A dark blue vertical bar is positioned on the left side of the page. From its base, several thin, light blue lines curve upwards and outwards, creating an abstract, organic shape.

Aus dem Physiologischen Institut
(Direktor: Prof. Dr. Peer Wulff)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Afferenzen des Nukleus Reuniens des Thalamus in der Maus

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Niklas Scheel
aus Kiel

KIEL 2019

1. Berichterstatter*in:

Prof. Dr. Peer Wulff,

Physiologisches Institut

2. Berichterstatter*in:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Martina Böttner,

Anatomisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2020

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 15.07.2020

gez. Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Gedächtnis und Lernen in der Neurowissenschaft	1
Grundlegende Formen von Lernen und Speicherung	1
Komplexe Formen von Lernen und Gedächtnis	2
Der Hippocampus als Zentrale für das deklarative Gedächtnis	3
Zusammenarbeit zwischen Präfrontalem Kortex und Hippocampus	4
Der Nukleus Reuniens als Puzzlestück	5
Mäuse in der Gedächtnisforschung	7
Tracing zur Darstellung neuronaler Verbindungen	7
Ziel der Arbeit.....	8
Materialien und Methoden	10
Mäuse.....	10
Stereotaktische Applikation des Fluorogold-Tracers in den Nukleus Reuniens.....	10
Perfusion	14
Lagerung und Fixation der Gehirne.....	17
Herstellung von Schnitten im Kryostaten.....	18
Auswertung der Schnitte im Fluoreszenzmikroskop.....	19
Ergebnisse	21
Injektionsort	21
Ergebnisse der Auswertung.....	22
Abbildung 6	24
Abbildung 7	25
Abbildung 8	26
Abbildung 9	27
Abbildung 10	28
Abbildung 11	29
Abbildung 12	30
Abbildung 13	31
Abbildung 14	33
Abbildung 15	34
Abbildung 16	36
Abbildung 17	37
Abbildung 18	38

Abbildung 19	39
Afferente Verbindungen zum Nukleus Reuniens	40
Diencephalon.....	43
Frontalhirn.....	44
Hippocampus und Subikulum.....	48
Diskussion.....	50
Überlegungen zur Methodik	51
Funde im Präfrontalen Kortex und Hippocampus.....	53
Funde in weiteren Strukturen	55
Vergleich mit Ergebnissen in Ratten	63
Perspektiven.....	68
Zusammenfassung.....	70
Anhang	71
Literatur.....	71
Abkürzungsverzeichnis.....	79
Vorlagen aus dem „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“	88
Danksagung	95
Lebenslauf	96

Einleitung

Gedächtnis und Lernen in der Neurowissenschaft

Die Frage, wie das Gedächtnis funktioniert und Erinnerungen gespeichert werden, ist eine zentrale Frage der Neurowissenschaft. Seit dem Neunzehnten Jahrhundert wurden bedeutende Fortschritte gemacht. Während zu Beginn des Neunzehnten Jahrhunderts die Frage nach Gedächtnis, Lernen und Erkenntnis bei Hegel noch eher mit metaphysischen Theorien beantwortet wurde, rückte der Fokus mit Weiterentwicklung der Medizin und der naturwissenschaftlichen Forschung in Richtung des Gehirns und neurobiologischer Konzepte.

Vor allem die Silberimprägnationen von Hirngewebe von Golgi und Santiago Ramón y Cajal waren ein bedeutender Schritt hin zur modernen Neurowissenschaft. Cajal stellte bereits 1894 eine Theorie über Informationsspeicherung durch Vernetzung von Nervenzellen vor [Kandel 2009].

Grundlegende Formen von Lernen und Speicherung

Zu Beginn des Zwanzigsten Jahrhunderts lag der Fokus der Forschung auf grundlegenden Formen der Informationsspeicherung. Pavlov beschrieb mit seinen Versuchen zur klassischen Konditionierung von Reflexen eine basale Form von Lernen [Pavlov 1904]. Eine weitere einfache Form von Lernen wurde durch die Habituation beschrieben, bei der ein Organismus lernt, auf einen Reiz nicht oder weniger stark zu reagieren, wenn der Reiz kontinuierlich gegeben wird, keine unmittelbare Bedeutung für den Organismus hat und nicht gesteigert wird [Thorpe 1944].

Diese elementaren Formen des Lernens wurden sowohl bei Vertebrata als auch bei Invertebrata beobachtet, was Hinweis auf phylogenetisch alte Prozesse war, die auf Zellebene ablaufen. Ende der 1940er Jahre wurde die Theorie der Speicherung von Gedächtnisinhalten durch synaptische Verknüpfung weiterentwickelt: Es wurde postuliert, dass Nervenzellen, die zeitgleich aktiv sind, ihre Verbindung miteinander verstärken [Hebb 1949].

Um diese Prozesse auf Zellebene nachvollziehen zu können, wurden auf der Basis von elektrophysiologischen Experimenten aus den 1920er Jahren Ende der 1940er Jahre elektrophysiologische Methoden zur Erforschung von Zellaktivität und zur Ableitung von Potentialen an Nervenzellen entwickelt, mit denen in den 1950er Jahren die Ionenströme des Aktionspotentials untersucht wurden [Hodgkin 1949] [Huxley 1952] [Cole 1939].

Elektrophysiologische Methoden waren danach als wichtiges Werkzeug in der Neurobiologie etabliert und wurden weiter verfeinert. Sie hatten einen Zugang der Neurobiologie zu den Aktivitäten auf zellulärer Ebene eröffnet.

Um diese Aktivitäten besser nachvollziehen zu können, wechselte Kandel in den 1970er Jahren von den komplexen Gehirnen von Primaten auf den einfacheren Organismus der Seeschnecke *Aplysia* um, um zuerst grundlegendere Funktionsprinzipien bei der Organisation von Nervensystemen auf synaptischer Ebene nachvollziehen zu können [Kandel 2001] [Schwartz 1982].

Bei diesen Arbeiten an der Seeschnecke *Aplysia* in den 1970er Jahren mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden wurden Modulationen von Transmitterfreisetzungen nach Reizen beschrieben: Langfristige Potenzierung (long term potentiation) und langfristige Unterdrückung der Signalweitergabe (long term depression) [Schwartz 1982] [Kandel 1991] [Kandel2001]. Diese molekularbiologischen Korrelate langfristiger Zustandsspeicherungen synaptischer Verknüpfungen waren fortan ein Fokus bei der Erforschung der basalen Prozesse des Lernens auf zellulärer Ebene.

In den 1990er Jahren ermöglichten genetische Manipulationsmöglichkeiten bei Mäusen neue Einblicke in die Arbeitsweise des Gehirns auf synaptischer Ebene [Brandon 1995]. Es bestätigte sich, dass im Bereich des Hippocampus und der Gedächtniskonsolidierung die Funktionsprinzipien in einfachen und komplexen Organismen sehr ähnlich und genetisch stark konserviert sind. Die Konzepte auf molekularer Ebene von Synapsen in *Aplysia* konnten so auf Zellen im Hippocampus der Ratte übertragen werden [Kandel 2001].

Komplexe Formen von Lernen und Gedächtnis

In Verhaltensexperimenten mit Tieren wurde das Konditionierungskonzept mit der operanten Konditionierung als Form langfristiger Speicherung von komplexen Verhaltensweisen erweitert [Skinner 1958].

In den 1950er Jahren wurde die Merkspanne von 7 ± 2 Einheiten beschrieben [Miller 1956]. Dieses Konzept wurde in den 1960er und 1970er Jahren in ein System aus Arbeitsgedächtnis und Langzeitgedächtnis weiterentwickelt: Gedächtnisinhalte werden dabei von einem sensorischen Gedächtnis in ein Arbeitsgedächtnis überführt, um von dort aus in das Langzeitgedächtnis übertragen zu werden [Atkinson1968] [Baddeley 1974].

1957 wurde der Patient H.M vorgestellt, dem beide medialen Temporallappen mitsamt Hippocampi im Rahmen einer Epilepsiebehandlung entfernt worden waren [Milner 1957]. H.M. zeigte eine sehr selektive Form der Amnesie, bei der seine Fähigkeit, neue Informationen zu speichern und sich an neue Geschehnisse zu erinnern, eingeschränkt war. Sein Intelligenzlevel und seine kognitiven Funktionen zeigten dagegen kaum Einschränkungen.

Ausgehend von den Funden im Patienten H.M. 1957 wurden in den 1970er und 1980er Jahren durch Untersuchungen an Amnesiepatienten verschiedene Qualitäten von Langzeitgedächtnis identifiziert, die ab den 1970er Jahren in Klassifikationssysteme eingeteilt wurden [Squire 1992] [Tulving 1994]:

Es wurden das deklarative bzw. Explizite und das Nicht-deklarative bzw. Implizite Gedächtnis unterschieden:

Das deklarative Gedächtnis beinhaltet dabei bewusst erinnerbare Fakten und Geschehnisse [Squire 1992]. Auch die Fähigkeit zum Unterscheiden von Objekten [Squire 1992] sowie das Abrufen räumlicher Informationen werden hierzu gezählt [Ergorul 2004].

Das nicht-deklarative Gedächtnis ist dagegen eine heterogene Gruppe von gespeicherten Inhalten, die unbewusst Verhalten beeinflussen können und zu denen kein direkter Zugang möglich ist [Squire 1992]. Dies beinhaltet gelernte Fertigkeiten, Klassische Konditionierung, Nichtassoziatives Lernen und Priming [Squire 1992]. Priming beschreibt dabei eine erleichterte Erkennung oder Verarbeitung von Wahrnehmungen, basierend auf kurz vorher akquirierten Erfahrungen [Tulving 1990].

Der Hippocampus als Zentrale für das deklarative Gedächtnis

Der Patient H.M. rückte den Hippocampus als neurobiologisches Korrelat für das deklarative Gedächtnis in den Vordergrund und inspirierte Experimente an Tiermodellen, um die Rolle des Hippocampus an der Gedächtnisbildung zu erforschen [Squire 1992] [Tulving 1994] [Kandel 2009]. Passend zu den Funden von Kandel in der Seeschnecke *Aplysia* wurden dabei Anfang der 1970er Jahre auch im Hippocampus von Hasen basale Formen der langfristigen Informationsspeicherung in Form von long term potentiations beschrieben [Loemo 1973].

Analog zu der Rolle, die für den Hippocampus bei der Bildung des deklarativen Gedächtnisses beschrieben wurde, wurden in den 1970er Jahren im Hippocampus von Ratten sogenannte Place Cells entdeckt, welche räumliche Informationen kodieren. Es wurde daraus das Konzept

einer kognitiven Karte entwickelt [O'Keefe 1971]. Neben Place Cells wurden in den letzten Jahren weitere Zelltypen zur räumlichen Orientierung in Hippocampus-assoziierten Arealen identifiziert, die Grid Cells und Head Direction Cells [Moser 2008].

Zusammenarbeit zwischen Präfrontalem Kortex und Hippocampus

Durch Studien an Affen rückte auch der Präfrontale Kortex in den Interessenfokus als wichtiger Ort für die Funktion des Arbeitsgedächtnisses [Courtney 1998].

Einige Vorstellungen zur Funktionsweise des Arbeitsgedächtnisses gehen davon aus, dass eine Arbeitsteilung in der zeitlichen Domäne zwischen Hippocampus und Präfrontalen Kortex stattfindet: Sobald Gedächtnisinhalte länger als Sekunden in Anspruch nehmen, würde die mittel- bis langfristige Verarbeitung vom Präfrontalen Kortex in den Hippocampus verschoben [Yoon 2008].

Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass unterschiedliche Arten von Informationen im Präfrontalen Kortex und Hippocampus verarbeitet werden [Yoon 2008] und dass die Rolle des Präfrontalen Kortex weniger in Bezug auf die zeitliche Länge der Informationsaufnahme im Rahmen der Gedächtniskonsolidierung steht, sondern eher in Bezug zu der kontextbezogenen Sortierung von Eingängen aus dem Hippocampus [Preston 2013].

Wegen der guten Trainierbarkeit und der verhältnismäßig einfach durchzuführenden Versuchsaufbauten mit Labyrinthen sind in Bezug auf das räumliche Arbeitsgedächtnis besonders viele Experimente an Ratten durchgeführt worden; hierbei belegen sowohl elektrophysiologische Untersuchungen als auch Läsionsstudien, dass eine Zusammenarbeit zwischen Hippocampus und Präfrontalem Kortex abläuft. So wurden sowohl bei Läsionen des Hippocampus als auch des Präfrontalen Kortex Defizite des Arbeitsgedächtnisses beschrieben, wobei die Wahl der jeweiligen Unterregion, in der die Läsion gesetzt wurde, deutlichen Einfluss auf die Ausprägung des Defizits hatte [Kesner 1996] [Floresco 1997]. Bei der Untersuchung der elektrophysiologischen rhythmischen Aktivitäten von Hippocampus und Präfrontalem Kortex während solcher Tests des räumlichen Arbeitsgedächtnisses wurde synchrone Aktivität des Präfrontalen Kortex und des Hippocampus in einem Theta-Rhythmus beschrieben, wobei die Synchronität mit der Leistung während der Experimente korrelierte [Jones 2005] [Molter 2012] [O'Neill 2013].

Im Zusammenhang mit der Kommunikation beider Hirnregionen ist die Frage der synaptischen Verbindungen zwischen diesen beiden Regionen von Bedeutung. Während vom Hippocampus ausgehend ein monosynaptischer Pfad mit Informationsfluss hin zum Präfrontalen Kortex beschrieben wurde, wird ein monosynaptischer Pfad vom Präfrontalen Kortex zurück zum Hippocampus noch diskutiert, wobei ein Kandidat eines solchen Pfades ausgehend vom dorsalen Anteil des Anterioren Zingulären Kortex zu Pyramidenzellen in CA1 und CA3 des dorsalen Hippocampus von Rajasethupathy et al. beschrieben wurde [Vertes 2007] [Aggleton 2014] [Rajasethupathy 2015].

Der Nukleus Reuniens als Puzzlestück

Eine andere Theorie bezieht sich auf die Möglichkeiten eines bisynaptischen Pfades vom Präfrontalen Cortex zurück zum Hippocampus. Ein Kandidat für eine Relaisstation für eine solche bisynaptische subkortikale Route stellt der Nukleus Reuniens des Thalamus dar [Xu 2013].

Der Nukleus Reuniens ist ein Kerngebiet des Mittellinien-Thalamus. Im Menschen entspricht er dem Nukleus Endymalis bzw. einem Teil des medioventralen Nukleus (The Human Nervous System (Third Edition), 2012). Es sind weitreichende afferente und efferente Verbindungen in das gesamte Gehirn beschrieben worden, vor allem ins limbische System [Vertes 2015]. In Experimenten an Ratten ist herausgefunden worden, dass der Nukleus Reuniens an Zirkadianer Rhythmik, Arousal, Stress, Nahrungsaufnahme, Reproduktion und Schmerzreizen beteiligt ist. Eine weite Übersicht bietet „The Reuniens and Rhomboid Nuclei: Neuroanatomy, Electrophysiological Characteristics and Behavioral Implications“ [Cassel 2013].

Der Nukleus Reuniens rückt als Kandidat für einen bisynaptischen Pfad zwischen Präfrontalen Kortex und Hippocampus in den Fokus, da in Studien mit anterograden und retrograden Tracern in Ratten direkte monosynaptische afferente Verbindungen zum Nukleus Reuniens vom Präfrontalen Kortex als auch direkte monosynaptische Efferenzen vom Kerngebiet zum Hippocampus beschrieben worden sind [Herkenham 1978] [Cassel 2013] [McKenna 2004] [Vertes 2002]. Der Mittellinienthalamus, zu dem der Nukleus Reuniens gehört, bildet den thalamohippocampalen Hauptinput in CA1 des Hippocampus [Vertes 2007]. Der Nukleus Reuniens sendet dort Fasern an Dendriten von Pyramidenzellen, die im Stratum Lacunosum Moleculare lokalisiert sind [Cassel 2013].

Gerade auch in Hinblick auf das räumliche Arbeitsgedächtnis, an welchem Hippocampus und Präfrontaler Kortex beteiligt sind, zeigten sich Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung des Nukleus Reuniens auf Präfrontalen Cortex und Hippocampus:

So sind Auswirkungen von Läsionen des Nukleus Reuniens auf die Kohärenz der Theta Synchronisation zwischen Präfrontalem Kortex und Hippocampus beschrieben worden, was auf eine modulierende Eigenschaft des Nukleus Reuniens auf diese Oszillationen und auf die Funktionen von Hippocampus und Präfrontalem Kortex in Bezug auf das räumliche Arbeitsgedächtnis hinweist [Kafetzopoulos 2018].

Passend zu diesen Funden ist ein 2-5Hz Netzwerk zwischen Präfrontalem Kortex, Nukleus Reuniens und Hippocampus gefunden worden, welches parallel zur Theta-Kupplung von Präfrontalen Cortex und Hippocampus zu funktionieren scheint [Roy 2017].

Die Bedeutung des Nukleus Reuniens für die Zusammenarbeit von Hippocampus und Präfrontalen Kortex wird auch durch Experimente von Hembrook et al. unterstrichen, in denen mit dem GABA-Agonisten Muscimol der Nukleus Reuniens deaktiviert wurde, was in Defiziten des räumliche Arbeitsgedächtnisses in Tests resultierte, welche die gemeinsame Aktivität des Präfrontalen Kortex und Hippocampus in Bezug auf das räumliche Arbeitsgedächtnis testeten. Die Deaktivierung des Nukleus Reuniens führte jedoch nicht zu Defiziten in Versuchsaufbauten, welche nur die Funktion des Hippocampus in Bezug auf das räumliche Arbeitsgedächtnis prüften [Hembrook 2012] [Prasad 2017]. Dies passt zu Auswirkungen von Läsionen des Nukleus Reuniens auf das räumliche Arbeitsgedächtnis, welche in Läsionsstudien von Barker et al. und Hallock et al. [Barker 2018] [Hallock 2013] beschrieben worden sind.

In anderen Experimenten zeigten Läsionen des Nukleus Reuniens Leistungssteigerungen der exekutiven Funktionen, welche dem Präfrontalen Kortex zugeschrieben werden [Prasad 2017]. Passend zu dieser Bedeutung in Bezug auf das räumliche Arbeitsgedächtnis und exekutiven Funktionen sind analog zu Funden von Head Direction Cells im Hippocampus und Präfrontalen Cortex auch Head Direction Cells im Nukleus Reuniens nachgewiesen worden [Jankowsky 2014].

Weitere Hinweise auf eine funktionelle Rolle des Nukleus Reuniens in Verbindung mit dem Hippocampus und dem Präfrontalen Kortex neben dem räumlichen Arbeitsgedächtnis sind

Funde, die modulierende Eigenschaften des Nucleus Reunians auf die Kontrolle von dopaminergen Regionen durch Hippocampus und Präfrontalen Kortex beschreiben [Zimmermann 2016] sowie Funde bei Läsionen des Nucleus Reunians, welche ähnliche antidepressive Wirkungen wie Läsionen des Präfrontalen Kortex zeigten [Kafetzopoulos 2018].

Mäuse in der Gedächtnisforschung

Ein großer Teil der Gedächtnisforschung hat an Ratten stattgefunden, da sie sich gut für Verhaltensexperimente eignen.

Allerdings stellen heute Mäuse das wichtigste Tiermodell in der Gedächtnisforschung dar. Gerade auch in Hinblick auf Inaktivierung oder Aktivierung von molekularen und neuronalen Signalwegen stehen bei Mäusen auf Grund ihrer genetischen Zugänglichkeit Möglichkeiten zur Verfügung, die noch nicht bei Ratten in äquivalenter Form und Anwendungsbreite verfügbar sind. Ein Beispiel dafür sind optogenetische Manipulationen von spezifischen Nervenzellen und neuronalen Verbindungen [Kramer 2009]. Dabei werden über genetische Methoden molekulare Werkzeuge (z.B. Channelrhodopsine oder Halorhodopsine) in genetisch definierten Nervenzelltypen exprimiert, so dass diese selektiv durch Lichtapplikation im Gehirn in ihrer Aktivität moduliert werden können [Miesenböck 2009]. Damit ist es möglich, in vivo Verhaltensexperimente durchzuführen, während man neuronale Pfade wahlweise aktivieren oder deaktivieren kann.

Ein anderes Beispiel sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch Mutationen pharmakologisch sehr selektiv konzipiert worden sind. Auf diese Weise können Zellen gezielt in vivo beeinflusst werden [Wulff 2012].

Diese modernen Methoden erlauben die funktionelle Dissektion neuronaler Schaltkreise, die an der Gedächtnisbildung beteiligt sind, und haben die Maus zu einem wichtigen Modellorganismus in der Gedächtnisforschung gemacht.

Tracing zur Darstellung neuronaler Verbindungen

Ein Tracer ist ein Stoff, der von einer Zelle aufgenommen wird und benutzt werden kann, um den Verlauf dieser Nervenzelle zu visualisieren.

Nervenzellen haben eine bestimmte Informationsflussrichtung. Eingangssignale kommen an den Dendriten an, am Axonhügel wird das Aktionspotential bei Überschreiten des Schwellenwertes ausgelöst und läuft danach das Axon entlang. Die Signalübertragung erfolgt

in der Regel über Neurotransmitter von einer Nervenzelle zu den Dendriten der nächsten Nervenzelle.

Ein Tracer, der in die Nervenzelle eingebracht wird und analog zur Flussrichtung vom Zellkörper Richtung Axon zu den Synapsen wandert, beispielsweise durch Ausnutzen der intrazellulären Transportwege entlang des Zytoskelettes, wird anterograde Tracer genannt. Ein Tracer, der den umgekehrten Weg nimmt, also flussaufwärts entgegen der Informationsflussrichtung, wird retrograde Tracer genannt.

Als Tracer, die in den Nucleus Reunians injiziert wurden, wurden bisher Meerrettichperoxidase [Herkenham1978] und Fluorogold [McKenna2004] [Cavdar 2008] sowie Phaseolus vulgaris leucoagglutinin [Wouterlood 1990] verwendet.

Bei Meerrettichperoxidase handelt es sich um einen retrograden Tracer. In der Regel erfolgt die Injektion mit einer Glaspipette; die Injektion kann mittels Mikroiontophoretik erfolgen. Die Gehirnschnitte werden in Diaminobenzidin inkubiert, um die Nervenzellen unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können [Aghajanian 1977]. Allerdings verblassen die Ergebnisse relativ schnell und der Farbstoff diffundiert aus den markierten Nervenzellen [Schmued 1986].

Bei Phaseolus vulgaris leucoagglutinin handelt es sich um einen Tracer, der per Mikroiontophorese appliziert wird. Der Druck während der Injektion hat Einfluss darauf, ob es sich um eine anterograde oder retrograde Darstellung der Nervenzelle handelt, es wird ebenfalls eine Inkubation mit Diaminobenzidin verwendet [Shu 1988].

Bei Fluorogold handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff mit retrograden Eigenschaften. Er hat einige Vorteile gegenüber Meerrettichperoxidase: Der Farbstoff verblasst nicht so schnell und es kommt nicht zu einer Diffusion des Farbstoffs aus den Nervenzellen. Eine Inkubation nach der Herstellung der Schnitte ist nicht notwendig [Schmued 1986].

Ziel der Arbeit

Der Nucleus Reunians stellt eine zentrale Schaltstelle zwischen Hippocampus und Präfrontalem Kortex dar und ist damit in eine Vielzahl von kognitiven und mnestischen Prozessen eingebettet. Unser Wissen über die anatomischen Verbindungen des Nucleus Reunians stammt fast ausschließlich aus Studien, die an Ratten durchgeführt wurden. In der

modernen Gedächtnisforschung ist jedoch die Maus zunehmend zum wichtigsten Modellorganismus avanciert. Dies ist Ihrer genetischen Zugänglichkeit geschuldet, die es ermöglicht, molekulare Signalkaskaden und neuronale Verbindungen selektiv auf Ihre Funktion zu untersuchen.

In dieser Studie sollten die afferenten Verbindungen des Nucleus Reunians in der Maus untersucht werden, um Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Spezies Maus und Ratte aufzuzeigen. Ein besonderer Fokus stellen dabei die Verbindungen mit dem Hippocampus und dem Präfrontalen Kortex dar. Zur Detektion von Hirnregionen, die Projektionen zum Nucleus Reunians senden, sollte der retrograde Farbstoff Fluorogold verwendet werden.

An diese Experimente sollte sich ein eingehender Vergleich der erhobenen Befunde mit den aus der Literatur bekannten Verbindungen der Ratte anschließen. Durch diese Studie soll eine Basis geschaffen werden, um die Zusammenarbeit zwischen Präfrontalem Kortex und Hippocampus und deren Beeinflussung durch andere Hirnregionen genauer erforschen zu können.

Materialien und Methoden

Mäuse

Es wurden insgesamt 16 Mäuse unterschiedlichen Geschlechts mit dem genetischen C57/Bl6j Hintergrund verwendet. Die Mäuse hatten ein minimales Alter von 3,5 Monaten und ein maximales Alter von 4 Monaten, um zu gewährleisten, dass die Hirnstrukturen voll ausgebildet waren. Die Mäuse wurden vor und nach der Operation ad libitum mit Wasser und Essen versorgt. Der Erfolg und die Präzision der stereotaktischen Tracer Injektion (siehe unten) wurden in den hergestellten Schnitten im Abgleich mit der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ überprüft. Die Bedingung für den Einschluss in die Studie war eine Verteilung des Fluorogold-Tracers begrenzt auf den Nucleus Reunien, ohne Mitinjektion von Nachbarregionen.

In dieser Studie werden 5 Mäuse, 2 Männchen und 3 Weibchen, vorgestellt, die hinsichtlich der Applikation des Fluorogold-Tracerdepots im Nucleus Reunien die größte Präzision zeigten.

Stereotaktische Applikation des Fluorogold-Tracers in den Nucleus Reunien

Narkose

Vor Beginn der Operation wurde in einer kleinen Plexiglas-Kammer mit 3% Isofluran (IsofluranBaxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) mit Hilfe eines Isofluran-Verdampfers (IsoFlo, Eickemeyer KG, Tuttlingen) eine Narkose induziert, die während der Operation mit Hilfe einer Gesichtsmaske bei 1,5% Isofluran aufrechterhalten wurde. Eine Analgesie erfolgte mit 0,001ml/g Körpergewicht Temgesic s.c. (Buprenorphinhydrochlorid, 0,3mg Buprenorphin pro ml, Indivior Eu Limited, Berkshire, Großbritannien), gelartige Augentropfen (Bausch + Lomb Vidisic Augengel, 2mg Carbomer, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland) wurden gegen das Austrocknen der Augen verwendet. 0,5ml Ringer Lösung s.c. (Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland) wurden appliziert, um den intraoperativen Flüssigkeitsverlust auszugleichen.

OP Durchführung

Nach Einleitung der Narkose wurde den Mäusen das Kopffell rasiert, um einen sauberen OP-Zugang zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Maus in dem Stereotaktischen Apparat

positioniert (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) (Abb. 1). Der Kopf wurde mit einem festpositionierten Beißkeil (Abb. 3 (A)) mit einem Loch zur Positionierung der oberen Schneidezähne fixiert. Nach dem Positionieren des Kopfes im Stereotakt mit Hilfe der Ohrenstützen wurde der Kopf möglichst horizontal eingestellt. Nach der Positionierung des Kopfes wurde die Kopfschwarte mit einem Skalpell eröffnet und die Schädeldecke freigelegt, wobei auf eine gute Sichtbarkeit der Suturenschnittstellen Bregma und Lambda geachtet wurde. Die Haut wurde mit Klammern aus dem Sichtfeld gehalten. Die Schädeldecke wurde mit Ringerlösung gesäubert. Die Nadel im Stereotakt (Abb. 2) wurde auf Bregma eingestellt und die Koordinaten genullt. Anschließend wurde eine Kontrollmessung mit Lambda durchgeführt, wobei der Höhenunterschied zwischen Lambda und Bregma kleiner als 0,2mm sein musste, um eine horizontale Lagerung des Kopfes zu gewährleisten.

