

**Neuronale Kontrolle von Echoortungs- und
Kommunikationslauten bei der Fledermaus
Phyllostomus discolor: selektive Ausschaltung des
periaquädukten Graus und des Nucleus des
Brachiums des Colliculus inferior.**

Silvana Siebert



Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München 2009

**Neuronale Kontrolle von Echoortungs- und
Kommunikationslauten bei der Fledermaus *Phyllostomus
discolor*: selektive Ausschaltung des periaquädukten Graus
und des Nucleus des Brachiums des Colliculus inferior.**

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Silvana Siebert
aus Heilbad Heiligenstadt

München 2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerd Schuller
Zweitgutachter: Prof. Dr. Benedikt Grothe

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	9
2.1 Vokalisation	9
2.1.1 Echoortung bei Fledermäusen	9
2.1.2 Anatomische Grundlagen der Vokalisation	10
2.1.3 Neurale Grundlagen der Vokalisation	12
2.2 Neuropharmaka	17
2.2.1 Homocysteinsäure	17
2.2.2 Kainsäure	18
2.2.3 Kynurensäure	18
2.2.4 Muscimol	19
2.3 Die Kleine Lanzennase <i>Phyllostomus discolor</i>	20
2.3.1 Vokalisationsrepertoire der Lanzennase	21
2.4 Narkose	22
2.5 Die elektrische Stimulation	22
2.6 Die pharmakologische Stimulation	23
2.7 Ziel der Arbeit	23
3 Material und Methoden	25
3.1 Versuchstiere	25
3.2 Präparation	25
3.3 Elektrische Reizung	28
3.4 Pharmakologische Reizung und Ausschaltung	29
3.4.1 Verwendung von Homocysteinsäure	31
3.4.2 Verwendung von Kainsäure	31
3.4.3 Verwendung von Kynurensäure	32
3.4.4 Verwendung von Muscimol	32
3.5 Tracerinjektionen	33
3.6 Perfusion	33

3.7	Histologie	34
3.8	Auswertung	35
3.8.1	Auswertung der Vokalisationen	35
3.8.2	Feststellung der Stimulations- und Injektionspositionen	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Im PAG ausgelöste Vokalisationen	37
4.1.1	Elektrisch ausgelöste Vokalisationen	37
4.1.2	Verteilung der Schwellen	48
4.1.3	Verteilung der Kommunikationslaute unter Berücksichtigung des Verhaltenskontextes	49
4.1.4	Applikation von Neuropharmaka ins PAG	53
4.2	Auslösbarkeit von Vokalisation im NBIC	55
4.2.1	Elektrische Auslösung von Vokalisationen	55
4.2.2	Pharmakologische Auslösung von Vokalisation	56
4.3	Ausschaltung des NBICs	58
4.3.1	Auswirkung der Ausschaltung des NBICs auf im selben NBIC ausgelöste Vokalisationen	58
4.3.2	Auswirkung der Ausschaltung des NBICs auf im kontralate- ralen NBIC ausgelöste Vokalisationen	59
4.3.3	Auswirkungen der Ausschaltung des NBICs auf im PAG aus- gelöste Laute	61
4.4	Ausschaltung des PAGs und Auswirkung auf im NBIC ausgelöste Laute	67
4.5	Tracerinjektionen	73
4.5.1	BDA	73
4.5.2	WGA-HRP	75
4.5.3	Alexa 488-Dextran	76
5	Diskussion	87
5.1	Methoden	87
5.1.1	Elektrische Reizung	87
5.1.2	Applikation von Neuropharmaka	88
5.1.3	Tracermethoden	91
5.1.4	Einfluss der Sedierung auf die Ergebnisse	94
5.2	Ergebnisse	95
5.2.1	Auslösung von Vokalisation im PAG und im NBIC	95
5.3	Ausschaltung des PAGs bei elektrischer Stimulation im NBIC	98

5.4	Ausschaltung des NBICs bei elektrischer Stimulation im kontralateralen NBIC	99
5.5	Ausschaltung des NBICs bei elektrischer Stimulation im PAG	100
5.6	Tracerinjektionen und Transport	103
5.6.1	Injektion von BDA bzw. Alexa 488-Dextran in das PAG	104
5.6.2	Injektion von Alexa 488-Dextran in den NBIC	105
5.7	Der NBIC innerhalb des Vokalisationssystems	107
6	Ausblick	109
A	Verwendete Abkürzungen	111
B	Protokolle	115
B.1	Präparationsprotokoll zum Aufsetzen des Haltestifts	115
B.2	Histologische Aufarbeitung	116
B.2.1	BDA-Nachweis mittels DAV-Methode und anschließender TIM-Färbung	116
B.2.2	TTN-Färbung: Ammonium -Tungstate (Paratungstate) für Tracing über Nacht	118
B.2.3	Kombinierte DAB-Cytochrom-Färbung	119
B.2.4	Gegenfärbung mit Kresylviolett	120
B.2.5	Gegenfärbung mit Neutralrot	121
	Abbildungsverzeichnis	123
	Tabellenverzeichnis	127
	Literaturverzeichnis	129
	Danksagung	141
	Lebenslauf	143

1. Zusammenfassung

Vokalisationen von Fledermäusen können in zwei Gruppen unterteilt werden: Kommunikationslaute und Echoortungslaute. Diese Arbeit wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob in die Steuerung der unterschiedlichen Laute unterschiedliche Hirnstrukturen involviert sind. Dazu wurden zwei Hirnstrukturen zur näheren Betrachtung herangezogen und ihre Funktion und Verschaltung zueinander innerhalb der Vokalisationsbahn untersucht. Diese Strukturen waren zum einen das periaquädukte Grau (PAG) oder zentrale Höhlengrau und zum anderen der Nucleus des Brachiums des Colliculus inferior (NBIC). In beiden Strukturen waren sowohl Echoortungslaute als auch Kommunikationslaute auslösbar.

Im PAG waren bei 11 Tieren an insgesamt 517 Positionen Vokalisationen auslösbar. Neben Echoortungslauten (an 348 Positionen) waren auch 6 Kommunikationstypen sowie 2 Mischformen der bekannten Kommunikationslaute (an 169 Positionen) auslösbar. Alle Laute hatten einen natürlichen Charakter. Es konnten keine artifiziellen Vokalisationen im PAG evoziert werden. Über die komplette rostrocaudale (rund 3000 μm) und mediolaterale (rund 2000 μm) Ausdehnung des PAGs waren Echoortungslaute auslösbar. Die elektrische Auslösbarkeit der Kommunikationslaute beschränkte sich auf die caudalen zwei Drittel des PAGs. Über das ganze PAG hinweg waren beide Lautgruppen auch pharmakologisch sowohl mit Homocysteinsäure als auch mit Kainsäure auslösbar.

Die Schwellen, mit denen die Laute im PAG ausgelöst werden konnten waren relativ gering. In 49 % der Fälle konnten Echoortungslaute mit Schwellen zwischen > 20 und $\leq 50 \mu\text{A}$, in 23 % mit $\leq 20 \mu\text{A}$ und in 28 % mit $> 50 \mu\text{A}$ ausgelöst werden. Kommunikationslaute waren in 48 % mit $\leq 20 \mu\text{A}$, in 40 % mit > 20 bis $\leq 50 \mu\text{A}$ und in 14 % mit $> 50 \mu\text{A}$ auslösbar. Vokalisationen waren im mittleren Drittel des PAGs in Randbereichen mit geringeren Schwellen auslösbar. Höhere Reizstärken waren in diesem Rostrocaudalbereich in der zentral gelegenen Region notwendig, um Vokalisation zu evozieren. Abgesehen von diesen Gebieten waren keine räumlichen Unterschiede erkennbar.

Die Latenzen der im PAG ausgelösten Laute waren sehr gering und lagen in rostralen Bereichen fast ausschließlich unter 40 ms. Weiter caudal findet man zudem Latenzen über 40 ms. Eine prozentuale Verteilung der Latenzen gestaltet sich wie

folgt: rund 83 % der Echoortungslaute und 71 % der Kommunikationslaute haben Latenzen von ≤ 40 ms, 15 % der Echoortungslaute und rund 9 % der Kommunikationslaute haben Latenzen zwischen > 40 und ≤ 60 ms und lediglich 1 % der Echoortungslaute und rund 20 % der Kommunikationslaute besitzen Latenzen von > 60 ms.

Im NBIC waren neben Echoortungslauten ausschließlich den Echoortungslauten sehr ähnliche Zirplante elektrisch auslösbar. Alle ausgelösten Laute hatten eine Lautlänge von 0,6 - 3 ms und 3 - 4 im Spektrogramm sichtbare Harmonische. Die 3. Harmonische trug immer die Hauptenergie. Wie auch im PAG waren die Auslöseschwellen (in 78 % unter $15 \mu\text{A}$) und Latenzen (26 - 47 ms) sehr gering. Pharmakologisch war im NBIC weder mit dem NMDA-Rezeptoragonist Homocysteinsäure noch mit dem Kainat-Rezeptoragonist Kainsäure Vokalisation auslösbar.

