisation GABA-Glutamat auf oder waren rein glutamaterg (Abb. 30A, 33). In der Schicht 8 des contralateralen Tectum wurden nur sehr vereinzelt retrograd markierte Neurone nachgewiesen, deren Axone gekreuzt in die Medulla oblongata abstiegen. Hierbei handelt es sich vermutlich um TO4-Neurone. Diese Zellen waren in einer medianen Population lokalisiert und enthielten Glutamat oder GABA und Glutamat (Abb. 30, 31).

TO1-Neurone wurden am häufigsten im contralateralen Tectum markiert. Ihre Somata waren mit einer mittleren Größe von 11x14µm etwas größer als die Somata aller anderen tectalen Neurone (siehe 3.3.2). In einer quantitativen Stichprobe wurden 62 TO1-Neurone des zentralen Tectum immunhistochemisch charakterisiert (Tab. 11), während im caudalen Tectum 15 Somata dieses Zelltyps untersucht wurden. Die Mehrheit der TO1-Neurone war immunreaktiv für Glutamat. Etwa die Hälfte dieser Zellen war zusätzlich immunreaktiv für GABA. Rein glutamaterge TO1-Neurone wurden zu 29% (SF ± 11,87) nachgewiesen, während rein GABAerge Zellen mit einer Häufigkeit von 6% (SF ± 6,96) detektiert wurden.

Die zweite Gruppe contralateral markierter Neurone im Tectum mesencephali bildeten Neurone, die aufgrund ihrer Lage und axonalen Projektion als TO4-Neurone identifiziert wurden. In einer Stichprobe wurden insgesamt nur 7 dieser Zellen in einer medianen Population innerhalb der Zellkörperschicht 8 des zentralen Tectum lokalisiert, von denen 5 Neurone immunreaktiv für GABA und Glutamat waren (Tab. 11).

Tab. 11: Transmittergehalt von Neuronen mit ventromedial absteigenden Projektionen

Neurone		neg	GABA	Glu	GABA + Glu	GABA + Gly + Glu	Summe
TO1	N	6	4	18	33	1	62
in 6	%	9,7	6,5	29,0	53,2	1,6	100,0
TO4	N		1	1	5		7
in 8	%		14,3	14,3	71,4		100,0

N gibt die Anzahl der contralateral retrograd markierten Projektionsneurone nach einer Applikation von Biocytin im ventromedial absteigenden Trakt im zentralen Tectum an. Der Prozentwert gibt die prozentuale Häufigkeit der Anzahl immunhistochemisch charakterisierter Projektionsneurone bezogen auf den jeweiligen Neuronentyp an.

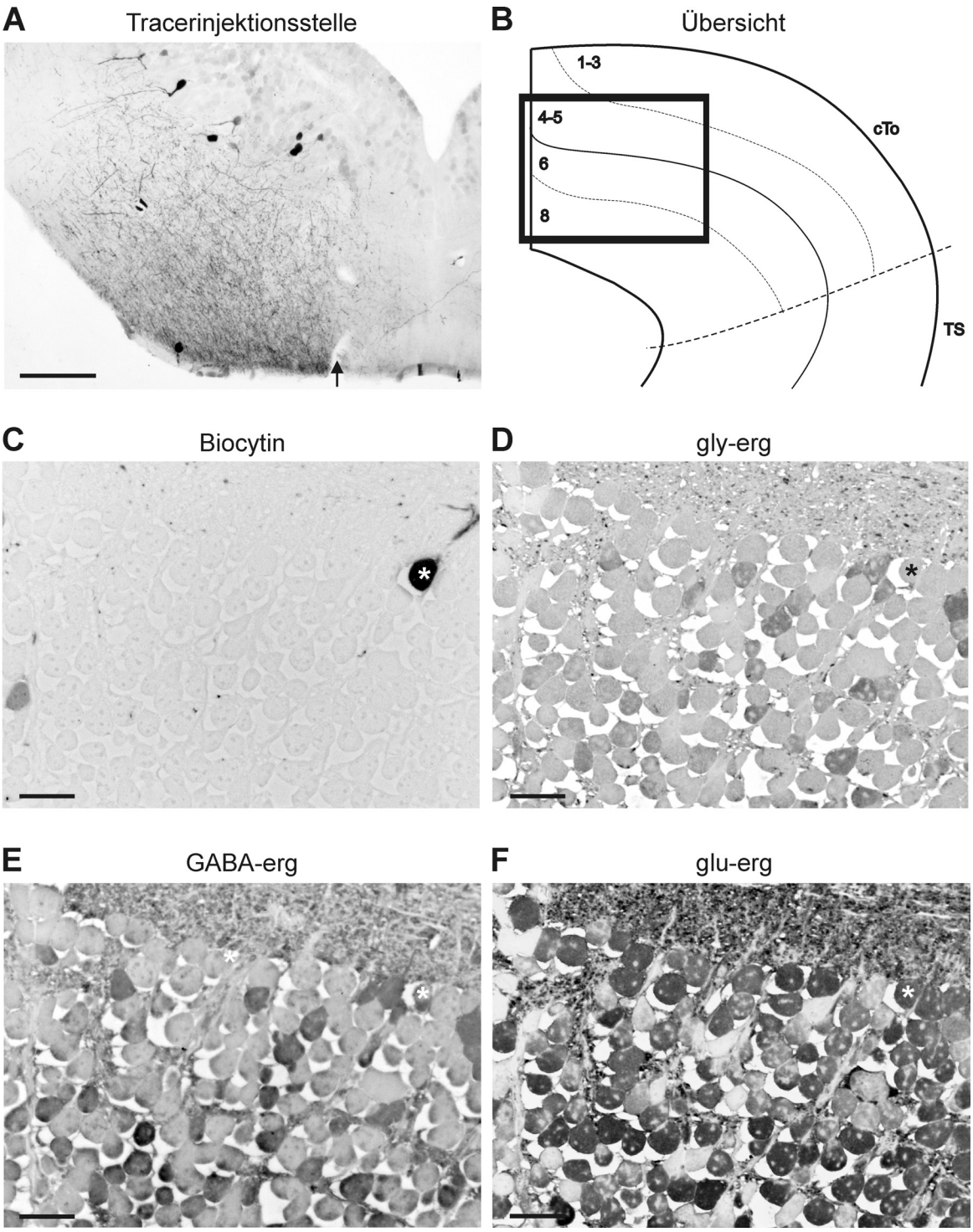


Abb. 33: Die mikroskopischen Aufnahmen transversaler Semidünn- und Vibratomschnitte durch das Tectum mesencephali und die rostrale Medulla oblongata bei *Plethodon shermani* zeigen retrograd markierte Neurone contralateral zur Applikationsstelle von Biocytin und ihren jeweiligen Transmittergehalt. **A:** Der Vibratomschnitt illustriert die Applikationsstelle von Biocytin in der Medulla. Der Pfeil zeigt auf die Läsionsstelle. **B:** Der Ausschnitt im medianen Bereich des contralateralen caudalen Tectum (cTo), welcher in **C-F** gezeigt wird, ist im schematischen Querschnitt des Tectum angezeigt. Die mikroskopischen Aufnahmen **C-F** zeigen aufeinander folgende Semidünnschnitte, die für Biocytin (**C**), Glycin (**D**), GABA (**E**) und Glutamat (**F**) markiert sind. Weiße Sternchen demonstrieren Biocytin markierte immunpositive Somata, schwarze Sternchen illustrieren Biocytin markierte immunnegative Somata. Medial ist links, dorsal ist oben. TS = Torus semicircularis. Maßstab entspricht 100µm in A, 20µm in C-F.

3.3.9 Subzelluläre Strukturen im Tectum mesencephali

Elektronenmikroskopisch ließ sich die Laminierung des Tectum mesencephali von *Plethodon shermani* deutlich anhand subzellulärer Strukturen erkennen. Die retinalen Faserschichten (1-3) waren durch viele unmyelinisierte Fasern charakterisiert, die untereinander eine Vielzahl von synaptischen Kontakten ausbildeten. Viele der unmyelinisierten Strukturen waren Teile von Dendriten der tectalen Neurone. Es handelte sich hierbei um relativ große Faserstrukturen (bis zu 3µm dick) mit Mikrotubuli, Mitochondrien und z.T. relativ gleichmäßig verteilten Vesikeln. Axonale Strukturen hingegen waren durch eine Vielzahl von dichtgepackten Vesikeln, deren Durchmesser rund 30nm betrug, charakterisiert. Diese Axonterminalien waren mit einer Größe von 120–580nm deutlich dünner als die dendritischen Fasern.

In den efferenten Faserschichten (4-5) verliefen viele unmyelinisierte Fasern und eine Vielzahl myelinisierter Axone. Letztere sind die efferenten Axone der tectalen Projektionsneurone (Székely und Lázár, 1976), die besonders häufig in der Schicht 4 lokalisiert sind und das Tectum über diese Schicht verlassen. In der Faserschicht 5 war der Anteil myelinisierter Fasern deutlich geringer. Viele der unmyelinisierten Fasern waren Teile der Primärdendriten von TO1-, TO2- und TO4-Neuronen bzw. Interneuronen oder von Dendriten der TO3-Neurone, welche vorwiegend in den Schichten 4 und 5 des Tectum aborisierten. Viele axonale Strukturen wurden in den tieferen Schichten des Tectum lokalisiert. Zudem wurden vereinzelt migrierte Somata in den tieferen Faserschichten des Tectum nachgewiesen. Synapsen wurden in allen Faserschichten sowohl zwischen Axonen und Dendriten (axo-dendritisch) als auch zwischen dendritischen Strukturen untereinander (dendro-dendritisch) lokalisiert.

Die Zellkörperschichten 6 und 8 des Tectum mesencephali bestanden aus vielen dichtgepackten Somata. Die sehr großen Nuclei der Zellen waren nur von einem dünnen Zytoplasmasaum umgeben. Die einzelnen Somata waren durch sehr dünne Fasern voneinander getrennt. Beide Zellkörperschichten waren durch eine relativ dünne Faserschicht 7 voneinander getrennt, welche ausschließlich aus unmyelinisierten Fasern bestand. An der Grenze zum Ventrikel befand sich eine Reihe ependymaler Gliazellen. Die Somata dieser Zellen erschienen unter dem Elektronenmikroskop als langgestreckte Strukturen mit relativ wenigen subzellulären Kompartimenten.

Im Folgenden wird zunächst die Qualität der Markierung im elektronenmikroskopischen Präparat beschrieben. Anschließend erfolgt eine Darstellung der synaptischen Verschaltung glycinerger und serotonerger Fasern im Tectum.

3.3.9.1 Qualität der Immungolddoppelmarkierung

Nach einer unilateralen Applikation von Biocytin im ventromedialen Trakt der Medulla oblongata wurden ipsilateral TO3-Neurone markiert, während contralateral vorwiegend TO1-Neurone in großer Zahl markiert wurden. Die Markierung der Projektionsneurone entsprach der unter 3.3.8 beschriebenen Verteilung. Glycinerge Fasern wurden in den Faserschichten 4, 5 und 7 des Tectum markiert, während serotonerge Fasern in den Schichten 2-4 detektiert wurden.

Unter dem Elektronenmikroskop ließen sich bei einer 18.500fachen Vergrößerung neben einer deutlichen Unterscheidung subzellulärer Strukturen Markierungen für Biocytin und Neurotransmitter klar erkennen (Abb. 34). Immungoldmarkierungen für Biocytin hatten eine durchschnittliche Körnergröße von 50-70nm, während die Körnergröße für die Immungoldmarkierungen der Neurotransmitter 17-30nm betrug. Die einzelnen Markierungen einer Körnergröße waren relativ gleichmäßig, so dass eine Zuordnung der einzelnen Körner zu den beiden Nachweisen möglich war.

Bei der Mehrheit der Markierungen wurden innerhalb einer Faserstruktur nur wenige (<10) Körner lokalisiert. Vereinzelt wurden massive Anfärbungen einer Faserstruktur nachgewiesen, bei denen eine Identifikation der subzellulären Strukturen nicht möglich war. Daher beruhen die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse auf der Analyse der Einzelmarkierungen von Körnern (<10). Aufgrund sehr geringer Hintergrundanfärbungen ist davon auszugehen, dass die Einzelmarkierungen spezifischen Anfärbungen für Biocytin bzw. den jeweiligen Neurotransmitter entsprechen.

Markierungen für Biocytin wurden vorwiegend in unmyelinisierten Fasern lokalisiert. Nur sehr vereinzelt wurden auch myelinisierte Axone markiert.

3.3.9.2 Synaptische Verschaltung von Neuronen mit deszendierenden Projektionen

Unter dem Elektronenmikroskop wurde eine Vielzahl biocytinmarkierter Fasern von deszendierenden Tectumneuronen detektiert (Abb. 34). Markierungen für Biocytin wurden sowohl im Zytoplasma der Zellsomata in der Schicht 6 und 8 gefunden, als auch in dendritischen und vereinzelt in axonalen Strukturen. Die Häufigkeit und damit die Stärke der Markierungen für Biocytin nahm mit der Entfernung zum Soma ab. So wurden sehr viele Markierungen vorwiegend in Somanähe und in den tieferen Faserschichten 4, 5 und 7 lokalisiert. In den retinalen Faserschichten 1-3 wurden Markierungen biocytinhaltiger Dendriten in geringerer Anzahl nachgewiesen.

Erste Ergebnisse zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der synaptischen Verschaltung glycinerger, serotonerger, GABAerger oder unmarkierter Axone auf ipsilateral bzw. contralateral deszendierende Projektionsneurone. Daher wird im Folgenden die synaptische Verschaltung dieser Axone auf ipsilateral absteigende Projektionsneurone dargestellt.

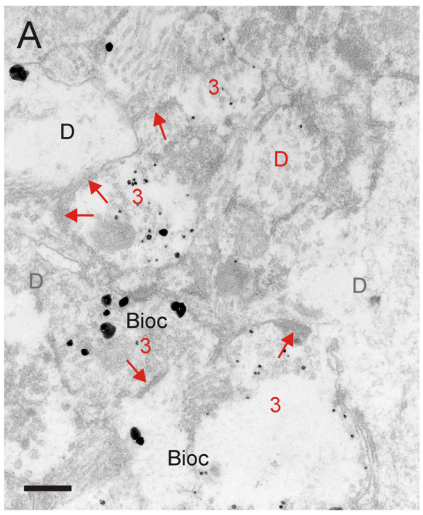
Zur Beschreibung der unterschiedlichen synaptischen Terminalien im Tectum mesencephali wird die Nomenklatur von Székely und Lázár (1976) verwendet und hinsichtlich der eigenen Daten erweitert. Entsprechend dieser Nomenklatur werden retinale Afferenzen im Tectum von Fröschen als Typ-1-Terminalien bezeichnet. Typ-2-Terminalien beschreiben eine inhomogene Gruppe axonaler Strukturen in den retinalen Faserschichten, deren Ursprung nicht eindeutig zu identifizieren ist. Laut Székely und Lázár (1976) sind einige der Typ-2-Terminalien diencephalen Ursprungs (Thalamus). Es lässt sich jedoch vermuten, dass auch isthmische Axone oder serotonerge Afferenzen der Nuclei raphes zur Gruppe der Typ-2-Terminalien hinzugezählt werden müssen. Typ-3-Terminalien definieren tectale dendritische Terminalien, die zu anderen tectalen dendritischen Fasern symmetrische Synapsen ausbilden. Intratectale Axonterminalien wurden als Typ-4-Terminalien bezeichnet.

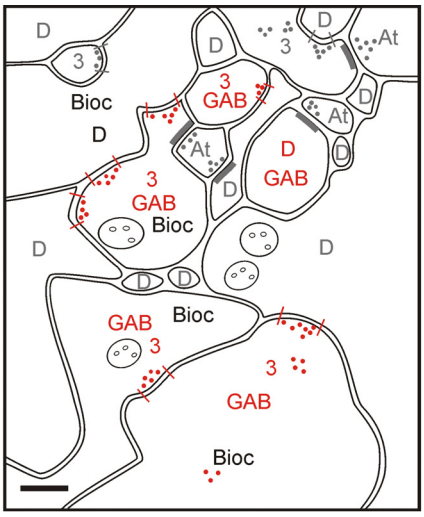
Ergänzend zu dieser Nomenklatur wird im Folgenden der Terminus „Typ-5-Terminalien“ eingeführt. Hierbei handelt es sich um glycinerge Axonterminalien, die bei *Plethodon shermani* in den tieferen Faserschichten 4, 5 und 7 des Tectum lokalisiert wurden.

Zunächst wird die synaptische Verschaltung GABAerger Fasern tectaler Neurone beschrieben. Anschließend erfolgt die Darstellung der synaptischen Verschaltung 5-HT-haltiger und glycinerger Axone im Tectum mesencephali, sowie die Beschreibung anderer axo-dendritischer Kontakte.

GABA

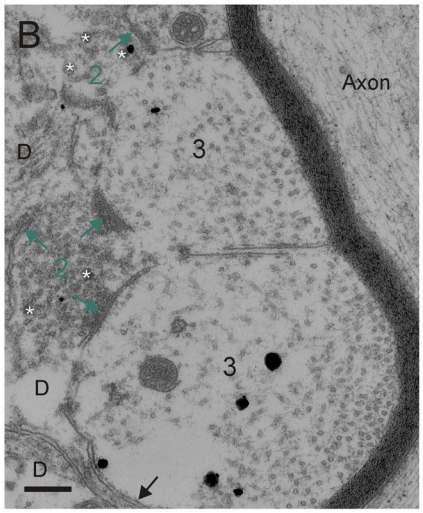
Schicht 3
30.000x

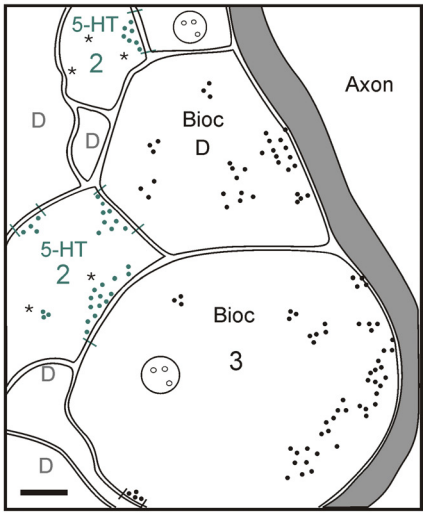




5-HT

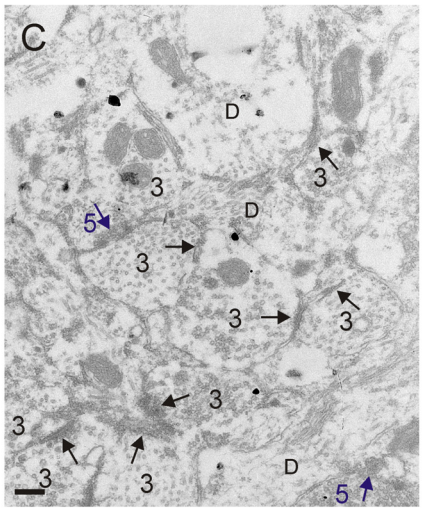
Schicht 4
30.000x

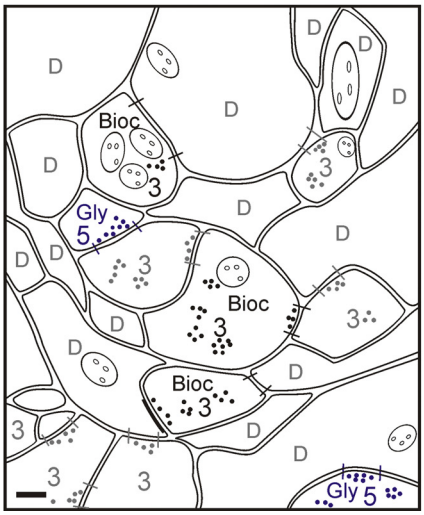




Glycin

Schicht 4
18.500x





= Mitochondrium

= symmetrische Synapse

= asymmetrische Synapse

Abb. 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (linke Seite) zur Dokumentation synaptischer Kontakte (Pfeile) zwischen ipsilateral markierten Projektionsneuronen (große Körner) und GABAergen (**A**), serotonergen (**B**) und glycinergen (**C**) Fasern (kleine Körner) im Tectum mesencephali von *Plethodon shermani.* Die rechte Seite zeigt eine schematische Darstellung des elektronenmikroskopischen Bildes. Die Zahlen geben die Bezeichnung der verschiedenen Typen von Terminalien an; 2 = Typ-2-Terminalien, 3 = Typ-3-Terminalien, 5 = Typ-5-Terminalien. Schwarze Beschriftungen betiteln Biocytinmarkierungen, rote bezeichnen GABAerge Markierungen, türkise beschriften 5-HT-immunreaktive Strukturen und blaue Beschriftungen zeigen glycinerge Strukturen. Unmarkierte subzelluläre Strukturen sind durch graue Beschriftungen gekennzeichnet. Sternchen markieren dense-cored Vesikel, Kreise markieren agranuläre Vesikel. D = dendritische Faser; Axon = axonale Faser; At = Axonterminalie. Maßstab entspricht 200nm.

3.3.9.3 Synaptische Verschaltung GABAerger Fasern

Immungoldmarkierungen für GABA wurden in allen Schichten des Tectum nachgewiesen. In den Faserschichten 1-5 und 7 wurden GABAerge Markierungen sowohl in axonalen als auch in dendritischen Strukturen detektiert (Abb. 34A). Die Zellkörperschichten 6 und 8 zeigten ebenso eine Vielzahl GABAerger Markierungen. GABA wurde hier vorwiegend in dendritischen Strukturen oder im Zytoplasmasaum der Somata nachgewiesen. Immungoldmarkierungen für GABA und Biocytin wurden häufig innerhalb der gleichen dendritischen Faser nachgewiesen (Abb. 34A).

In den retinalen Faserschichten 1-3 sowie in der efferenten Faserschicht 4 wurden viele dendro-dendritische Kontakte zwischen Typ-3-Terminalien und anderen dendritischen Strukturen nachgewiesen. Viele der Typ-3-Terminalien waren immungolddoppelmarkiert für GABA und Biocytin. Es handelte sich also um Typ-3-Terminalien GABAerger Projektionsneurone. Eine Vielzahl dieser Terminalien bildete Synapsen zu biocytinunmarkierten Dendriten aus. Einige dieser Dendriten waren immungoldmarkiert für GABA. Zum Teil wurden auch synaptische Kontakte zwischen GABAergen Projektionsneuronen und biocytinmarkierten Dendriten untereinander nachgewiesen.

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass GABA sowohl in tecto-bulbaren Projektionsneuronen als auch in Interneuronen lokalisiert ist und innerhalb des Tectum auf benachbarte tectale Interneurone oder auch Projektionsneurone einwirkt.

3.3.9.4 Synaptische Verschaltung 5-HT-positiver Axone

Immungoldmarkierungen für 5-HT wurden vorwiegend in den retinalen Faserschichten 2 und 3 sowie in der efferenten Faserschicht 4 des Tectum mesencephali lokalisiert. Demzufolge wurden synaptische Kontakte zwischen 5-HT-positiven Axonen und biocytinmarkierten dendritischen Strukturen ausschließlich in diesen Faserschichten detektiert (Abb. 34B). Entsprechend ihrer Lage und subzellulären Struktur ließen sich die 5-HT-positiven Axonterminalien zur inhomogenen Gruppe der nach Székely und Lázár (1976) bezeichneten

Typ-2-Terminalien zuordnen. Serotonerge Typ-2-Terminalien hatten eine relativ gleichmäßige runde oder ovale Form. Ihre Größe betrug 250-900nm. Sie waren dicht gepackt mit 30nm großen agranulären Vesikeln. Vereinzelt ließen sich dense-cored Vesikel erkennen, deren Größe 70-80nm betrug (Abb. 34B). Diese serotonergen Axonterminalien bildeten kleine Synapsen von 70-300nm Länge.