Danach wurde die Injektionsnadel auf den korrekten Winkel eingestellt und die Koordinaten der Injektionsstelle ausgemessen, auf die Kalotte projiziert und dort markiert. An den markierten Stellen wurden mit Hilfe eines zahnmedizinischen Bohrers (Microtorque II mit Tech2000 Handbohrer, Aufsatz 0,5mm, Jan L Co. Inc., Mount Holly, USA, Abb. 1 (F)) kleine Löcher gebohrt, wobei darauf geachtet wurde, das unter der Kalotte liegende Hirnparenchym nicht zu beschädigen. Anschließend wurde der Schädel mit Ringerlösung vom Knochenstaub gereinigt.

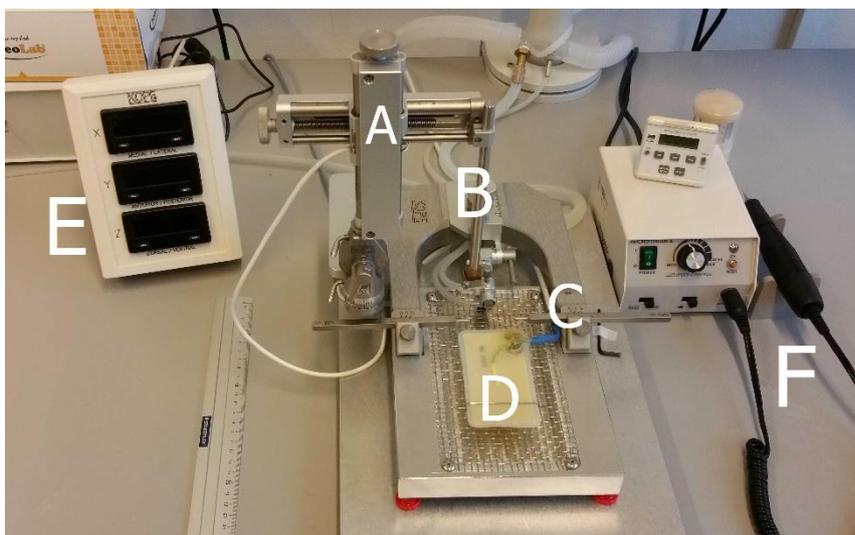
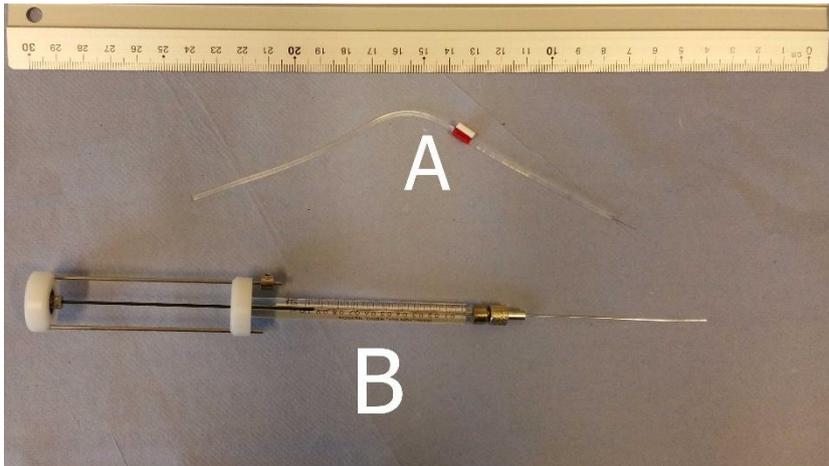
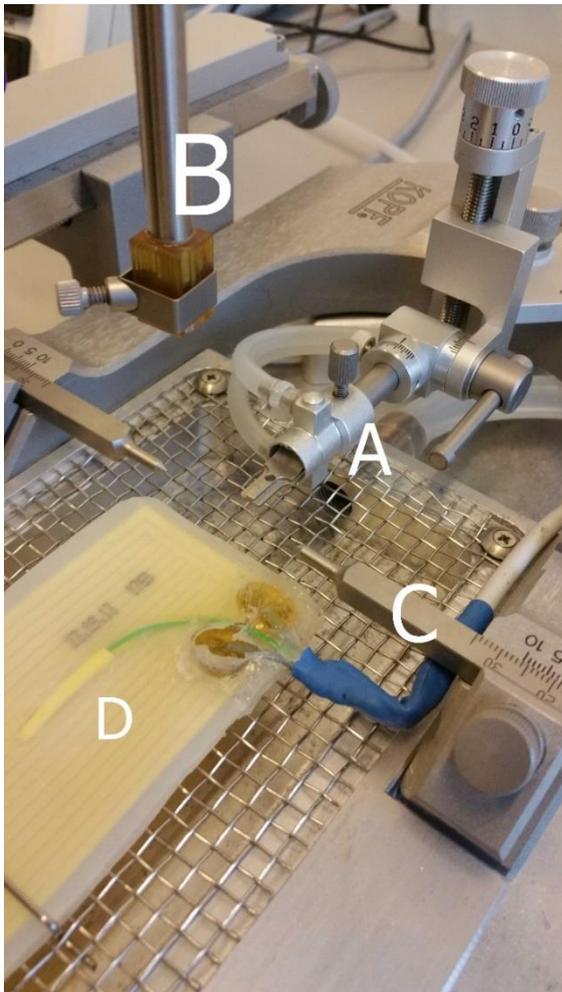


Abbildung.1 Aufbau des Operationsplatzes mit Stereotakt (A), Injektionsnadelhalterung (B), Ohrhalterungen (C), Heizmatte (D), digitale Abstandsanzeige des Stereotakt (E) und Bohrer (F)



Oben: Abbildung 2: Injektionsnadel mit Gummischlauch (A) und 1µl Spritze (B), wie sie für die Injektion verwendet wurden.



Links: Abbildung 3: Detailaufnahme des Stereotaktes mit kombinierter Sauerstoffzufuhr, Bißfläche für Schnauze, und Sauerstoffmaske(A), Nadelhalterung(B), Ohrhalterungen (C) und Heizmatte (D)

Danach erfolgte die Vorbereitung des Injektionssystems: Eine Metallnadel (Stumpfe Nadelspitze, Länge ca. 1cm, Kaliber 33 Gauge, Wanddicke 0,051mm, Durchmesser außen 0,210mm, Durchmesser innen 0,108mm, Hamilton Germany GmbH, Deutschland, Abb. 2(A)). wurde mit einem dünnen Gummischlauch (Wanddicke 0,91mm, Durchmesser innen 0,19mm, Erich Eydam KG, Kiel, Abb. 2(A)) an eine kochsalzgefüllte Injektionsspritze (Stumpfe Nadel, 1µl,

Kaliber 25ga, Hamilton Company, Reno, USA, Abb. 2(B)) angeschlossen und das Fluorogold (4% Fluorogold-Lösung in 0,9% Kochsalzlösung; FluoroChrome, LLC, Denver, USA) vorsichtig aufgezogen.

Es wurde darauf geachtet, dass zwischen dem Kochsalz und dem Fluorogold eine sehr kleine Luftblase steht, um ein Vermischen beider Flüssigkeiten zu verhindern und einen Positionsindikator für die Bewegung des Farbstoffs während der Injektion zu haben.

Das mit Fluorogold geladene Injektionssystem wurde in der Nadelhalterung (siehe Abb. 3, B) im Stereotakt fixiert. Die Nadel wurde anschließend in das Bohrloch gesenkt und auf Dura-Niveau gebracht. Anschließend wurde die Z-Koordinate für die Tiefenangabe genullt, um von der Dura aus den Tiefenstand der Nadel zu messen. Die hier verwendeten Koordinaten nach Bregma zur Injektion des Nucleus Reunians waren: Anterior/Posterior: -0,82; Lateral: -1,65 bis -1,55; Tiefe: -4,5 mm (von Dura aus); Winkel: Alpha 17°. Nachdem die Durchgängigkeit der Nadel sichergestellt worden war, wurde sie langsam in das Gehirn vorgeschoben. Das Einbringen zur Zielregion erfolgte langsam, um die mechanischen Schäden gering zu halten. Nach dem Erreichen der Zieltiefe wurde eine Minute lang gewartet, um dem Hirnparenchym etwas Zeit zu geben, sich von eventuell durch das Eindringen der Nadel verursachte mechanische Spannungen zu erholen und so eine korrekte Position der Nadel zu gewährleisten.

Es wurden 0,1-0,2µl der 4%igen Fluorogold-Lösung langsam über einen Zeitraum von fünf Minuten injiziert. Anschließend wurde weitere fünf Minuten gewartet, die Nadel 0,1 mm zurückgezogen und erneut eine Minute gewartet, um die vollständige Applikation des Tracerdepots zu gewährleisten und außerdem einen Rückfluss des Tracers in den Injektionskanal zu verhindern.

Ausleitung der Narkose

Nach Entfernen der Nadel wurde die Injektionshalterung entfernt. Die Klammern und Ohrstützen wurden entfernt, die Kopfhaut wurde mit Einzelknopfnähten (resorbierbares Nahtmaterial, Ethicon Coated Vicryl, Fadenstärke 1 Ph. Eur., Nadeltyp TF-1 Plus, ½ Kreis, Bogenlänge 10mm, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland) zugenäht. Gegen Ende des Nähens wurde die Ausleitung der Narkose eingeleitet, indem die Isofluran-Dosis langsam reduziert wurde. Sobald die Naht beendet war,

wurde der Kopf aus der Beißkeilhalterung genommen. Die Schnauze der Maus wurde nah an den Sauerstoffkanal gelegt, bis die Maus aufgewacht war. Der Käfig der Maus wurde mit Papier ausgelegt, damit das Risiko einer Verunreinigung der Wunde mit Käfigstreu minimiert wurde. Der Käfig der Maus wurde auf eine Heizmatte positioniert.

Nach dem Aufwachen wurde die Maus zurück in ihren Käfig gesetzt. Sobald sie sich wieder frei bewegte, wurden ihr Wasser und Futter ad libitum angeboten und der Käfig wurde zurück ins Lagerungsregal im Tierraum gebracht. Die Wundheilung und der postoperative Zustand der Tiere wurden täglich kontrolliert. Während die Haltung der Mäuse vor der Operation in kleinen Gruppen erfolgte, wurden die Tiere nach der Operation einzeln gehalten, um eine ungestörte Wundheilung zu ermöglichen.

Perfusion

Minimal 10 Tage, maximal 12 Tage nach der Operation wurden die Mäuse in terminaler Anästhesie mit 50mg/30g KG Narcoren (Pentobarbital-Natrium, 16g/100ml Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) intraperitoneal transkardial perfundiert, um die Gehirne zu entnehmen.

Herstellung von Paraformaldehyd und phosphatgepufferter Kochsalzlösung für die Perfusion

Eine 4%ige Paraformaldehydlösung und eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung wurden vorbereitet, jeweils ca. 100ml pro Maus.

Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurde hergestellt, indem aus der 10-fach konzentrierten PBS-Lösung (10X Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) mit destilliertem Wasser eine einfach verdünnte Lösung hergestellt wurde. Es wurden ca. 100 ml pro Maus benötigt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Das Paraformaldehyd (PFA) wurde hergestellt, indem 20g PFA-Granulat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in 200 ml destilliertem Wasser gelöst wurden. Dabei wurde die Temperatur nicht über 60°C erhöht und dabei kontinuierlich gerührt. Bei 40°C wurden 10 Tropfen 10M Natriumhydroxid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) dazugegeben, bei 50°C ebenfalls 10 Tropfen 10M Natriumhydroxid, um eine Lösung mit einem neutralen pH-Wert von 10 zu gewährleisten. Die Lösung wurde bei 4°C gekühlt gelagert.

Aus dieser Lösung wurde mit PBS eine 4%ige PFA-Lösung hergestellt. Der pH-Wert der Lösung wurde anschließend kontrolliert und auf 7,4 eingestellt, wobei ein zu niedriger pH-Wert mit Tropfen von Natriumhydroxid und ein zu hoher pH-Wert mit verdünnter Salzsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) unter kontinuierlicher Messung ausgeglichen wurde. Der pH-Wert durfte maximal 0,2 von 7,4 abweichen.

Perfusionsvorbereitung

Die Perfusion wurde vorbereitet, indem am Perfusionsplatz unter einer Abzugshaube Korkbrett, Papierunterlage, Ablaufschüssel, Pumpe, Scheren, Pinzetten, Butterfly-Nadel, Autoklavier-Beutel und Auffangbehälter für PBS und PFA bereitgelegt wurden. Die Korkauflage wurde so auf der Ablaufschüssel positioniert, dass Flüssigkeit von der Korkplatte in die Schüssel ablaufen konnte. Der Entnahmeplatz wurde ebenfalls aufgebaut mit einer Papierunterlage, Beutel, Schere zum Dekapitieren der Mäuse, Pinzette, Scheren und kleinem Löffel.

Es wurden kleine Glasbehälter für die Gehirne vorbereitet und zur Hälfte mit 4%iger PFA gefüllt, mit der entsprechenden Mausnummer beschriftet und auf Eis gestellt.

Die Pumpe (Ismatec Reglo Analog, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) wurde mit einem passenden Schlauch (Innendurchmesser 2,79mm, Wanddurchmesser 0,85mm, Erich Eydam KG, Kiel, Deutschland, Abb. 4) bestückt. An das flussabwärts gelegene Ende des Schlauches wurde eine Schlauchverlängerung (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland, Abb. 4) und eine Butterfly-Nadel (Venofix Safety, 30 cm Schlauchlänge, 23 Gauge, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und an das andere Ende ein T-Stück mit Schaltung (BD Connecta 3-Wege-Hahn mit Verlängerungsschlauch, Füllmenge 0,8 ml, 10cm Schlauchlänge, Abb. 4) angebracht. An das T-Stück wurden zwei weitere Schlauchverlängerungen (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland, Abb. 4) angeschlossen, an die jeweils zwei Pipettiergefäße (Serologische Pipette, 5ml, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland, Abb. 4) befestigt wurden.

Ein Pipettiergefäß führte in das PFA-Gefäß, das andere Pipettiergefäß in das PBS-Gefäß. Das Schlauch-System wurde vorbereitet, indem zuerst so viel PFA aus dem Gefäß gepumpt wurde, dass der Schlauch aus dem PFA-Gefäß bis zum T-Stück gefüllt war. Anschließend wurde dieser Schlauchteil durch Einstellung des T-Stücks verschlossen. Abschließend wurde der Rest des

Schlauchsystems mit PBS ausgewaschen und vollgepumpt, sodass keine Luftblasen mehr im System waren. Danach wurde die korrekte Einstellung des T-Stücks überprüft, damit nur PBS gepumpt wurde.

Narcoren wurde in eine Spritze aufgezogen. 0,3ml pro Maus wurden mit einer kurzen Nadel intraperitoneal injiziert. Die Menge des benutzten Narcoren wurde im Anästhesie-Logbuch notiert.

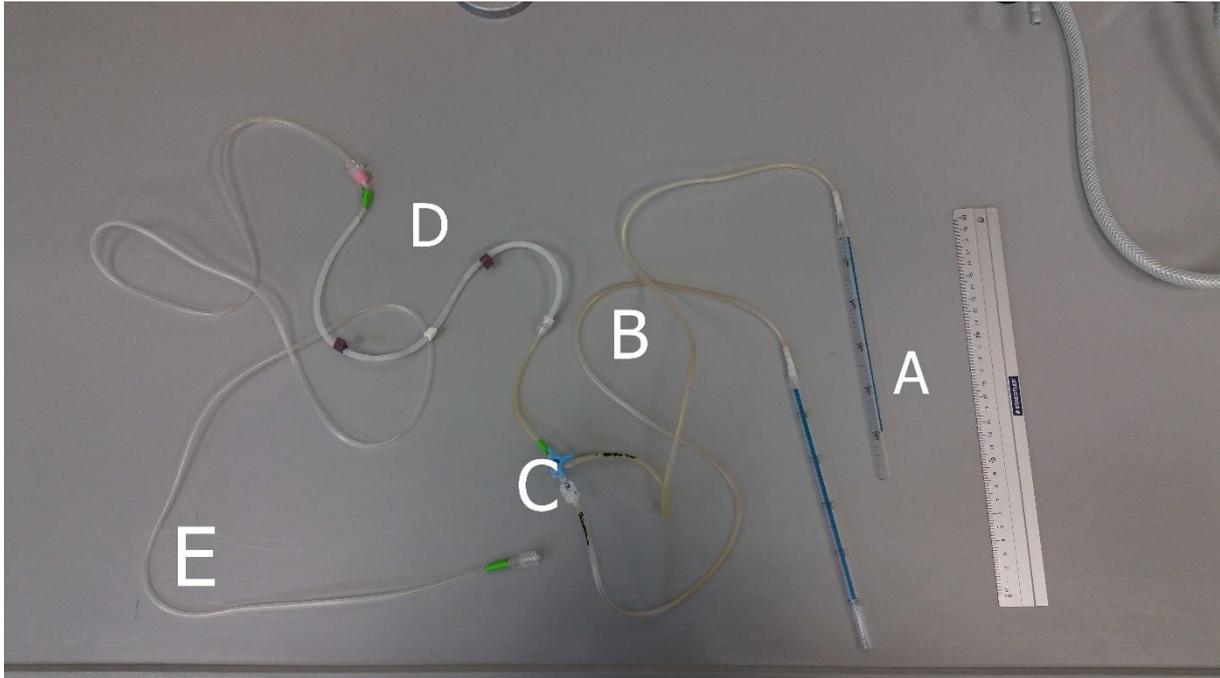


Abbildung 4 Perfusionsschläuche mit Pipetten (A), kurzen Verlängerungen (B), T-Stück (C), Schlauch für die Pumpe (D) und großem Verlängerungsschlauch (E)

Ablauf der Perfusion

Die Mäuse wurden jeweils einzeln mit 0,3 ml Narcoren i.p. injiziert und in ihren Käfig zurückgesetzt, bis sie vollkommen anästhesiert waren. Dies wurde überprüft, indem mit Kneifen in die Pfoten Abwehrreaktionen getestet wurden.

Nachdem die jeweilige Maus vollständig anästhesiert war, wurde sie mit Nadeln in die vier Pfoten auf die Korkplatte gepinnt.

Unter dem Sternum wurde die Inzision gesetzt und beidseits paracostal das Abdomen eröffnet, um Zugang zum Diaphragma zu erhalten, welches durchgeschnitten wurde. Das Sternum wurde mit einer Nadel zurückgehalten, um das Herz freizulegen.

Mit den Pinzetten wurde die Spitze des Herzens gegriffen, die Butterfly-Nadel wurde in den linken Ventrikel gestochen. Die Pumpe wurde angeschaltet und das Atrium dextrum mit einer kleinen Schere aufgeschnitten, damit Blut und eingepumpte Flüssigkeiten ablaufen konnten.

Es wurde zuerst eine Minute lang mit PBS perfundiert, das Blut wurde mit zwei Tüchern aufgefangen. Danach wurde das T-Stück umgestellt, sodass nur das PFA von der Pumpe gefördert wurde. Es wurde für 12 Minuten mit ca. 100ml PFA perfundiert; in dieser Zeit wurde das ablaufende PFA im Auffangbehälter gesammelt. In der Regel fing nach drei bis vier Minuten der Schwanz der Maus an zu zucken, was ein Hinweis für eine erfolgreiche Perfusion war. Ein weiterer Indikator für eine erfolgreiche Perfusion war eine deutliche Entfärbung der Leber am Ende der Prozedur.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Pumpe ausgeschaltet, die Nadel aus dem Herzen entfernt und in einen Glasbehälter gehalten, um die Schläuche anschließend durch Durchpumpen mit PBS zu reinigen.

Entnahme der Gehirne

Am vorbereiteten Arbeitsplatz wurden die Mäuse mit einer Schere dekapitiert, die Kadaver wurden in einem Beutel gelagert, um sie nach dem Ende der Prozedur im Tierhaus zu entsorgen. An den Köpfen wurde die Nackenmuskulatur durchschnitten und die Kopfhaut eröffnet, um die Schädeldecke freizupräparieren. Mit einer spitzen Schere wurde die Schädeldecke entlang der Sutura Sagittalis eingeritzt. Im Halsbereich wurden links und rechts sowie mittig im Verlauf der Sutura Sagittalis die Schädeldecke vorsichtig eingeschnitten. Anschließend wurde möglichst weit rostral im Bereich der Bulbi olfactorii die Schädeldecke punktiert und mit der Schere die Schädeldecke entlang der Einritzung vorsichtig aufgedehnt, sodass das Gehirn offen lag. Die Hirnnerven wurden mit dem Löffel vorsichtig durchtrennt und das Gehirn in den jeweils vorgesehenen Glasbehälter mit PFA eingelegt.

Lagerung und Fixation der Gehirne

Die präparierten Gehirne wurden für 3 - 5 Stunden in 4%ige PFA-Lösung auf einem Schwenker bei 4°C postfixiert. Danach wurden die Gehirne in eine 30%ige Sukrose/PBS-Lösung (Normapur AnalaR sucrose, VWR International Ltd., Lutterworth, England) für 24 – 48 Stunden eingelegt und so kryoprotectiert. Um die Gehirne verarbeiten zu können, wurden sie schließlich in kleine Schalen mit Shandon M-1 Embedding Matrix (Thermoscientific, Fisher

Scientific GmbH, Schwerte) gepackt und in einem Gefrierschrank mit -80°C Innentemperatur (New Brunswick Scientific U570 Premium, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) eingefroren. Die Gehirne in der Embedding Matrix wurden aus den Schalen genommen und in entsprechend beschrifteten Plastikbeuteln im Gefrierschrank bis zur Verarbeitung gelagert.

Herstellung von Schnitten im Kryostaten

Zur Herstellung koronarer Hirnschnitte wurden die Gehirne in einem Kryostaten (Leica CM 3050s, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, Deutschland) bei -20°C Kammer-Temperatur und -19°C Objekt-Temperatur in $16\ \mu\text{m}$ starke Scheiben geschnitten. Schnitte wurden von Bregma 4 bis -6 angefertigt. Die Schnitte wurden auf Polysine-beschichteten Objektträgern (Thermoscientific Polysine Slides Menzel-Gläser, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) aufgefangen, wobei 10 - 12 Schnitte pro Träger aufgenommen wurden. 6 Objektträger wurden zu einem Set zusammengefasst. Aufeinander folgende Schnitte wurden jeweils an der gleichen Position eines neuen Trägers aufgebracht. Sobald eine Position im Set vollständig belegt war, wurde die nächste Position nach und nach befüllt. Der Abstand im intakten Gehirn zwischen zwei benachbarten Schnitten auf einem Träger lag daher bei $96\ \mu\text{m}$ ($6 \times 16\ \mu\text{m}$). Sobald 6 Träger voll waren, wurden 6 neue Träger genommen und ein neues Set gebildet. Pro Maus kamen auf diese Weise jeweils 5 - 6 Sets zustande. Anschließend wurden die Schnitte auf den Objektträgern bei 4°C gelagert, bis sie mit $100 - 130\ \mu\text{l}$ Merckoglass (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder Mowiol/Dabco unter einem Deckglas fixiert wurden. Während die ersten Schnitte noch mit Mowiol/Dabco fixiert worden sind (N21 und N22) wurde bei späteren Experimenten Merckoglass verwendet (N41, N43 und N44). Bei einem Vergleich von mit Merckoglass und Mowiol/Dabco fixierten Schnitten unter dem Fluoreszenzmikroskop fiel auf, dass Mowiol/Dabco fixierte Schnitte eine veränderte Emissionswellenlänge aufwiesen. Die Analyse und Auswertung war mit beiden Präparationsmethoden gleichwertig möglich, zur besseren Vergleichbarkeit mit zukünftigen Analysen wurde jedoch auf Merckoglass gewechselt.

Herstellung von Mowiol/Dabco

Zur Herstellung von Mowiol/Dabco wurden zu 6g Glycerin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 2,4g Mowiol 4-88 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 6 ml destilliertes Wasser zugegeben, wobei jeweils nach Zugeben für eine Stunde bei

Raumtemperatur gerührt wurde. Danach wurden 12 ml 2M Tris-Hydrochlorid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit einem pH-Wert von 8,5 dazugegeben und die Mischung bei 50°C inkubiert. Am Ende wurden 25 mg/ml Dabco (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) dazu gerührt und gelöst, bis die Lösung klar war. Die Lösung wurde in 2ml-Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

Auswertung der Schnitte im Fluoreszenzmikroskop

Jeweils eine Serie wurde danach unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss AxioImager M, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgemustert. Es wurde ein 10X Objektiv (EC Plan-Neofluar 10X, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Zur Aufnahme wurde ein Breitbandfilterset benutzt (Filterset 488002-9901, Exzitationswellenfilter G365 für Wellenlänge von ca. 325nm bis ca. 490nm, Strahlauhteilungsfiler FT 395 für Wellenlängen ab ca. 375nm, Emissionswellenfilter LP 420 für Emissionswellenlänge ab ca. 425nm, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Fluorogold besitzt eine Exzitationswellenlänge von 205nm bis 395nm und eine Emissionswellenlänge von 530nm bis 600nm. Als Software für die Bilddarstellung wurde ZEN Imaging Software (ZEN 2012, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) genutzt.

Signaldarstellung

Schnittdarstellungen der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ (George Paxinos, Keith B.J. Franklin (2001). “The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, second edition.” Academic Press) wurden zur Dokumentation der Funde mit Photoshop 7.0 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin Republic of Ireland) bearbeitet. Die Beschriftungen der Gehirngebiete wurden aus dem Atlas übernommen und sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt, zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorhergehenden Studien an Ratten wurden die englischen Bezeichnungen beibehalten. Die Anzahl und Dichte der eingefügten Punkte in den Abbildungen quantifizieren die subjektiv im Vergleich mit den anderen Schnitten des jeweiligen Gehirns wahrgenommene Signaldichte in dem jeweiligen Gebiet als abgewandelte Form einer grafischen Ratingskala. Es wurden repräsentative Schnittdarstellungen ausgewählt, die Auswahl orientierte sich zur besseren Vergleichbarkeit an anderen Studien in Ratten [McKenna 2004].

Dieses Verfahren wurde als Ersatz zu einer direkten quantitativen Darstellung der markierten Zellen gewählt. Durch die Potenz des Fluorogold-Signals konnten die Zellen in Vorexperimenten häufig nicht überlagerungsfrei darstellbar gemacht werden, wodurch das direkte Auszählen der markierten Zellen nicht praktikabel durchführbar war.

Ergebnisse

Injektionsort

Es wurden bei allen Testsubjekten in einer OP stereotaktisch bei denselben Koordinaten Injektionen gesetzt. Es wurden 0,1- 0,2 µl der 4%igen Fluorogold-Lösung verwendet. 10 bis 12 Tage nach der OP wurden die Mäuse transkardial mit PFA perfundiert, die Gehirne wurden freipräpariert, in PFA postfixiert und mit einer Sukrose/PBS-Lösung kryoprotectiert. Danach wurden sie in einer Embedding Matrix bei -80°C eingefroren und eingelagert, bis sie im Kryostaten bei -20°C in koronale Schnitte von 16 µm Stärke präpariert wurden. Die Schnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Eine detaillierte Beschreibung der Abläufe findet sich im Kapitel Materialien und Methoden.