An 4 Positionen blieb bei elektrischer Stimulation im NBIC und gleichzeitiger pharmakologischer und reversibler Ausschaltung des PAGs (ipsi-, kontra- oder bilateral) die im ventralen NBIC ausgelöste Vokalisation unverändert. Eine an 1 Position im zentralen NBIC ausgelöste Vokalisation konnte durch eine Ausschaltung des PAGs blockiert werden. An 10 Positionen war bei elektrischer Stimulation im PAG nach der Ausschaltung des ipsilateralen ventralen NBICs keine Vokalisation mehr auslösbar, gleichgültig ob im PAG ein Echoortungslaut oder ein Kommunikationslaut ausgelöst wurde. Eine Ausschaltung des zentralen NBICs hatte keinen Einfluss auf die im PAG ausgelösten Laute. Eine Ausschaltung des kontralateralen NBICs beeinflusste die ausgelöste Vokalisation ebenfalls nicht, ebenso wie die unilaterale Ausschaltung des NBICs bei elektrischer Stimulation im zweiten NBIC ausgelöste Vokalisation.

Diese Ergebnisse zeigen die Rolle des NBICs auch für Kommunikationslaute, obwohl dort elektrisch nur Echoortungslaute und den Echoortungslauten strukturell sehr ähnliche Zirplante auslösbar sind. Die unterschiedlichen Ergebnisse für die Stimulation des ventralen und zentralen NBICs bei ausgeschaltetem PAG bzw. die Auswirkung der Ausschaltung des ventralen oder zentralen NBICs auf im PAG ausgelöste Laute deuten zudem darauf hin, dass die Verschaltung zwischen PAG und NBIC nicht hierarchisch sondern eher parallel organisiert ist.

2. Einleitung

2.1 Vokalisation

Innerhalb einer Art dient Vokalisation neben Gestik und Mimik als wichtiges Verständigungsmittel. Tierarten, die durch Umweltgegebenheiten nicht im ständigen Blickkontakt stehen können, teilen sich gegenseitig durch Vokalisation mit, wo sie sich befinden oder warnen ihre Artgenossen mit speziellen Rufen vor Luft- oder Bodenfeinden. Das nutzen beispielsweise auch Tiere anderer Arten, da sie mit der Zeit gelernt haben, die Vokalisation der nicht eigenen Art zu interpretieren (Kirchhof & Hammerschmidt, 2006). Somit wird Vokalisation auch artübergreifend verstanden und dient zum Schutz vor Fressfeinden und anderen Bedrohungen.

Die meisten Tiere besitzen ein Territorium, welches existenzhaltende Funktionen wie Futtersuche, Fortpflanzung und Aufzucht der Nachkommen erfüllt. Dieses Territorium muss gegen Feinde und Konkurrenten verteidigt werden. Diese territorialen Verhaltensweisen in Form von Markierungen des Territoriums, Verteidigung der Grenzen und Abwehr von Eindringlingen ist fast immer auch von Vokalisation begleitet, die den Konkurrenten in die Flucht schlagen soll.

Die Sprache des Menschen gilt als Spezialform der Vokalisation. Sie ist nicht angeboren, sondern muss in den ersten Lebensjahren erlernt und trainiert werden. Sie unterliegt der willentlichen Kontrolle.

Im Lauf der Evolution entwickelte sich die Vokalisation in Form der Echoortung als Hilfsmittel bei der Orientierung. Typischerweise denkt man bei Echoortung unmittelbar an Fledermäuse oder auch Delfine. Aber auch der Fettschwalm (*Steatornis caripensis*) bedient sich zur Orientierung in seinen dunklen Höhlen der aktiven Echoortung (Konishi & Knudsen, 1979) und sogar einige blinde Menschen haben gelernt, Schnalzlaut, die sie mit ihrer Zunge erzeugen zur Echoortung zu nutzen (Kish, 1982).

2.1.1 Echoortung bei Fledermäusen

Innerhalb der Unterordnung der *Microchiroptera* (Fledermäuse) sind alle Arten zur Echoortung befähigt. Fledermäuse benutzen zur Orientierung und Beutejagd

ein aktives Ultraschall-Ortungssystem. Aktiv deshalb, weil sie die Information aus Echos ihrer selbst produzierten Laute gewinnen. Diese dafür von den Tieren benutzten Ultraschall-Laute sind für den Menschen nicht hörbar, sie liegen oberhalb der menschlichen Hörgrenze von 16 kHz. Es gibt aber auch Fledermäuse (z.B. *Pipistrellus*) deren Ultraschalllaute schwache niederfrequente Anteile enthalten, die dann auch für den Menschen als eine Art Klick wahrnehmbar sind.

Es gibt 3 Hauptformen von Orientierungslauten: 1. abwärts und 2. aufwärts frequenzmodulierte Laute (FM) und 3. konstantfrequente (CF) Laute. Abwärts frequenzmodulierte Echoortungslaute sind die häufigste Form von Orientierungslauten. Konstantfrequente Laute sind Reintöne, die von Fledermäusen zur Detektion von Insekten genutzt werden. Ist im Echo des ausgestoßenen Lautes die Reintonkomponente moduliert (z.B. durch den Flügelschlag des Insekts), signalisiert das der Fledermaus eine Beute. Aufwärts frequenzmodulierte Laute treten nur im Zusammenhang mit konstantfrequenten Lautteilen auf (Neuweiler, 1993).

Oft weisen die Echoortungslaute bei Fledermäusen ganzzahlige Vielfache, sogenannte Harmonische einer Grundfrequenz auf. Dabei wird die Grundfrequenz bereits als erste Harmonische bezeichnet, die Hauptenergie des Lautes liegt in der Regel auf der 2. oder 3. Harmonischen.

Neben Echoortungslauten zur Navigation und zum Beutefang verwenden Fledermäuse auch für den Menschen hörbare Kommunikationslaute, um sich untereinander zu verständigen.

2.1.2 Anatomische Grundlagen der Vokalisation

Die Laute echoortender Fledermäuse werden wie alle Laute bei Säugern im Kehlkopf gebildet. Der Kehlkopf besteht aus dem Schildknorpel, dem Ringknorpel und dem Kehledeckel (Epiglottis), der die Luftröhre vor dem Eindringen von Speiseresten schützt, indem er beim Schlucken den Kehlkopfeingang verschließt. Am Ringknorpel setzen hinten 2 Stellknorpel an. Zwischen diesen Stellknorpeln und der Hinterwand des Schildknorpels setzen die Stimmlippen an (siehe Abb. 2.1).

Der Zwischenraum zwischen den Stimmlippen wird als Stimmritze bezeichnet. Durch Kontraktion dreier Muskeln, sogenannter Stimmritzenschließer, werden die Stellknorpel bewegt und die Stimmritze wird verengt. Durch den Luftstrom bei der Ausatmung werden die Stimmlippen in Schwingung versetzt und der Ton entsteht. Zur Öffnung der Stimmlippen (bei der stimmlosen Ein- und Ausatmung) werden die Stellknorpel um ihre Längsachse nach außen rotiert (*Musculus cricoarytaenoideus posterior* - Stimmritzenöffner) und die Stimmritze erweitert.

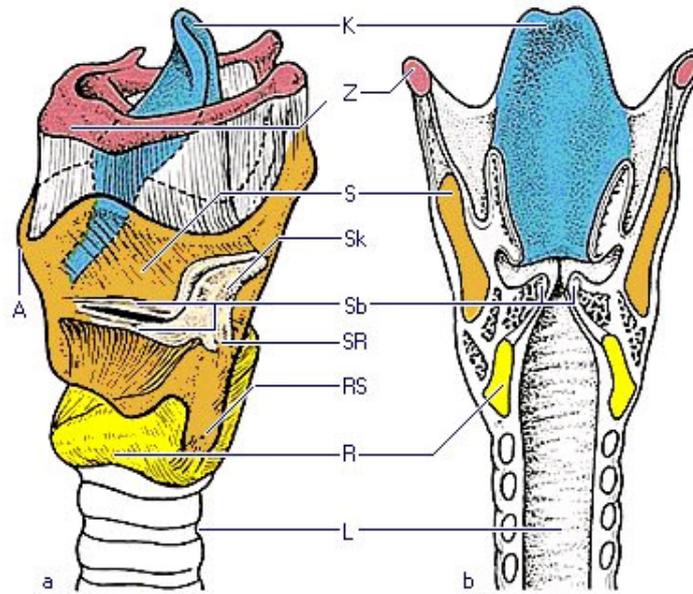


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Kehlkopfes (a von der Seite, b als Frontalschnitt. A Adamsapfel, K Kehledeckel, L Luftröhre, R Ringknorpel, RS Ringknorpel-Schildknorpelgelenk, S Schildknorpel, Sb Stimmklappen, Sk Stellknorpel, SR Stellknorpel-Ringknorpelgelenk, Z Zungenbein. (Quelle: Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus, Mannheim)

Bei Fledermäusen sind die Stellknorpel relativ starr, da sie am oberen Ende miteinander verwachsen sind. Die Schließung der Stimmritze erfolgt, indem die Stellknorpel über die *Mm. cricoarytaenoidei laterales* um ihre Längsachse zur Mitte gedreht werden und der paarige *Musculus thyroarytaenoideus* die Stimmklappen zusätzlich aneinanderpresst.

Echoortungslaute sind mit Schalldrücken bis zu 120 dB SPL sehr laut. Für die Aussendung solch lauter Vokalisationen bedarf es des Aufbaus eines hohen subglottischen Drucks, der die Lautstärke bestimmt. Dieser Druckaufbau kostet das vokalisierende Tier enorm Energie, was eine Ursache dafür sein könnte, dass das Ausstoßen der Echoortungslaute mit dem Flügelschlag korreliert ist, da dadurch die Energiekosten etwas gemindert werden können (Neuweiler, 1993).

