Die mögliche Rolle CGRP-immunreaktiver thalamo-amygdalärer Projektionen bei der durch Emotionen hervorgerufenen Veränderung vegetativer Parameter

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Wolfgang D'Hanis

geb. am 21 August 1975 in Siegen

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Linke Prof. Dr. Hans-Peter Lipp, PhD

Eingereicht am: 5. Februar 2008

Verteidigt am: 29. Juli 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	5
1.1 Emotionen	5
1.2 Die Amygdala	7
1.3 Die erweiterte Amygdala	11
1.4 Das Calcitonin Gene-related Peptid (CGRP)	13
1.5 Modifizierung emotionaler Schaltkreise durch Thyroxin	15
1.6 Fragestellung	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Tracing	18
2.1.1 Tracer Injektionen	18
2.1.2 Histologie und Immunfärbungen	21
2.1.3 Analyse	22
2.2 Telemetrie	
2.2.1 Hormonmanipulation	24
2.2.2 Implantation der Sonden	24
2.2.3 Telemetrie Equipment	26
2.2.4 Messung der vegetativen Parameter in den Käfigen	26
2.2.5 Messung der vegetativen Parameter in einer unbekannten Umgebung (Novelty).	26
2.2.6 Messung der vegetativen Parameter und der Schreckreaktion in der Startleappara	tur27
2.2.7 Statistische Untersuchungsmethoden	28
	20
3 LNGLDWI33L	29
3.1 Verteilung der CGRP-Immunreaktivität in der Amygdala	29
3.1.1 Verteilung der CGRP-Immunreaktivität in der Amygdala	29
3.1.2 Verteilung der CGRP-Immunreaktivität innerhalb der Nuclei intalaminares	0.1
posteriores thalami	31
3.2 Retrogrades Tracing	35
3.3 Injektionen in individuelle Kerne der Amvgdala	39
3.3.1 Area transitionis amygdalostriatalis (AStr)	39
3.3.2 Nucleus amygdalae lateralis (LA)	40
3.3.3 Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior (IPAC)	40
3.3.4 Nucleus amygdalae centralis (CeA)	41
3.3.5 Cautatoputamen (CPU)	41 42
5.5.0 Olobus pallitus lateralis (LOF)	42
3.4 Doppelmarkierungen von CGRP-ir und thalamoamygdalären Projektionsneur	onen
	46

3.4.1 Area transitionis amygdalostriatalis (AStr)	48
(LGP)	48
3.3.3 Cautatoputamen (CPU)	48
3.4.4 Nucleus amygdalae lateralis (LA)	49
3.4.5 Nucleus amygdalae centralis (CeA)	49
3.4 Fluorogold und CGRP-ir Projektionen des Nucleus parabrachialis zur Amygdala	ı.52
3.5 Allgemeine Auswirkungen der frühen postnatalen Thyroxinbehandlung	56
3.6 Messungen im Käfig vor dem Umsetzen in eine unbekannte Umgebung (Novelty).56
3.7 Messungen in einer unbekannten offenen Umgebung (Novelty)	56
3.7.1 Blutdruck und Herzfrequenz	56
3.7.2 Körpertemperatur	57
3.8 Messungen im Käfig nach den Versuchen in der neuen Umgebung (Novelty)	57
3.8.1 Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur	57
39 Messungen über Nacht im Käfig nach den Versuchen in einer neuen Umgebung	60
3.9.1 Blutdruck	60
3.9.2 Herzfrequenz	61
3.9.3 Körpertemperatur	62
3.9.4 Aktivität	63
3.10 Messungen in der Startleannaratur	65
3 10 1 Blutdruck	03
3 10 2 Herzfrequenz	66
3 10 3 Körpertemperatur	67
3.10.4 Schreckreaktion	68
3.11 Vergleich der verschiedenen Messbedingungen	70
4 DISKUSSION	73
	=0
4.1 Zusammenfassung	73
4.2 Technische Erwägungen	74
4.2.1 Retrogrades Tracing	74
4.2.2 Messung vegetativer Parameter	75
4.3 Topographie der thalamo-amygdalären Projektionen	76
4.4 CGRP in Projektionen vom Thalamus	77
4.5 Funktion thalamischer CGRP-Projektionen	79
4.6 Projektionen des CeA und seine Rolle bei vegetativen Funktionen	83
4.6.1 Projektionen vom CeA zum Nucleus tractus solitarius (NTS)	
4.6.2 Projektionen des CeA zur RVLM	85
4.6.3 Projektionen des CeA zum Hypothalamus	85
4.6.4 Projektionen des CeM zur Substantia grisea centralis (PAG)	87

4.6.5 Projektionen des CeM zu den Nuclei parabrachialis	
4.7 Modifikationen des furchtassoziierten Verhaltens	
DANKSAGUNG	94
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
LITERATURVERZEICHNISS	99
LEBENSLAUF	116

1 Einleitung

1.1 Emotionen

Schlägt man im Lexikon den Begriff "Emotion" nach, so steht dort, dass das Wort aus dem Lateinischen stammt und den Begriffen Gemütsbewegung und Erregung, somit also Gefühlen entspricht. Ein Gefühl ist eine elementare Erlebnisqualität wie z.B. Freude, Trauer, Mitleid, Abscheu und Ärger. Gefühle sind meist entweder lust- oder unlustbetont und entsprechend von einem Impuls zur Herbeifügung und Bewahrung oder aber zur Vermeidung der Situation oder des Gegenstandes begleitet, an den die Gefühle sich knüpfen. Gefühle sind auch Bestandteile von Einstellungen und Motiven. Plötzliche und starke Gefühlsabläufe heißen Affekte. Es gibt verschiedene begriffliche Klassifizierungen der Gefühle, vor allem unterscheidet man gerichtete Gefühle, die sich der Vorstellung eines Gegenstandes anheften, und ungerichtete Gefühle, zu denen besonders auch die Stimmungen gehören. Nach dem Inhalt trennt man empfindungsbedingte (Schmerz, Lust, Hunger) von trieb- (Furcht, Neid, Eifersucht) und persönlichkeitsbedingten Gefühlen (z.B. Selbst- und Fremdwertung, ethische, ästhetische und religiöse Gefühle). Die Psychiatrie hat, ausgehend von den verschiedenen Störungen des Gefühlslebens, besonders bei Psychopathen und Schizophrenen, abweichende Einteilungen gefunden. In Stärke, Tiefe und Nachhaltigkeit der Gefühle bestehen große interindividuelle Unterschiede, die zum Teil diagnostisch erfasst werden können. In besonderem Maße ist das kindliche Erleben durch Gefühle bestimmt.

Die Entstehung von Gefühlen ist eng mit neurophysiologischen und endokrinen Prozessen verbunden (James, 1884).

Angst ist ein stark von Unlust getönter Affekt. Angst tritt als Anfall bei drohender tatsächlicher oder vermeintlicher Gefahr oder als quälender, grundloser Dauerzustand ohne bestimmtes Objekt (bei Psychosen, besonders endogener Depression) auf. Im letzteren Fall spricht man ausschließlich von Angst, im ersteren ist Angst nicht klar von Furcht zu trennen. Angst ist begleitet von unspezifischen körperlichen Affektsymptomen wie beispielsweise der Beschleunigung von Atmung und Herzfrequenz und Schweißausbruch. Sie führt auf Dauer zu vegetativer Fehlsteuerung. Angst bewirkt auch Bewegungshemmung oder gesteigerte Unruhe und Tendenz zu Flucht oder Abwehrverhalten. Furcht ist ein Affekt bei tatsächlicher oder vermeintlicher Bedrohung. Im Gegensatz zur Angst ist die Furcht objektbezogen. Sie ist verbunden mit der Tendenz zu Flucht oder Abwehr.

Extreme Angstzustände lassen sich insbesondere bei Patienten mit posttraumatischem Stresssyndrom und Personen mit Phobien beobachten. Angststörungen können durch Übererregbarkeit neuronaler Schaltkreise verursacht werden, die normalerweise Angstzustände und Verhalten an die Umstände anpassen. Es gibt drei generelle Variablen, die zu der Entwicklung von Übererregbarkeit beitragen. Dabei handelt es sich um genetische Faktoren, Erfahrungen während kritischer Stadien der Entwicklung und physikalische sowie psychologische Traumata (Rosen und Schulkin, 1998). Diese Erkenntnisse werden durch Tierversuche gestützt. Dabei ist es von Nutzen, dass Furcht bei Nagern leicht identifiziert werden kann, da die Tiere in der Regel erstarren (Freezing), wenn in einer unangenehmen bzw. potentiell bedrohlichen Situation keine Fluchtmöglichkeit gegeben ist. Freezing ist durch einfaches Beobachten zu erkennen und durch Elektroschocks leicht zu induzieren. Eine weitere, mit Furcht verknüpfte, Verhaltensweise ist das Zusammenzucken (Startle Reaktion) als eine Reaktion auf ein Geräusch. Diese Schreckreaktion ist einfach zu messen.

Die Expression der angstinduzierten Tachykardie, die Änderungen der Atmung, des Freezing, der Schreckreaktion und der angstbedingten Analgesie werden durch Läsionen der Amygdala unterbunden (Campeau und Davis, 1995; Hitchcock und Davis, 1986; Kapp et al., 1979; LeDoux et al., 1990a; Roozendaal et al., 1990; Sananes und Davis, 1992), wohingegen eine Reizung der Amygdala zu Tachykardie, Freezing und erhöhter akustischer Startle Reaktion führt (Iwata et al., 1987; Kapp et al., 1979; Rosen und Davis, 1988).

1.2 Die Amygdala

Die Amygdala ist für die Akquisition und Expression der auditorischen und kontextabhängigen Furchtkonditionierung essentiell (Helmstetter, 1992; Helmstetter und Bellgowan, 1994; Kim et al., 1993; LeDoux, 1993; LeDoux, 2000; Maren und Fanselow, 1995; Selden et al., 1991).

Die Amygdala ist mehr ein Konzept als eine deutlich zu erkennende Hirnstruktur. Morphologisch und funktionell setzt sie sich aus zahlreichen, im medialen Temporallappen gelegenen Kernen zusammen, die zu einer basolateralen, zentralen und kortikalen Kerngruppe zusammengefasst werden (Alheid et al., 1995; Amaral et al., 1992; Swanson und Petrovich, 1998). Der basolaterale Kernkomplex besteht aus dem Nucleus amygdalae lateralis (LA) mit den dorsolateralen, ventrolateralen und ventromedialen Bereichen, dem Nucleus amygdalae basalis lateralis (BLA) mit den ventralen, anterioren und posterioren Bereichen, dem Nucleus amygdalae basalis medialis (BM) mit den anterioren und posterioren Bereichen. Die zentrale Gruppe beinhaltet die Area amygdaloidea anterior (AAA), den Nucleus amygdalae centralis (CeA), den Nucleus amygdalae medialis (MeA) und den Nucleus striae terminalis pars intraamygdalae (BSTIA). Je nach Autor werden auch bestimmte Teile des Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior (IPAC) dazugerechnet. Weiterhin wird der CeA in einen medialen (CeM), lateralen (CeL) und kapsulär lateralen (CeC) Bereich unterteilt. Die kortikale Gruppe umfasst die Area parahippocampalis (AHI), die Area transitionis amygdalopiriformis (APIR), den Nucleus tractus olfactorii lateralis (LOT), den Nucleus accessorii tractus olfactorii (AOT), den Nucleus amygdalae corticalis anterioris (ACO), den Nucleus amygdalae corticales posteromedialis (PMCO) und den Nucleus amygdalae corticales posterolateralis (PLCO). Alheid und seine Kollegen (Alheid, 1995) entwickelten das Konzept der erweiterten Amygdala. Sie schlossen die nicht intra-amygdalär gelegenen Bereiche des Nucleus stria terminalis (BSTN) und des Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior (IPAC) sowie die Pars sublenticularis amygdalae (SLEA) mit ein. Auch bei diesem Konzept ist jedoch die Begrenzung der sogenannten Area transitionis amygdalostriatalis (AStr), die zwischen dem CeA und der ventromedialen Ausdehnung des Putamens liegt, schlecht definiert. Von manchen Autoren werden die AStr und amygdalanah gelegenen Bereiche des IPAC, die in der folgenden Arbeit detailliert untersucht wurden, sogar zum CeC gezählt (McDonald, 2003).

Studien zum Angstverhalten und zur Furchtkonditionierung befassen sich vornehmlich mit dem LA, dem BL, dem BM und dem CeA. Der LA ist die Haupteingangspforte zur Amygdala für konvergente Eingänge aus verschiedenen sensorischen Modalitäten, wobei die akustischen Stimuli eine besondere Rolle spielen, weil der LA einen starken direkten extralemniskalen Eingang aus dem akustischen Thalamus erhält (Calandreau et al., 2005; LeDoux et al., 1990a; Romanski et al., 1993). Der LA ist wichtig für die auditorische Furchtkonditionierung. Er bestimmt die Wertigkeit conditionierter und unkonditionierter aversiver Stimuli (Blair et al., 2005; Campeau und Davis, 1995; Iwata et al., 1986; LeDoux et al., 1986). Für den BL und BM konnte eine Beteiligung an der Akquisition bei der kontextuellen Furchtkonditionierung gezeigt werden (Calandreau et al., 2005; Davis et al., 1993; Tazumi und Okaichi, 2002). Zudem wird spekuliert, dass visueller Input der entscheidend für die Furchtkonditionierung eines visuellen CS ist, über den BL in die Amygdala gelangt. Vom LA und BL aus gelangen die Informationen direkt zum CeA. Informationen aus dem LA gelangen aber auch indirekt über den BL zum CeA (Pitkanen et al., 1995; Stefanacci et al., 1992).

Der CeA ist die Hauptausgangspforte der Amygdala und scheint wichtig für die Entstehung konditionierter cardiovasculärer Angstantworten zu sein (Folkow et al., 1982; Galeno et al., 1984; Iwata et al., 1987; LeDoux et al., 1990a; Markgraf und Kapp, 1991; Roozendaal et al., 1990).

Bei Affen verhindern Läsionen des CeA die Einschätzung von Gefahren (Kalin et al., 2004). Bei Ratten führt die Zerstörung des CeA zu Defiziten der emotionalen Antworten auf unkonditionierte und konditionierte aversive Stimuli (Davis, 1992; LeDoux, 1995).

Elektrolytische bzw. chemische Läsionen des CeA verhindern bei Ratten die Entstehung neurogenen Bluthochdrucks, hervorgerufen durch chronischen Stress (Baklavadzhyan et al., 2000). Sie beeinflussen auch die Entwicklung spontanen Bluthochdrucks (Galeno et al., 1982; Galeno et al., 1984; Sharma und Gelsema, 1995) und schwächen, bei Ratten die unter spontanem Bluthochdruck leiden, den durch Lärm überspitzten Blutdruck und die Gefäßverengung ab (Baklavadzhyan et al., 2000; Folkow et al., 1982; Galeno et al., 1984).

Die elektrische Stimulation der Amygdala verursacht dagegen bei der Ratte das Ansteigen der Pulsfrequenz und der Durchblutung der Muskulatur, während sie die mesenteriale, renale und cutane Durchblutung verringert (Galeno und Brody, 1983; Stock et al., 1981). Die elektrische Stimulation des CeA bzw. die Furchtkonditionierung führt bei Kaninchen im Gegensatz zu Ratten zu Bradykardie, Hypotonie und Erweiterung der die Hinterläufe versorgenden Blutgefäße (Dampney, 1994; Kapp et al., 1982). Bei Katzen beeinflusst die Unterkühlung des CeM weder den Puls noch die Atmung infolge eines konditionierten Stimulus, ändert allerdings die kardiorespiratorische Antwort auf den CS. Die Studie lässt vermuten, dass bei der Katze der hauptsächliche Einfluss des CeA auf die kardiovaskuläre Kontrolle eher über den Blutdruck als über die Regulation der Herzfrequenz stattfindet (Zhang et al., 1986).

Mikroinjektionen der exzitatorischen Aminosäure L-Glutamat in den CeA anästhesierter Ratten bewirkt ein Absinken des Blutdrucks und eine Bradykardie, während eine solche Injektion bei leicht betäubten oder wachen Ratten einen Anstieg des Blutdrucks und des Pulses bewirkt (Gelsema et al., 1987; Iwata et al., 1987).

Injektionen der Peptide Thyrotropin-releasing factor (TRF) und Calcitonin gene-related Peptid (CGRP) in den CeM verursachen dagegen einen Anstieg des mittleren arteriellen

10

Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz (HR). Darüber hinaus erhöhen Injektionen des Corticotropin-releasing factor (CRF), TRF und CGRP in den CeA die Catecholaminkonzentration im Plasma (Brown und Gray, 1988).

Der CeA empfängt umfangreiche Eingänge aus dem Nucleus tractus solitarius (NTS) und dem parabrachialen Kern (Fulwiler und Saper, 1984; Norgren, 1976; Ottersen, 1981; Ricardo und Koh, 1978; Saper und Loewy, 1980). Viele Zellen des NTS, die zu dieser Projektion beitragen beinhalten Somatostatin, Dynorphin, Enkephalin, Neuropeptid Y oder Noradrenalin (Riche et al., 1990), wohingegen viele der Zellen der Nuclei parabrachiales, besonders im externen lateralen Subnukleus, Substanz P, Neurotensin oder CGRP enthalten (Block et al., 1989; Schwaber et al., 1988; Shinohara et al., 1988; Yamano et al., 1988b; Yamano et al., 1988a). Der CeA ist das Hauptzielgebiet für absteigende Projektionen des agranulären insularen Cortex (Saper, 1982; Yasui et al., 1991a) und aufsteigende Projektionen des posterioren intralaminaren Komplexes im Thalamus (LeDoux et al., 1990a; Yasui et al., 1991b). Auf diese Weise empfängt der CeA stark verarbeitete Informationen des visuellen Systems, auditorischen Kortex, olfactorischen und gustatorischen Neokortex, des somatosensorischen Kortex als auch des Hippocampus.

Die meisten Projektionen des CeA steigen über die Area hypothalamica lateralis hinab zur Substantia grisea centralis, den Nuclei parabrachiales, der Medulla oblongata ventrolateralis und dem NTS (Cassell und Gray, 1989; Krettek und Price, 1978; Moga et al., 1990; Ross et al., 1981; Veening et al., 1984), die an der Kontrolle des Blutdrucks beteiligt sind (Alheid et al., 1995).

1.3 Die erweiterte Amygdala

Der BSTN innerviert viele der Hirnstammgebiete die auch der CeM innerviert (Alheid et al., 1995; Wallace et al., 1992). Deswegen wurde diskutiert, ob er eine Rolle bei Furcht bzw. pathologischer Angst spielt (Davis et al., 1997). Der laterale Anteil des BSTN gilt als rostrale Erweiterung des CeM, wohingegen der mediale Anteil als Erweiterung des medialen Kerns der Amygdala angesehen wird. Wie der CeA spielt auch der BSTN eine Rolle bei der Kontrolle der physiologischen Aktivität der hypothalamo-hypophysären-Nebennieren-Achse als Antwort auf Stress (Herman und Cullinan, 1997), was zusätzlich die Annahme unterstützt, dass der BSTN einen wichtigen Einfluss auf Furcht und pathologische Angst hat. Der BSTN spielt eventuell eine Rolle bei der nichtspezifischen Angst im Gegensatz zur objektbezogenen Furcht (Davis et al., 1997). Ratten haben eine angeborene Angst vor hell erleuchteten Umgebungen, und erschrecken sich deswegen dort stärker als in einer schwach beleuchteten Umgebung (Davis et al., 1997). Läsionen des BSTN reduzieren die Amplitude der Schreckreaktion, die in einer hell erleuchteten Umgebung ausgelöst wird, auf den Wert, der in einer schwach beleuchteten Umgebung erreicht wird. Läsionen des CeM haben dagegen lichtverstärkte Schreckreaktion. Umgekehrt keinen Effekt auf diese blockieren Amygdalaläsionen des LA und CeA die objektbezogene, furchtpotenzierte Schreckreaktion, die durch eine Furchtkonditionierung auf einen neutralen Stimulus induziert wird, wohingegen Läsionen des BSTN darauf keinen Einfluss haben. Weiterhin verhindert eine Läsion des BLA, der sowohl zum CeA als auch BSTN projiziert, Furcht und Angst. Deshalb sind wahrscheinlich der CeM für Furcht bzw. Furchtkonditionierung, der BSTN für Angst und der BLA für beide Formen der Angst wichtig (Hitchcock und Davis, 1991).

Bei Versuchen zur Furchtkonditionierung wurden die Auswirkungen von CGRP- und hCGRP (8-37)-Injektionen in die Amygdala auf das Erlernen und das Ausdrücken angstassoziierten Verhaltens, hervorgerufen durch einen für sich alleine stehenden akustischen konditionierten Stimulus und dem Trainingskontext, betrachtet. Kocorowski und Helmstetter haben 2001 gezeigt, dass CGRP-, aber nicht hCGRP (8-37)- Injektionen angstassoziiertes Verhalten ohne die Gegenwart eines aversiven Stimulus hervorrufen. Beide Peptide schwächen das während der Tests durch den Kontext verursachte Freezing, aber keines von beiden beeinflusst das Erlernen des auditorischen konditionierten Stimulus. Zudem schwächen hCGRP (8-37)- Injektionen das durch den auditorischen konditionierten Stimulus verursachte Freezing ab, haben aber keinen Einfluss auf das durch den konditionierten Kontext verursachte Freezing (Kocorowski und Helmstetter, 2001).

Kocorowski's und Helmstetter's CGRP-Injektionen befanden sich im lateralen Kern der Amygdala, einer Region die nur spärlich von CGRP-ir Fasern innerviert wird. Die CGRP-ir Fasern stammen aus den kaudalen intralaminaren Kernen. Der LA grenzt an die amygdalostriatale Übergangsregion. Diese Zone wird dicht von CGRP-ir Fasern innerviert die ihren Ursprung in den kaudalen intralaminaren Kernen des Thalamus haben.

1.4 Das Calcitonin Gene-related Peptid (CGRP)

CGRP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid, das in zwei eindeutigen Isoformen vorliegt, CGRPa und CGRPB (Amara et al., 1985; Rosenfeld et al., 1983). Die zwei Peptide unterscheiden sich bei der Ratte lediglich in einer Aminosäure (Thomas et al., 2001). Während ßCGRP von einem eigenen Gen codiert wird, werden αCGRP und Calcitonin von demselben Gen kodiert (Amara et al., 1985). Gewebespezifisches alternatives RNA Processing verursacht die überwiegende Expression von Calcitonin in C-Zellen der Schilddrüse und aCGRP im Gehirn, dem Rückenmark, kranialen Ganglien und einzelnen endokrinen Geweben (Amara et al., 1984; Gibson et al., 1984; Rosenfeld et al., 1983; Tschopp et al., 1984). Das Verteilungsmuster der beiden Isoformen ist ähnlich, allerdings variiert ihre relative Expression zueinander (Amara et al., 1985). Es wird angenommen, dass CGRP eine wichtige Rolle für verschiedene Funktionen auf der Ebene des Rückenmarks spielt, wie zum Beispiel der Weiterleitung von Schmerzreizen und Aktivität von Motoneuronen (Micevych und Kruger, 1992; van Rossum et al., 1997). So aktiviert CGRP über seinen eigenen Rezeptor die cAMP-Kaskade die zur Phosphorylierung des Acetylcholinrezeptors führt. Dieser reagiert nun nicht mehr so empfindlich auf Acetylcholin. Dieses Phänomen wird Desensitivierung genannt (Huganir und Greengard, 1990). Der G-Protein-gekoppelte CGRP-Rezeptor ist eine Multiproteineinheit, zusammengesetzt aus sieben transmembranständigen Domänen und zwei zusätzlichen separaten Proteinen (Evans et al., 2000; McLatchie et al., 1998; Poyner et al., 2002). Es ist ein CGRP-Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen geklont worden und pharmakologische Studien legen nahe, dass unterschiedliche CGRP-Rezeptor-Subtypen existieren (Dennis et al., 1989). CGRP-Mikroinjektionen in den CeA erhöhen den mittleren arteriellen Blutdruck, den Herzschlag und die Plasmakatecholaminkonzentration (Brown and Gray, 1988; Nguyen et al., 1986). Intra-CeA Injektionen des CGRP induzieren Antinozizeption, während die Blockade des CGRP1-Rezeptors mit CGRP (8-37) diesen Effekt aufhebt (Xu et al., 2003). Es ist aber auch gezeigt worden, dass gerade die Blockade der CGRP1-Rezeptoren, allerdings im kapsulären Teil des zentralen Kerns der Amygdala, antinozeptiv wirkt. Dabei werden durch NMDA hervorgerufene Ionenflüsse verhindert, was zu einer eingeschränkten synaptischen Plastizität führt (Han et al., 2005). Anscheinend ist der Effekt des CGRP abhängig davon, in welche Subkerne des zentralen Kerns es freigesetzt wird. Es stellt sich die Frage nach der Verschaltung der Subkerne untereinander und deren Wichtung. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch noch die Frage nach der Vergleichbarkeit von Schmerzen im Hinblick auf die sie auslösenden Reize. So haben Xu und seine Kollegen Heizplatten- und Randal-Selitto-Tests durchgeführt, während Han und seine Kollegen Arthritis induziert haben.