Der Zielort der stereotaktischen Injektionen war der Nukleus Reuniens des Thalamus, der durch seine tiefe ventrale Lage und geringe Größe nur relativ schwierig zu erreichen ist. Es wurde mit Hilfe der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ ein Injektionspfad bestimmt, bei welchem die Wahrscheinlichkeit das Ventrikelsystem oder den Sinus cavernosus zu penetrieren möglichst gering war: Ein Eindringen von Blut oder anderen Substanzen in den Liquorraum kann schmerzhaft für die Mäuse sein und Läsionen verursachen. Auch sollte so die Bildung von Liquorfisteln vermieden werden. Eine Fehl-injektion von Fluorogold in den Liquorraum kann zudem zu Fehlmarkierungen in dem den Liquorraum anliegenden Regionen führen [Szabados 1996]. Es wurden zur Justierung der Koordinaten in Vorexperimenten Mäuse gemäß dem im Kapitel Materialien und Methoden beschriebenen Ablauf injiziert und die Gehirne präpariert und für die Histologie aufbereitet. Die Injektionspfade wurden im Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Koordinaten für die stereotaktische Injektion entsprechend angepasst, bis der Nukleus Reuniens korrekt getroffen wurde. Für die Experimente wurden 16 Mäuse injiziert, wobei 5 Mäuse, die eine präzise Applikation des Fluorogold-Tracerdepots im Nucleus Reuniens aufwiesen, für die Analyse ausgewählt wurden. Einschlusskriterium war ein zentrales Injektionsdepot im Nucleus Reuniens mit geringer Ausdehnung in angrenzende Hirnregionen. Einen Beispielschnitt mit Visualisierung des Injektionsdepots sowie die Ausdehnung des Depots für die in die Studie eingeschlossenen Mäuse bietet Abbildung 5.

auf die rechte Hemisphäre in den Abbildungen. Trotz des einseitig gewählten Injektionspfades breitete sich das Fluorogold in beide Hälften des Nucleus Reunians aus, mit führender Tendenz in Richtung des Injektionspfades. Regionen, die relativ sicher Afferenzen zum Nucleus Reunians besitzen, sollten daher in beiden Hemisphären mit Fluorogold markiert worden sein. Im Folgenden werden die für die Analyse verwendeten koronaren Schnittebenen von rostral nach kaudal besprochen. Die genannten Regionen sind dabei sowohl ipsi- als auch kontralateral markiert worden, Ausnahmen werden im Text herausgestellt. Dabei werden nur Regionen besprochen, die in einer Mehrzahl der Testsubjekte zu finden waren. Sollten Regionen durch die Markierungen nicht leserlich sein, stehen die Vorlagen im Anhang zur Verfügung (Abb. 25 -38).

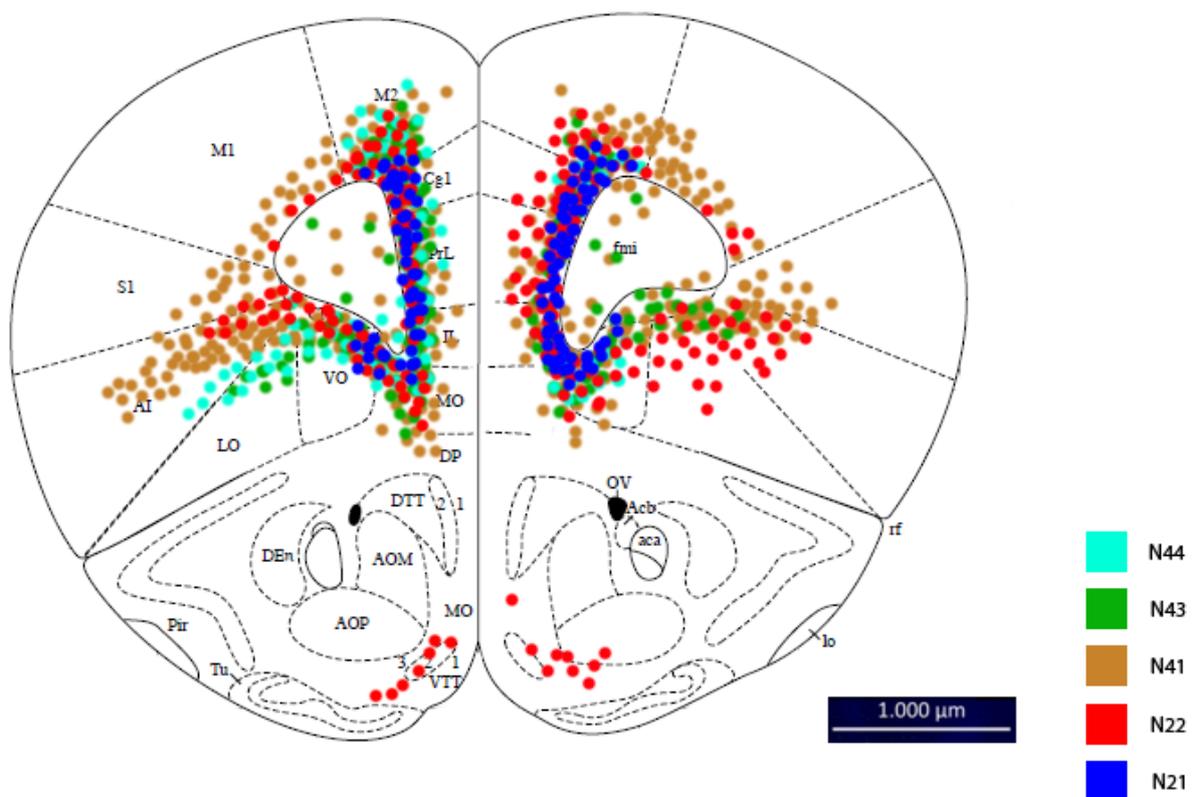


Abbildung 6 Ebene auf Höhe des Frontallappens aus der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ zur Darstellung der anatomischen Strukturen, PrL =Prälimbischer Kortex, II= Infralimbischer Kortex, MO = Medialer Orbitaler Kortex, VO = Ventraler Orbitaler Kortex, Cg1 = Zingulum Area 1, Schematische Darstellung der mit Fluorogold markierten Regionen (gekennzeichnet durch Punkte) der fünf in die Studie eingeschlossenen Mäuse (jede Farbe repräsentiert eine Maus). Um die Lesbarkeit zu gewährleisten, finden sich in dieser und den nachfolgenden Bildunterschriften nur die wichtigsten Abkürzungen wieder. Eine vollständige Auflistung der Abkürzungen findet sich im Anhang im Abkürzungsverzeichnis.

Abbildung 6

Von der Vielzahl der markierten Regionen im vorderen Anteil des Gehirns, stach am deutlichsten der ventromediale Präfrontale Kortex hervor (Abbildung 6). Von seinen Gebieten war in allen Mäusen bilateral der Infralimbische Kortex (Anzahl der Mäuse in denen Signale in dieser Region gefunden wurden $n=5$) und der Prälimbische Kortex ($n = 5$) am deutlichsten von markierten Zellen durchsetzt. Das Zingulum ($n=5$) gehörte ebenfalls zu den Regionen des Präfrontalen Kortexes, welche eine Vielzahl an markierten Zellen aufweisen. Zu den von Fluorogold markierten Regionen gehörte auch das Klastrum ($n=5$), wenn auch weniger stark ausgeprägt als in Regionen des Prälimbischen oder Infralimbischen Kortex, aber auch hier fanden sich markierte Zellen in allen Mäusen.

Der Ventrale, ($n=5$) Mediale ($n=5$) und Laterale Orbitale Kortex ($n=3$) waren ebenfalls Gebiete, in denen in beiden Hemisphären Fluorogold-positive Zellen zu finden waren (Abbildung 6), wobei der Ventrale Orbitale Kortex deutlich hervorstach. Im Ventralen Orbitalen Kortex fanden sich in allen Mäusen sowohl kontra- als auch ipsilateral eine ähnliche Signaldichte wie im Prälimbischen und Infralimbischen Kortex.

Abgesehen von den Regionen des Präfrontalen Kortexes wies auch der Motorkortex eine deutliche Häufung von markierten Zellen auf, wobei der Sekundäre Motorkortex in allen Mäusen beidseits eine auffällig deutlich markierte Region war ($n=5$), während der Primäre Motorkortex nur in zwei Mäusen auf dieser Höhe Fluorogold-positive Zellen aufwies. Durch die Wahl des Injektionspfades durch den Motorkortex handelte es sich bei den Funden im Motorkortex auf dieser Höhe als auch weiter kaudal am ehesten um Kontaminationen durch den Injektionsprozess.

Eine weitere deutlich markierte Region war der agranuläre Inselkortex, der in vier Mäusen als markierte Region auffiel, wobei er in zwei Testsubjekten sehr deutlich markierte Areale zeigte.

Auch die Forceps Minor des Corpus Callosum zeigte Fluorogold-markierte Zellen, wobei die Ausprägung sehr gering und nicht in allen Mäusen zu finden war ($n=3$).

Auch die dorsale Taenia Tecta und der dorsale Pedunkuläre Kortex waren in der vorherigen Schnittebene nicht sichtbar, kamen hier jedoch zur Darstellung. Sie zeigten in allen bis auf ein Testsubjekt sowohl auf der ipsi- wie auch auf der kontralateralen Seite markierte Zellen (jeweils n=4).

Der Nucleus Accumbens zeigte ebenfalls in einigen Subjekten auf der kontralateralen Seite Signale (n =3) die im Vergleich zu Regionen wie dem Infralimbischen Kortex jedoch von der Dichte und Anzahl der Signale weniger ausgeprägt waren.

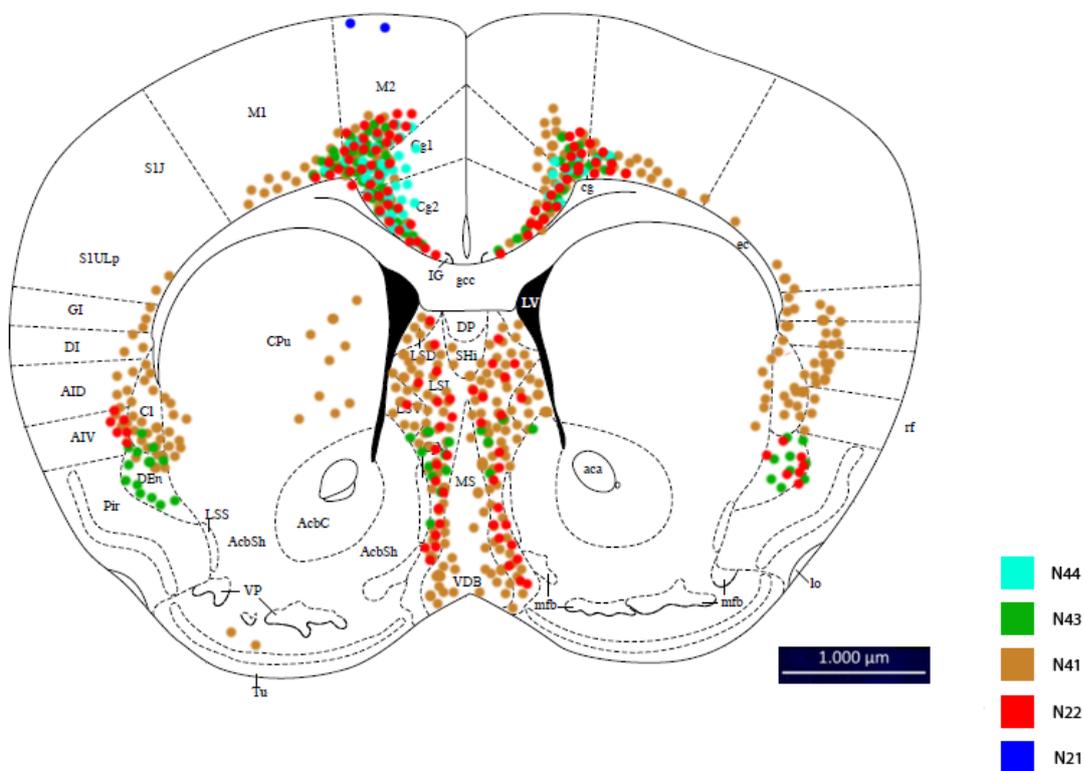


Abbildung 8 Ebene auf Höhe der Septalen Nuklei aus der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ zur Darstellung der anatomischen Strukturen, Cl=Clastrum, Cg1/2 = Zingulum Area 1 bzw. Area 2, LS* = Septale Nuklei, DEn = Dorsaler Endopiriformer Nucleus, Schematische Darstellung der mit Fluorogold markierten Regionen (gekennzeichnet durch Punkte) der fünf in die Studie eingeschlossenen Mäuse (jede Farbe repräsentiert eine Maus)

Abbildung 8

Das Zingulum (n=4) und die Motorkortizes (M1 n=4, M2 n=5) zeigten in den meisten Mäusen beidseits deutliche Ansammlungen Fluorogold-markierter Zellen. Zu den Regionen mit markierten Zellen gehörten in einigen Fällen wiederum das Claustrum (n=3), wobei hier in einer Maus besonders deutliche Ansammlungen markierter Zellen zur Darstellung kamen. In

dieser Koronarebene waren außerdem Nuklei des Septums sichtbar. Vor allem der intermediäre (n=3) und laterale Teil (n=3) des lateralen Septalen Nukleus wiesen in vielen Testsubjekten auf beiden Seiten Ansammlungen Fluorogold-positiver Zellen auf.

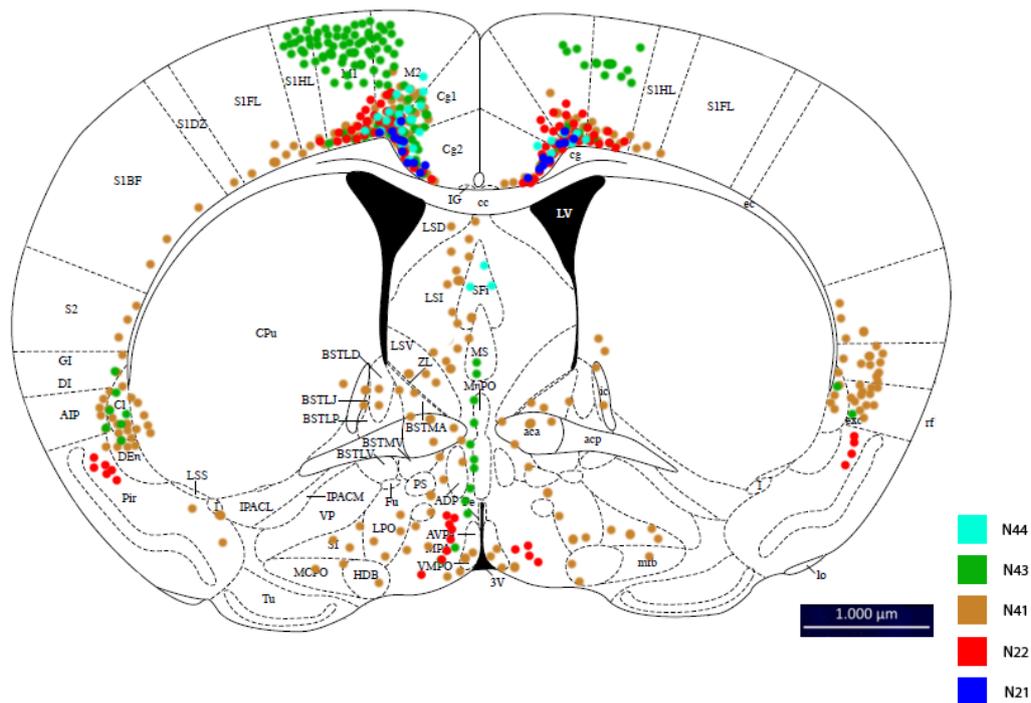


Abbildung 9 Ebene auf Höhe der Septalen Nuklei aus der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ zur Darstellung der anatomischen Strukturen, Cl=Clastrum, Cg1/2 = Zingulum Area 1 bzw. Area 2, DEN = Dorsaler Endopiriformer Nukleus, LS* = Septale Nuklei, S1HL = Somatosensorischer Kortex, Schematische Darstellung der mit Fluorogold markierten Regionen (gekennzeichnet durch Punkte) der fünf in die Studie eingeschlossenen Mäuse (jede Farbe repräsentiert eine Maus)

Abbildung 9

In dieser Koronarebene waren in allen Fällen markierte Zellen beidseits in beiden Regionen des Zingulums zur Darstellung gekommen. Die benachbarten Primären (n=4) und Sekundären Motorkortizes (n=5) gehörten ebenfalls zu den markierten Regionen. Der Somatosensorische Kortex zeigte zwar erst in kaudaleren Abschnitten deutlichere Markierungen, jedoch konnten in einigen Fällen bereits in dieser Ebene vor allem ipsilateral Fluorogold-markierte Zellen gefunden werden (n=3). Ebenso zeigte der Mediale Präoptische Kortex in einigen Testsubjekten markierte Zellen (n=3).

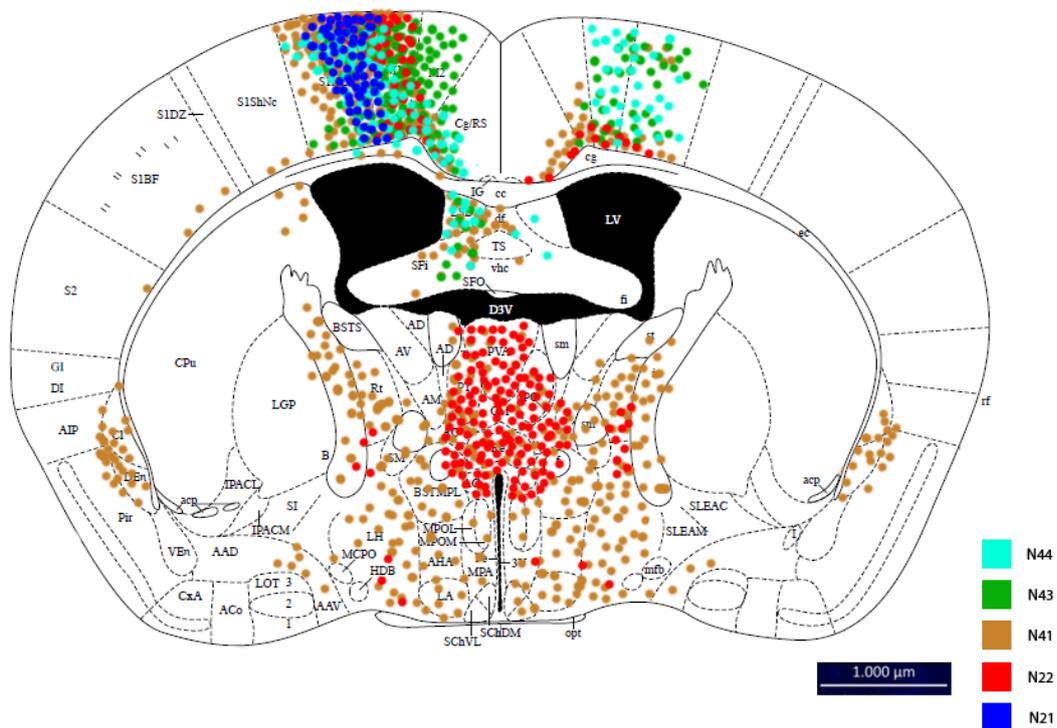


Abbildung 11 Ebene auf Höhe des Thalamus aus der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ zur Darstellung der anatomischen Strukturen, Cg/RS = Zingulärer/Retrosplenialer Kortex, Re= Nucleus Reuniens, PVA=Paraventriculärer Nucleus des Thalamus, Cl=Clastrum, DEn = Dorsaler Endopiriformer Nucleus, S1HL = Somatosensorischer Kortex, Schematische Darstellung der mit Fluorogold markierten Regionen (gekennzeichnet durch Punkte) der fünf in die Studie eingeschlossenen Mäuse (jede Farbe repräsentiert eine Maus)

Abbildung 11

Zu den besonders deutlich markierten Regionen gehörten hier die Übergangsregion von Zingulum und Retrosplenialem Kortex (n=4), die Motorkortizes (M1 n=5, M2 n=4) und der Primäre Somatosensorische Kortex (n=5). In einigen Testsubjekten waren hier bereits markierte Zellen aus dem Nucleus Reuniens als Zielregion der Injektion zu sehen.

Gruppen von Zellen auch in der Posterioren Hypothalamischen Region auf beiden Seiten in allen Mäusen zu sehen.

Im Retrosplenialen Kortex fanden sich Zellen mit Fluorogold-Signalen vor allem auf der ipsilateralen Seite der meisten Mäuse, sowohl im granulären (n=4), als auch im agranulären Kortex (n=3).

Der Fasciculus Retroflexus zeigte in einigen Fällen ebenfalls markierte Zellen (n=3).

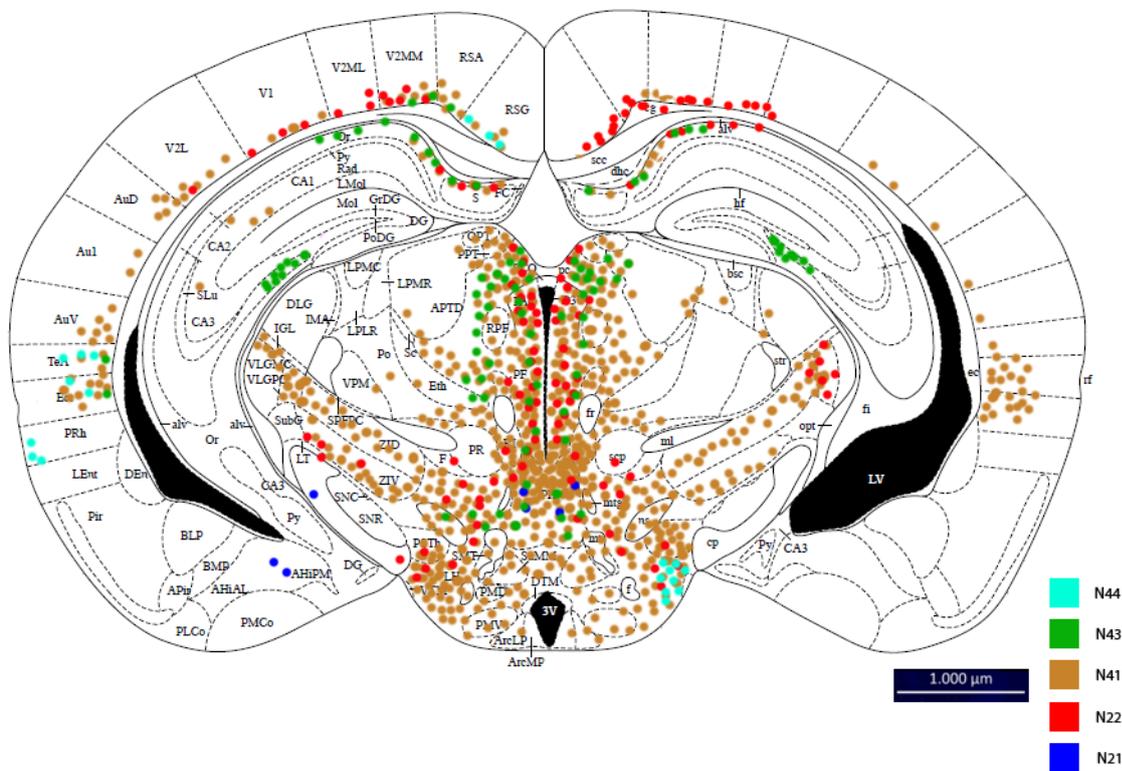


Abbildung 14 Ebene auf Höhe des Thalamus und Hippokampus aus der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ zur Darstellung der anatomischen Strukturen, RSG/RSA Retrosplenialer Kortex, agranulärer/granulärer Anteil, PH = hinteres Hypothalamisches Gebiet, S= Subiculum, CA1,CA3 = CA1/CA3 Region des Hippokampus, V2MM= Teil des visuellen Kortex, Schematische Darstellung der mit Fluorogold markierten Regionen (gekennzeichnet durch Punkte) der fünf in die Studie eingeschlossenen Mäuse (jede Farbe repräsentiert eine Maus)

Abbildung 14

Im Vergleich zur vorherigen Koronarebene wurden hier weniger Thalamusgebiete retrograd markiert. Im Bereich des Hypothalamus fanden sich in einigen Fällen einzelne Fluorogold-markierte Zellen in der Lateralen Hypothalamischen Region (n=3). Ein weiterer deutlich mit markierten Zellen ausgestatteter Bereich des limbischen Systems auf dieser Ebene war das Periaquäduktale Grau. Diese Region wies in den meisten Testsubjekten sehr deutliche Signalhäufungen von Fluorogold auf (n=3).

Bei den mit dem limbischen System assoziierten Bereichen fiel auch der Hippocampus ins Auge, dessen Subikulum und dessen Region CA1 in drei Mäusen einzelne Zellen mit Signalen von Fluorogold zeigte, in einer Maus fanden sich auch in CA3 beidseits Signale, in einer anderen Maus nur ipsilateral. In den weiter kaudal gelegenen Bereichen des Hippocampus traten vor allem im Subikulum diese Signale deutlich zu Tage.

Außerhalb des limbischen Systems waren Ansammlungen von markierten Zellen im Ektorhinalen Kortex (n=3), im Temporalen Assoziationskortex (n=3) und im Sekundären Visuellen Kortex (n=3) zu finden. Bemerkenswert ist, dass sich nur in einer Maus Zellen im lateralen Genikulären Komplex fanden (N 41).

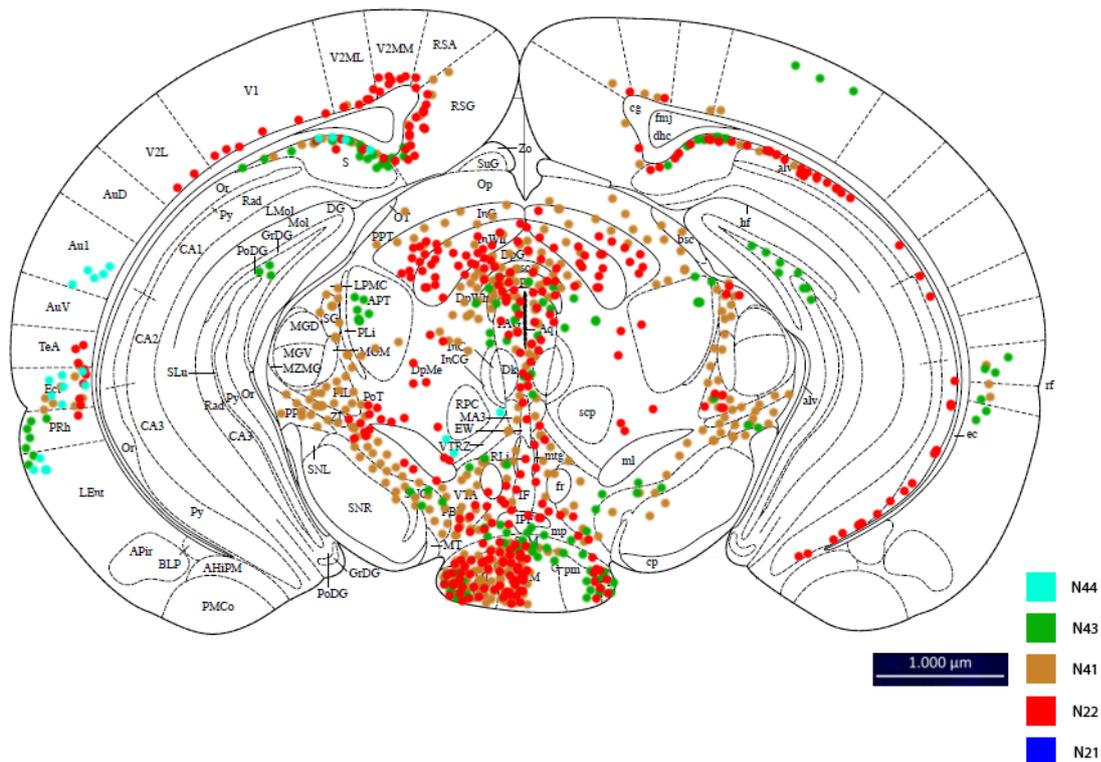


Abbildung 15 Ebene auf Höhe des Hippokampus aus der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ zur Darstellung der anatomischen Strukturen, Ect = Ektorhinaler Kortex, RSG/RSA Retrosplenialer Kortex, agranulärer/granulärer Anteil, S=Subiculum, CA1,CA3 = CA1/CA3 Region des Hippokampus, V2MM= Teil des visuellen Kortex, Schematische Darstellung der mit Fluorogold markierten Regionen (gekennzeichnet durch Punkte) der fünf in die Studie eingeschlossenen Mäuse (jede Farbe repräsentiert eine Maus)

Abbildung 15

Das Periaquäduktale Grau war auch auf dieser Koronarebene eine der Regionen, in denen sich sehr deutliche Gruppen von Zellen fanden, die mit Fluorogold markiert worden sind (n=3). Auch hier fanden sich weitere Regionen, die Häufungen markierter Zellen aufwiesen und mit dem Limbischen System assoziiert waren. So zeigten Zellen des Medialen (n=3) und Lateralen (n=3) Nucleus Mamillaris vor allem ipsilateral in den meisten Testsubjekten sehr deutliche Signale von Fluorogold.

Einzelne markierte Zellen waren auch im Supramamillären Nucleus (n=3) zu sehen, die ebenfalls besonders auf der ipsilateralen Seite der Injektion lokalisiert waren.