Bis heute ist nicht vollkommen bekannt, wie genau die Ultraschalllaute entstehen. Ausschließlich im Kehlkopf der Fledermaus gibt es sogenannte Vokalmembranen. Sie sitzen am Rand der Stimmklappen, sind nur wenige Mikrometer dick und haben keine Muskelansätze. Die Vokalmembranen schwingen bei der Lauterzeugung in einem Luftstrom mit einer sehr hohen Geschwindigkeit (100 m/s) und erzeugen wahrscheinlich auf diese Weise den Ultraschalllaut.

Es gibt Fledermäuse, die ihre Echoortungslaute durch das Maul aussenden und andere, die sie durch die Nase ausstoßen. Das wirkt sich merklich auf die Lauteigenschaften aus. Wie bereits beschrieben, werden die Laute im Kehlkopf gebildet und bestehen zumeist aus mehreren Harmonischen. Die Aussendung des Lautes durch den Mund beeinträchtigt die Zusammensetzung des Lautes weniger stark als die Aussendung durch die Nase, da es von der Beschaffenheit (Geometrie und Volumen) der schalleitenden Räume abhängt, welche der Harmonischen stark oder schwach betont werden. Bei der Aussendung durch die Nase wirken zusätzliche Luftkammern auf dem Weg vom Kehlkopf zur Nase als Resonatoren. Zum einen dämpfen sogenannte Trachealkammern die 1. Harmonische des Lautes und zum anderen wirken sogenannte Nasenkammern ebenfalls dämpfend auf die 1. Harmonische und auch auf die 4. Harmonische des Lautes. Somit entsteht die typische Verteilung der Energien der Harmonischen eines Echoortungslautes (Neuweiler, 1993).

2.1.3 Neurale Grundlagen der Vokalisation

An der Vokalisation sind zahlreiche Muskeln beteiligt, die zentral koordiniert und sensorisch und motorisch innerviert werden müssen. Die an der Vokalisation beteiligten Hirnbereiche sind innerhalb der Klasse der Säugetiere im Wesentlichen die gleichen (Rhesusaffe (Simonyan & Jürgens, 2003), Totenkopffaffe (Jürgens, 2002), Katze (de Lanerolle, 1990; Holstege, 1989) und Fledermaus (Schuller & Radtke-Schuller, 1990)). Untersuchungen an Totenkopffaffen haben gezeigt, dass das Vokalisationssystem hierarchisch organisiert ist (Jürgens, 1988). Wie Abbildung 2.2 zeigt, steht an der Spitze dieser Hierarchie der limbische Kortex. Er steuert die willentliche Vokalisation. Dieser projiziert direkt zum periaquädukten Grau (PAG). Das PAG bekommt zudem Input von anderen Teilen des limbischen Systems (Hypothalamus, Amygdala, Thalamus). Auf der unteren Ebene dieser Hierarchie stehen die Motoneurone des Nucleus ambiguus und retroambiguus, die die Muskulatur des Vokalisationsapparates ansteuern und für die Koordination der Phonation zuständig sind (Jürgens, 1998). Studien an Fledermäusen belegen, dass in verschiedenen Hirnstammgebieten (z.B. der PLA) mit sehr niedrigen Schwellen und kurzen Latenzen ausschließlich Echoortungslaute auslösbar sind (Schuller & Radtke-Schuller, 1990; Fenzl & Schuller, 2002). Dies lässt den Schluss zu, dass verschiedene Vokalisationstypen über z.T. getrennte und/oder parallele Vokalisationsbahnen bei der Fledermaus gesteuert werden.

2.1.3.1 Die Rolle des PAGs innerhalb der Vokalisationsbahn

Das Gehirn der Fledermaus *Phyllostomus discolor* ist ca. 16 mm lang und an der größten mediolateralen Ausdehnung 12 mm breit. Das PAG erstreckt sich über ca. 3000 μm auf der Rostrocaudal-Ebene (im Normatlas (A. Nixdorf, T. Fenzl, B. Schwellnus, unveröffentlicht) von 7980 μm bis 11004 μm). Mediolateral hat das PAG an der breitesten Stelle eine Ausdehnung von 2000 μm . Die geringste mediolaterale Ausdehnung beträgt 1000 μm . Das PAG umschließt den Aquädukt (Aquaeductus mesencephali), der den III. und IV. Ventrikel miteinander verbindet.

Das PAG spielt für die Vokalisation eine zentrale Rolle. Im PAG sind bei verschiedenen Tierarten Zellen zu finden, die vokalisationskorreliert aktiv sind (z.B. bei Katze (Adams, 1968), Javaneraffe (Larson & Kistler, 1984; Larson & Kistler, 1986), Fledermaus (Suga & Yajima, 1988), Totenkopffaffe (Kirzinger & Jürgens, 1991; Düsterhöft et al., 2000) und sogar beim Knochenfisch (Kittelberger et al., 2006)). Dabei können Zellen im PAG bei Vokalisation auf unterschiedliche Art und Weise bezüglich der Vokalisation aktiv sein. Es gibt Zellen, die bereits vor Vokalisationsbeginn Aktionspotentiale aussenden und auch vor Vokalisationsbeginn wieder aufhören, andere beginnen vor der Vokalisation zu feuern und sind während der gesamten Vokalisationsdauer aktiv, wieder andere werden vor Vokalisationsbeginn gehemmt (Larson, 1991). Das Vorkommen von Zellen innerhalb des PAGs, die bereits vor der Vokalisation aktiv sind zeigt, dass das PAG nicht einfach auf den auditorischen Input reagiert, sondern in die motorische Steuerung der Vokalisation integriert ist.

Mittels elektrischer Stimulation lassen sich bei vielen Tierarten (so z.B. bei Ratte (Yajima et al., 1980), Fledermaus (Valentine et al., 2002; Schuller & Radtke-Schuller, 1990; Suga et al., 1973), Katze (Zhang et al., 1995; Nonaka et al., 1997), Totenkopffaffe (Jürgens & Ploog, 1970), Javaneraffe und Rhesusaffe (Larson, 1985) und Schimpanse (Brown, 1915)) und sogar beim Menschen (Sem-Jacobsen & Torkildsen, 1960) weitgehend natürliche und artspezifische Vokalisationen auslösen. Die Vokalisationen sind mit geringer Latenz (< 100 ms) auslösbar und habituierten kaum. Das heißt, dass die im PAG elektrisch ausgelösten Vokalisationen direkt durch den Stimulus hervorgerufen werden und nicht etwa durch Stimmungsänderung oder das Auslösen eines Schmerzes, aufgrund dessen dann eine Lautäußerung erfolgt.

Im Bezug auf die Vokalisation ist die Frage nach dem Mustergenerator noch immer eine sehr interessante und auch umstrittene. Aufgrund der Auslösbarkeit von natürlicher Vokalisation kommt dem PAG eher die Rolle eines Triggers zu (Jürgens, 1994) als die Funktion des Mustergenerators (Larson & Kistler, 1986;

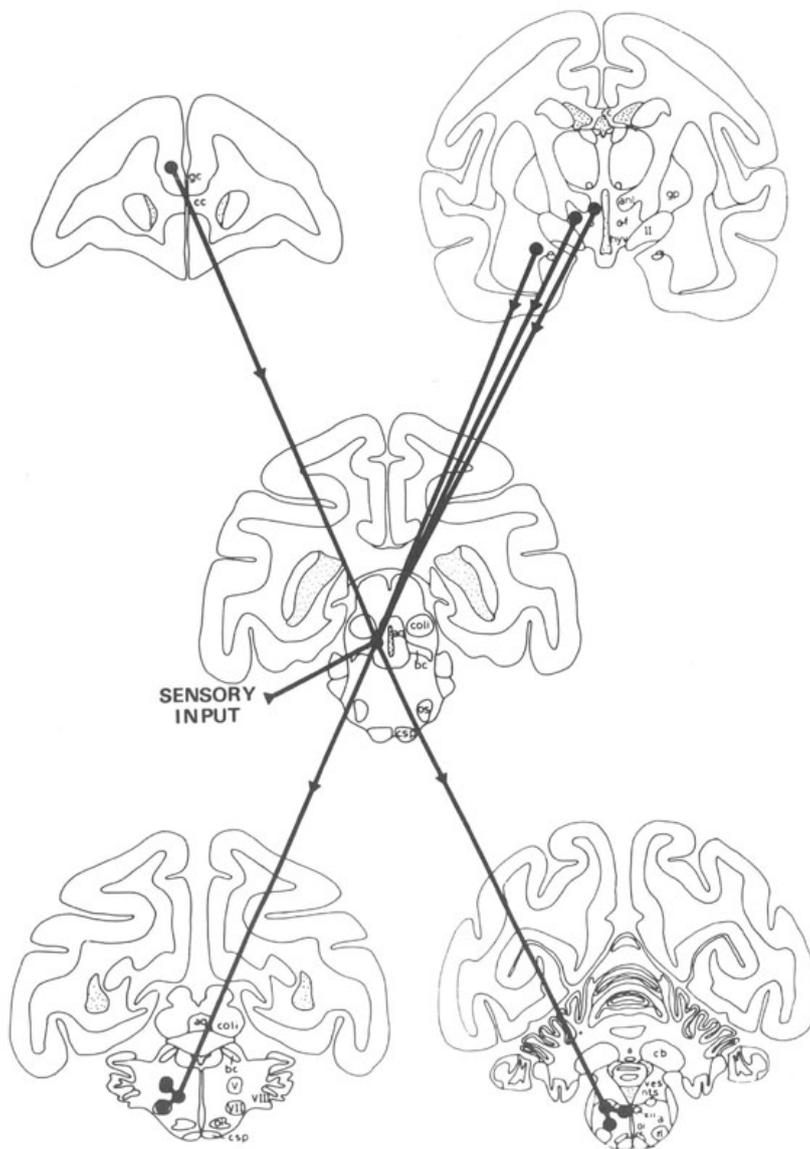


Abbildung 2.2: Darstellung der hierarchischen Organisation der Vokalisation beim Totenkopffaffen. Das PAG bekommt Informationen vom cingulären Gyrus sowie vom limbischen System. Es projiziert seinerseits zum Nucleus ambiguus und retroambiguus. (Abkürzungen: a Nucleus ambiguus; aq periaquuktes Grau; anl ansa leticularis; bc brachium conjunctivum; cb Cerebellum; cc Corpus Callosum; coli Colliculus inferior; csp Pyramidenbahn; f Fornix; gc Gyrus cinguli; gp Globus pallidus; hyf ventraler Hypothalamus; nts Nucleus solitarius; oi untere Olive; os obere Olive; rl Nucleus reticularis lateralis; ves Nucleus vestibularis; II Nucleus opticus; V Nucleus trigeminus; VII Nucleus facialis; VIII Nucleus cochlearis; XII Nucleus hypoglossus). Verändert nach Jürgens (1988).