1.5 Modifizierung emotionaler Schaltkreise durch Thyroxin

Endokrine Ereignisse während kritischer Phasen der Entwicklung haben Langzeitauswirkungen auf die Entwicklung des Gehirns und das Verhalten (Goy und McEwen, 1980; Takahashi, 1994). Neonatale Thyroxin-Behandlung führt zu verändertem Angst- und Lernverhalten, dass wahrscheinlich auf anhaltenden und spezifischen morphologischen Veränderungen individueller Kerne des Hippocampus und der Amygdala im ausgewachsenen Tier beruht (Lipp et al., 1988; Schwegler, 1995; Yilmazer-Hanke et al., 2004). Die Anzahl Corticoliberin (Corticotropin-Releasing Factor, CRF) positiver Neurone im CeA ist niedriger, doch die Anzahl Neuropeptid Y (NPY) positiver Neurone und die Dichte der Thyroxin-Hydroxylase (TH) positiven Fasern im basolateralen Komplex ist trotz einer Reduktion der Gesamtzahl der Neurone erhöht (Yilmazer-Hanke et al., 2004). Es gibt Zusammenhänge bezüglich der Amygdalamorphologie und des angstassoziierten Verhaltens, welche die anxiogene Wirkung des CRF und die anxiolytischen Eigenschaften des NPY und des TH zeigen. Bei Untersuchungen zweier engverwandte Rattenstämme hat sich gezeigt, dass die Tiere des Stamms mit deutlicherer furchtsensitivierter Schreckreaktion aber erhöhtem explorativem Verhalten mehr CRF-ir Projektionsneurone im zentralen Kern der Amygdala hatten. Diese Tiere hatten auch mehr NPY-ir Neurone im lateralen und mehr Parvalbumin-ir Neurone im basalen Kern der Amygdala. Zudem ist gezeigt worden, dass Mäusestämme, die sich in ihrem angstassoziierten Verhalten unterscheiden, sich auch bezüglich der Rezeptorendichte bestimmter Neuromodulatoren der Amygdala voneinander unterscheiden. Die Rezeptorendichte einiger Neuromodulatoren (Serotonin- und Kainatrezeptoren) korreliert positiv mit der angstassoziierten Schreckreaktion (Yilmazer-Hanke et al., 2002; Yilmazer-Hanke et al., 2003; Yilmazer-Hanke et al., 2004). Die Amygdala spielt eine wichtige Rolle bei den Effekten des CRF auf angstassoziiertes Verhalten (Liang et al., 1992; Swiergiel et al.,

1993). Innerhalb des CeM werden CRF-ir Zellen durch CGRP-ir Neurone kontaktiert (Harrigan et al., 1994).

Der Blutdruck oder die Herzfrequenz können das Verhalten beeinflussen. Dies ist durch die Blockade vegetativer Afferenzen, die zu einer Veränderung des Kontext- nicht aber des Stimuluslernens führt, gezeigt worden (Janitzky et al., 2007). Amygdaloides CGRP ist wahrscheinlich in Schaltkreisen zur Regulation der vegetativen Parameter zu finden. Welche Rolle es dabei spielt, hängt davon ab in welchen Schaltkreisen es sich genau befindet. Ein Modellsystem, mit dem veränderte Schaltkreise untersucht werden können, sind thyroxinbehandelte Ratten. Direkte Messungen vegetativer Parameter derart veränderter Tiere und der Vergleich dieser Werte mit denen unbehandelter Tiere ermöglicht eventuell Rückschlüsse auf den Einfluss der amygdalären Schaltkreise zu ziehen, die an der Steuerung vegetativer Parameter beteiligt sind.

1.6 Fragestellung

Die angeführten Untersuchungen legen die Frage nahe, wie die CGRP-ir Projektionen der kaudalen intralaminaren Kerne des Thalamus zur Amygdala organisiert sind und ob sie eine Rolle bei der Steuerung vegetativer Parameter spielen. Das Ziel der vorliegenden Studie ist, die Projektionsmuster CGRP-ir Neurone der kaudalen intralaminaren Kerne zum lateralen Kern der Amygdala detaillierter als je zuvor zu charakterisieren. Durch die Verwendung kleiner Injektionen des retrograden Tracers Fluorogold (FG) wird der Nachweis für eine ausgeprägte Topographie der CGRP-ir thalamo-amygdaloiden Projektionen geliefert, die womöglich Teil des morphologischen Substrats zur Abgrenzung von objekt- und kontext-abhängigen emotionalem Lernen und Erinnern sind. Zudem wird der Frage nachgegangen, ob Veränderungen der Amygdalamorphologie durch transiente neonatale Hyperthyreose einen Einfluss auf vegetative Parameter haben.

2 Material und Methoden

2.1 Tracing

2.1.1 Tracer Injektionen

Die Experimente wurden an 73 acht Wochen alten männlichen Sprague-Dawly Ratten mit ca. 250 g Körpergewicht (Harlan/Winkelmann, Borchen) durchgeführt.

Die Tiere wurden in Gruppen zu vier bis sechs Tieren in Macrolon Käfigen unter einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden Dunkelheit zu 12 Stunden Licht gehalten. Um 6:00 Uhr ging ein schwaches Licht an, das bis 8:00 Uhr in kontinuierlichen Schritten heller wurde. Ab 16:00 Uhr begann das Licht wieder an Intensität abzunehmen, bis es um 18:00 Uhr vollständig ausgeschaltet wurde. Futter und Wasser waren ad libitum verfügbar.

Alle Experimente wurden gemäß der Direktive (86/608/EEC) der Europäischen Union und des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Alle Protokolle wurden vom Kommunalrat genehmigt (AZ: 42502-2-528 Uni MD).

Die Tiere erhielten eine initiale intraperitoneale Pentobarbital Injektion (0,03 mg/kg Kg, Narcoren®, Merial), gefolgt von einer intramuskulären Injektion eines Gemisches aus Ketamin (Ketavet®, Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Pharmacia & Upjohn, 100 mg/ml), Xylazin (Rompun®, Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, 20 mg/ml) und Azepromazin (Vetranquil®, Wirkstoff: Acepromazinmaleat, Albrecht, 20 mg/ml) in einer Dosierung von 1,5 ml/kg Körpergewicht. Nach Einsetzen der Narkose wurde der Kopf geschoren und die Tiere in einem stereotaktischen Apparat fixiert (Stoelting, Illinois, USA).

Vom Bregma ausgehend wurden die Kerne der Amygdala mittels Koordinaten, die aus dem Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1986) entnommen wurden, angesteuert. An der entsprechenden Stelle (Tabelle 1) wurde ein Loch in den Schädel gebohrt und nach der Eröffnung der Dura die Injektionskapillare ins Gehirn gesenkt. Die Injektionskapillaren (Borosilicatglas, Außendurchmesser 1,6 mm, Innendurchmesser 0,928 mm, Länge 150 mm, Hilgenberg, Malsfeld) wurden mit Sigmacote (SIGMA, Taufkirchen, Germany, siehe Yu und Gordon, 1994) innenbeschichtet, um ein Verstopfen während der Injektion zu verhindern. Die innenbeschichteten Kapillaren wurden zu Mikrokapillaren ausgezogen (Kopf Instruments, Tujunga, California, USA). Im Zielgebiet wurde der retrograde Tracer Fluorogold (Fluorochrome INC, Englewood, Colorado, USA, 4 % in destilliertem Wasser) iontophoretisch appliziert (Stromstärke +5µA, 5sec an/aus Intervall, Dauer circa 15 min.). Tabelle 1 gibt einen Überblick über ausgewertete Fälle, die Lage der Injektionsstellen, Durchmesser der verwendeten die inneren Mikrokanülen, die Überlebenszeit und die iontophoretische Applikation. Nach dem Ende der Injektion verblieb die Kanüle weitere drei Minuten an Ort und Stelle und wurde danach langsam entfernt. Die Wunde wurde verschlossen und die nun einzeln untergebrachten Tiere wurden beobachtet bis sie erwachten. Danach wurden sie zu ihren alten Käfiggesellen gesetzt und die folgenden Tage beobachtet.

Fall	Kern	Ø (µm)	Tage	Stromstärke
HAN10	LaVM	30	8	5µAmp/7.5 min
HAN39	LaDL	-	15	5µAmp/15 min
HAN40	LaVL	-	15	5μAmp/5 min; 2μAmp/10 min
HAN27	AStr	55	22	5µAmp/15 min
HAN28	AStr	50	22	5μAmp/10 min; 2μAmp/3 min; 1μAmp/2 min
HAN37	AStr	-	14	2μAmp/4 min; 2μAmp/1 min; 1μAmp/10 min
HAN41	AStr	-	14	5µAmp/7 min; 2µAmp/7 min; 1µAmp/1 min
HAN42	AStr	32,5	13	5µAmp/12 min
HAN48	AStr	25	13	1µAmp/4 min; 0,7µAmp/11 min
HAN67	IPAC	42,5	16	5µAmp/15 min
HAN68	IPAC	35	16	5μAmp/5 min; 0,5μAmp/10 min
HAN70	IPAC	45	14	5µAmp/5 min; 0,2µAmp/10 min
HAN72	IPAC	35	14	5µAmp/5 min; 1µAmp/10 min
HAN30	CeL	42,5	29	5µAmp/10 min; 1µAmp/5 min
HAN66	CeC	-	16	-
HAN45	CeM	32,5	10	5μAmp/5 min; 1μAmp/5 min; 0,5μAmp/5min
HAN57	LGP	25	15	3μAmp/5 min; 1μAmp/5 min; 0.5 μAmp/5 min
HAN58	LGP	25	15	3μAmp/3 min; 1μAmp/3 min; 0.5 μAmp/9 min
HAN60	LGP	37.5	15	3µAmp/10 min: 1µAmp/5 min
HAN63	LGP	35	14	3μAmp/5 min; 1μAmp/5 min; 0.5μAmp/5
HAN64	LGP	45	14	3μAmp/10 min; 2μAmp/5 min
HAN44	Сри	42,5	10	5µAmp/4 min; 0,1µAmp/11 min
HAN47	Cpu	35	13	5µAmp/14 min
HAN59	Сри	25	15	3μAmp/3 min; 1μAmp/3 min; 0.5 μAmp/9 min
HAN49	VEn	30	12	5µAmp/3 min; 0,5µAmp/12 min
HAN56	VEn/Pir	35,5	12	5µAmp/3 min; 0,5µAmp/12 min
HAN51	VEn/Pir	33,5	12	5µAmp/2 min; 0,1µAmp/13 min
HAN52	VEn/LSS	35	12	5µAmp/4 min; 0,1µAmp/11 min
HAN53	Ven/BMA	33,5	12	5µAmp/3 min; 2µAmp/7 min
HAN54	VEn/I	30	13	5μAmp/5 min; 1μAmp/5 min; 0.5 μAmp/5 min
HAN69	BMA/CeM	135	16	5μAmp/5 min; 0,2μAmp/10 min
HAN38	Den	-	15	5μAmp/4 min; 0,3μAmp/11 min

Tabelle 1: Details der experimentellen Parameter der in dieser Studie verwendeten FG Injektionen. Jedes Tier erhielt nur eine Injektion. Bei einigen Tieren verstopfte die Kapillare und die anfängliche Stromstärke konnte nicht konstant gehalten werden. Die Injektionen wurden mit einer geringeren Stromstärke fortgesetzt, um eine Injektionsdauer von mindestens 15 Minuten zu erreichen. Fall: Behandeltes Tier, Kern: Injektionsstelle, Ø: Innendurchmesser der Injektionskanüle, Tage: Überlebenszeit, Stromstärke: Stromstärke (µA) und Dauer der Injektion (min), -: Daten fehlen.

2.1.2 Histologie und Immunfärbungen

Nach einer Überlebenszeit von 8-29 Tagen (Tabelle 1) erhielten die Tiere eine Überdosis Narcoren (0,3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) und wurden transcardial perfundiert. Dazu wurde der Thorax eröffnet, Heparin (1000 I.E., Liquemin®, Roche, Basel, Schweiz) in den linken Ventrikel injiziert, die absteigende Aorta abgeklemmt, eine Kanüle durch den linken Ventrikel in die aufsteigende Aorta geschoben, das rechte Atrium geöffnet und das Blut mit 0,9 %iger Kochsalzlösung ausgewaschen. Sobald die aus dem rechten Atrium austretende Flüssigkeit frei von Blut war, wurde das Tier 20 Minuten lang mit Fixans, bestehend aus 4 % Paraformaldehyd, 15 % gesättigter Picrinsäure und 0,1 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, perfundiert. Danach wurde das Gehirn entfernt und über Nacht in Fixans ohne Glutaraldehyd gelagert. Vor dem Schneiden verblieben die Gehirne in einer gepufferten 20 %igen Saccharoselösung. Das Gehirn wurde mit einem Cryostaten in 40µm dicke Scheiben geschnitten. Es wurden vier äquidistante Serien angelegt. Die erste Serie wurde zur Darstellung der Zytoarchitektur mit Cresylviolett nach Nissl gefärbt. Diese Schnitte ermöglichten eine genaue Lokalisation der Injektionsstelle. Wurden die gewünschten Kerne getroffen, wurde die zweite Serie zur immunhistochemischen Visualisierung des CGRP aufbereitet.

Zur immunhistochemischen Aufbereitung der Schnitte wurden diese vier mal für jeweils 10 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen, präinkubiert (5 % Triton X-100, 5 % normales Ziegenserum (NGS, Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A) in 0,1 M Phosphatpuffer), um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern und mit dem primären Antikörper gegen CGRP (anti-CGRP 1:1500 (Sigma, C 8198), 1 % NGS, 5 % Triton X-100 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 at 4 °C für 48-72 Stunden) inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und mit einem biotingekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege (Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A, 0,1 M Phosphatpuffer, 1 % NGS, 5 % Triton X-100) für 90 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte wie zuvor beschrieben erneut gespült. Die letzte Inkubation wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden in einer Lösung aus 0,1 M Phosphatpuffer, 1 % NGS, 5 % Triton X-100 und 0,1 % Cy3-konjugiertem Avidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., West Grove, U.S.A) angesetzt. Die Schnitte wurden abschließend nach erwähntem Protokoll gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und in Mowiol (Hoechst, Frankfurt) eingebettet.

2.1.3 Analyse

Die Schnitte wurden mittels Fluoreszensmikroskopie ausgewertet (Axioplan 2 Imaging, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany). Zur Visualisierung des Fluorogold (Absorption 361 nm Wellenlänge, Emission 536 nm Wellenlänge) wurde der Filtersatz Nummer 1 der Carl Zeiss Jena GmbH benutzt. Dieser Filtersatz besteht aus einem Bandpassfilter für 365 nm +/- 12 nm (Extinktion), einem Strahlenteiler für 395 nm und einem Langpassfilter ab 397 nm (Emission).

Zur Visualisierung des Cy3 (Absorption 514-554 nm Wellenlänge, Emission 566-570 nm Wellenlänge) wurde der Filtersatz Nummer 15 der Carl Zeiss Jena GmbH eingesetzt. Dieser besteht aus einem Bandpassfilter für 546 nm +/- 12 nm (Extinktion), einem Strahlenteiler für

580 nm und einem Langpassfilter ab 590 nm (Emission). Die Bilder wurden mittels einerDigitalkamera der Firma Visitron Systems, Model 2.3.1, unter Verwendung der Axiovision3.1 Software (Carl Zeiss Jena GmbH) erstellt.

Fanden sich sowohl Fluorogold- als auch CGRP-markierte Zellen wurden Mehrkanalaufnahmen generiert. Die beiden Mikrofotografien wurden fusioniert und nach Neuronen durchsucht, die doppelt markiert waren. Traten Doppelmarkierungen auf, wurden die mit Fluorogold markierten, die CGRP-immunreaktiven und die doppelt markierten Neurone gezählt. Die Bilder der Schnitte durch den posterioren Thalamus wurden in ihrer Helligkeit, ihrem Kontrast und in ihrer Farbvarianz einander angeglichen.

2.2 Telemetrie

2.2.1 Hormonmanipulation

Trächtige Wistar-Ratten wurden von Harlan/Winkelmann (Borchen) geliefert. Die Nachkommenschaft wurde in drei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt Thyroxininjektionen, eine zweite Gruppe physiologische Kochsalzinjektionen und die dritte Gruppe wurde nicht behandelt. Während der ersten 12 Tage nach der Geburt erhielten die Welpen der ersten Gruppe täglich eine Injektion von 7,5 µg L-Thyroxin (T4) in 0,05 ml gepufferter 0,9 % iger NaCl Lösung (T4 Natrium Salz; Reinheit 98 % [HPLC]; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz). Die mit der Kochsalzlösung behandelten Tiere erhielten ein äquivalentes Injektionsvolumen (Trägermedium). Im Alter von vier Wochen wurden die Tiere von ihren Müttern getrennt. Die Ratten wurden in getrenntgeschlechtlichen Gruppen zu maximal fünf Tieren gehalten. Die sonstigen Haltungsbedingungen entsprachen den bereits erwähnten Bedingungen.

Gleichaltrigen Weibchen der drei Gruppen wurden 9-18 Monate nach der Behandlung Blutdruckkatheter in die Abdominalaorta und Telemetrietransmitter in die Bauchhöhle implantiert. Des Weiteren wurden EKG-Elektroden unter die Haut implantiert, eine in die rechte Axilla und die andere an den unteren Rand des linken Rippenbogens. Die Körpertemperatur wurde mittels Thermosensoren im Gehäuse der Telemetrietransmitter erfasst.

Die Tiere wurden nach einer Erholungsphase von zwei Wochen erst in ihren Käfigen und in einer neuen Umgebung und danach in der Startleapparatur getestet. Alle Protokolle wurden vom Kommunalrat genehmigt.

2.2.2 Implantation der Sonden

Die Tiere erhielten eine einleitende Narkose durch die intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus Midazolam (5mg/kg, Dormicum®, Hoffmann-La Roche AG, GrenzachWyhlen), Fentanyl (0,157 mg/kg, Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe) und Droperidol (7mg/kg, Abbott Laboratories, USA). Nach Einsetzen der Narkose erhielten sie eine intramuskuläre Injektion eines Gemisches aus Fentanyl (0,157 mg/kg) und Droperidol (7mg/kg). Des Weiteren wurde ihnen Atropin (0,1 mg/kg) und Augmentan (1.3mg/kg) s.c. injiziert. Im Bedarfsfall bekamen die Tiere eine zusätzliche halbe Dosis der Mixtur aus Fentanyl und Droperidol i.m. verabreicht. Den Tieren wurden der Bauch und die rechte Brust rasiert, anschließend wurden sie auf dem Rücken liegend fixiert. Über ein Rektalthermometer, das über einen Thermostaten mit einem Heizkissen verbunden war, wurde die Körpertemperatur konstant gehalten. Alle operativen Maßnahmen wurden unter strengen sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Bäuche der Tiere mit Jodlösung gewaschen und mit steriler selbstklebender Folie bedeckt. Die Tiere wurden mit einem sterilen Tuch bedeckt, so dass die Schnauze frei blieb und aus diesem Tuch wurde ein Stück herausgetrennt, um den Bauch freizulegen. Nun wurde der Bauchraum entlang der Linea alba eröffnet. Nach Darstellung und Abklemmung der Aorta unterhalb des Abgangs der Renalarterien, wurde der Katheter oberhalb der Bifurkation eingeführt und die Stelle mit Gewebekleber abgedichtet. Auf beiden Seiten des Schnittes wurden die EKG-Elektroden durch die Bauchwand geführt und unter der Haut bis zur rechten Brust und der linken Flanke unterhalb des Thorax verlegt. Die temperierten Implantate wurden beim Schließen der Bauchwand mitvernäht und so fixiert. Nachdem alle Wunden verschlossen wurden, erhielten die Tiere s.c. 3 ml temperierte physiologische Kochsalzlösung. Die Tiere wurden einzeln in einen Käfig mit einem nährstoffreichen und Flüssigkeit liefernden Gel (Solid Drink®-Energy, Triple A Trading, Otterlo, Niederlande) und angefeuchtetem Futter untergebracht. Sie verblieben über Nacht unter einem Wärmestrahler und wurden bis zum Ende der Versuche separat gehalten.

Für die Implantationen wurden ausschließlich Weibchen verwendet, da diese die Operation besser vertrugen.

2.2.3 Telemetrie Equipment

Die Ausrüstung zur Erfassung der vegetativen Parameter, am frei beweglichen Tier, wurde von DSI, data science international (St. Paul, U.S.A.) bezogen. Die gänzlich implantierten Sonden waren mit einer Batterie und einem Magnetschalter ausgerüstet, sodass das Gerät bei Nichtgebrauch ohne Operation ausgeschaltet werden konnte. Es wurden Implantate für kleine Tiere vom Typ TL11M2-C50PXT genutzt. Dieses Modell erfasste Druck, Temperatur, und Biopotentiale, wandelt diese um und sendet Radiosignale aus. Diese Signale wurden von Receivern des Typs RPC-1 empfangen und umgewandelt. Diese Receiver, sowie eine Hardwarekomponente zur Erfassung des Luftdrucks (Ambient Pressure Reference Monitor, APR-1), waren an eine Dataquest ART Data Exchange Matrix angeschlossen. Diese erfasste automatisch den Receivertyp, dessen Seriennummer und die Daten des APC-1. Die Matrix war an einen Computer angeschlossen. Auf dem Computer war die Software Data Quest 3.01 Gold installiert. Mit der Software wurden die Daten generiert.

Während der Versuche befand sich der Receiver unmittelbar unter oder neben den Versuchsaufbauten.

2.2.4 Messung der vegetativen Parameter in den Käfigen

Vor und nach den Tests in einer neuen Umgebung (neuer Raum, offenes Feld) wurden der Blutdruck, die Herzfrequenz und die Körpertemperatur gemessen. Die Messungen nach den Tests in einer neuen Umgebung liefen über Nacht.

2.2.5 Messung der vegetativen Parameter in einer unbekannten Umgebung (Novelty)

Die Tiere wurden in ihren Käfigen in einen neuen Raum gebracht und unmittelbar nach ihrer Ankunft in eine nach oben offene Plexiglaskiste (45-45-45 cm) platziert, die einer kleinen Variante eines offenes Feldes entsprach. Die Auswirkung der unbekannten Umgebung auf Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur wurde in einer Versuchsdauer von 15 Minuten gemessen. Anschließend wurden die Tiere in ihren Käfigen in ihren eigenen Raum bzw. an ihren eigenen Platz zurückgebracht, um die Messung der vegetativen Parameter fortzusetzen.