Eine weitere Region des limbischen Systems war der Perirhinale Nucleus (n=3), der in einigen Fällen auf der ipsilateralen Seite einzelne Zellen und Gruppen von markierten Zellen aufwies.

Auch das Subikulum beinhaltete auf dieser weiter kaudal gelegenen Koronarebene wieder markierte Zellen auf der ipsilateralen und kontralateralen Seite, allerdings in mehr Tieren und in höherer Dichte als in weiter rostral gelegenen Schnitten (n=4).

Im Fornix, der als Teil des Papez-Neuronenkreises ebenfalls zum limbischen System gezählt wird, traten ebenfalls einzelne Signale von Fluorogold auf (n=3).

In dieser Koronarebene fanden sich neben Strukturen des limbischen Systems auch Nuklei Intralaminare des Thalamus, die vor allem auf der kontralateralen Seite in den meisten Mäusen Markierungen von Fluorogold zeigten (n=3).

Im Bereich des Mesenzephalon waren ebenfalls Zellen zu finden, die mit Fluorogold markiert wurden. Die Tiefe Graue Schicht und die Tiefe Weiße Schicht des Colliculus Superior (n=3) als auch der Tiefe Mesenzephalische Kern (n=3) waren Gebiete, in denen einzelne Zellen auftauchten, die auf der ipsilateralen Seite im Falle des Colliculus zum Teil auch in dichterem Anhäufung zusammenstanden. Zusätzlich fanden sich Zellen in der Area Tegmentalis Ventralis auf der ipsi- und kontralateralen Seite der meisten Testsubjekte (n=3).

Des Weiteren zeigte der Ektorhinale Kortex auf dieser Ebene in den meisten Mäusen wieder Markierungen (n=3). Ebenso fanden sich Zellen im granulären Teil des Retrosplenialen Kortex (n=3), die in einem Fall sehr dicht zusammenstanden.

Die Posteriore Kommissur zeigte ebenfalls in den meisten Testsubjekten Signale von Fluorogold-markierten Zellen (n=3).

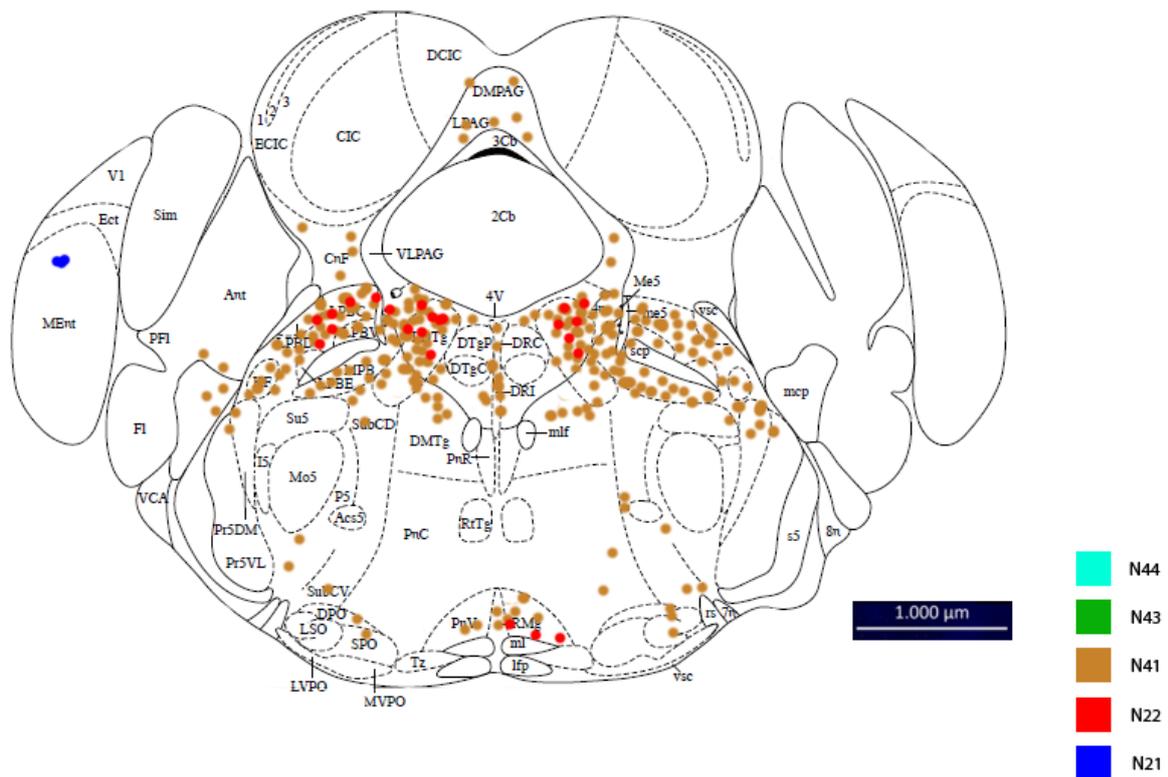


Abbildung 19 Ebene auf Höhe des vierten Ventrikels aus der zweiten Auflage des „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ zur Darstellung der anatomischen Strukturen, LDTg= laterodorsaler Tegmentaler Nukleus, DTgC/P = Dorsaler Tegmentaler Nukleus Schematische Darstellung der mit Fluorogold markierten Regionen (gekennzeichnet durch Punkte) der fünf in die Studie eingeschlossenen Mäuse (jede Farbe repräsentiert eine Maus)

Abbildung 19

Nur in drei Mäusen fanden sich auf dieser Koronarebene markierte Zellen. Nur bei zwei Testsubjekten fanden sich markierte Zellen in beiden Hemisphären. Bei diesen beiden Testsubjekten waren gemeinsam markierte Gebiete im laterodorsalen Tegmentalen Nukleus und im ventrolateralen Periaquaeduktalen Grau zu finden.

Afferente Verbindungen zum Nucleus Reunians

Im Folgenden sollen Funde in Regionen besprochen werden, die am ehesten einer afferenten Verbindung zum Nucleus Reunians entsprechen.

Wenn Fluorogold-markierte Regionen nur auf der ipsilateralen Seite zu finden waren und in der Nähe des Injektionspfades lagen, ist die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, dass es sich hierbei nicht um afferente Verbindungen zum Nucleus Reunians handelt, sondern um Fehlmarkierungen durch Auslaufen von Fluorogold im Injektionspfad, was in den Überlegungen zur Methodik weiter ausgeführt wird.

Der Nucleus Reunians liegt sehr zentral im Gehirn, eine Hälfte liegt in der einen, die andere Hälfte in der anderen Hemisphäre. Einschlusskriterium für die Experimente war eine präzise Applikation des Fluorogold-Tracerdepots im Nucleus Reunians mit geringer Ausdehnung in angrenzende Hirnregionen. Trotz des einseitig gewählten Injektionspfades breitete sich das Fluorogold in beide Hälften des Nucleus Reunians aus, mit führender Tendenz in Richtung des Injektionspfades. Regionen, die relativ sicher Afferenzen zum Nucleus Reunians besitzen, sollten daher in beiden Hemisphären mit Fluorogold markiert worden sein.

Auf diese Funde von afferenten Verbindungen zum Nucleus Reunians, soll im Folgenden näher eingegangen werden. Eine Übersicht der wichtigsten Funde bietet die Tabelle in Tabelle 1, die Auswahl der Regionen orientiert sich an vorhergegangenen Arbeiten an Ratten.

Tabelle 1 **Auflistung der Hauptfunde** Beschriftung auf Englisch, um die Arbeit mit dem „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ und den Studien an Ratten zu erleichtern. Ein Plus (+) stellt ein Fundgebiet dar, ein Minus (-) zeigt eine Region ohne Funde von Fluorogold im Experiment. Aufteilung der Hirnregionen in ipsilateral und kontralateral von der Injektionsseite im Experiment. (Tabelle fortgesetzt auf der nächsten Seite)

	ipsilateral	contralateral
Telencephalon		
Amygdala	-	-
Clastrum	+	+
Cortex		
<i>Agranular Insular Cortex</i>	+	+
<i>Agranular Medial Cortex</i>	-	-
<i>Anterior Cingulate Cortex</i>	+	+
<i>Ectorhinal Cortex</i>	+	+
<i>Enthorhinal Cortex</i>	-	-
<i>Infralimbic Cortex</i>	+	+
<i>Medial Orbital Cortex</i>	+	+
<i>Parietal Cortex</i>	-	-
<i>Perirhinal Cortex</i>	+	+
<i>Piriform Cortex</i>	+	+
<i>Prelimbic Cortex</i>	+	+
<i>granular Retrosplenial Cortex</i>	+	+
<i>agranular Retrosplenial Cortex</i>	+	+
<i>Somatosensory Cortex</i>	+	+
<i>Motor Cortex</i>	+	+
Endopiriform Cortex	-	-
Hippocampal Formation		
<i>Subiculum</i>	+	+
<i>Presubiculum</i>	+	+
<i>Dentate Gyrus</i>	-	-
<i>Ammons Horn</i>	+	+
Preoptic Area		
<i>Anterodorsal Preoptic Nucleus</i>	-	-
<i>Anteroventral Preoptic Nucleus</i>	-	-
<i>Lateral Preoptic Area</i>	-	-
<i>Magnocellular Preoptic Area</i>	-	-
<i>Medial Preoptic Area</i>	+	+
<i>Median Preoptic Area</i>	-	-
Septofimbrial Nucleus	+	+
Septum	+	+
Taenia Tecta	+	+

	ipsilateral	contralateral
Diencephalon		
Epithalamus		
<i>Lateral Habenula</i>	+	+
<i>Medial habenula</i>	-	-
Hypothalamus		
<i>Anterior Hypothalamic Area</i>	-	-
<i>Anterior Nucleus</i>	-	-
<i>Dorsomedial nucleus</i>	-	-
<i>Lateral Hypothalamic Area</i>	+	+
<i>Lateral Mamillary Area</i>	+	+
<i>Medial Mamillary Area</i>	+	+
<i>Paraventricular Nucleus</i>	-	-
<i>Posterior Hypothalamus</i>	+	+
<i>Premamillary Nucleus</i>	-	-
<i>Supramamillary Nucleus</i>	+	+
<i>Tuberomamillary Nucleus</i>	-	-
<i>Ventromedial Nucleus</i>	+	+
Thalamus		
<i>Intergeniculate leaflet</i>	-	-
<i>Lateral dorsal Nucleus</i>	-	-
<i>Lateral Geniculate Complex</i>	-	-
<i>Paraventricular Nucleus</i>	-	-
<i>Reticular Nucleus</i>	-	-
Brainstem		
Central Grey	+	+
Commissural nucleus	+	+
Cuneiform Nucleus	-	-
Dorsal Raphe Nucleus	+	+
Interpeduncular Nucleus	-	-
Laterodorsal tegmental Nucleus	-	-
Locus coeruleus	-	-
Median Raphe Nucleus	-	-
Nuclei Solitary Tract	-	-
Pedunculo pontine Nucleus	-	-
Peripeduncular Nucleus	-	-
Precommissural Nucleus	-	-
Reticular Tegmental Nucleus	+	+
Superior Colliculus	+	+
Ventral Tegmental Area	+	+

Diencephalon

Thalamus

In den Kerngebieten des Thalamus fanden sich viele markierte Zellen. Der Nukleus Reuniens und der Nukleus Rhomboideus verfügen als zentrale Kerngebiete des Thalamus über weitreichende Verbindungen zu anderen Regionen des Gehirns, insbesondere auch mit Nachbargebieten des Thalamus.

In unmittelbarer Nähe zum Nukleus Reuniens gehörte der Nukleus Rhomboideus als auch der Ventrale Nukleus Reuniens zu den markierten Gebieten, die sich in allen Mäusen fanden. In drei der Testsubjekten reichten die Fundorte von markierten Zellen bis zum Bregma AP -0.94, die sowohl kontra- als auch ipsilateral zu der Injektionsseite zu finden waren (Abbildung 12, 13).

Als weiteres Kerngebiet des Thalamus zeigte der Mediodorsale Nukleus des Thalamus Zellen, die mit dem Tracer markiert wurden. Der kraniale Anteil zeigte vor allem auf der ipsilateralen Seite markierte Zellen, während in kaudalen und medialen Anteilen des Kernes entsprechende Zellen auch auf der kontralateralen Seite zu finden waren (Abbildungen 12, 13).

Im Intermediodorsalen Nukleus des Thalamus fanden sich in einigen Mäusen entsprechend markierte Zellen auf beiden Seiten bei Bregma AP -1,82 (Abbildungen 12, 13).

Der Zentromediale Nukleus des Thalamus zeigte ebenfalls ipsilateral und kontralateral Fluorogold-positive Zellen, vor allem bei Bregma AP -0.94, in einigen Fällen auch noch bei Bregma AP -1.82 (Abbildungen 12, 13).

Der Ventromediale Nukleus des Thalamus zeigte in allen Testsubjekten ipsi- und kontralateral markierte Zellen (Abbildungen 12, 13).

Der Nukleus Submedius zeigte ebenfalls in allen Testsubjekten auf Höhe Bregma AP -1,82 (Abbildungen 12, 13) markierte Zellen.

Bemerkenswerterweise fanden sich nur in einer Maus markierte Zellen im lateralen Genikulären Komplex (Abbildung 14).

Epithalamus

Sowohl der Mediale als auch der Laterale Teil des Lateralen Nucleus Habenularis zeigten markierte Zellen. Sie konnten in den meisten Mäusen auf der ipsilateralen Seite gefunden werden. In einigen Fällen (n=2) konnten Zellen auch auf der kontralateralen Seite bei Bregma AP -1,82 gesehen werden (Abbildungen 12, 13).

Der Faszikulus Retroflexus, der zum größten Teil aus Leitungsbahnen besteht und keine Zellkörper aufweist, zeigte Fluorogold-Signale in den meisten Mäusen bei Bregma AP -1,82 ipsilateral. Dieses Gebiet liegt direkt im Injektionspfad (Abbildung 13), womit am ehesten eine Kontamination durch den Injektionsprozess wahrscheinlich ist.

Hypothalamus

Der Hypothalamus ist Teil des limbischen Systems und gehört damit zu Regionen, die mit der Arbeit des Netzwerkes zwischen Hippocampus und Präfrontalen Kortex assoziiert werden.

Im Posterioren Hypothalamischen Gebiet konnten in allen Mäusen beidseitig Fluorogold-positive Zellen auf Höhe von Bregma AP -1,82, teilweise auch auf Höhe von Bregma AP -2,54 gefunden werden (Abbildungen 23, 14). Zusätzlich fanden sich in zwei Testsubjekten markierte Zellen im Lateralen, Medialen und Supramammillären Nucleus, allerdings nicht in weiter rostral liegenden Kernen, wie den Präammillären oder Tuberosammillären Kerngebieten (Abbildungen 14-16). Neben dem Posterioren Hypothalamischen Gebiet zeigten auch das Laterale Areal, der anteriore Hypothalamus sowie Kerngebiete wie der Anteriore Nucleus und der Dorsomediale Nucleus Fluorogold-markierte Zellen.

Frontalhirn

Besonders ausgeprägt waren Funde von Zellen, die Affenzen zum Nucleus Reunians haben, im Präfrontalen Kortex. So konnten Fluorogold-positive Zellen in den tiefen Schichten des Medialen Präfrontalen Kortex, des Ventralen Präfrontalen Kortex, und auch in gewissem Grad in den tiefen Schichten des Lateralen Präfrontalen Kortex gefunden werden. Abbildung 20 zeigt einen Beispielschnitt mit Fluorogold-Signalen. Zusätzlich erschienen markierte Zellen in anderen Teilen des Frontalhirns, wie dem ipsilateralen Putamen und in Gebieten des Olfaktorischen Systems.

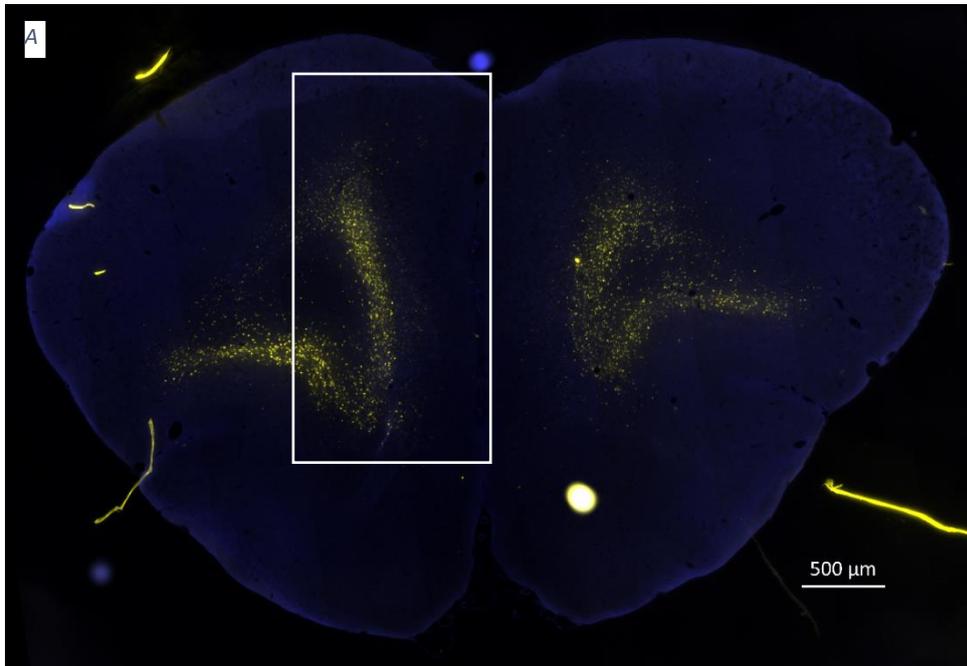
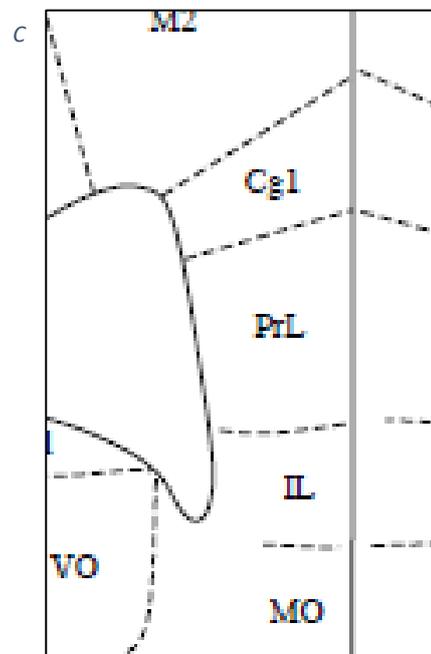
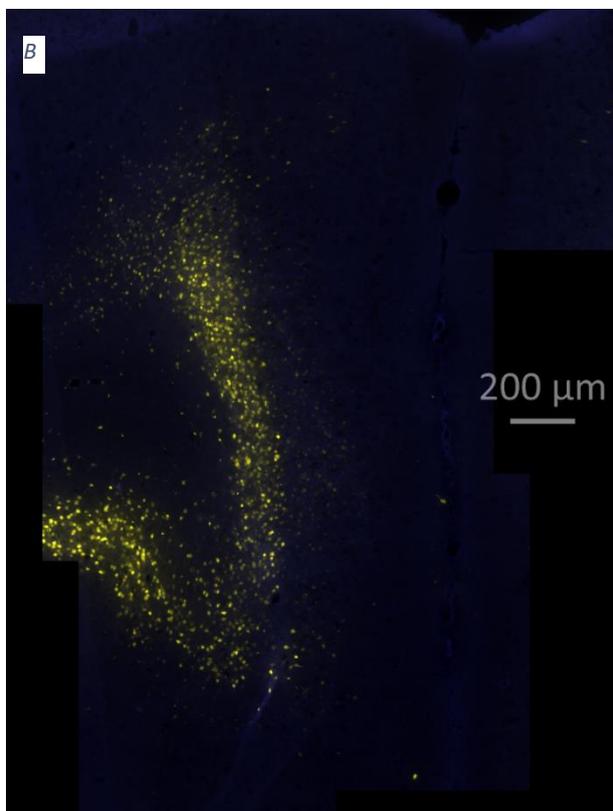


Abbildung 20 Beispielschnitt auf Höhe des Frontallappens (A) die Übersicht zeigt ipsi- und kontralaterale Signale in Regionen des medialen Präfrontalen Kortex (Infralimbischer Kortex, Prälimbischer Kortex) und des Zingulums (B) Vergrößerung der markierten Region in A mit Details von Fluorogold-Signalen des Infralimbischen Kortex und Prälimbischen Kortex; (C) Schnitt aus der Korrespondierenden Ebene zu (B) aus dem „Paxinos and Frankling Brain Atlas“



Präfrontaler Kortex

Medialer Präfrontaler Kortex

Im medialen Präfrontalen Kortex konnten Fluorogold-positive Zellen vor allem in den Schichten V und VI des ipsilateralen und kontralateralen Prälimbischen und Infralimbischen Kortex gefunden werden (Abbildungen 6, 7; Abbildung 20). Auch im Zingulum fanden sich in den Schichten V und VI der Gebiete 1 und 2 Fluorogold-positive Zellen. Genauso wie der Hippocampus und der Hypothalamus sind diese Strukturen Teil des Limbischen Systems. (Abbildungen 6 – 10).

Lateraler Präfrontaler Kortex

Auch im Lateralen Präfrontalen Kortex fanden sich in einigen Mäusen in beiden Hemisphären entsprechend markierte afferente Zellen. Diese waren vor allem im ventralen und dorsalen agranulären Inselkortex zu finden (Abbildungen 6 - 12).

Ventraler Präfrontaler Kortex

Ganz ähnlich zu dem medialen Präfrontalen Kortex waren auch hier viele Zellen mit Afferenzen zum Nukleus Reuniens zu finden. In allen Mäusen wurden Fluorogold-markierte Zellen in Schichten des Medialen, Ventralen und Lateralen Orbitalen Kortex gefunden, und zwar sowohl ipsilateral als auch kontralateral (Abbildung 6).

Ventrales Vorderhirn

Im Kortex des dorsalen Pedunkulus beider Hemisphären waren Fluorogold-positive Zellen nachzuweisen, hier ebenfalls bilateral in den Schichten V und VI, ähnlich zu den Funden im Prälimbischen Kortex und Infralimbischen Kortex. In einigen Testsubjekten zeigte die Dorsale Taenia Tecta ebenfalls markierte Zellen (Abbildung 7).

Der Kaudale Anteil des Putamen war im ventralen ipsilateralen Anteil überaus stark mit Fluorogold-positiven Zellen durchsetzt (ebenfalls Abbildung 7).

Retrosplenialer Kortex

Im agranulären Anteil des Retrosplenialen Kortex wurden in den meisten Mäusen sowohl kontra- als auch ipsilateral markierte Zellen gefunden.

Im granulären Anteil konnten in einigen Testsubjekten ebenfalls positive Zellen entdeckt werden, und zwar ipsilateral zwischen Bregma AP -0,94 und -3,40 als auch kontralateral zwischen Bregma AP -2,54 und -3,08 (Abbildungen 12 - 15).

Auch im vereinigten Zingulum und Retrosplenialen Kortex waren beidseits Zellen auf Höhe von Bregma AP -0,45 zu finden (Abbildung 11).

Motorkortex, Assoziationskortex und Somatosensorischer Kortex

In allen Fällen konnten sowohl im Primären als auch im Sekundären Motorkortex beider Hemisphären markierte Zellen gefunden werden.

Im parietalen Assoziationskortex wurden ebenfalls einige Zellen gefunden: Sowohl ipsilateral, bei Bregma AP -1,82 in allen Testsubjekten, als auch lateral im medialen Anteil des Kortex (n=4) (Abbildung 13).

In der hinteren Limbischen Region des Primären Somatosensorischen Kortex waren Gruppen markierter Zellen sichtbar, sowohl kontra- als auch ipsilateral (Abbildungen 9 - 12).

Hippocampus und Subikulum

Der Hippocampus und das Subikulum zeigten sehr viele markierte Zellen. Es fanden sich vor allem viele Zellen in der Region des ventralen Hippocampus. Einen Beispielschnitt zeigt Abbildung 21.

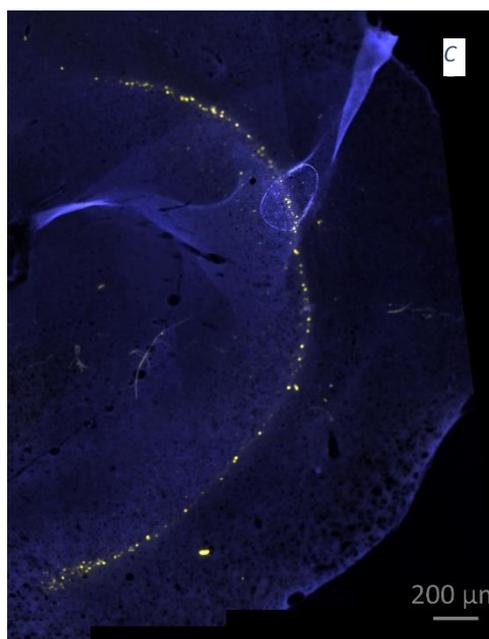
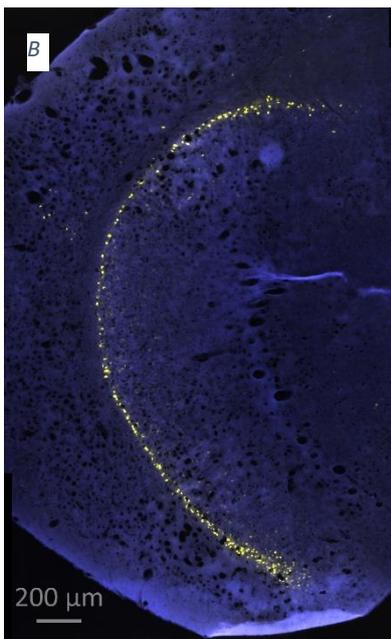
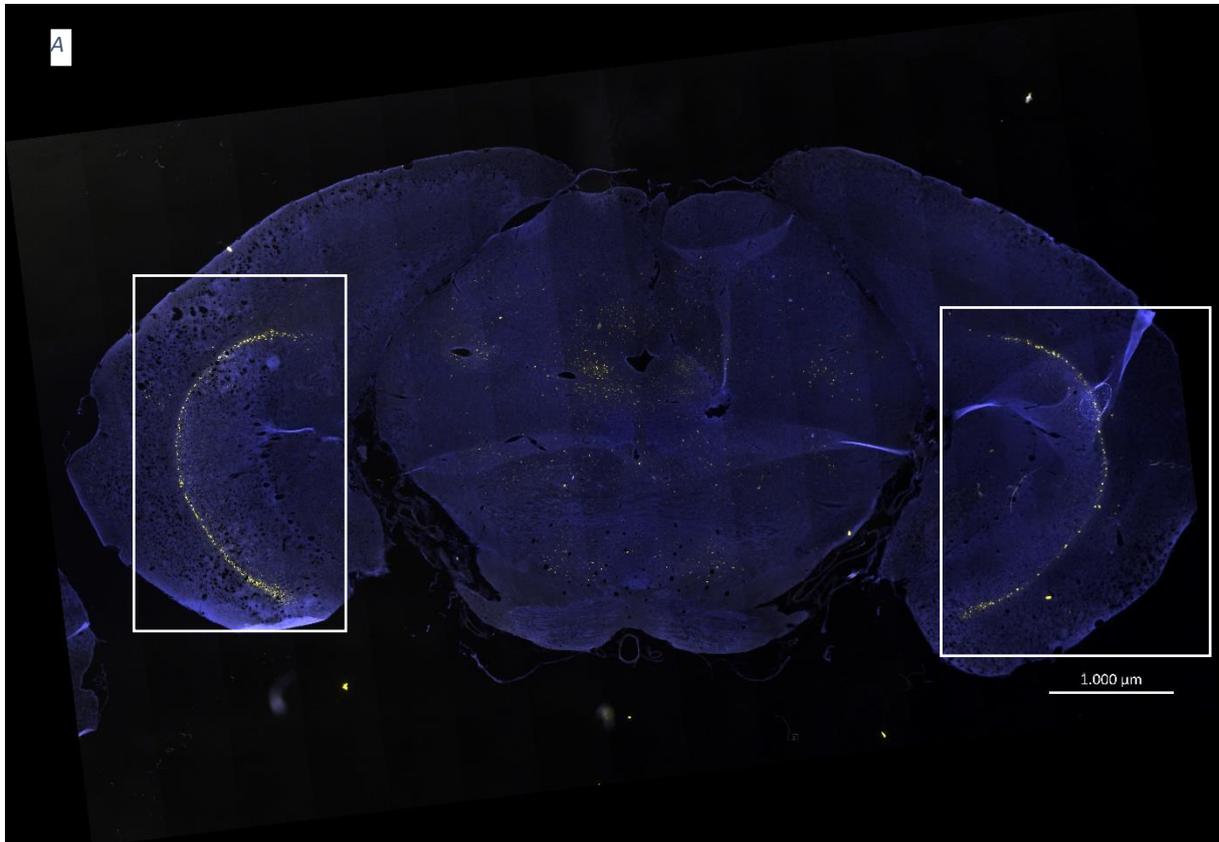


Abbildung 21
Beispielschnitt auf Höhe des Hippokampus (A) die Übersicht zeigt ipsi- und kontralaterale Signale in Regionen des Subikulums (B) (C) Vergrößerung der markierten Regionen in (A) mit Details von Fluorogold-Signalen

Hippocampus

Ventraler Hippocampus

Markierte Zellen wurden in der Region CA1 aller Testsubjekte gefunden.