Zhang et al., 1994). Durch die physikalischen Eigenschaften der elektrischen Reizung sind nur Teile einer Struktur aktivierbar, nicht jedoch die komplette Hirnstruktur. Wäre das PAG der Mustergenerator, würde man erwarten, dass dort mittels der elektrischen Reizung artifizielle Laute auszulösen sind, da eben nur Teile des PAGs aktiviert werden können und eine Aktivierung von Teilen des Mustergenerators zu Bruchstücken von Vokalisationen, also artifizieller Vokalisation führen müsste. Für die Auslösbarkeit natürlicher Vokalisation im Mustergenerator, müsste dieser vollständig aktiviert werden. Desweiteren sind auch nach Ausschaltung des PAGs nach wie vor natürliche Vokalisationen auslösbar (Siebert & Jürgens, 2003). Wäre das PAG der Mustergenerator, dürfte das nicht möglich sein.

Im PAG wurden außer mit elektrischer Stimulation auch mit neuropharmakologischer Reizung Vokalisationen ausgelöst (Fenzl & Schuller, 2002; Bandler, 1982; Bandler & Carrive, 1988; Richter & Jürgens, 1986; Lu & Jürgens, 1993). Dabei ließen sich mit der Injektion verschiedenener glutamaterger, cholinergischer und monoaminergischer Agonisten und auch einigen GABA-Antagonisten Vokalisationen hervorrufen. Daraus ist zu schließen, dass sich im PAG Schaltstellen der Vokalisationsbahn befinden.

Wird das PAG ausgeschaltet oder zerstört, führt das bei vielen Tierarten und auch beim Menschen zum Ausbleiben der Spontanvokalisation (Jürgens & Zwirner, 1996; Jürgens & Pratt, 1979; Skultety, 1962; Esposito et al., 1999; Botez & Carp, 1968). Eine partielle Ausschaltung/Zerstörung des PAGs beeinflusst die Vokalisation insofern, dass bestimmte Lauttypen nicht mehr auslösbar sind. Weiterhin auslösbare Vokalisationen sind in ihrer Lautstruktur unverändert. Vokalisationen, die vom Hypothalamus oder Gyrus cinguli elektrisch ausgelöst werden können, sind bei inaktivem PAG nicht mehr auslösbar (Lu & Jürgens, 1993). Bereits eine ipsilaterale Ausschaltung des PAGs führt dazu, dass im Vorderhirn ausgelöste Vokalisationen blockiert werden (Jürgens & Zwirner, 1996). Schaltet man hingegen den anterioren limbischen Kortex aus, führt das weder zu Stummheit noch zu einer veränderten Struktur der Laute. Somit ist der anteriore limbische Kortex von einem intakten PAG abhängig, das PAG jedoch nicht von einem intakten anterioren limbischen Kortex (Jürgens, 1988).

Das PAG weist direkte Projektionen zum Nucleus ambiguus auf (Holstege, 1989; Bockstaele et al., 1991). Vom Nucleus retroambiguus und der ihn umgebenden *Formatio reticularis* ziehen über kontralaterale Bahnen Neurone zu motorischen Kernen der Intercostal- und Abdominalmuskeln (Holstege, 1989; Thoms & Jürgens, 1987), die den für die Vokalisation notwendigen Luftstrom erzeugen.

Neben der wichtigen Funktion, die das PAG für die Vokalisation einnimmt, steuert es auch Angst- und Fluchtreflexe, Verhaltensreaktionen auf Stress und ist an der Schmerzunterdrückung und anderen Funktionen beteiligt (Bandler & Shipley, 1994; Keay & Bandler, 2001; Behbehani, 1995).

2.1.3.2 Die Rolle des NBICs innerhalb der Vokalisationsbahn

Der Nucleus des Brachiums des Inferioren Colliculus (NBIC) erstreckt sich bei der Fledermaus *Phyllostomus discolor* auf der Rostrocaudal-Ebene über 1000 μm (im Normatlas (A. Nixdorf, T. Fenzl, B. Schwellnus, unveröffentlicht) von 9700 μm bis 10664 μm). Die größte mediolaterale Ausdehnung von 350 μm findet man im caudalen Gebiet des NBICs. Seine größte dorsoventrale Ausdehnung von 2000 μm ist im Gebiet von 10248 μm bis 10416 μm zu finden (Romanowski, 2005).

Der Aufbau, Eigenschaften der Neurone und die Bedeutung des NBICs sind bis heute weitgehend ungeklärt. Der NBIC wurde erstmals 1968 beschrieben (Berman, 1968) und später in anderen Arbeiten als Bestandteil des Colliculus inferior (IC) dargestellt (Morest & Oliver, 1984).

Die anatomische Lage gleicht sich in verschiedenen Tierarten (Ratte (Skalióra et al., 2004), Frettchen (Schnupp & King, 1997) und Fledermaus (Schuller & Radtke-Schuller, 1990)): der caudale Teil des NBICs überlappt mit dem rostralen Hauptbereich des externen Nucleus des IC. Er läuft im rostralen Bereich parallel und medial zum Brachium und stößt dann auf den Nucleus des Geniculatum mediale.

Bei der Katze wurden verschiedene vom NBIC in andere Strukturen aufsteigende Projektionen nachgewiesen (Kudo et al., 1984). So finden sich ipsilaterale Verbindungen zum lateralen Tegmentum, dem dorsalen Thalamus und dem dorsalen und medialen Corpus geniculatum mediale (MGB). Bilaterale Projektionen fanden Kudo et al. (1984) zum Colliculus superior (SC), zu den anterioren und medialen Kernen des Prätektums, zum PAG und zur peripedunkulären tegmentalen Region. Bei diesen bilateralen Projektionen waren die kontralateralen Anteile etwas schwächer als die ipsilateralen.

Beim Frettchen beschrieben Doubell et al. (2000) Projektionen vom SC zum NBIC. Injektionen in den NBIC führten zu anterograden Markierungen in den tieferen Schichten des SC und zu retrograden Markierungen in der obersten Schicht und tiefen SC-Neuronen. Doubell et al. (2000) wiesen eine funktionelle SC-NBIC-Verschaltung, sozusagen eine Projektionsschleife, nach. Über diese können auditorische und visuelle Informationen ausgetauscht oder auch zusammengeführt werden.

Der NBIC nimmt für die Doppler-Shift-Kompensation eine bedeutende Rolle ein, wie an der Fledermaus *Rhinolophus rouxi* nachgewiesen wurde. Schaltet man den NBIC bilateral aus, ist keinerlei Doppler-Shift-Kompensation bei den Tieren mehr festzustellen (Schuller, 1998). Diese Studie zeigte zudem, dass in der Fledermaus *Rhinolophus rouxi* Vokalisationen im Gebiet des NBICs mit geringen Reizstärken auslösbar sind.

Bei der Fledermaus *Phyllostomus discolor* wurden Mikrostimulationen im NBIC durchgeführt (Romanowski, 2005). Die Ergebnisse zeigten, dass über den ganzen NBIC hinweg Echoortungslaute mit sehr geringen Schwellen von 5-10 μA und Latenzen von ca. 44 ms auslösbar sind. Der Stellenwert des NBICs für die Vokalisation ist bis auf die wenigen erwähnten Studien (Schuller, 1998; Romanowski, 2005) unbekannt.

2.2 Neuropharmaka

Um Vokalisation pharmakologisch auszulösen oder Strukturen auszuschalten, bedarf es verschiedener neuropharmakologischer Substanzen. Zur Auslösung kommen dabei Glutamat-Rezeptor-Agonisten wie z.B. Homocysteinsäure oder Kainensäure zum Einsatz. Für die Ausschaltung werden z.B. der GABA_A-Rezeptor-Agonist Muscimol oder auch der Glutamat-Rezeptor-Antagonist Kynurensäure verwendet. Über eine pharmakologische Überprüfung auf Vokalisation lässt sich die Aussage treffen, ob sich am Auslöseort lediglich durchziehende Fasern oder Schaltstellen der Vokalisationsbahn befinden. Eine Auslösbarkeit von Vokalisation mittels Neuropharmaka lässt auf Schaltstellen der Vokalisation am Auslöseort schließen.