2.2.6 Messung der vegetativen Parameter und der Schreckreaktion in der Startleapparatur

Die furchtsensitivierte akustische Schreckreaktion (ASR) wurde mit bereits etablierten Parametern getestet (Schwegler et al., 1997; Yilmazer-Hanke et al., 2002). Die Experimente wurden in einer schallisolierten Kammer, die mit einer 5 Watt Kaltlichtbirne beleuchtet wurde, eine Woche nach den Messungen in einer neuen Umgebung (offenes Feld) durchgeführt. Die Tiere wurden in einen Drahtgitterkäfig platziert, der auf einer Plattform, gekoppelt an einen piezoelektrischen Beschleunigungsmesser, befestigt wurde. Der Ausgang des Wandlersystems wurde verstärkt und gefiltert (Piezo-Amp-System; Universität Tübingen). Die resultierende Spannung wurde digitalisiert und mittels eines Mikrocomputersystems analysiert (Microstar DAP 1200, Universität Tübingen). Die Schreckreaktion wurde als die Differenz der Spitzenspannungen während eines Zeitfensters von 80 ms vor und nach Verabreichung des akustischen Stimulus gemessen. Die akustischen Reize wurden von einem digitalen Funktionsgenerator (Waldmann; SigGen-PC) produziert und mittels eines Lautsprechers in den schallisolierten Raum abgegeben. Die Stimuli bestanden aus 10 kHz, 105 dB SPL RMS (Schalldruckpegel Effektivwert) Impulsen von 20 ms Dauer, davon 0,4 ms Anstieg und Abfall. Die Stimuli überlagerten ein 55-dB-SPL RMS Hintergrundrauschen mit einer Bandbreite von 2-40 kHz. Die elektrischen 1 mA Schocks von 500 ms Dauer wurden über den aus 2mm dicken und 15 mm voneinander entfernten Gitterstäben bestehenden Fußboden verabreicht. Ein Konstantstromgenerator außerhalb des Raums erzeugte die elektrischen Stimuli. Die Ratten konnten sich für fünf Minuten an die neue Umgebung gewöhnen (Habituation), dann erhielten sie 40 akustische Stimuli mit 30 Sekunden Abstand zueinander. Zehn Sekunden nach diesen ersten akustischen Stimuli erhielten die Tiere 10 elektrische Schocks mit jeweils 10 Sekunden Abstand. Nach 10 Sekunden Pause erhielten die Tiere 30 weitere akustische Stimuli. Für die Auswertung der Daten wurden die Amplituden der Schreckreaktion von 10 aufeinander folgenden Stimuli jedes Tieres zusammengefasst, sodass sieben Blöcke entstanden (4 vor dem Fußschock, 3 danach). Dann wurden aus diesen Werten für jede Gruppe Mittelwerte und deren S.E.M errechnet. Die furchtsensitivierte ASR errechnete sich aus der Differenz der Mittelwerte der Blöcke 5-7 und 3-4. Der Blutdruck, die Herzfrequenz und die Körpertemperatur wurden simultan zur Schreckreaktion gemessen.

2.2.7 Statistische Untersuchungsmethoden

Zur statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurden, je nach Versuch, einfaktorielle Varianzanalysen, zweifaktorielle Varianzanalysen mit Messwertwiederholung für den Faktor Zeit oder ein allgemeines lineares Modell mit Messwiederholung angewendet. Als hochsignifikant wurde p<0,001 und als signifikant p<0,05 eingestuft. Ein Wert von $0.10>p\geq$ 0,05 wurde als Trend definiert. Obwohl es unüblich ist, wurden Gruppenunterschiede, die lediglich als Trend vorlagen, ebenso den Posthoc-Tests unterzogen wie auch die signifikanten Gruppenunterschiede. Als Posthoc-Tests für multiple Vergleiche wurden Fisher's LSD und Tukey-HSD verwendet. Alle Werte der einzelnen Versuchsgruppen wurden als Mittelwerte ± S.E.M. dargestellt. Die Berechnungen wurden mit SPSS durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der CGRP-Immunreaktivität in der Amygdala

3.1.1 Verteilung der CGRP-Immunreaktivität in der Amygdala

Innerhalb der Amygdala befanden sich CGRP-ir Fasergeflechte, aber keine CGRP-ir Neurone. Die einzelnen Amygdalakerne wiesen erhebliche Unterschiede in der Dichte der CGRP-ir Fasern auf (Abb.1). Das dichteste Fasergeflecht wurde im Nucleus centralis pars lateralis der Amygdala beobachtet (CeC; Abb.1.1). Das Fasergeflecht des Nucleus amygdalae centralis pars medialis war weniger dicht. Sehr lockere Fasergeflechte wurden im Nucleus lateralis (LA) und der Randzone um die Nuclei intercalares beobachtet. Der Nucleus amygdalae basalis (BA) war frei von CGRP-ir Fasern. Bei höherer Vergrößerung der Grenzregion zwischen dem LA und CeA verliefen einige CGRP-ir Fasern vom CeA in den LA (Abb. 1.2).



Abb.1: Übersicht über die Verteilung CGRP-immunreaktiver Fasern in der rostralen Amygdala (Bregma –2,12). Der Rahmen umgrenzt jenes Areal, welches in Abb. B vergrößert dargestellt ist. B zeigt die Grenze zwischen dem lateralen und zentralen Kern der Amygdala mit aus dem zentralen Kern in den lateralen Kern ziehenden Fasern (Pfeile). Astr: Area transitionis amygdalostriatalis, BLA: Nucleus amygdalae basalis lateralis pars anterioris, CeC: Nucleus amygdalae centralis pars capsularis, CeM: Nucleus amygdalae centralis pars medialis, CPU: Caudatoputamen, IPAC: Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior, LA: Nucleus amygdalae lateralis. Maßstab: 300µm (A.), 50µm (B).

3.1.2 Verteilung der CGRP-Immunreaktivität innerhalb der Nuclei intalaminares posteriores thalami

Immunhistochemisch ließen sich viele CGRP-markierte Neurone im posterioren Thalamus darstellen. Im äußerst rostralen Bereich des Thalamus fanden sich CGRP-positive Neurone innerhalb des Nucleus subparafascicularis und des Nucleus posterior thalami, die sich von rostromedial bis caudolateral erstreckten. Die Anordnung der markierten Zellen erinnerte an ein Band (Abb. 2E, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3A). Weiter kaudal dehnte sich das von den immunpositiven Neuronen eingenommene Areal dorsal und lateral aus und beinhaltete den Nucleus peripeduncularis (PP), den Nucleus intralaminaris posterior thalami (PIL) und den Nucleus posterior triangularis thalami (PoT). Das Aussehen des Gebietes erinnerte an ein Dreieck dessen Grenzen dorsolateral durch das Corpus geniculatum mediale (MG), pars medialis (MGm), dorsomedial durch den Nucleus pretectalis anterior (APT) und den Nucleus retroethmoidales (REth) sowie ventral von der Substantia nigra pars lateralis gebildet wurden (Abb. 2F, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3B). Weiter kaudal expandierte das Areal lateral bis an die Oberfläche des Gehirns. Die Form erinnerte an einen Keil (Abb. 2G, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3C). Bis zum Ende des MG verlagerte sich die mediale Grenze des von den markierten Zellen eingenommenen Areals weiter nach lateral (Abb. 2H, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3D). War der MG nicht mehr zu sehen, fanden sich auch keine markierten Zellen mehr. Die markierten Zellen bildeten einen zusammenhängenden Komplex [Abb. 2; siehe auch Abb. 2 in (Dobolyi et al., 2005)].



Abb.2: Die Abbildungen A, B, C und D zeigen fluorogoldmarkierte Zellen im Thalamus. Die Abbildungen E, F, G und H zeigen CGRP-immunreaktive Zellen innerhalb desselben Areals. Die Zeichnungen stellen vier unterschiedliche Ebenen entlang der rostro-kaudalen Achse dar (sieh AP Distanz zu Bregma) und stammen aus dem Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997), sie entsprechen in ihrer Lage den Fluorogold und CGRP zeigenden Abbildungen. I, J, K und L zeigen die Abbildungen, nachdem sie vereinigt wurden. Doppelt markierte Zellen werden durch Pfeilspitzen angezeigt. Die Abbildungen gehören zu einer Injektion in die AStr (HAN 41, siehe Abbildung 5). Maßstab: 200µm.



Eth: Nucleus ethmoidalis thalami, MGM: Corpus geniculatum mediale, Nucleus medialis, MGV: Corpus geniculatum mediale, Nucleus ventralis, ml: Lemniscus medialis, PIL: Nucleus intralaminaris posterioris thalami, Po: Nuclei posteriores thalami, PoT: Nucleus posteriores triangulares thalami, PP: Nucleus peripedunculares, REth: Nucleus retroethmoidales, SPFPC: Nucleus subparafascicularis thalami pars parvicellularis, SubB: Nucleus subbrachialis, VPM: Nucleus ventralis posteromedialis thalami.



Abb. 3: Koronale Nissl-gefärbte Schnitte des posterioren Thalamus an vier unterschiedlichen rostro-kaudalen Positionen (A oben links bis kaudal D unten rechts). Die Zeichnungen sind Ausschnitte aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1997) auf Höhe der Abbildungen. Maßstab 200 µm. MGD: Corpus geniculatum mediale, Nucleus dorsalis MGM: Corpus geniculatum mediale, Nucleus medialis, MGV: Corpus geniculatum mediale, Nucleus ventralis, ml: Lemniscus medialis, PIL: Nucleus intralaminaris posterioris thalami, Po: Nucleus posteriores thalami, PoT: Nucleus posteriores triangulares thalami, PP: Nucleus peripedunculares, REth: Nucleus retroethmoidales, SG: Nucleus suprageniculatus thalami, SPFPC: Nucleus subparafascicularis thalami pars parvicellularis, SubB: Nucleus subbrachialis, VPM: Nucleus ventralis posteromedialis thalami.

3.2 Retrogrades Tracing

Fluorogold wurde in jene amygdaloiden Kerne injiziert, die vermutlich Afferenzen aus dem posterioren Thalamus um das MG erhalten. Dies waren vor allem die Area transitionis amygdalostriatalis (AStr), der Nucleus amygdalae lateralis (LA), der Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior (IPAC), der Nucleus centralis pars medialis (CeM) und das ventrale Caudatoputamen (CPu) (LeDoux et al., 1990b; LeDoux, 1993; LeDoux, 2000; Linke et al., 1999). Wie in Abbildung 4 dargestellt, wies das Zentrum der typischen Fluorogoldinjektionsstelle einen nekrotischen Bereich von etwa 100 µm Durchmesser auf, verursacht durch das Absterben von Neuronen und Einwandern von Gliazellen (Abb. 4.A). Von der zentralen Nekrose ausgehend verteilte sich der Tracer konzentrisch und man konnte ein stärker fluoreszierendes Zentrum von einer es umgebenden schwächer fluoreszierenden Randzone unterscheiden (Abb. 4B, innere Pfeile). Aufgrund früherer Arbeiten ist anzunehmen, dass der Tracer nur innerhalb des stärker fluoreszierenden Zentrums aufgenommen wird und der schwächer markierte Halo nicht zur retrograden Markierung beiträgt (Linke, 1999; Linke et al., 2004). Im Folgenden wird die Zone der aktiven Aufnahme des Tracers als das Zentrum der Injektion betrachtet. Die genaue Lage der Injektionen zeigt Abbildung 5. Details individueller Injektionen finden sich in Tabelle 1. Injektionen in angrenzende Gebiete wie den piriformen Cortex (HAN 51, 56 Abb. 5A) oder den endopiriformen Kern (HAN 49, 54, Abb. 5B; HAN 38 Abb. 5D) wiesen keine Markierungen in den posterioren intralaminaren Kernen auf, weshalb sie von dieser Untersuchung ausgeschlossen wurden.



Abb. 4: Fluorogoldinjektion in die zentrale Amygdala (HAN 30). A: Nissl Färbung, der Pfeil deutet auf die nekrotische Injektionsstelle hin in deren Zentrum die Spitze der Injektionskanüle gesessen hat. Die Injektionszonen sind eingekreist. B: der selbe Schnitt beleuchtet unter Fluorogoldfluoreszenz Bedingungen. Die nekrotische Stelle ist deutlich zu erkennen. Um diese Stelle, umringt von dem inneren Kreis aus Pfeilen, befindet sich die Kernzone der Injektion. Die äußeren Pfeile weisen auf die äußere Grenze der Diffusionszone des Tracers hin. Maßstab 500 µm. Abkürzungen siehe Liste.


Abb. 5: Lage und Größe der Injektionsstellen. Die Zeichnungen stammen aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1997) und sind von rostral nach kaudal geordnet. Die Zahlen neben den Falllisten geben die Distanzen zu Bregma in mm an. AStr: Area transitionis amygdalostriatalis, BLA: Nucleus amygdalae basalis lateralis pars anterioris, BLP: Nucleus amygdalae basalis lateralis pars posterioris, BLV: Nucleus amygdalae basalis lateralis pars ventralis, BMA: Nucleus amygdalae basalis medialis pars anterioris, BSTIA: Nucleus striae terminalis pars intraamygdalae, CeC: Nucleus amygdalae centralis pars capsularis, CeL: Nucleus amygdalae centralis pars lateralis, CeM: Nucleus amygdalae centralis pars medialis, CPu: Caudatoputamen, DEn: Nucleus endopiriformis dorsalis, I: Nuclei intercalates amygdalae, IPAC: Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior, IPACL: Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior, IPACM: Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterolateralis, LAVM: Nucleus amygdalae lateralis, LAVL: Nucleus amygdalae lateralis pars ventrolateralis, VEn: Nucleus amygdalae lateralis pars ventromedialis, LGP: Globus pallidus lateralis, VEn: Nucleus endopiriformis ventralis.

3.3 Injektionen in individuelle Kerne der Amygdala

3.3.1 Area transitionis amygdalostriatalis (AStr)

Die Area transitionis amygdalostriatalis wurde entlang ihrer rostro-kaudalen Ausdehnung an unterschiedlichen Stellen getroffen (Bregma -1.30 bis -3.30; Abb. 5). Bei fünf der Injektionen beschränkte sich das Zentrum der Injektionen auf die AStr (HAN 27, HAN 42, HAN 48, Abb. 5C; HAN 37, HAN 41, Abb. 5D). Bei zwei weiteren Injektionen befand sich das Zentrum der Injektion im IPAC an der Grenze zum CPu (HAN 65, HAN 68, Abb. 5A und 5B). Alle Injektionen zeigten retrograd markierte Neurone innerhalb des SPF, PP, MGm und jener thalamischen Region die von Swanson und Kollegen als Nucleus intralaminares posteriores thalami, abgekürzt PIN, bezeichnet wird (Abb. 2, 3). Dieselbe Region wird von Paxinos und Watson in einen Nucleus posteriores triangulares thalami (PoT) und einen Nucleus intralaminares posteriores thalami (PIL) unterteilt. Das Gebiet, welches von diesen markierten Zellen eingenommen wurde, veränderte seine Form entlang der rostro-kaudalen Achse. Rostral formten die Projektionsneurone ein Band, das medial des Nucleus ventralis posteromedialis thalami (VPM) und dorsal des Lemniscus medialis lag. Das Band befand sich im Nucleus posteriores thalami (Po), an dessen Grenze zum und im Nucleus subparafascicularis pars parvicellularis (SPFPC, Abb. 2A, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3A). Das Areal erweiterte sich kaudal nach dorsal und erhielt die Form eines Dreiecks. Dessen Kanten wurden dorsolateral durch das MG, ventral durch das DpMe und medial vom REth begrenzt. Dieses Areal beinhaltete den PIL, PoT und SPFPC sowie den medialen Teil des MG. Innerhalb dieses Bereiches befanden sich in jedem dieser Kerne Subpopulationen von retrograd markierten Neuronen (Abb. 2B, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3B, Übersichtszeichnung Abb. 6A). Weiter kaudal flachte das Dreieck ab und ähnelte einem Keil, dessen Spitze nach lateral zeigte und die Oberfläche des Gehirns erreichte. Dorsolateral wurde der Keil vom MG begrenzt, ventrolateral vom Pedunculus cerebralis (CP) und der Substantia nigra (SN). Auf dieser koronalen Ebene beinhaltete das Areal den PIL, PoT, den PP und den ventralen Teil der marginalen Zone des MG (Abb. 2C, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3C, Übersichtszeichnung Abb. 6B). Auffallend war die deutliche Zunahme in der Anzahl und Dichte retrograd markierter Neurone. Im weiteren Verlauf dehnte sich das Areal dorsal und dorsolateral aus. Die Zellen formten eine Kappe um den kaudalen Teil des MG. Markierte Zellen traten auch in der marginalen Zone des MG, dem medialen Teil des MG, dem Nucleus suprageniculatus thalami (SG), dem PP und dem Nucleus subbrachialis (SUBB, Abb. 2D, repräsentative Färbung nach Nissl Abb. 3D) auf.

3.3.2 Nucleus amygdalae lateralis (LA)

Jede der drei Injektionen in den Nucleus amygdalae lateralis (Abb. 5) zeigte fluorogoldmarkierte Zellen im posterioren Thalamus (Abb. 6, C, D). Das Gebiet, welches von diesen Zellen eingenommen wurde, deckte sich mit jenem, welches durch Injektionen in die AStr markiert wurde, mit Ausnahme des kaudalen Teils des Areals. Die Zellen dort umschlossen nicht den MG, sie lagen lediglich medial des MG. Injektionen in den LA markierten weniger Zellen im posterioren Thalamus als Injektionen in die AStr.

3.3.3 Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior (IPAC)

Injektionen in den IPAC (Abb. 5) zeigten ebenfalls fluorogoldmarkierte Zellen im posterioren Thalamus. Rostral wiesen die markierten Zellen die gleiche Verteilung auf wie sie nach Injektionen in die AStr zu beobachten waren. Dennoch war die Neuronendichte noch höher als nach Injektionen in die AStr und es wurde ein größeres Areal eingenommen. Weiter caudal bildeten die markierten Zellen ein Dreieck. Eine Spitze des Dreiecks zeigte nach medial und nicht nach lateral, wie es bei Injektionen in die AStr der Fall war (Abb. 6E). Weiter posterior nahm die Anzahl der markierten Zellen ab und die Dreieckskontur verändert sich hin zu einem Band, welches entlang der dorso-ventralen Achse verlief (Abb. 6F). Mit Ausnahme der rostralen Bereiche, wo die markierten Zellen sowohl nach Injektion in den IPAC als auch nach Injektion in die AStr die gleiche Verteilung zeigten, befanden sich die Neurone, welche zum IPAC projizierten eher medial, während Neurone die zur AStr projizierten, eher lateral lagen. Kaudal des intralaminaren Thalamus nahm die Anzahl der markierten Zellen ab. Das stand im deutlichen Kontrast zu den Markierungen nach Injektionen in die AStr: Anstelle einer Kappe aus markierten Zellen, die das MG umschlossen, fanden sich nur einige wenige markierte Zellen.

3.3.4 Nucleus amygdalae centralis (CeA)

Drei Injektionen waren im zentralen Kern der Amygdala lokalisiert, davon je eine im medialen, im lateralen und im kapsulären Subnukleus. Die Injektion in den medialen Subnukleus des CeA markierte Zellen innerhalb des PIN. Rostral im SPF befand sich ein Cluster markierter Zellen. Diese Ansammlung von Zellen nahm mehr Raum ein als die Markierung nach Injektionen in die AStr. Weiter kaudal erweiterte sich das Gebiet ventral und dorsal und war vergleichbar mit dem Dreieck aus Zellen im PIN, welches nach Injektionen in die AStr zu beobachten war (Abb. 6G). Weiterhin expandierte das okkupierte Areal bis zur Oberfläche des Gehirns und sah aus wie ein Keil (ABB. 6H). Sehr weit kaudal rahmten die markierten Zellen das MG komplett ein. Wie erwartet konnten keine Zellen durch Injektionen in den lateralen und kapsulären Teil des zentralen Kerns markiert werden.

3.3.5 Cautatoputamen (CPU)

Drei Injektionen befanden sich in Amygdala nahen Abschnitten des CPu. Die erste Injektion lag ventral und relativ weit kaudal, nahe der AStr (HAN 44, Abb. 5B). In diesem Fall konnten Zellen im rostralen Bereich des posterioren Thalamus beobachtet werden, noch bevor das MG beginnt. Diese Zellen befanden sich dorsal des Lemniscus medialis und ventral der Nuclei posteriores thalami und somit im SPFPC. Weiter caudal nahmen markierte Zellen ein dreieckiges Areal ein, das dem PIN entsprach (Abb. 6I). Weiter kaudal wurde aus dem Dreieck ein Band, das senkrecht zu dem rostral gelegenen Band orientiert war. Es erstreckte sich lateral entlang der medialen Grenze der Nuclei intralaminares posteriores thalami, ein Areal, das dem medialen Bereich des PIN entsprach. In dem am weitesten posterior gelegenen Teil des Thalamus befanden sich Zellen innerhalb des PP und der angrenzenden marginalen Zone des MG (Abb. 6J).

Bei der zweiten, weiter rostral und dorsal gelegenen Injektion in den CPu fanden sich nur einige wenige markierte Zellen oberhalb des Lemniscus medialis und unterhalb der Nuclei posteriores thalami im Bereich vor dem MG. Weiter kaudal gab es keine markierten Zellen mehr.

Die dritte Injektion in die CPu befand sich noch weiter rostral und lateral als die beiden anderen Injektionen und wies keine markierten Zellen innerhalb des posterioren Thalamus auf.

3.3.6 Globus pallidus lateralis (LGP)

Die Injektionen in den Globus pallidus lateralis (HAN57, Abb. 5) markierten vereinzelte Zellen des SPFPC und des REth. Kaudal waren nur wenige markierte Zellen medial der Nuclei intralaminares posteriores thalami zu beobachten, wohingegen der PIN weitestgehend frei von markierten Zellen war. Nachdem der MG endete, fanden sich einige wenige markierte Zellen in der Formatio reticularis.





Abb. 6: Verteilung Fluorogold markierter Neurone der Kerne des kaudalen intralaminaren Thalamus, an zwei unterschiedlichen Stellen entlang der rostro-kaudal Achse, nach Injektionen in unterschiedliche Kerne der erweiterten Amygdala (A, C, E, G, I, Bregma –5,3 mm; B, D, F, H, J Bregma – 6,04 mm). A, B: Markierung nach Injektion in die AStr. C, D: Markierung nach Injektion in den LAVM. E, F: Markierung nach Injektion in den IPAC. G, H: Markierung nach Injektion in den CEM. I, J: Markierung nach Injektion in das CPu. Die Fenster zeigen die entsprechende Injektionsstelle und Größe. Zu besseren Übersichtlichkeit befindet sich die Beschriftung in den Abbildungen K und L. Jedes Symbol repräsentiert eine einzelne Zelle. Die Zeichnungen sind Ausschnitte aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1997). MGD: Corpus geniculatum mediale, Nucleus dorsalis, MGM: Corpus geniculatum mediale, Nucleus ventralis, PIL: Nucleus intralaminaris posterioris thalami, PoT: Nucleus posteriores triangulares thalami, PP: Nucleus peripedunculares, SG: Nucleus suprageniculatus thalami, SPFPC: Nucleus subparafascicularis thalami pars parvicellularis.

3.4 Doppelmarkierungen von CGRP-ir und thalamoamygdalären Projektionsneuronen

Die Doppelmarkierung mit Fluorogold und Antikörpern gegen CGRP (Abb. 7) zeigte, dass CGRP-ir Neuronen im posterioren Thalamus nur in die AStr, den LA, den CeM und in das CPu projizieren. Darüber hinaus finden sich topographische Unterschiede in der Verteilung der CGRP-ir Projektionsneurone, insbesondere in der rostro-kaudalen Achse (Table 2).

Injektions-	Rostral	er	Teil	des	ро	sterioren	Kaudal	er '	Teil	des	posterioren
stelle	Thalan	nus					Thalam	nus			
& Eall	#	#	#	(%	%	#	#	#	%	%
& Fall	CGRP	FG	DM		FG	CGRP	CGRP	FG	DM	FC	GGRP
AStr											
HAN37	68	117	29		24.8	42.6	119	501	30	6.	0 25.2
HAN41	75	273	45	-	16.5	60.0	139	1183	70	5.	9 50.4
HAN27	89	470	49		4.7	55.5	83	455	22	10	.8 59.0
HAN28	75	311	39	-	12.5	52.0	147	1462	63	4.	3 42.9
LA											
HAN10	144	185	5		2.7	3.5	142	230	0	0.	0.0 0.0
HAN39	99	190	3		1.6	3.0	72	119	0	0.	0.0
HAN40	78	111	2		1.8	2.0	98	112	0	0.	0.0 0.0
CeM											
HAN45	63	287	2		0.7	3.2	96	508	4	0	.8 4.2
CPu											
HAN44	113	338	11		3.3	9.7	116	61	4	6	.6 3.4

Tabelle 2: Anzahl und Prozentsatz Fluorogold-, CGRP- und doppelt markierter Zellen im posterioren Thalamus. Der Thalamus ist unterteilt in einen rostralen (Bregma –4,52 bis –5,60) und einen kaudalen (Bregma –5,60 bis –6,72) Teil. Fall/Injektion: Fall und Injektionsstelle; # CGRP: Anzahl CGRP-ir Neurone; # FG: Anzahl fluorogoldmarkierter Neurone; # DM: Anzahl doppelt markierter Neurone; % FG: Prozentsatz doppelt markierter Zellen an der fluorogoldmarkierter Population; FG: Fluorogoldmarkierte Zellen; % CGRP: Prozentsatz doppelt markierter Zellen (DM) an der CGRP-markierter Population.