Bei zwei Mäusen wurden diese Zellen kontralateral zwischen Bregma AP -3,08 und -3,40 gefunden, in zwei Subjekten auch ipsilateral bei Bregma AP -3,4. In allen Mäusen jedoch konnten markierte Zellen bei Bregma AP -3,64 ipsilateral gefunden werden. Bei allen außer einer Maus war dies auf der kontralateralen Seite ebenfalls der Fall (Abbildungen 15 - 17).

Dorsaler Hippocampus

Im Stratum Pyramidale und Oriens konnten Markierungen auf Höhe von Bregma AP -0,94, im Stratum Pyramidale bei Bregma AP -1,83 der ipsilateralen Region CA3 des Dorsalen Hippocampus gefunden werden.

Im Gyrus Dentatus konnten auch bei einigen Mäusen (n=3) auf der ipsilateralen Seite bei Bregma AP -0.94 und -1,82 markierte Zellen gefunden werden (Abbildungen 12 - 15).

Subikulum

Fluorogold-positive Zellen konnten in großer Anzahl beidseits im Subikulum aller Mäuse gefunden werden (Abbildungen 14 – 17).

Diskussion

In den vorliegenden Experimenten sollten die Afferenzen des Nukleus Reuniens in der Maus untersucht werden, indem der retrograde Tracer Fluorogold zentral in den Nukleus Reuniens des Thalamus injiziert wurde. Mit diesen Experimenten sollte geprüft werden, ob sich die Ergebnisse aus entsprechenden Experimenten in Ratten bei Mäusen reproduzieren lassen, oder ob es speziesspezifische Unterschiede in der Konnektivität des Nucleus Reuniens gibt.

Als Kandidaten für Regionen, die direkte Afferenzen zum Nukleus Reuniens besitzen, kamen vor allem Regionen in Betracht, die in beiden Hemisphären mit Fluorogold markiert worden

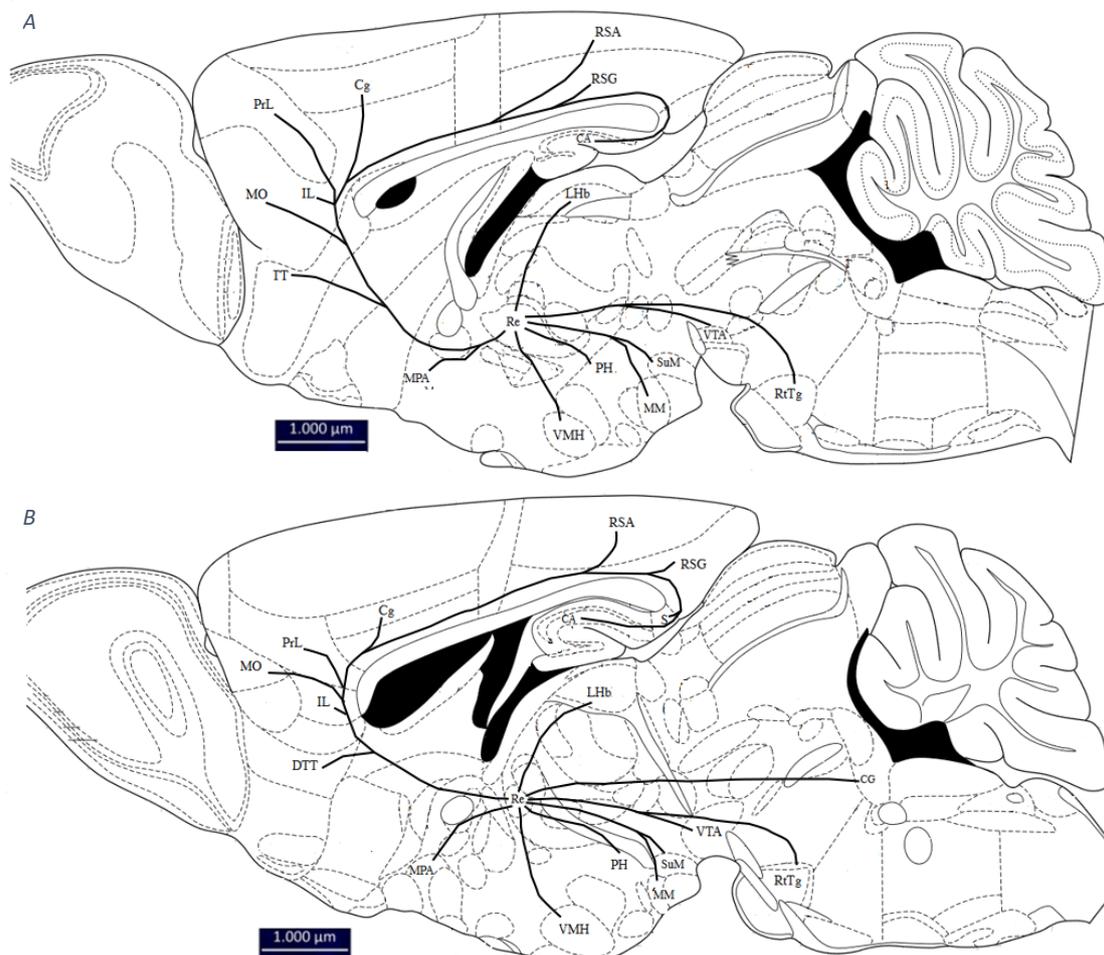


Abbildung 22 **Illustration der Hauptafferenzen des Nukleus Reuniens in der sagittalen Ebene.** Angepasst an Schnittebenen der zweiten Auflage des Paxinos und Franklin Mouse Brain Atlas, Mediale Schnittebene (A) and laterale Schnittebene (B)

sind und in mindestens 3 von 5 der Testsubjekte zu finden waren. Regionen, die den Kriterien entsprachen, fanden sich vor allem im Diencephalon, hier vor allem im Thalamus und Hypothalamus, im Präfrontalen Kortex als auch im Hippocampus. Eine Visualisierung der

wichtigsten Regionen, von denen der Nukleus Reuniens Afferenzen erhält, bietet Abbildung 22.

Überlegungen zur Methodik

Topographische Unterschiede

Die Injektionen wurden stereotaktisch durchgeführt und lagen allesamt zentral im Nukleus Reuniens. Allerdings gibt es dennoch Unterschiede in der Lage des Injektionsdepots innerhalb des Nukleus Reuniens: Die Position variiert leicht entlang der Sagittalachse. Zum Beispiel lag bei Maus N22 die Injektion etwas weiter rostral als bei den anderen Mäusen. Auch wenn diese Variation nicht zum Ausschluss aus der Studie geführt hat, kann sie dennoch Auswirkungen auf das Studienergebnis haben. Es ist ein topographischer Zusammenhang zwischen Zellverbänden im Nukleus Reuniens und Zellverbänden in anderen Hirnregionen beschrieben worden [Herkenham 1978]. Es lässt sich also nicht ausschließen, dass einige der Variationen, die in markierten Regionen zwischen den Mäusen gesehen wurden, durch Unterschiede in der genauen Lage des Injektionsdepots bedingt sind. So ist als Beispiel in Maus N22 auch die ventrale Taenia Tecta markiert worden, welche sich nicht unter den markierten Regionen anderer Mäuse fand (Abbildung 6), und die daher in dieser Studie nicht als Region mit afferenter Verbindung zum Nukleus Reuniens gezählt wurde, obwohl sie bilateral markiert worden ist.

Mitinjektion benachbarter Regionen des Nukleus Reuniens

Trotz stereotaktischer Injektion ließ sich eine Mitinjektion von benachbarten Regionen des Nukleus Reuniens nicht komplett vermeiden. So finden sich im Fall von Maus N41 eine Vielzahl von markierten Regionen, vor allem im Bereich des Diencephalons, welche sich nicht in den anderen Mäusen fanden, z.B. markierte Zellen im Nukleus Arcuatus des Hypothalamus oder im posterioren Prätektalen Nukleus. Dies kann durch eine Mitinjektion von Regionen wie dem Rhomboiden Nukleus des Thalamus und der Posterioren Hypothalamischen Region bedingt sein, welche bei der Beurteilung der Qualität und Präzision der Injektion nicht auffiel, da die Abgrenzung zwischen Injektionsgebiet und benachbarten Thalamusregionen durch den bereits genannten hohen Anteil markierter Zellen im Thalamus in diesem Fall durch die Überlagerung der Fluorogold-Signale schwerfiel. Die Analyse der Injektion einer einzelnen Maus ist daher nicht aussagekräftig, erst im Vergleich mit Injektionen in anderen Mäusen kann

man Kandidaten für Regionen mit einer afferenten Verbindung zum Nukleus Reunies unterscheiden. Auch sollte darauf geachtet werden, nicht zu große Mengen an Fluorogold zu injizieren, da dies die genannten Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Präzision des gesetzten Injektionsdepots durch Signalüberlagerungen verstärkt. Auch ist es durch die Potenz des Signals nicht leicht, eine Unterscheidung zwischen einer Ausbreitung des Tracerdepots in benachbarte Regionen und einer starken retrograden Markierung von Zellverbänden in benachbarten Regionen zum Nukleus Reunies zu treffen.

Verunreinigungen im Injektionspfad

Ein genereller Nachteil der gewählten Methode stellt die Entstehung von Artefakten dar, die durch die Kontamination des Injektionskanals mit Tracersubstanz bedingt ist. Markierte Zellen sind in diesem Fall nicht nur entlang des Injektionskanals zu finden, sondern Verunreinigungen von Fluorogold, die im Injektionstrakt verblieben, zeigen auch lokale und bilaterale Verknüpfungen der kontaminierten Regionen. In der vorliegenden Studie führte der Injektionskanal durch den Motorischen und Somatosensorischen Kortex, durch den Retrosplenialen Kortex, das Zingulum und den Gyrus Dentatus sowie den dorsalen Anteil des Hippocampus als auch durch einige andere Nuklei des Thalamus. Diese Verunreinigungen des Injektionspfades ließen sich jedoch in der Regel von markierten Zellen mit Verbindungen zum Nukleus Reunies durch die bereits genannte Überprüfung des Vorhandenseins von bilateralen Signalen unterscheiden. Ausnahmen hiervon waren Regionen wie der Motorkortex, welche Verbindungen zum Motorkortex der Gegenseite enthalten: Verunreinigungen in der Einstichstelle des Injektionspfades durch den Motorkortex konnten Zellen in benachbarten Regionen des Motorkortex und im kontralateralen Motorkortex markieren. Dies kann durch Verbindungen zu benachbarten Anteilen des Motorkortex und Querverbindungen zum Motorkortex der kontralateralen Seite über das Corpus Callosum erklärt werden. Mögliche Beziehungen der markierten Regionen zum Motorkortex mussten daher bei der Analyse berücksichtigt werden.

Die Wahl von Metallnadeln statt Glasnadeln wie in Experimenten in Ratten könnte Einfluss gehabt haben auf die Präzision und Verunreinigungen durch Fluorogold in den Injektionspfaden [McKenna 2004] [Herkenham 1978] [Cavdar 2008]. Metallnadeln haben im Vergleich zu Glasnadeln zwar eine größere Öffnung, wodurch mehr Leckage von Injektionsmaterial entsteht, sind jedoch wesentlich stabiler und daher gut geeignet,

besonders tiefliegende Strukturen zu erreichen, was bei der Injektion eines tiefliegenden Kerns wie dem Nukleus Reuniens eine entscheidende Eigenschaft zur erfolgreichen Durchführung der Experimente war.

Quantifizierung des Ergebnisses

Vorexperimente zeigten, dass das Auszählen der markierten Zellkörper in den Regionen, in denen sich Fluorogold-Signale fanden, durch die potenten Eigenschaften des Fluorogold die Verwendung einer höheren Auflösung erforderlich gemacht hätten. Die Überlagerung des Signals mehrerer Zellkörper führte häufig zu Schwierigkeiten beim Identifizieren einzelner Zellen. Da jedoch keine Studien in Ratten mit einer vergleichbaren genauen Analyse von Zellzahlen vorlagen, wurde als Ersatz auf eine Analyseform umgeschwenkt, die sich an den vorliegenden Studien orientierte und eine zeitsparendere Schätzung der Signaldichte verwendete. Es wurde ein Verfahren gewählt, in dem die subjektiv wahrgenommene Signaldichte im Sinne einer abgewandelten visuellen Analogskala dargestellt wurde. Dies ermöglichte eine Darstellung der Ergebnisse in Hinblick auf eine Identifikation von Regionen, die Efferenzen zum Nukleus Reuniens aussenden. Dieses Vorgehen stellt eine Vorarbeit für die Identifikation von Zielregionen für zukünftige Studien dar, in denen mit höheren Auflösungen und sekundären Antikörpern einzelne Zelltypen in den markierten Regionen identifiziert werden können.

Funde im Präfrontalen Kortex und Hippocampus

Besonders prominente Signale finden sich im Experiment im Prälimbischen Kortex, im Infralimbischen Kortex und im anterioren Zingulären Kortex, die zusammen den medialen Präfrontalen Kortex bilden.

Auch wenn die funktionelle Organisation des Gedächtnisses in Schleifen im Präfrontalen Kortex noch nicht vollständig verstanden ist [Kandel 2009], so ist im Laufe von Verhaltensexperimenten klargeworden, dass diese Region eine zentrale Rolle für die Organisation des Arbeitsgedächtnisses und beim Planen spielt [Preston 2013] [Vertes 2007]. Dabei werden dem Präfrontalen Kortex eher Aufgaben des Arbeitsgedächtnisses und dem kurzzeitigen Abrufen von Informationen zugeschrieben. Die Rolle des Präfrontalen Kortex scheint jedoch weniger eine zeitlich definierte Rolle im Rahmen des Arbeitsgedächtnisses zu sein, sondern eher eine kontextbezogene und sortierende für Eingänge aus dem Hippocampus

[Preston 2013]. Der Hippocampus wird mit langfristigem Konsolidieren von Erinnerungen des deklarativen Gedächtnisses in Verbindung gebracht [Milner 1957] [Squire 1992] [Tulving 1994] [Vertes 2007] [Kandel 2009] [Li 2015]. Dabei wird angenommen, dass der Nukleus Reuniens eine Funktion als Verbindungspfad für Gedächtnisinhalte zwischen Arbeitsgedächtnis und langfristigem deklarativen Gedächtnis innehat [Vertes 2007] [Xu 2013] [Aggleton2014].

Auch anatomisch sind Verbindungen zu Hirnstrukturen beschrieben worden, die an der Gedächtnisbildung beteiligt sind: Der mediale Präfrontale Kortex erhält direkte Afferenzen aus dem ventralen Anteil von CA1 und dem Subikulum des Hippocampus, die über den Fornix geleitet werden und an exzitatorischen Pyramidenzellen und GABAergen Interneuronen im Präfrontalen Kortex enden [Li 2015]. Ein direkter Pfad zurück zum Hippocampus ist nicht einheitlich beschrieben worden [Cassel 2013] [Rajasethupathy 2015].

Für das Zielgebiet der Afferenzen in diesem Experiment, den Nukleus Reuniens, sind jedoch direkte glutamaterge Efferenzen zum Stratum Lacunosum-Moleculare von CA1 und zum dorsalen Anteil des Subikulums gezeigt worden [Wouterlood 1990] [Vertes 2007].

Die in diesem Experiment gezeigten Afferenzen des Nukleus Reuniens aus dem medialen Präfrontalen Kortex passen daher zu der Theorie eines Pfades, der den medialen Präfrontalen Kortex mit CA1 und dem Subikulum verbindet [Vertes 2007].

Eine solche im Experiment gezeigte Verbindung deckt sich mit Ergebnissen aus anderen Experimenten in Mäusen [Xu 2013] und in Ratten [McKenna2004] [Herkenham 1978] [Cavdar 2008].

Als Verbindungsglied zwischen medialem Präfrontalen Kortex sowie CA1 und Subikulum des Hippocampus sind Efferenzen vom Nukleus Reuniens zum Hippocampus beschrieben worden [Wouterlood 1990] [Vertes 2007]. Dies wird durch Funde unterstützt, die einen Einfluss des Nukleus Reuniens auf die Aktivität der Region CA1 beschreiben [Ito 2015] [Van der Weel 2017]. Bemerkenswerterweise fanden sich im Experiment jedoch auch Hinweise auf Afferenzen aus dem Subikulum und CA1 zurück in den Nukleus Reuniens; ein Ergebnis, welches in der Literatur nicht einheitlich bei Konnektom-Studien zwischen Nukleus Reuniens und Hippocampus beschrieben wurde [Aggleton 2014] [Cassel2013] [McKenna 2004] [Herkenham1978].

Es ist neben dem Theta-Rhythmus des Präfrontalen Kortex und des Hippocampus ein weiteres Netzwerk zwischen Präfrontalen Kortex, Nukleus Reuniens und Hippocampus beschrieben worden, welches niedriger frequente Oszillationen von 2-5Hz verwendet und parallel zum Theta-Netzwerk arbeitet [Roy 2017]. Afferenzen von CA1 und aus dem Subikulum könnten eine Rolle bei der Synchronisation dieser Oszillationen spielen. Dies wird durch Funde nahegelegt, die bei einer Läsion des Nukleus Reuniens eine verminderte Kohärenz der Oszillationen von 2-5Hz zwischen Präfrontalen Kortex und Hippocampus zeigten [Roy 2017].

Funde in weiteren Strukturen

Im Experiment wiesen weitere Strukturen wie der Entorhinale Kortex, der Nukleus Accumbens, das Putamen, das Septofimbriale Kerngebiet und Septale Kerne, das Präoptische Gebiet, der Zinguläre Kortex, Perirhinaler und Ektorhinaler Kortex sowie der Retrospleniale Kortex Fluorogold-markierte Zellen auf. Bei diesen Strukturen sind eine Beteiligung bei Gedächtniskonsolidierung, Aufmerksamkeitssteuerung und Arbeitsgedächtnis beschrieben worden. Für aufsteigende Bahnen aus dem Hirnstamm zum Nukleus Reuniens sind Einflüsse auf die Modulatorischen Funktionen des Nukleus Reuniens bei der Synchronisation von Präfrontalen Kortex und Hippocampus gezeigt worden [Prasad 2017]. Diese Afferenzen aus verschiedenen Regionen deuten auf eine Beeinflussung der modulatorischen Arbeit aus weiten Teilen des Gehirns hin [Griffin 2015]. Dies unterstreicht die Bedeutung des Nukleus Reuniens in der Modulation der Synchronisation des Theta-Netzwerkes und der Gedächtniskonsolidierung zwischen Hippocampus und Präfrontalen Kortex [Roy 2017]. Die Vielzahl von Afferenzen unterstreicht dabei die Rolle des Mittellinienthalamus als Aggregator von Afferenzen aus dem gesamten Gehirn und verdeutlicht so seine Bedeutung als größten thalamo-hippocampalen Input [Vertes 2007].

Entorhinaler Kortex

Für den Nukleus Reuniens der Ratte sind Efferenzen zu den Schichten I sowie III bis VI des ventralen lateralen und medialen Entorhinalen Kortex beschrieben worden [Wouterlood 1990]. Der Entorhinale Kortex spielt eine Rolle bei der Konsolidierung von Erinnerungen im Hippocampus durch Synchronisation von neokortikal-hippocampalen Oszillationen. In Ratten sind synaptische Verbindungen in die gleichen dendritischen Subregionen von Pyramidenzellen der Region CA1 beschrieben worden, wie sie in Studien in Ratten als Zielort von Efferenzen des Nukleus Reuniens gezeigt worden sind, wobei davon ausgegangen wird,

dass sowohl der Entorhinale Kortex als auch der Nukleus Reuniens Einfluss auf die Erregbarkeit der Pyramidalen Zellen haben [Wouterlood 1990] [van der Weel 2017].

Es fanden sich im Experiment im Nukleus Reuniens keine afferenten Zellen aus den Gebieten des Entorhinalen Kortex. Diese Funde werden durch Ergebnisse aus anderen Experimenten unterstützt, welche in der Ratte ebenfalls keine solche Verbindung zwischen Entorhinalem Kortex und Nukleus Reuniens fanden [McKenna 2004], sodass hier ein einseitiger Informationsfluss ausgehend vom Nukleus Reuniens in Richtung des Entorhinalen Kortex angenommen werden kann.

Nukleus Accumbens und Putamen

Im Experiment konnten der Nukleus Accumbens und das Putamen als Ursprungsorte für Afferenzen des Nukleus Reuniens festgestellt werden.

Nukleus Accumbens und Putamen sind Teil der Basalganglien. Die Basalganglien sind an der Regulierung der Motorik beteiligt. Auch sind Verbindungen zu Präfrontalen Assoziationskortexen und zum limbischen System beschrieben worden [DeLong 2007].

Sowohl Nukleus Accumbens als auch Putamen werden zum Dorsalen-Striatum-System gezählt, welches sensorische und motorische Informationen konvergiert. Sie sind als Teil eines Systems beschrieben worden, welches Informationen parallel zum Hippocampalen System speichert [White 2002]. Dabei wird von Verbindungen des Striatums zum Mittellinien Thalamus berichtet [White 2002], zu dem auch der Nukleus Reuniens gehört.

Vorherige Studien an Ratten zu einer solchen Verbindung zwischen Nukleus Reuniens und Accumbens sowie Putamen waren nicht einstimmig. Es gibt Studien, die Afferenzen zum Reuniens gefunden haben [Williams 1977], und Studien, die keine Verbindung gefunden haben [McKenna 2004].

Septofimbriales Kerngebiet und Septale Kerne

Im Experiment fanden sich Ursprünge von Nukleus Reuniens Afferenzen vom Septofimbrialem Kerngebiet und Septalen Kernen.

Diese Gebiete haben sich auch als Ursprungsort von Efferenzen zu Moosfasern im Gyrus Dentatus gezeigt [Sun 2017] und werden mit der Generierung des Theta Rhythmus im

Hippocampus assoziiert [Sanchez-Peres 2015], wobei der Theta Rhythmus auch in anderen Regionen gefunden wurde, die mit der Funktion des Hippocampus zusammenhängen [Fransen 2005].

Die Funde decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten an Ratten [McKenna 2004, Septofimbriale Kerne und Septale Kerne: alle Ratten] [Herkenham 1978]. Diese Afferenzen zum Nukleus Reuniens aus dem Septofimbriales Kerngebiet und den Septalen Kernen passen zu Ergebnissen von Studien, die von einer Beeinflussung der modulierenden Funktion des Nukleus Reuniens auf Hippocampus und Präfrontalen Kortex durch Afferenzen aus einem Netzwerk im Bereich des Hirnstamms und des basalen Vorderhirns ausgehen, denen eine Funktion bei Aufmerksamkeitskontrolle und Arousal zugeschrieben wird. [Prasad 2017].

Präoptisches Gebiet

In den Präoptischen Gebieten fanden sich vor allem medial markierte Zellen.

Sowohl Mediales als auch Laterales Präoptisches Gebiet erhalten Verbindungen aus der Region CA1 des Hippocampus [Cenquizca 2006] und werden mit Belohnungserwartung [Tsurugizawa 2012] assoziiert.

Die Funde sind kongruent mit den Funden in anderen Experimenten [McKenna 2004, alle Testsubjekte] [Herkenham 1978]. Allerdings werden dort auch Funde in den Lateralen, Anterodorsalen und Anteroventralen Anteilen sowie Kernen dieses Gebietes beschrieben, welche im vorliegenden Experiment nicht nachvollzogen werden konnten.

Orbitofrontaler Kortex

Der Mediale, Laterale und Ventrale Orbitale Kortex des Orbitofrontalen Kortex waren im Experiment ebenfalls Gebiete mit Fluorogold-markierten Zellen. Der Orbitofrontale Kortex spielt eine Rolle bei der flexiblen Anpassung von Verhalten [Hoover 2011], insbesondere der Mediale Orbitale Kortex wird mit Funktionen des medialen Präfrontalen Kortex wie zielorientiertes Verhalten und Arbeitsgedächtnis assoziiert [Hoover 2011].

Während die Funde zum Lateralen Orbitalen Kortex sich nicht in anderen Studien finden lassen und eventuell als Artefakt durch die Wahl des Injektionspfades durch den Mediodorsalen Nukleus des Thalamus zu sehen sind [Price 1983], sind die Funde im Medialen Orbitalen Kortex mit anderen Studien kongruent [McKenna 2004] [Hoover 2011, case 9].

Auffällig waren die markierten Zellen im Ventralen Orbitalen Kortex. Der Ventrale Orbitale Kortex ist mit Funktionen der Aufmerksamkeitsteuerung assoziiert worden. Die Studienlage zu Projektionen des Ventralen Orbitalen Kortex und Medialen Orbitalen Kortex in der Ratte ist dünn [Hoover 2011]. In Studien mit Injektionen von retrograden Tracern in den Nukleus Reuniens in Ratten sind keine Afferenzen aus dem Ventralen Orbitalen Kortex beschrieben worden [Herkenham 1978] [McKenna 2004] [Cavdar 2008]. Allerdings fanden sich Projektionen zum Nukleus Reuniens in einer Studie mit Injektionen von anterograden Tracern in den Ventralen Orbitalen Kortex von Ratten [Hoover 2011, case 11], was zu den Funden im Experiment passt.

Zingulärer Kortex

Im Anterioren Zingulären Kortex, welchem eine Rolle bei der Regulierung von Aufmerksamkeit zugeschrieben wird [Koike 2016], konnten im Experiment Zellen nachgewiesen werden. Diese Funde passen zu Ergebnissen aus anderen Studien [McKenna 2004, alle Testsubjekte].

Perirhinaler und Ektorhinaler Kortex

Der Perirhinale Kortex gehört ebenfalls zu den Regionen, in denen markierte Zellen aufzufinden waren. Vom Perirhinalen Kortex ist in Ratten eine Verbindung zum Hippocampus in Zusammenhang mit der Erfassung objektbasierender Informationen als Teil der deklarativen Gedächtnisbildung beschrieben worden [Aggleton 2016].

Der Ektorhinale Kortex war eine weitere Quelle für Afferenzen zum Reuniens. Diese Funde von Afferenzen stimmen mit Ergebnissen in anderen Experimenten überein [McKenna et al, 2004, Perirhinaler Kortex: alle Testsubjekte, Ektorhinaler Kortex: Ratten: 23, 58].

Retrosplenialer Kortex

Der agranuläre als auch der granuläre Anteil des Retrosplenialen Kortex zeigten markierte Zellen. Aktivität im Retroplenalen Kortex ist im Zusammenhang mit Experimenten zu räumlichem Lernen beschrieben worden [Czajkowski 2014]. Die Funde passen zu Funden in der Literatur zu Fluorogold-positiven Zellen in diesen Regionen [McKenna 2004, alle Testsubjekte] [Cavdar 2008] [Herkenham 1978].