2.2.1 Homocysteinsäure

Homocysteinsäure ist ein Glutamat-Rezeptor-Agonist und bindet an NMDA-Rezeptoren. Der Name dieses Rezeptors kommt von dem für ihn spezifischen Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA).

NMDA-Rezeptoren sind postsynaptische, ionotrope Glutamatrezeptoren. Diese Rezeptoren sind aus pentamer angeordneten Untereinheiten zusammengesetzt und besitzen zwei Leitfähigkeitszustände: Bei geringer Depolarisation der Membran blockiert ein Mg^{2+} -Ion den Kanal teilweise, dadurch ist die Leitfähigkeit des Kanals gering. Erfolgt in diesem Zustand eine Rezeptorbindung, werden nur Na^{+} - und K^{+} -Ionen hindurchgelassen. Bei stärkerer Depolarisation der Membran entfernt sich das Mg^{2+} -Ion aus dem Kanal. Die Blockade des Kanals wird somit auf-

gehoben und die Leitfähigkeit erhöht sich. Dadurch wird der Kanal neben Na^+ - und K^+ -Ionen auch für Ca^{2+} -Ionen durchlässig (Dudel et al., 1996).

Injiziert man Homocysteinsäure in ein vokalisationsrelevantes Gebiet, indem sich Schaltstellen der Vokalisationsbahn befinden, wirkt es exzitatorisch und es tritt eine vokale Reaktion auf (Dujardin & Jürgens, 2006; Zhang et al., 1994; Zhang et al., 1995).

2.2.2 Kainsäure

Kainsäure wurde 1953 das erste Mal aus der Rotalge *Digneia simplex* isoliert. Es wirkt im Nervensystem exzitatorisch und bei Applikation von höheren Dosen auch neurodegenerativ (Langmeier et al., 2003). Kainsäure ist für Kainatrezeptoren spezifisch. Kainatrezeptoren gehören zu den non-NMDA ionotropen Glutamatrezeptoren. Die Applikation von Kainsäure bewirkt eine Kanalöffnung und es erfolgt ein starker Na^+ -Ionen-Einstrom und ein schwacher K^+ -Ionen-Ausstrom. Das bewirkt eine schnelle und starke Depolarisation der Zelle.

Kainatrezeptoren befinden sich nicht an Fasern. Wird nun Kainsäure in ein vokalisationsrelevantes Gebiet appliziert und erfolgt auf die Applikation dieses Glutamat-Agonisten Vokalisation, ist davon auszugehen, dass das überprüfte Gebiet Schaltstellen der Vokalisationsbahn enthält und nicht nur durchziehende Fasern stimuliert wurden (Fenzl & Schuller, 2002), wie das z.B. bei der elektrischen Reizung möglich ist.

2.2.3 Kynurensäure

Kynurensäure wurde erstmals von Justus von Liebig in Urin von Hunden entdeckt (Liebig, 1853). Es kommt aber auch natürlicherweise im menschlichen Gehirn vor, wo es von Astrocyten synthetisiert und ausgeschieden wird (Guillemin et al., 2001; Kiss et al., 2003).

Kynurensäure ist ein Glutamat-Antagonist und blockiert in Abhängigkeit der Konzentration alle ionotropen Glutamatrezeptoren, also AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren (Stone, 1993). In Anwesenheit von Kynurensäure kann die postsynaptische Zelle nicht ausreichend depolarisiert werden. Dadurch ist der Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen über spannungsabhängige Ionenkanäle blockiert.

Eine Injektion von Kynurensäure in ein vokalisationsrelevantes Gebiet bewirkt, dass zuvor elektrisch dort ausgelöste Vokalisationen blockiert werden. Auch eine in einem bestimmten Gebiet der Vokalisationsbahn evozierte Vokalisation kann

mit einer Kynurensäureinjektion in ein anderes vokalisationsrelevantes Gebiet blockiert werden (Hannig & Jürgens, 2006; Fenzl & Schuller, 2005; Jürgens, 2000).

2.2.4 Muscimol

Muscimol kommt in Pilzen der Gattung der Amanita (Wulstlinge) vor. Muscimol kann aus Ibotensäure durch Decarboxylierung gebildet werden und hat eine stark halluzinogene Wirkung.

Muscimol ist ein GABA_A-Rezeptor-Agonist. Der GABA_A-Rezeptor gehört zu der Gruppe der ionotropen GABA-Rezeptoren. Er ist über das Gehirn und Rückenmark weit verbreitet und stellt den wichtigsten inhibitorischen Rezeptor im ZNS dar. Die transmitterabhängigen Ionenkanäle setzen sich aus pentamer angeordneten Transmembranprotein-Komplexen zusammen. Jede dieser 5 verschiedenen Untereinheiten durchzieht dabei die Membran vier mal. GABA_A-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle und für Cl⁻- und HCO₃⁻-Ionen durchlässig.

Wird Muscimol direkt in der Nähe von Nervenzellen appliziert, werden die Zellen in ihrer Aktivität vollständig gehemmt (Sallagundala et al., 2007).

2.3 Die Kleine Lanzennase *Phyllostomus discolor*

Die neotropische Fledermaus *Phyllostomus discolor* gehört zu der Ordnung der Fledertiere (*Chiroptera*), der Familie der Blattnasen (*Phyllostomidae*) und der Gattung der Lanzennasen (*Phyllostomus*).



Abbildung 2.3: Männliche Fledermaus der Art *Phyllostomus discolor* im Flug.

Das Vorkommen dieser Tierart erstreckt sich von Südmexiko bis Nord-Argentinien. Ebenso findet man die Lanzennase in Trinidad. Die Körperlänge der Kleinen Lanzennase beträgt ca. 75 mm, die Unterarmlänge liegt bei 55-65 mm und das Gewicht liegt zwischen 20 g bis 40 g. Der Name *discolor* wird durch die Färbung des Fells begründet. Die einzelnen Haare sind an der Basis hell und werden zur Spitze hin dunkler, sie sind also zweifarbig. Die Fellfärbung reicht von dunkelbraun bis hin zu rotbraun und grau.

Die Individuen dieser Fledermausart leben in Haremsstrukturen, bei denen die Zahl der Weibchen 1-12 pro dominantes Männchen beträgt.

Die Lanzennase ernährt sich omnivor, d.h. es werden Früchte, Pollen, Nektar und Insekten gefressen. Insekten erbeutet die Kleine Lanzennase auf Blüten oder Früchten, jedoch nicht mittels der Echoortung.

Die Lanzennase bekommt ein Mal im Jahr in der Regel ein Jungtier.

2.3.1 Vokalisationsrepertoire der Lanzennase

Die Fledermaus *Phyllostomus discolor* stößt über die Nase kurze, abwärts frequenzmodulierte und multiharmonische Echoortungslaute aus. Diese Echoortungslaute sind 0,3 bis 2,5 ms lang und überstreichen einen Frequenzbereich von 15-100 kHz (Rother & Schmidt, 1982). Abbildung 2.4 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Parameter (wie Lautstärke- und Frequenzverlauf über die Zeit, sowie den Lautstärkeverlauf über die Frequenz) eines von *Phyllostomus discolor* spontan geäußerten Echoortungslautes.

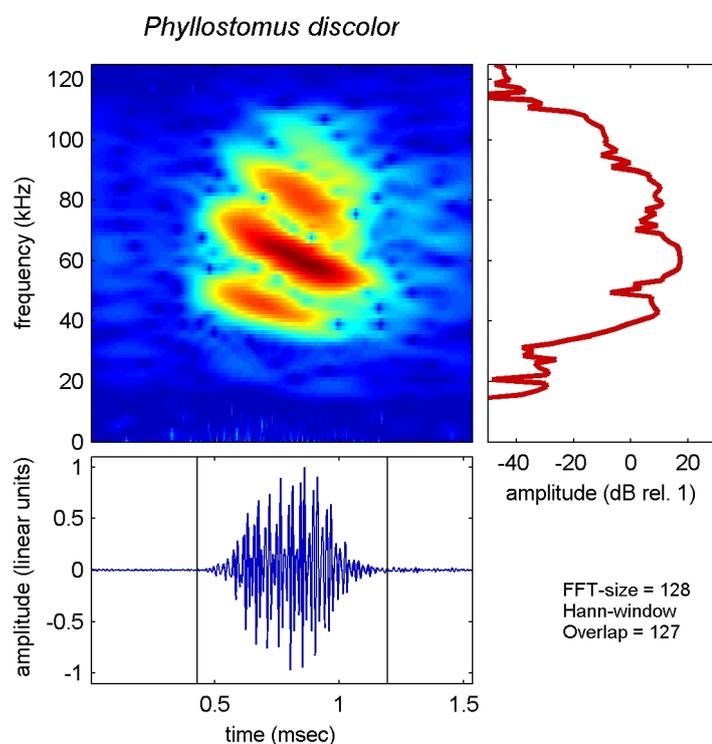


Abbildung 2.4: Spektrogramm, Frequenz-Amplituden-Diagramm und Amplituden-Zeit-Diagramm eines Echoortungslautes von *Phyllostomus discolor*.