Vereinzelt wurden 5-HT-positive Typ-2-Terminalien detektiert, die gleichzeitig synaptische Kontakte zu biocytinhaltigen und unmarkierten dendritischen Strukturen und/oder mehreren unterschiedlichen biocytinhaltigen Fasern ausbildeten (Abb. 34B). Es ist jedoch ungeklärt, ob die unterschiedlichen biocytinhaltigen dendritischen Faserabschnitte ein und demselben Projektionsneuron zuzuordnen sind, oder ob es sich um die dendritischen Faserabschnitte verschiedener Projektionsneurone handelt. Sehr häufig wurden biocytinmarkierte dendritische Fasern nachgewiesen, die gleichzeitig von mehreren 5-HT-positiven Typ-2-Terminalien innerviert wurden (multisynaptischer Kontakt). Auch hier ist es ungeklärt, ob es sich bei diesen verschiedenen Typ-2-Terminalien um einen multisynaptischen Kontakt ein und desselben serotonergen Axons handelt.

3.3.9.5 Synaptische Verschaltung glycinerger Axone

Immungoldmarkierungen für Glycin wurden vorwiegend in den Schichten 4 und 5 lokalisiert. Einige Markierungen wurden auch in den Schichten 6 und 7 nachgewiesen. Dies entspricht der glycinergen Faserprojektion in den tiefen Schichten des Tectum mesencephali beschrieben anhand lichtmikroskopischer immunhistochemischer Präparate (siehe 3.3.2).

Erste Ergebnisse zeigten synaptische Kontakte zwischen glycinergen Typ-5-Terminalien und unmarkierten Dendriten in der Schicht 4 und 5 (Abb. 34C). Synaptische Kontakte zwischen glycinergen Typ-5-Terminalien und Projektionsneuronen wurden nicht nachgewiesen. Die axonalen Typ-5-Terminalien waren rund bis oval. Ihre Größe variierte zwischen 330nm und 1770nm. Diese Axonterminalien waren dicht mit 30nm großen runden Vesikeln gepackt. Typ-5-Terminalien bildeten symmetrische Synapsen mit der angrenzenden postsynaptischen Membran der dendritischen Faser. Die Größe dieser axo-dendritischen Kontakte betrug 130nm - 430nm.

Eine Vielzahl der unmarkierten postsynaptischen dendritischen Fasern bildeten gleichzeitig relativ kleine symmetrische Synapsen (100-600nm) zu biocytinhaltigen oder anderen unmarkierten dendritischen Fasern. Demzufolge handelt es sich bei der Mehrheit dieser unmarkierten dendritischen Fasern um Typ-3-Terminalien mit einer mittleren Größe von 170-

1230nm (Abb. 34C). Das Zytoplasma war relativ hell und enthielt gleichmäßig verteilte runde Vesikel von 30nm Durchmesser. Vereinzelt wurden Akkummulationen von Vesikeln entlang der präsynaptischen Membran lokalisiert.

3.3.9.6 Unmarkierte axo-dendritische Kontakte

Axo-dendritische Kontakte zwischen glycin-, 5-HT-, und biocytin-unmarkierten Axonterminalien und biocytinhaltigen dendritischen Strukturen wurden in allen Schichten des Tectum mesencephali lokalisiert. In den retinalen Schichten bildeten viele der unmarkierten Axonterminalien die nach Székely und Lázár (1976) benannten Typ-1-Terminalien der retinalen Afferenzen. Andere unmarkierte axonale Terminalien gehörten zu der inhomogenen Gruppe der Typ-2-Terminalien.

In den tiefen Schichten des Tectum waren axo-dendritische Kontakte zwischen unmarkierten Axonterminalien und biocytinhaltigen dendritischen Strukturen relativ häufig. Auch wurden viele axo-dendritische Kontakte zwischen unmarkierten Axonterminalien und unmarkierten dendritischen Fasern nachgewiesen.

3.4 Konnektivität und cytochemische Organisation des ventralen Mesencephalon

Das ventrale Mesencephalon ist eine sehr heterogene Hirnstruktur bei Vertebraten, die sich entlang der dorsoventralen Achse in drei Gebiete unterteilen lässt. Im Folgenden werden die einzelnen Gebiete des ventralen Mesencephalon hinsichtlich der Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Neurone und ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen beschrieben. Im Anschluss daran erfolgt eine Darstellung deszendierender Projektionen innerhalb der einzelnen Gebiete des ventralen Mesencephalon sowie eine immunhistochemische Charakterisierung der einzelnen tegmento-bulbaren Projektionsneurone.

3.4.1 Verteilung GABA- und glycinerger Somata anhand von Vibratomschnitten

Ventral zum Tectum mesencephali erstreckt sich der Torus semicircularis. Die Mehrheit der Zellen dieses auditorischen Zentrums sind immunnegativ für GABA und Glycin (Abb. 20A-F; 21A, E). Einige GABAerge Neurone wurden besonders im caudalen Teil des Torus vorwiegend an der Grenze zum Ventrikel lokalisiert.

Im dorsalen Tegmentum wurden viele gleichmäßig verteilte GABAerge Neurone detektiert (Abb. 20A-D). Glycinerge Somata wurden vereinzelt im zentralen dorsalen Tegmentum lokalisiert (Abb. 20B, C). Caudal wurden viele großzellige Neurone innerhalb eines Zellklusters detektiert, die stark immunreaktiv für GABA bzw. schwach immunreaktiv für Glycin waren (Abb. 20E, F; 21E). Diese Neurone gehören zum magnozellulären Subnucleus des Torus semicircularis.

Das ventrale Tegmentum weist entlang der gesamten rostrocaudalen Ausdehnung viele gleichmäßig verteilte GABAerge Somata auf (Abb. 20A-F). Im caudal gelegenen Nucleus interpeduncularis wurden ebenfalls viele GABAerge Somata nachgewiesen. Glycin hingegen wurde nur im Übergangsbereich zwischen zentral und caudal in den Zellen des ventralen Tegmentum lokalisiert (Abb. 20D). Im caudalen Bereich des ventralen Tegmentum wurden nur sehr vereinzelt glycinerge Somata nachgewiesen. Immunnegative Zellen wurden im ventralen Tegmentum innerhalb eines Klusters lokalisiert, dass sich entlang der Grenze zur Faserschicht erstreckte (Abb. 20F). Die Zellen dieses Klusters waren deutlich größer als die Mehrheit der anderen tegmentalen Neurone. Es handelt sich daher vermutlich um Zellen des Nucleus motorius nervi trigemini. Im lateralen Bereich des caudalen Mesencephalon erstreckt sich auf Höhe des ventralen Tegmentum das Tegmentum isthmi. Die Zellen dieses Gebietes waren immunnegativ für GABA und Glycin (Abb. 20E, F).

3.4.2 Kolokalisationen von GABA, Glycin und Glutamat

Im ventralen Mesencephalon wurden in allen Gebieten Einfach-, Ko- und Dreifachlokalisationen von GABA, Glycin und Glutamat detektiert. Die Abbildungen 35 und 36 zeigen je ein Beispiel für die Verteilung im zentralen und caudalen Bereich. Die Verteilung von GABA- und glycinergen Somata in diesen mesencephalen Arealen entsprach im Wesentlichen der Verteilung der beiden Neurotransmitter ermittelt anhand von Vibratomschnitten (siehe 3.4.1).

Entsprechend der Verteilung der drei Neurotransmitter und ihrer Kolokalisationen in der Medulla oblongata (siehe 3.2.6) zeigten sich Unterschiede in der mediolateralen bzw. dorsoventralen Ausdehnung im zentralen und caudalen Bereich des ventralen Mesencephalon. GABAerge Somata wurden hauptsächlich im periventrikulären Bereich der Zellkörperschicht im Torus und Tegmentum gleichmäßig verteilt lokalisiert, während glutamaterge Neurone vorwiegend in einem mittleren Bereich der Zellkörperschicht gleichmäßig verteilt nachgewiesen wurden. Folglich wurden Kolokalisationen von GABA und Glutamat hauptsächlich im Überlappungsbereich zwischen der periventrikulären und mittleren Zellschicht lokalisiert. Glycinerge Somata wurden vorwiegend im lateralen Bereich der Zellkörperschicht gefunden. Kolokalisationen von Glycin und Glutamat bzw. aller drei Neurotransmitter wurden daher vorwiegend im Überlappungsbereich zwischen lateraler und mittlerer Zellschicht gefunden.

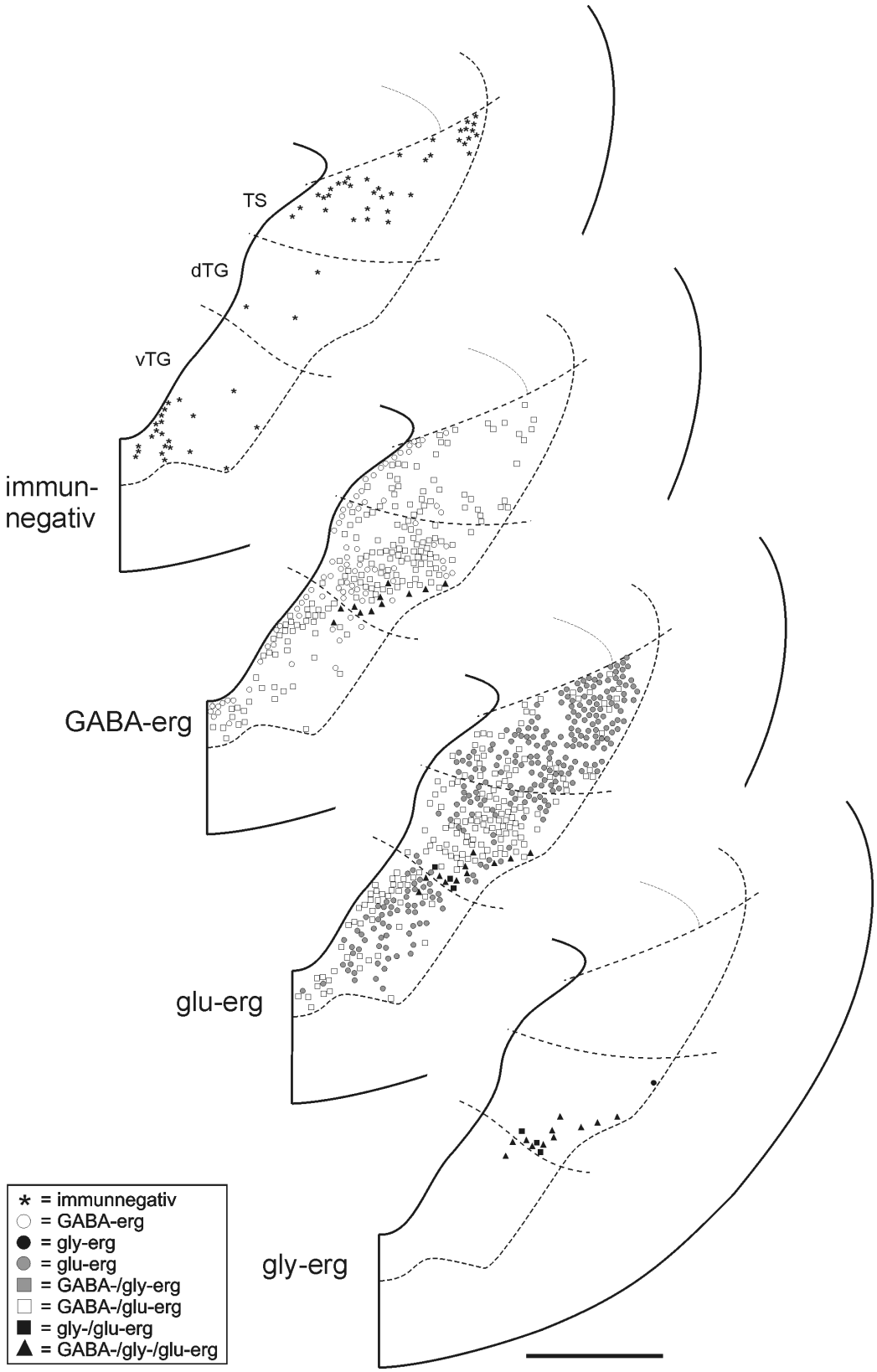


Abb. 35: Schemata aufeinander folgender transversaler Schnitte zeigen die Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata und ihrer Kolokalisationen ebenso wie die Verteilung immunnegativer Somata in der Zellkörperschicht des zentralen Tegmentum bei *Plethodon shermani*. Die gestrichelten Linien geben die Grenze zwischen den verschiedenen tegmentalen Arealen an. TS = Torus semicircularis, dTG = dorsales Tegmentum, vTG = ventrales Tegmentum. Maßstab entspricht 200µm.

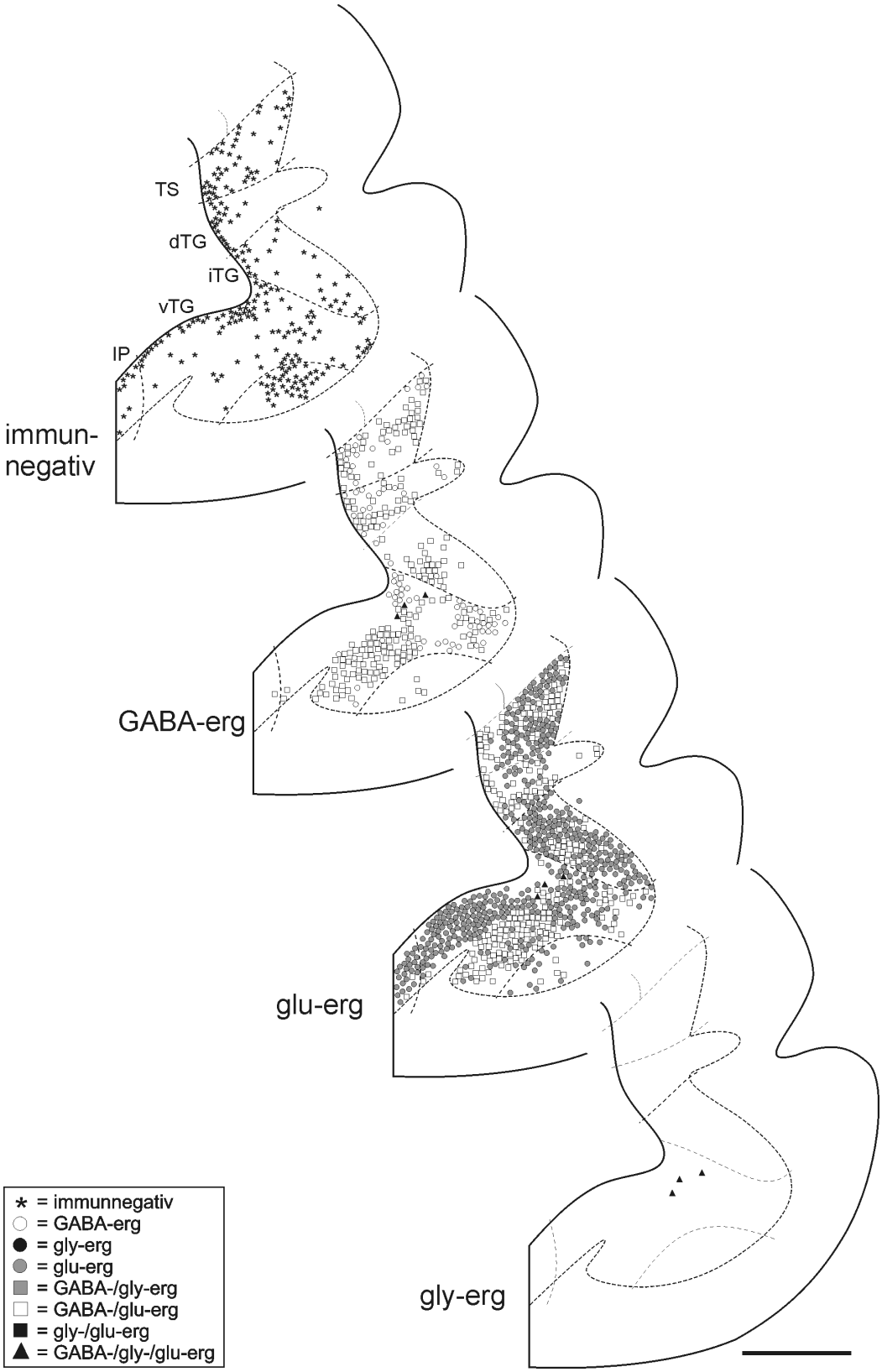


Abb. 36: Schemata aufeinander folgender transversaler Schnitte zeigen die Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata und ihrer Kolokalisationen ebenso wie die Verteilung immunnegativer Somata in der Zellkörperschicht des caudalen Tegmentum bei *Plethodon shermani*. Die gestrichelten Linien geben die Grenze zwischen den verschiedenen tegmentalen Arealen an. TS = Torus semicircularis, dTG = dorsales Tegmentum, iTG = Tegmentum isthmi, vTG = ventrales Tegmentum, IP = Nucleus interpeduncularis. Maßstab entspricht 200µm.

3.4.2.1 Kolokalisationen im Torus semicircularis

Eine Untersuchung der drei Neurotransmitter im Torus semicircularis zeigte, dass die Mehrheit aller Zellen in diesem Gebiet glutamaterg war (Abb. 35, 36). Besonders im zentralen Bereich des Torus kamen viele rein glutamaterge Zellen vor. Der Anteil GABAerger Zellen nahm von zentral nach caudal zu. Diese Zellen waren meistens kolokalisiert mit Glutamat. Im zentralen Torus wurden Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat vorwiegend in parallel zur Ventrikeloberfläche verlaufenden Zellkörperschichten lokalisiert (Abb. 35). Rein GABAerge Zellen wurden fast ausschließlich in einer periventrikulären Zellkörperschicht an der Grenze zum Ventrikel detektiert. Im caudalen Bereich des Torus wurde eine erhöhte Anzahl von Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat gefunden, die gleichmäßig über die gesamte mediolaterale und dorsoventrale Achse verteilt waren. Glycin wurde in den Zellen des Torus nicht nachgewiesen. Immunnegative Zellen kamen gleichmäßig verteilt im Torus semicircularis vor.

3.4.2.2 Kolokalisationen im Tegmentum

Das Tegmentum unterteilt sich in drei unterschiedliche Bereiche, die sich immunhistochemisch deutlich voneinander abgrenzen lassen (Abb. 35, 36). Das dorsale Tegmentum war durch einen sehr hohen Anteil GABAerger Somata gekennzeichnet. Ebenso ließen sich viele glutamaterge Neurone in diesem Gebiet nachweisen. Kolokalisationen von GABA und Glutamat waren sehr häufig. Diese ebenso wie die rein GABA- und glutamatergen Zellen waren relativ gleichmäßig im mittleren Bereich des dorsalen Tegmentum verteilt. Glycinerge Somata hingegen kamen vorwiegend im ventrolateralen Bereich der Zellkörperschicht des dorsalen Tegmentum vor. Sie waren häufig kolokalisiert mit GABA und Glutamat. Im caudalen Bereich des dorsalen Tegmentum wurden in der ventrolateralen Zellkörperschicht besonders viele magnozelluläre Neurone detektiert, die immunreaktiv für GABA und Glutamat waren. Einige dieser Zellen waren zudem immunreaktiv für Glycin. Diese großzelligen Neurone gehören zum magnozellulären Subnucleus des Torus semicircularis.

Das ventrale Tegmentum ist durch ein häufiges Auftreten von Glutamat in den Somata der Zellen gekennzeichnet (Abb. 35, 36). Die Mehrheit dieser Neurone war rein glutamaterg und ließ sich gleichmäßig verteilt im mittleren bis lateralen Bereich der Zellkörperschicht lokalisieren. Der Anteil GABAerger Somata war im ventralen Tegmentum deutlich geringer als im dorsalen Tegmentum, jedoch war eine Zunahme GABAerger Somata nach caudal hin

zu erkennen. Die Mehrheit der GABAergen Neurone war zudem immunreaktiv für Glutamat und kam vorwiegend im Übergangsbereich der medialen und mittleren Zellkörperschicht gleichmäßig verteilt vor. Im caudalen Bereich des ventralen Tegmentum wurde ein erhöhter Anteil von Somata nachgewiesen, die sowohl immunreaktiv für GABA als auch für Glutamat waren. Viele dieser Neurone wurden im Bereich des Nucleus interpeduncularis detektiert. Rein GABAerge Neurone wurden im gesamten ventralen Tegmentum besonders im periventrikulären Bereich der Zellkörperschicht detektiert. Glycin hingegen wurde nur im Übergangsbereich zwischen zentral und caudal in den Zellen des ventralen Tegmentum nachgewiesen (Abb. 35). Diese Neurone waren häufig kolokalisiert mit GABA und Glutamat und befanden sich konzentriert im lateralen bis mittleren Bereich der Zellkörperschicht. Im caudalen Bereich des ventralen Tegmentum wurden immunnegative Zellen mit relativ großen Somata in einem ventralen Zellkluster lokalisiert (Abb. 36). Es handelt sich vermutlich um Neurone des Nucleus motorius nervi trigemini.

Im Tegmentum isthmi wurden viele glutamaterge Neurone detektiert (Abb. 36). Somata mit einer Immunreaktivität für GABA und Glutamat wurden nur sehr vereinzelt im Tegmentum isthmi nachgewiesen. Glycinerge Somata wurden nicht gefunden.

3.4.3 Transmitterspezifität nicht tectaler mesencephaler Projektionsneurone

Wie anhand der Abbildungen 30 und 31 ersichtlich, wurden nach einer unilateralen Applikation von Biocytin im ventromedial oder ventrolateral absteigenden Trakt sehr viele Neurone im ventralen Mesencephalon markiert. Die Mehrheit aller mesencephalen Neurone mit absteigenden Projektionen befand sich ipsilateral zur Applikationsstelle. Die meisten Neurone waren Projektionsneurone des Torus semicircularis. Des weiteren wurden Zellen des dorsalen, ventralen und isthmischen Tegmentum sowohl ipsi- als auch contralateral zur Applikationsstelle markiert (Abb. 30 und Abb. 31).

3.4.3.1 Neurone des Torus semicircularis mit deszendierenden Projektionen

Die Mehrheit aller Projektionsneurone befand sich im Torus semicircularis ipsilateral zur Applikationsstelle. In einer quantitativen Stichprobe wurden insgesamt im ipsilateralen Torus 372 Projektionsneurone lokalisiert und hinsichtlich ihres Transmittergehaltes untersucht. Davon befanden sich 176 Zellen im zentralen Torus und 196 Neurone im caudalen Torus. Contralateral wurden insgesamt 44 Projektionsneurone im Torus markiert und immunhistochemisch charakterisiert, davon 17 Zellen im zentralen und 27 im caudalen Torus.

Haupttransmitter aller Torusneurone ist Glutamat. Er kam bis zu 95% in allen Projektionsneuronen des Torus vor. Die meisten (71%) dieser Neurone waren rein glutamaterg, während 24% dieser Zellen zusätzlich GABA enthielten. Im zentralen Bereich des Torus wurden rein glutamaterge Projektionsneurone mit einer mittleren Häufigkeit von 73% (SF ± 6,44) ipsilateral zur Applikationsstelle gefunden (Tab. 12). Neurone, die immunreaktiv für GABA und Glutamat waren, wurden zu 14% (SF ± 5,14) nachgewiesen. Contralateral zur Applikationsstelle betrug der Anteil rein glutamaterger Neurone im zentralen Torus 59% (SF ± 24,32), während Neurone mit GABA und Glutamat mit einer mittleren Häufigkeit von 18% (SF ± 19,82) detektiert wurden. Im caudalen Bereich des dorsalen Torus nimmt der Anteil rein glutamaterger Neurone ab (Tab. 13). Dem entgegen wurde ipsilateral zur Applikationsstelle ein vermehrtes Auftreten der Kolokalisation GABA und Glutamat (32%; SF ± 7,12) in den Projektionsneuronen des dorsalen Torus nachgewiesen.

Tab. 12: Transmittergehalt von Neuronen mit absteigenden Projektionen des dorsalen Torus

Neurone		neg	GABA	Glu	GABA + Glu	Summe
ipsilateral	N	23	2	143	28	196
	%	11,7	1,0	73,0	14,3	100,0
contralateral	N	4		10	3	17
	%	23,5		58,8	17,7	100,0

N gibt die Anzahl der retrograd markierten Projektionsneurone im zentralen Torus an. Der Prozentwert gibt die prozentuale Häufigkeit der Anzahl immunhistochemisch charakterisierter Projektionsneurone bezogen auf die Gesamtzellzahl der Projektionsneurone an.