Telencephalon

Amygdala

Es fanden sich keine markierten Zellen in Kerngebieten der Amygdala. Primärfunktion der Amygdala ist die Verarbeitung von Angst [Pollak 2008] [Bocchio 2016]. Sekundär ist die Amygdala an Lernen und Gedächtnis beteiligt [Cassel 2013]. Sie wird zur zentralen Struktur eines Systems gezählt, welches parallel zum Dorsalen Striatum System und dem Hippocampalen System Informationen verarbeiten und speichern soll [White 2002]. Für Ratten sind Verbindungen zwischen Nukleus Reuniens und Amygdala beschrieben worden [McKenna 2004, alle Ratten] [Herkenham 1978].

Zwar kann dieser Unterschied in den Funden bei Mäusen und Ratten einerseits methodenspezifische Gründe haben: Eventuell spielen unterschiedlich stark getroffene Kernanteile des Nukleus Reuniens in diesem Experiment im Vergleich mit anderen Experimenten eine Rolle. So projizieren Fasern von der Amygdala vor allem zu medialen und ventralen Anteilen des Nukleus Reuniens, während in den hier vorgestellten Experimenten vor allem dorsale Anteile injiziert wurden. Andererseits ist auch die Möglichkeit speziesspezifischer Unterschiede nicht zu vernachlässigen. Inwieweit es sich bei den Unterschieden um speziesspezifische anatomische Unterschiede zwischen Mäusen und Ratten handelt, muss mit zukünftigen Experimenten näher untersucht werden.

Taenia Tecta

Auch die Taenia Tecta mit ihrem dorsalen Anteil gehört zu den Ursprungsgebieten von Projektionen zum Nukleus Reuniens, was kongruent zu vorhergehenden Funden in der Literatur ist [McKenna 2004, alle Ratten]. Allerdings könnte es sich bei dieser Markierung mit Fluorogold um ein Artefakt handeln, welches auftritt, wenn Fluorogold in den Subarachnoidalraum gelangt [Szabados 1996]. Dass es sich hierbei um einen Fluorogold-spezifischen Effekt im Vergleich zu anderen Tracern handeln könnte, wird durch Studien unterstrichen, die bei Nutzung anderer Tracer keine Effenzen zum Nukleus Reuniens ausgehend von der Taenia Tecta gefunden haben [Herkenham 1978].

Piriformer Kortex und Endopiriformer Kortex

Der Piriforme Kortex und der Endopiriforme Kortex gehörten zu den Regionen, in denen im Experiment in einigen Mäusen Fluorogold-markierte Zellen gefunden wurden. Jedoch wurden in der Literatur keine Verbindungen von dieser Region zum Nucleus Reiniens nachgewiesen [McKenna 2004] [Herkenham 1978]. Allerdings gibt es Beschreibungen von Afferenzen des Mediodorsalen Thalamus ausgehend vom Piriformen Cortex [Pelzer 2017] [Price 1983]. Der Mediodorsale Thalamus liegt direkt im Injektionspfad zum Zielgebiet, sodass eine Artefaktbildung durch Einbringen von Fluorogold in den Mediodorsalen Nucleus hier nicht auszuschließen ist.

Im Experiment konnten Efferenzen vom Dorsalen Pedunculären Kortex gezeigt werden. McKenna und Vertes wiesen keine solchen Verbindungen in ihren Experimenten nach [McKenna 2004].

Motorkortex und Somatosensorische Kortex

Im Motorkortex und Somatosensorischen Kortex fanden sich ebenfalls Signale. Auch wenn es sich hierbei um bilaterale Funde von markierten Zellen handelte, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Signalen um Artefakte handelt, da diese Regionen im Einstichkanal der Nadel in das Hirnparenchym liegen. Nachweise von markierten Zellen in diesen Regionen können daher nicht sicher auf retrogrades Tracing ausgehend vom Nucleus Reiniens zurückgeführt werden, da ein retrogrades Labeling ausgehend von Fluorogold-Resten im Injektionspfad über die interhemispherischen Verbindungen wahrscheinlicher ist.

Laterale und Mediale Habenula

Im Gegensatz zur Lateralen Habenula zeigte die Mediale Habenula in den hier vorgestellten Experimenten keine Ursprünge von Efferenzen zum Nucleus Reiniens. In anderen Studien zeigte sich das umgekehrte Bild, dort waren in der Medialen Habenula Ursprünge von Afferenzen nachweisbar, nicht jedoch in der lateralen Habenula [McKenna 2004, alle Ratten]. In Studien, die nicht Fluorogold als Tracer benutzten, sondern Meerrettichperoxidase, fanden sich keine markierten Zellen in diesen Gebieten [Herkenham 1978]. Allerdings fanden sich in Arbeiten, in denen Fluorogold in den Subarachnoidalraum und in die Zisternen injiziert wurde, markierte Zellen in der Medialen Habenula [Szabados 1996]. Wenn Fluorogold in den Reiniens mit einem Injektionspfad eingebracht wurde, der die Zisternen verschont, finden

sich ebenfalls keine Signale von Fluorogold in den Habenula [Cavdar 2008]. Es ist also möglich, dass es sich bei den in dieser Region mit Fluorogold markierten Zellen um Artefakte durch den gewählten Injektionspfad handelt. Die Frage nach einer direkten Verbindung zwischen Habenula und Nucleus Reuniens sollte in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

Hypothalamus

Der Hypothalamus ist eine Region mit herausragender Bedeutung für die Koordination physiologischer Abläufe des Körpers. In dieser Studie zeigte sich, dass der Hypothalamus auch ein wichtiger Ursprungsort für Signale zum Nucleus Reuniens war.

So konnten die Lateralen und Posterioren Hypothalamischen Gebiete als auch der Ventromediale Nucleus als Ursprungsorte für Verbindungen zum Nucleus Reuniens festgestellt werden. Vor allem auch von Mamillären Kerngebieten fanden sich Afferenzen. Die Mammillarkörperchen spielen eine Rolle in mnemonischen Prozessen. So ist für den supramammillären Nucleus Aktivität in Abhängigkeit vom Theta-Rhythmus des Hippocampus beschrieben worden [Nelson 2017] [Vann 2015]. Auch hat der supramammilläre Kern einen Einfluss auf die Weiterleitung von Theta-Rhythmus-Oszillationen und den Informationsfluss zwischen Hippocampus und Reuniens [Ito 2018] [Magloczky 1994]. Im Experiment traten hierbei vor allem das Mediale und Laterale Mamilläre Gebiet sowie das Supramammilläre Kerngebiet mit Fluorogold-markierten Zellen hervor. Dies passt zu Funden in Ratten [McKenna 2004, Mediale und Laterale Mamilläre Gebiete und Supramammilläres Kerngebiet: alle Ratten]. In den vorliegenden Experimenten fanden sich jedoch auch Afferenzen aus weiteren Kerngebieten der Mamillarkörperchen wie den Prämamillären Nuclei und dem Tuberosomammillären Nucleus. Ursache für diese abweichenden Funde könnten zwar einerseits wieder unterschiedlich durch das Tracerdepot erfasste Subregionen des Nucleus Reuniens sein. Andererseits muss unterstrichen werden, dass auch in diesem Fall die Möglichkeit speziesspezifischer Unterschiede nicht vernachlässigt werden und in zukünftigen Experimenten näher untersucht werden sollte.

Thalamus

Der Thalamus zeigte deutliche Verbindungen zum Nucleus Reuniens.

In Kerngebieten des von Vertes [Vertes 2015] postulierten "Limbischen Thalamus", zu denen der Nucleus Reuniens gezählt wird, fanden sich im Experiment im Zentralen Medialen

Thalamischen Nukleus, dem Rhomboiden Thalamischen Nukleus und dem intermediodorsalen Nukleus Ursprungsorte für Efferenzen zum Nukleus Reuniens. Im Paraventriculären Kerngebiet des Thalamus, der von Vertes ebenfalls zu dem „limbischen Thalamus“ gezählt wird, fanden sich jedoch keine markierten Zellen, was kongruent zu den Funden in Ratten ist [McKenna 2004, alle Ratten].

Im Experiment fanden sich zusätzlich Ursprünge für Afferenzen zum Nukleus Reuniens aus dem Submedialen Nukleus und dem Ventromedialen Nukleus des Thalamus sowie aus dem posterioren intralaminären Kerngebiet. Allerdings fanden sich im Gegensatz zu den Experimenten in Ratten nur in einer Maus Afferenzen aus dem lateralen Genikulären Kernkomplex, wodurch dieser Fund in einer einzelnen Maus nicht zu den relevanten Ergebnissen gezählt wurde.

Hirnstamm

Es fanden sich in den rostralen Anteilen des Hirnstamms Ursprungsorte für Afferenzen des Nukleus Reuniens.

So fanden sich im Bereich des Zentralen Graus, in Kommissuralen Kerngebieten, in Retikulären Tegmentalen und ventralen Tegmentalen Kerngebieten, im Bereich des Tiefen Mesenzephalischen Kerns und in Kerngebieten des Collikululus superior Efferenzen zum Nukleus Reuniens; ähnliche Funde wurden auch in der Literatur beschrieben [McKenna 2004, Zentrales Grau: alle Ratten; Kommissurale Kerngebiete: alle Ratten; Retikuläres Kerngebiet: Ratten 23 und 58; ventrales Tegmentales Kerngebiet: alle Ratten; Tiefer Mesenzephalischer Kern: alle Ratten; Kerngebiete des Collikululus Superior: alle Ratten] [Krout 2000] [Cavdar 2008] [Herkenham 1978].

Auch im Dorsalen Raphe Kerngebiet fanden sich Verbindungen zum Nukleus Reuniens, was kongruent zu anderen Experimenten ist [McKenna 2004, alle Ratten], jedoch fanden sich dort auch weitere Anteile der Raphe Kerngebiete als Ursprungsorte für Verbindungen. Allerdings zeigten sich bei Injektionen von Fluorogold in den Subarachnoidalraum auch markierte Zellen im Medialen Raphe Kerngebiet, sodass es sich hierbei wieder um ein Fluorogold-assoziiertes Artefakt handeln könnte [Szabados 1996]. Dagegen spricht jedoch, dass sich markierte Zellen auch in Experimenten fanden, die nicht Fluorogold verwendeten [Herkenham 1978].

Vergleich mit Ergebnissen in Ratten

Im Experiment fanden sich Unterschiede zu Experimenten in Ratten, bei denen retrograde Tracer in den Nukleus Reuniens injiziert worden sind. Am auffälligsten waren die fehlenden Funde von markierten Zellen in der Amygdala im Gegensatz zu Experimenten in Ratten [McKenna 2004] [Herkenham 1978]. Ebenso fanden sich im Gegensatz zu den Studien in Ratten keine Zellen im Medianen Raphe Kerngebiet und im lateralen Präoptischen Gebiet, und es fanden sich nur in einem Fall Zellen im lateralen Genikulären Komplex, welcher in Ratten als ein wichtiger Ursprungsort für Afferenzen beschrieben worden ist [McKenna 2004]. Dafür konnten Afferenzen aus weiteren Kerngebieten der Mamillarkörperchen wie den Prämamillären Nuklei und dem Tuberomamillären Nukleus nachgewiesen werden, die nicht in Ratten beschrieben worden sind [McKenna 2004] [Herkenham 1978]. Es ist ein topographischer Zusammenhang zwischen Zellregionen im Nukleus Reuniens und in Regionen beschrieben worden, die mit dem Nukleus Reuniens in Verbindung stehen [Herkenham 1978]. Das bedeutet, dass jeweils verschiedene Anteile des Nukleus Reuniens mit jeweils verschiedenen Hirnregionen verbunden sind. Unterschiede im genauen Injektionsort im Nukleus Reuniens könnten daher eine Erklärung für die unterschiedlichen Fundstellen sein. Allerdings darf die Möglichkeit von speziespezifischen Unterschieden im Konnektom von Mäusen und Ratten nicht vernachlässigt werden.

Insbesondere interessant sind hierbei die Unterschiede bei den Funden im Orbitofrontalen Kortex, der ähnliche Funktionen aufweist wie der mediale Präfrontale Kortex in Hinblick auf Aufmerksamkeitssteuerung und flexible Anpassung von Verhalten [Hoover 2011]. Die Funde im Medialen Orbitalen Kortex waren in Ratten und Mäusen kongruent [McKenna 2004] [Cavdar 2008] [Hoover 2011]. Im Ventralen Orbitalen Kortex gab es jedoch Unterschiede: Im Ventralen Medialen Kortex zeigten sich Ursprünge von Afferenzen in den Nukleus Reuniens, die sich in Ratten zwar nicht bei Injektionen in den Nukleus Reuniens zeigten [Herkenham 1978] [McKenna 2004] [Cavdar 2008], allerdings bei Injektionen mit einem anterograden Tracer in den Ventralen Orbitalen Kortex [Hoover 2011].

In der Literatur fanden sich auch Funde im Paraventriculären Kerngebiet, die sich bei Mäusen nicht reproduzieren ließen. Durch die Nähe des Paraventriculären Nukleus zum Zisternensystem lassen sich Verunreinigungen mit Fluorogold, welches in den Liquor gelangt ist, in den zitierten Experimenten nicht ausschließen [Szabados 1996].

Im Bereich des Piriformen Kortex fanden sich im Experiment Fluorogold-markierte Zellen, die nicht in der Literatur beschrieben wurden [McKenna 2004] [Herkenham 1978] [Cavdar 2008]. Dies könnte durch eine Mitinjektion des Mediodorsalen Nukleus des Thalamus bedingt sein. So sind Verbindungen zwischen dem Piriformen Kortex und dem Mediodorsalen Nukleus beschrieben worden [Kowianski 1999].

Abgesehen von diesen Regionen gab es auch markierte Regionen im agranulären Medialen Kortex, im Präoptischen Areal, Hypothalamus, Hirnstamm und Thalamus, die nur in einer Studie beschrieben wurden [McKenna 2004]. Dies könnte mit Unterschieden in der Methode der Injektion im Vergleich zu anderen Studien zusammenhängen [McKenna 2004] [Herkenham 1978] [Cavdar 2008].

Eine Übersicht über gleiche Funde und Unterschiede bietet die Liste in Tabelle 2.

Tabelle 2 Vergleichende Auflistung von Funden in der Studie im Vergleich zu Studien in Ratten Die Auswahl der aufgelisteten Gebiete orientiert sich zur besseren Vergleichbarkeit an den vorhergehenden Studien in Ratten. Beschriftung auf Englisch, um die Arbeit mit dem „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“ und den Studien an Ratten zu erleichtern. Ein Plus (+) stellt ein Fundgebiet dar, ein Minus (-) zeigt eine Region ohne Funde von Fluorogold im Experiment. Aufteilung der Hirnregionen in ipsilateral und kontralateral von der Injektionsseite im Experiment und Auflistung von Funden in Studien von Herkenham 1978 und McKenna 2004 mit Injektionen von retrograden Tracern in den Nukleus Reuniens von Ratten

	Funde ipsilateral	Funde contralateral	Herkenham 1978	McKenna 2004
Telencephalon				
Amygdala	-	-	+	+
Clastrum	+	+		+
Septofimbrial Nucleus	+	+		+
Septum	+	+	+	+
Taenia Tecta	+	+		+
Cortex				
Agranular Insular Cortex	+	+		+
Agranular Medial Cortex	-	-		+
Anterior Cingulate Cortex	+	+	+	+
Ectorhinal Cortex	+	+		(+)
Entorhinal Cortex	-	-		-

Infralimbic Cortex	+	+		+
Medial Orbital Cortex	+	+		+
Parietal Cortex	-	-		-
Perirhinal Cortex	+	+		+
Piriform Cortex	+	+		-
Prelimbic Cortex	+	+		+
granular Retrosplenial Cortex	+	+		+
agranular Retrosplenial Cortex	+	+		+
Somatosensory Cortex	+	+		+
Motor Cortex	+	+		
Endopiriform Cortex	-	-		-
Hippocampal Formation				
Subiculum	+	+	+	+
Presubiculum	+	+		+
Dentate Gyrus	-	-		-
Ammon's Horn	+	+		+
Preoptic Area				
Anterodorsal Preoptic Nucleus	-	-		+
Anteroventral Preoptic Nucleus	-	-		+
Lateral Preoptic Area	-	-	+	+
Magnocellular Preoptic Area	-	-		+
Medial Preoptic Area	+	+	+	+
Median Preoptic Area	-	-		+
Diencephalon				
Epithalamus				
Lateral Habenula	+	+		+

Medial habenula	-	-		-
Hypothalamus				
Anterior Hypothalamic Area	-	-		+
Anterior Nucleus	-	-		+
Dorsomedial Nucleus	-	-		+
Lateral Hypothalamic Area	+	+	+	+
Lateral Mammillary Area	+	+		+
Medial Mammillary Area	+	+		+
Paraventricular Nucleus	-	-		-
Posterior Hypothalamus	+	+	+	+
Premamillary Nucleus	-	-	+	+
Supramammillary Nucleus	+	+	+	+
Tuberomammillary Nucleus	-	-		+
Ventromedial Nucleus	+	+	+	+
Thalamus				
Intergeniculate Leaflet	-	-		+
Lateral Dorsal Nucleus	-	-		+
Lateral Geniculate Complex	-	-	+	+
Paraventricular Nucleus	-	-	+	+
Reticular Nucleus	-	-		+
Brainstem				
Central Grey	+	+	+	+
Commissural nucleus	+	+		+
Cuneiform Nucleus	-	-		+
Dorsal Raphe Nucleus	+	+	+	+
Interpeduncular Nucleus	-	-		-
Laterodorsal tegmental nucleus	-	-		+

Locus coeruleus	-	-		+
Median Raphe Nucleus	-	-	+	+
Nuclei solitary tract	-	-		(+)
Pedunculopontine nucleus	-	-		+
Peripeduncular Nucleus	-	-		+
Precomissural Nucleus	-	-		+
Reticulotegmental Nucleus	+	+		(+)
Superior Colliculus	+	+		+
Ventral Tegmental Area	+	+	+	+

Perspektiven

Auch in dieser Studie zeigte sich der Nukleus Reuniens als Kerngebiet mit weitreichenden Verbindungen in das gesamte Gehirn. Im Vergleich zwischen Mäusen und Ratten zeigten sich zwar einige Unterschiede bei der Darstellung der Afferenzen des Nukleus Reuniens zwischen Mäusen und Ratten, jedoch entsprechen die Funde im Präfrontalen Kortex und Hippocampus jenen in Ratten, was für eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von den Verhältnissen in Ratten auf die Verhältnisse in Mäusen in Bezug auf die Zusammenarbeit zwischen Hippocampus, Präfrontalem Kortex und Nukleus Reuniens spricht. Die direkte Übertragbarkeit von Erkenntnissen in diesen Regionen von einer Spezies zu einer anderen ist jedoch immer mit Vorsicht zu betrachten. Obwohl die Konnektivität zwischen Nukleus Reuniens, Hippocampus und Präfrontalem Kortex weitgehend konserviert scheint, ist es jedoch möglich, dass die hier detektierten Unterschiede in den Afferenzen z. B. von der Amygdala oder dem Ventralen Orbitalen Kortex zu speziesspezifischen Unterschieden in der Synchronisation und damit konsekutiv in der Kommunikation zwischen Nukleus Reuniens, Hippocampus und Präfrontalem Kortex führen. Auch genauere Untersuchungen zu einzelnen Subregionen des Nukleus Reuniens sollten durchgeführt werden, um auch eventuelle speziesspezifische Unterschiede in den topographischen Verknüpfungen zu anderen Hirnregionen zu berücksichtigen. Dessen ungeachtet ist es hilfreich, zu untersuchen, wie diese Regionen in Mäusen und Ratten funktionieren. Dies bietet Ansatzpunkte, um basale Grundprinzipien und Abläufe auch beim Menschen nachvollziehen zu können, um die Arbeitsweise des Gedächtnisses beim Menschen besser zu verstehen. Depressionen, Schizophrenie und demenzielle Erkrankungen gehen mit Gedächtnisstörungen und strukturellen Veränderungen von Präfrontalem Kortex und Hippocampus einher. Das Erarbeiten genauerer Modelle der Abläufe der Gedächtnisbildung ist eine Voraussetzung, um neue Strategien zur Behandlung dieser Erkrankungen zu entwickeln. Die Ähnlichkeit der Funde in Mäusen im Vergleich zu Ratten in Bezug auf Präfrontalen Kortex und Hippocampus eröffnet dabei neue Ansätze.

Um die dargestellten Netzwerke genauer und auf zellulärer Ebene zu charakterisieren, sollten in zukünftigen Experimenten immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden, um einzelne Zelltypen, die zum Aufbau der Schaltkreise beitragen, zu identifizieren. Um die funktionelle Bedeutung der einzelnen Verbindungen zu untersuchen, könnte bei Versuchen am Mausmodell die Aktivität dieser Regionen selektiv durch optogenetische Manipulationen

moduliert werden. Ein interessantes Zielgebiet wären zum Beispiel Efferenzen des Nucleus Reunians an Dendriten von Pyramidenzellen von CA1, die mit Efferenzen aus dem Entorhinalen Kortex dort an denselben dendritischen Abschnitten konvergieren. Eine nähere Untersuchung des Einflusses des Nucleus Reunians auf das 2-5Hz Netzwerk zwischen Präfrontalem Kortex, Nucleus Reunians und Hippocampus und seinem Einfluss auf die Theta-Oszillationen wäre auf diesem Weg auch möglich.

In Kombination mit Verhaltensexperimenten ließen sich so Rückschlüsse auf Aufgaben dieser Zellen z.B. bei der Gedächtnisbildung ziehen. Klassische Labyrinthvarianten oder sogenannte Touchscreen Chambers, eine Form modifizierter Skinner-Boxen, welche verschiedene Varianten der Leistungstestung von Präfrontalem Kortex und Hippocampus in Bezug auf das Arbeitsgedächtnis auf kleinstem Raum ermöglichen, würden sich hierfür anbieten. Die Verknüpfung von Nucleus Reunians, Präfrontalen Kortex und Hippocampus kann so Stück für Stück erarbeitet werden.

Der Nucleus Reunians ist jedoch auch selbst ein interessantes Therapiezielgebiet. So sind bei Studien zur Behandlung chronischer Schmerzen mit tiefer Hirnstimulation Elektroden in das entsprechende Kerngebiet im Menschen, dem Nucleus Endymalis, eingebracht worden und führten zu günstigen Ergebnissen bei der Schmerztherapie der Patienten [Wallace 2004] [Rasche 2006] [Strenge 1981]. Durch seine Verbindungen zur schmerzregulierenden Region des Zentralen Höhlengraus sollte die Eignung dieses Thalamuskerngebietes als Zielort dieser Therapieform genauer untersucht werden.

Zusammenfassung

Der Nukleus Reuniens bildet den größten Kern des sogenannten Mittellinien-Thalamus und gilt als zentraler Knotenpunkt für die Kommunikation zwischen Präfrontalem Kortex und Hippocampus. Er spielt eine zentrale Rolle für verschiedene kognitive und mnestiche Leistungen. Weitere Hirnregionen, die Efferenzen zum Nukleus Reuniens senden, können die Kommunikation zwischen Präfrontalem Kortex und Hippocampus modulieren. Ziel der Arbeit war es, das afferente Konnektom des Nukleus Reuniens in der Maus darzustellen, um eine anatomische Basis für zukünftige funktionelle Analysen des Netzwerkes zu schaffen. Nach Injektionen des Nukleus Reuniens mit dem retrograden Tracer Fluorogold stellten sich weitreichende Verbindungen aus verschiedenen Teilen des Gehirns zum Nukleus Reuniens dar. Die detektierten Verbindungen wurden daraufhin mit Daten aus der Literatur, die in Ratten erhoben worden sind, verglichen. Weitgehende Übereinstimmungen zwischen den Spezies fanden sich in den Verbindungen vom Präfrontalen Kortex und Hippocampus/Subiculum. Es wurden jedoch auch bedeutende Unterschiede festgestellt. So ließen sich die Funde von Afferenzen aus dem Gebiet der Amygdala in Mäusen nicht reproduzieren. Dafür fanden sich afferente Verbindungen aus dem Ventralen Orbitalen Kortex, die in ähnlichen Experimenten in Ratten nicht beschrieben wurden. Aufgrund der speziesspezifischen afferenten Konnektivität des Nukleus Reuniens ist zu vermuten, dass sich auch die Funktion dieser Netzwerke zwischen Mäusen und Ratten in einem gewissen Rahmen unterscheidet.

Nach Etablierung der anatomischen Verbindungen soll in Zukunft die genetische Zugänglichkeit der Maus genutzt werden, um die dargestellten Schaltkreise funktionell zu untersuchen. So bieten sich beispielsweise optogenetische Manipulationen an. Einzelne Zellen in den neuronalen Schaltkreisen können auf diese Weise aktiviert und deaktiviert werden. In Kombination mit Verhaltensexperimenten lassen sich so Rückschlüsse z.B. auf Gedächtnisprozesse ziehen. Durch seine weitreichenden Verbindungen in wichtige Regionen der Gedächtnisbildung, der emotionalen Regulation und der Schmerzregulation ist der Nukleus Reuniens auch eine der Schlüsselregionen bei der Erforschung komplexer neurologischer Erkrankungen und der Entwicklung neuer Therapien.

Anhang

Literatur

Aggleton, J. P. (2014). "Looking beyond the hippocampus: old and new neurological targets for understanding memory disorders." Proc Biol Sci **281**(1786).

Aghajanian, G. K. and R. Y. Wang (1977). "Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique." Brain Res **122**(2): 229-242.

Alan D. Baddeley, G. H. (1974). "Working Memory."

Atkinson, R. C. (1968). "Computerized instruction and the learning process." Am Psychol **23**(4): 225-239.

Barker, G. R. I. and E. C. Warburton (2018). "A Critical Role for the Nucleus Reuniens in Long-Term, But Not Short-Term Associative Recognition Memory Formation." J Neurosci **38**(13): 3208-3217.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.

Bocchio, M., S. B. McHugh, D. M. Bannerman, T. Sharp and M. Capogna (2016). "Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle." Front Neural Circuits **10**: 24.

Brandon, E. P., M. Zhuo, Y. Y. Huang, M. Qi, K. A. Gerhold, K. A. Burton, E. R. Kandel, G. S. McKnight and R. L. Idzerda (1995). "Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8851-8855.

Cassel, J. C., A. Pereira de Vasconcelos, M. Loureiro, T. Cholvin, J. C. Dalrymple-Alford and R. P. Vertes (2013). "The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications." Prog Neurobiol **111**: 34-52.

Cavdar, S., F. Y. Onat, Y. O. Cakmak, H. R. Yananli, M. Gulcebi and R. Aker (2008). "The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat." J Anat **212**(3): 249-256.

Cenquizca, L. A. and L. W. Swanson (2006). "Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat." J Comp Neurol **497**(1): 101-114.

Cole, K. S. and H. J. Curtis (1939). "Electric Impedance of the Squid Giant Axon during Activity." J Gen Physiol **22**(5): 649-670.

Courtney, S. M., L. Petit, J. V. Haxby and L. G. Ungerleider (1998). "The role of prefrontal cortex in working memory: examining the contents of consciousness." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1377): 1819-1828.

Czajkowski, R., B. Jayaprakash, B. Wiltgen, T. Rogerson, M. C. Guzman-Karlsson, A. L. Barth, J. T. Trachtenberg and A. J. Silva (2014). "Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(23): 8661-8666.

Daniel L. Schacter, E. T. (1994). "What are the memory systems of 1994?" **Memory Systems 1994**.

DeLong, M. R. and T. Wichmann (2007). "Circuits and circuit disorders of the basal ganglia." Arch Neurol **64**(1): 20-24.

Dolleman-van der Weel, M. J., F. H. Lopes da Silva and M. P. Witter (2017). "Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat." Brain Struct Funct **222**(5): 2421-2438.

Dolleman-van der Weel, M. J., R. G. Morris and M. P. Witter (2009). "Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning." Brain Struct Funct **213**(3): 329-342.

Floresco, S. B., J. K. Seamans and A. G. Phillips (1997). "Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay." J Neurosci **17**(5): 1880-1890.

Fransen, E. (2005). "Functional role of entorhinal cortex in working memory processing." Neural Netw **18**(9): 1141-1149.

Griffin, A. L. (2015). "Role of the thalamic nucleus reuniens in mediating interactions between the hippocampus and medial prefrontal cortex during spatial working memory." Front Syst Neurosci **9**: 29.