Neben den Echoortungslaute verfügt *Phyllostomus discolor* über ein breites Spektrum an Kommunikationslauten, mittels derer sich die Individuen untereinander verständigen. Das Lautrepertoire wurde ausführlich untersucht (Pistohl, 1998; Pistohl, 1998). Insgesamt wurden 15 verschiedene Kommunikationslaute beschrieben, die in 3 Gruppen von Verhaltenskontexten gegliedert wurden. Es wurden 5 Lauttypen gefunden, die im Zusammenhang mit agonistischem Verhalten geäußert wurden, 6 Lauttypen traten im Zusammenhang mit nicht-aggressivem Verhalten auf und 4 Lauttypen waren keinem Verhaltenskontext zuordenbar.

2.4 Narkose

Für die Vorbereitungen des Tieres für die Experimente mussten die Tiere mittels einer Dreifach-Kombinationsnarkose narkotisiert werden. Dieses 3-fach Narkotikum erfüllt durch seine spezielle Zusammensetzung wichtige Punkte der Narkose wie Sedation, Hypnose und Analgesie. Zudem hat es den Vorteil, dass sich die einzelnen Bestandteile in ihrer Wirkung ergänzen, potenzieren und Nebenwirkungen aufheben. Aufgrund dessen ist eine Reduzierung von Einzeldosen und die Unterschreitung eventuell toxischer Konzentrationen gegeben und möglich. Die verwendeten Narkotikabestandteile waren Medetomidin (α_2 -Rezeptor-Agonist, wirkt als Sedativum), Midazolam (gehört zur Gruppe der Benzodiazepine, wirkt als Hypnotikum) und Fentanyl (Opiat-Agonist, wirkt als Analgetikum). Diese hier beschriebene 3-fach Kombinationsnarkose aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (MMF) ist mit einer Kombination aus dem α_2 -Rezeptor-Antagonisten Atipamezol, dem Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil und dem Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon (AFN) antagonisierbar.

2.5 Die elektrische Stimulation

Bereits 1937 löste Magoun die ersten Vokalisationen mittels elektrischer Hirnreizung aus. Das Prinzip der elektrischen Stimulation findet bis heute vielfach Anwendung in Bereichen der Grundlagenforschung (Toda et al., 2008; Zhang et al., 2007; Behrend & Schuller, 2000) und Medizin (Temel et al., 2007; Nuttin et al., 2000).

Als Voraussetzung für die elektrische Stimulation im Gehirn der Kleinen Lanzennase *Phyllostomus discolor* wurde eine stereotaktische Methode von Schuller (1986) entwickelt. Mittels dieser Methode ist es möglich, Strukturen mit einer Genauigkeit von $\pm 100 \mu\text{m}$ anzuzielen und das angezielte Gebiet elektrisch zu stimulieren. Die elektrische Reizung wurde in dieser Arbeit mit parylenisolierten Wolframelektroden mit einem Spitzendurchmesser von 2-3 μm und ca. 2 M Ω Widerstand durchgeführt.

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der elektrischen Reizung ist die Frage, wie weit sich der Strom von der Elektrode aus im Gewebe ausbreitet. Besonders bei Strukturen mit geringer Ausdehnung ist es wichtig, das eingrenzen zu können, da dadurch verhindert werden kann, dass angrenzende Gebiete stimuliert werden und möglicherweise für die ausgelöste Reaktion verantwortlich sind. Für die Ausbreitung des elektrischen Reizes von der monopolen Elektrode ist die Beschaffenheit des die Elektrode umgebenden Gewebes maßgebend (Ranck, 1975).

2.6 Die pharmakologische Stimulation

Vielfach ist es wichtig, ein zuvor unter einem bestimmten Gesichtspunkt (z.B. der Auslösbarkeit von Vokalisation) elektrisch stimuliertes Gebiet auch pharmakologisch zu testen. Bei der elektrischen Reizung ist nicht zu unterscheiden, ob durchziehende Fasern oder Fasern angrenzender Zellen stimuliert werden und für die ausgelöste Reaktion verantwortlich sind. Erfolgt auf die pharmakologische Reizung eine Reaktion, ist davon auszugehen, dass sich an der Stimulationsposition Schaltstellen von Neuronen des jeweiligen untersuchten Systems (z.B. der Vokalisationsbahn) befinden.

Für eine pharmakologische Stimulation bei der Fledermaus *Phyllostomus discolor* wird eine definierte Menge einer exzitatorischen Substanz (z.B. Glutamat oder ein Glutamat-Agonist) mittels einer Glaselektrode in ein bestimmtes Gebiet eingebracht. Die Glaselektrode hat einen Spitzendurchmesser von 12 - 15 μm und wird unter dem Mikroskop mit der gewünschten Substanz befüllt.

Eine pharmakologische Injektion ist sowohl über Iontophorese als auch mit Druck möglich. Für diese Arbeit wurde die Applikation mittels Druck verwendet. Für die Druckinjektion wird die Glaselektrode an ein Druckluftsystem mit 2 Ventilen angeschlossen. Das System steht permanent unter einem Druck von ca. 7 bar. Für eine bestimmte Zeit (im Millisekundenbereich) wird der Druck über eine Ventilöffnung appliziert und unmittelbar darauf über ein zweites Ventil druckfrei geschaltet, sodass für den eingestellten Zeitwert der Druck auf die Flüssigkeit in der Elektrode wirkt. Je nach Durchmesser der Austrittsöffnung gelangt so eine definierte Menge der Substanz in das Gehirn.

Bei der Applikation von Neuropharmaka ins Gehirn ist die mögliche Toxizität, die eine Substanz besitzen kann, zu berücksichtigen. Ebenfalls ist besonderes Augenmerk auf das zu injizierende Volumen zu richten. Ist dieses zu groß, kann das zur Zerstörung von neuronalem Gewebe führen und die Hirnregion in die es eingebracht wurde in ihrer Funktion beeinträchtigen.

2.7 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte das PAG hinsichtlich der elektrischen Auslösbarkeit von Vokalisation untersucht werden. Es sollten systematisch Positionen an denen Vokalisationen auslösbar sind im Hinblick auf Reizschwelle, Vokalisationstyp, Latenz und räumliche Lage (zur Klärung einer möglichen Topographie) erfasst werden.

Es sollte weiterhin mittels Reiz- und Ausschaltexperimenten aufgeklärt werden, ob zwischen dem PAG und dem NBIC eine für die Vokalisation relevante funktionelle Verbindung besteht und wie sich die Strukturen im Bezug auf die Vokalisation gegenseitig beeinflussen. In Bezug auf die verschiedenen Lauttypen (Kommunikationslaute und Echoortungslaute) der Fledermaus *Phyllostomus discolor* sollten diese Untersuchungen einen Hinweis auf die Organisation der neuronalen Kontrolle dieser beiden Lauttypen liefern.

Tracerinjektionen in das PAG und den NBIC sollten aufklären, inwiefern diese Strukturen mit anderen (vokalisationsrelevanten) Gebieten in Verbindung stehen.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen am neuronalen System der Echoortungs- und Kommunikationslaute bei der Fledermaus wurden 11 Tiere (6 Männchen, 5 Weibchen) der Art Kleine Lanzennase (*Phyllostomus discolor*) verwendet. Die Tiere stammten aus hauseigener Zucht und waren in einem klimatisierten Raum (ca. 28 °C Raumtemperatur, 80 % Luftfeuchtigkeit) bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12h - 12h untergebracht. Während des Versuchszeitraumes wurden die Tiere einzeln in einem ca. 50 cm x 40 cm x 30 cm großen Käfig gehalten. Die Untersuchungen wurden ausschließlich an Zuchttieren durchgeführt. Der Umgang mit den Tieren erfolgte unter Berücksichtigung des in der Bundesrepublik Deutschland geltenden Tierschutzgesetzes. Die Versuche wurden zuvor von der Regierung Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 209.1/211-2531-68/03). Alle Personen die an der Versuchsdurchführung und -betreuung beteiligt waren, hatten eine Genehmigung nach §9 Abs. 1 Satz 4.

3.2 Präparation

Für die Durchführung der Versuche musste das Tier in einer eigens entwickelten, stereotaktischen Apparatur fixiert werden (Schuller et al., 1986). Dafür musste zunächst ein Metallstift auf dem Schädel des Tieres befestigt werden. Das Tier wurde mit 0,025 ml pro 10 g Körpergewicht MMF (Dreifachnarkose aus 0,5 mg/ml Medetomidin, 5 mg/ml Midazolam und 0,05 mg/ml Fentanyl) s.c. narkostisiert und dann in einem Maulhalter fixiert. Unter dem Binokular wurde die Kopfhaut von rostral nach caudal in der Schädelmitte geöffnet. Der Schnitt reichte von der Augenlinie bis zum Hinterhauptsabfall. Die darunterliegenden Muskeln wurden mit einem Spatel vorsichtig zur Seite geschoben. Um Blutungen zu vermeiden wurde ein Blutgerinnungsmittel mit dem Inhaltsstoff Aluminiumchlorat verwendet (Mallebrin[®], Krewel Meuselbach GmbH, Eitorf, Deutschland).

Nach der Freilegung des Schädelknochens wurde dieser sorgfältig von Geweberesten befreit und mit dem Spatel leicht aufgeraut. Anschließend wurde der Me-



Abbildung 3.1: Lage des Gehirns im Schädel der kleinen Lanzennase.

tallstift mit dem Zahnzementkit von M+W Dental, einem lichthärtenden Kunststoff, auf dem Schädel fixiert.