Tab. 13: Transmittergehalt von Neuronen mit absteigenden Projektionen des dorsalen Torus

Neurone		neg	GABA	Glu	GABA + Glu	GABA + Gly + Glu	Summe
ipsilateral	N	16	4	100	56		176
	%	9,1	2,3	56,8	31,8		100,0
contralateral	N	13		11	2	1	27
	%	48,2		40,7	7,4	3,7	100,0

N gibt die Anzahl der retrograd markierten Projektionsneurone im caudalen Torus an. Der Prozentwert gibt die prozentuale Häufigkeit der Anzahl immunhistochemisch charakterisierter Projektionsneurone bezogen auf die Gesamtzellzahl der Projektionsneurone an.

3.4.3.2 Neurone des dorsalen Tegmentum mit deszendierenden Projektionen

Nach unilateraler Applikation von Biocytin im ventrolateral absteigenden Trakt der Medulla oblongata wurden viele Neurone im ipsi- und contralateralen dorsalen Tegmentum markiert (Abb. 31). Dem entgegen führte eine Applikation im ventromedial absteigenden Trakt nur sehr vereinzelt zu einer Markierung von Somata im dorsalen Tegmentum (Abb. 30). Im kombinierten tracing-immunhistochemischen Experiment zeigte sich, dass Glutamat der Haupttransmitter der ventrolateral absteigenden Neurone des dorsalen Tegmentum ist. Der Anteil glutamaterger Zellen im gesamten dorsalen Tegmentum betrug rund 80%. Ipsilateral absteigende Neurone enthielten zu rund 60% sowohl Glutamat als auch GABA. Diese Zellen waren gleichmäßig in der Zellkörperschicht des dorsalen Tegmentum verteilt (Abb. 31), während Neurone mit contralateral deszendierenden Axonen im mittleren Bereich der Zellkörperschicht konzentriert waren. Ihre Somata waren im zentralen Bereich zu rund 80% rein glutamaterg und nur zu 20% immunreaktiv für GABA und Glutamat. Im caudalen Bereich des dorsalen Tegmentum wurden magnozelluläre Neurone sowohl ipsi- als auch contralateral zur Applikationsstelle lokalisiert. Die Mehrheit (44%) dieser Neurone war immunreaktiv sowohl für GABA als auch für Glutamat. Rein glutamaterge Neurone wurden zu 36% ipsilateral und zu 28% contralateral detektiert. Diese Zellen gehören zum magnozellulären Subnucleus des Torus semicircularis. Glycin wurde nur sehr vereinzelt in den Zellen des dorsalen Tegmentum lokalisiert. Diese Neurone enthielten häufig auch GABA und Glutamat.

3.4.3.3 Neurone des ventralen Tegmentum mit deszendierenden Projektionen

Die meisten retrograd markierten Neurone im ventralen Tegmentum wurden nach einer Applikation von Biocytin im ventrolateral absteigenden Trakt detektiert (Abb. 31). Eine Applikation im ventromedialen Trakt führte nur vereinzelt zu einer Markierung von Neuronen im ventralen Tegmentum (Abb. 30). Die Mehrheit aller retrograd markierten Projektionsneurone des ventralen Tegmentum wurde ipsilateral zur Applikationsstelle lokalisiert. Contralateral wurden nur vereinzelt Somata im caudalen Bereich des ventralen Tegmentum markiert. Je nach Lokalisation der Applikationsstelle zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Lage und immunhistochemischen Charakterisierung der markierten Somata. Nach einer Applikation von Biocytin im ventrolateralen Trakt wurden die meisten Neurone ipsilateral im caudalen Bereich des ventralen Tegmentum markiert. Dem entgegen wurden nach einer Applikation im ventromedialen Trakt häufig Neurone contralateral im caudalen Bereich detektiert. Neurone des Tegmentum isthmi und des Nucleus interpeduncularis zeigten keine deszendierenden Projektionen in die ventromediale und ventrolaterale Medulla.

Der Haupttransmitter aller retrograd markierter Somata im ventralen Tegmentum war Glutamat. Der Anteil dieses Transmitters innerhalb der Projektionsneurone betrug zwischen 70% und 80%. Ipsilateral wurden sehr viele rein glutamaterge Neurone (rund 55%) lokalisiert. Der Anteil von tegmento-bulbaren Neuronen mit GABA und Glutamat nahm von zentral rund 7% auf caudal rund 20% zu. Des weiteren wurden einige immunnegative Zellen ipsilateral zur Applikationsstelle retrograd markiert. Vereinzelt wurden Neurone detektiert, die für alle drei Transmitter immunreaktiv waren.

Contralateral zur Applikationsstelle waren die meisten retrograd markierten Neurone immunreaktiv für GABA und Glutamat. Der Anteil dieser Kolokalisation in den Projektionsneuronen betrug zwischen 40% und 50%. Rein glutamaterge und rein GABAerge Projektionsneurone wurden contralateral bis zu 20% identifiziert. Im caudalen Bereich wurden bis zu 70% der contralateral absteigenden Projektionsneurone innerhalb eines lateralen Zellklusters mit relativ großen Somata lokalisiert. Diese Zellen waren sehr häufig immunreaktiv für GABA und Glutamat. Vereinzelt wurden auch rein glutamaterge Neurone innerhalb dieses Zellklusters identifiziert.

4 DISKUSSION

4.1 Anmerkungen zur Methode

Mit Hilfe von Adsorptionskontrollen und Kreuzreaktivitätstests konnte gezeigt werden, dass die primären Antikörper Anti-GABA, Anti-Glycin und Anti-Glutamat spezifische Bindungen zu ihrem jeweiligen Antigen im Hirngewebe von *Plethodon shermani* ausbildeten. Auch die Negativkontrollen der licht- und elektronenmikroskopischen Detektierungen zeigten, dass sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper spezifisch bindet. Die Interpretation immunhistochemischer Detektierungen von Aminosäuren ist jedoch hinsichtlich einer funktionellen Zuordnung problematisch, wie dies im Folgenden näher erläutert wird.

4.1.1 Interpretation immunhistochemischer Detektierungen von Aminosäuren

Die drei Aminosäuren GABA, Glycin und Glutamat sind in Neuronen neben ihrer Funktion als Transmitter an einer Vielzahl metabolischer Prozesse beteiligt. Dennoch deutet eine starke Anfärbung und damit eine hohe Konzentration an GABA, Glycin und Glutamat auf die Funktion als Transmitter hin.

Ein weiteres Problem bei der Interpretation der immunhistochemischen Daten beruht in der Aussagekraft der Kolokalisationen der drei verschiedenen Transmitter. Sowohl bei der Kolokalisation von GABA und Glycin, als auch bei der Kolokalisation von Glycin und Glutamat handelt es sich um „echte“ Kolokalisationen von Transmittern, da die Biosynthese der einzelnen Transmitter unabhängig voneinander erfolgt. Dem entgegen ist Glutamat in Neuronen ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese von GABA. Ein Vorkommen von GABA und Glutamat innerhalb der selben Zelle könnte also allein aufgrund der Biosynthese von GABA auftreten. In diesen Fällen handelt es sich ausschließlich um rein GABAerge Zellen. Gleichermaßen lässt sich auch das Vorkommen aller drei Neurotransmitter innerhalb einer Zelle nicht eindeutig als Dreifachlokalisation interpretieren; es könnte sich dabei um Zellen handeln, die nur GABA- und glycinerg sind. Zur Klärung dieses methodischen Interpretationsproblems ist eine Detektion des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD67) notwendig, welches die Umwandlung von Glutamat in GABA katalysiert. Leider konnte ein Nachweis der GAD67 nicht durchgeführt werden, da die kommerziell erwerblichen Antikörper gegen GAD67 im Gewebe von *Plethodon shermani* und *Hydromantes genei* nicht binden. Der Anteil der Kolokalisationen zwischen GABA und Glutamat lag in der Medulla oblongata im Mittel unter 30%, im Tectum mesencephali bei 25%.

4.1.2 Geringe Immungoldmarkierung myelinisierter Axone

Beim elektronenmikroskopischen Nachweis des im Gewebe gebundenen Biocytins mittels immungoldmarkiertem Antikörper wurden nur sehr vereinzelt myelinisierte Axone markiert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein größerer Anteil myelinisierter Axone in die Medulla oblongata absteigt. Die relativ seltene Anfärbung dieser Axone könnte auf ein erschwertes Eindringen der Antikörper ins Zytoplasma der axonalen Faser beruhen. Die Myelinscheide wirkte als natürliche Barriere gegen das Eindringen von Antikörpern.

4.2 Konnektivität und cytochemische Organisation der Medulla

Die Befunde zur cytochemischen Charakterisierung der Medulla oblongata bei Salamandern der Familie Plethodontidae werden im Folgenden mit den Befunden anderer Untersuchungen an Vertebraten besprochen. Insbesondere werden funktionelle Zusammenhänge hinsichtlich der Transmitterspezifität der Projektionsneurone des NRM, NV und ND im tecto-reticulären System diskutiert. Im letzten Abschnitt erfolgt eine Besprechung der bei *Plethodon shermani* gefundenen Mauthner Neurone.

4.2.1 Longitudinalzonen der Medulla oblongata

Die Medulla oblongata bei Salamandern besteht in der Regel aus einer Zellkörperschicht und einer Faserschicht, wie dies in der vorliegenden Untersuchung bei *Plethodon* und *Hydromantes* beschrieben wurde. In beiden Spezies besteht die Zellkörperschicht der Medulla aus vielen dicht gepackten Neuronen, deren Somata – ausgenommen der Motor-, Riesen- und Mauthner Neurone – annähernd gleich groß sind. Daher ist eine Identifizierung unterschiedlicher medullärer Kerngruppen in den vier verschiedenen Longitudinalzonen der Medulla allein anhand der Größe und Anordnung der Somata nicht möglich. Erst ein Nachweis von charakteristisch verteilten Neurotransmittern sowie ein Nachweis bestimmter Projektionsneurone ermöglichte eine Identifizierung einzelner Kerngruppen in den vier verschiedenen Zonen sowie eine Unterscheidung der rostralen und caudalen Medulla.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Neurotransmitter-detektionen und Tracing-Experimente beschrieben zum einen erstmalig die Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata in den vier verschiedenen Longitudinalzonen bei Amphibien, zum anderen wurden bestimmte reticuläre und sensorische Kerngruppen identifiziert und hinsichtlich der drei Neurotransmitter charakterisiert. Frühere Tracer- und immunhistochemische Untersuchungen der viscero- und somatomotorischen Nuclei, der sensorischen Afferenzen und transmitterspezifischen Nuclei zeigten, dass die Longitudinalzonen in der Medulla oblongata von Salamandern der Familie Plethodontidae der anderer Amphibienspezies entsprechen (Roth und Wake, 1985; Roth et al., 1988; Fritzsch, 1988, 1989; Dicke et al., 1997; Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998).

4.2.2 Verteilung der Transmitter in den Longitudinalzonen

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden wurde die Verteilung immunpositiver Neurone in den vier verschiedenen Longitudinalzonen der Medulla oblongata untersucht. Hierbei wurde

sowohl die interzonale als auch die intrazonale Häufigkeit in den vier Zonen berechnet. Die interzonale Häufigkeit gibt den prozentualen Anteil immunpositiver Zellen bezogen auf die Anzahl aller Neurone innerhalb der gesamten Zellkörperschicht der Medulla oblongata an. Sie spiegelt somit die Gebietsgröße der einzelnen Zonen wider. Folglich befindet sich die höchste Anzahl immunpositiver Somata in der medialen Zone, welche auch die größte Zone der Medulla ist. Die intrazonale Häufigkeit hingegen gibt den prozentualen Anteil immunpositiver Zellen bezogen auf die Gesamtneuronenzahl innerhalb der einzelnen Zonen der Zellkörperschicht an. Sie ist somit ein Maß für die Dichte immunpositiver Zellen in den einzelnen Zonen der Medulla, weil sie unabhängig von der jeweiligen Flächengröße der einzelnen Zonen ist.

Die in der vorliegenden Untersuchung durchgeführte immunhistochemische Detektierung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata lieferte eine charakteristische Verteilung der drei Neurotransmitter und ihrer Kolokalisationen in den vier verschiedenen Longitudinalzonen und ermöglichte eine Unterscheidung der rostralen und caudalen Medulla anhand der inter- und intrazonalen Häufigkeiten. Die rostrale Medulla ist durch das Verteilungsmuster der verschiedenen Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen der drei Transmitter in der medialen Zone geprägt, welche zudem in diesem Bereich die Zone mit der größten Dichte GABAerger, glycinerger und glutamaterger Zellen ist. Die caudale Medulla hingegen ist durch das Verteilungsmuster der verschiedenen Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen der Transmitter in der lateralen und medialen Zone geprägt, welche zudem die größten intrazonalen Häufigkeiten glycinerger Somata aufweisen. Für GABA und Glutamat wurden die größten intrazonalen Häufigkeiten in der lateralen und dorsalen Zone der caudalen Medulla ermittelt. Diese cytochemischen Unterschiede beruhen vermutlich auf ein Vorkommen funktionell unterschiedlicher Kerne in den einzelnen Zonen der rostralen und caudalen Medulla.

4.2.2.1 Die mediane Zone

In der medianen Zone wurden am häufigsten glutamaterge Neurone markiert. Glycinerge Neurone kamen nur sehr vereinzelt in der medianen Zone der rostralen Medulla oblongata vor. Einige GABAerge Neurone waren über die gesamte rostrocaudale Ausdehnung der Medulla in der medianen Zone gleichmäßig verteilt. In *Rana esculenta* und *Triturus cristatus carnifex* ebenso wie in *Rana catesbeiana* und *Xenopus laevis* wurden ebenfalls GABAerge Somata in der medianen Zone der rostralen Medulla beschrieben (Franzoni und Morino, 1989; Hollis und Boyd, 2003). Dem entgegen wurden in *Pleurodeles waltl* und *Triturus*

alpestris keine GABAergen Neurone in dieser Zone gefunden (Naujoks-Manteuffel et al., 1994).

Aus früheren immunhistochemischen Untersuchungen an Amphibien ist bekannt, dass wie bei allen Vertebraten in der medianen Zone die serotonergen Raphekerne liegen (Clairambault et al., 1994; Dicke et al., 1997; Adli et al., 1999; Stuesse et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit sind die immunnegativen Zellkluster in dieser Zone Kandidaten für serotonerge Neurone. In Säugern wurden GABAerge, glutamaterge und Glutamatdecarboxylase (GAD)-immunreaktive Zellen im Nucleus raphe magnus gefunden, der in der rostralen medianen Zone lokalisiert ist (Reichling und Basbaum, 1990; Jones et al., 1991; Fredette et al., 1992; Holmes et al., 1994; Jones, 1995; Li et al., 1996, 1997; Kalyuzhny und Wessendorf, 1997; Ellenberger, 1999; Maloney et al., 2000), während nur wenige dieser Zellen im Nucleus raphe obscurus und pallidus der caudalen medianen Zone beschrieben wurden. Glycinerge Somata wurden nur im Nucleus raphe magnus von Ratten lokalisiert (Li et al., 1996, 1997; Rampon et al., 1996, 1999). Demzufolge entspricht die Lokalisation und Verteilung der Transmitter in Neuronen der medianen Zone bei Säugern der in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen Verteilung in Salamandern der Familie Plethodontidae. Es bleibt jedoch ungeklärt, ob die glutamatergen Somata in dieser Zone mit 5-Hydroxytryptamin (5-HT) kolokalisiert sind, wie dies bei anderen Vertebraten beschrieben wurde (Überblick siehe Hökfelt et al., 2000).

4.2.2.2 Die mediale Zone

Innerhalb der rostralen Medulla befindet sich die höchste Dichte GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata in der medialen Zone. Zudem lässt sich in dieser Zone auch eine große Anzahl der Ko- bzw. Dreifachlokalisationen dieser Transmitter nachweisen. Eine hohe Dichte GABAerger Neurone wurde ebenso in der medialen Zone anderer Amphibienspezies gefunden (Franzoni und Morino, 1989; Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Hollis und Boyd, 2003). Während GABAerge Neurone gleichmäßig verteilt vorkamen, wurden glycinerge Neurone in zwei Zellklustern detektiert, von denen eine große Anzahl in die tiefen Schichten des Tectum projiziert. Letztere gehören zum Nucleus reticularis medius (NRM), welcher zuvor in einer Tracer-Untersuchung bei *Plethodon* und *Hydromantes* beschrieben wurde (Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998). Aufgrund der ähnlichen Lokalisation des NRM in der medialen Zone der rostralen Medulla und seiner vergleichbaren Projektionsmuster in die tiefen Schichten des Tectum mesencephali ist dieser Kern höchstwahrscheinlich dem Nucleus reticularis rhombencephalis medialis in Goldfischen (Pérez-Pérez et al., 2003a, b) homolog.

Bei Amphibien wurde die Konnektivität des NRM bei verschiedenen Tierspezies untersucht. Untersuchungen an intrazellulär abgeleiteten und markierten Neuronen des NRM bei *Plethodon jordani* zeigten sowohl in die Medulla spinalis absteigende Projektionen als auch aufsteigende Projektionen ins Tectum (Heimbuch und Dicke, 1998; Heimbuch, 2001); die Transmitterspezifität der aufsteigenden Projektionen wurde in der vorliegenden Untersuchung erstmalig beschrieben. Tracing-Experimente an verschiedenen Spezies anderer Amphibienordnungen beschreiben ebenso absteigende Projektionen des mittleren Nucleus reticularis (Sánchez-Camacho et al., 2001a). Mittels immunhistochemischer Untersuchungen von Neuropeptiden in Kombination mit Tracing-Experimenten in der Medulla oblongata von *Rana pipiens* wurden in der medialen Zone drei verschiedene reticuläre Kerne immunhistochemisch charakterisiert, deren Neurone in die Medulla spinalis absteigen (Adli et al., 1999; Stuesse et al., 2001). Diese Kerne wurden im Homologieschluss zu denen von Ratten als Nucleus reticularis magnocellularis, gigantocellularis und paragigantocellularis benannt. Vertes und Kollegen (1986) beschrieben bei Ratten aufsteigende Projektionen des Nucleus reticularis gigantocellularis und des Nucleus reticularis gigantocellularis alpha in die tiefen und intermediären Faserschichten des Colliculus superior, der dem Tectum mesencephali homologen Hirnregion. Aufgrund der ebenfalls in die multimodalen und tiefen Schichten des Tectum ziehenden Projektionen und der vergleichbaren Lage und Ausdehnung des NRM bei *Plethodon* und *Hydromantes* lässt sich annehmen, dass der in der vorliegenden Studie untersuchte NRM dem Nucleus reticularis gigantocellularis und/oder dem Nucleus reticularis gigantocellularis alpha homolog ist. In Säugern wurden ebenfalls glycinerge, GABAerge und GAD-immunreaktive Somata in beiden gigantocellulären Kernen gefunden (Reichling und Basbaum, 1990; Jones et al., 1991; Holmes et al., 1994; Jones, 1995; Li et al., 1996, 1997; Rampon et al., 1996, 1999; Ellenberger, 1999; Maloney et al., 2000).

Im Übergangsbereich der Zellkörperschicht zur Faserschicht wurden in der medialen und lateralen Zone immunnegative Zellkluster lokalisiert. Aufgrund ihrer Lage und ihrer relativ großen Somata lassen sich diese Zellen als Motorneurone der Kranialnerven identifizieren, welche in früheren Tracing-Experimenten ebenso wie durch immunhistochemische Untersuchungen der Acetylcholintransferase in Amphibien charakterisiert wurden (Roth et al., 1988; Wake et al., 1988; Marín et al., 1997; Wallstein, 1999).

4.2.2.3 Die laterale Zone

Die laterale Zone in *Plethodon* und *Hydromantes* ist durch eine geringe Dichte der drei Transmitter in der rostralen Medulla und einer hohen Dichte in der caudalen Medulla

charakterisiert. Der Nucleus vestibularis (NV), der in der lateralen Zone der rostralen Medulla oblongata lokalisiert ist, beinhaltet Neurone, die ins Tectum mesencephali aufsteigen. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit der Tracing-Studie von Dicke und Mühlenbrock-Lenter (1998). Die Mehrheit dieser Projektionsneurone enthielt Glutamat, das häufig mit Glycin und/oder GABA kolokalisiert war. Reichenberger und Kollegen (1997), welche die Kolokalisation von GABA, Glycin und Glutamat in den Zellen der Vestibularkerne in *Rana temporaria* untersuchten, kamen zu den gleichen Ergebnissen und vermuteten, dass einige dieser Neurone Projektionsneurone sind. In der vorliegenden Untersuchung wird dieses für Neurone des NV bei *Plethodon* gezeigt.

In der rostralen lateralen Zone wurden zudem einige gleichmäßig verteilte GABAerge und glycinerge Neurone lokalisiert, die keine Projektionen ins Tectum aufwiesen. Einige dieser Neurone könnten inhibitorische Interneurone sein. Bei elektrophysiologischen Untersuchungen an Fröschen der Familie Ranidae antwortete die Mehrheit aller Neurone des NV mit einer disynaptischen inhibitorischen Antwort auf die Stimulation des ipsilateralen VIII. Hirnnerven (Straka und Dieringer, 1996). Diese Inhibition wurde durch Glycin vermittelt.

Des weiteren wurden in der rostralen lateralen Zone auf der Höhe der Area octavolateralis einige Riesenneurone (giant neurons) identifiziert, die immunreaktiv für Glutamat und Glycin waren. Reichenberger und Kollegen (1997) beschrieben ebenfalls große glutamat-glycinerge Zellen im lateralen Bereich der Vestibularkerne und identifizierten diese analog zu den bei Primaten beschriebenen glutamatergen Riesenneurone als Deiter`s Neurone (Walberg und Kollegen, 1990). Aufgrund der ähnlichen Lage und der gleichen morphologischen und cytochemischen Struktur sind die in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen Riesenneurone vermutlich den Deiter's Neuronen homolog.

Die immunhistochemischen Befunde im NV bei Amphibien entsprechen größten Teils der Verteilung der Aminosäuretransmitter in den Nuclei vestibularis der Säuger. In einer Reihe von Untersuchungen wurden glycinerge Neurone ebenso wie GAD-immunreaktive Somata in den vestibulären Kernen verschiedener Säugetierspezies beschrieben (Jones et al., 1991; Li et al., 1996, 1997; Rampon et al., 1996; Ellenberger, 1999). Walberg und Kollegen (1990) wiesen eine große Anzahl glutamaterger Neurone in den vestibulären Kernen der Katze nach und berichteten, dass „Kolokalisationen von zwei oder mehreren neuroaktiven Aminosäuren wie GABA, Glycin, Glutamat und Aspartat eher eine Regel als eine Ausnahme in vestibulären Neuronen sind."

In der caudalen Medulla oblongata befindet sich der Tractus solitarius an der Grenze zwischen der lateralen und dorsalen Zone. Die Zellen des Nucleus solitarius umgeben den Trakt in seinem Verlauf von rostral nach caudal. Frühere Untersuchungen an Fröschen und anderen Salamanderspezies zeigten, dass sowohl einige Fasern des Tractus solitarius als auch Neurone des Nucleus solitarius catecholaminerg sind (Gonzaléz and Smeets, 1991, 1993, 1994; González et al., 1994, 1995; Sánchez-Camacho et al., 2001b). Die in dieser Untersuchung gefundene relativ homogene Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata in dieser Region legt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Neuronen um Interneurone handelt, die die catecholaminergen Projektionsneurone des Nucleus solitarius umgeben.

4.2.2.4 Die dorsale Zone

Die in dieser Untersuchung identifizierten Projektionsneurone des Nucleus dorsalis (ND) in der dorsalen Zone der rostralen Medulla oblongata waren rein glutamaterg. Aufsteigende Projektionsneurone dieses Kerns wurden zuvor von Dicke und Mühlenbrock-Lenter (1998) beschrieben. Der ND ist vermutlich an der Verarbeitung von Tiefenfrequenzen und Bodenvibrationen beteiligt, die durch Afferenzen des VIII. Kranialnerven erzeugt werden (Roth et al., 1993). Anterograde Tracing-Experimente in Salamandern beschreiben aufsteigende Projektionen der Neurone des ND und NV sowohl zum Tectum mesencephali als auch zum Torus semicircularis, dem Hauptzentrum für auditorische und vestibuläre Verarbeitungsprozesse (Will, 1988; Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998). Bislang ist ungeklärt, ob es sich bei den im Tectum nachgewiesenen Projektionen um Kollaterale der zum Torus ziehenden Projektionsneurone handelt, oder ob diese Projektionen von zwei unterschiedlichen Neuronenpopulationen abstammen.