Abb. 7: CGRP-immunreaktive (A) und FG markierte (B) Neurone im posterioren Thalamus nach einer Injektion in die AStr (HAN 28, Abb. 5). C ist eine Vergrößerung der übereinander gelagerten Ausschnitte. Doppelt markierte Neurone sind mit Pfeilspitzen markiert. Maßstab 100 µm. MGM: Corpus geniculatum mediale, Nucleus medialis, MGV: Corpus geniculatum mediale, Nucleus ventralis, PIL: Nucleus intralaminaris posterioris thalami, PoT: Nucleus posteriores triangulares thalami, PP: Nucleus peripedunculares, SPFPC: Nucleus subparafascicularis thalami pars parvicellularis.

3.4.1 Area transitionis amygdalostriatalis (AStr)

Die AStr zeichnete sich dadurch aus, dass sie von allen untersuchten Regionen die mit Abstand stärkste CGRP-ir Projektion aus dem posterioren Thalamus erhielt. Doppelt markierte Neurone fanden sich entlang der gesamten rostro-kaudalen Achse des posterioren Thalamus (Abb. 2 I, J, K, L; Abb. 8). Insgesamt befanden sich in der kaudalen Hälfte des Thalamus doppelt so viele CGRP-ir Zellen wie in der rostralen Hälfte. Darüber hinaus gab es mindestens doppelt so viele FG markierte Zellen als CGRP-ir Neurone. Etwa 50 % der CGRP-ir Neurone waren auch fluorogoldmarkiert und projizierten demnach in die AStr. Im Gegensatz dazu machten CGRP-ir Neurone zwischen 5 bis 25 % der thalamo-amygdalären Projektionsneurone aus (Tabelle 2). In der kaudalen Hälfte des posterioren Thalamus gab es vier mal mehr fluorogoldmarkierte Zellen als in der anterioren Hälfte. Deshalb fiel in dieser Region der Anteil CGRP-ir Neurone auf 4-11 %, obwohl die absolute Anzahl doppelt markierter Neurone vergleichbar mit der des rostralen Teils des posterioren Thalamus war. Doppelt markierte Zellen verteilten sich über das gesamte von markierten Zellen eingenommene Areal. Es gab keine Anzeichen einer Clusterbildung.

3.4.2 Nucleus interstitialis commissura ant. pars post. (IPAC) und Globus pallidus lat. (LGP) Injektionen in den IPAC und den LGP, die beide an die AStr angrenzten, zeigten keine doppelt markierten Zellen im Thalamus und das, obwohl viele Zellen fluorogoldmarkiert waren. Das galt insbesondere für Injektionen in den IPAC.

3.3.3 Cautatoputamen (CPu)

Injektionen in das Caudatoputamen wiesen lediglich in einem Fall der sehr nahe an der AStr lag, doppelt markierte Zellen auf (HAN 44, Abb. 5). In diesem Fall befanden sich deutlich mehr Zellen in der anterioren Hälfte als in der posterioren Hälfte des Thalamus, zudem unterschied sich die Anzahl der CGRP-ir Zellen nicht zwischen den beiden Hälften. Die wenigen doppelt markierten Zellen verteilten sich über das gesamte von markierten Zellen eingenommene Gebiet, allerdings befanden sich mehr doppelt markierte Zellen im anterioren als im posterioren Bereich. Der Anteil doppelt markierter Neurone war deutlich geringer im Vergleich zu Injektionen in die AStr, aber höher als nach Injektionen in die LA oder CeA.

3.4.4 Nucleus amygdalae lateralis (LA)

Es gab keine großen Unterschiede in der Anzahl fluorogoldmarkierter Zellen zwischen der anterioren und der posterioren Hälfte des Thalamus. Alle der wenigen doppelt markierten Neurone befanden sich in der anterioren Hälfte (Tabelle 2).

3.4.5 Nucleus amygdalae centralis (CeA)

Bei Injektionen in den medialen Teil des Zentralen Kerns nahm die Anzahl fluorogoldmarkierter Zellen von rostral nach kaudal zu. Die wenigen doppelt markierten Zellen befanden sich in beiden Hälften, allerdings gab es mehr davon in der posterioren Hälfte (Abb. 9)



Abb. 8: CGRP-ir (Dreiecke), FG-markierte (Kreise) und doppelt markierte (Sterne) Neurone im posterioren Thalamus nach Injektion in die AStr (HAN 41, Abb. 5). Die Zeichnungen A, B, C und D sind Ebenen entlang der rostro-kaudalen Achse (AP Distanz –4,52, -5,30, -6,04, – 6,30 von Bregma ausgehend) aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1997). Abbildung E entspricht dem umrahmten Areal in Zeichnung C und Abbildung F entspricht dem umrahmten Areal in Zeichnung D. Doppelt markierte Neurone werden durch Pfeilspitzen angezeigt. Maßstab: 100 μm. MGM: Corpus geniculatum mediale, Nucleus medialis, MGV: Corpus geniculatum mediale, Nucleus ventralis, ml: Lemniscus medialis, PIL: Nucleus intralaminaris posterioris thalami, Po: Nuclei posteriores thalami, PoT: Nucleus posteriores triangulares thalami, PP: Nucleus peripedunculares, REth: Nucleus retroethmoidales, SPFPC: Nucleus subparafascicularis thalami pars parvicellularis, SubB: Nucleus subbrachialis.



Abb. 9: CGRP-ir (Dreiecke) und FG-markierte (Kreise) Neurone im posterioren Thalamus nach Injektion in die CeM (HAN 45, Abb. 5). Die Zeichnungen A, B, C und D sind Ebenen entlang der rostro-kaudalen Achse (AP Distanz –4,52, -5,30, -6,04, –6,30 von Bregma ausgehend) aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1997). Abbildung E entspricht dem umrahmten Areal in Zeichnung B und Abbildung F entspricht dem umrahmten Areal in Zeichnung D. Die Abbildungen zeigen lediglich CGRP-ir und FG-markierte Neurone. Maßstab 100 µm. MGM: Corpus geniculatum mediale, Nucleus medialis, MGV: Corpus geniculatum mediale, Nucleus ventralis, ml: Lemniscus medialis, PIL: Nucleus intralaminaris posterioris thalami, Po: Nuclei posteriores thalami, PoT: Nucleus posteriores triangulares thalami, PP: Nucleus peripedunculares, REth: Nucleus retroethmoidales, SPFPC: Nucleus ventralis posteromedialis thalami pars parvicellularis, SubB: Nucleus subbrachialis, VPM: Nucleus ventralis posteromedialis thalami.

3.4 Fluorogold und CGRP-ir Projektionen des Nucleus parabrachialis zur Amygdala

Im parabrachialen Kern, in einer Entfernung von etwa –9,0 bis –9,4 mm von Bregma, fanden sich fluorogoldmarkierte Neurone nach Injektionen in den CeM, CeL, IPAC, die AStr und bei den Injektionen in das CPu (HAN44, Abb. 5) und das LGP (HAN63, HAN60, Abb. 5) die dem IPAC am nächsten lagen. Im PB gab es keine Tracer markierten Neurone nach Injektionen in den LaDL (HAN 39, Abb. 5D), LaVL (HAN 40, Abb. 5D), piriformen Kortex (HAN51 und HAN56, Abb. 5A) oder Nucleus endopiriformis (HAN49 und HAN54, Abb. 5B; HAN38, Abb. 5D).

Injektionen in den CeL und die AStr markierten zerstreut liegende Neurone im Nucleus parabrachialis medialis, pars lateralis (MPBE), Nucleus parabrachialis lateralis, pars lateralis (LPBE) und Nucleus parabrachialis lateralis, pars medialis (LBPC) (Abb. 10A). Injektionen in den CeM markierten Neurone, die eng beieinander im LPBE, Nucleus parabrachialis lateralis, pars mediolateralis (LPBCr) und LPBC lagen (Abb. 11A). Die CGRP-ir Neurone lagen zusammengeballt überwiegend im LPBE und Nucleus parabrachialis medialis, pars lateralis (MPBE, Abb. 10B, 11B) und überlappten teilweise mit den zusammenliegenden Neuronen, die nach einer Injektion in den CeM mit FG markiert waren. Nach Injektionen in das CPu und den CeL lagen markierte Neurone verstreut im MPBE und lateralen parabrachialen Kern. Injektionen in den IPAC führten zu einigen wenigen markierten Neuronen im MPBE, doch stieg die Anzahl der markierten Neurone mit abnehmender Entfernung der Injektionsstelle zur CeA.

Nach Injektionen in den CeL oder die AStr gab es doppelt markierte Neurone, die über LPBE und MPBE verteilt waren (Abb. 10C/D). Lediglich einige wenige doppelt markierten Neurone befanden sich in der Ansammlung der CGRP-ir Neurone. Nach Injektionen in den CeM gab es doppelt markierte Neurone im LPBE und LPBCr aber keine im lateralen Bereich des MPBE (Abb. 11C/D). Insgesamt ist die Dichte der doppelt markierten Neurone höher nach Injektionen in den CeM als nach Injektionen in den CeL oder die AStr. Im PB wurden keine doppelt markierten Neurone nach Injektionen in den IPAC, CPu und LPG gefunden.



Abb. 10: Verteilung doppelt markierter Neurone im Nucleus parabrachialis. A: FG markierte Neurone nach einer Injektion in den CeL (HAN 30, Abb. 5C). B: CGRP-ir Neurone. C: Übersicht der Kolokalisation retrograd markierter (Kreise) und CGRP-ir (Dreiecke) Neurone. Die Position der Zellen wurde in die entsprechende Ebene des Atlanten von Paxinos und Watson übertragen, Entfernung von Bregma –9,16mm. Sterne repräsentieren doppelt markierte Zellen. Jedes Symbol repräsentiert eine Zelle. Die Pfeilspitzen zeigen doppelt markiert Neurone an. D: Ausschnittsvergrößerung des in C eingerahmten Bereichs mit übereinander gelagerten Fluoreszenzen. E: Ausschnittsvergrößerung der Fluorogoldmarkierung. F: Ausschnittsvergrößerung der CGRP-ir. Maßstab: 100µm.



Abb. 11: Verteilung doppelt markierter Neurone im Nucleus parabrachialis. A: FG markierte Neurone nach einer Injektion in den CeM (HAN 45, Abb. 5C). B: CGRP-ir Neurone. C: Übersicht der Kolokalisation retrograd markierter (Kreise) und CGRP-ir (Dreiecke) Neurone. Die Position der Zellen wurde in die entsprechende Ebene des Atlanten von Paxinos und Watson übertragen, Entfernung von Bregma -9,16mm. Sterne repräsentieren doppelt markierte Zellen. Jedes Symbol repräsentiert eine Zelle. Die Pfeilspitzen zeigen doppelt markierte Neurone an. D: Ausschnittsvergrößerung des in C eingerahmten Bereichs mit übereinander gelagerten Fluoreszenzen. E: Ausschnittsvergrößerung der Fluorogoldmarkierung. F: Ausschnittsvergrößerung der CGRP-ir. Maßstab: 100µm. LPBE: Nucleus parabrachialis lateralis, pars lateralis, me 5: Tractus mesencephalicus nervi trigemini, MPBE: Nucleus parabrachialis medialis, pars lateralis, scp: Pedunculus cerebellaris superior, vsc: Tractus spinocerebellaris anterior.

3.5 Allgemeine Auswirkungen der frühen postnatalen Thyroxinbehandlung

Die thyroxinbehandelten Tiere öffneten früher ihre Augen und das Fellwachstum setzte früher ein. Weiterhin wogen die thyroxinbehandelten Tiere weniger (Gruppe 3, 233g, SEM \pm 8g) als die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tiere (Gruppe 2, 285g, SEM \pm 8g) und die unbehandelten Tiere (Gruppe 1, 309g, SEM \pm 8g). Die unbehandelten Tiere unterschieden sich nicht signifikant von den kochsalzbehandelten Tieren (Univariante Varianzanalyse, F=25, df=2, p<0,05. Posthoc-Test: Tukey-HSD, Gruppe 3 gegen Gruppe 1 und 2 jeweils p<0,000, Gruppe 1 gegen Gruppe 2: p=0,116).

3.6 Messungen im Käfig vor dem Umsetzen in eine unbekannte Umgebung (Novelty)

Während der Messdauer von 15 Minuten gab es keine signifikanten Veränderungen des Blutdrucks (Abb. 12A Gruppen: F=0,88 p=0,44; Zeit: F=1,22 p=0,32), der Herzfrequenz (Abb. 12D Gruppen: F=0,01 p=0,99; Zeit: F=1,57 p=0,20) und der Körpertemperatur (Abb. 12G Gruppen: F=0,13 p=0,88; Zeit: F=2,12 p=0,09). Die Gruppen unterschieden sich nicht voneinander.

3.7 Messungen in einer unbekannten offenen Umgebung (Novelty)

3.7.1 Blutdruck und Herzfrequenz

Die statistische Analyse mittels eines allgemeinen linearen Modells mit Messwiederholungen ergab, dass der Blutdruck (F=27,529, df=1, p<0,000) und die Herzfrequenz (F=58,055, df=1, p<0,000) der Tiere nach ihrer Umsetzung in einen neuen unbekannten Raum signifikant anstieg. Zwischen den Gruppen gab es sowohl beim Blutdruck (F=1,798, df=2, p=2,11) als auch bei der Herzfrequenz (F=0,215, df=2, p=0,81) keine signifikanten Unterschiede. Weiterhin kam es im Verlauf der 15-minütigen Messung im offenen Feld zu einem signifikanten Abfall des Blutdrucks (zweifaktorielle ANOVA, F=10,48, df=4, p<0,0001) und Sinken der Herzfrequenz (F=8,62, df=4, p<0,001), wobei sich die Gruppen sowohl beim

Blutdruck (zweifaktorielle ANOVA, F=1,90, df=2, p=0,15, Abb. 12B) als auch bei der Herzfrequenz (F=0,52, df=4, p=0,62, Abb. 12E) nicht signifikant voneinander unterschieden. Bezüglich des Blutdrucks gab es allerdings den Trend, dass sich die unbehandelten von den behandelten Tieren unterschieden.

3.7.2 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Tiere veränderte sich unmittelbar nach ihrer Umsetzung in einen neuen unbekannten Raum nicht signifikant (F = 1,655, df = 1, p = 0,225), es gab auch diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (F = 0,424, df = 2, p = 0,665). Während des 15-minütigen Versuchs stieg die Körpertemperatur allerdings signifikant an (F = 24,29, df = 4, p < 0,0001). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (F = 2,72, df = 2, p = 0,10, Abb. 12 H.) es gab allerdings den Trend, dass sich die unbehandelten von den behandelten Tieren unterschieden.

3.8 Messungen im Käfig nach den Versuchen in der neuen Umgebung (Novelty)

3.8.1 Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur

Der Blutdruck (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, F = 5,37, df = 9, p < 0,0001), die Herzfrequenz (F = 10,91, df = 9, p < 0,0001) und die Körpertemperatur (F = 10,91, df = 9, p < 0,0001) der Versuchstiere, die sich wieder in ihrem Käfig befanden, nahm innerhalb der ersten 30 Minuten nach dem Test in der unbekannten Umgebung ab. Dabei gab es beim Blutdruck (F = 2,04, df = 2, p = 0,17, Abb. 12 C), der Herzfrequenz (F = 1,33, df = 2,

p = 0,30, Abb. 12 F) und der Körpertemperatur (F = 0,35, df = 2, p = 0,71, Abb. 12 I) keine Unterschiede zwischen den Gruppen.



Abb. 12: Verläufe von Herzfrequenz, Blutdruck und Körpertemperatur in der neuen Umgebung sowie im Käfig davor und danach. Die Zeit im Käfig vor dem Versuch in der neuen Umgebung zählt zurück. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin.



Abb. 13: Verlauf des Blutdrucks, der Herzfrequenz, der Körpertemperatur und der Aktivität im Käfig über Nacht. Die Symbole unmittelbar über den Messpunkten zeigen Unterschiede zwischen den Gruppen und den Grad der Signifikanz. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin.

3.9 Messungen über Nacht im Käfig nach den Versuchen in einer neuen Umgebung

Gemessen wurde von 16:00 Uhr bis 10:00 Uhr des darauffolgenden Tages. Alle 30 Minuten wurde eine Messung durchgeführt. Für die Berechnungen wurden die Mittelwerte über einen Zeitraum von zwei Stunden benutzt. Geht man von 16:00 Uhr aus, so erfolgten die Messungen innerhalb eines Zweistundenfensters um 16:00 Uhr, 16:30 Uhr, 17:00 Uhr und zuletzt um 17:30 Uhr. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde zum einen ein allgemeines lineares Modell mit Messwiederholung und ein Fisher's LSD Posthoc-Test sowie für jeden Zeitpunkt eine einfaktorielle ANOVA und ein Fisher's LSD Posthoc-Test durchgeführt.

3.9.1 Blutdruck

Der Blutdruck änderte sich über Nacht nicht signifikant (allgemeines lineares Modell mit Messwiederholung, F = 0,109, df = 1, p = 0,748). Man kann einen Trend erkennen, dass sich die unbehandelten Gruppen (Fisher's LSD p = 0,030) von den mit Kochsalz behandelten Tieren (F = 3,115, df = 2, p = 0,085) unterschieden, während sich weder die unbehandelten von den mit Thyroxin behandelten Tieren (Fisher's LSD p = 0,261) noch beide behandelten Gruppen (Fisher's LSD p = 0,381) unterschieden. Eine Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte ergab, dass der Blutdruck der unbehandelten Tiere (Kontrolle: C) öfter, dann aber meist nur als Trend, über dem der behandelten Tiere lag (Behandlung mit Kochsalz: S; Behandlung mit Thyroxin: T). Der Blutdruck der Thyroxin behandelten Tiere pendelte zwischen den beiden anderen (Abb. 13A, Tabelle 3).

Tageszeit								
16:00- 17:30	18:00- 19:30	20:00- 21:30	22:00- 23:30	24:00- 1:30	02:00- 03:30	04:00- 05:30	06:00- 07:30	08:00- 09:30
ANOVA								
F=8,07 P=0,006 Df=2 Fisher's I	F=2,01 P=0,18 Df=2 -SD	F=4,15 P=0,043 Df=2	F=3,26 P=0,074 Df=2	F=1,87 P=0,20 Df=2	F=3,80 P=0,053 Df=2	F=3,57 P=0,061 Df=2	F=2,41 P=0,132 Df=2	F=1,602 P=0,245 Df=2
C×T: p<0,05 C×S: p<0,01		C×S: p<0,05	C×S: 0,10> p≥0,05		C×S: 0,10> p≥0,05	C×S: 0,10> p≥0,05		

Tabelle 3: Ergebnisse der statistischen Berechnungen zur Ermittelung der Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des Blutdrucks. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin.

3.9.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz änderte sich über Nacht nicht signifikant (allgemeines lineares Modell mit Messwiederholung, F = 4,545, df = 1, p = 0,054). Analog zum Blutdruck unterschieden sich die unbehandelten Tiere von denen, die mit Kochsalz behandelt wurden (F = 4,411, df = 2, p = 0,037), (Fisher's LSD p = 0,014), während sich weder die unbehandelten von den mit Thyroxin behandelten Tieren (Fisher's LSD p = 0,635) noch beide behandelten Gruppen (Fisher's LSD p = 0,088) voneinander unterschieden. Eine Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte ergab, dass die Herzfrequenz der unbehandelten Tiere anfangs signifikant, dann lediglich als Trend und in der späteren Hälfte nicht mehr signifikant über der der mit Kochsalz behandelten Tiere lag. Die Herzfrequenz der mit Thyroxin behandelten Tiere pendelte zwischen den beiden anderen (Abb.13C, Tab. 4).

Tageszeit								
16:00- 17:30	18:00- 19:30	20:00- 21:30	22:00- 23:30	24:00- 1:30	02:00- 03:30	04:00- 05:30	06:00- 07:30	08:00- 09:30
ANOVA								
F=6,72 P=0,01 Df=2 Fisher's L	F=0,984 P=0,400 Df=2 .SD	F=6,29 P=0,012 Df=2	F=3,35 P=0,067 Df=2	F=3,66 P=0,055 Df=2	F=2,40 P=0,13 Df=2	F=1,89 P=0,191 Df=2	F=0,26 P=0,771 Df=2	F=2,64 P=0,112 Df=2
S×T: p<0,05 S×C: p<0,01		C×S: p<0,01 S×T: p<0,05	C×S: 0,10> p≥0,05	C×S: 0,10> p≥0,05				

Tabelle 4: Ergebnisse der statistischen Berechnungen zur Ermittelung der Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Herzfrequenz. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin.

3.9.3 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur änderte sich über Nacht nicht signifikant (allgemeines lineares Modell mit Messwiederholung, F = 0,001, df = 1, p = 0,971). Die Gruppen unterschieden sich voneinander (F = 4,885, df = 2, p = 0,030), wobei sich allerdings lediglich die behandelten Tiere voneinander unterschieden (Fisher's LSD p = 0,012), während sich weder die mit Thyroxin behandelten Tiere (Fisher's LSD p=0,209), noch die mit Kochsalz behandelten Tiere (Fisher's LSD p=0,061), von den unbehandelten Tieren unterschieden. Eine Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte ergab, dass die Körpertemperatur der Thyroxin behandelten Tiere in der ersten Hälfte signifikant über jener der mit Kochsalz behandelten Tiere lag. In der zweiten Hälfte unterschieden sich die Werte beider Gruppen nicht mehr voneinander. Die Körpertemperatur der unbehandelten Tiere lag in der ersten Hälfte und am Ende zwischen den beiden anderen, in der Zwischenzeit stieg sie über die der anderen, allerdings nicht signifikant (Abb. 13B, Tab. 5).

Tageszeit								
16:00- 17:30	18:00- 19:30	20:00- 21:30	22:00- 23:30	24:00- 1:30	02:00- 03:30	04:00- 05:30	06:00- 07:30	08:00- 09:30
ANOVA								
F=2,93 P=0,092 Df=2 Fisher's L	F=2,20 P=0,153 Df=2 .SD	F=3,94 P=0,048 Df=2	F=5,50 P=0,020 Df=2	F=5,89 P=0,017 Df=2	F=0,52 P=0,426 Df=2	F=1,10 P=0,365 Df=2	F=1,875 P=0,196 Df=2	F=4,89 P=0,030 Df=2
S×T: 0,10> p≥0,05		S×T: p<0,05	C×S: p<0,05 S×T: p<0,05	C×S: p<0,05 S×T: p<0,01				C×S: p<0,05 S×T: p<0,05

Tabelle 5: Ergebnisse der statistischen Berechnungen zur Ermittelung der Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Körpertemperatur. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin.

3.9.4 Aktivität

Die Aktivität änderte sich über Nacht nicht signifikant (allgemeines lineares Modell mit Messwiederholung, F = 1,045, df = 1, p = 0,325). Die Gruppen unterschieden sich nicht voneinander (F = 2,299, df = 2, p = 0,140). Eine Betrachtung der einzelnen Zeitabschnitte ergab, dass die Aktivität aller Gruppen, wenn auch nicht signifikant, bis zum Ausschalten des Lichts zunahm, über Nacht schwankte und bis zum Anschalten des Lichts absank. Eigenen Beobachtungen zufolge schien es, als seien die mit Thyroxin behandelten Tiere aktiver als die mit Kochsalz behandelten Tiere. Die unbehandelten Tiere lagen dazwischen, doch waren die Unterschiede nicht signifikant (Abb. 13D, Tab. 6).

Tageszeit								
16:00- 17:30	18:00- 19:30	20:00- 21:30	22:00- 23:30	24:00- 1:30	02:00- 03:30	04:00- 05:30	06:00- 07:30	08:00- 09:30
ANOVA								
F=1,20 P=0,332 Df=2	F=1,16 P=0,342 Df=2	F=1,56 P=0,244 Df=2	F=3,48 P=0,059 Df=2	F=1,00 P=0,392 Df=2	F=2,31 P=0,136 Df=2	F=0,71 P=0,508 Df=2	F=2,79 P=0,096 Df=2	F=2,43 P=0,124 Df=2
Fisher's LSD								
			S×T: 0,10> p≥0,05				S×T: 0,10> p≥0,05	

Tabelle 6: Ergebnisse der statistischen Berechnungen zur Ermittelung der Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Aktivität. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin.