Grot, S., V. P. Legare, O. Lipp, I. Soulieres, F. Dolcos and D. Luck (2017). "Abnormal prefrontal and parietal activity linked to deficient active binding in working memory in schizophrenia." Schizophr Res.

Hallock, H. L., A. Wang and A. L. Griffin (2016). "Ventral Midline Thalamus Is Critical for Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Spatial Working Memory." J Neurosci **36**(32): 8372-8389.

Hebb, D. O. (1949). "The Organization of Behavior - a neuropsychological Theory."

Hembrook, J. R. and R. G. Mair (2011). "Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance." Hippocampus **21**(8): 815-826.

Hembrook, J. R., K. D. Onos and R. G. Mair (2012). "Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat." Hippocampus **22**(4): 853-860.

Herkenham, M. (1978). "The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat." J Comp Neurol **177**(4): 589-610.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**(4): 500-544.

Hodgkin, A. L. and B. Katz (1949). "The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid." J Physiol **108**(1): 37-77.

Hoover, W. B. and R. P. Vertes (2011). "Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat." J Comp Neurol **519**(18): 3766-3801.

Ito, H. T., E. I. Moser and M. B. Moser (2018). "Supramammillary Nucleus Modulates Spike-Time Coordination in the Prefrontal-Thalamo-Hippocampal Circuit during Navigation." Neuron **99**(3): 576-587 e575.

Ito, H. T., S. J. Zhang, M. P. Witter, E. I. Moser and M. B. Moser (2015). "A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation." Nature **522**(7554): 50-55.

Jankowski, M. M., M. N. Islam, N. F. Wright, S. D. Vann, J. T. Erichsen, J. P. Aggleton and S. M. O'Mara (2014). "Nucleus reuniens of the thalamus contains head direction cells." Elife **3**.

Jones, M. W. and M. A. Wilson (2005). "Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task." PLoS Biol **3**(12): e402.

Kafetzopoulos, V., N. Kokras, I. Sotiropoulos, J. F. Oliveira, H. Leite-Almeida, A. Vasalou, V. M. Sardinha, Z. Papadopoulou-Daifoti, O. F. X. Almeida, K. Antoniou, N. Sousa and C. Dalla (2018). "The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression." Mol Psychiatry **23**(3): 579-586.

Kandel, E. (1982). "The origins of modern neuroscience." Annu Rev Neurosci **5**: 299-303.

Kandel, E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses." Biosci Rep **21**(5): 565-611.

Kandel, E. R. (2009). "The biology of memory: a forty-year perspective." J Neurosci **29**(41): 12748-12756.

Kandel, E. R. and J. H. Schwartz (1982). "Molecular biology of learning: modulation of transmitter release." Science **218**(4571): 433-443.

Kesner, R. P., M. E. Hunt, J. M. Williams and J. M. Long (1996). "Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location, and visual object information in the rat." Cereb Cortex **6**(2): 311-318.

Kinnavane, L., E. Amin, C. M. Olarte-Sanchez and J. P. Aggleton (2016). "Detecting and discriminating novel objects: The impact of perirhinal cortex disconnection on hippocampal activity patterns." Hippocampus **26**(11): 1393-1413.

Koike, H., M. P. Demars, J. A. Short, E. M. Nabel, S. Akbarian, M. G. Baxter and H. Morishita (2016). "Chemogenetic Inactivation of Dorsal Anterior Cingulate Cortex Neurons Disrupts Attentional Behavior in Mouse." Neuropsychopharmacology **41**(4): 1014-1023.

Kowianski, P., M. Lipowska and J. Morys (1999). "The piriform cortex and the endopiriform nucleus in the rat reveal generally similar pattern of connections." Folia Morphol (Warsz) **58**(1): 9-19.

Kramer, R. H., D. L. Fortin and D. Trauner (2009). "New photochemical tools for controlling neuronal activity." Curr Opin Neurobiol **19**(5): 544-552.

Krout, K. E. and A. D. Loewy (2000). "Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat." J Comp Neurol **424**(1): 111-141.

Li, M., C. Long and L. Yang (2015). "Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders." Biomed Res Int **2015**: 810548.

Magloczky, Z., L. Acsady and T. F. Freund (1994). "Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat." Hippocampus **4**(3): 322-334.

McKenna, J. T. and R. P. Vertes (2004). "Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus." J Comp Neurol **480**(2): 115-142.

Miesenbock, G. (2009). "The optogenetic catechism." Science **326**(5951): 395-399.

Miller, G. A. (1956). "The magical number seven plus or minus two: some limits on our capacity for processing information." Psychol Rev **63**(2): 81-97.

Molter, C., J. O'Neill, Y. Yamaguchi, H. Hirase and X. Leinekugel (2012). "Rhythmic modulation of theta oscillations supports encoding of spatial and behavioral information in the rat hippocampus." Neuron **75**(5): 889-903.

Morse, W. H. and B. F. Skinner (1958). "Some factors involved in the stimulus control of operant behavior." J Exp Anal Behav **1**: 103-107.

Moser, E. I. and M. B. Moser (2008). "A metric for space." Hippocampus **18**(12): 1142-1156.

Nelson, A. J. D. and S. D. Vann (2017). "The importance of mammillary body efferents for recency memory: towards a better understanding of diencephalic amnesia." Brain Struct Funct **222**(5): 2143-2156.

O'Dell, T. J., E. R. Kandel and S. G. Grant (1991). "Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors." Nature **353**(6344): 558-560.

O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." Brain Res **34**(1): 171-175.

O'Neill, P. K., J. A. Gordon and T. Sigurdsson (2013). "Theta oscillations in the medial prefrontal cortex are modulated by spatial working memory and synchronize with the hippocampus through its ventral subregion." J Neurosci **33**(35): 14211-14224.

Pavlov, I. (1904). "Nobel Lecture." The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1904.

Pelzer, P., H. Horstmann and T. Kuner (2017). "Ultrastructural and Functional Properties of a Giant Synapse Driving the Piriform Cortex to Mediodorsal Thalamus Projection." Front Synaptic Neurosci **9**: 3.

Pollak, D. D., F. J. Monje, L. Zuckerman, C. A. Denny, M. R. Drew and E. R. Kandel (2008). "An animal model of a behavioral intervention for depression." Neuron **60**(1): 149-161.

Prasad, J. A., A. R. Abela and Y. Chudasama (2017). "Midline thalamic reuniens lesions improve executive behaviors." Neuroscience **345**: 77-88.

Preston, A. R. and H. Eichenbaum (2013). "Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory." Curr Biol **23**(17): R764-773.

Price, J. L. and B. M. Slotnick (1983). "Dual olfactory representation in the rat thalamus: an anatomical and electrophysiological study." J Comp Neurol **215**(1): 63-77.

Rajasethupathy, P., S. Sankaran, J. H. Marshel, C. K. Kim, E. Ferenczi, S. Y. Lee, A. Berndt, C. Ramakrishnan, A. Jaffe, M. Lo, C. Liston and K. Deisseroth (2015). "Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval." Nature **526**(7575): 653-659.

Rasche, D., P. C. Rinaldi, R. F. Young and V. M. Tronnier (2006). "Deep brain stimulation for the treatment of various chronic pain syndromes." Neurosurg Focus **21**(6): E8.

Routh, B. N., D. Johnston, K. Harris and R. A. Chitwood (2009). "Anatomical and electrophysiological comparison of CA1 pyramidal neurons of the rat and mouse." J Neurophysiol **102**(4): 2288-2302.

Roy, A., F. P. Svensson, A. Mazeh and B. Kocsis (2017). "Prefrontal-hippocampal coupling by theta rhythm and by 2-5 Hz oscillation in the delta band: The role of the nucleus reuniens of the thalamus." Brain Struct Funct **222**(6): 2819-2830.

Sanchez-Perez, A. M., I. Arnal-Vicente, F. N. Santos, C. W. Pereira, N. ElMlili, J. Sanjuan, S. Ma, A. L. Gundlach and F. E. Olucha-Bordonau (2015). "Septal projections to nucleus incertus in the rat: bidirectional pathways for modulation of hippocampal function." J Comp Neurol **523**(4): 565-588.

Schmued, L. C. and J. H. Fallon (1986). "Fluorogold - a New Fluorescent Retrograde Axonal Tracer with Numerous Unique Properties." Brain Research **377**(1): 147-154.

Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.

Shu, S. Y. and G. M. Peterson (1988). "Anterograde and retrograde axonal transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) from the globus pallidus to the striatum of the rat." J Neurosci Methods **25**(2): 175-180.

Squire, L. R. (1992). "Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory." J Cogn Neurosci **4**(3): 232-243.

Streng, H., E. Braak, H. Braak and U. Muhtaroglu (1981). "On the nucleus endymalis of the human thalamus." J Hirnforsch **22**(3): 243-252.

Sun, Y., S. F. Grieco, T. C. Holmes and X. Xu (2017). "Local and Long-Range Circuit Connections to Hilar Mossy Cells in the Dentate Gyrus." eNeuro **4**(2).

Szabados, G., I. Kovacs, Z. Loderer and G. Setalo (1996). "Distribution of Fluoro-Gold (FG) in the central nervous system of the rat following its injection into the cerebello-medullary cistern." Acta Biol Hung **47**(1-4): 411-418.

Thorpe, W. H. (1944). "Some Problems of Animal Learning." Proceedings of the Linnaean Society of London **Session 156 1943-44**(part 2): S. 70-83.

Tsurugizawa, T., A. Uematsu, H. Uneyama and K. Torii (2012). "Functional brain mapping of conscious rats during reward anticipation." J Neurosci Methods **206**(2): 132-137.

Tulving, E. and D. L. Schacter (1990). "Priming and human memory systems." Science **247**(4940): 301-306.

Vann, S. D. and A. J. Nelson (2015). "The mammillary bodies and memory: more than a hippocampal relay." Prog Brain Res **219**: 163-185.

Vertes, R. P. (2002). "Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens." J Comp Neurol **442**(2): 163-187.

Vertes, R. P., W. B. Hoover, K. Szigeti-Buck and C. Leranth (2007). "Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus." Brain Res Bull **71**(6): 601-609.

Vertes, R. P., S. B. Linley and W. B. Hoover (2015). "Limbic circuitry of the midline thalamus." Neurosci Biobehav Rev **54**: 89-107.

Wallace, B. A., K. Ashkan and A. L. Benabid (2004). "Deep brain stimulation for the treatment of chronic, intractable pain." Neurosurg Clin N Am **15**(3): 343-357, vii.

White, N. M. and R. J. McDonald (2002). "Multiple parallel memory systems in the brain of the rat." Neurobiol Learn Mem **77**(2): 125-184.

Williams, D. J., A. R. Crossman and P. Slater (1977). "The efferent projections of the nucleus accumbens in the rat." Brain Res **130**(2): 217-227.

Wouterlood, F. G., E. Saldana and M. P. Witter (1990). "Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin." J Comp Neurol **296**(2): 179-203.

Wulff, P. and B. R. Arenkiel (2012). "Chemical genetics: receptor-ligand pairs for rapid manipulation of neuronal activity." Curr Opin Neurobiol **22**(1): 54-60.

Xu, W. and T. C. Sudhof (2013). "A neural circuit for memory specificity and generalization." Science **339**(6125): 1290-1295.

Yoon, T., J. Okada, M. W. Jung and J. J. Kim (2008). "Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats." Learn Mem **15**(3): 97-105.

Zimmerman, E. C. and A. A. Grace (2016). "The Nucleus Reuniens of the Midline Thalamus Gates Prefrontal-Hippocampal Modulation of Ventral Tegmental Area Dopamine Neuron Activity." J Neurosci **36**(34): 8977-8984.

Zimmerman, E. C. and A. A. Grace (2018). "Prefrontal cortex modulates firing pattern in the nucleus reuniens of the midline thalamus via distinct corticothalamic pathways." Eur J Neurosci **48**(10): 3255-3272.

Abkürzungsverzeichnis

2Cb	2nd Cerebellar lobule
3Cb	3rd Cerebellar lobule
3PC	oculomotor nucleus, parvicellular part
3V	3rd ventricle
4N	trochlear nucleus
4n	trochlear nerve or its root
4V	4th ventricle
7n	facial nerve or its root
7N	facial nucleus
8n	vestibulocochlear nerve
A1	noradrenaline cells
AAD	anterior amygdaloid area, dorsal part
AAV	anterior amygdaloid area, ventral part
AC	anterior commissural nucleus
aca	anterior commissure, anterior part
Acb	accumbens nucleus
AcbC	accumbens nucleus, core
AcbSH	accumbens nucleus, shell
Acs5	accessory trigeminal nucleus
ACo	anterior cortical amygdaloid nucleus
acp	anterior commissure, posterior
ADP	anterodorsal preoptic nucleus
AHA	anterior hypothalamic area, anterior part
AHiAL	amygdalohippocampal area, anterolateral
AHiPM	amygdalohippocampal area, posteromedial part
AID	agranular insular cortex, dorsal part
AIP	agranular insular cortex, posterior part
AIV	agranular insular cortex, ventral part
alv	alveus of the hippocampus
AM	anteromedial thalamic nucleus
Ant	anterior lobe cerebellum
AOM	anterior olfactory nucleus, medial part
AOP	anterior olfactory nucleus, posterior part
Apit	anterior lobe of pituitary
Apir	amygdalopiriform transition area
APT	anterior pretectal nucleus
APTD	anterior pretectal nucleus, dorsal part
Aq	Aqueduct
ArcD	arcuate hypothalamic nucleus, dorsal part
ArcL	arcuate hypothalamic nucleus, lateral part
ArcLP	arcuate hypothalamic nucleus, lateroposterior part
ArcMP	arcuate hypothalamic nucleus, medial posterior part
AStr	amygdalostriatal transition area

Au1	primary auditory cortex
AuD	secondary auditory cortex, dorsal area
AuV	secondary auditory cortex, ventral area
AVPe	anteroventral periventricular nucleus
B	basal nucleus (Meynert)
BAC	bed nucleus of the anterior commissure
BAOT	bed nucleus of the accessory olfactory tract
bic	brachium of the inferior colliculus
BIC	nucleus of the brachium of the inferior colliculus
BLA	basolateral amygdaloid nucleus, anterior part
BLP	basolateral amygdaloid nucleus, posterior part
BLV	basolateral amygdaloid nucleus, ventral part
BMA	basomedial amygdaloid nucleus, anterior part
BMP	basomedial amygdaloid nucleus, posterior part
bp	brachium pontis (stem of middle cerebellar peduncle)
bsc	brachium of the superior colliculus
BSTIA	bed nucleus of the stria terminalis, intraamygdaloid division
BSTLD	bed nucleus of the stria terminalis, lateral division, dorsal part
BSTLJ	bed nucleus of the stria terminalis, lateral division, juxtacapsular part
BSTLP	bed nucleus of the stria terminalis, lateral division, posterior part
BSTLV	bed nucleus of the stria terminalis, lateral division, ventral part
BSTMA	bed nucleus of the stria terminalis, medial division, anterior part
BSTMPL	bed nucleus of the stria terminalis, medial division, posterolateral part
BSTMV	bed nucleus of the stria terminalis, medial division, ventral part
BSTS	bed nucleus of stria terminalis, supracapsular part
CA1	field CA1 of hippocampus
CA2	field CA2 of hippocampus
CA3	field CA3 of hippocampus
cc	corpus callosum
CeC	central amygdaloid nucleus, capsular part
CeL	central amygdaloid nucleus, lateral division
CeMAD	central amygdaloid nucleus, medial division, anterodorsal part
CeMAV	central amygdaloid nucleus, medial division, anteroventral part
cg	cingulum
Cg	cingulate cortex
Cg1	cingulate cortex, area 1
Cg2	cingulate cortex, area 2
CI	caudal interstitial nucleus of the medial longitudinal fasciculus
CIC	central nucleus of the inferior colliculus
Cir	circular nucleus
CM	central medial thalamic nucleus
CnF	cuneiform nucleus
cp	cerebral peduncle, basal part
CPu	caudate putamen (striatum)
csc	commissure of the superior colliculus
CxA	cortex-amygdala transition zone
D3V	dorsal 3rd ventricle
DCIC	dorsal cortex of the inferior colliculus

DEn	dorsal endopiriform nucleus
df	dorsal fornix
DG	dentate gyrus
dhc	dorsal hippocampal commissure
DI	dysgranular insular cortex
Dk	nucleus of Darkschewitsch
DLG	dorsal lateral geniculate nucleus
DLL	dorsal nucleus of the lateral lemniscus
DLPAG	dorsolateral periaqueductal gray
DMD	dorsomedial hypothalamic nucleus, dorsal part
DMPAG	dorsomedial periaqueductal gray
DMTg	dorsomedial tegmental area
DMV	dorsomedial hypothalamic nucleus, ventral part
DP	dorsal peduncular cortex
DpG	deep gray layer of the superior colliculus
DpMe	deep mesencephalic nucleus
DPO	dorsal periolivary region
DpWh	deep white layer of the superior colliculus
DRC	dorsal raphe nucleus, caudal part
DRD	dorsal raphe nucleus, dorsal part
DRI	dorsal raphe nucleus, interfascicular part
DRVL	dorsal raphe nucleus, ventrolateral part
DTgC	dorsal tegmental nucleus, central part
DTgP	dorsal tegmental nucleus, pericentral part
DTM	dorsal tuberomammillary nucleus
DTT	dorsal tenia tecta
ec	external capsule
ECIC	external cortex of the inferior colliculus
Ect	ectohinal cortex
EMi	epimicrocellular nucleus
eml	external medullary lamina
Ent	entorhinal cortex
Eth	ethmoid thalamic nucleus
EW	Edinger-Westphal nucleus
exc	extreme capsule
f	fornix
FC	fasciola cinereum
fi	fimbria of the hippocampus
Fl	Flocculus
fmi	forceps minor of the corpus callosum
fr	fasciculus retroflexus
Fu	bed nucleus of stria terminalis, fusiform part
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
gcc	genu of the corpus callosum
GI	granular insular cortex
GrDG	granular layer of the dentate gyrus
hbc	habenular commissure
HDB	nucleus of the horizontal limb of the diagonal band

hf	hippocampal fissure
Hz	Hertz
I	intercalated nuclei of the amygdala
I5	intertrigeminal nucleus
IAD	interanterodorsal thalamic nucleus
IAM	interanteromedial thalamic nucleus
ic	internal capsule
icf	intercrural fissure
ICj	islands of Calleja
ICjMM	islands of Calleja, major island
IF	interfascicular nucleus
IG	indusium griseum
IGL	intergeniculate leaf
IL	infralimbic cortex
ILL	intermediate nucleus of the lateral lemniscus
IMA	intramedullary thalamic area
IMD	intermediodorsal thalamic nucleus
InCG	interstitial nucleus of Cajal, greater part
InCo	intercollicular nucleus
InG	intermediate gray layer of the superior colliculus
InWh	intermediate white layer of the superior colliculus
IPAC	interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure
IPACL	interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure, lateral part
IPACM	interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure, medial part
IPC	interpeduncular nucleus, caudal subnucleus
IPDM	interpeduncular nucleus, dorsomedial subnucleus
IPF	interpeduncular fossa
IPI	interpeduncular nucleus, intermediate subnucleus
IPL	interpeduncular nucleus, lateral subnucleus
IPR	interpeduncular nucleus, rostral subnucleus
KF	Kořlliker-Fuse nucleus
LA	lateroanterior hypothalamic nucleus
LaDL	lateral amygdaloid nucleus, dorsolateral part
LaVL	lateral amygdaloid nucleus, ventrolateral part
LaVM	lateral amygdaloid nucleus, ventromedial part
LD	laterodorsal thalamic nucleus
LDDM	laterodorsal thalamic nucleus, dorsomedial part
LDTg	laterodorsal tegmental nucleus
LDVL	laterodorsal thalamic nucleus, ventrolateral part
LEnt	lateral entorhinal cortex
lfp	longitudinal fasciculus of the pons
LGP	lateral globus pallidus
LH	lateral hypothalamic area
LHb	lateral habenular nucleus
LHbL	lateral habenular nucleus, lateral part
LHbM	lateral habenular nucleus, medial part

LMol	lacunosum moleculare layer of the hippocampus
LO	lateral orbital cortex
lo	lateral olfactory tract
LOT	nucleus of the lateral olfactory tract
LPAG	lateral periaqueductal gray
LPBC	lateral parabrachial nucleus, central part
LPBD	lateral parabrachial nucleus, dorsal part
LPBE	lateral parabrachial nucleus, external part
LPBV	lateral parabrachial nucleus, ventral part
LPLR	lateral posterior thalamic nucleus, laterorostral part
LPMC	lateral posterior thalamic nucleus, mediocaudal part
LPMR	lateral posterior thalamic nucleus, mediorostral part
LPO	lateral preoptic area
LPtA	lateral parietal association cortex
LSD	lateral septal nucleus, dorsal part
LSI	lateral septal nucleus, intermediate part
LSO	lateral superior olive
LSS	lateral stripe of the striatum
LSV	lateral septal nucleus, ventral part
LT	lateral terminal nucleus of the accessory optic tract
LV	lateral ventricle
LVPO	lateroventral periolivary nucleus
M1	primary motor cortex
M2	secondary motor cortex
MA3	medial accessory oculomotor nucleus
MCLH	magnocellular nucleus of the lateral hypothalamus
mcp	middle cerebellar peduncle
MCPO	magnocellular preoptic nucleus
MD	mediodorsal thalamic nucleus
MDC	mediodorsal thalamic nucleus, central part
MDL	mediodorsal thalamic nucleus, lateral part
MDM	mediodorsal thalamic nucleus, medial part
ME	median eminence
Me5	mesencephalic trigeminal nucleus
me5	mesencephalic trigeminal tract
MeAD	medial amygdaloid nucleus, anterior dorsal
MeAV	medial amygdaloid nucleus, anteroventral part
MEnt	medial entorhinal cortex
MePD	medial amygdaloid nucleus, posterodorsal part
MePV	medial amygdaloid nucleus, posteroventral part
mfb	medial forebrain bundle
MGD	medial geniculate nucleus, dorsal part
MGM	medial geniculate nucleus, medial part
MGV	medial geniculate nucleus, ventral part
MHb	medial habenular nucleus
MiTg	microcellular tegmental nucleus
ml	medial lemniscus
ML	medial mammillary nucleus, lateral part

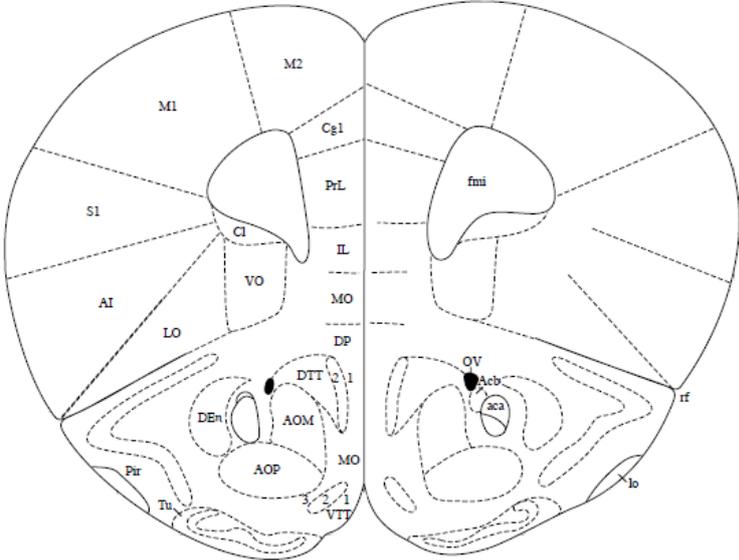
mlf	medial longitudinal fasciculus
MM	medial mammillary nucleus, medial part
MnPO	median preoptic nucleus
MO	medial orbital cortex
Mo5	motor trigeminal nucleus
Mol	molecular layer of the dentate gyrus
MPA	medial preoptic area
MPB	medial parabrachial nucleus
MPOC	medial preoptic nucleus, central part
MPOL	medial preoptic nucleus, lateral part
MPOM	medial preoptic nucleus, medial part
MPtA	medial parietal association cortex
MS	medial septal nucleus
mt	mammillothalamic tract
MT	medial terminal nucleus of the accessory optic tract
mtg	mammillotegmental tract
MTu	medial tuberal nucleus
MVPO	medioventral periolivary nucleus
MZMG	marginal zone of the medial geniculate
ns	nigrostriatal bundle
OPT	olivary pretectal nucleus
opt	optic tract
Or	oriens layer of the hippocampus
OT	nucleus of the optic tract
OV	olfactory ventricle (olfactory part of lateral ventricle)
ox	optic chiasm
P5	peritrigeminal zone
PaDC	paraventricular hypothalamic nucleus, dorsal ca
PAG	periaqueductal gray
PaLM	paraventricular hypothalamic nucleus, lateral magnocellular part
PaMP	paraventricular hypothalamic nucleus, medial parvicellular part
PaS	Parasubiculum
PBP	parabrachial pigmented nucleus
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	paracentral thalamic nucleus
pc	posterior commissure
PC5	parvicellular motor trigeminal nucleus
Pe	periventricular hypothalamic nucleus
PeF	perifornical nucleus
PFA	Paraformaldehyd
PFI	Paraflocculus
PH	posterior hypothalamic area
PIL	posterior intralaminar thalamic nucleus
Pir	piriform cortex
PL	paralemniscal nucleus
PLCo	posterolateral cortical amygdaloid nucleus (C2)
PLi	posterior limitans thalamic nucleus
pm	principal mammillary tract

PMCo	posteromedial cortical amygdaloid nucleus (C3)
PMD	preammillary nucleus, dorsal part
PMnR	paramedian raphe nucleus
PMV	preammillary nucleus, ventral part
Pn	pontine nuclei
PnC	pontine reticular nucleus, caudal part
PnO	pontine reticular nucleus, oral part
PnR	pontine raphe nucleus
PnV	pontine reticular nucleus, ventral part
PoDG	polymorph layer of the dentate gyrus
PoT	posterior thalamic nuclear group, triangular part
PP	peripeduncular nucleus
PPT	posterior pretectal nucleus
PPTg	pedunculopontine tegmental nucleus
Pr5DM	principal sensory trigeminal nucleus, dorsomedial part
Pr5VL	principal sensory trigeminal nucleus, ventrolateral part
PRh	perirhinal cortex
PrL	prelimbic cortex
PrS	presubiculum
PS	parastrial nucleus
PSTh	parasubthalamic nucleus
PVA	paraventricular thalamic nucleus, anterior part
Py	pyramidal cell layer of the hippocampus
Rad	stratum radiatum of the hippocampus
RC	raphe cap
RCh	retrochiasmatic area
Re	reuniens thalamic nucleus
rf	rhinal fissure
Rh	rhomboid thalamic nucleus
RI	rostral interstitial nucleus of medial longitudinal fasciculus
RLi	rostral linear nucleus of the raphe
RMC	red nucleus, magnocellular part
RMg	raphe magnus nucleus
RPC	red nucleus, parvicellular part
RPF	retroparafascicular nucleus
RPO	rostral periolivary region
RRF	retrotrubral field
rs	rubrospinal tract
RSA	retrosplenial agranular cortex
RSG	retrosplenial granular cortex
Rt	reticular thalamic nucleus
RtTg	reticulotegmental nucleus of the pons
RtTgP	reticulotegmental nucleus of the pons, pericentral part
S	Subiculum
S1	primary somatosensory cortex
S1BF	primary somatosensory cortex, barrel field
S1DZ	primary somatosensory cortex, dysgranular regio
S1FL	primary somatosensory cortex, forelimb regio