Die in der vorliegenden Untersuchung identifizierten glutamatergen Projektionsneurone des ND sind umgeben von gleichmäßig verteilten GABAergen und glycinergen Somata, bei denen es sich vermutlich um Interneurone handelt. Einige dieser Zellen könnten auch aufsteigende Axone zum Torus und/oder absteigende Axone in die Medulla spinalis besitzen. Bei Fröschen der Familie Ranidae und in *Pleurodeles waltl* wurden in der dorsalen Zone der rostralen Medulla nur wenige Projektionsneurone mit absteigenden Projektionen gefunden (Adli et al., 1999; Sánchez-Camacho et al., 2001a; Stuesse et al., 2001). In *Rana esculenta* ebenso wie in *Pleurodeles waltl* und *Triturus alpestris* wurden kaum GABAerge Somata in der rostralen dorsalen Zone gefunden (Franzoni und Morino, 1989; Naujoks-Manteuffel et al., 1994), während einige GABAerge Zellen in der Area octavolateralis nachgewiesen wurden,

welche sich bei Salamandern der Familie Plethodontidae im Übergangsbereich zwischen der lateralen und dorsalen Zone befindet. Die geringe Anzahl GABAerger Somata bei *Rana* und *Pleurodeles* ist nicht in Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Untersuchung ermittelten intrazonalen Häufigkeit von annähernd 20% an GABAergen Zellen in der rostralen dorsalen Zone.

4.2.3 Funktionelle Betrachtung

Die Medulla oblongata von Vertebraten ist ein anatomisch und funktionell sehr heterogenes Hirngebiet. Bei Salamandern der Familie Plethodontidae sind die Neurone der Medulla oblongata zum einen an der Kontrolle einer Reihe motorischer Prozesse wie die Steuerung der Hals- und Nackenmotorik sowie der Schleuderzunge beim Beutefang und der fluchtartigen Auslösung von Rückzugsbewegungen (Fluchtverhalten) beteiligt. Die Auslösung dieser motorischen Bewegungsprozesse wird durch andere Hirnzentren hervorgerufen. So terminieren die absteigenden Bahnen aus allen Teilen des Gehirns in der Medulla (für Plethodontiden siehe Dicke et al., 1998; Übersicht in Butler und Hodos, 1996; Nieuwenhuys et al., 1998). Gleichzeitig beinhaltet die Medulla auch einige sensorische Umschaltkerne, wie die primärsensorischen Kerne des VIII. Kranialnerven (ND und NV), sowie einige reticuläre Kerne, die aufsteigend in andere Hirngebiete projizieren (Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998). Letztere projizieren zum Teil absteigend in die Medulla spinalis (Adli et al., 1999; Stuesse et al., 2001).

Glycinerge Projektionsneurone des Nucleus reticularis medius (NRM) ziehen in die tieferen Faserschichten des Tectum mesencephali ein, wo sie vermutlich auf die Verarbeitung visueller und multimodaler Afferenzen einwirken. Das Tectum sendet dicke Axonbündel zur reticulären Formation in der medialen Zone, deren Axone viele Kollaterale zu den medullären Zellen ausbilden (Dicke, 1999). Diese tecto-reticulären Verbindungen werden durch die Nuclei raphes beeinflusst, welche wiederum selbst direkte Projektionen in die intermediären Schichten 2-4 des Tectum aufweisen (Dicke et al., 1997). In diesem Zusammenhang scheint der NRM Teil einer der Rückkopplungsschleifen zwischen Tectum und Medulla zu sein (Landwehr und Dicke, 2004). Pérez-Pérez und Kollegen (2003a) beschrieben beim Goldfisch ebenfalls starke reziproke Verbindungen zwischen dem Tectum und dem Nucleus reticularis medialis rhombencephalicus, einem dem NRM möglichen homologen Kern. Die Autoren nehmen ebenfalls die Existenz einer negativen Rückkopplungsschleife zwischen diesen beiden Hirnzentren an. Bei Affen wurden reziproke Verbindungen zwischen dem Colliculus superior und der mesencephalen Formatio reticularis dokumentiert, die im Rahmen einer

lokalen Rückkopplungsschleife für Augenbewegungen diskutiert werden (Chen und May, 2000). Eine funktionelle Betrachtung der glycinergen Projektion des NRM in die tieferen Faserschichten des Tectum erfolgt in Verbindung mit der Darstellung der Verschaltung der glycinergen Axonterminalien dieses Kernes im Tectum mesencephali (siehe 4.3.8).

Neben diesen inhibitorischen Einfluss des NRM wird das Tectum ebenso durch exzitatorische Projektionsneurone des NV und ND in den tiefen Schichten innerviert. Hierdurch werden nicht-visuelle sensorische Informationen ins Tectum geleitet.

4.2.4 Mauthner Neuron

Das in *Plethodon* gefundene glutamaterge und schwach glycinerge Mauthner Neuron wies an der Membranoberfläche des Somas und des distalen lateralen Dendriten eine massive GABAerge Innervation auf, während glycinerge Terminalien nur in Somanähe detektiert wurden. Bei Teleosteern wurde ebenso von einer GABAergen, glycinergen oder GAD-immunreaktiven Innervation des Mauthner Neurons berichtet (Petrov et al., 1991; Lee et al., 1993; Triller et al., 1993; Sur et al., 1994). Marín und Kollegen (1997) berichteten, dass in *Pleurodeles waltl* das Mauthner Neuron eine Immunreaktivität für Acetylcholintransferase (ChAT) aufzeigte. Dieser Befund ist nicht in Übereinstimmung mit Untersuchungen der ChAT-Immunreaktivität bei *Plethodon shermani* (Dicke, persönliche Mitteilung) und Fischen (Teleosteer), deren Mauthner Neurone nicht immunreaktiv für ChAT waren (Rhodes et al., 1986; Ekström, 1987).

Bei Anamnioten ist das Mauthner Neuron an der Initiierung von Fluchtverhalten beteiligt (Will, 1991). Es ist daher anzunehmen, dass es auch bei terrestrisch lebenden Tieren an der motorischen Kontrolle von Fluchtverhalten beteiligt ist. Weiterhin ist das Mauthner Neuron bei Goldfischen (*Carassius auratus*) auch bei der Steuerung anderer motorischer Bewegungen beim Sozial-, Brut- und Beutefangverhalten aktiv (Canfield und Rose, 1993; Eaton et al., 2001). Die Funktion des Mauthner Neurons in *Plethodon* ist bislang nicht bekannt; es gibt auch keine Untersuchungen zur Konnektivität des Mauthner Neurons bei *Plethodon*.

Bislang wurden Mauthner Neurone ausschließlich in aquatisch lebenden Tierarten nachgewiesen. Das Vorkommen dieser Riesenneurone bei dem vollständig terrestrisch lebenden Salamander *Plethodon* ist daher eine seltene Ausnahme. Der Verlust des Mauthner Neurons bei *Hydromantes* ist möglicherweise in der Ontogenie und Phylogenie dieser Tiere begründet. Die hier untersuchten Salamanderarten gehören zu den sich direkt entwickelnden Gruppen der Plethodontini und Bolitoglossini (Roth und Wake, 1985; Roth, 1987). Während

der Embryonalentwicklung bilden Salamander der Gattungsgruppe Plethodontini (*Plethodon shermani*) im Ei ein Larvenstadium aus und verwandeln sich per Metamorphose zum Salamander. In den Eiern von Tieren der Gattungsgruppe Bolitoglossini (*Hydromantes genei*) erfolgt eine Modifikation dieser Entwicklung. Hinweise hierfür lassen sich in der Ausbildung bzw. Reduktion der Kiemenbögen bei den Bolitoglossini finden (Roth und Wake, 1985). Diese Tiere zeigen zudem besonders viele pädomorphe Merkmale, die sich auf sekundäre Simplifizierung zurückführen lassen (Roth et al., 1993). Dies ist eine mögliche Erklärung für den Verlust des Mauthner Neurons bei *Hydromantes genei.*

4.3 Konnektivität und cytochemische Organisation des Tectum mesencephali

Die Befunde der vorliegenden Untersuchung über die Verteilung der drei Neurotransmitter und ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen im Tectum mesencephali bei *Plethodon shermani* werden im Folgenden mit den Befunden anderer Untersuchungen bei Vertebraten verglichen und funktionelle Zusammenhänge hinsichtlich der Transmitterspezifität der tecto-bulbaren Projektionsneurone diskutiert. Im Anschluß daran wird die funktionelle Bedeutung GABAerger Systeme bei der visuellen Verarbeitung im Tectum erläutert. Im letzten Abschnitt wird der Einfluss glycinerger bzw. serotonerger Afferenzen reticulärer Kerne auf das intratectale System diskutiert.

4.3.1 Anatomische und cytochemische Differenzierung der tectalen Bereiche

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden wurde die Verteilung immunpositiver Neurone in den beiden Zellkörperschichten des Tectum untersucht. Hierbei wurde sowohl die interlaminare als auch die intralaminare Häufigkeit berechnet. Die interlaminare Häufigkeit gibt den prozentualen Anteil immunpositiver Zellen bezogen auf die Anzahl aller Neurone des Tectum an. Sie lässt sich daher mit der Gesamthäufigkeit immunpositiver Somata im Tectum vergleichen, ist aber abhängig von der jeweiligen Schichtgröße der einzelnen Zellkörperschichten. Die intralaminare Häufigkeit hingegen gibt den prozentualen Anteil immunpositiver Zellen bezogen auf die Gesamtneuronenzahl innerhalb der beiden Schichten an. Sie ist somit ein Maß für die Dichte immunpositiver Zellen in den einzelnen Zellkörperschichten des Tectum, weil sie unabhängig von der jeweiligen Flächengröße der einzelnen Schichten ist.

Das Tectum mesencephali von *Plethodon shermani* gliedert sich sowohl anatomisch als auch cytochemisch in drei unterschiedliche Abschnitte entlang der rostrocaudalen Achse. In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmalig ein cytochemischer Unterschied zwischen dem caudalen Tectum und dem rostralen bzw. zentralen Tectum beschrieben, welcher auf einer Abnahme GABAerger Somata bzw. einer Zunahme glycinerger Zellen im caudalen Tectum beruht. Rettig und Roth (1986) zeigten, dass Salamander der Familie Plethodontidae, im Gegensatz zu anderen Amphibien, einen direkten ipsilateralen Eingang von der Retina in den rostralen zwei Drittel des Tectum erhalten. Dieser Bereich entspricht in etwa dem rostralen und zentralen Tectum. Zudem konnte mittels elektrophysiologischer Ableitungen und neuroanatomischer Untersuchungen eine retinotope Karte entlang der rostrocaudalen und mediolateralen Ausdehnung des Tectum bestimmt werden (Wiggers, 1991). Neurone des

rostralen und zentralen Tectum erhalten einen binokularen Eingang und sind an der Verarbeitung visueller Stimuli im frontalen, binokularen Gesichtsfeld beteiligt. Dem entgegen reagieren Neurone des caudalen Tectum auf eine visuelle Reizung im lateralen, monokularen Gesichtsfeld. Eine hohe Dichte GABAerger Somata besonders in der Schicht 8 des rostralen und zentralen Tectum deutet auf eine intensive vorwiegend über inhibitorische Interneurone vermittelte Verarbeitung visueller Afferenzen im binokularen Gesichtsfeld hin, welches zu einer besseren Auflösung der einzelnen visuellen Reize führt. Eine detaillierte Objekterkennung erfolgt vorwiegend im binokularen Gesichtsfeld.

4.3.2 Laminierung des Tectum mesencephali

In allen bislang untersuchten Wirbeltieren ist das Tectum mesencephali bzw. der Colliculus superior, das dem Tectum homologe Hirngebiet der Säuger, durch eine deutliche Laminierung in unterschiedliche Faser- und Zellkörperschichten charakterisiert. Während die Laminierung bei Fröschen und Säugern durch einen regelmäßigen Wechsel zwischen Faser- und Zellkörperschichten gekennzeichnet ist (Székely und Lázár, 1976; Lázár, 1987; Dicke und Roth, 1996; Hilbig et al., 1998; Übersicht in Butler und Hodos, 1996), ist das Tectum bei Salamandern der Familie Plethodontidae kaum laminiert (Roth et al., 1990, 1999; Dicke, 1999). Dennoch war in der vorliegenden Untersuchung aufgrund unterschiedlicher GABAerger und glycinerger Immunreaktivitäten eine Unterteilung in die superfiziellen retinalen und die tieferen multimodalen Faserschichten des Tectum von *Plethodon shermani* möglich. Im Folgenden wird zunächst die Verteilung der Immunreaktivitäten für GABA, Glycin und Glutamat in den Faserschichten des Tectum diskutiert und mit früheren Untersuchungen bei anderen Vertebraten verglichen. Anschließend erfolgt eine Diskussion über die Verteilung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata innerhalb der tectalen Zellkörperschichten, sowie ein Vergleich mit anderen Vertebraten.

4.3.3 Immunreaktivität in den Faserschichten des Tectum mesencephali

Immunreaktivitäten für Glutamat und GABA wurden in allen Faserschichten des Tectum nachgewiesen. Besonders in den retinalen Faserschichten 1-3 wurde eine intensive GABAerge Fasermarkierung lokalisiert, während glycinerge Fasern fast ausschließlich in den tieferen Faserschichten 4, 5 und 7 des Tectum markiert wurden. Diese Befunde stimmen mit früheren Untersuchungen zum Nachweis einer GABA- Glycin- und Glutamat-Immunreaktivität im Tectum mesencephali von *Plethodon shermani* und *Hydromantes italicus* überein (Wallstein und Dicke, 1996; Wallstein, 1999). In der vorliegenden

Untersuchung konnte erstmalig gezeigt werden, dass es sich bei der massiven glycinergen Faserprojektion um lateral einziehende Axone der Zellen des Nucleus reticularis medius (NRM) handelt.

Bei allen bislang untersuchten Wirbeltieren wurden Fasern mit einer Immunreaktivität für GABA und GAD in allen Schichten des Tectum mesencephali bzw. Colliculus superior nachgewiesen (Amphibien: Franzoni und Morino, 1989; Antal, 1991; Rybicka und Udin, 1994; Tyler et al., 1995; Li und Fite, 1998; Fische: Villani et al., 1982; Medina et al., 1994; Reptilien: Bennis et al., 1991; Vögel: Domenici et al., 1988; Granda und Crossland, 1989; Veenman und Reiner, 1994; Hilbig et al., 1998; Säuger: Überblick in Mize RR, 1992). Bei *Rana pipiens* ebenso wie bei Fischen und Vögeln wurde von einer besonders intensiven Markierung für GABA und GAD in den retinalen Faserschichten berichtet (*Rana*: Tyler et al., 1995; Li und Fite, 1998; Fische: Villani et al., 1982; Medina et al., 1994; Vögel: Domenici et al., 1988; Granda und Crossland, 1989). Elektronenmikroskopische Untersuchungen in der oberen Zellkörper- und Faserschicht 8 und 9 des Tectum von *Xenopus laevis* wiesen eine Vielzahl GABAerger dendritischer und axonaler Strukturen auf (Rybicka und Udin, 1994). Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden viele GABAerge dendritische und axonale Strukturen in den Faserschichten des Tectum von *Plethodon* nachgewiesen. Diese besonders starke Markierung GABAerger dendritischer und axonaler Fasern in den retinalen Faserschichten des Tectum bei Amphibien, Fischen und Vögeln deutet auf eine massive intratectale GABAerge Verarbeitung retinaler Afferenzen hin (siehe 4.3.7).

Immunhistochemische Untersuchungen bei Ratten zeigten eine Immunreaktivität für Glycin in den intermediären und tiefen Faserschichten des Colliculus superior (Rampon et al., 1996), welche mit der intensiven glycinergen Faserprojektion in den tiefen Schichten 4, 5 und 7 des Tectum bei *Plethodon* vergleichbar ist. Untersuchungen zur immunhistochemischen Lokalisation von Gephyrin, einer Komponente des Glycin-Rezeptors, zeigten ebenfalls eine massive Fasermarkierung in den intermediären und tiefen Faserschichten des Colliculus superior bei Ratten (Mineff et al., 1998). Die Autoren vermuteten eine signifikante, durch Glycin vermittelte inhibitorische Neurotransmission im Colliculus, die möglicherweise durch Interneurone erzeugt wird. Wie in der vorliegenden Untersuchung dargestellt, erfolgt die glycinerge Neurotransmission in den tiefen Faserschichten des Tectum bei *Plethodon* durch axonale Projektionen des NRM. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass einige wenige tectale glycinerge Interneurone an dieser inhibitorischen Neurotransmission beteiligt sind.

4.3.4 Verteilung der Transmitter in den Zellkörperschichten des Tectum

Die immunhistochemische Detektierung GABAerger, glycinerger und glutamaterger Somata sowie ihrer Kolokalisationen lieferte eine charakteristische Verteilung der drei Neurotransmitter und ihrer Kolokalisationen in den beiden Zellkörperschichten des Tectum und ermöglichte eine Unterscheidung des rostralen, zentralen und caudalen Tectum anhand der inter- und intralaminaren Häufigkeiten. Das rostrale und zentrale Tectum ist durch das Verteilungsmuster der verschiedenen Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen der drei Transmitter in der Zellkörperschicht 8 geprägt, welche zudem in diesem Bereich die größte Dichte GABAerger und glutamaterger Zellen aufweist. Das caudale Tectum hingegen ist durch das Verteilungsmuster der verschiedenen Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen der Transmitter in der Zellkörperschicht 6 geprägt. Glutamaterge Somata lassen sich in den beiden Zellkörperschichten des Tectum mesencephali am häufigsten (70%) nachweisen. Etwa ein Drittel der Somata im rostralen und zentralen Tectum ist GABAerg, während caudal weniger als ein Fünftel der Zellen immunreaktiv für GABA ist. Dieser Gradient ist besonders in der Zellkörperschicht 8 ausgeprägt. Glycinerge Somata hingegen lassen sich nur vereinzelt im Tectum nachweisen.

Eine Vielzahl GABAerger Somata wurde in den Zellkörperschichten des Tectum anderer Amphibienspezies gefunden (Amphibien: Franzoni und Morino, 1989; Antal, 1991; Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Li und Fite, 1998; Hollis und Boyd, 2005). In *Rana esculenta* wurde anhand einer Stichprobe von jeweils einem transversalem Schnittpräparat je Tier (n=6) eine Gesamthäufigkeit GABAerger Somata im Tectum von rund 30% ermittelt (Antal, 1991). Dies stimmt mit der in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Gesamthäufigkeit GABAerger Somata im rostralen und zentralen Bereich des Tectum überein; caudal waren weniger als ein Fünftel der Zellen immunreaktiv für GABA. In Fröschen wurden GABAerge Somata vermehrt in den tieferen Zellkörperschichten nachgewiesen (Li und Fite; 1998; Hollis und Boyd, 2005). Dies stimmt mit der in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen höheren Dichte GABAerger Somata in der tieferen Zellkörperschicht 8 des Tectum von *Plethodon* überein.

GABA- bzw. GAD-positive Somata sind im Tectum bzw. Colliculus superior anderer Vertebraten in allen Schichten vorhanden (Fische: Villani et al., 1982; Medina et al., 1994; Kim et al., 2004; Reptilien: Bennis et al., 1991; Vögel: Domenici et al., 1988; Granda und Crossland, 1989; Veenman und Reiner, 1994; Hilbig et al., 1998; Säuger: van der Heyden, 1979; Überblick in Mize RR, 1992). Einige Vertebraten besitzen GABAerge Somata

ebenfalls vorwiegend in den tieferen periventrikulären Zellkörperschichten (Fische: Villani et al., 1982; Medina et al., 1994; Kim et al., 2004; Rhesusaffen: Mize et al., 1991; Mize, 1992). Im Gegensatz dazu wurde im Tectum der Vögel und bei Katzen eine höhere Dichte GABAerger Somata in den superfiziellen Schichten beschrieben (Vögel: Domenici et al., 1988; Granda und Crossland, 1989; Katze: Mize, 1988). Die Verteilung GABAerger Somata in den verschiedenen Schichten des Tectum bzw. Colliculus der Vertebraten ist folglich spezifisch für jede Spezies. Eine einheitliche, schichtspezifische Verteilung lässt sich nicht nachweisen.

Die Lokalisation und Verteilung glycinerger und glutamaterger Somata sowie ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen mit GABA wurde im Tectum mesencephali von Amphibien bislang noch nicht umfassend untersucht. Wallstein und Dicke (1996) und Wallstein (1999) beschrieben anhand einer Stichprobe von nur einer Semidünn-Schnittserie aus dem zentralen Tectum Einzel-, Ko- und Dreifachlokalisationen der drei Neurotransmitter in den beiden Zellkörperschichten. Glycinerge Somata wurden bislang noch gar nicht im Tectum bzw. Colliculus superior anderer Vertebraten beschrieben. Rampon und Kollegen (1996) wiesen die Verteilung glycinerger Neurone und Fasern im Hirngewebe von Ratten nach. Die Autoren fanden jedoch keine glycinergen Somata im Colliculus superior. Möglicherweise ist das Vorkommen glycinerger Somata im Tectum eine Besonderheit bei Amphibien.

In den mittleren Schichten der Zellkörperschicht 8 wurden bei Salamandern der Familie Plethodontidae cholinerge (ChAT) Neurone gleichmäßig entlang der mediolateralen und rostrocaudalen Ausdehnung des Tectum lokalisiert (Wallstein, 1999). Kolokalisationen zwischen Acetylcholintransferase und GABA bzw. Glutamat wurden bislang noch nicht beschrieben. Aufgrund der dichten und gleichmäßigen Verteilung GABAerger und glutamaterger Somata im mittleren Bereich der Schicht 8 lässt sich vermuten, dass ein Teil der cholinergen Neurone auch GABA oder Glutamat enthalten.

4.3.5 Neurone des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini

Neurone des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini sind bei Amphibien innerhalb der Zellkörperschichten des Tectum mesencephali lokalisiert. Auch in Salamandern der Familie Plethodontidae wurden die Somata dieser Neurone teilweise nach einer Applikation von Meerrettichperoxidase in das Ganglion des fünften Kranialnerven sowie in der rostralen Medulla innerhalb der periventrikulären Zellkörperschicht des Tectum markiert (Roth et al., 1988, 1990; Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998). In allen untersuchten Salamanderspezies waren die Somata der Neurone des Nucleus mesencephalicus die größten im Tectum

beschriebenen Zellen (Roth et al., 1990). Die Mehrheit dieser Neurone war immunreaktiv für Glutamat und schwach immunpositiv für Glycin. Zudem wird bei *Plethodon* von einer Immunreaktivität für das Enzym Acetylcholintransferase (ChAT) in den Neuronen des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini berichtet (Land, 2005).

Die Befunde der vorliegenden Untersuchung stimmen im Wesentlichen mit früheren immunhistochemischen Untersuchungen zur Verteilung von GABA und Glycin innerhalb der Neurone des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini bei Vögeln und Säugern überein (Granda und Crossland, 1989; Rampon et al., 1996).

4.3.6 Transmitterspezifität tecto-bulbarer Projektionsneurone

Das Tectum mesencephali von *Plethodon shermani* weist eine Vielzahl tectaler Neurone mit axonalen Projektionen in die Medulla oblongata auf. Neurone mit ipsilateral absteigenden Axonen im ventromedialen und ventrolateralen Trakt bildeten zwei unterschiedliche Zellpopulationen in den Zellkörperschichten des Tectum. Neurone mit contralateral absteigenden Axonen im ventromedialen Trakt wurden vorwiegend gleichmäßig verteilt in der oberen Zellreihe der Zellkörperschicht 6 lokalisiert. Frühere Tracing-Experimente an Salamandern der Familie Plethodontidae und *Discoglossus pictus* beschrieben entsprechende Projektionen tectaler Neurone (Naujoks-Manteuffel und Manteuffel, 1990; Dicke et al., 1998). Bei *Plethodon shermani* sind die tectalen Neurone mit deszendierenden Projektionen vorwiegend in der Schicht 6 lokalisiert und nur vereinzelt in der Schicht 8. Demzufolge befinden sich in der Schicht 8 vorwiegend tectale Interneurone. Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelte hohe Dichte GABAerger Somata in der Schicht 8 des Tectum von *Plethodon* lässt vermuten, dass viele der tectalen Interneurone GABAerg sind.