3.10. Messungen in der Startleapparatur

3.10.1 Blutdruck

Die statistische Analyse mittels eines allgemeinen linearen Modells mit Messwiederholungen ergab, dass der Blutdruck der Tiere nach ihrer Umsetzung in die Startleapparatur signifikant anstieg (F = 77,339, df = 1, p < 0,000). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (F = 2,841, df = 2, p = 0,111). Während des Versuchs veränderte sich der Blutdruck signifikant (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, F = 16,25, df = 7, p < 0,0001, Tab. 7). Die Gruppen unterschieden sich voneinander (F = 7,26, df = 2, p < 0,01). Die unbehandelten Tiere hatten einen deutlich höheren Blutdruck als die behandelten Tiere, die sich nicht voneinander unterschieden (Tab. 8). Der Blutdruck nahm erst ab und veränderte sich bis zu den Fußschocks nicht mehr signifikant. Unmittelbar nach den Schocks stieg er an und fiel im weiteren Verlauf ab. Dies galt für alle Gruppen. (Abb. 14A).

Gruppe	Zeitfenster (min)	Fisher's LSD,
		Mittlere Differenz
		Signifikanz
Ohne	0-5×5-10	1.94519 ^(*)
Behandlung (C)	0-5×10-15	4.09921**
	10-15×15-20	2.25916*
	20-25×25-30	3.32479**
	25-30×30-35	2.74276**
	25-30×35-40	-0.01514(*)
Kochsalz	0-5×5-10	2.36079*
Behandlung (S)	5-10×20-25	2.44605*
	20-25×25-30	-3.5443**
	25-30×35-40	2.58847*
Thyroxin	0-5×15-20	2.90536**
Behandlung (T)	5-10×15-20	2.69943**
	20-25×25-30	-3.07608**

Tabelle 7: Signifikante Blutdruckveränderung der Gruppen Signifikanzniveau **: p<0.01, *: p<0.05, $^{(*)}: 0,10>p\geq0,05$.

Zeitfenster	(min)						
0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40
Fisher's LS	SD, Mittlere	Differenz, S	Signifikanz				
C×T							
5.082**	C×T	C×T	C×T	C×T	C×T	C×T	C×T
C×S	4.868**	3.763**	3.224**	4.091**	4.048**	2.852**	2.614*
5.756**	C×S	C×S	C×S	C×S	C×S	C×S	C×S
	6.357**	5.555**	2.862**	5.573**	5.353**	4.309**	5.214**

Tabelle 8: Gruppenunterschiede innerhalb der Zeitfenster des Versuchs. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin. Signifikanzniveau **:p<0.01, *: p<0.05.

3.10.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz der Tiere stieg nach ihrer Umsetzung in die Startleapparatur signifikant an (F = 98,769, df = 1, p < 0,000). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (F = 3,846, df = 2, p = 0,068). Während des Versuchs veränderte sich die Herzfrequenz signifikant (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, F = 19,72, df = 7, p < 0,0001). Die Gruppen unterschieden sich nicht voneinander (F = 1,61, df = 2, p = 0,24). Die Herzfrequenz der unbehandelten und der mit Kochsalz behandelten Tiere nahm bis zu den Schocks ab, während die der mit Thyroxin behandelten Tiere sich nicht veränderte. Direkt nach den Fußschocks stieg die Herzfrequenz deutlich an und nahm bei allen Gruppen bis zum Ende des Versuchs ab. (Abb. 14 B, Tab 9).

Gruppe	Zeitfenster (min)	Fisher's LSD,
		Mittlere Differenz
		Signifikanz
Ohne	0-5×10-15	4.08095**
Behandlung (C)	5-10×10-15	2.22764*
	10-15×15-20	2.84735**
	20-25×25-30	-5.18158**
	25-30×30-35	4.52416**
	25-30×35-40	3.84461**
Kochsalz	0-5×10-15	4.22644**
Behandlung (S)	5-10×10-15	2.4969*
	15-20×20-25	2.03173*
	20-25×25-30	-4.68695**
	25-30×30-35	3.03479**
	25-30×35-40	4.43622**
Thyroxin	20-25×25-30	-2.44827*
Behandlung (T)	25-30×30-35	2.28064*
	25-30×35-40	2.66162**

Tabelle 9: Signifikante Herzfrequenzveränderungen der Gruppen Signifikanzniveau **: p<0.01, *:p<0.05.

3.10.3 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Tiere stieg nach ihrer Umsetzung in die Startleapparatur signifikant an (F = 13,514, df = 1, p = 0,006). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (F = 1,108, df = 2, p = 0,376). Während des Versuchs veränderte sich die Körpertemperatur signifikant (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, F = 28,34, df = 7, p < 0,0001). Die Gruppen unterschieden sich nicht voneinander (F = 0,90, df = 2, p = 0,43). Nach den Fußschocks stieg die Körpertemperatur bei allen drei Gruppen an. Die Körpertemperatur stieg bis zum Einsetzen der Fußschocks langsam und nach den Fußschocks schneller an (Abb. 14 C, Tabelle 10).

Gruppe	Zeitfenster (min)	Fisher's LSD,
		Mittlere Differenz
		Signifikanz
Ohne	0-5×5-10	-2.78785**
Behandlung (C)	20-25×30-35	-3.86812**
	20-25×35-40	-4.85271**
Kochsalz	20-25×30-35	-2.9173**
Behandlung (S)	20-25×35-40	-3.76732**
	25-30×30-35	-2.23908*
	25-30×35-40	-3.0891**
Thyroxin	0-5×10-15	-2.23236*
Behandlung (T)	5-10×15-20	-2.20011*
	5-10×20-25	-2.10536*
	20-25×30-35	-3.83471**
	20-25×35-40	-4.35296**
	25-30×30-35	-3.26893**
	25-30×35-40	-3.81351**

Tabelle 10: Signifikante Körpertemperaturveränderungen der Gruppen. Signifikanzniveau **: p<0.01, *:p<0.05.

3.10.4 Schreckreaktion

Bis zu dem Moment, in dem der Fußschock einsetzte, gab es bei keiner Gruppe signifikante Veränderungen der Schreckreaktion. Danach war die Schreckreaktion signifikant erhöht (Abb. 14, Tab. 11).

Gruppe	Zeitfenster (min)	Fisher's LSD,
		Mittlere Differenz
		Signifikanz
Ohne	20-25×35-40	-3.26302**
Behandlung (C)		
Kochsalz	20-25×25-30	-2.29664*
Behandlung (S)	20-25×30-35	-3.01499**
Thyroxin	20-25×25-30	-2.4875*
Behandlung (T)	20-25×30-35	-2.82954**
	20-25×35-40	-3.35821**

Tabelle 11: Signifikante Schreckreaktionsveränderungen der Gruppen Signifikanzniveau **: p<0.01, *: p<0.05.





Abb. 14: Verlauf des Blutdrucks, der Herzfrequenz, der Körpertemperatur und der Schreckreaktion in der Startleapparatur. Die Klammern und die Sterne über den Grafiken zeigen Signifikanzen im Verlauf an. Die Symbole unmittelbar über den Messpunkten zeigen Unterschiede zwischen den Gruppen und den Grad dieser Signifikanz. C: Kontrolle, S: Behandlung mit Kochsalz, T: Behandlung mit Thyroxin.

3.11 Vergleich der verschiedenen Messbedingungen.

Man kann die Bedingungen, unter denen die vegetativen Parameter gemessen wurden, in normale aktive (über Nacht, Abb. 13), eine normale inaktive (vor dem offenen Feld, Abb. 12 A, D, G), zwei unbekannte (offenes Feld und Startle Apparatur, Abb. 12 B, E, H, Abb. 14) und eine normale Situation, allerdings unmittelbar nach einer unbekannten Situation (nach dem offenen Feld, Abb. 12 C, F, I) unterteilen.

Während der normalen aktiven Bedingungen lagen der Blutdruck, die Herzfrequenz und die Körpertemperatur der Gruppen in einem relativ weiten Bereich und die Werte der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tiere stellten die unterste Grenze dar. Im Vergleich dazu näherten sich die Werte unter inaktiven Bedingungen auf dem Niveau der Kochsalz behandelten Tiere einander an. Beide unbekannten Situationen verursachten einen Anstieg der Parameterwerte, wobei sich die Körpertemperatur und der Blutdruck zwischen den beiden unbekannten Situationen unterschieden, es aber keine Unterschiede bezüglich der Herzfrequenz und zwischen den Gruppen gab (Herzfrequenz: Zeit F = 0,447, df = 1, p = 0,523; Gruppe F = 2,238, df = 2, p = 0,169. Körpertemperatur: Zeit F = 7,686, df = 1, p = 0,024; Gruppe F = 1,705, df = 2, p = 0,242. Blutdruck: Zeit F = 11,310, df = 1, p = 0,008; Gruppe F = 3,374, df = 2, p = 0,081). Des Weiteren führten die unbekannten Situationen zu einem divergieren der Werte der Gruppen. Dieser Effekt blieb während der normalen Situation, unmittelbar nach der unbekannten Situation bestehen. Der Vergleich der Blutdruckund Herzfrequenzwerte in der unbekannten Umgebung gegen Ende des Versuchs und im Käfig nach Ende des Versuchs zeigte keine Unterschiede zwischen den Messungen und zwischen den Gruppen (Herzfrequenz: Zeit F = 0,005, df = 1, p = 0,948; Gruppe F = 0,082, df = 2, p = 0,922. Blutdruck: Zeit F = 0,011, df = 1, p = 0,747; Gruppe F = 0,965, df = 2, p = 0,441). Allerdings gab es Unterschiede in der Körpertemperatur zwischen den Messungen, aber nicht zwischen den Gruppen (Körpertemperatur: Zeit F = 20,348, df = 1, p = 0,001; Gruppe F = 1,672, df = 2, p = 0,232). Die Körpertemperatur im Käfig nach dem Ende des Versuchs war höher.

Der Vergleich zwischen den Blutdruck-, Herzfrequenz- und Körpertemperaturwerten gegen Ende der Messungen im Käfig, nach den Tests in einer neuen Umgebung und unmittelbar nach dem Einsetzen der Dunkelheit, also unter normalen aktiven Bedingungen zeigte, dass es keine Unterschiede oder nur einen Trend zu Unterschieden zwischen den Messungen und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gab (Blutdruck: Zeit F = 2,462, df =1, p = 0,143; Gruppe F = 1,604, df = 2, p = 0,283. Herzfrequenz: Zeit F = 3,445, df = 1, p = 0,088; Gruppe F = 1,218, df = 2, p = 0,330. Körpertemperatur: Zeit F = 1,029, df = 1, p = 0,330; Gruppe F = 3,414, df = 2, p = 0,067). Allerdings zeigt der Vergleich zwischen den Blutdruck-, Herzfrequenz- und Körpertemperaturwerten zu Beginn der Messungen im Käfig, nach den Tests in einer neuen Umgebung und unmittelbar nach dem Einsetzen der Dunkelheit, dass es sowohl den Trend zu Unterschieden als auch Unterschiede zwischen den Messungen aber nicht zwischen den Gruppen gab (Blutdruck: Zeit F = 4,832, df = 1, p = 0,048; Gruppe F = 2,019, df = 2, p = 0,175. Herzfrequenz: Zeit F = 4,525, df = 1, p = 0,055; Gruppe F = 1,624, df = 2, p = 0,237. Körpertemperatur: Zeit F = 9,701, df = 1, p = 0,009; Gruppe F = 1,936, df = 2, p = 0,187). Die Tiere waren zu einem Zeitpunkt, an dem sie eigentlich hätten ruhiger sein sollen, erregter als während ihrer aktiven Phase. Dies zeigten die Vergleiche zwischen den Herzfrequenz- und Körpertemperaturwerten im Käfig, vor dem Umsetzen in eine unbekannte Umgebung und unmittelbar nach dem Einsetzen der Dunkelheit, denn es gab signifikante Unterschiede zwischen den Messungen, aber nicht zwischen den Gruppen (Herzfrequenz: Zeit F = 18,949, df = 1, p = 0,001; Gruppe F = 0,421, df = 2, p = 0,667. Körpertemperatur: Zeit F = 18,141, df = 1, p = 0,001; Gruppe F = 1,319, df = 2, p = 0.307). Die Herzfrequenz und die Körpertemperatur waren unmittelbar nach dem Einsetzen der Dunkelheit erhöht. Es gab keine Unterschiede zwischen den Messungen der

Blutdruckwerte und zwischen den Gruppen (Blutdruck: Zeit F=2,040, df =1, p=0,181; Gruppe F=1,349, df =2, p=0,299).
4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung

Die retrograden Tracingexperimente zeigen je nach Injektionsstelle in der Amygdala ein unterschiedliches Muster an fluorogoldmarkierten Zellen im posterioren Thalamus. Das heißt, einzelne Kerne innerhalb des posterioren intralaminaren Komplexes projizieren unterschiedlich zu den Kernen der Amygdala, zu deren Teilbereichen und zu den Subnuklei der erweiterten Amygdala. Darüber hinaus gibt es deutliche topographische Unterschiede im Verteilungsmuster der CGRP exprimierenden thalamischen Projektionsneurone, die zur Amygdala und erweiterten Amygdala projizieren. Dabei hebt sich die AStr als ein besonderes Gebiet hervor, das nicht nur eine ausgeprägte Projektion aus dem posterioren Thalamus erhält, sondern auch mit Abstand den stärksten Eingang aus den CGRP-ir Projektionsneuronen im posterioren Thalamus erhält.

Bezüglich der Telemetrieexperimente kann festgestellt werden, dass während der Tests in der neuen unbekannten Umgebung und der Startleapparatur ein kontinuierliches Ansteigen der Körpertemperatur bei allen drei Gruppen zu beobachteten war. Den höchsten Wert erreichte sie nach den Fußschocks. Blutdruck und Herzfrequenz zeigten einen rapiden Anstieg nach dem Einsetzen in die unbekannte Umgebung und die Startleapparatur, gefolgt von einem kontinuierlichen Sinken. Der Anstieg der ASR Amplitude war verzögert. Unter normalen aktiven Bedingungen zeigten die Thyroxin behandelten Tiere zu Anfang der Messung eine höhere Körpertemperatur als die unbehandelten und mit Kochsalz behandelten Tiere. In der unbekannten Umgebung wiesen die behandelten Tiere den Trend zu einer höheren Körpertemperatur, aber geringerem Blutdruck als die unbehandelten Tiere auf.

Während der Tests in der Startleapparatur unterschied sich die Körpertemperatur nicht zwischen den drei Gruppen, allerdings lag der Blutdruck der unbehandelten Tiere deutlich über dem der behandelten Tiere. Der Verlauf von Blutdruck und Herzfrequenz war stets gleich.

4.2 Technische Erwägungen

4.2.1 Retrogrades Tracing

Für die retrograde Darstellung von Neuronenpopulationen steht eine Reihe von Markierungssubstanzen zur Verfügung. Fluorogold ist eine verlässliche und ausschließlich retrograd transportierte Tracersubstanz (Schmued und Fallon, 1986). Die iontophoretische Applikation von Fluorogold führt zu kleinen Injektionsstellen, abhängig von der Stromstärke und dem Durchmesser der Injektionskanüle (Pieribone und Aston-Jones, 1988; Schmued und Heimer, 1990). Zudem bleibt der Tracer nach der Aufnahme in die Zelle stabil und ist selbst noch nach einem Jahr nachweisbar (Divac und Mogensen, 1990).

Für diese Studie wurden Kanülen mit Spitzendurchmessern von 25-42,5 µm und soweit möglich 5µA Stromstärke verwendet. Dieses Vorgehen führt zu kleinen nekrotischen Stellen und vergleichsweise kleinen Arealen, welche die tatsächliche Aufnahmezone darstellt (Schmued und Fallon, 1986).

Die verwendete Iontophoresetechnik liess unsere Injektionen relativ klein bleiben und ermöglichte es uns, geringe Mengen Tracer zu applizieren. Dieses ist nötig, um die Injektion möglichst innerhalb auch kleiner Kerngebiete zu platzieren, ohne die Nachbarareale zu kontaminieren und damit die Selektivität der Injektion aufzuheben. Um eine derartige Präzision der Injektionsstelle zu erreichen, wurde in Kauf genommen, dass gelegentlich nur wenige Neurone markiert wurden, was auch ein Grund für weniger doppelt markierten Zellen sein kann. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass trotz der relativ einheitlichen Größe der Injektionsstellen, die Anzahl der retrograd markierten Neurone zwischen sehr wenigen bis hin zu über 1000 Zellen schwankte, und dass in den meisten Fällen deutliche topographische Unterschiede in der Position markierter Neurone vorlagen. Eine weitere Quelle der Variabilität in der Darstellung der markierten Neurone war die Verstopfung der Mikropipetten, die die Innenbeschichtung verhindern sollte. Dies wurde durch eine Reduktion der Stromstärke teilweise kompensiert (siehe Tabelle 1). Auch in diesen Fällen gelang es, zahlreiche Neurone im posterioren Thalamus retrograd zu markieren (z.B. HAN44). Darüber hinaus gab es keine absolute Sicherheit, ob der komplette Kern befüllt und somit die gesamte Population der Projektionsneurone markiert wurde. Deshalb ist die absolute Anzahl der markierten Zellen, auch bei Injektionen in relativ kleine Areale wie die AStr, möglicherweise höher als in dieser Arbeit gezeigt wurde. Momentan ist es nicht möglich, einen Kern vollends mit Tracer zu befüllen ohne dessen Grenzen zu überschreiten.

4.2.2 Messung vegetativer Parameter

Die Verwendung der Telemetriesonden hatte den Vorteil, dass die Tiere in ihrer Beweglichkeit nicht behindert wurden, da die Implantate keine Durchtrittsstellen durch die Haut für Anschlüsse an Messgeräte hatten, sondern die Daten mittels Funk übermittelt wurden. Dadurch gab es zudem auch keine permanent offenen Wunden. Es konnten mehrere vegetative Parameter gleichzeitig erfasst werden. Die OP stellte eine extreme Belastung für die Tiere dar. Durch die OP hatten die Tiere bereits Erfahrungen mit extremen unbekannten Situationen und es ist denkbar, dass diese Erfahrungen sich auf das Verhalten in den Testsituationen auswirkten. Deshalb war es ratsam, unbehandelten Tieren ebenfalls Telemetriesonden zu implantieren, mit ihnen die Tests durchzuführen und deren Ergebnisse mit zu vergleichen. Die Implantation des Blutdruckmesskatheters in die Aorta war der risikoreichste Schritt bei der OP, funktionierte sie nicht auf Anhieb, war die Überlebenschance gering. Einige Tiere starben bei der OP, die meisten davon an Blutungen aus der Aorta. Nach der OP sind die Tiere einzeln gehalten worden, dies kann auch Auswirkungen auf das Verhalten der sonst in Sozialverbänden lebenden Tiere gehabt haben.

4.3 Topographie der thalamo-amygdalären Projektionen

Der posteriore intralaminare Komplex besteht aus dem Nucleus suprageniculatus (SG), Nucleus intralaminaris posterioris thalami (PIN) und dem Nucleus peripeduncularis (PP). Er empfängt konvergente Projektionen vom externen Kortex des Colliculus inferior, der tiefen Schicht des Colliculus superior und aus dem Rückenmark (LeDoux et al., 1987; Linke, 1999; Yasui et al., 1990). Deshalb ist es ein Areal der akustischen und somatosensorischen Integration (Bordi und LeDoux, 1994a; Bordi und LeDoux, 1994b; Hicks et al., 1984; Wepsic, 1966) und hat möglicherweise Einfluss auf die beobachtete neuronale Plastizität in dieser Region zur Assoziation beider Eingänge. Allerdings empfängt jeder einzelne Kern innerhalb dieses Komplexes ein einzigartiges Muster von Projektionen. Es scheint, als sei jeder der thalamischen Kerne dieses Komplexes hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, mit einer einzelnen sensorischen Modalität befasst. Somit ist dieses Areal der Ausgangsort für parallele, multimodale und unimodale sensorische Informationen zur Amygdala (Linke, 1999). Die vorliegende Arbeit bestätigt Befunde, dass sich die einzigartigen Pfade und Projektionsmuster bis in die Amygdala fortsetzen.

4.4 CGRP in Projektionen vom Thalamus

Die hier dargestellte Topographie der thalamo-amygdaloiden durch FG markierten Pfade stimmt im Allgemeinen mit früheren Publikationen überein (Dobolyi et al., 2005; Inagaki et al., 1990; Kubota et al., 1991; Linke et al., 2000; Yasui et al., 1991b), obwohl auch erwähnenswerte Unterschiede im Hinblick auf Details der Projektionen bestehen. Yasui et al. (1991) markierten durch intra-amygdaläre Fluorogoldinjektionen Neurone der kaudalen intralaminaren thalamischen Kerne. Die Muster der markierten Projektionsneurone unterschieden sich nicht sehr voneinander. In der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich die Projektionsmuster der fluorogoldmarkierten Projektionsneurone jedoch deutlich voneinander in Abhängigkeit von den getroffenen Amygdalakernen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Fluorogoldinjektionen in die AStr, La und CeM markierten Neurone im gesamten posterioren intralaminaren thalamischen Komplex, wobei die meisten Neurone durch Injektionen in die AStr markiert wurden. Tracerinjektionen in den IPAC und das ventro-kaudale CPu markierten Neurone in den rostralen zwei Dritteln des posterioren intralaminaren thalamischen Komplexes, dabei war ihr Auftreten im kaudalen Bereich des mittleren Drittels, auf das mediale Gebiet des intralaminaren posterioren thalamischen Komplexes beschränkt. Injektionen in den LGP, CeC, CeL und ventro-rostrale CPu markierten nur wenige Zellen. Im Gegensatz zu dieser Untersuchung fanden Yasui et al. (1991) zahlreiche markierte Neurone nach Injektionen in die CPu. Dieser Unterschied beruht eventuell auf unterschiedlichen Injektionsstellen. Yasui und seine Mitarbeiter injizierten in den kaudo-lateralen Bereich der CPu, während für diese Studie in den rostro-medialen Teil injiziert wurde. Von den drei durchgeführten Injektionen in die CPu zeigten sich retrograd markierte Neurone nur bei der Injektion, die der AStr am nächsten lag. Das durch die markierten Neurone im posterioren Thalamus gebildete Muster schien mit den Beobachtungen Yasui's und seiner Ko-Autoren überein zu stimmen (1991). Bei ihrer Untersuchung der thalamischen CGRP-ir Projektionen zur Amygdala und dem CPu mittels Fluorogoldinjektionen fanden Yasui et al. (1991) überlappende Areale markierter Neurone im Thalamus. Ihrer Meinung nach könnten diese Gemeinsamkeiten eventuell durch Fluorogold, welches die Grenze zwischen beiden Kernen überschritten hatte, verursacht worden sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Vermutung.

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine hohe Dichte von CGRP-ir Fasern und Terminalien im IPAC, AStr, CeC, CeL und dem CPu beobachtet werden. Eine geringere Dichte an CGRP-ir Fasern und Terminals fanden sich im MEA, LA und CeM. Dies stimmt mit den Beobachtungen früherer Untersuchungen überein (Dobolyi et al., 2005; Haring et al., 1991; Harrigan et al., 1994; Honkaniemi et al., 1990; Kawai et al., 1985; Kruger et al., 1988; Schwaber et al., 1988; Shimada et al., 1989; Yasui et al., 1991b). Es wurden keine CGRPpositiven Neurone in der Amygdala gefunden. Quellen der CGRP-ir Fasern und Terminalien in den zuvor erwähnten Kernen waren CGRP-ir Zellen des posterioren thalamischen Komplexes und der Nuclei parabrachiales. Dies wurde auch von Inagaki et al. (1990), Kubota et al. (1991), Yasui et al. (1991) und Dobolyi et al. (2005) gezeigt.

4.5 Funktion thalamischer CGRP-Projektionen

Bei Furchtkonditionierungsversuchen führten intra-amygdaläre CGRP-Injektionen auch ohne einen aversiven Stimulus zu furchtassoziiertem Verhalten. Sowohl CGRP als auch dessen Rezeptorantagonist hCGRP (8-37) verminderten das durch den konditionierten Kontext hervorgerufene Erstarren (Freezing). Vor den Tests durchgeführte hCGRP(8-37)-Injektionen schwächten die durch den konditionierten Ton hervorgerufen Starre ab. Das weist auf eine Beteiligung des CGRP bei der Verknüpfung von Tönen mit Schmerz hin (Kocorowski and Helmstetter, 2001). Die Injektionen jener Studie befanden sich nahe der Grenze zur AStr. Eventuell wurde der Effekt, welcher dem CGRP im lateralen Kern der Amygdala zugeschrieben wurde, durch CGRP in den dichten Fasern und Terminalien der AStr hervorgerufen. Es gibt viele nozizeptive Neurone in der AStr (Bernard et al., 1992) und die AStr projiziert, wie auch der CeA, hauptsächlich zur Substantia innominata (Bourgeais et al., 2001). Eventuell spielt die Projektion des PoT zur AStr eine wichtige Rolle bei der aversiven emotionalen und autonomen Komponente von Schmerz (Gauriau und Bernard, 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass 50 % der CGRP-ir Neurone des PIN zur AStr projizieren. Dies weist darauf hin, dass diese Region ein Hauptzielgebiet für Neurone des posterioren Thalamus ist.