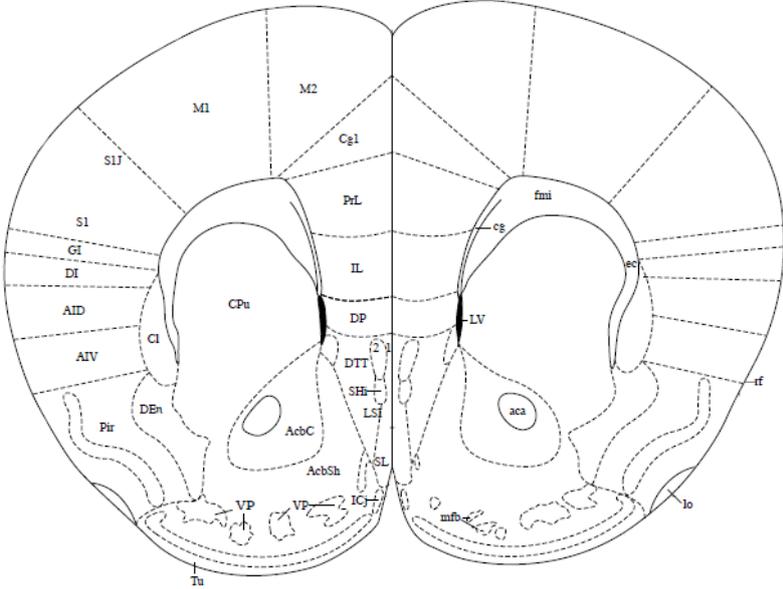
S1HL	primary somatosensory cortex, hindlimb regio
S1J	primary somatosensory cortex, jaw region 0
S1ShNc	primary somatosensory cortex, shoulder/neck region
S1Tr	primary somatosensory cortex, trunk region
S1ULp	primary somatosensory cortex, upper lip regio
S2	secondary somatosensory cortex
s5	sensory root of the trigeminal nerve
Sag	sagulum nucleus
SC	superior colliculus
Sc	scaphoid thalamic nucleus
scc	splenium of the corpus callosum
SChDM	suprachiasmatic nucleus, dorsomedial part
SChVL	suprachiasmatic nucleus, ventrolateral part
SCO	subcommissural organ
scp	superior cerebellar peduncle (brachium conjunctivum)
SFi	septofimbrial nucleus
SFO	subfornical organ
SG	suprageniculate thalamic nucleus
SHi	septohippocampal nucleus
SI	substantia innominata
Sim	simple lobule
SL	semilunar nucleus
SLEA	sublenticular extended amygdala
SLEAC	sublenticular extended amygdala, central part
SLEAM	sublenticular extended amygdala, medial part
SLu	stratum lucidum, hippocampus
sm	stria medullaris of the thalamus
SMT	submammillothalamic nucleus
SNC	substantia nigra, compact part
SNL	substantia nigra, lateral part
SNR	substantia nigra, reticular part
SO	supraoptic nucleus
sox	supraoptic decussation
SPFPC	subparafascicular thalamic nucleus, parvicellular part
st	stria terminalis
STh	subthalamic nucleus
str	superior thalamic radiation
Su3C	supraoculomotor cap
Su5	supratrigeminal nucleus
Sub	submedius thalamic nucleus
SubB	subbrachial nucleus
SubCD	subcoeruleus nucleus, dorsal part
SubCV	subcoeruleus nucleus, ventral part
SubG	subgeniculate nucleus
SuG	superficial gray layer of the superior colliculu
SuMM	supramammillary nucleus, medial part
Te	terete hypothalamic nucleus
TeA	temporal association cortex

TS	triangular septal nucleus
ts	tectospinal tract
Tu	olfactory tubercle
Tz	trapezoid body
V1	primary visual cortex
V2L	secondary visual cortex, lateral area 0
V2ML	secondary visual cortex, mediolateral area 0
V2MM	secondary visual cortex, mediomedial area 0
VA	ventral anterior thalamic nucleus
VCA	ventral cochlear nucleus, anterior part
VDB	nucleus of the vertical limb of the diagonal band
VE _n	ventral endopiriform nucleus
vhc	ventral hippocampal commissure
VL	ventrolateral thalamic nucleus
VLG	ventral lateral geniculate nucleus
VLGMC	ventral lateral geniculate nucleus, magnocellular part
VLGPC	ventral lateral geniculate nucleus, parvicellular part
VLPO	ventrolateral preoptic nucleus
VMHC	ventromedial hypothalamic nucleus, central part
VMHDM	ventromedial hypothalamic nucleus, dorsomedial part
VMHVL	ventromedial hypothalamic nucleus, ventrolateral part
VMPO	ventromedial preoptic nucleus
VO	ventral orbital cortex
VP	ventral pallidum
VPL	ventral posterolateral thalamic nucleus
VPM	ventral posteromedial thalamic nucleus
VRe	ventral reuniens thalamic nucleus
vsc	ventral spinocerebellar tract
VTA	ventral tegmental area
vtgx	ventral tegmental decussation
VTM	ventral tuberomammillary nucleus
VTT	ventral tenia tecta
Xi	xiphoid thalamic nucleus
xscp	decussation of the superior cerebellar peduncle
ZI	zona incerta
ZID	zona incerta, dorsal part
ZIV	zona incerta, ventral part
ZL	zona limitans
Zo	zonal layer of the superior colliculus

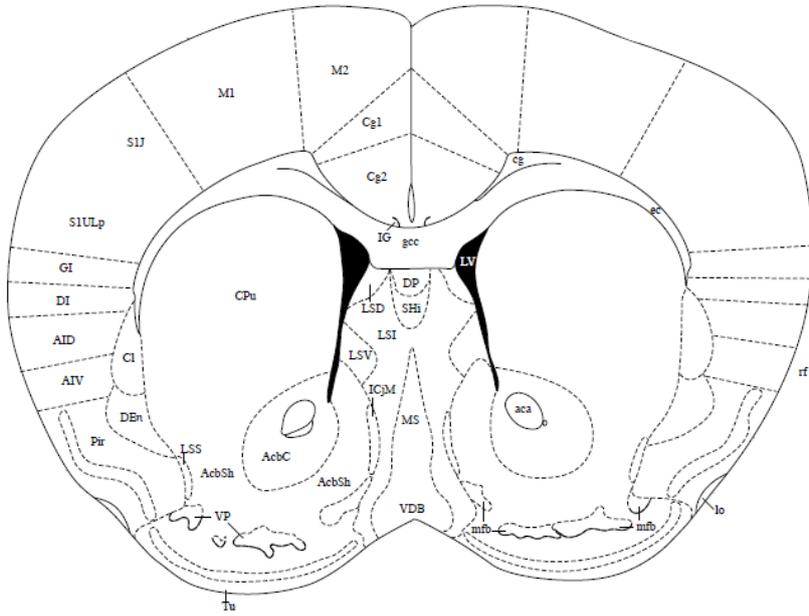
Vorlagen aus dem „Paxinos and Franklin Mouse Brain Atlas“



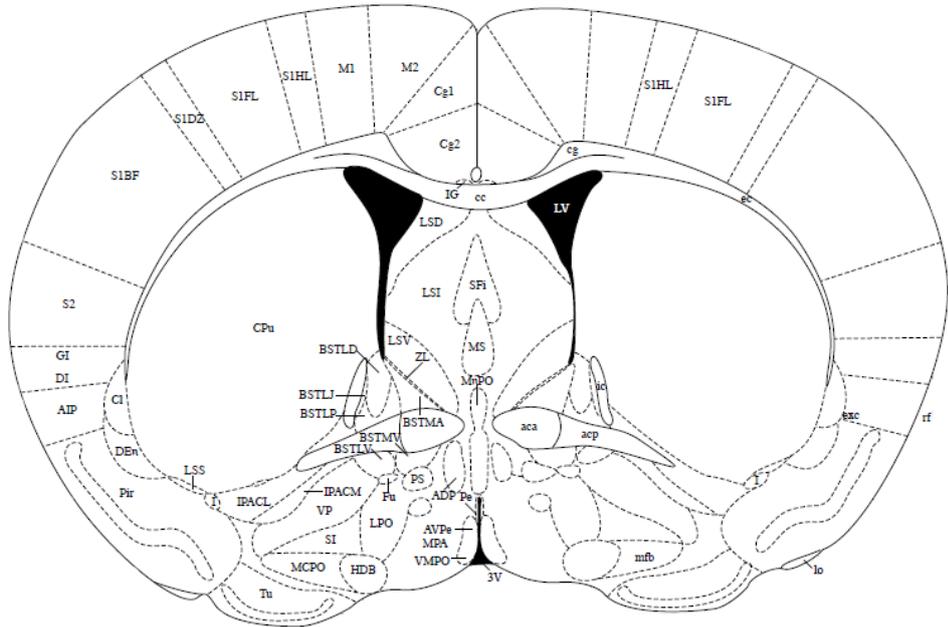
Vorlage Abbildung 6 Bregma AP 1,98



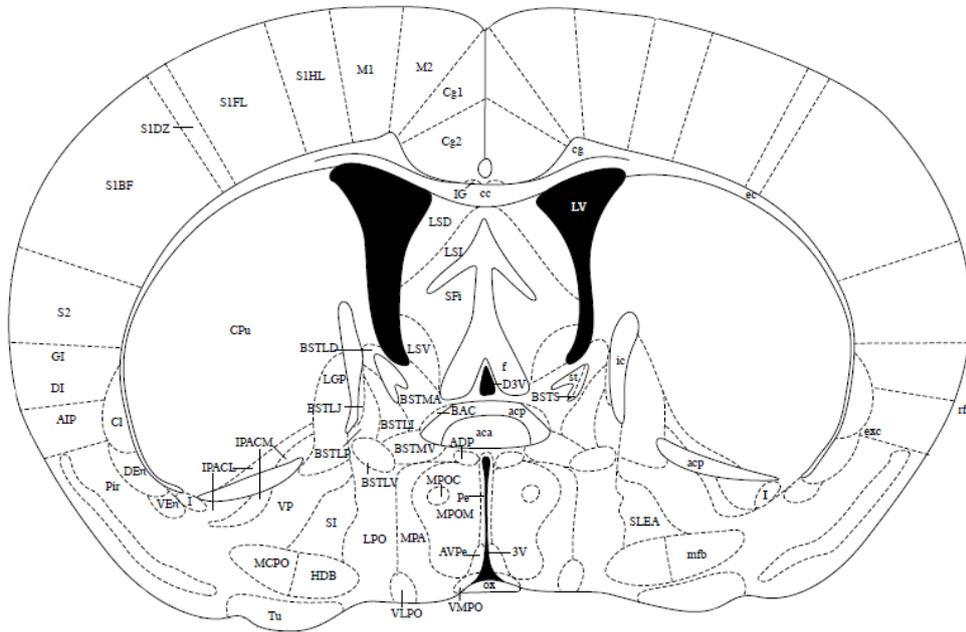
Vorlage Abbildung 7 Bregma AP 1,54



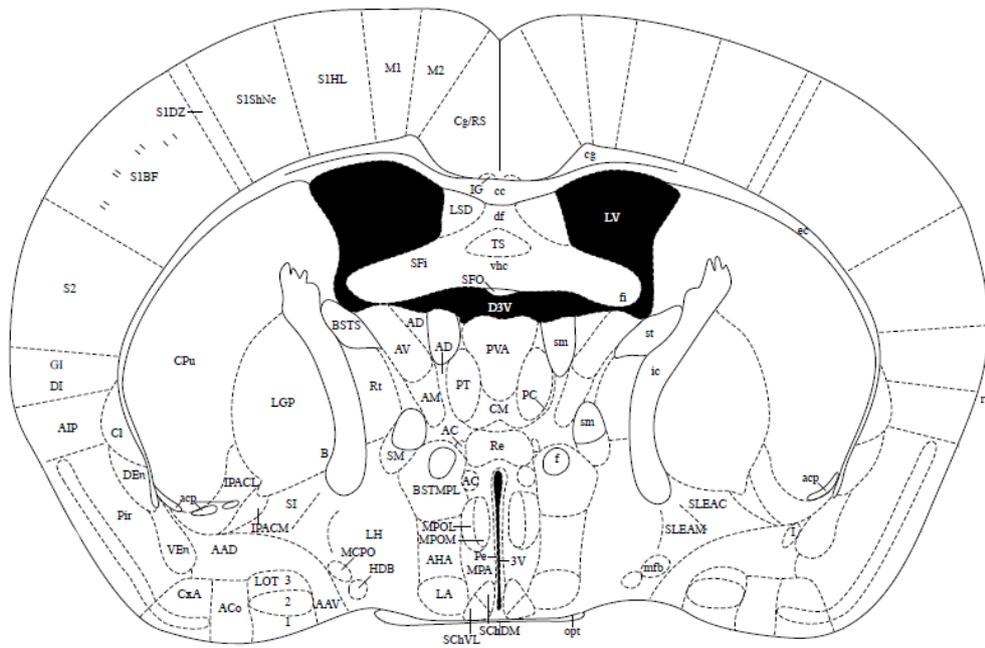
Vorlage Abbildung 8 Bregma AP 1,10 mm



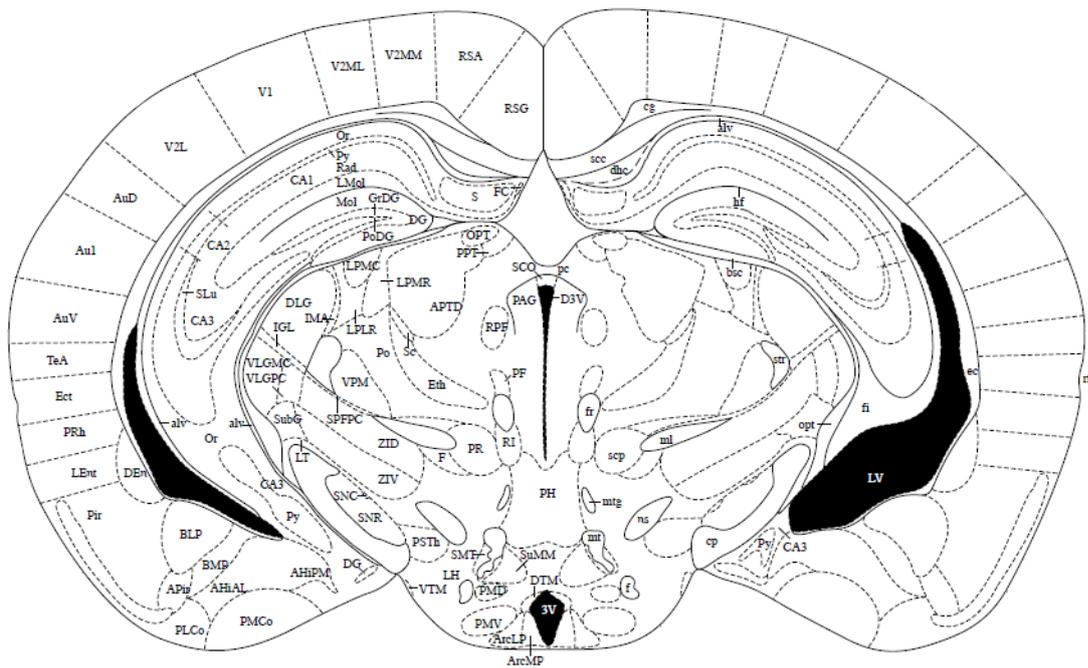
Vorlage Abbildung 9 Bregma AP 0,26mm



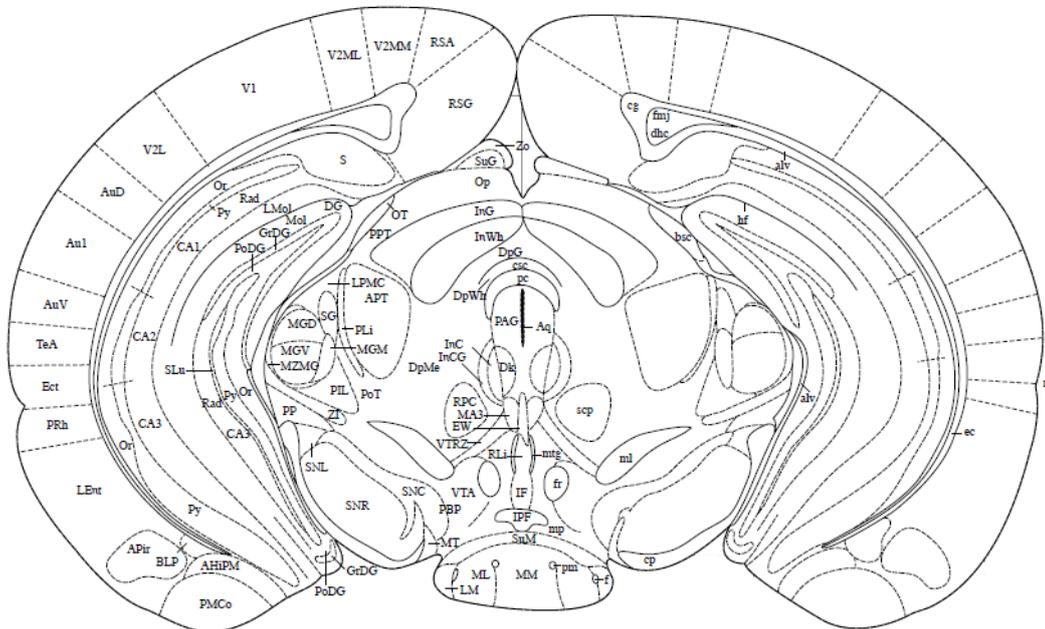
Vorlage Abbildung 10 Bregma AP 0.02mm



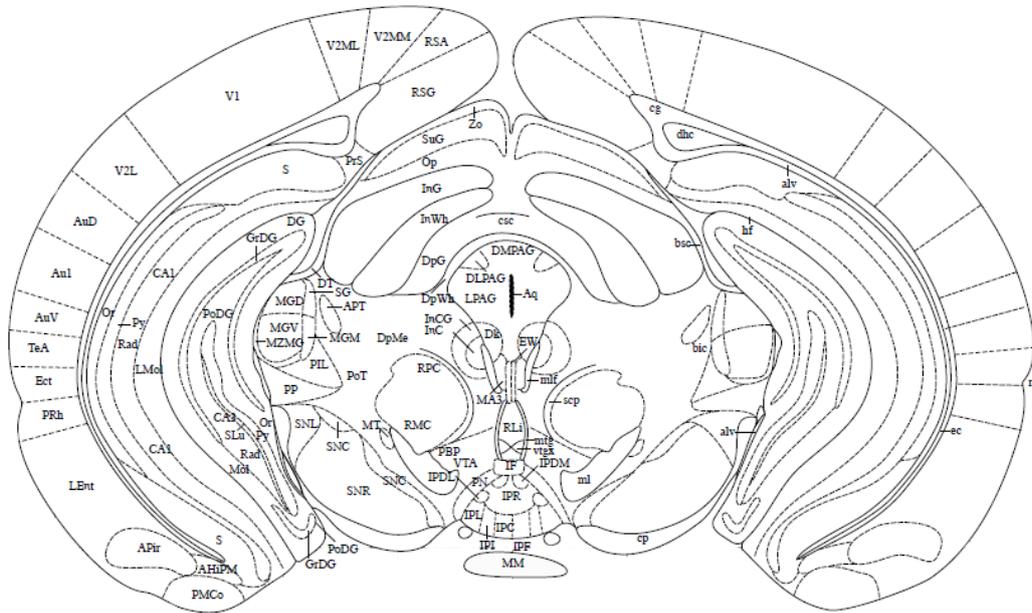
Vorlage Abbildung 11 Bregma AP -0.46mm



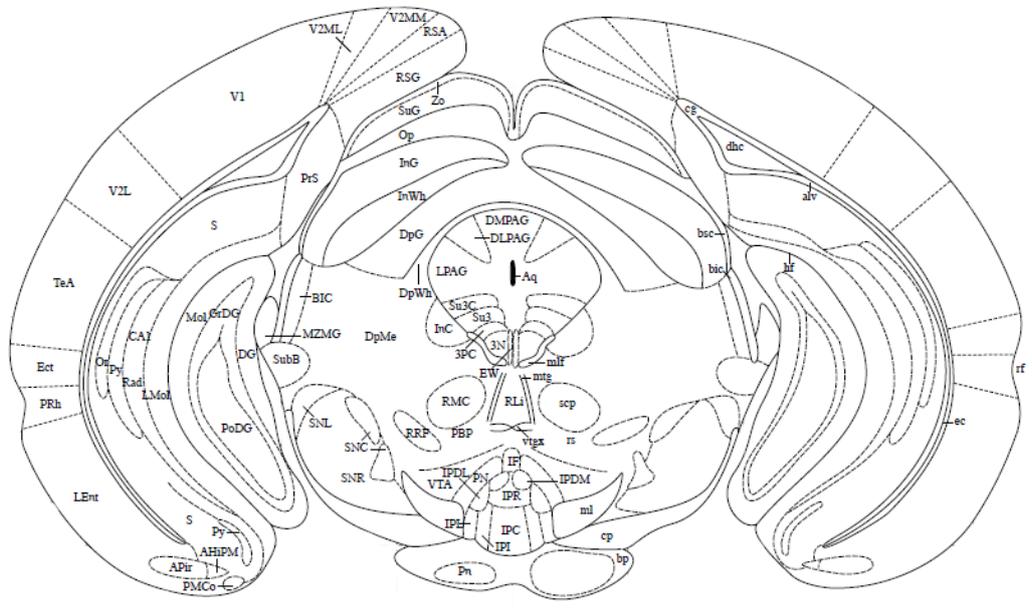
Vorlage Abbildung 14 Bregma AP -2,54mm



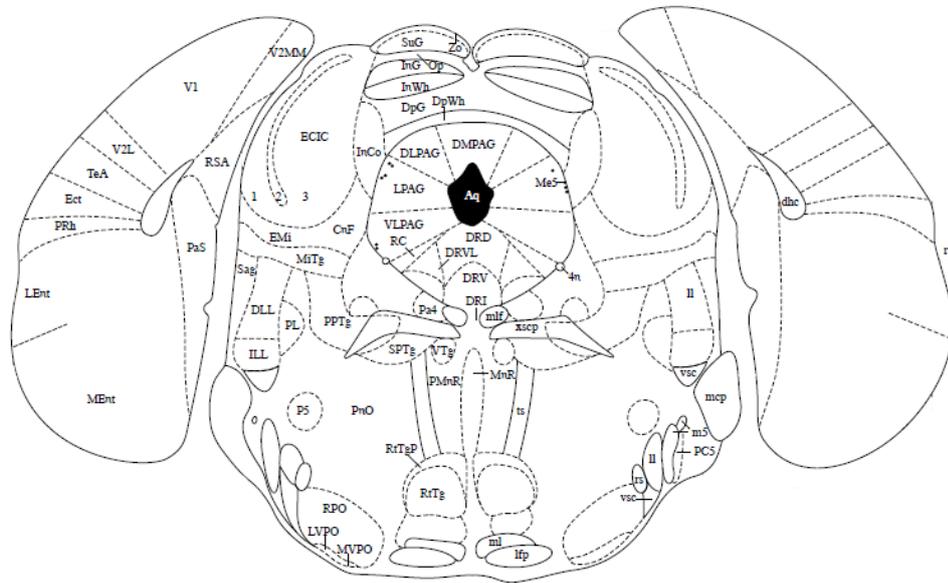
Vorlage Abbildung 15 Bregma AP -3,08mm



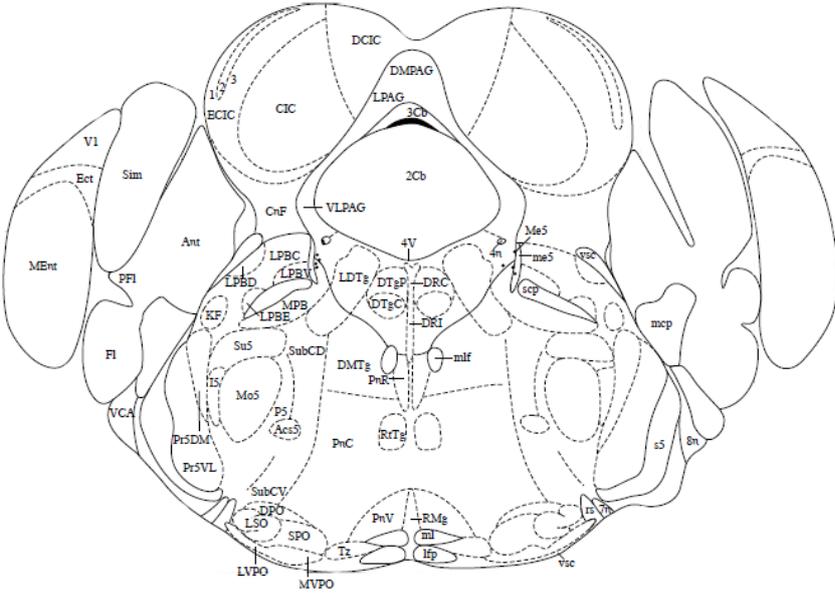
Vorlage Abbildung 16 Bregma AP -3,40mm



Vorlage Abbildung 17 Bregma AP -3,64mm



Vorlage Abbildung 18 Bregma AP -4,72mm



Vorlage Abbildung 19 Bregma AP -5,20mm

Danksagung

Ich danke meiner Familie
für die Begleitung und die Unterstützung.

Ich danke
meinem Doktorvater Prof. Dr. Peer Wulff und
meiner Supervisorin Dr. Annetrude de Mooij-van Malsen
für das Thema und die Lehre.

Lebenslauf

Geburtsort: Kiel

Geburtstag: 20.01.1991

Familienstand: ledig

Ausbildung, Forschung und Beruf

- 03/2014 – 05/2019 Schriftliche Ausarbeitung der Dissertation „Afferenzen des Nukleus Reuniens des Thalamus in der Maus“, Sektion Neurobiologie, Physiologisches Institut, *CAU Kiel*
- 01/2019 – 06/2019 Rotation im Rahmen der Fortbildung, Institut für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie, *MHH Hannover*
- 05/2018 Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt für Radiologie, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, *MHH Hannover*
- 11/2017 Approbation als Arzt durch das Landesamt für soziale Dienste Schleswig-Holstein, *Kiel*
- 11/2017 3. Teil des Staatsexamens, *CAU Kiel*
- 10/2017 Vorstellung der Ergebnisse der Dissertation im Rahmen der Postersession des 4. Kiel Neuroscience Day, Physiologisches Institut, *CAU Kiel*
- 10/2010 – 11/2017 Studium der Humanmedizin, *CAU Kiel*
- 10/2016 – 10/2017 Praktisches Jahr, Innere Medizin *UKSH Kiel*, Chirurgie und Radiologie *Imland Klinik Rendsburg*
- 09/2016 2. Teil des Staatsexamens, *CAU Kiel*
- 04/2015 – 03/2016 Durchführung und Analyse weiterer Experimente parallel zum Studium, Sektion Neurobiologie, Physiologisches Institut, *CAU Kiel*
- 03/2014 – 03/2015 Forschungsjahr zur Doktorarbeit, Sektion Neurobiologie, Physiologisches Institut, *CAU Kiel*
- 10/2012 1. Teil des Staatsexamens, *CAU Kiel*
- 2010 Allgemeine Hochschulreife, *Alexander-von-Humboldt-Schule, Neumünster*
- 2001 – 2010 Besuch des Gymnasiums, *Alexander von Humboldt-Schule, Neumünster*
- 1997 – 2001 Besuch der Grundschule, *Grundschule Nortorf*

Praktika

10/2016 – 10/2017	Praktisches Jahr 1. Terial Innere Medizin, <i>UKSH Kiel</i> 2. Terial Chirurgie, <i>Imland Klinik Rendsburg</i> 3. Terial Radiologie und Nuklear-/Strahlenmedizin, <i>Imland Klinik Rendsburg</i>
2013 - 2016	Famulaturen
03/2016	Famulatur, Radiologie, <i>FEK Neumünster</i>
02/2016 – 03/2016	Famulatur, Neurologie, <i>UKSH Kiel</i>
09/2015 – 10/2015	Famulatur, Allgemeinmedizin, <i>Erstaufnahmestelle für Flüchtlinge, Neumünster</i>
09/2013 – 10/2013	Famulatur, Nephrologie, <i>UKSH Kiel</i>
03/2013	Famulatur, hausärztliche Versorgung, <i>Arztpraxis Burhenne und Dr. Schmitz, Nortorf</i>

Erfahrung und Ehrenämter

03/2014-03/2015	Wissenschaftliche Hilfskraft, <i>Physiologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel</i> Labortätigkeiten, Mitbetreuung des physiologischen Praktikums der Vorklinik
03/2014	Wissenschaftliche Hilfskraft, <i>UKSH Kiel</i> Mithilfe bei der Betreuung des Kurses „Einführung in die klinische Medizin“
2010 - 2012	Mitglied des Semesterkomitees der Vorklinischen Semester
2012 - 2014	Gründungs- und Vorstandsmitglied des Vereins zur Förderung anthropomorpher Kunst e.V.