Bei Salamandern der Familie Plethodontidae wurden bislang fünf verschiedene Typen von Projektionsneuronen (TO1 bis TO5), mit jeweils unterschiedlicher Morphologie und verschiedenen axonalen Projektionsmustern beschrieben (Roth et al., 1990, 1999; Dicke, 1999). In der vorliegenden Untersuchung erfolgte erstmalig eine immunhistochemische Charakterisierung der einzelnen Projektionsneuronentypen mit deszendierenden Axonen in die Medulla. Die Mehrheit aller tecto-bulbaren Projektionsneurone (87%) beinhaltete Glutamat. In etwa der Hälfte dieser Zellen wurde zusätzlich der schnell inhibierende Transmitter GABA lokalisiert. Zudem wurden einige rein GABAerge Projektionsneurone identifiziert. Dem entgegen beschrieb Wallstein (1999) bei *Plethodon jordani* (n=1) anhand einer sehr kleinen Stichprobe von nur wenigen TO3-Neuronen Immunreaktivitäten für Glutamat und Glycin in diesen Zellen. In der vorliegenden Untersuchung wurde Glycin nur in

einem einzigen TO1-Neuron des contralateralen Tectum gefunden. Diese Zelle war zudem immunreaktiv für GABA und Glutamat. Eine intrazonale Häufigkeit glycinerger Somata von maximal 8% in der Zellkörperschicht 6 legt die Vermutung nahe, dass Glycin kein charakteristischer Transmitter für tecto-bulbare Projektionsneurone ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass einige wenige Projektionsneurone zusätzlich Glycin enthalten.

4.3.6.1 Tecto-bulbare Transmission

Bei *Plethodon shermani* ist Glutamat der vorherrschende Transmitter tecto-bulbarer Projektionsneurone. Intrazelluläre Ableitungen in der Medulla oblongata von *Plethodon* zeigten, dass medulläre Neurone nach einer Reizung des optischen Nerven mit einer Exzitation antworteten (Dicke und Roth, 1994; Heimbuch, 2001). Neurone der medialen Zone antworteten drei mal so schnell auf eine Reizung des contralateralen Nervus opticus, als bei Reizung des ipsilateralen Nervus opticus. Diese Befunde sprechen für eine Glutamat vermittelte exzitatorische tecto-bulbare Transmission.

Eine elektrische Reizung des optischen Nerven führt zu einer Erregung des gesamten Tectum. Einzelne exzitatorische oder inhibitorische Effekte hervorgerufen durch lokale Aktivierungen einzelner tectaler Neuronenpopulationen, wie z. B. die Erregung einzelner Zellgruppen auf einen visuellen Reiz hin, können hierdurch nicht ermittelt werden. Ein Vorkommen von GABA in etwa der Hälfte der immunhistochemisch charakterisierten tecto-bulbaren Projektionsneurone, lässt vermuten, dass bei *Plethodon shermani* auch eine inhibitorische tecto-bulbare Transmission via GABA erfolgen kann.

Ein charakteristisches Merkmal zur Unterscheidung der Neuronentypen mit ventromedial bzw. ventrolateral deszendierenden Projektionen ist ein Vorkommen von GABA und Glutamat in etwa der Hälfte aller TO1- und TO3-Neurone, deren Axone im ventromedialen Trakt deszendieren, während die TO2- und TO4-Neurone, deren Axone im ventrolateralen Trakt absteigen, nur zu etwa einem Drittel GABA und Glutamat enthielten. Aufgrund dieser Befunde lässt sich vermuten, dass eine mögliche inhibitorische Projektion stärker über den ventromedialen Trakt vermittelt wird. Physiologische Befunde zu einer möglichen GABAergen tecto-bulbaren Transmission in die Medulla liegen bislang noch nicht vor.

4.3.6.2 Tectale Projektionsneurone – Substrat für intratectale laterale Inhibition

Das in den Somata der tecto-bulbaren Projektionsneurone nachgewiesene GABA kann auch innerhalb des Tectum an der lokalen Verarbeitung visueller und multimodaler Reize beteiligt sein. Intrazelluläre Ableitungen im Tectum von *Plethodon* zeigten, dass tectale

Projektionsneurone nach einer Stimulation des contralateralen Nervus opticus bei kurzer Latenz mit einer Exzitation antworteten (Roth et al., 1999). Dieser ersten Antwort folgte zumeist entweder eine weitere exzitatorische oder eine inhibitorische Antwort. Dem entgegen antworteten tectale Interneurone erst nach längerer Latenz mit einer Exzitation oder einer Inhibition. Tectale Projektionsneurone werden demnach durch retinale Afferenzen des contralateralen Auges monosynaptisch erregt, um dann wiederum inhibierend oder erregend auf tectale Interneurone einzuwirken. Demzufolge müssen sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Transmitter in den Projektionsneuronen lokalisiert sein, was durch die vorliegende Untersuchung gezeigt werden konnte.

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung an Tectumpräparaten von *Plethodon shermani* zeigten, dass GABA sowohl in tecto-bulbaren Projektionsneuronen als auch in Interneuronen lokalisiert ist und innerhalb des Tectum auf benachbarte tectale Interneurone oder auch Projektionsneurone mittels dendro-dendritischer Kontakte einwirkt. Dieser anatomische Befund untermauert die von Roth und Kollegen (1999) beschriebenen physiologischen Antworteigenschaften tectaler Neurone. Weiterhin lassen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen den Schluss zu, dass die zweite, meist inhibitorische Antwort der Projektionsneurone durch benachbarte Projektionsneurone erzeugt wird.

4.3.7 Einfluss GABAerger Systeme bei der visuellen Verarbeitung

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter der Vertebraten. Im Tectum von *Plethodon shermani* wurden GABAerge Fasern in allen Schichten lokalisiert. Der Ursprung dieser Fasern ist mehrheitlich auf ein GABAerges intratectales Netzwerk bestehend aus verschiedenen Projektionsneuronentypen und einer Vielzahl unterschiedlicher Interneurone zurückzuführen. Zunächst wird ein Einfluss möglicher extratectaler GABAerger Afferenzen auf das Tectum besprochen. Anschließend wird das intratectale GABAerge System beschrieben und die Wirkung und Funktion von GABA innerhalb des Tectum diskutiert.

4.3.7.1 GABAerge Afferenzen im Tectum

Ein Einfluss GABAerger Afferenzen aus anderen Hirnregionen auf das Tectum ist bei Amphibien bislang noch weitesgehend ungeklärt. Im Folgenden wird ein möglicher Einfluss von drei extratectalen GABAergen Systemen auf das Tectum diskutiert.

Bei Salamandern der Familie Plethodontidae werden die tieferen Faserschichten des Tectum von einer Vielzahl parallel verlaufender multimodaler und reticulärer Afferenzen aus der

Medulla durchzogen (Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998). Wie in der vorliegenden Untersuchung beschrieben, enthalten einige Projektionsneurone des Nucleus vestibularis (NV) sowie des medialen Unterkernes des Nucleus reticularis medius (mNRM) GABA. Bislang ist jedoch ungeklärt, ob das in den Somata der Projektionsneurone nachgewiesene GABA über die Axone ins Tectum projiziert wird und dort inhibierend auf die visuelle und/oder multimodale Verarbeitung einwirkt. Analog zu der dendro-dendritischen Interaktion tecto-bulbarer Projektionsneurone lässt sich über eine dendro-dendritische Interaktion der sensorischen und reticulären Projektionsneurone innerhalb der Medulla spekulieren. Bislang wurde die synaptische Verschaltung der sensorischen und reticulären Kerne innerhalb der Medulla noch nicht untersucht.

Des weiteren wird im Tectum mesencephali der Vertebraten ein inhibitorischer Einfluss durch GABAerge retinale Fasern diskutiert (Frösche: Li und Fite, 1998; Salamander: Watt et al., 1994; Vögel: Kalloniatis und Fletcher, 1993). Die Autoren berichten über eine geringe Anzahl GABAerger Retinaganglienzellen mit Projektionen in die retinalen Faserschichten des Tectum. Die Funktion dieser Projektion ist bislang jedoch ungeklärt. In Salamandern der Familie Plethodontidae wurde bislang keine GABAerge Projektion von der Retina beschrieben. Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen belegen, dass die retino-tectale Transmission vorwiegend über Glutamat vermittelt wird (Kahl, 1999).

Ebenso wird ein extratectaler inhibitorischer Einfluss auf das Tectum mesencephali durch bilaterale prätectale Afferenzen, deren Terminalien in allen Faserschichten bei Salamandern der Familie Plethodontidae nachgewiesen wurden, diskutiert (Finkenstädt et al., 1983; Luksch et al., 1998; Kahl, 1999). Immunhistochemische Untersuchungen beschrieben eine Vielzahl GABAerger Somata im Prätectum von Amphibien (Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Tyler et al., 1995; Li und Fite, 1998; Wallstein, 1999; Hollis und Boyd, 2005). Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen an *Plethodon jordani* beschreiben einen inhibitorischen Einfluss des Prätectum auf das Tectum (Kahl, 1999). Bislang ist jedoch ungeklärt, ob dieser Effekt direkt durch GABAerge Afferenzen des Prätectum erzeugt wird, oder ob exzitatorische Afferenzen des Prätectum auf GABAerge tectale Neurone einwirken.

4.3.7.2 Intratectales GABAerges System

Das intratectale GABAerge Netzwerk bei *Plethodon* besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher tectaler Neurone, deren Dendriten vorwiegend in den retinalen Faserschichten aborisieren (Roth et al., 1999). Diese Neurone sind der Ursprung der in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen massiven Fasermarkierung für GABA in den

oberen retinalen Schichten. Eine Vielzahl axo- und dendro-dendritischer Kontakte zwischen GABAergen Fasern und anderen dendritischen Strukturen belegen eine starke intratectale Vernetzung zwischen tectalen Interneuronen und/oder Projektionsneuronen. Diese Befunde sind mit früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen GABAerger Immunreaktivitäten im Tectum von Fröschen und im Colliculus superior der Säuger vergleichbar (Frösche: Antal, 1991; Rybicka und Udin, 1994; Säuger: Mize et al., 1994; Übersicht in Mize, 1992).

4.3.7.3 Postsynaptische Wirkung von GABA

Pharmakologische Untersuchungen zur Wirkung von GABA im Tectum mesencephali von Amphibien zeigten einen biphasischen Effekt (Sivilotti und Nistri, 1992; Kahl, 1999). Geringe Konzentrationen von GABA und dem $GABA_{A/C}$-Rezeptor-Agonisten Muscimol-Hydrobromid bewirkten eine Zunahme der Amplitude des postsynaptisch evozierten Potentials, während hohe Konzentrationen dieser Stoffe eine Abnahme der Amplitude erzeugten. Eine Applikation des $GABA_B$-Rezeptor-Agonisten (+/-)Baclofen führte zu einer Abnahme der Amplituden des postsynaptisch evozierten Potentials (Kahl, 1999). Kahl erbrachte hiermit einen indirekten Nachweis der Beteiligung von $GABA_A$-, $GABA_B$- und $GABA_C$-Rezeptoren an postsynaptischen Prozessen im Tectum mesencephali von *Plethodon.* Er vermutete, dass $GABA_A$-Rezeptoren an einem Zentrum-Umfeld-Antagonismus beteiligt sind, während $GABA_B$-Rezeptoren Habituationseffekte erzeugen. Eine Zentrum-Umfeldbeeinflussung setzt laterale Inhibition voraus. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung machen wahrscheinlich, dass dieser Mechanismus sowohl über tectale Projektionsneurone als auch über Interneurone vermittelt werden kann. Es ist daher anzunehmen, dass $GABA_A$-Rezeptoren auf der dendritischen Membranoberfläche tectaler Projektionsneurone und Interneurone lokalisiert sind. Des weiteren beobachtete Kahl (1999) durch eine pharmakologische Hemmung tectaler $GABA_A$-Rezeptoren im Tectum von *Plethodon* eine Zunahme polysynaptischer Exzitationen. Er schlussfolgerte, dass eine wesentliche Funktion der $GABA_A$-Rezeptor vermittelten Inhibition ist, ein „Überschießen der Erregung“ zu verhindern. Dies könnte durch eine kontrollierbare „permanente“ Inhibition erzeugt von einer Vielzahl von Interneuronen auf das Tectum ausgelöst werden.

Untersuchungen zur Charakterisierung von $GABA_A$-Rezeptoren im Hirngewebe von *Rana catesbeiana* lieferten Hinweise auf das Vorkommen eines dem $GABA_A$-Rezeptor der Säuger ähnlichem Rezeptorproteins (Hollis und Boyd, 2003). $GABA_A$-, $GABA_B$- und $GABA_C$-

Rezeptoren wurden ebenfalls im Tectum anderer Vertebraten detektiert (Vögel: Rodríguez Gil et al., 2005; Säuger: Margeta-Mitrovic et al., 1999; Pirker et al., 2000; Schmidt et al., 2001).

4.3.7.4 Modell zur intratectalen inhibitorischen Interaktion

Ein regelbares intratectales Netzwerk, bestehend aus einer Vielzahl inhibitorischer dendritischer und/oder axonaler Verbindungen, ist bei der Verarbeitung visueller und multimodaler Objekte notwendig, um eine „Dauererregung“ aufgrund des Überangebotes visueller und multimodaler Reize zu verhindern. Ein sehr vereinfachtes Modell zur intratectalen inhibitorischen Interaktion im Tectum von *Plethodon* ist in der Abbildung 37 dargestellt. Zur Vereinfachung wurden in dem Modell Populationen verschiedener Projektions- (P1 und P2) bzw. Interneurone (I1 und I2) als einzelne Zellen dargestellt.

Eine Vielzahl von Interneuronen (I1) wirkt vorwiegend inhibitorisch auf tectale Projektionsneurone (P1) ein, wodurch die Schwelle der Erregbarkeit in den Projektionsneuronen heraufgesetzt wird. Exzitatorische oder inaktive Interneurone (I2) hingegen erzeugen keine lokalen Inhibitionen bei benachbarten Projektions- oder Interneuronen. Die nicht inhibierten Projektionsneurone (P2) können durch visuelle und/oder multimodale Afferenzen erregt werden. Durch die Erregung einer Population von tectalen Projektionsneuronen (P2), welche an der Verarbeitung bestimmter visueller Eigenschaften des Reizes (Form, Gestalt, Bewegungsmuster etc.) sowie der Lokalisation des Objektes im dreidimensionalen Raum beteiligt sind, werden benachbarte Projektions- oder Interneurone über die Ausschüttung von GABA an dendro-dendritischen Synapsen inhibiert (P1, I2). Tecto-bulbare Projektionsneurone der aktivierten Population (P2) wirken exzitatorisch via Glutamat oder inhibitorisch über die Ausschüttung von GABA auf die Medulla ein. Der genaue Wirkungsort innerhalb der Medulla ist jedoch noch weitesgehend ungeklärt.

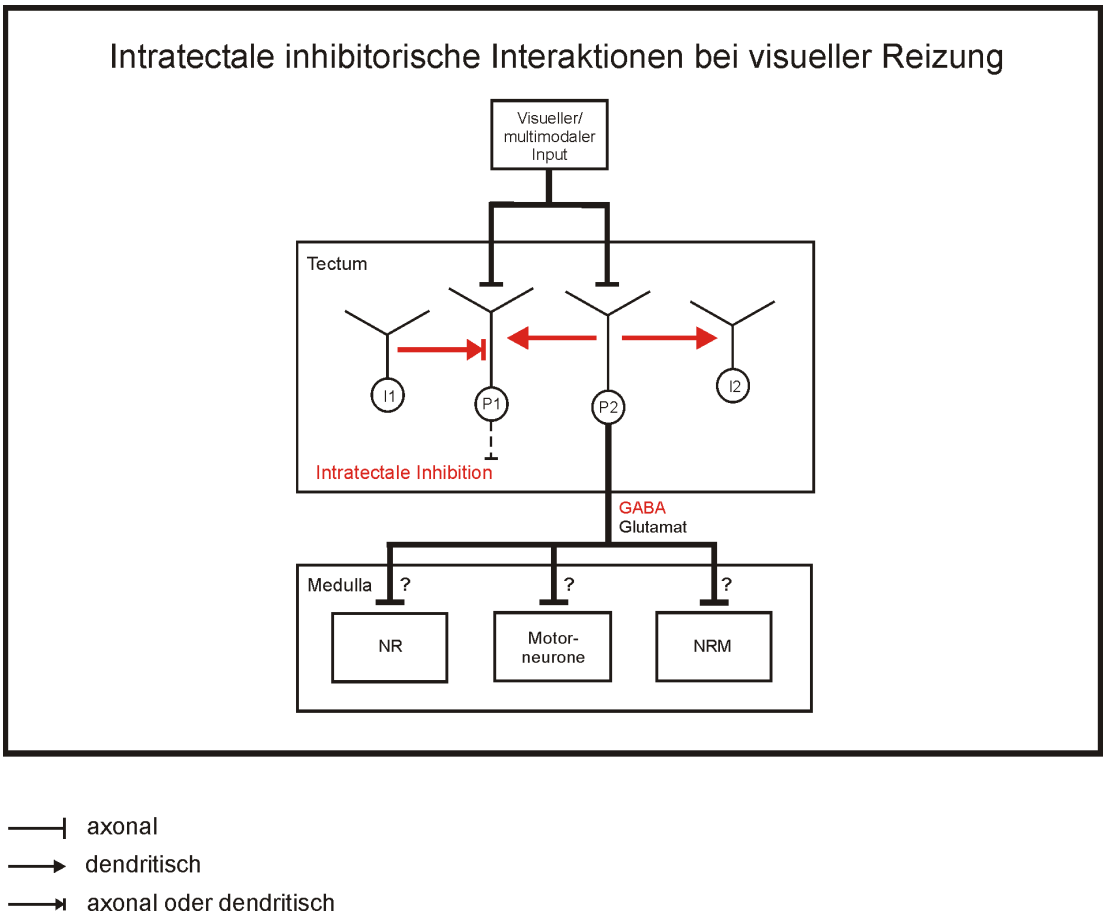


Abb. 37: Modell der Interaktionen des intratectalen GABAergen Systems bei der visuellen/multimodalen Reizung. Die einzelnen Neurone symbolisieren verschiedene Neuronenpopulationen. Rote Verbindungen zeigen inhibitorische, GABA vermittelte Interaktionen zwischen den tectalen Neuronen; schwarze Verbindungen symbolisieren exzitatorische, Glutamat vermittelte Interaktionen. Die gestrichelten Verbindungen stellen unterdrückte exzitatorische Interaktionen dar. NR = Nuclei raphes; NRM = Nucleus reticularis medius. Weitere Erläuterungen sind im Text gegeben.

Die intratectale Verarbeitung visueller Reize kann durch eine Vielzahl anderer multimodaler und retikulärer Afferenzen aus der Medulla und dem ventralen Tegmentum sowie durch den Einfluss bewertender Afferenzen aus dem Thalamus (Roth et al., 1999, 2003, 2004) beeinflusst werden. Im Folgenden wird der Einfluss reticulärer Kerne auf das Tectum von *Plethodon shermani* besprochen.

4.3.8 Einfluss glycinerger Afferenzen des Nucleus reticularis medius im Tectum

Die Projektionsneurone des Nucleus reticularis medius (NRM) terminieren in den tiefen Schichten des Tectum mesencephali, in denen die Fasern tectaler Efferenzen und die nicht-visueller Afferenzen verlaufen. In einer früheren anterograden Tracing-Untersuchung beschrieben Dicke und Mühlenbrock-Lenter (1998), dass die Hauptprojektion des NRM in die Schichten 5 und 7 des Tectum einzieht. Wenige Kollaterale wurden in der Schicht 3

nachgewiesen. Neuere Untersuchungen mittels verbesserter Nanoliterinjektion von Biocytin in den NRM zeigten, dass die Hauptprojektion dieses Kerns in den Schichten 4, 5 und 7 erfolgt (Dicke, unveröffentlichte Daten). Die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Befunde zeigten, dass annähernd alle markierten Projektionsneurone des NRM glycinerg sind und ein komplexes Muster an Ko- und Dreifachlokalisationen mit GABA und Glutamat aufweisen. Eine massive glycinerge Faseranfärbung wurde in den Schichten 4, 5 und 7 nachgewiesen, welche überwiegend vom NRM stammt, da es im Tectum nur wenige glycinerge Zellen gibt. Es lässt sich daher vermuten, dass der NRM hauptsächlich der Ursprung für die im Tectum nachgewiesenen glycinergen Fasern ist. Es ist jedoch anzunehmen, dass ein sehr geringer Anteil der glycinergen Fasern von den im Tectum lokalisierten glycinergen Neuronen stammt. Glycinerge Faserprojektionen aus dem Thalamus und Prätectum wurden bislang noch nicht beschrieben.

4.3.8.1 Einfluss des NRM auf tectale Interneurone

Die elektronenmikroskopischen Befunde der vorliegenden Untersuchung zeigten, dass die Neurone des NRM indirekt auf die in die Medulla oblongata absteigenden Projektionsneurone einwirken. Glycinerge Axone des NRM wirken über axo-dendritische Kontakte auf tectale Neurone ein, welche wiederum über dendro-dendritische Kontakte auf tecto-bulbare Projektionsneurone oder Interneurone einwirken. Eine Zuordnung der zwischengeschalteten Neurone zu einem bestimmten Neuronentyp ist bislang ungeklärt. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um tectale inhibitorische oder exzitatorische Interneurone. Tectale Projektionsneurone des Typs TO5, welche ausschließlich aszendierend in den Thalamus projizieren, könnten ebenso als zwischengeschaltete Neurone fungieren. Die Dendriten dieser Neurone aborisieren jedoch vorwiegend in den retinalen Faserschichten. Im Folgenden wird daher eine mögliche Verschaltung glycinerger Afferenzen des NRM auf inhibitorische Interneurone beschrieben.

Ein sehr vereinfachtes Modell zur intratectalen Verarbeitung unter dem Einfluss des NRM im Tectum von *Plethodon* zeigt die Abbildung 38. Zur Vereinfachung wurden in dem Modell Populationen verschiedener Projektions- (TO2 und TO3) bzw. Interneurone (I1 und I2) als einzelne Zellen dargestellt.

Unter der Annahme einer regelbaren inhibitorischen Interaktion tectaler Neurone untereinander, ist die Schwelle der Erregbarkeit bei einer Vielzahl von Projektionsneuronen heraufgesetzt, wodurch diese Zellen nicht durch multimodale und/oder visuelle Afferenzen erregt werden können. Durch den Einfluss glycinerger Afferenzen des NRM können selektiv

einzelne inhibitorische Interneurone (I2) inhibiert werden, wodurch die Hemmung der Erregbarkeit benachbarter Projektionsneurone (TO3) aufgehoben wird (Abb. 38). Der Eingang exzitatorischer multimodaler und/oder visueller Afferenzen kann daraufhin zu einer Erregung dieser Projektionsneurone führen. Tecto-bulbare Projektionsneurone, wie das im Modell dargestellte TO3-Neuron, können daraufhin entweder exzitatorisch via Glutamat oder inhibitorisch über GABA auf das Netzwerk der Medulla oblongata einwirken. Intratectal können diese Zellen inhibitorisch über dendro-dendritische Kontake auf andere Projektionsneurone einwirken, wodurch letztere in ihrer Aktivität gehemmt werden (TO2). Der in diesem Modell dargestellte Einfluss des NRM führt also indirekt über eine Disinhibition von Interneuronen zu einer selektiven Aktivierung einer Gruppe von Projektionsneuronen. Der NRM kann somit ein möglicher Kandidat für die Kontrolle von Wachheit- und Aufmerksamkeitsprozessen bei der Generation von visuomotorischem Verhalten sein.

In den tieferen Faserschichten 4 und 5 des Tectum aborisieren vorwiegend die Dendriten der ipsilateral deszendierenden TO3-Neurone, welche an der Verarbeitung multimodaler Afferenzen und somit an der Initiierung von Verteidigungs- und Fluchtreaktionen beteiligt sind (Mühlenbrock-Lenter, 2001). Es lässt sich vermuten, dass der Einfluss des NRM vorwiegend zu einer indirekten Aktivierung dieser Neurone führt. In diesem Fall lässt sich ein Einfluss des NRM bei der Initiierung von Verteidigungsreaktionen vermuten.