Nguyen et al. (1986) zeigten, dass CGRP-Mikroinjektionen in den zentralen Kern der Amygdala die Herzfrequenz und den Blutdruck bei anästhesierten Ratten steigerten. Xu et al. (2003) beobachteten, dass CGRP-Injektionen in den zentralen Kern der Amygdala das Zurückziehen der Hinterpfoten nach einem nozizeptiven Stimulus verzögerte. Diese Verzögerung verschwand nach einer Injektion von hCGRP (8-37), was den antinozizeptiven Effekt des CGRP unterstrich. CGRP innerhalb der Amygdala wirkt sowohl anxiogen als auch antinozizeptiv. Dies ist eine sinnvolle Kombination, da es überlebenswichtig ist, in einer lebensbedrohlichen Situation reagieren zu können, ohne durch Schmerzen behindert zu werden. Eine solche Kombination ist innerhalb der Hypothalamo-hypophysärenadrenokortikalen Stressachse bekannt, bei der die Stimulation der Nebennierenrinde durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) mit der Freisetzung endogener Opiate einhergeht (Herman et al., 2003).

Doch wie spezifisch ist die Information über den nozizeptiven Stimulus, der die Amygdala erreicht? Der nozizeptive Pfad vom Rückenmark über PoT zum S2/insulären Kortex, den Gauriau und Bernard (2004) erwähnen, beinhaltet auch Projektionen vom PoT zur AStr. Diese Pfade beinhalten Informationen, die von nicht spezifischen nozizeptiven und taktilen Neuronen weitergeleitet werden. Möglicherweise übermittelt einer der anderen Kerne des posterioren intralaminaren Komplexes des Thalamus nozizeptive spezifische Signale. Für die posterioren intralaminaren Kerne gibt es verschiedene Gliederungsvorschläge. Während Paxinos und Watson (1997) sie in einen posterioren triangulären thalamischen Kern (PoT) und einen posterioren intralaminaren Kern (PIL) aufteilen, gibt es dort für Swanson nur den posterioren intralaminaren Kern (PIN). Letzteres wird durch diese und andere Arbeiten, die zeigen, dass PoT und PIL zu denselben Zielen projizieren, gestützt (LeDoux et al., 1985; LeDoux et al., 1990b; Linke, 1999). Ist ein nozizeptives, spezifisches Signal wichtig für konditioniertes, aversives Verhalten, verursacht durch einen konditionierten Stimulus? Die am häufigsten verwendeten unkonditionierten Stimuli bei Konditionierungsexperimenten sind Fußschocks. Das durch einen Fußschock hervorgerufene Empfinden wird anders als die Empfindungen von Kniffen oder der Temperatur weitergeleitet. Gauriau und Bernard (2004) untersuchten die Reaktion von nozizeptiven spezifischen, nicht nozizeptiven unspezifischen und taktilen Neuronen auf transkutane elektrische Stimulation. Sie beobachteten, dass alle drei Typen reagierten und einige nozizeptive, nicht spezifische und taktile Neurone zur AStr und zum insulären Kortex projizieren, aber nicht zum lateralen oder zentralen Kern der Amygdala. Es ist unbekannt, ob diese Neurone CGRP enthalten. Es gibt nozizeptive Neurone im zentralen Kern der Amygdala und in der AStr (Bernard et al., 1992). Beide Kerne werden zudem von separaten Neuronenpopulationen, die sich in den Nuclei parabrachiales befinden, innerviert. Deshalb werden sie als Teil des Lamina 1-parabrachialen-amygdaloiden nozizeptiven Pfades angesehen (Bernard et al., 1993; Bernard und Besson, 1990; Sarhan et al., 2005). CGRP-immunreaktive Terminalien im CeA stehen in Verbindung mit Enkephalin-, CRF-, und Neurotensin enthaltenden Dendriten und Somata (Harrigan et al., 1994; Honkaniemi et al., 1990; Ju, 1991; Kozicz und Arimura, 2001; Shimada et al., 1992). Diese Neurone projizieren zum PAG (Gray und Magnuson, 1992). Sie aktivieren eventuell die absteigenden inhibitorischen Pfade zum dorsalen Horn und könnten vergleichbar mit dem Neurotensin freisetzenden Analgesiesystem im ventralen periaquäduktalen Grau (PAG) sein, das durch Stimulation des basolateralen Nukleus der Amygdala aktiviert wird (Tershner und Helmstetter, 2000). Die Entdeckung, dass Überexpression von Preproenkephalin im CeA Antinozizeption induziert, weist in diese Richtung (Kang et al., 1998).

Die zuvor erwähnten aufsteigenden Pfade, der spinale-PoT-S2/insulärer Kortex/AStr nozizeptive Pfad und der Lamina 1-parabrachiale-amygdaloide nozizeptive Pfad, haben miteinander gemein, dass beide nozizeptive Inputs weiterleiten. Sie unterscheiden sich hauptsächlich durch die weiteren Modalitäten, die sie weiterleiten. Der spinale/dorsale Säule-PoT- S2/insulärer Kortex/AStr Pfad leitet zusätzlich überwiegend durch akustische Stimulation hervorgerufene Signale. Daher wird vermutet, dass er an der Akquisition, Wiedererkennung und der Bedeutung gefährlicher und schädlicher Stimuli, kombiniert mit Geräuschen, beteiligt ist.

Der spino-parabrachio-amygdaloide Pfad kann in einen spinalen- PPB-CeL/dorsale BSTL und einen spinalen- PPB-CeC Pfad unterteilt werden (Alden et al., 1994; Bernard et al., 1992; Bernard et al., 1993; Bernard et al., 1996; Bernard und Besson, 1990; Gauriau und Bernard, 2002). Der erste Pfad scheint mit autonomen Gegebenheiten befasst zu sein und der zweite Pfad mit Nozizeption. Fasern des PPB-CeC-Pfades projizieren zusätzlich zur AStr. Es wird angenommen, dass diese Pfade dazu beitragen, autonome Prozesse zu modulieren, um sie an bedrohliche Stimuli anzupassen (Bernard et al., 1993; Sarhan et al., 2005). Nichtsdestoweniger zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass die AStr ein Areal ist, welches viele Projektionen aus dem posterioren Thalamus erhält und dass der posteriore Thalamus eine Hauptquelle des CGRP in dieser Region ist, wohingegen die beiden direkt benachbarten Kerne CeC und der CeL kein CGRP aus dem posterioren Thalamus erhalten. Sollte CGRP aus dem posterioren thalamischen Komplex eine Rolle bei der Akquisition und Expression von angstassoziiertem Verhalten spielen, dann wird es jenes aus den Fasern und Axonterminalien innerhalb der AStr sein. AStr und CeA haben ähnliche Afferenzen und Efferenzen. Der CeA ist aufgrund seiner Projektionen in die Regelkreise der vegetativen Parameter eingeschaltet und somit in der Lage, diese zu beeinflussen. Die Betrachtung dieser Regelkreise könnte weitere Informationen über die Funktion der AStr und des CGRP liefern.

4.6 Projektionen des CeA und seine Rolle bei vegetativen Funktionen

4.6.1 Projektionen vom CeA zum Nucleus tractus solitarius (NTS)

Retrograde und anterograde Tracerstudien zeigen, dass der CeA zum NTS projiziert (Danielsen et al., 1989; Hopkins und Holstege, 1978; Krettek und Price, 1978; Schwaber et al., 1982; van der Kooy et al., 1984; Wallace et al., 1992). Elektrophysiologische Studien zeigen, dass eine Stimulation des NTS zu einer verminderten Aktivität von CeA Neuronen führt (Rogers und Fryman, 1988). Zudem induziert eine elektrische Stimulation des CeA c-fos Immunreaktivität im NTS (Petrov et al., 1996).

Mikroinjektionen von GABA in den NTS von Ratten und Katzen führen zu einem Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks (Bousquet et al., 1982; Kubo und Kihara, 1987), eine Reaktion ähnlich jener, die durch Stimulation des CeA zu beobachten ist. So beeinflusst der CeA womöglich direkt den Barorezeptorreflex zur Kontrolle des Blutdrucks auf der Ebene des NTS (Saha, 2005).

Der NTS, welcher in der dorsalen Medulla liegt, erhält afferente Fasern aus verschiedenen visceralen Organen, unter anderem den arteriellen Baro- und Chemorezeptoren in den Blutgefässen und dem Herzen. Somit ist der NTS eine wichtige Integrationsstelle verschiedener visceraler Reflexe wie dem Barorezeptorreflex. Der NTS projiziert zu cholinergen parasympathischen Neuronen, welche im Nucleus dorsalis nervi vagi und dem Nucleus ambiguus liegen, wie auch zu einer Gruppe inhibitorischer Neurone in der kaudalen ventrolateralen Medulla (CVLM). Diese wiederum projizieren zu tonisch aktiven sympathoexzitatorischen Neuronen in der rostralen, ventro-lateralen Medulla (RVLM). Barosensitive Neurone des RVLM projizieren zu sympathischen präganglionären Neuronen im Nucleus intermediolateralis der Columnae griseae (IML), die an der vegetativen Kontrolle des Herzens, der Nieren und der meisten Gefäße, mit Ausnahme der die Haut versorgenden

Gefäße, beteiligt sind (Chalmers et al., 1994; Dampney, 1994). Eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks in der Peripherie wird von Barorezeptoren in den Karotiden und dem Aortenbogen detektiert. Diese aktivieren Neurone des NTS über Äste des N. vagus und des N. glossopharyngeus. Die Aktivierung der NTS Neurone stimuliert inhibitorische Neurone des CVLM, welche die Aktivität der RVLM Neurone abschwächen, dies führt zu einer Reduktion der sympathischen Aktivität und einem Abfall des Blutdrucks (Chalmers et al., 1994; Dampney, 1994).

Einige Neurone des CeA, die zum NTS projizieren, enthalten Somatostatin, Neurotensin und den Corticotropin-releasing Faktor (Gray und Magnuson, 1987; Higgins und Schwaber, 1983). Durch immunhistochemische Untersuchungen und mittels in-situ-Hybridisierungen wurde gezeigt, dass der CeA eine große Anzahl GABAerger bzw. Glutamatdecarboxylase mRNA exprimierender Zellen (GABA synthetisierendes Enzym) besitzt (McDonald und Augustine, 1993; Nitecka und Ben Ari, 1987; Pare und Smith, 1993; Pitkanen und Amaral, 1994). Axonterminalien im NTS, welche durch die Injektion von agglutininkonjugierter Meerrettichperoxydase in den CeA anterograd markiert wurden, zeigen GABA-Immunreaktivität (Jia et al., 1997). Dies ist ein weiterer Beweis, dass Projektionen vom CeA GABAerge Synapsen mit Neuronen überall im rostro-kaudalen Bereich des NTS bilden (Saha et al., 2000), besonders in den kommisuralen, medialen, ventralen und ventrolateralen Subnuklei. Das sind Areale, von denen bekannt ist, dass sie kardiovaskulärer Afferenzen aus dem Karotissinus, den Barorezeptoren der Aorta und Rezeptoren des Herzens erhalten (Loewy und Spyer, 1990). Ableitungen von NTS Neuronen in Gewebeschnitten von Ratten zeigen, dass NTS Neurone, die auf eine Stimulation des Tractus solitarius reagieren, durch die Applikation von GABA inhibiert werden (Feldman und Felder, 1991). Darüber hinaus führt die iontophoretische Applikation von GABA in Areale des NTS, die vagale Afferenzen aus dem Herzen empfangen, ebenfalls zur Inhibition der Neurone des NTS (Bennett et al., 1987). Diese Inhibition schaltet eventuell die inhibitorischen Inputs vom CVLM zum RVLM aus, wodurch RVLM Neurone aktiv werden, was zu einer verstärkten sympathischen Aktivität und somit zu einem Anstieg des Blutdrucks und der Herzfrequenz führt (Saha, 2005).

4.6.2 Projektionen des CeA zur RVLM

Eine weitere Hirnstammprojektion, von der angenommen wird, dass sie wichtig für die Regulation des Blutdrucks sei, ist die direkte Projektion zur RVLM (Takayama et al., 1990; Thompson und Cassell, 1989; Wallace et al., 1992). Die RVLM Neurone sind die hauptsächliche Quelle der absteigenden Bahn zu den symphatischen vasomotorischen Neuronen im Rückenmark (Dampney, 1994; Dampney und Horiuchi, 2003). Eine kleine Population von Amygdalaefferenzen scheint Synapsen mit catecholaminergen Neuronen des RVLM auszubilden (Wallace et al., 1992). Die C1 catecholaminergen Zellen befinden sich in der blutdruckregulierenden Region des RVLM und viele dieser C1 Zellen projizieren in die intermediolaterale Zellsäule des Rückenmarks (Ross et al., 1981; Ross et al., 1983). Elektrische Stimulation des CeA verursacht Aktivität in Neuronen des RVLM (Gelsema et al., 1987). Sowohl elektrische als auch chemische Stimulation des CeA führen zur Expression des Proteins c-fos (Petrov et al., 1995; Petrov et al., 1996; Salome et al., 2001). Diese direkten Projektionen aktivieren eventuell RVLM Neurone, welche die Aktivität sympathischer Nerven mittels ihrer Projektionen zu präganglionären sympathischen Neuronen im Rückenmark beeinflusst. Ein Neurotransmitter, der in diesen Pfad vom CeA zu RVLM Neuronen involviert ist, scheint Glutamat zu sein (Miura et al., 1991; Ross et al., 1984).

4.6.3 Projektionen des CeA zum Hypothalamus

Der CeA projiziert zum Nucleus dorsomedialis hypothalami (DMH), dem Nucleus perifornicalis, der Area hypothalamica lateralis, dem Nucleus supramammillaris und dem Nucleus paramammillaris. Die Aktivierung der Neurone des DMH durch Mikroinjektion exzitatorischer Aminosäuren oder des GABA-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin verursacht einerseits einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz (De Novellis et al., 1995; Soltis und DiMicco, 1991; Soltis und DiMicco, 1992), und andererseits hämodynamische, neuroendokrine, gastrointestinale und Verhaltensveränderungen, die Reaktionen bei akutem emotionalen Stress ähneln (Greenwood und DiMicco, 1995). Weiterhin führt eine Inhibition der Neurone im DMH zu einer deutlichen Reduktion des durch Stress hervorgerufen Blutdruck- und Herzfrequenzanstiegs (Stotz-Potter et al., 1996).

Die absteigenden Projektionen des DMH zum Hirnstamm sind im Vergleich zu den intrahypothalamischen Projektionen des DMH klein (Thompson et al., 1996). Eines der Hauptziele dieser Projektionen ist der Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN), insbesondere sein parvozellulärer Teil (ter Horst und Luiten, 1986; Thompson et al., 1996). Dieser Teil des PVN ist die größte Quelle der direkten Projektionen zu den sympathischen präganglionären Kernen des Rückenmarks, der RVLM und des NTS (Dampney and Horiuchi, 2003; Swanson und Kuypers, 1980). Dennoch scheint die durch den DMH hervorgerufene sympathoexzitatorische Antwort von Synapsen im PVN unabhängig zu sein (De Novellis et al., 1995; Stotz-Potter et al., 1996). Neurone des DMH projizieren zur CVLM (ter Horst und Luiten, 1986; Thompson et al., 1996). Der DMH projiziert auch noch zur Substantia grisea centralis (PAG), die in die kardiovasculäre Kontrolle eingebunden ist (ter Horst und Luiten, 1986; Thompson et al., 1996). Alle diese Regionen beinhalten Neuronen, die direkt zum RVLM projizieren (Dampney, 1994), weshalb sie auch als Relaiskerne im absteigenden sympathoexzitatorischem Pfad des DMH betrachtet werden können. Allerdings scheint der NTS nicht die hauptsächliche Komponente des absteigenden Pfades zu sein, der die kardiovasculäre Antwort auf die Disinhibition des DMH vermittelt (Fontes et al., 2001).

Der Output des PAG spielt eine zentrale Rolle bei der Generierung des Freezing und des Fluchtverhaltens (Bandler und Shipley, 1994; Carrive, 1993; Fanselow und Kim, 1994). Die elektrische Stimulation der Amygdala verursacht Verteidigungsreaktionen, die durch Läsion des PAG verhindert werden (Hunsperger, 1956). Bei wachen Tieren verursacht die Stimulation des PAG viscerale und somatische Veränderungen, wie das Ansteigen des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz, die Vasodilatation in den Muskeln der Hinterläufe, Vasokonstriktion in visceralen Organen wie z.B. der Niere, Hyperkapnie und Tachypnoe, Exophthalmus, Mydriasis, Zucken der Vibrissen und Retroflexion des Schwanzes, die charakteristisch für Verteidigungsreaktionen sind (Hilton und Redfern, 1986; Jansen et al., 1995a; McDougall et al., 1985). Das PAG ist gegliedert in vier longitudinal orientierte funktionelle Säulen. Chemische Stimulation der lateralen Säule triggert Flucht, Tachykardie und Hypertension, während Injektionen exzitatorischer Aminosäuren in die ventrolaterale Säule den gegensätzlichen Effekt verursachen (Carrive und Bandler, 1991a; Carrive und Bandler, 1991b). Das PAG ist imstande, sympathische Funktionen zu modulieren. Dies geschieht über eine Serie von indirekten Pfaden, die im Hypothalamus, Pons und der Medulla liegen. Jede dieser sympathischen Prämotorregionen projiziert zum IML (Dampney, 1994). Der hauptsächliche Pfad des PAG beinhaltet Relaiskerne in der rostralen ventrolateralen Medulla (RVLM) und der rostralen ventromedialen Medulla (RVMM) (Farkas et al., 1997). Ebenso wie der CeA innerviert das PAG adrenerge Neurone der C1 Gruppe in der RVLM, die an der kardiovasculären Kontrolle (Carrive et al., 1988; Carrive and Bandler, 1991b; Chen und Aston-Jones, 1995; Reis et al., 1989) und der Regulation weiterer autonomer Funktionen beteiligt sind (Haxhiu et al., 1993; Loewy et al., 1994; Strack et al., 1989). Die Hauptprojektionsgebiete des PAG innerhalb des RVMM sind die sympathischen Prämotorneurone des Nucleus raphe magnus und des Nucleus gigantocellularis reticularis, pars alpha. Der Nucleus raphe magnus ist der Ursprungsort einer absteigenden inhibitorischen Schmerzbahn (Fields et al., 1991) und moduliert sympathische Funktionen (Basbaum et al., 1978; Minson et al., 1987). Der Nucleus raphe magnus ist in der Lage, Informationen über direkte Projektionen zum IML (Basbaum et al., 1978) oder über einen indirekten Pfad zum dorsalen Horn des Rückenmarks weiterzuleiten, welches wiederum sympathische Interneurone enthält und in die Verarbeitung sensorischen Inputs involviert ist (Cabot et al., 1994; Craig, 1991; Jansen et al., 1995b; Kwiat und Basbaum, 1992). Weitere indirekte Pfade verlaufen über Projektionen zu C1 adrenergen Neuronen (Nicholas und Hancock, 1990), oder den Projektionen zu A5 noradrenergen Neuronen (Clark und Proudfit, 1991). Beide, A5 noradrenerge Neurone und C1 adrenerge Neurone, projizieren direkt zum IML. So könnten chemische Stimulationen des Nucleus raphe magnus eine zentrale Inhibition oder schlechtere Bahnung eines zentralen sympathoexzitatorisch Pfades (beispielsweise C1 bulbospinale Neurone) und/oder die Erregung eines zentralen sympathoinhibitorischen Systems (beispielsweise A5 bulbospinale Neurone) verursachen (Farkas et al., 1997).

4.6.5 Projektionen des CeM zu den Nuclei parabrachialis

Jeder der dreizehn Nuclei parabrachiales ist assoziiert mit einem einzigartigen Satz von Afferenzen, Efferenzen und Neurotransmittern (Chamberlin und Saper, 1992; Fulwiler und Saper, 1984; Moga et al., 1990). Elektrische und chemische Stimulationen des lateralen Randes des externen lateralen Nucleus und des dorsalen lateralen Subnucleus (Chamberlin und Saper, 1992) führen zu einer Vielfalt von kardiovasculären Reaktionen, hervorgerufen durch Projektionen zum RVLM und zu den ventrolateralen und intermedialen Teilen des NTS (Chamberlin und Saper, 1992; Chamberlin und Saper, 1994). Der Kölliker-Fuse Subnukleus, welcher den weit ventrolateral liegenden Bereich des parabrachialen Komplexes einnimmt, innerviert die sympathische präganglionäre Säule des Rückenmarks, den Nucleus ambiguus, den ventrolateralen und den intermedialen Subnucleus des NTS, den Nucleus reticularis rostroventrolateralis (RVL) und weiter kaudal gelegene Bereiche der ventrolateralen medullären Formatio reticularis (Fulwiler und Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Saper und Loewy, 1980).

Andererseits gibt es auch topographisch organisierte Projektionen vom parabrachialen Kern zum CeA. Der äußere Teil des externen lateralen Nucleus projiziert zum CeL. Der innere Bereich des externen lateralen Subnucleus und angrenzende ventro-laterale und mittlere Subnuclei projizieren zum CeM und der angrenzenden Substantia innominata. Von den äußeren medialen Subnuclei projiziert der extrem lateral gelegene Subnukleus am stärksten zum CeC. Viele dieser Neurone enthalten CGRP (Schwaber et al., 1988; Shimada et al., 1985; Yasui et al., 1991b). Einige dieser CGRP-ir Neurone haben Kontakt zu CRF-positiven Zellen (Harrigan et al., 1994), die wiederum über Projektionen zum PAG eine zentrale Rolle bei der Generierung des Freezings (Bandler and Shipley, 1994; Carrive, 1993; Fanselow and Kim, 1994), und über Projektionen zum Nucleus reticularis pontis kaudalis eine furchtpotenzierte Schreckreaktion bedingen (Davis et al., 1982; Lee et al., 1996). Die Nuclei parabrachiales kontrollieren die Respiration (von Euler et al., 1976), wohingegen der Nucleus dorsalis nervi vagi und der Nucleus ambiguus die parasympathischen Veränderungen wie Bradykardie und respiratorische Sinusarhythmie kontrollieren (Porges, 1995).