Das Gehirn liegt bei der Fledermaus *Phyllostomus discolor* etwas geneigt im Schädel (Abb. 3.1). Als Ausgangssituation für die Versuche war es notwendig, das Tier mittels des Apparaturdrehpunkts in die sogenannte Normposition (siehe Abb. 3.2 B) zu bringen, d.h. die Raumachsen des Gehirns des Tieres liegen parallel zu den Raumachsen der Apparatur. Für die Ermittlung dieser Normposition wurde der Schädel des Tieres 500 μm neben dem Schädelkamm von rostral nach caudal mit einer auf dem Referenzpunkt der Apparatur ausgerichteten Sonde abgetastet. Die so erhaltene Schädelkontur wurde mit der Standard-Schädelkontur überlagert und der sich aus den Scandaten und dem Drehpunkt ergebende Korrekturwinkel errechnet. Dieser Vorgang wurde für die mediolaterale Ausrichtung ebenfalls durchgeführt. Die sich daraus ergebenden Korrekturwinkel wurden an der Apparatur eingestellt und führten zur Positionierung des Tieres in Normposition (Abb. 3.2).

Nach diesem sogenannten Schädelscan und der Definition der Normposition wurde die Lage der anzuzielenden Struktur (z.B. PAG oder NBIC) im Normposition-Koordinatensystem des Tieres eingetragen und die resultierenden Werte für das Apparatur-Koordinatensystem abgelesen. Diese Koordinaten wurden dann an der Apparatur eingestellt und an entsprechender Stelle des Schädels des in Normposition fixierten Tieres eine Markierung gesetzt. Diese Markierung bezeichnete die Position, an der die oberste Schicht des Schädelknochens mit einem Bohrer auf einer Fläche von ca. 200 x 200 μm abgenommen wurde. Danach wurde innerhalb

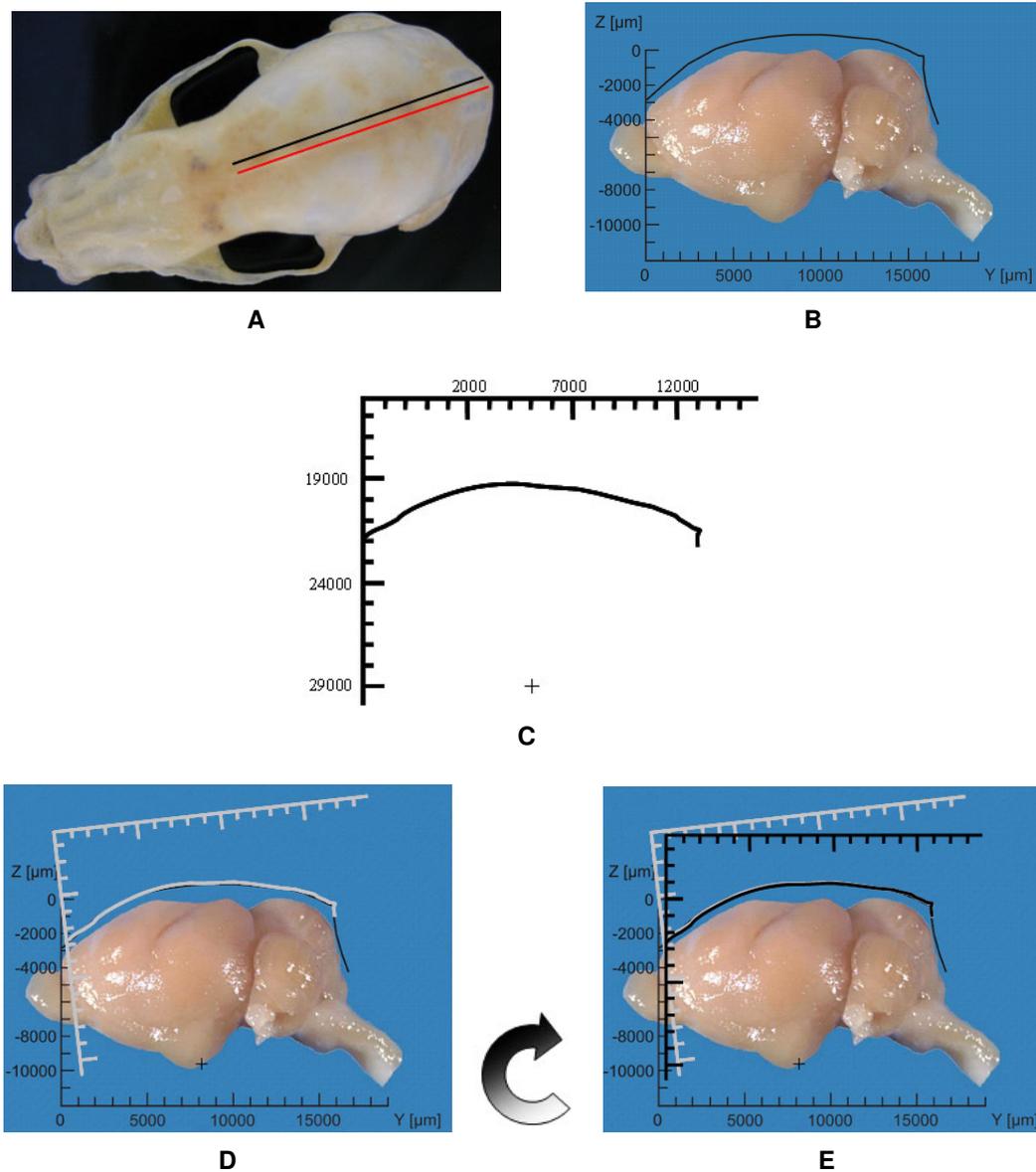


Abbildung 3.2: Stereotaxie, Methode nach Schuller et al. (1986). Die Schädeloberfläche von *Phyllostomus discolor* wird $500\ \mu\text{m}$ neben dem Schädelkamm abgetastet (A die rote Linie markiert die Lage des Schädelkamms, entlang der schwarzen Linie erfolgt der Scan). In Normposition liegen Gehirn und Schädelprofil in einem bestimmten Verhältnis zueinander (B). Der Scan wird in ein Apparaturkoordinatensystem mit bekanntem Drehpunkt eingezeichnet (C). Werden Scan und Normdaten übereinander gelegt, sind die beiden Koordinatensysteme nicht parallel zueinander (D), deshalb erfolgt eine Verschiebung um den bekannten Drehpunkt, sodass beide Koordinatensysteme zueinander parallel liegen (E). Dadurch ist die Lage des Gehirns des Versuchstiers in der Apparatur definiert und es können gezielt Hirnstrukturen aufgesucht werden.

dieses Bereichs auf ca. $100 \times 100 \mu\text{m}$ der Schädelknochen vollkommen entfernt und die Dura unter Verwendung von Xylocain[®] 2% mit einer Kanüle perforiert. Nach Abschluss der Präparation wurde die Narkose des Tieres mit $0,085 \text{ ml} / 10 \text{ g}$ Körpergewicht AFN (5 mg/ml Atipamezol, 0,1 mg/ml Flumazenil und 0,4 mg/ml Naloxon) antagonisiert.

3.3 Elektrische Reizung

Alle Experimente fanden in einer schallgedämmten Kammer statt, die mit einer stereotaktischen Apparatur, einem Binokular (Zeiss, Deutschland) und einer Kamera (Domiplan 2,8/50, Zoomar Vertriebs GmbH, München) ausgestattet war. Nachdem das Tier wie zuvor beschrieben, präpariert worden war, wurde nach einer Ruhezeit von 3 Tagen das Hirngebiet, unter der vorbereiteten Öffnung im Schädelknochen mittels elektrischer Reizung abgetastet.

Dazu wurde das Tier zuvor mit einer Initialdosis von 0,1 ml einer 0,04%igen Rompun[®]-Lösung (0,1 ml Rompun[®] 2% in 4,9 ml 0,9% NaCl-Lösung) sediert und danach für 15 Minuten in der Transportbox in der ruhigen, schallgedämmten Versuchskammer gelassen. Anschließend wurde es in eine sandwichartige Halterung platziert und über eine Schmetterlingskanüle je nach Erregungszustand mit $1 - 6 \mu\text{l} / \text{min}$ Rompun[®] (0,04%) sediert.

Eine Parylen-isolierte Wolframelektrode (WPI, Sarasota, USA) mit einem Spitzendurchmesser von $2 - 3 \mu\text{m}$ und 2 MOhm Widerstand wurde zuvor in einem Glasröhrchen fixiert. Anschließend wurde sie in den Elektrodenhalter der Apparatur eingespannt. Die Elektrode wurde auf dem Referenzpunkt der Apparatur eingenußt. Die Elektrode wurde dann zur Öffnung im Schädelknochen gefahren und nach Betäubung des Gebiets mit Xylocain[®] 2% (AstraZeneca, Wedel, Deutschland) auf der Gehirnoberfläche aufgesetzt. Mittels Piezo-Vorschub (WPI, Sarasota, USA) wurde die Elektrode dann in das Gehirn eingebracht. Die Tiefe, auf die die Elektrode gefahren wurde, ergab sich aus der Lage der angezielten Struktur unter der Hirnoberfläche (Bezug auf Normatlas). Mit der Reizung wurde bereits $400 \mu\text{m}$ vor dem eigentlichen Erreichen der Zielstruktur begonnen. Der elektrische Reiz bestand aus 15 Rechteckimpulsen mit einer Pulsdauer von $100 \mu\text{s}$ und einer Pause von $900 \mu\text{s}$ (daraus ergibt sich eine Pulsfolgendauer von 15 ms). Die Stimulationsrate betrug 1 kHz. Die Pulsfolgenrate betrug 6 Hz, die Reizung erfolgte mit einer monopolen Elektrode und negativem Strom. Es wurde immer mit einem Stimulus von $10 \mu\text{A}$ und den oben angegebenen Parametern begonnen. Bei keinerlei vokaler und geringfügiger körperlicher Reaktion auf diesen Reiz, wurde die Intensität

immer wieder um 10 μA erhöht, bis entweder eine Vokalisation ausgelöst werden konnte oder die Stromstärke von 80 μA erreicht war.