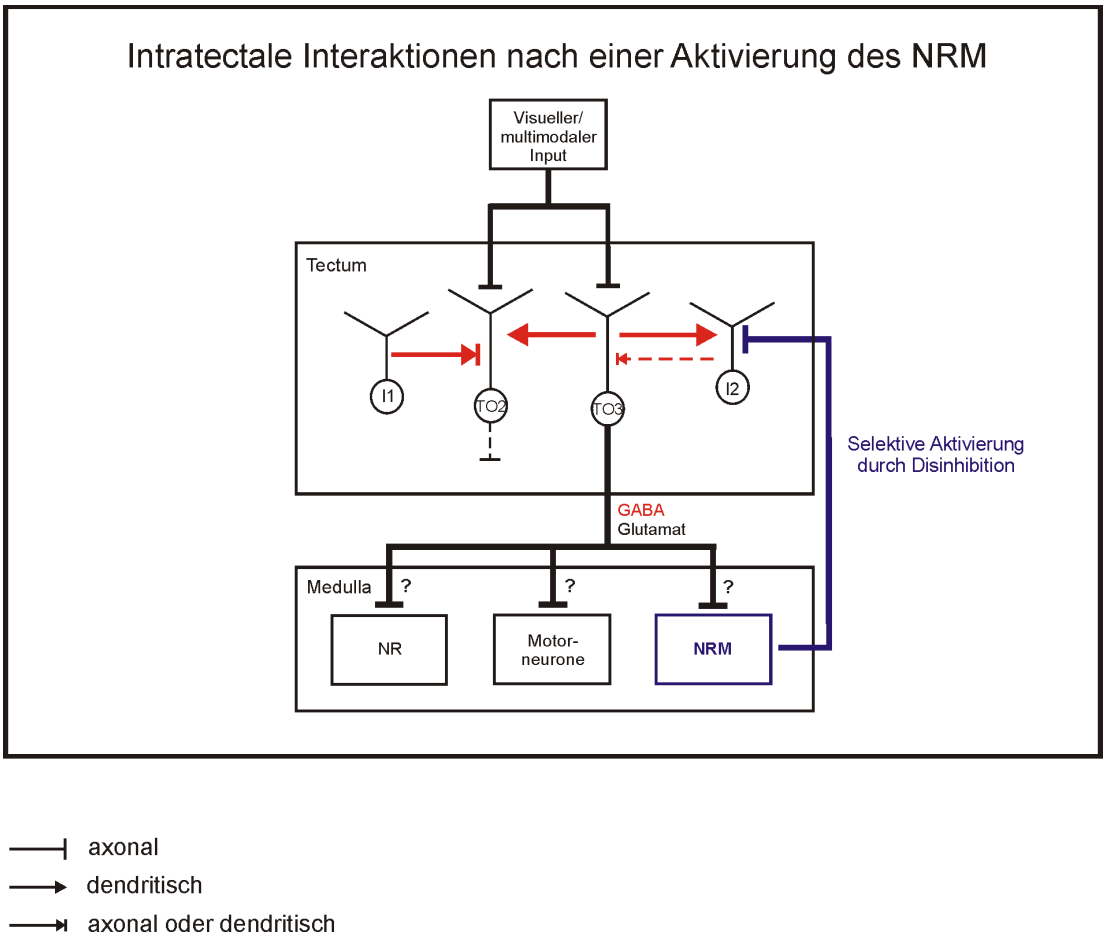


Abb. 38: Modell intratectaler Interaktionen nach einer Aktivierung des NRM. Die einzelnen Neurone symbolisieren verschiedene Neuronenpopulationen. Rote Verbindungen zeigen inhibitorische, GABA vermittelte Interaktionen zwischen den tectalen Neuronen; schwarze Verbindungen symbolisieren exzitatorische, Glutamat vermittelte Interaktionen. Der glycinerge inhibitorische Einfluss des NRM wird durch die blaue Verbindung angezeigt. Die gestrichelten Verbindungen stellen unterdrückte exzitatorische bzw. inhibitorische Interaktionen dar. NR = Nuclei raphes; NRM = Nucleus reticularis medius. Weitere Erläuterungen sind im Text gegeben.

4.3.8.2 Physiologische Wirkung von Glycin

In-vitro-pharmakologische Untersuchungen an Amphibien zeigten, dass Glycin während der Ableitung von tectalen Neuronen bei elektrischer Stimulation des optischen Nerven einen biphasischen Effekt erzeugt. Geringe Konzentrationen von Glycin erzeugten einen exzitatorischen Effekt, während hohe Konzentrationen des Transmitters einen inhibitorischen Effekt hervorriefen (Sivilotti und Nistri, 1986; Kahl, 1999). Die im Modell dargestellte glycinerge Disinhibition der Interneurone und die daraus resultierende Exzitation der Projektionsneurone ist somit ein möglicher Mechanismus des exzitatorischen Effektes. Der durch hohe Konzentrationen ausgelöste inhibitorische Effekt kann hierdurch jedoch nicht erklärt werden. Hierfür lassen sich drei verschiedene mögliche Ursachen vermuten:

1. Ein indirekter Einfluss glycinerger Afferenzen des NRM auf exzitatorische Interneurone und dadurch eine Abnahme exzitatorischer Eingänge auf Projektionsneurone. Andere inhibitorische Eingänge von Interneuronen würden dadurch nicht beeinträchtigt, so dass daraus eine Inhibition der Projektionsneurone resultieren würde.
2. Einen direkten Einfluss glycinerger Afferenzen des NRM auf die Projektionsneurone und dadurch eine Inhibition der tecto-bulbaren bzw. tecto-thalamischen Transmission.
3. Ein Einfluss des NRM auf präsynatische visuelle und/oder multimodale Afferenzen und dadurch eine Hemmung der Erregung von Projektionsneuronen.

Die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Befunde geben keine Hinweise auf eine Verschaltung der glycinergen Afferenzen auf Projektiosneurone oder präsynaptische Axone. Zur Klärung des inhibitorischen Effektes sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

4.3.9 Serotonerge Modulation im Tectum

Ein weiteres transmitterspezifisches System im Tectum der Vertebraten ist das serotonerge System. In der vorliegenden Untersuchung wurden 5-HT-haltige axonale Strukturen in den retinalen Faserschichten 2 und 3 sowie der efferenten Faserschicht 4 bei *Plethodon* dokumentiert. Serotonerge Fasern wurden bei allen bislang untersuchten Wirbeltieren in diesen Schichten des Tectum beschrieben (Salamander: Gruberg und Harris, 1981; Fasolo et al., 1986; Clairambault et al., 1994; Dicke et al., 1997; Wallstein, 1999; Frösche: Ueda et al., 1984; Liu und Debski, 1995; Zhao und Debski, 2005; Fische: Adrio et al., 1999; Kaslin und Panula, 2001). Während bei *Rana pipiens* von einer Vielzahl serotonerger Neurone in allen Zellkörperschichten des Tectum berichtet wird (Debski et al., 1995), wurden 5-HT immunreaktive Neurone nicht im Tectum von Salamandern der Familie Plethodontidae lokalisiert (Dicke et al., 1997; Wallstein, 1999). Die serotonerge Faserprojektion ist somit nicht intratectalen Ursprungs. Durch kombinierte Tracing- und immunhistochemische Untersuchungen bei *Rana pipiens* konnten diese serotonergen Fasern auf Projektionen der unterschiedlichen Raphekerne in der medianen Zone der Medulla und des ventralen Tegmentum zurückgeführt werden (Liu und Debski, 1995; Zhao und Debski, 2005). Frühere retrograde Tracing-Experimente zur tecto-bulbaren Konnektivität bei Salamandern konnten keine Verbindungen der Nuclei raphes zum Tectum aufzeigen (Gruberg und Harris, 1981; Dicke et al., 1997; Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998; Wallstein, 1999).

Nanoliterinjektionen von Biocytin in die Zellen der median lokalisierten Nuclei raphes der rostralen Medulla zeigten jedoch biocytinhaltige Fasermarkierungen in den Schichten 2-4 des Tectum (Dicke, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Untersuchung wurden sehr vereinzelt bulbo-tectale Projektionsneurone in der medianen Zone der rostralen Medulla bei *Plethodon* lokalisiert. Es ist daher anzunehmen, dass die in der Faserschicht 2-4 des Tectum lokalisierten 5-HT-immunreaktiven Fasern axonale Projektionen der Nuclei raphes sind. Bei Säugern wurden aszendierende serotonerge Projektionen des Nucleus raphe dorsalis und Nucleus raphe magnus zum Colliculus superior beschrieben (Janušonis et al., 1999; Coimbra et al., 2006).

Bei Salamandern der Familie Salamandridae und bei Fröschen wurden 5-HT immunreaktive Retinaganglienzellen detektiert, die in die retinalen Faserschichten des Tectum projizieren (Liu und Debski, 1993, 1995). Bei *Plethodon* wurden bislang noch keine serotonergen Retinaganglienzellen beschrieben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein geringer Teil der in den retinalen Faserschichten 2 und 3 verlaufenden parallelen Axone retinalen Ursprungs ist.

Im Folgenden wird zunächst die physiologische Wechselwirkung von Serotonin und GABA im Tectum mesencephali von Amphibien besprochen. Anschließend erfolgt eine funktionelle Diskussion über den Einfluss der serotonergen Neurone der Nuclei raphes auf die visuelle und multimodale Verarbeitung im Tectum.

4.3.9.1 Wechselwirkung zwischen Serotonin und GABA

Erste Ergebnisse zur synaptischen Verschaltung serotonerger Axone in den intermediären Faserschichten 2-4 des Tectum mesencephali von *Plethodon shermani* zeigten direkte axo-dendritische Kontakte zu tecto-bulbaren Projektionsneuronen. Sehr vereinzelt wurden serotonerge axo-dendritische Kontakte zu unmarkierten Fasern nachgewiesen, welche vermutlich von GABAergen Interneuronen stammen. Patch clamp-Untersuchungen am Tectumteilhirnpräparat von *Rana pipiens* zeigten nach einer Applikation von Serotonin eine dosisabhängige Inhibition mono- und polysynaptischer retino-tectaler Antworten (Malayev und Debski, 1998). Die Autoren diskutierten eine postsynaptische Lokalisation von 5-HT_{1A}- und 5-HT_2-Rezeptoren an exzitatorischen Synapsen zwischen retino-tectalen Afferenzen und tectalen Neuronen. Autoradiografische Untersuchungen an *Rana pipiens* beschreiben 5-HT_{1A}-Bindungsstellen vorwiegend in den superfiziellen, retinorezipienten Faserschichten und 5-HT_{1B}-Bindungsstellen hauptsächlich in den tieferen Faserschichten des Tectum (Butt et al., 2002). Die Autoren vermuten, dass 5-HT_{1A}-Rezeptoren vorwiegend auf tectalen Neuronen

lokalisiert sind, deren Dendriten synaptische Kontakte zu retinalen Afferenzen besitzen, während 5-HT_{1B}-Rezeptoren vorwiegend auf der Membranoberfläche GABAerger Interneurone vorkommen. Folglich wirken im Tectum mesencephali von Amphibien serotonerge Fasern sowohl auf tectale Projektionsneurone als auch auf GABAerge Interneurone ein, wie dies in der vorliegenden Untersuchung bei *Plethodon* gezeigt wurde.

Mittels pharmakologischer Untersuchungen wurden bei *Rana pipiens* sowohl $GABA_A$- als auch 5-HT-Rezeptoren an der Membranoberfläche der gleichen tectalen Neurone nachgewiesen (Malayev und Debski, 1998). Eine Applikation von Serotonin führte zu einer Reduzierung lateraler inhibitorischer Interaktionen zwischen den tectalen Neuronen. Butt und Kollegen (2002) postulierten, dass eine Aktivierung der 5-HT-Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation der tectalen Neurone führt. Dies führt im Fall einer Aktivierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren zu einer Abnahme der Effektivität der retino-tectalen Transmission, im Fall der 5-HT_{1B}-Rezeptoren zu einer Kontrolle der Ausschüttung von GABA. Pharmakologische Untersuchungen am Tectumteilhirnpräparat von *Plethodon* zeigten eine Zunahme später exzitatorischer Ereignisse durch eine Applikation von Serotonin-Hydrochlorid, welche vermutlich auf eine inhibitorische Wirkung an inhibierenden, GABAergen Interneuronen zurückzuführen ist (Kahl, 1999). Diese physiologischen Befunde sowie die in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen axo-dendritischen Kontakte serotonerger Afferenzen mit tectalen Neuronen legen die Vermutung nahe, dass bei *Plethodon* eine ähnliche Verteilung der 5-HT-Rezeptoren vorliegt. Für eine Überprüfung der Hypothese ist ein Nachweis der einzelnen 5-HT-Rezeptoren im Tectum von Salamandern der Familie Plethodontidae notwendig.

4.3.9.2 Modell zum Einfluss der serotonergen Projektion der Nuclei raphes

Serotonerge Afferenzen der medullären Raphekerne ziehen vorwiegend ipsilateral in die retinalen Schichten 2-4 des Tectum mesencephali ein. Bei Salamandern der Familie Plethodontidae aborisieren in diesen retinalen Schichten vorwiegend die Dendriten der TO2- und TO4-Neurone, welche vermutlich an der visuellen Verarbeitung bewegter Objekte beteiligt sind (Dicke, 1999; Roth et al., 1999). In den tieferen Schichten 3-5 aborisieren vorwiegend TO3-Neurone, welche an der Verarbeitung multimodaler und reticulärer Afferenzen beteiligt sind (Dicke, 1999; Roth et al., 1999). Zusätzlich verlaufen in diesen Schichten viele Dendriten tectaler GABAerger Interneurone.

Bei *Plethodon shermani* wurde ein Einfluss serotonerger Afferenzen sowohl auf tecto-bulbare Projektionsneurone als auch auf Interneurone beschrieben. Aufgrund der durch Serotonin

vermittelten Hyperpolarisation, welche zu einer Abnahme der Erregbarkeit eines Neurons führt, werden durch den Einfluss der Nuclei raphes selektiv Interneurone inaktiviert, wodurch eine oder mehrere Populationen von Projektionsneuronen aktiviert werden können. Die im Tectum ausgelöste Veränderung der tectalen Interaktionen entspricht der durch den Einfluss des NRM beschriebenen Interaktionsänderung. Im Folgenden wird daher nur ein mögliches Modell zum Einfluss serotonerger Axone auf tecto-bulbare Projektionsneurone dargestellt.

Projektionsneurone (Abb. 39; TO2) können durch serotonerge Afferenzen der Nuclei raphes selektiv an ihren Dendriten hyperpolarisiert werden. Dies führt zu einer erschwerten Erregbarkeit der dendritischen Faser, wodurch die Projektionsneurone inhibiert werden, was zu einer Abnahme der tecto-bulbaren Transmission führt. Gleichzeitig erfolgt durch die Inaktivierung der Projektionsneurone eine Abnahme der intratectalen Inhibition auf benachbarte Zellen (Abb. 39; I1 und TO1). Der Einfluss der Nuclei raphes kann somit zu einer selektiven Abnahme der tecto-bulbaren Transmission einer oder mehrerer Populationen von Projektionsneuronen führen („Down"-Regulierung). Gleichzeitig können andere Neuronenpopulationen durch eine Abnahme intratectaler Inhibitionen selektiv erregt werden („Up"-Regulierung). Aufgrund der selektiven Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen sind die Nuclei raphes ebenfalls an der Kontrolle von Wachheit- und Aufmerksamkeitsprozessen bei der Generation von visuomotorischem Verhalten beteiligt.

In der Medulla oblongata bestehen axonale Projektionen der Nuclei raphes zum Nucleus reticularis medius (Dicke et al., 1997). Der Einfluss dieser Projektionen auf die Neurone des NRM ist bislang noch ungeklärt.

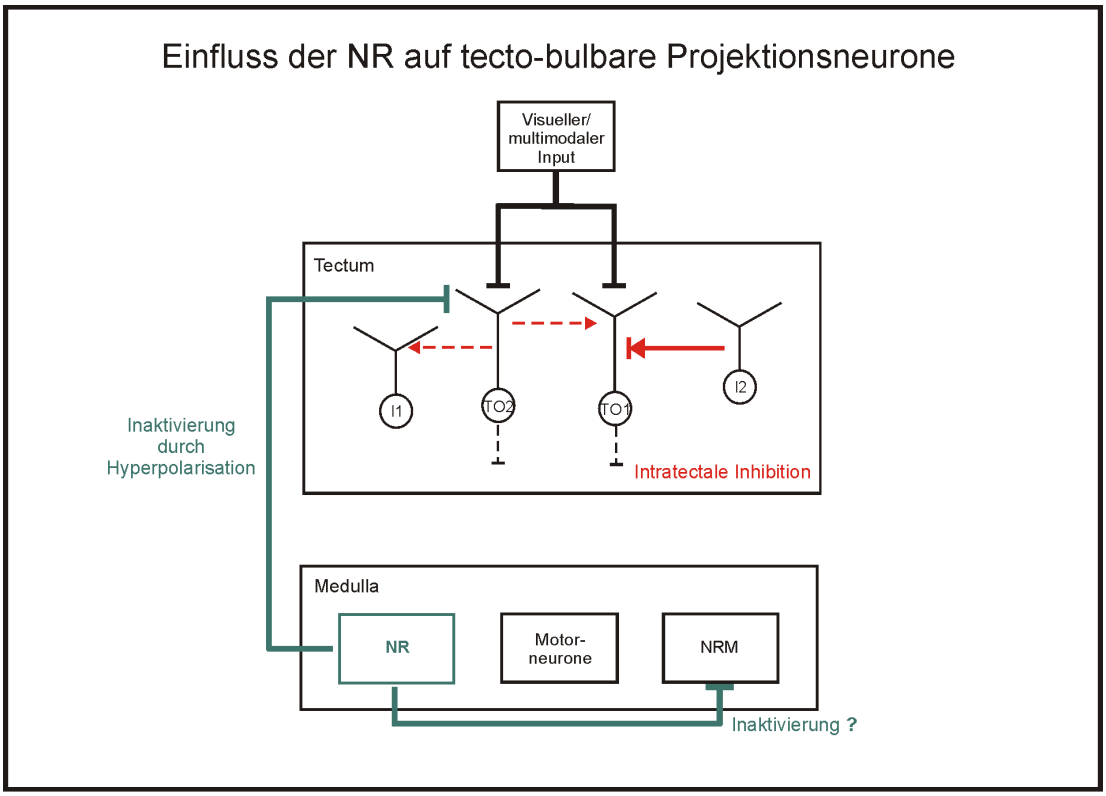


Abb. 39: Modell zur Verschaltung serotonerger Afferenzen der Nuclei raphes (NR) auf tecto-bulbare Projektionsneurone. Die einzelnen Neurone symbolisieren verschiedene Neuronenpopulationen. Rote Verbindungen zeigen inhibitorische, GABA vermittelte Interaktionen zwischen den tectalen Neuronen; schwarze Verbindungen symbolisieren exzitatorische, Glutamat vermittelte Interaktionen. Der serotonerge inhibitorische Einfluss der NR wird durch die türkise Verbindung angezeigt. Die gestrichelten Verbindungen stellen unterdrückte exzitatorische bzw. inhibitorische Interaktionen dar. NRM = Nucleus reticularis medius. Weitere Erläuterungen sind im Text gegeben.

4.3.10 Kontrolle von Aufmerksamkeitsprozessen im Tectum mesencephali

Die in dieser Untersuchung gewonnenen Kenntnisse über das tecto-reticuläre System bei *Plethodon shermani* machen wahrscheinlich, dass die beiden in der Medulla oblongata lokalisierten reticulären Kerngruppen, der Nucleus reticularis medius und die Nuclei raphes, im Tectum mesencephali Aufmerksamkeitsprozesse kontrollieren. Die grundlegenden Prozesse bei der aufmerksamkeitsgesteuerten Verarbeitung visueller und/oder multimodaler Reize sind hierbei sehr ähnlich. Beide Kerne können durch eine Hemmung meist inhibitorischer intratectaler Interaktionen selektiv Neuronenpopulationen aktivieren, die an einer Verarbeitung bedeutungsrelevanter Objekte beteiligt sind. Aufgrund einer unterschiedlichen Projektion der beiden Kerne in verschiedene tectale Faserschichten, könnte ein möglicher funktioneller Unterschied in einer unterschiedlichen Selektion verschiedener Neuronenpopulationen liegen. Da glycinerge Afferenzen des NRM vorwiegend in den tiefen Faserschichten des Tectum terminieren, können vorwiegend TO3-Neurone indirekt aktiviert werden, während durch die Projektion der Nuclei raphes in die Schichten 2-4 hauptsächlich TO2- und TO4-Neurone selektiv erregt werden können. Physiologische Befunde zur Projektion der einzelnen reticulären Kerngruppen liegen noch nicht vor.

4.4 Konnektivität und cytochemische Organisation des ventralen Mesencephalon

Das ventrale Mesencephalon ist eine anatomisch und funktionell sehr heterogene Hirnstruktur, die sich in drei unterschiedliche Gebiete einteilen lässt. Im Folgenden werden die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Befunde zur Neurotransmitterverteilung und Konnektivität mit den Befunden anderer Untersuchungen bei Vertebraten verglichen und mögliche funktionelle Aspekte diskutiert.

4.4.1 Konnektivität und cytochemische Organisation des Torus semicircularis

Der Torus semicircularis der Salamander, das dem Colliculus inferior der Säuger homologe Hirnareal, ist das Hauptintegrationszentrum für die Verarbeitung auditorischer und vestibulärer Informationen. Bei Amphibien wurden bislang zwei verschiedene Unterkerne dieses auditorischen und vestibulären Zentrums beschrieben. Der dorsale meist laminierte Subnucleus verarbeitet auditorische, spinale und vibratorische Informationen, während der ventrale vorwiegend caudal gelegene magnozelluläre Subnucleus an der Verarbeitung vestibulärer Informationen beteiligt ist (Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998). Bei Salamandern befindet sich der magnozelluläre Subnucleus des Torus semicircularis zwischen Tectum und dorsalem Tegmentum (Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Wallstein, 1999).

Bei *Plethodon shermani* enthielten die Neurone des Torus semicircularis fast ausschließlich Glutamat. Sie wurden besonders im dorsalen laminaren Bereich des Torus lokalisiert. Lediglich im ventralen und periventrikulären Bereich, insbesondere des caudalen Torus wurden einige GABAerge Neurone lokalisiert, die zudem sehr häufig mit Glutamat kolokalisiert waren. Die Mehrheit aller Neurone mit absteigenden Projektionen deszendierte ungekreuzt im ventromedialen und ventrolateralen Trakt. Diese Projektionsneurone wurden vorwiegend im dorsalen laminaren Torus lokalisiert. Vergleichbare Tracing-Experimente an Amphibien beschreiben ebenfalls eine vorwiegend ipsilaterale Projektion toraler Neurone in die ventromediale und -laterale Medulla (Dicke et al., 1998). Glutamat ist der Haupttransmitter aller deszendierenden Projektionsneurone des Torus. Etwa ein Viertel der Neurone war zusätzlich immunreaktiv für GABA und wurde vorwiegend im caudalen Bereich des dorsalen Torus detektiert. Bei diesen Zellen kann Glutamat auch ein Stoffwechselzwischenprodukt sein.

Caudal gelegene Neurone des magnozellulären Subnucleus des Torus semicircularis wurden ventrolateral in der Zellkörperschicht des dorsalen Tegmentum lokalisiert. Diese großzelligen Neurone waren vorwiegend immunreaktiv für GABA und Glutamat. Projektionsneurone im

magnozellulären Subnucleus des Torus deszendierten sowohl ipsi- als auch contralateral in die Medulla oblongata und waren mehrheitlich immunreaktiv für GABA und Glutamat.

Frühere immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation GABAerger Somata in toralen Gebieten von Salamandern der Familie Plethodontidae beschreiben eine ähnliche Verteilung der GABAergen Zellen (Wallstein, 1999). Dagegen wurde bei anderen Salamandern und bei *Rana esculenta* vorwiegend von einer Immunnegativität für GABA im Torus berichtet (Franzino und Morino, 1989; Naujoks-Manteuffel et al., 1994). Neuere immunhistochemische Untersuchungen an Fröschen dokumentieren eine differenzierte Verteilung GABAerger Somata in zwei verschiedenen Subnuclei des Torus (Hollis und Boyd, 2005), welche im Wesentlichen der Verteilung bei *Plethodon* entspricht. Das Vorkommen GABAerger Somata wurde auch bei anderen Vertebraten im Torus semicircularis (Fische: Médina et al., 1994; Reptilien: Bennis et al., 1991) bzw. Colliculus inferior (Säuger: van der Heyden et al., 1979) beschrieben.