4.7 Modifikationen des furchtassoziierten Verhaltens

Die hier vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass vegetative Antworten auf emotionale Stimuli nicht nur durch neonatale vorübergehende Hyperthyreose, sondern auch durch den Umgang mit den Tieren beim Injizieren der Substanzen modifiziert wurden. Dies zeigen die vegetativen Parameter der mit Thyroxin und Kochsalz behandelten Tiere, deren Messwerte wichen im statistischen Vergleich weniger deutlich voneinander ab als von den Messwerten der unbehandelten Tiere. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Beobachtung geben, dass kurze, wiederholte Separation von der Mutter zu Unempfindlichkeit gegenüber späterem Stress geführt hat, wohingegen längere Perioden der Trennung die spätere Stressempfindlichkeit steigerte (Levine et al., 1993; Meaney et al., 1993). Möglicherweise waren die Injektionen eine Art Kurzzeitdeprivation, die zu Unempfindlichkeit gegen Stress geführt hat. Daher erscheint es mir ratsam, microosmotische Pumpen oder ähnliche subkutan implantierbare Systeme, die schnell einzubringen sind und kontinuierlich Substanzen abgeben, zu verwenden, um nicht wiederholt die Neugeborenen von der Mutter zu trennen. Unkontrollierter Stress führt bei jungen Affen zu einem andauernd höheren CRF- Spiegel im Liquor bis ins hohe Alter (Coplan et al., 1996). Von der Mutter benachteiligte junge Ratten

haben eine höhere CRF-mRNA Expression im Hypothalamus und CeM. Gesteigerte Corticosteron-Spiegel, hervorgerufen durch maternale Deprivation, haben Langzeitauswirkungen auf die Entwicklung des Gehirns und des Verhaltens (Levine et al., 1993; Meaney et al., 1993). Obwohl sich bei den adulten Tieren die Corticosteron-Spiegel vernachlässigter Ratten nicht von denen normaler Ratten unterscheiden, ist die überspitzte Angstbereitschaft lange anhaltend. Überspitzte Angst ist bei Affen mit einem hohen Kortisol-Spiegel verknüpft (Champoux et al., 1989; Kalin et al., 1998). Corticosteroninjektionen potenzieren die konditionierte Furcht von Ratten (Corodimas et al., 1994). Peripher verabreichte Glucocorticoide, Glucose und Adrenalin können das Gedächtnis und die Festigung der Erinnerungen bei verschiedenen Lernversuchen potenzieren und die Auslöschung konditionierter Reaktionen verzögern (Gold und Stone, 1988; Izquierdo et al., 1993; McGaugh et al., 1993; Roozendaal et al., 1997). Eine Adrenalektomie verringert die Kontext-konditionierte Furcht bei Ratten (Pugh et al., 1997) und adrenerge Antagonisten beeinträchtigen bevorzugt die Erinnerung erlernten Verhaltens (McGaugh et al., 1993), wobei der Einfluss auf emotionale (aversive) Erfahrungen größer zu sein scheint (Cahill et al., 1994). Glucocorticoidrezeptor Agonisten und Antagonisten, injiziert in den BLA, modulieren die Speicherung von Erinnerungen (McGaugh et al., 1993; Roozendaal et al., 1997). Injektionen noradrenerger Antagonisten in die Amygdala blockieren die Effekte nach peripherer Adrenalinapplikation, die das Erinnerungsvermögen potenzieren. GABA und Acetylcholin modulieren ebenfalls das von der Amygdala gesteuerte emotionale Gedächtnis (McGaugh et al., 1993). Die Expression von CRF und dessen mRNA im CeM und BSTL werden durch periphere Corticosteronapplikation positiv beeinflusst, während die CRFmRMA Expression im paraventriculären Kern des Hypothalamus abnimmt (Makino et al., 1994; Swanson und Simmons, 1989; Watts und Sanchez-Watts, 1995). Die Regulierung der CRF-Rezeptoren im Hypothalamus, der Amygdala und des BSTL reagiert möglicherweise unterschiedlich sensitiv auf Corticosteron (Makino et al., 1994; Makino et al., 1995). CRF spielt eine entscheidende Rolle bei Angst und pathologischer Furcht in extrahypothalamischen und hypothalamischen Hirnregionen (Koob et al., 1993). CRF-Injektionen in den BSTL und nicht in die Amygdala, das Septum oder den ventralen Hippocampus führen zu einer Potenzierung der Schreckreaktion (Lee und Davis, 1997a; Lee und Davis, 1997b), die durch die Injektion eines CRF-Antagonisten in den BSTL blockiert wird (Lee and Davis, 1997a; Lee and Davis, 1997b). Angstassoziiertes Verhalten korreliert mit der Anzahl CRF exprimierender Neurone. Neonatal mit T4 behandelte Tiere hatten weniger CRF-ir Neurone im CeA. Diese Tiere zeigten reduzierte Ängstlichkeit bei Motilitätstests und dem erhöhten Pluslabyrinth, eine erhöhte lokomotorische Aktivität und

eine gesteigerte Schreckreaktion (Yilmazer-Hanke et al., 2004). CRF-ir Neurone und Fasern werden von CGRP-ir Terminalien kontaktiert. Es ist doch wahrscheinlich, dass mit geringerer Anzahl anxiogener CRF-ir Neurone auch die Anzahl der Kontakte von CGRP-ir Zellen zu CRF-ir Zellen geringer ist. Dies würde in das Bild von Angst auslösenden CGRP-ir Fasern in der Amygdala passen, müsste aber noch bewiesen werden.

Wenn sich eine neonatale T4-Behandlung derart auf die Amygdalamorphologie auswirkt, dass es zu Veränderungen des angstassoziiertes Verhalten kommt, könnte es doch auch zu Veränderungen der vegetativen Parameter wie erhöhtem Blutdruck, gesteigerter Herzfrequenz und höherer Körpertemperatur kommen. Es waren aber keine großen Veränderungen aufgetreten. Dies stimmt mit der Studie von McCarty et al. (1983) überein, der zeigte, dass es nach Fußschocks zwar erhöhte Catecholamin-Spiegel bei Thyroxin-behandelten Tieren gab, aber keine Unterschiede beim Blutdruck und der Herzfrequenz zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe zu beobachten waren. Unter normalen Umständen war die Herzfrequenz der mit Thyroxin behandelten Ratten höher (Foley et al., 2001; McCarty et al., 1983). Das konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden. Eventuell verschwinden die durch vorübergehende Hyperthyreose verursachten Effekte mit der Zeit. Das Gewicht der Herzen neugeborener Thyroxin-behandelter Ratten ist bis zum Alter von acht Tagen erhöht, doch der Grad der Hypertrophie sinkt von 50 % auf 20 % trotz andauernder Behandlung. Die Behandlung bewirkte eine anfängliche Erhöhung der basalen Ornihtindecarboxylase (ODC) Aktivität des Herzens, gefolgt von einer Periode subnormaler Werte und letztendlich dem Angleichen an Kontroll ODC Werte im Alter von 18 Tagen (Bartolome et al., 1982). McCarty's Tiere waren zwischen 60 und 100 Tage alt als sie getestet wurden und der einzige Unterschied des autonomen Systems fand sich bei der Herzfrequenz im Ruhezustand. Auch die erhöhten Corticosteron-Spiegel bei gestressten Jungtieren sanken mit der Zeit auf das normale Mass. Das könnte ebenso für die überspitzte Angstbereitschaft gelten. Diese hält zwar lange an, doch wie lang ist dieser Zeitraum? Vielleicht waren die hier verwendeten Ratten mit 9-18 Monaten einfach schon zu alt.

Dass behandelte Tiere reduzierte Ängstlichkeit bei Motilitätstests und dem erhöhten Pluslabyrinth und eine erhöhte lokomotorische Aktivität aber eine gesteigerte Schreckreaktion zeigten (Yilmazer-Hanke et al., 2004) und dass sich die Körpertemperatur und der Blutdruck zwischen den beiden unbekannten Situationen unterschieden, könnte darauf hinweisen, dass der Versuch in der Startleapparatur bedrohlicher auf die Tiere gewirkt hatte als der Versuch im offenen Feld. Wahrscheinlich wird das an den Fußschocks gelegen haben, denen die Tiere nicht entkommen konnten. War die Angst vor den Fußschocks dieselbe Angst wie die vor dem Unbekannten, nur größer, oder war es Furcht, die bei dem Versuch in der Startleapparatur hervorgerufen wurde?

Dass die Körpertemperatur stieg, während Blutdruck und Herzfrequenz sanken, könnte daran gelegen haben, dass es länger dauert, die Körpertemperatur einzustellen, da sie von mehreren Faktoren, direkt und indirekt beeinflusst wird.

Danksagung

Ich bedanke mich für die Unterstützung meiner Arbeit bei:

Frau I. Zipreß

PD. Dr. med. D. Yilmazer-Hanke, Doktormutter

Prof. Dr. rer. nat. R. Linke, Doktorvater

Prof. Dr. rer. nat. H. Schwegler

Prof. Dr. med. H-J. Rothkötter

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 426 (B4) gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert.

Abkürzungsverzeichnis

AAA	Area amygdaloidea anterior
ACO	Nucleus amygdalae corticalis anterioris
AHI	Area parahippocampalis
AOT	Nucleus accessorii tractus olfactorii
APIR	Area transitionis amygdalopiriformis
APTD	Nucleus dorsalis pretectalis anterior
APTv	Nucleus ventralis pretectalis anterior
ASR	akustische Schreckreaktion
AStr	Area transitionis amygdalostriatalis
BL	Nucleus amygdalae basalis lateralis
BLA	Nucleus amygdalae basalis lateralis pars anterioris
BLP	Nucleus amygdalae basalis lateralis pars posterioris
BLV	Nucleus amygdalae basalis lateralis pars ventralis
BM	Nucleus amygdalae basalis medialis
BMA	Nucleus amygdalae basalis medialis pars anterioris
BMP	Nucleus amygdalae basalis medialis pars posterioris
BST	Nucleus striae terminalis
BSTIA	Nucleus striae terminalis pars intraamygdalae
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
CeA	Nucleus amygdalae centralis
CeC	Nucleus amygdalae centralis pars capsularis
CeL	Nucleus amygdalae centralis pars lateralis
CeM	Nucleus amygdalae centralis pars medialis

CL	Claustrum
СР	Pedunculus cerebralis
CPu	Caudatoputamen
CRF	Corticotropin-releasing factor
DpMe	Nucleus mesencephalicus profundus
DEn	Nucleus endopiriformis dorsalis
DMH	Nucleus dorsomedialis hypothalami
Eth	Nucleus ethmoidalis thalami
FG	Fluorogold
Ι	Nuclei intercalates amygdalae
IM	Nucleus intercalatus amygdalae, haupt Teil
IMG	Substantia grisea intramedullaris amygdaloideus
IML	Nucleus intermediolateralis der Columnae griseae
IPAC	Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterior
IPACL	Nucleus interstitialis commissura anterioris pars posterolateralis
IPACM	Nucleus interstitialis commissura anterioris pars
LA	Nucleus amygdalae lateralis
LADL	Nucleus amygdalae lateralis pars dorsolateralis
LAVL	Nucleus amygdalae lateralis pars ventrolateralis
LAVM	Nucleus amygdalae lateralis pars ventromedialis
LGP	Globus pallidus lateralis

LOT	Nucleus tractus olfactorii lateralis
LPBC	Nucleus parabrachialis lateralis, pars medialis
LPBCr	Nucleus parabrachialis lateralis, pars mediolateralis
LPBE	Nucleus parabrachialis lateralis, pars lateralis
LSS	Stria olfactoria laterais
MEA	Nucleus amygdalae anteromedialis
me 5	Tractus mesencephalicus nervi trigemini
MG	Corpus geniculatum mediale
MGd	Corpus geniculatum mediale, Nucleus dorsalis
MGm	Corpus geniculatum mediale, Nucleus medialis
MGv	Corpus geniculatum mediale, Nucleus ventralis
ml	Lemniscus medialis
MPBE	Nucleus parabrachialis medialis, pars lateralis
NPY	Neuropeptid Y
PAG	Substantia grisea centralis
PIL	Nucleus intralaminaris posterioris thalami
PIN	Nucleus intralaminaris posterioris thalami
PLCO	Nucleus amygdalae corticales posterolateralis
РМСО	Nucleus amygdalae corticales posteromedialis
Ро	Nuclei posteriores thalami
РоТ	Nucleus posteriores triangulares thalami
PP	Nucleus peripedunculares
PVN	Nucleus paraventricularis hypothalami
REth	Nucleus retroethmoidales
scp	Pedunculus cerebellaris superior

SG	Nucleus suprageniculatus thalami
SLEA	Pars sublenticularis amygdalae
SN	Substantia nigra
SPF	Nucleus subparafascicularis thalami
SPFPC	Nucleus subparafascicularis thalami pars parvicellularis
SUBB	Nucleus subbrachialis
TH	Thyroxin-Hydroxylase
TRF	Thyrotropin-releasing factor
VEn	Nucleus endopiriformis ventralis
VPM	Nucleus ventralis posteromedialis thalami
VSC	Tractus spinocerebellaris anterior

Literaturverzeichniss

Alden M, Besson JM, and Bernard JF. 1994. Organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the bed nucleus of the stria terminalis and neighboring regions: a PHA-L study in the rat. J Comp Neurol 341:289-314.

Alheid GF, de Olmos JS, and Beltramino CA. 1995. Amygdala and extended amygdala. In The Rat Nervous System. In George Paxinos, editor. The Rat Nervous System. San Diego: Academic Press, INC. p 495-578.

Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, and Rosenfeld MG. 1985. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. Science 229:1094-1097.

Amara SG, Evans RM, and Rosenfeld MG. 1984. Calcitonin/calcitonin gene-related peptide transcription unit: tissue-specific expression involves selective use of alternative polyadenylation sites. Mol Cell Biol 4:2151-2160.

Amaral DG, Price JL, Pitkanen A, and Carmichael ST. 1992. Anatomical Organization of the Primate Amygdaloid Complex. In Aggleton JP, editor. The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction. New York: Wiley-Liss. p 1-66.

Baklavadzhyan OG, Pogosyan NL, Arshakyan AV, Darbinyan AG, Khachatryan AV, and Nikogosyan TG. 2000. Studies of the role of the central nucleus of the amygdala in controlling cardiovascular functions. Neurosci Behav Physiol 30:231-236.

Bandler R and Shipley MT. 1994. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends Neurosci 17:379-389.

Bartolome J, Lau C, and Slotkin TA. 1982. Neonatal hyperthyroidism causes premature development of baroreceptor-mediated cardiac sympathetic reflexes. Dev Neurosci 5:208-215.

Basbaum AI, Clanton CH, and Fields HL. 1978. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. J Comp Neurol 178:209-224.

Bennett JA, McWilliam PN, and Shepheard SL. 1987. A gamma-aminobutyric-acid-mediated inhibition of neurones in the nucleus tractus solitarius of the cat. J Physiol 392:417-430.

Bernard JF, Alden M, and Besson JM. 1993. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. J Comp Neurol 329:201-229.

Bernard JF and Besson JM. 1990. The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. J Neurophysiol 63:473-490.

Bernard JF, Bester H, and Besson JM. 1996. Involvement of the spino-parabrachio - amygdaloid and -hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain. Prog Brain Res 107:243-255.

Bernard JF, Huang GF, and Besson JM. 1992. Nucleus centralis of the amygdala and the globus pallidus ventralis: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. J Neurophysiol 68:551-569.

Blair HT, Sotres-Bayon F, Moita MA, and LeDoux JE. 2005. The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli. Neuroscience 133:561-569.

Block CH, Hoffman G, and Kapp BS. 1989. Peptide-containing pathways from the parabrachial complex to the central nucleus of the amygdala. Peptides 10:465-471.

Bordi F and LeDoux JE. 1994a. Response properties of single units in areas of rat auditory thalamus that project to the amygdala. I. Acoustic discharge patterns and frequency receptive fields. Exp Brain Res 98:261-274.

Bordi F and LeDoux JE. 1994b. Response properties of single units in areas of rat auditory thalamus that project to the amygdala. II. Cells receiving convergent auditory and somatosensory inputs and cells antidromically activated by amygdala stimulation. Exp Brain Res 98:275-286.

Bourgeais L, Gauriau C, and Bernard JF. 2001. Projections from the nociceptive area of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. Eur J Neurosci 14:229-255.

Bousquet P, Feldman J, Bloch R, and Schwartz J. 1982. Evidence for a neuromodulatory role of GABA at the first synapse of the baroreceptor reflex pathway. Effects of GABA derivatives injected into the NTS. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 319:168-171.

Brown MR and Gray TS. 1988. Peptide injections into the amygdala of conscious rats: effects on blood pressure, heart rate and plasma catecholamines. Regul Pept 21:95-106.

Cabot JB, Alessi V, Carroll J, and Ligorio M. 1994. Spinal cord lamina V and lamina VII interneuronal projections to sympathetic preganglionic neurons. J Comp Neurol 347:515-530.

Cahill L, Prins B, Weber M, and McGaugh JL. 1994. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. Nature 371:702-704.

Calandreau L, Desmedt A, Decorte L, and Jaffard R. 2005. A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. Learn Mem 12:383-388.

Campeau S and Davis M. 1995. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. J Neurosci 15:2301-2311.

Carrive P. 1993. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res 58:27-47.

Carrive P and Bandler R. 1991a. Control of extracranial and hindlimb blood flow by the midbrain periaqueductal grey of the cat. Exp Brain Res 84:599-606.

Carrive P and Bandler R. 1991b. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. Brain Res 541:206-215.

Carrive P, Bandler R, and Dampney RA. 1988. Anatomical evidence that hypertension associated with the defence reaction in the cat is mediated by a direct projection from a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey to the subretrofacial nucleus of the medulla. Brain Res 460:339-345.

Cassell MD and Gray TS. 1989. The amygdala directly innervates adrenergic (C1) neurons in the ventrolateral medulla in the rat. Neurosci Lett 97:163-168.

Chalmers J, Arnolda L, Llewellyn-Smith I, Minson J, Pilowsky P, and Suzuki S. 1994. Central neurons and neurotransmitters in the control of blood pressure. Clin Exp Pharmacol Physiol 21:819-829.

Chamberlin NL and Saper CB. 1992. Topographic organization of cardiovascular responses to electrical and glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. J Comp Neurol 326:245-262.

Chamberlin NL and Saper CB. 1994. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. J Neurosci 14:6500-6510.

Champoux M, Coe CL, Schanberg SM, Kuhn CM, and Suomi SJ. 1989. Hormonal effects of early rearing conditions in the infant rhesus monkey. American Journal of Primatology 19:111-117.

Chen S and Aston-Jones G. 1995. Anatomical evidence for inputs to ventrolateral medullary catecholaminergic neurons from the midbrain periaqueductal gray of the rat. Neurosci Lett 195:140-144.

Clark FM and Proudfit HK. 1991. Projections of neurons in the ventromedial medulla to pontine catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. Brain Res 540:105-115.

Coplan JD, Andrews MW, Rosenblum LA, Owens MJ, Friedman S, Gorman JM, and Nemeroff CB. 1996. Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. Proc Natl Acad Sci U S A 93:1619-1623.

Corodimas KP, LeDoux JE, Gold PW, and Schulkin J. 1994. Corticosterone potentiation of conditioned fear in rats. Ann N Y Acad Sci 746:392-393.

Craig AD. 1991. Spinal distribution of ascending lamina I axons anterogradely labeled with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat. J Comp Neurol 313:377-393.

Dampney RA. 1994. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. Physiol Rev 74:323-364.

Dampney RA and Horiuchi J. 2003. Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using c-fos gene expression. Prog Neurobiol 71:359-384.

Danielsen EH, Magnuson DJ, and Gray TS. 1989. The central amygdaloid nucleus innervation of the dorsal vagal complex in rat: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin lectin anterograde tracing study. Brain Res Bull 22:705-715.

Davis M. 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. Annu Rev Neurosci 15:353-375.

Davis M, Falls WA, Campeau S, and Kim M. 1993. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. Behav Brain Res 58:175-198.

Davis M, Gendelman DS, Tischler MD, and Gendelman PM. 1982. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. J Neurosci 2:791-805.

Davis M, Walker DL, and Lee Y. 1997. Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. Ann N Y Acad Sci 821:305-331.

De Novellis V, Stotz-Potter EH, Morin SM, Rossi F, and DiMicco JA. 1995. Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. Am J Physiol 269:R131-R140.

Dennis T, Fournier A, St Pierre S, and Quirion R. 1989. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. J Pharmacol Exp Ther 251:718-725.

Divac I and Mogensen J. 1990. Long-term retrograde labelling of neurons. Brain Res 524:339-341.

Dobolyi A, Irwin S, Makara G, Usdin TB, and Palkovits M. 2005. Calcitonin gene-related peptide-containing pathways in the rat forebrain. J Comp Neurol 489:92-119.

Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, and Dickerson IM. 2000. CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. J Biol Chem 275:31438-31443.

Fanselow MS and Kim JJ. 1994. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. Behav Neurosci 108:210-212.

Farkas E, Jansen AS, and Loewy AD. 1997. Periaqueductal gray matter projection to vagal preganglionic neurons and the nucleus tractus solitarius. Brain Res 764:257-261.

Feldman PD and Felder RB. 1991. Effects of gamma-aminobutyric acid and glycine on synaptic excitability of neurones in the solitary tract nucleus. Neuropharmacology 30:225-236.

Fields HL, Heinricher MM, and Mason P. 1991. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. Annu Rev Neurosci 14:219-245.

Foley CM, McAllister RM, and Hasser EM. 2001. Thyroid status influences baroreflex function and autonomic contributions to arterial pressure and heart rate. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280:H2061-H2068.

Folkow B, Hallback-Nordlander M, Martner J, and Nordborg C. 1982. Influence of amygdala lesions on cardiovascular responses to alerting stimuli, on behaviour and on blood pressure development in spontaneously hypertensive rats. Acta Physiol Scand 116:133-139.

Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, and Dampney RA. 2001. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280:H2891-H2901.

Fulwiler CE and Saper CB. 1984. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. Brain Res 319:229-259.

Galeno TM and Brody MJ. 1983. Hemodynamic responses to amygdaloid stimulation in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol 245:R281-R286.

Galeno TM, Van Hoesen GW, and Brody MJ. 1984. Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in the spontaneously hypertensive rat. Brain Res 291:249-259.

Galeno TM, Van Hoesen GW, Maixner W, Johnson AK, and Brody MJ. 1982. Contribution of the amygdala to the development of spontaneous hypertension. Brain Res 246:1-6.

Gauriau C and Bernard JF. 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. Exp Physiol 87:251-258.

Gauriau C and Bernard JF. 2004. Posterior triangular thalamic neurons convey nociceptive messages to the secondary somatosensory and insular cortices in the rat. J Neurosci 24:752-761.

Gelsema AJ, McKitrick DJ, and Calaresu FR. 1987. Cardiovascular responses to chemical and electrical stimulation of amygdala in rats. Am J Physiol 253:R712-R718.

Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor GP, Morrison JF, Kelly JS, Evans RM, and . 1984. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. J Neurosci 4:3101-3111.

Gold PE and Stone WS. 1988. Neuroendocrine effects on memory in aged rodents and humans. Neurobiol Aging 9:709-717.

Goy RW and McEwen BS. 1980. Sexual Differentiation of the Brain : Based on a Work Session of the Neurosciences Research Program. Cambridge, Massachusetts: MIT Press.

Gray TS and Magnuson DJ. 1987. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. J Comp Neurol 262:365-374.

Gray TS and Magnuson DJ. 1992. Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. Peptides 13:451-460.

Greenwood B and DiMicco JA. 1995. Activation of the hypothalamic dorsomedial nucleus stimulates intestinal motility in rats. Am J Physiol 268:G514-G521.

Han JS, Li W, and Neugebauer V. 2005. Critical role of calcitonin gene-related peptide 1 receptors in the amygdala in synaptic plasticity and pain behavior. J Neurosci 25:10717-10728.

Haring C, Humpel C, Skofitsch G, Krobath J, Javorsky F, and Saria A. 1991. Calcitonin generelated peptide in the amygdaloid complex of the rat: immunohistochemical and quantitative distribution, and drug effects on calcium dependent, potassium-evoked in vitro release. Synapse 8:261-269.

Harrigan EA, Magnuson DJ, Thunstedt GM, and Gray TS. 1994. Corticotropin releasing factor neurons are innervated by calcitonin gene-related peptide terminals in the rat central amygdaloid nucleus. Brain Res Bull 33:529-534.

Haxhiu MA, Jansen AS, Cherniack NS, and Loewy AD. 1993. CNS innervation of airwayrelated parasympathetic preganglionic neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. Brain Res 618:115-134.

Helmstetter FJ. 1992. Contribution of the amygdala to learning and performance of conditional fear. Physiol Behav 51:1271-1276.

Helmstetter FJ and Bellgowan PS. 1994. Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. Behav Neurosci 108:1005-1009.

Herbert H, Moga MM, and Saper CB. 1990. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. J Comp Neurol 293:540-580.

Herman JP and Cullinan WE. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci 20:78-84.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, and Cullinan WE. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. Front Neuroendocrinol 24:151-180.

Hicks TP, Watanabe S, Miyake A, and Shoumura K. 1984. Organization and properties of visually responsive neurones in the suprageniculate nucleus of the cat. Exp Brain Res 55:359-367.

Higgins GA and Schwaber JS. 1983. Somatostatinergic projections from the central nucleus of the amygdala to the vagal nuclei. Peptides 4:657-662.

Hilton SM and Redfern WS. 1986. A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. J Physiol 378:213-228.

Hitchcock J and Davis M. 1986. Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. Behav Neurosci 100:11-22.

Hitchcock JM and Davis M. 1991. Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. Behav Neurosci 105:826-842.

Honkaniemi J, Pelto-Huikko M, Isola J, and Rechardt L. 1990. Simultaneous localization of calcitonin gene-related peptide and neurotensin in rat central amygdaloid nucleus. Neurosci Lett 113:1-6.

Hopkins DA and Holstege G. 1978. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. Exp Brain Res 32:529-547.

Huganir RL and Greengard P. 1990. Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. Neuron 5:555-567.