Als Hauptintegrationszentrum der Verarbeitung auditorischer Informationen erhält der dorsale Torus semicircularis einen massiven vorwiegend contralateralen Eingang vom Nucleus dorsalis (ND) (Will, 1988; Manteuffel und Naujoks-Manteuffel, 1990; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998). Zudem wurden bei Salamandern der Familie Plethodontidae sowie bei *Pleurodeles waltl* somatosensorische Projektionen des dorsalen Kolumnenkerns (DCN) und des Nucleus cervicalis lateralis (NCL) zum Torus nachgewiesen (Muñoz et al., 1997, 1998; Dicke und Mühlenbrock-Lenter, 1998). Bei *Plethodon* wurde vorwiegend Glutamat in den Neuronen des ND lokalisiert. Da ein Großteil dieser Zellen aufsteigende Projektionen ins Tectum hat, lässt sich vermuten, dass die aufsteigende Projektion in den Torus ebenfalls vorwiegend glutamaterg ist. Der ND ist vermutlich an der Verarbeitung von Tiefenfrequenzen und Bodenvibrationen beteiligt, die durch Afferenzen des VIII. Kranialnerven erzeugt werden (Roth et al., 1993). Es lässt sich somit spekulieren, dass tief frequente Informationen über Bodenvibrationen aus der contralateralen Medulla oblongata im dorsalen Torus verarbeitet und auf glutamaterge Neurone umgeschaltet werden, die zum Großteil in die ipsilaterale Medulla oblongata absteigen und dort an der Initiierung motorischer Prozesse beteiligt sind. Durch anatomische und elektrophysiologische Untersuchungen an *Salamandra salamandra* wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Verarbeitung von Bodenvibrationen im Torus mesencephali an der Initiierung von Verteidigungsreaktionen beteiligt ist (Manteuffel und Naujoks-Manteuffel, 1990). Physiologische Befunde hierzu liegen für Salamander der Familie Plethodontidae bislang nicht vor.

Die Bedeutung des GABAergen Anteils im caudalen Bereich des dorsalen Torus sowie des magnozellulären Subnucleus bei Salamandern ist bislang noch ungeklärt. Bei Anuren wird vermutet, dass der magnozelluläre Nucleus principalis phasengebundene Signale an den laminaren Kern weiterleitet (Monsivais et al., 2000). Ein ähnlicher funktioneller Zusammenhang lässt sich bei Salamandern nur im Bezug auf phasengebundene tiefenfrequente Stimuli vermuten. Untersuchungen hierzu liegen bislang nicht für Salamander der Familie Plethodontidae vor.

4.4.2 Konnektivität und cytochemische Organisation des dorsalen Tegmentum

Das dorsale Tegmentum der Salamander ist an der Verarbeitung vestibulärer Informationen beteiligt. Es erhält somit einen massiven meist contralateralen Eingang vom Nucleus vestibularis (NV) in der rostralen Medulla oblongata (Will, 1988; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998). Im Folgenden werden die im rostralen und medialen Bereich gelegenen Neurone des dorsalen Tegmentum von *Plethodon shermani* hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Charakterisierung und Projektionen mit denen anderer Vertebraten verglichen und mögliche funktionelle Zusammenhänge diskutiert. Die magnozellulären Neurone im caudalen Bereich wurden dem Torus semicircularis zugeordnet.

Bei *Plethodon shermani* ist das dorsale Tegmentum durch eine Vielzahl GABAerger und glutamaterger Neurone charakterisiert, welche sehr häufig in den gleichen Zellen lokalisiert wurden. Glycinerge Neurone, welche zumeist kolokalisiert mit GABA und Glutamat waren, wurden nur im ventrolateralen Bereich der Zellkörperschicht detektiert. Eine Reihe immunhistochemischer Untersuchungen an anderen Vertebraten beschreiben ebenfalls ein häufiges Auftreten GABAerger Somata im dorsalen Tegmentum (Salamander: Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Wallstein, 1999; Frösche: Hollis und Boyd, 2005; Fische: Médina et al., 1994; Reptilien: Bennis et al., 1991; Vögel: Domenici et al., 1988; Granda und Crossland, 1989).

In der vorliegenden Untersuchung wurden vorwiegend ipsilateral deszendierende Projektionen des dorsalen Tegmentum in die ventrolaterale Medulla oblongata nachgewiesen, wie dies bereits in einer vergleichbaren Untersuchung an *Plethodon jordani* und *Discoglossus pictus* beschrieben wurde (Dicke et al., 1998). Die meisten Projektionsneurone mit ipsilateralen Projektionen waren immunreaktiv für GABA und Glutamat. Dem entgegen waren contralateral deszendierende Projektionen vorwiegend glutamaterg. Dies legt die Vermutung nahe, dass das dorsale Tegmentum vorwiegend inhibitorisch auf die Motorneurone der ipsilateralen Medulla und exzitatorisch auf die der contralateralen Medulla

einwirkt und somit an der Kontrolle vestibulomotorischer Prozesse wie die Steuerung der Hals- und Nackenmuskulatur beteiligt ist.

Des weiteren bestehen Projektionen des dorsalen Tegmentum ins Tectum mesencephali. Anatomische und elektrophysiologische Untersuchungen an *Salamandra salamandra* legten die Vermutung nahe, dass die vestibulären Zellen des dorsalen Tegmentum sensorische Informationen zur Stellung des Kopfes an das visuelle Zentrum weiterleiten (Manteuffel und Naujoks-Manteuffel, 1990; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998). Die Transmitterspezifität dieser Projektionsneurone ist bislang noch nicht bekannt.

4.4.3 Konnektivität und cytochemische Organisation des ventralen Tegmentum

Das ventrale Tegmentum ist ein sehr heterogenes mesencephales Hirngebiet, das an der Steuerung motorischer Prozesse beteiligt ist. Es wird bei Salamandern durch den begrenzenden Sulcus des Nucleus tuberculi posterioris vom dorsalen Tegmentum abgegrenzt (Herrick, 1948). Das ventrale Tegmentum der Urodelen setzt sich aus sieben Kernen zusammen. Hierzu zählen der Nucleus interstitialis des Fasciculus longitudinalis medialis, der Nucleus ruber, der Nucleus tuberculi posterioris, der Nucleus interpeduncularis, die Motorkerne des Nervus oculomotorius und des Nervus trochlearis, sowie der Nucleus opticus tegmenti (Übersicht in Herrick, 1948; Nieuwenhuys et al., 1998). Im lateralen Bereich des caudalen ventralen Tegmentums befindet sich das Tegmentum isthmi, in dem u. a. der Nucleus isthmi lokalisiert ist. Bei Salamandern der Familie Plethodontidae besteht das ventrale Tegmentum aus einer dicken periventrikulären Zellkörperschicht und einer Faserschicht. Eine Unterteilung der einzelnen Kerne anhand anatomischer Merkmale ist nur bedingt möglich, da die Mehrheit der Zellen relativ gleich große Somata besitzt.

Das ventrale Tegmentum bei *Plethodon shermani* ist durch eine große Anzahl Glutamat und/oder GABA immunreaktiver Neurone charakterisiert, die in nahezu allen Kerngebieten des ventralen Tegmentum vorkamen. Frühere Untersuchungen bei Vertebraten beschreiben ebenfalls GABAerge Zellen in den verschiedenen Kernen (Amphibien: Franzoni und Morino, 1989; Naujoks-Manteuffel et al., 1994; Wallstein, 1999; Hollis und Boyd, 2005; Reptilien: Bennis et al., 1991; Vögel: Domenici et al., 1988; Granda und Crossland, 1989; Säuger: van der Heyden et al., 1979). In der vorliegenden Untersuchung wurde lediglich im caudalen Bereich des ventralen Tegmentum ein immunnegatives Zellkluster mit relativ großen Somata ventral in der Zellkörperschicht lokalisiert. Diese Zellen gehören vermutlich zum Nucleus motorius nervi trigemini. Es ist allgemein bekannt, dass die Motorneurone bei Salamandern

ebenso wie bei allen anderen Vertebraten cholinerg sind (Marín et al., 1997; Pombal et al., 2001; González et al., 2002).

4.4.3.1 Das isthmische Tegmentum

In der vorliegenden Untersuchung wurden sehr viele glutamaterge Neurone im isthmischen Tegmentum von *Plethodon* nachgewiesen, von denen einige zusätzlich immunreaktiv für GABA waren. Bei Fröschen wurde eine moderate bis dichte Markierung GABAerger Somata im Nucleus isthmi beschrieben (Hollis und Boyd, 2005), der sich jedoch durch eine zentrale GABA-freie Region auszeichnet. Auch bei anderen Vertebraten wurde eine Unterteilung des Nucleus isthmi in einen GABAergen magnozellulären Subnucleus und einen GABA immunnegativen parvozellulären Subnucleus vorgenommen (Reptilien: Bennis et al., 1991; Vögel: Domenici et al., 1988; Granda und Crossland, 1989).

Die Zellen des Nucleus isthmi sind bei allen Wirbeltieren vorwiegend cholinerg (Desan et al., 1987; Zottoli et al., 1988; Wallstein, 1999). In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, dass viele Neurone im Tegmentum isthmi Glutamat enthalten. Daher ist es wahrscheinlich, dass Glutamat und Acetylcholin in den Zellen des isthmischen Tegmentum kolokalisiert sind. Der Nucleus isthmi projiziert in die retinalen Faserschichten des Tectum mesencephali, wo er an der Verarbeitung visueller Informationen zur Objektlokalisation im dreidimensionalen Raum beteiligt ist (Wiggers, 1991, 1998; Wiggers und Roth, 1994). Wiggers (1998) beschrieb synaptische Kontakte zwischen isthmischen Axonen und tectalen Interneuronen in den retinalen Faserschichten des Tectum. Er vermutete, dass diese Interneurone den retinalen Eingang zu efferenten tectalen Neuronen modulieren. Neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Konnektivität isthmischer Axone im Tectum von *Xenopus* belegen, dass isthmische Afferenzen Synapsen zu inhibitorischen Interneuronen ausbilden, welche keine direkten Kontakte zu retinalen Afferenzen besitzen (Rybicka und Udin, 2005). Wiggers Annahme kann also bestätigt und präzisiert werden: GABAerge Interneurone in den retinalen Faserschichten können durch cholinerge isthmische Axone erregt werden und wiederum inhibierend auf tectale Projektionsneurone einwirken. Diese Annahme wurde bei Amphibien bislang jedoch noch nicht elektrophysiologisch überprüft.

Auf Höhe des Tegmentum isthmi wurde bei Amphibien unterhalb des Cerebellums der noradrenerge Locus coeruleus lokalisiert, dessen Neurone axonale Projektionen zur Medulla spinalis, zum Cerebellum und ins Telencephalon besitzen (González und Smeets, 1991, 1993; Gonzàlez et al., 1994, 1995; Marín et al., 1996; Wallstein, 1999; Übersicht in Nieuwenhuys et al., 1998). Vereinzelt wurden aufsteigende Projektionen ins Tectum beschrieben (Sánchez-

Camacho et al., 2002). Aufgrund der sehr hohen Dichte glutamaterger und z. T. auch GABAerger Somata in diesem Gebiet, lässt sich vermuten, dass einige dieser noradrenergen Zellen kolokalisiert mit Glutamat und/oder GABA sind. Dies ist bislang jedoch ungeklärt.

4.4.3.2 Neurone mit deszendierenden Projektionen des ventralen Tegmentum

Im ventralen Tegmentum bei *Plethodon* befinden sich zwei verschiedene Kerngruppen mit absteigenden Projektionen in die Medulla, der Nucleus tegmentalis ventralis, welcher vorwiegend ipsilateral im ventromedialen Trakt deszendiert, und der Nucleus ruber, welcher vorwiegend im ventrolateralen Trakt der contra- und ipsilateralen Medulla projiziert (Dicke et al., 1998). In der vorliegenden Untersuchung wurden viele gleichmäßig verteilte Projektionsneurone im ventralen Tegmentum gefunden, deren Axone vorwiegend ipsilateral im ventrolateralen Trakt deszendierten. Diese Projektionsneurone enthielten vorwiegend Glutamat und waren teilweise zusätzlich immunreaktiv für GABA. Aufgrund der unterschiedlichen Lage und Projektionen zu den von Dicke und Kollegen (1998) beschriebenen Projektionsneuronen ist eine Zuordnung der in der vorliegenden Untersuchung immunhistochemisch charakterisierten Neurone nur bedingt möglich. Da diese Zellen ausschließlich im ventrolateralen Trakt deszendierten, lässt sich vermuten, dass ein Teil dieser Zellen dem Nucleus ruber entstammt. Die gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Zellkörperschicht des ventralen Tegmentum spiegelt jedoch eher das Verteilungsmuster der Projektionsneurone des Nucleus tegmentalis ventralis wider. Bei Säugern wurden GABAerge Neurone im Nucleus ruber beschrieben (van der Heyden et al., 1979; Granda und Crossland, 1989), während dieser Kern bei Tauben kein GABA enthält (Domenici et al., 1988).

Des weiteren wurden in der vorliegenden Untersuchung im caudalen ventralen Tegmentum einige GABAerge Projektionsneurone detektiert, deren Axone vorwiegend contralateral sowohl im ventromedialen als auch im ventrolateralen Trakt deszendierten. Diese Neurone lassen sich aufgrund ihrer Lage und ihrer vorwiegend contralateralen Projektionen zum einen dem Nucleus reticularis isthmi und zum anderen dem Nucleus reticularis lateralis zuordnen. Naujoks-Manteuffel und Kollegen (1994) berichten von einer geringen Anzahl GABAerger Zellen im Nucleus reticularis isthmi bei Salamandern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Amphibien eine Vielzahl unterschiedlicher Kerne aus verschiedenen Hirngebieten auf das Netzwerk der Medulla oblongata einwirkt und dort an der Initiierung motorischer Prozesse beteiligt ist. Die Verschaltung und der genaue Einwirkungsort innerhalb der Medulla ist bislang noch weitesgehend unbekannt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Untersuchung trägt zur Aufklärung der funktionellen Anatomie des tecto-reticulären Systems bei Salamandern der Familie Plethodontidae bei. Die Untersuchungen zur cytochemischen Organisation der Medulla oblongata zeigen eine charakteristische Verteilung der drei Neurotransmitter GABA, Glycin und Glutamat und ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen in den vier verschiedenen Longitudinalzonen der rostralen und caudalen Medulla, welche der Verteilung dieser Transmitter bei anderen Vertebraten entspricht. Die rostrale Medulla ist durch die Verteilung der Einfach-, Ko- und Dreifachlokalisationen der drei Transmitter in der medialen Zone charakterisiert, in welcher die größte Dichte GABAerger, glycinerger und glutamaterger Neurone ermittelt wurde. Dem entgegen ist die caudale Medulla durch die Verteilung der einzelnen Transmitter und ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen in der lateralen Zone geprägt. Diese Unterschiede beruhen vermutlich auf ein Vorkommen funktionell unterschiedlicher Kerne in den einzelnen Zonen der rostralen Medulla, deren Neurone aufsteigende Projektionen ins Tectum haben. Neurone des Nucleus reticularis medius (NRM), deren Axone in die tieferen Schichten des Tectum projizieren, waren vorwiegend glycinerg und häufig kolokalisiert mit Glutamat. Der NRM ist vermutlich dem Nucleus reticularis gigantocellularis oder dem α-Teil dieses Kernes der Säuger homolog. Neurone des Nucleus dorsalis (ND) und des Nucleus vestibularis (NV), deren Axone ebenfalls in die tieferen Faserschichten des Tectum projizieren, sind vorwiegend glutamaterg. Während die Projektionsneurone des ND ausschließlich rein glutamaterg sind, sind die Projektionsneurone des NV häufig kolokalisiert mit GABA und/oder Glycin.

Die Untersuchungen zur cytochemischen Organisation des Tectum mesencephali beschreiben eine charakteristische Verteilung der drei Neurotransmitter und ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen in den zwei Zellkörperschichten des Tectum. Das rostrale und das zentrale Tectum sind durch die Verteilung der Einfach-, Ko- und Dreifachlokalisationen der drei Transmitter in der Zellkörperschicht 8 charakterisiert, in welcher vorwiegend tectale GABAerge Interneurone lokalisiert sind. Dem entgegen ist das caudale Tectum durch die Verteilung der drei Transmitter und ihrer Ko- und Dreifachlokalisationen durch die Zellkörperschicht 6 geprägt. Diese Unterschiede beruhen vermutlich auf funktionell unterschiedliche Verarbeitungsprozesse bei der Repräsentation des Gesichtsfeldes. Das rostrale und zentrale Tectum ist vorwiegend an der Objekterkennung und –lokalisation im binokularen Gesichtsfeld beteiligt, während im caudalen Tectum vorwiegend visuelle

Informationen des lateralen Gesichtsfeldes verarbeitet werden. Neurone mit absteigenden Projektionen in die ipsi- oder contralaterale Medulla sind vorwiegend in der Zellkörperschicht 6 lokalisiert. Haupttransmitter dieser Zellen ist Glutamat. Etwa die Hälfte der tecto-bulbaren Projektionsneurone enthält zusätzlich GABA. Projektionsneurone der Typen TO2 und TO4, deren Axone im ventrolateralen Trakt deszendieren, waren vorwiegend rein glutamaterg, während viele der Neurone der Typen TO1 und TO3, deren Axone im ventromedialen Trakt absteigen, zusätzlich GABA enthielten.

Das intratectale inhibitorische System ist folglich sehr komplex und besteht aus GABAergen tecto-bulbaren Projektionsneuronen und einer Vielzahl GABAerger Interneurone. Diese GABAergen Zellen wirken mittels dendro-dendritischer bzw. axo-dendritischer Kontakte bei der intratectalen Verarbeitung visueller und multimodaler Afferenzen auf benachbarte tectale Projektionsneurone oder Interneurone ein. Diese intratectale Verarbeitung wird durch glycinerge Projektionen des NRM bzw. serotonerge Projektionen der Nuclei raphes (NR) beeinflusst, welche Aufmerksamkeitsprozesse im Tectum kontrollieren. Beide Kerne können durch eine Hemmung meist inhibitorischer intratectaler Interaktionen selektiv Neuronenpopulationen aktivieren, die an einer Verarbeitung bedeutungsrelevanter Objekte beteiligt sind („Up“-Regulation). Serotonerge Afferenzen können zusätzlich durch Inhibition einer oder mehrerer Populationen von Projektionsneuronen direkt zu einer selektiven Abnahme der tecto-bulbaren Transmission führen („Down“-Regulation).

Die Untersuchungen zur cytochemischen Organisation des ventralen Mesencephalon zeigen, dass die Medulla durch eine Vielzahl glutamaterger und/oder GABAerger Afferenzen aus dem Torus semicircularis und dem dorsalen und ventralen Tegmentum innerviert wird, welche an der Initiierung motorischer Prozesse beteiligt sind.

Die vorliegende Untersuchung zur Konnektivität und cytochemischen Organisation des tecto-reticulären Systems bei Amphibien trägt somit einerseits zu einem besseren Verständnis intratectaler Verarbeitungsprozesse andererseits zur Aufklärung der integrativen Rolle der Medulla insbesondere im Zusammenhang mit visuomotorischen Verhalten bei.

6 LITERATUR

Adams JC (1981) Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. J Histochem Cytochem 29:775

Adams JC, Mugnaini E (1990) Immunocytochemical evidence for inhibitory and disinhibitory circuits in the superior olive. Hear Res 49:281-298

Adli DSH, Stuesse SL, Cruce WLR (1999) Immunohistochemistry and spinal projections of the reticular formation in the northern leopard frog, *Rana pipiens*. J Comp Neurol 404:387-407

Adrio F, Anadón R, Rodríguez-Moldes I (1999) Distribution of serotonin (5-HT)-immunoreactive structures in the central nervous system of two chondrostean species (*Acipenser baeri* and *Huso huso*). J Comp Neurol 407:333-348

Antal M (1991) Distribution of GABA immunoreactivity in the optic tectum of the frog: A light and electron microscopic study. Neurosci 42:879-891

Behrens PK, Dicke U (2003) The features of visual stimuli influence the orienting behavior in the frogs *Bombina orientalis* and *Discoglossus pictus.* In: Göttingen Neurobiology Report 2003. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Bennis M, Calas A, Geffard M, Gamrani H (1991) Distribution of GABA immunoreactive systems in the forebrain and midbrain of the chameleon. Brain Res Bull 26:891-898

Butler AB, Hodos W (Hrsg.) (1996) Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation. Wiley-Liss. Inc., New York

Butt CM, Zhao B, Duncan MJ, Debski EA (2002) Sculping the visual map: The distribution and function of serotonin-1A and serotonin-1B receptors in the optic tectum of the frog. Brain Res 931:21-31

Canfield JG, Rose GJ (1993) Activation of Mauthner neurons during prey capture. J Comp Physiol A 172:611-618

Chen B, May PJ (2000) The feedback circuit connecting the superior colliculus and central mesencephalic reticular formation: A direct morphological demonstration. Exp Brain Res 131:10-21

Clairambault P, Cristophe N, Pairault C, Herbin M, Ward R, Reperant J (1994) Organization of the serotonergic system in the brain of two amphibian species, *Ambystoma mexicanum* (Urodela) and *Typhlonectes compressicauda* (Gymnophiona). Anat Embryol 190:87-99

Coimbra NC, De Oliveira R, Freitas RL, Ribeiro SJ, Borelli KG, Pacagnella RC, Moreira JE, da Silva LA, Melo LL, Lunardi LO, Brandao ML (2006) Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. Exp Neurol 197:93-112

Desan PH, Gruberg ER, Grewell KM, Eckenstein F (1987) Cholinergic innervation of the optic tectum in the frog *Rana pipiens*. Brain Res 413:344-349

Dicke U (1999) Morphology, axonal projection pattern, and response types of tectal neurons in the plethodontid salamanders. I: Tracer study of projection neurons and their pathways. J Comp Neurol 404:473-488

Dicke U, Mühlenbrock-Lenter S (1998) Primary and secondary somatosensory projections in direct-developing plethodontid salamanders. J Morphol 238:307-326

Dicke U, Roth G (1994) Tectal activation of premotor and motor networks during feeding in salamanders. Eur J Morphol 32:106-116

Dicke U, Roth G (1996) Similarities and differences in the cytoarchitecture of the tectum of frogs and salamanders. Acta Biol Hung 47:49-59

Dicke U, Roth G, Matsushima T (1998) Neural substrate for motor control of feeding in amphibians. Acta Anat 163:127-143

Dicke U, Wallstein M, Roth G (1997) 5-HT-like immunoreactivity in the brains of plethodontid and salamandrid salamanders (*Hydromantes italicus*, *Hydromantes genei*, *Plethodon jordani*, *Desmognathus ochrophaeus*, *Pleurodeles waltl*): An immunohistochemical and biocytin double-labelling study. Cell Tissue Res 287:513-523

Domenici L, Waldvogel HJ, Matute C, Streit P (1988) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the pigeon brain. Neurosci 25:931-950

Eaton RC, Lee RK, Foreman MB (2001) The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of the fish. Prog Neurobiol 63:467-485

Ekström P (1987) Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in the brain of a cyprinid teleost (*Phoxinus phoxinus* L.). J Comp Neurol 156:494-515

Ellenberger HH (1999) Distribution of bulbospinal γ-aminobutyric acid-synthesizing neurons of the ventral respiratory group of the rat. J Comp Neurol 411:130-144

Ewert JP (1984) Tectal mechanisms that underlie prey catching and avoidance behaviors in toads. In: Vanegas H (Hrsg.) Comparative Neurology of the optic tectum. Plenum Press., New York, S. 247-399

Fasolo A, Franzoni MF, Gaudino G, Steinbusch HWM (1986) The organization of serotonin-immunoreactive neuronal systems in the brain of the crested newt, *Triturus cristatus carnifex* Laur. Cell Tissue Res 243:239-247

Finkenstädt T, Ebbesson SOE, Ewert JP (1983) Projections to the midbrain tectum in *Salamandra salamandra* L. Cell Tissue Res 234:39-55