Hunsperger RW. 1956. Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats. Helv Physiol Pharmacol Acta 14:17-92.

Inagaki S, Matsuda Y, Nakai Y, and Takagi H. 1990. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the afferents to the caudate-putamen and perirhinal cortex of rats. Brain Res 537:263-270.

Iwata J, Chida K, and LeDoux JE. 1987. Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. Brain Res 418:183-188.

Iwata J, LeDoux JE, Meeley MP, Arneric S, and Reis DJ. 1986. Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. Brain Res 383:195-214.

Izquierdo I, Medina JH, Bianchin M, Walz R, Zanatta MS, Da Silva RC, Bueno e Silva, Ruschel AC, and Paczko N. 1993. Memory processing by the limbic system: role of specific neurotransmitter systems. Behav Brain Res 58:91-98.

James W. 1884. What is an Emotion? Mind 9:188-205.

Janitzky K, Linke R, Yilmazer-Hanke DM, Grecksch G, and Schwegler H. 2007. Disrupted visceral feedback reduces locomotor activity and influences background contextual fear conditioning in C57BL/6JOlaHsd mice. Behav Brain Res 182:109-118.

Jansen AS, Nguyen XV, Karpitskiy V, Mettenleiter TC, and Loewy AD. 1995a. Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. Science 270:644-646.

Jansen AS, Wessendorf MW, and Loewy AD. 1995b. Transneuronal labeling of CNS neuropeptide and monoamine neurons after pseudorabies virus injections into the stellate ganglion. Brain Res 683:1-24.

Jia HG, Rao ZR, and Shi JW. 1997. Evidence of gamma-aminobutyric acidergic control over the catecholaminergic projection from the medulla oblongata to the central nucleus of the amygdala. J Comp Neurol 381:262-281.

Ju G. 1991. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity and its relation with neurotensin- and corticotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in the bed nuclei of the stria terminalis in the rat. Brain Res Bull 27:617-624.

Kalin NH, Shelton SE, and Davidson RJ. 2004. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. J Neurosci 24:5506-5515.

Kalin NH, Shelton SE, Rickman M, and Davidson RJ. 1998. Individual differences in freezing and cortisol in infant and mother rhesus monkeys. Behav Neurosci 112:251-254.

Kang W, Wilson MA, Bender MA, Glorioso JC, and Wilson SP. 1998. Herpes virus-mediated preproenkephalin gene transfer to the amygdala is antinociceptive. Brain Res 792:133-135.

Kapp BS, Frysinger RC, Gallagher M, and Haselton JR. 1979. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. Physiol Behav 23:1109-1117.

Kapp BS, Gallagher M, Underwood MD, McNall CL, and Whitehorn D. 1982. Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of the amygdala central nucleus in the rabbit. Brain Res 234:251-262.

Kawai Y, Takami K, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, and Tohyama M. 1985. Topographic localization of calcitonin gene-related peptide in the rat brain: an immunohistochemical analysis. Neuroscience 15:747-763.

Kim M, Campeau S, Falls WA, and Davis M. 1993. Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of fear-potentiated startle. Behav Neural Biol 59:5-8.

Kocorowski LH and Helmstetter FJ. 2001. Calcitonin gene-related peptide released within the amygdala is involved in Pavlovian auditory fear conditioning. Neurobiol Learn Mem 75:149-163.

Koob GF, Heinrichs SC, Pich EM, Menzaghi F, Baldwin H, Miczek K, and Britton KT. 1993. The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. Ciba Found Symp 172:277-289.

Kozicz T and Arimura A. 2001. Axon terminals containing CGRP-immunoreactivity form synapses with CRF- and Met-enkephalin-immunopositive neurons in the laterodorsal division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. Brain Res 893:11-20.

Krettek JE and Price JL. 1978. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. J Comp Neurol 178:225-254.

Kruger L, Sternini C, Brecha NC, and Mantyh PW. 1988. Distribution of calcitonin generelated peptide immunoreactivity in relation to the rat central somatosensory projection. J Comp Neurol 273:149-162.

Kubo T and Kihara M. 1987. Evidence for the presence of GABAergic and glycine-like systems responsible for cardiovascular control in the nucleus tractus solitarii of the rat. Neurosci Lett 74:331-336.

Kubota Y, Inagaki S, Shimada S, Takatsuji K, Tohyama M, and Takagi H. 1991. Striatal calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive afferents from the regions ventral and medial to the medial geniculate nucleus of rats. Neuroscience 40:423-428.

Kwiat GC and Basbaum AI. 1992. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. Somatosens Mot Res 9:157-173.

LeDoux JE. 1993. Emotional memory systems in the brain. Behav Brain Res 58:69-79.

LeDoux JE. 1995. Emotion: clues from the brain. Annu Rev Psychol 46:209-235.

LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23:155-184.

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, and Romanski LM. 1990a. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. J Neurosci 10:1062-1069.

LeDoux JE, Farb C, and Ruggiero DA. 1990b. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. J Neurosci 10:1043-1054.

LeDoux JE, Ruggiero DA, Forest R, Stornetta R, and Reis DJ. 1987. Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. J Comp Neurol 264:123-146.

LeDoux JE, Ruggiero DA, and Reis DJ. 1985. Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. J Comp Neurol 242:182-213.

LeDoux JE, Sakaguchi A, Iwata J, and Reis DJ. 1986. Interruption of projections from the medial geniculate body to an archi-neostriatal field disrupts the classical conditioning of emotional responses to acoustic stimuli. Neuroscience 17:615-627.

Lee Y and Davis M. 1997a. Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. J Neurosci 17:6434-6446.

Lee Y and Davis M. 1997b. Role of the septum in the excitatory effect of corticotropinreleasing hormone on the acoustic startle reflex. J Neurosci 17:6424-6433.

Lee Y, Lopez DE, Meloni EG, and Davis M. 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. J Neurosci 16:3775-3789.

Levine S, Wiener SG, and Coe CL. 1993. Temporal and social factors influencing behavioral and hormonal responses to separation in mother and infant squirrel monkeys. Psychoneuroendocrinology 18:297-306.

Liang KC, Melia KR, Campeau S, Falls WA, Miserendino MJ, and Davis M. 1992. Lesions of the central nucleus of the amygdala, but not the paraventricular nucleus of the hypothalamus, block the excitatory effects of corticotropin-releasing factor on the acoustic startle reflex. J Neurosci 12:2313-2320.

Linke R. 1999. Differential projection patterns of superior and inferior collicular neurons onto posterior paralaminar nuclei of the thalamus surrounding the medial geniculate body in the rat. Eur J Neurosci 11:187-203.

Linke R, Braune G, and Schwegler H. 2000. Differential projection of the posterior paralaminar thalamic nuclei to the amygdaloid complex in the rat. Exp Brain Res 134:520-532.

Linke R, De Lima AD, Schwegler H, and Pape HC. 1999. Direct synaptic connections of axons from superior colliculus with identified thalamo-amygdaloid projection neurons in the

rat: possible substrates of a subcortical visual pathway to the amygdala. J Comp Neurol 403:158-170.

Linke R, Faber-Zuschratter H, Seidenbecher T, and Pape HC. 2004. Axonal connections from posterior paralaminar thalamic neurons to basomedial amygdaloid projection neurons to the lateral entorhinal cortex in rats. Brain Res Bull 63:461-469.

Lipp HP, Schwegler H, Heimrich B, and Driscoll P. 1988. Infrapyramidal mossy fibers and two-way avoidance learning: developmental modification of hippocampal circuitry and adult behavior of rats and mice. J Neurosci 8:1905-1921.

Loewy AD, Franklin MF, and Haxhiu MA. 1994. CNS monoamine cell groups projecting to pancreatic vagal motor neurons: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus. Brain Res 638:248-260.

Loewy AD and Spyer KM. 1990. Central Regulation of Autonomic Functions. New York: Oxford University Press.

Makino S, Gold PW, and Schulkin J. 1994. Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Brain Res 640:105-112.

Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, and Gold PW. 1995. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. Endocrinology 136:4517-4525.

Maren S and Fanselow MS. 1995. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. J Neurosci 15:7548-7564.

Markgraf CG and Kapp BS. 1991. Lesions of the amygdaloid central nucleus block conditioned cardiac arrhythmias in the rabbit receiving digitalis. J Auton Nerv Syst 34:37-45.

McCarty R, Kirby RF, and Brunjes PC. 1983. Neonatal hyperthyroidism: effects on sympathetic responses to stress in adult rats. Am J Physiol 245:R95-R99.

McDonald AJ. 2003. Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. Ann N Y Acad Sci 985:1-21.

McDonald AJ and Augustine JR. 1993. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. Neuroscience 52:281-294.

McDougall A, Dampney R, and Bandler R. 1985. Cardiovascular components of the defence reaction evoked by excitation of neuronal cell bodies in the midbrain periaqueductal grey of the cat. Neurosci Lett 60:69-75.

McGaugh JL, Introini-Collison IB, Cahill LF, Castellano C, Dalmaz C, Parent MB, and Williams CL. 1993. Neuromodulatory systems and memory storage: role of the amygdala. Behav Brain Res 58:81-90.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, and Foord SM. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 393:333-339.
Meaney MJ, Bhatnagar S, Larocque S, McCormick C, Shanks N, Sharma S, Smythe J, Viau V, and Plotsky PM. 1993. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. Ann N Y Acad Sci 697:70-85.

Micevych PE and Kruger L. 1992. The status of calcitonin gene-related peptide as an effector peptide. Ann N Y Acad Sci 657:379-396.

Minson JB, Chalmers JP, Caon AC, and Renaud B. 1987. Separate areas of rat medulla oblongata with populations of serotonin- and adrenaline-containing neurons alter blood pressure after L-glutamate stimulation. J Auton Nerv Syst 19:39-50.

Miura M, Takayama K, and Okada J. 1991. Difference in sensitivity of cardiovascular and respiratory control neurons in the subretrofacial nucleus to glutamate receptor subtype agonists in SHR, WKY and cats. J Auton Nerv Syst 36:1-12.

Moga MM, Herbert H, Hurley KM, Yasui Y, Gray TS, and Saper CB. 1990. Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. J Comp Neurol 295:624-661.

Nguyen KQ, Sills MA, and Jacobowitz DM. 1986. Cardiovascular effects produced by microinjection of calcitonin gene-related peptide into the rat central amygdaloid nucleus. Peptides 7:337-339.

Nicholas AP and Hancock MB. 1990. Evidence for projections from the rostral medullary raphe onto medullary catecholamine neurons in the rat. Neurosci Lett 108:22-28.

Nitecka L and Ben Ari Y. 1987. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. J Comp Neurol 266:45-55.

Norgren R. 1976. Taste pathways to hypothalamus and amygdala. J Comp Neurol 166:17-30.

Ottersen OP. 1981. Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. J Comp Neurol 202:335-356.

Pare D and Smith Y. 1993. Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. Neuroscience 57:1061-1076.

Paxinos G and Watson C. 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press.

Paxinos G and Watson C. 1997. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press.

Petrov T, Jhamandas JH, and Krukoff TL. 1996. Connectivity between brainstem autonomic structures and expression of c-fos following electrical stimulation of the central nucleus of the amygdala in rat. Cell Tissue Res 283:367-374.

Petrov T, Krukoff TL, and Jhamandas JH. 1995. Convergent influence of the central nucleus of the amygdala and the paraventricular hypothalamic nucleus upon brainstem autonomic neurons as revealed by c-fos expression and anatomical tracing. J Neurosci Res 42:835-845.

Pieribone VA and Aston-Jones G. 1988. The iontophoretic application of Fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei. Brain Res 475:259-271.

Pitkanen A and Amaral DG. 1994. The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: an immunohistochemical and in situ hybridization study. J Neurosci 14:2200-2224.

Pitkanen A, Stefanacci L, Farb CR, Go GG, LeDoux JE, and Amaral DG. 1995. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. J Comp Neurol 356:288-310.

Porges SW. 1995. Orienting in a defensive world: mammalian modifications of our evolutionary heritage. A Polyvagal Theory. Psychophysiology 32:301-318.

Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, and Foord SM. 2002. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. Pharmacol Rev 54:233-246.

Pugh CR, Tremblay D, Fleshner M, and Rudy JW. 1997. A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. Behav Neurosci 111:503-511.

Reis DJ, Ruggiero DA, and Morrison SF. 1989. The C1 area of the rostral ventrolateral medulla oblongata. A critical brainstem region for control of resting and reflex integration of arterial pressure. Am J Hypertens 2:363S-374S.

Ricardo JA and Koh ET. 1978. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. Brain Res 153:1-26.

Riche D, De Pommery J, and Menetrey D. 1990. Neuropeptides and catecholamines in efferent projections of the nuclei of the solitary tract in the rat. J Comp Neurol 293:399-424.

Rogers RC and Fryman DL. 1988. Direct connections between the central nucleus of the amygdala and the nucleus of the solitary tract: an electrophysiological study in the rat. J Auton Nerv Syst 22:83-87.

Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F, and LeDoux JE. 1993. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. Behav Neurosci 107:444-450.

Roozendaal B, Koolhaas JM, and Bohus B. 1990. Differential effect of lesioning of the central amygdala on the bradycardiac and behavioral response of the rat in relation to conditioned social and solitary stress. Behav Brain Res 41:39-48.

Roozendaal B, Quirarte GL, and McGaugh JL. 1997. Stress-activated hormonal systems and the regulation of memory storage. Ann N Y Acad Sci 821:247-258.

Rosen JB and Davis M. 1988. Enhancement of acoustic startle by electrical stimulation of the amygdala. Behav Neurosci 102:195-202, 324.

Rosen JB and Schulkin J. 1998. From normal fear to pathological anxiety. Psychol Rev 105:325-350.

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, and Evans RM. 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. Nature 304:129-135.

Ross CA, Armstrong DM, Ruggiero DA, Pickel VM, Joh TH, and Reis DJ. 1981. Adrenaline neurons in the rostral ventrolateral medulla innervate thoracic spinal cord: a combined immunocytochemical and retrograde transport demonstration. Neurosci Lett 25:257-262.

Ross CA, Ruggiero DA, Joh TH, Park DH, and Reis DJ. 1983. Adrenaline synthesizing neurons in the rostral ventrolateral medulla: a possible role in tonic vasomotor control. Brain Res 273:356-361.

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, and Reis DJ. 1984. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. J Neurosci 4:474-494.

Saha S. 2005. Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. Clin Exp Pharmacol Physiol 32:450-456.

Saha S, Batten TF, and Henderson Z. 2000. A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: a combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. Neuroscience 99:613-626.

Salome N, Viltart O, Leman S, and Sequeira H. 2001. Activation of ventrolateral medullary neurons projecting to spinal autonomic areas after chemical stimulation of the central nucleus of amygdala: a neuroanatomical study in the rat. Brain Res 890:287-295.

Sananes CB and Davis M. 1992. N-methyl-D-aspartate lesions of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala block fear-potentiated startle and shock sensitization of startle. Behav Neurosci 106:72-80.

Saper CB. 1982. Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. J Comp Neurol 210:163-173.

Saper CB and Loewy AD. 1980. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. Brain Res 197:291-317.

Sarhan M, Freund-Mercier MJ, and Veinante P. 2005. Branching patterns of parabrachial neurons projecting to the central extended amgydala: single axonal reconstructions. J Comp Neurol 491:418-442.

Schmued LC and Fallon JH. 1986. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. Brain Res 377:147-154.

Schmued LC and Heimer L. 1990. Iontophoretic injection of fluoro-gold and other fluorescent tracers. J Histochem Cytochem 38:721-723.

Schwaber JS, Kapp BS, Higgins GA, and Rapp PR. 1982. Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. J Neurosci 2:1424-1438.

Schwaber JS, Sternini C, Brecha NC, Rogers WT, and Card JP. 1988. Neurons containing calcitonin gene-related peptide in the parabrachial nucleus project to the central nucleus of the amygdala. J Comp Neurol 270:416-419.

Schwegler H. 1995. Transient postnatal thyroxine treatment leads to an increased number of cholinergic neurons in the medial septum and to a higher density of cholinergic fibers in hippocampal CA3 in rats. Neurosci Lett 198:197-200.

Schwegler H, Pilz PK, Koch M, Fendt M, Linke R, and Driscoll P. 1997. The acoustic startle response in inbred Roman high- and low-avoidance rats. Behav Genet 27:579-582.

Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, and Robbins TW. 1991. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. Neuroscience 42:335-350.

Sharma NB and Gelsema AJ. 1995. Central nucleus of the amygdala and the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol 268:R1171-R1177.

Shimada S, Inagaki S, Kubota Y, Kito S, Funaki H, and Takagi H. 1989. Light and electron microscopic studies of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive terminals in the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. Exp Brain Res 77:217-220.

Shimada S, Inagaki S, Narita N, and Takagi H. 1992. Synaptic contacts between CGRPimmunoreactive terminals and enkephalin-immunoreactive neurons in the central amygdaloid nucleus of the rat. Neurosci Lett 134:243-246.

Shimada S, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, and Tohyama M. 1985. Calcitonin gene-related peptidergic projection from the parabrachial area to the forebrain and diencephalon in the rat: an immunohistochemical analysis. Neuroscience 16:607-616.

Shinohara Y, Yamano M, Matsuzaki T, and Tohyama M. 1988. Evidences for the coexistence of substance P, neurotensin and calcitonin gene-related peptide in single neurons of the external subdivision of the lateral parabrachial nucleus of the rat. Brain Res Bull 20:257-260.

Soltis RP and DiMicco JA. 1991. Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. Am J Physiol 261:R427-R433.

Soltis RP and DiMicco JA. 1992. Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats. Am J Physiol 262:R689-R697.

Stefanacci L, Farb CR, Pitkanen A, Go G, LeDoux JE, and Amaral DG. 1992. Projections from the lateral nucleus to the basal nucleus of the amygdala: a light and electron microscopic PHA-L study in the rat. J Comp Neurol 323:586-601.

Stock G, Rupprecht U, Stumpf H, and Schlor KH. 1981. Cardiovascular changes during arousal elicited by stimulation of amygdala, hypothalamus and locus coeruleus. J Auton Nerv Syst 3:503-510.

Stotz-Potter EH, Willis LR, and DiMicco JA. 1996. Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. J Neurosci 16:1173-1179.

Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, and Loewy AD. 1989. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. Brain Res 491:274-296.

Swanson LW and Kuypers HG. 1980. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. J Comp Neurol 194:555-570.

Swanson LW and Petrovich GD. 1998. What is the amygdala? Trends Neurosci 21:323-331.

Swanson LW and Simmons DM. 1989. Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. J Comp Neurol 285:413-435.

Swiergiel AH, Takahashi LK, and Kalin NH. 1993. Attenuation of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing factor receptors in the central amygdala in the rat. Brain Res 623:229-234.

Takahashi LK. 1994. Organizing action of corticosterone on the development of behavioral inhibition in the preweanling rat. Brain Res Dev Brain Res 81:121-127.

Takayama K, Okada J, and Miura M. 1990. Evidence that neurons of the central amygdaloid nucleus directly project to the site concerned with circulatory and respiratory regulation in the ventrolateral nucleus of the cat: a WGA-HRP study. Neurosci Lett 109:241-246.

Tazumi T and Okaichi H. 2002. Effect of lesions in the lateral nucleus of the amygdala on fear conditioning using auditory and visual conditioned stimuli in rats. Neurosci Res 43:163-170.

ter Horst GJ and Luiten PG. 1986. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. Brain Res Bull 16:231-248.

Tershner SA and Helmstetter FJ. 2000. Antinociception produced by mu opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of mu opioid and neurotensin receptors in the ventral periaqueductal gray. Brain Res 865:17-26.

Thomas PM, Nasonkin I, Zhang H, Gagel RF, and Cote GJ. 2001. Structure of the mouse calcitonin/calcitonin gene-related peptide alpha and beta genes. DNA Seq 12:131-135.

Thompson RH, Canteras NS, and Swanson LW. 1996. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. J Comp Neurol 376:143-173.

Thompson RL and Cassell MD. 1989. Differential distribution and non-collateralization of central amygdaloid neurons projecting to different medullary regions. Neurosci Lett 97:245-251.

Tschopp FA, Tobler PH, and Fischer JA. 1984. Calcitonin gene-related peptide in the human thyroid, pituitary and brain. Mol Cell Endocrinol 36:53-57.

van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, and Bloom FE. 1984. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. J Comp Neurol 224:1-24.

van Rossum D, Hanisch UK, and Quirion R. 1997. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. Neurosci Biobehav Rev 21:649-678.

Veening JG, Swanson LW, and Sawchenko PE. 1984. The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. Brain Res 303:337-357.

von Euler C, Marttila I, Remmers JE, and Trippenbach T. 1976. Effects of lesions in the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. Acta Physiol Scand 96:324-337.

Wallace DM, Magnuson DJ, and Gray TS. 1992. Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. Brain Res Bull 28:447-454.

Watts AG and Sanchez-Watts G. 1995. Region-specific regulation of neuropeptide mRNAs in rat limbic forebrain neurones by aldosterone and corticosterone. J Physiol 484 (Pt 3):721-736.

Wepsic JG. 1966. Multimodal sensory activation of cells in the magnocellular medial geniculate nucleus. Exp Neurol 15:299-318.

Xu W, Lundeberg T, Wang YT, Li Y, and Yu LC. 2003. Antinociceptive effect of calcitonin gene-related peptide in the central nucleus of amygdala: activating opioid receptors through amygdala-periaqueductal gray pathway. Neuroscience 118:1015-1022.

Yamano M, Hillyard CJ, Girgis S, Emson PC, MacIntyre I, and Tohyama M. 1988a. Projection of neurotensin-like immunoreactive neurons from the lateral parabrachial area to the central amygdaloid nucleus of the rat with reference to the coexistence with calcitonin gene-related peptide. Exp Brain Res 71:603-610.

Yamano M, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, Emson PC, and Tohyama M. 1988b. Presence of a substance P-like immunoreactive neurone system from the parabrachial area to the central amygdaloid nucleus of the rat with reference to coexistence with calcitonin gene-related peptide. Brain Res 451:179-188.

Yasui Y, Breder CD, Saper CB, and Cechetto DF. 1991a. Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. J Comp Neurol 303:355-374.

Yasui Y, Kayahara T, Nakano K, and Mizuno N. 1990. The subparafascicular thalamic nucleus of the rat receives projection fibers from the inferior colliculus and auditory cortex. Brain Res 537:323-327.

Yasui Y, Saper CB, and Cechetto DF. 1991b. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive projections from the thalamus to the striatum and amygdala in the rat. J Comp Neurol 308:293-310.

Yilmazer-Hanke DM, Faber-Zuschratter H, Linke R, and Schwegler H. 2002. Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats. Eur J Neurosci 15:1206-1218.

Yilmazer-Hanke DM, Hantsch M, Hanke J, Schulz C, Faber-Zuschratter H, and Schwegler H. 2004. Neonatal thyroxine treatment: changes in the number of corticotropin-releasing-factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) containing neurons and density of tyrosine hydroxylase positive fibers (TH) in the amygdala correlate with anxiety-related behavior of wistar rats. Neuroscience 124:283-297.

Yilmazer-Hanke DM, Roskoden T, Zilles K, and Schwegler H. 2003. Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABAA, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. Behav Brain Res 145:145-159.

Yu D and Gordon FJ. 1994. A simple method to improve the reliability of iontophoretic administration of tracer substances. J Neurosci Methods 52:161-164.

Zhang JX, Harper RM, and Ni HF. 1986. Cryogenic blockade of the central nucleus of the amygdala attenuates aversively conditioned blood pressure and respiratory responses. Brain Res 386:136-145.

Lebenslauf

Name: Vorname: Geburtsdatum: Geburtsort: Familienstand: wohnhaft:	D'Hanis Wolfgang 21. August 1975 Siegen ledig Fermersleber Weg 45 39112 Magdeburg
Schulbildung:	
1982-1986	Grundschule ,Burgschule Siegen"
1986-1992	Realschule Am Hengsberg in Siegen
1992-1995	Gymnasium Auf der Morgenröthe in Siegen
<u>Studium und Ausbildung:</u>	
1995-2002	Diplomstudiengang Biologie an der Philipps Universität Marburg mit Abschluss
Während der Studienzeit:	Studentische Hilfskraft im Labor (Arbeitsgruppe Prof Dr. Werner)
	Pförtner ("Springer") an den Pforten der Kinderklinik, Psychiatrie und Psychologie, HNO und Frauenklinik
	Helfer bei Behindertenbetreuung
Nach der Studienzeit:	
Ab 2003	Doktorand am Anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdburg

Magdeburg, den 5. Februar 2008