Franzoni MF, Morino P (1989) The distribution of GABA-like-immunoreactive neurons in the brain of the newt, *Triturus cristatus carnifex*, and the green frog, *Rana esculenta*. Cell Tissue Res 255:155-166

Fredette BJ, Adams JC, Mugnaini E (1992) GABAergic neurons in the mammalian inferior olive and ventral medulla detected by glutamate decarboxylase immunocytochemistry. J Comp Neurol 321:501-514

Fritzsch B (1988) The lateral-line and inner-ear afferents in larval and adult urodeles. Brain Behav Evol 31:325-348

Fritzsch B (1989) Diversity and regression in the amphibian lateral line system. In: Coombs S, Görner P, Münz H (Hrsg.) The Mechanosensory Lateral Line. Neurobiology and Evolution. Springer, New York, S. 99-115

González A, Marín O, Tuinhof R, Smeets WJAJ (1994) Ontogeny of the catecholamine system in the central nervous system of anuran amphibians: An immunohistochemical study with antibodies against tyrosine hydroxylase and dopamine. J Comp Neurol 346:63-79

González A, Marín O, Smeets WJAJ (1995) Development of the catecholamine system in the central nervous system of the newt *Pleurodeles waltlii* as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. J Comp Neurol 360:33-48

González A, Sánchez-Camacho C, Marín O (2002) Localization of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of a caecilian amphibian, *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona). J Comp Neurol 448:249-267

González A, Smeets WJAJ (1991) Comparative analysis of the dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. J Comp Neurol 303:457-477

González A, Smeets WJAJ (1993) Noradrenaline in the brain of the south african clawed frog *Xenopus laevis*: A study with antibodies against noradrenaline and dopamine-β-hydroxylase. J Comp Neurol 331:363-374

González A, Smeets WJAJ (1994) Distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brain of *Typhlonectes compressicauda* (amphibia, gymnophiona): Further assessment of primitive and derived traits of amphibian catecholamine systems. J Chem Neuroanat 8:19-32

Granda RH, Crossland WJ (1989) GABA-like immunoreactivity of neurons in the chicken diencephalon and mesencephalon. J Comp Neurol 287:455-469

Gruberg ER, Harris WA (1981) The serotonergic somatosensory projection to the tectum of normal and eyeless salamanders. J Morphol 170:55-69

Heimbuch J (2001) Elektrophysiologische Charakterisierung und morphologische Darstellung von Neuronen des tecto-bulbären und bulbo-tectalen Systems von lungenlosen Salamandern (Fam. Plethodontidae). Dissertation, Universität Bremen

Heimbuch J, Dicke U (1998) Neurons of the medial reticular zone in lungless salamanders: Physiology and morphology. In: Elsner N, Wehner R (Hrsg.) Proceed 26th Gött Neurobiol Conf, Vol II. Thieme, Stuttgart. S. 499

Herrick CJ (1948) The brain of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. The University of Chicago Press., Chicago

Highton R, Peabody RB (2000) Geographic protein variation and speciation in salamanders of the *Plethodon jordani* and *Plethodon glutinosus* complexes in the southern Appalachian Mountains with the description of four new species. In: Bruce RC, Jaeger RG, Houck L (Hrsg.) The biology of plethodontid salamanders. Kluwer Academic Plenum, New York, S. 31-93

Hilbig H, Roth G, Brylla E, Robine KP (1998) Cytoarchitecture of the tectum opticum in the Japanese quail. Neurosci 86:663-678

Hökfelt T, Arvidsson U, Cullheim S, Millhorn D, Nicholas AP, Pieribone V, Seroogy K, Ulfhake B (2000) Multiple messengers in descending serotonin neurons: Localization and functional implications. J Chem Neuroanat 18:75-86

Hollis DM, Boyd SK (2003) Characterization of the $GABA_A$ receptor in the brain of the adult male bullfrog, *Rana catesbeiana*. Brain Res 992:69-75

Hollis DM, Boyd SK (2005) Distribution of GABA-like immunoreaktive cell bodies in the brains of two amphibians, *Rana catesbeiana* and *Xenopus laevis.* Brain Behav Evol 65: 127-142

Holmes CJ, Mainville LS, Jones BE (1994) Distribution of cholinergic, GABAergic and serotonergic neurons in the medial medullary reticular formation and their projections studied by cytotoxic lesions in the rat. Neurosci 62:1155-1178

Hsu S, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabaled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29:577-580

Janušonis S, Fite KV, Foote W (1999) Topographic organization of serotonergic dorsal raphe neurons projecting to the superior colliculus in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). J Comp Neurol 413:342-355

Jones BE, Holmes CJ, Rodriguez-Veiga E, Mainville L (1991) GABA-synthesizing neurons in the medulla: Their relationship to serotonin-containing and spinally projecting neurons in the rat. J Comp Neurol 313:349-367

Jones BE (1995) Reticular formation: Cytoarchitecture, transmitters, and projections. In: Paxinos G (Hrsg.) The Rat Nervous System. Academic Press, New York. S. 155-171

Kahl H (1999) Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen zur retino-tectalen Transmission, intra-tectalen Verarbeitung sowie zur praetecto-tectalen Beeinflussung bei *Plethodon jordani* (Ordnung Caudata). Dissertation. Universität Bremen

Kalloniatis M, Fletcher EL (1994) Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chicken retina. J Comp Neurol 336:174-193

Kalyuzhny AE, Wessendorf MW (1997) CNS GABA neurons express the μ-opioid receptor: Immunocytochemical studies. Neuroreport 8:3367-3372

Kaslin J, Panula P (2001) Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). J Comp Neurol 440:342-377

Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ (2004) Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). Neurosci Lett 355:29-32

Kobayashi M, Nemoto T, Nagata H, Konno A, Chiba T (1997) Immunohistochemical studies on glutamatergic, GABAergic and glycinergic axon varicosities presynaptic to parasympathetic preganglionic neurons in the superior salivatory nucleus of the rat. Brain Res 766:72-82

Land R (2005) Characterisation and distribution of ChAT-like immunoreactive neurons in the tectum of plethodontid salamanders. Master's Thesis. Universität Osnabrück

Landwehr SLG, Dicke U (2004) Modulatory systems of the tectum mesencephali in *Plethodon shermani*. 4th Eur Conf Comp Neurobiol, Oxford

Lázár G (1987) Cellular architecture and connectivity of the frog's optic tectum and pretectum. In: Ewert JP (Hrsg.) Visuomotor coordination: Amphibians, comparisons, models and robots. Plenum Press, New York, London

Lee RK, Finger TE, Eaton RC (1993) GABAergic innervation of the Mauthner cell and other reticulospinal neurons in the goldfish. J Comp Neurol 338:601-611

Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N (1996) GABAergic and glycinergic neurons projecting to the trigeminal motor nucleus: A double labeling study in the rat. J Comp Neurol 373:498-510

Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N (1997) Distribution of GABAergic and glycinergic premotor neurons projecting to the facial and hypoglossal nuclei in the rat. J Comp Neurol 378:283-294

Li Z, Fite KV (1998) Distribution of GABA-like immunoreactive neurons and fibers in the central visual nuclei and retina of frog, *Rana pipiens*. Vis Neurosci 15:995-1006

Liu Q, Debski EA (1993) Serotonin-like immunoreactivity in the adult and developing retina of the leopard frog *Rana pipiens*. J Comp Neurol 338:391-404

Liu Q, Debski EA (1995) Origins of serotonin-like immunoreactivity in the optic tectum of *Rana pipiens*. J Comp Neurol 352:280-296

Luksch H, Kahl H, Wiggers W, Roth G (1998) Connectivity of the salamander pretectum: An in-vitro (whole-brain) intracellular tracing study. Cell Tissue Res 292:47-56

Malayev AA, Debski EA (1998) Serotonin modulates induced synaptic activity in the optic tectum of the frog. Brain Res 781:167-181

Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. J Neurosci 20:4669-4679

Mandon S (1997) Funktionelle Klassifizierung retinaler Afferenzen im Tectum opticum von lungenlosen Salamandern (Fam. Plethodontidae). Dissertation, Universität Bremen

Manteuffel G, Naujoks-Manteuffel C (1990) Anatomical connections and electrophysiological properties of toral and dorsal tegmental neurons in the terrestrial urodele *Salamandra salamandra*. J Hirnforsch 31:65-76

Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI (1999) Immunohistochemical localization of $GABA_B$ receptors in the rat central nervous system. J Comp Neurol 405:299-321

Marín O, Smeets WJAJ, González A (1996) Do amphibians have a true locus coeruleus? Neuroreport 7:1447-1451

Marín O, Smeets WJAJ, González A (1997) Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltl*) amphibians. J Comp Neurol 382:499-534

Médina M, Repérant J, Dufour S, Ward R, Le Belle N, Miceli D (1994) The distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of the silver eel (*Anguilla anguilla* L.). Anat Embryol 189:25-39

Mineff EM, Popratiloff A, Romansky R, Kazakos V, Kaimaktschieff V, Usunoff KG, Ovtscharoff W, Marani E (1998) Evidence for a possible glycinergic inhibitory neurotransmission in the midbrain and rostral pons of the rat studied by gephyrin. Arch Physiol Biochem 106: 210-220

Mize RR (1988) Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the cat superior colliculus. J Comp Neurol 276:169-187

Mize RR (1992) The organization of GABAergic neurons in the mammalian superior colliculus. In Mize RR, Mare RE, Sillito AM (Hrsg.) Progress in Brain Research, Vol. 90, Kapitel 11, Elsevier Science Pub. BV, S. 219-248

Mize RR, Jeon CJ, Hamada OL, Spencer RF (1991) Organization of neurons labeled by antibodies to gamma-aminobutyric acid (GABA) in the superior colliculus of the Rhesus monkey. Vis Neurosci 6:75-92

Mize RR, Whitworth RH, Nunes-Cardozo B, van der Want J (1994) Ultrastructural organization of GABA in the rabbit superior colliculus revealed by quantitative postembedding immunocytochemistry. J Comp Neurol 341:273-287

Monsivais P, Yang L, Rubel EW (2000) GABAergic inhibition in nucleus magnocellularis: Implications for phase locking in the avian auditory brainstem. J Neurosci 20:2954-2963

Mühlenbrock-Lenter S (2001) Multimodale Verarbeitung im Tectum mesencephali von lungenlosen Salamandern (Fam. Plethodontidae). Dissertation, Universität Bremen

Muñoz M, Muñoz A, Marín O, González A (1994) Primary afferents and second order projections of the trigeminal system in a frog (*Rana ridibunda*). Eur J Morphol 32:288-292

Muñoz A, Muñoz M, González A, ten Donkelaar HJ (1997) Spinal ascending pathways in amphibians: Cells of origin and main targets. J Comp Neurol 378:205-228

Muñoz A, Muñoz M, González A, ten Donkelaar HJ (1998) Organization of the caudal rhombencephalic alar plate of the ribbed newt, *Pleurodeles waltl*: Evidence for the present of dorsal column and lateral cervical nuclei. Brain Behav Evol 51:162-182

Naujoks-Manteuffel C, Himstedt W, Gläsener-Cipollone G (1994) Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of adult and developing salamanders (*Pleurodeles waltli*, *Triturus alpestris*). Cell Tissue Res 276:485-501

Naujoks-Manteuffel C, Manteuffel G (1988) Origins of descending projections to the medulla oblongata and rostral medulla spinalis in the urodele *Salamandra salamandra* (Amphibia). J Comp Neurol 273:187-206

Naujoks-Manteuffel C, Manteuffel G (1990) Quantitative distribution of descending tectal efferent cells in salamanders. Neurosci Lett 118:103-106

Nieuwenhuys R, Opdam P (1976) Structure of the brain stem. In: Llinas R, Precht W (Hrsg.) Frog Neurobiology. Springer, Berlin, S.811-855

Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C (1998) The central nervous system of vertebrates. Vol. 1-3. Springer, Berlin

Nikundiwe AM, Nieuwenhuys R (1983) The cell masses in the brainstem of the south african clawed frog *Xenopus laevis*: A topographical and topological analysis. J Comp Neurol 213:199-219

Opdam P, Nieuwenhuys R (1976) Topological analysis of the brain stem of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. J Comp Neurol 165:285-306

Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1984) Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In Björklund A, Hökfelt T, Kuhar MJ (Hrsg.) Handbook of chemical neuroanatomy. Vol 3: Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, Part II. Elsevier Science Pub BV

Pérez-Pérez MP, Luque MA, Herrero L, Nunez-Abades PA, Torres B (2003a) Connectivity of the goldfish optic tectum with the mesencephalic and rhombencephalic reticular formation. Exp Brain Res 151:123-135

Pérez-Pérez MP, Luque MA, Herrero L, Nunez-Abades PA, Torres B (2003b) Afferent connectivity to different functional zones of the optic tectum in goldfish. Vis Neurosci 20:397-410

Petrov T, Seitanidou T, Triller A, Korn H (1991) Differential distribution of GABA- and serotonin-containing afferents on an identified central neuron. Brain Res 559:75-81

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) $GABA_A$ receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. Neurosci 101:815-850

Pombal MA, Marín O, González A (2001) The distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive structures in the lamprey brain. J Comp Neurol 431:105-126

Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M (1996) Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. Neurosci 75:737-755

Rampon C, Peyron C, Gervasoni D, Pow DV, Luppi P, Fort P (1999) Origins of the glycinergic inputs to the rat locus coeruleus and raphe nuclei: A study combining retrograde tracing with glycine immunocytochemistry. Eur J Neurosci 11:1058-1066

Reichenberger I, Straka H, Ottersen OP, Streit P, Gerrits NM, Dieringer N (1997) Distribution of GABA, glycine, and glutamate immunoreactivities in the vestibular nuclear complex of the frog. J Comp Neurol 377:149-164

Reichling DB, Basbaum AI (1990) Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls I: GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. J Comp Neurol 302:370-377

Rettig G, Roth G (1986) Retinofugal projections in salamanders of the family Plethodontidae. Cell Tissue Res 243:285-296

Rodríguez Gil DJ, Vacotto M, Rapacioli M, Scicolone G, Flores V, Fiszer de Plazas S (2005) Development and localization of $GABA_A$ receptor α_1, α_2, β_2 and γ_2 subunit mRNA in the chick optic tectum. J Neurosci Res 81:469-480

Rhodes KJ, Zottoli SJ, Mufson EJ (1986) Choline acetyltransferase immunohistochemical staining in the goldfish (*Carassius auratus*) brain: Evidence that the Mauthner cell does not contain choline acetyltransferase. Brain Res 381:215-224

Roth G (1987) Visual behavior in salamanders: Studies of Brain function. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Roth G, Dicke U, Grunwald W (1999) Morphology, axonal projection pattern, and response types of tectal neurons in plethodontid salamanders. II: Intracellular recording and labeling experiments. J Comp Neurol 404:489-504

Roth G, Grunwald W (2000) Morphology, axonal projection pattern, and responses to optic nerve stimulation of thalamic neurons in the salamander *Plethodon jordani*. J Comp Neurol 428:543-557

Roth G, Grunwald W, Dicke U (2003) Morphology, axonal projection pattern and responses to optic nerve stimulation of thalamic neurons in the fire-bellied toad *Bombina orientalis*. J Comp Neurol 461:91-110

Roth G, Mühlenbrock-Lenter S, Grunwald W, Laberge F (2004) Morphology and axonal projection pattern of neurons in the telencephalon of the fire-bellied toad *Bombina orientalis*: An anterograde, retrograde, and intracellular biocytin labeling study. J Comp Neurol 478:35-61

Roth G, Naujoks-Manteuffel C, Grunwald W (1990) Cytoarchitecture of the tectum mesencephali in salamanders: A golgi and HRP study. J Comp Neurol 291:27-42

Roth G, Nishikawa K, Dicke U, Wake DB (1988) Topography and cytoarchitecture of the motor nuclei in the brainstem of salamanders. J Comp Neurol 278:181-194

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, Wake DB (1985) The structure of the brainstem and cervical spinal cord in lungless salamanders (Family Plethodontidae) and its relation to feeding. J Comp Neurol 241:99-110

Rybicka KK, Udin SB (1994) Ultrastructure and GABA immunoreactivity in layers 8 and 9 of the optic tectum of *Xenopus laevis*. Eur J Neurosci 6:1567-1582

Rybicka KK, Udin SB (2005) Connections of contralaterally projecting isthmotectal axons and GABA-immunoreactive neurons in *Xenopus* tectum: An ultrastructural study. Vis Neurosci 22:305-315

Sánchez-Camacho C, Márin O, González A (2002) Distribution and origin of the catecholaminergic innervation in the amphibian mesencephalic tectum. Vis Neurosci 19:321-333

Sánchez-Camacho C, Márin O, ten Donkelaar HJ, González A (2001a) Descending supraspinal pathways in amphibians I: A dextran amine tracing study of their cells of origin. J Comp Neurol 434:186-208

Sánchez-Camacho C, Márin O, Smeets WJAJ, ten Donkelaar HJ, González A (2001b) Descending supraspinal pathways in amphibians II: Distribution and origin of the catecholaminergic innervation of the spinal cord. J Comp Neurol 434:209-232

Schmidt M, Boller M, Özen G, Hall WC (2001) Disinhibition in rat superior colliculus mediated by $GABA_C$ receptors. J Neurosci 21:691-699

Schülert N (2004) Dynamik und Kontextabhängigkeit in den Antworteigenschaften tectaler Neurone und im Orientierungsverhalten des Salamanders *Plethodon shermani* durch unterschiedliche Merkmale visueller Stimuli. Dissertation, Universität Bremen

Schülert N, Dicke U (2002) The effekt of stimulus features on the visual orienting behavior in *Plethodon jordani*. J Exp Biol 205:241-251

Schülert N, Dicke U (2005) Dynamic response properties of visual neurons and context-dependent surround effects on receptive fields in the tectum of the salamander *Plethodon shermani*. Neurosci 134:617-632

Sivilotti L, Nistri A (1986) Biphasic effects of glycine and synaptic responses of the frog optic tectum in vitro. Neurosci Lett 66:25-30

Sivilotti L, Nistri A (1992) An intracellular study of the effects of GABA on frog tectal neurons in vitro. Neurosci Lett 145:28-32

Spirou GA, Berrebi AS (1997) Glycine immunoreactivity in the lateral nucleus of the trapezoid body of the cat. J Comp Neurol 383:473-488

Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabaled antibody-enzyme method of immunochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase anti-horseradish peroxydase) and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem 18:315-317

Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1990) Antibodies and fixatives for the immunocytochemical localization of glycine. In: Ottersen OP, Storm-Mathisen J (Hrsg.) Glycine Neurotransmission. John Wiley and Sons Ltd., New York, USA

Straka H und Dieringer N (1996) Uncrossed disynaptic inhibition of second-order vestibular neurons and its interaction with monosynaptic excitation from vestibular nerve afferent fibers in the frog. J Neurophysiol 76:3087-3101

Straka H und Dieringer N (2000) Convergence pattern of uncrossed excitatory and inhibitory semicircular canal-specific inputs onto second-order vestibular side loops. Exp Brain Res 135:462-473

Strake J, Luksch H, Walkowiak W (1994) Audio-motor interface in anurans. Eur J Morphol 32:122-126

Stuesse SL, Adli DSH, Cruce WLR (2001) Immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P and somatostatin in the brain of the leopard frog, *Rana pipiens*. Micr Res Tech 54:229-245

Sur C, Korn H, Triller A (1994) Colocalization of somatostatin with GABA or glutamate in distinct afferent terminals presynaptic to the Mauthner cell. J Neurosci 14:576-589

Suzuki T, Takayama K, Miura M (1997) Distribution and projection of the medullary cardiovascular control neurons containing glutamate, glutamic acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase in rats. Neuronsci Res 27:9-19

Szekely G, Lázár G (1976) Cellular and synaptic architecture of the optic tectum. In: Llinás R, Precht W (Hrsg.) Frog neurobiology. Kapitel 12, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 407-434

Székely G und Matesz C (1993) The efferent system of cranial nerv nuclei: A comparative neuromorphological study. Adv Anat Embryol Cell Biol 128:1-92

ten Donkelaar HJ (1982) Organization of descending pathways to the spinal cord in amphibians and reptiles. In: Kuypers HGJM, Martin GF (Hrsg.) Anatomy of descending pathways to the spinal cord. Elsevier, Amsterdam, S. 26-58

ten Donkelaar HJ, de Boer-van Huizen R, Schouten FT, Eggen SJ (1981) Cells of origin of descending pathways to the spinal cord in the clawed toad (*Xenopus laevis*). Neurosci 6:2297-2312

Triller A, Sur C, Korn H (1993) Heterogeneous distribution of glycinergic and GABAergic afferents on an identified central neuron. J Comp Neurol 338:83-96

Tyler CJ, Fite KV, De Vries GJ (1995) Distribution of GAD-like immunoreactivity in the retina and central visual system of *Rana pipiens*. J Comp Neurol 353:439-450

Ueda S, Nojyo Y, Sano Y (1984) Immunohistochemical demonstration of the serotonin neuron system in the central nervous system. Anat Embryol 169:219-229

van der Heyden JAM, De Kloet ER, Korf J, Versteeg DHG (1979) GABA content of discrete brain nuclei and spinal cord of the rat. J Neurochem 33:857-861

Veenman CL, Reiner A (1994) The distribution of GABA-containing perikarya, fibers, and terminals in the forebrain and midbrain of pigeons, with particular reference to the basal ganglia and its projection targets. J Comp Neurol 339:209-250

Vertes RP, Martin GF, Waltzer R (1986) An autoradiographic analysis of ascending projections from the medullary reticular formation in the rat. Neurosci 19:873-898

Villani L, Contestabile A, Niso R (1982) Electron microscopic demonstration of neurons and synaptic terminals selectively accumulating (^{3}H)GABA in goldfish optic tectum. Bas Appl Histochem 26:185-191

Wake DB (1966) Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae. Acad Sci 4:1-111

Wake DB, Nishikawa K, Dicke U, Roth G (1988) Organization of the motor nuclei in the cervical spinal cord of salamanders. J Comp Neurol 278:195-208

Walberg F, Ottersen OP, Rinvik E (1990) GABA, glycine, aspartate, glutamate and taurine in the vestibular nuclei: An immunocytochemical investigation in the cat. Exp Brain Res 79:547-563

Wallstein M, Dicke U (1996) Distribution of glutamate-, GABA-, and glycine-like immunoreactivity in the optic tectum of plethodontid salamanders. In: Elsner N, Schnitzler HU (Hrsg.) Proceed 24th Gött Neurobiol Conf, Vol. I. Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 706

Wallstein M (1999) Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von Neurotransmittern und Neuromodulatoren im Gehirn von Salamandern der Familie Plethodontidae (Ordnung: Caudata). Dissertation, Universität Bremen

Watt CB, Glazebrook PA, Florack VJ (1994) Localization of substance P and GABA in retinotectal ganglion cells of the larval tiger salamander. Vis Neurosci 11:355-362

Wiggers W (1991) Elektrophysiologische, neuroanatomische und verhaltensphysiologische Untersuchungen zur visuellen Verhaltenssteuerung bei lungenlosen Salamandern. Dissertation, Universität Bremen

Wiggers W (1998) Isthmotectal connections in plethodontid salamanders. J Comp Neurol 395:261-272

Wiggers W (1999) Projections of single retinal ganglion cells to the visual centers: An intracellular staining study in a plethodontid salamander. Vis Neurosci 16:435-447

Wiggers W, Roth G (1994) Depth perception in salamanders: The wiring of the visual maps. Eur J Morph 32:311-314

Will U (1988) Organization and projections of the area octavolateralis in amphibians. In Fritzsch B, Ryan M, Wilczynski W, Hetherington T, Walkowiak W (Hrsg.) The evolution of the amphibian auditory system. Wiley, New York, S. 185-208

Will U (1991) Amphibian Mauthner cells. Brain Behav Evol 37:317-332

Zhao B, Debski EA (2005) Serotonergic reticular formation cells in *Rana pipiens*: Categorization, development, and tectal projections. J Comp Neurol 487:441-456

Zottoli SJ, Rhodes KJ, Corrodi JG, Mufson EJ (1988) Putative cholinergic projections from the nucleus isthmi and the nucleus reticularis mesencephali to the optic tectum in the goldfish (*Carassius auratus*). J Comp Neurol 273:385-398