Anhand der ausgelösten körperlichen und vokalen Reaktion war eine ungefähre Aussage möglich, ob man sich auf das gewünschte Gebiet zu bewegt. Bei ausschließlich körperlicher Reaktion wurde die Elektrode nach der Stimulation mit maximal 80 μA 200 μm tiefer gefahren und an der neuen Position nach mindestens einer halben Minute Wartezeit gereizt. War an der obersten getesteten Position bereits Vokalisation auslösbar, wurde die Elektrode 200 μm nach oben gefahren und diese Position auf Vokalisation getestet. Die oberste und die unterste getestete Position eines Elektrodentraktes waren immer ohne vokale Reaktion auf den elektrischen Stimulus. Nachdem ein Trakt auf diese Weise abgetastet wurde, wurde die Elektrode herausgezogen und die Lage des Tieres um mindestens 3° (in der Rostrocaudalachse oder in der Mediolateralachse) verändert. Parallel wurde die Lage der Elektrode anhand der abgelesenen Koordinaten und vorliegenden Drehpunkte rechnergestützt ermittelt. Diese Vorgehensweise wurde beibehalten, bis das gesamte Gebiet mittels elektrischer Reizung auf Vokalisation überprüft worden war.

Bei vokaler Reaktion wurden pro Position 4 Lautaufnahmen (mit 2 Sekunden Dauer) gemacht; 2 mit der Schwellenreizstärke und 2 mit einer Reizstärke 10 μA über der Schwelle. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 1/4 - inch Kondensormikrofon (Typ 4135, Brüel & Kjær, Nærum, Dänemark), wurden verstärkt (Brüel & Kjær, Nærum, Dänemark) und gefiltert (Active Filter AF 173, Lötscher Elektronik, Rosenheim, Deutschland) und mittels eines Analog-Digital-Wandlers (CIO-DAS16/M1, Computerboards, Mansfield, USA) im PC mit einem in VEE Pro (Agilent Technologies, USA) geschriebenen Programm mit einer Abtastrate von 250 kHz aufgenommen und abgespeichert. Damit die Aufnahme der Vokalisation synchron zur Reizung stattfand, generierte eine zweite digitale Stimulationseinheit (PG 4000 Digital Stimulator, Neuro Data Instruments, New York, USA) einen reizsynchronen Hüllimpuls, der als Trigger für das VEE-Aufnahmeprogramm diente. Die Dateien wurden in .wav-Dateien konvertiert und mit dem Programm BatSound Pro (Pettersson Elektronik AB, Uppsala, Schweden) ausgewertet.

3.4 Pharmakologische Reizung und Ausschaltung

Nachdem das PAG bzw. der NBIC auf die oben beschriebene Art und Weise elektrisch auf Auslösbarkeit von Vokalisation überprüft wurden, wurden einige zentral gelegene Positionen in diesen Strukturen auf pharmakologische Auslösbarkeit von Vokalisation geprüft. Das diente dazu, festzustellen, ob an der Position, an der

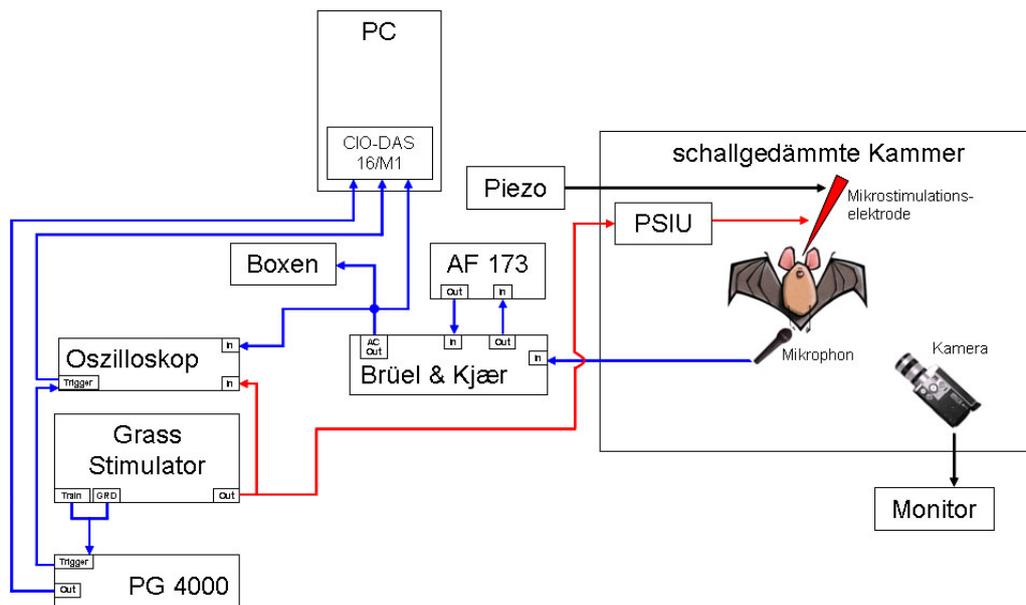


Abbildung 3.3: Blockschaltbild des Apparaturaufbaus für die elektrische Mikrostimulation und die Vokalisationsaufnahme: elektrische Mikrostimulation (rot) über Grass Stimulator, Oszilloskop und Isolationseinheit (PSIU) zum Tier. Aufnahme (blau): Mikrofon zum Verstärker (Brüel & Kjær, Filter (AF 173) zum Analog-Digital-Wandler (CIO-DAS 16/M1 im Rechner (PC). Den Trigger zur Aufnahme generierte die zweite Stimulationseinheit (PG 4000). Während der ganzen Versuchsdauer wurde das Tier mit seinen Spontanbewegungen und seinen körperlichen Reaktionen auf die elektrische bzw. pharmakologische Reizung über eine Videokamera mit angeschlossenen Monitor beobachtet. Die Beobachtungen wurden dokumentiert. Die Aufwärts- bzw. Abwärtsbewegung der Mikroelektrode wurde mittels eines Piezo-Vorschubs von außerhalb der Kammer gesteuert.

elektrisch Vokalisation auslösbar war lediglich durchziehende Fasern oder Axone nahegelegener Neurone elektrisch aktiviert worden waren und zur Vokalisation geführt hatten. Zudem sollten in weiterführenden Experimenten sowohl das PAG als auch der NBIC pharmakologisch ausgeschaltet werden. Dafür war es wichtig, ein Gebiet mit vokalaktiven Neuronen zu erreichen, an denen Neuropharmaka andocken und wirken können. Für die pharmakologische Auslösung von Vokalisation wurde der NMDA-Rezeptor-Agonist Homocysteinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und der Kainat-Rezeptor-Agonist Kainsäure (Diagnostic Chemicals, Charlottetown, Kanada) verwendet. Zur pharmakologischen Ausschaltung dienten der Glutamat-Rezeptor-Antagonist Kynurensäure und der GABA_A-Rezeptor-Agonist Muscimol (beide von Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz). Die Neuropharmaka wurden in Konzentrationen von 20 mM (Homocysteinsäure), 0,65 mM (Kain-

säure), 75 mM (Kynurensäure) und 3,5 mM (Muscimol) angesetzt, in Eppendorfcups zu je 50 µl aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren (Homocysteinsäure, Kainsäure, Kynurensäure) bzw. bei 4-6°C gekühlt aufbewahrt (Muscimol).

Für die pharmakologische Reizung und Ausschaltung wurden Glaskapillaren (Minicaps) mit einem Puller (Sutter Instruments, USA) so gezogen, dass sie einen Innendurchmesser an der Elektrodenspitze von 12 - 15 µm besaßen. Die Länge der Elektrodenspitze betrug zwischen 5000 und 6500 µm. Die Glaselektrode wurde mit dem zu injizierenden flüssigen Stoff befüllt, in einer Halterung an der Apparatur fixiert und mit einer Druckinjektionsanlage verbunden. Über diese Druckinjektionseinrichtung war es möglich, auf die Flüssigkeit in der Elektrode für 50 - 90 ms einen Druck von 7 bar auszuüben. Somit wurde ein definiertes Volumen von 5 - 20 nl aus der Elektrode ausgetrieben. Zudem wurde an die Elektrode mit Sekundenkleber ein Streifen Millimeterpapier geklebt, anhand dessen Veränderungen des Füllstands der Flüssigkeit in der Elektrode gemessen wurden. Für die verwendeten Glaskapillaren war auf der Länge eines Millimeters ein Flüssigkeitsvolumen von 100 nl vorhanden, und die Meniskusbewegung konnte mit einer Genauigkeit von 10 nl abgelesen werden.

3.4.1 Verwendung von Homocysteinsäure

Einige Positionen, an denen elektrisch Vokalisation ausgelöst werden konnte, wurden pharmakologisch auf Vokalisation überprüft, indem an diesen stereotaktischen Koordinaten Homocysteinsäure injiziert wurde. An diesen Positionen wurden 10 - 50 nl Homocysteinsäure (20 mM) injiziert und die Reaktion des Tieres (Bewegungen und Vokalisationen) dokumentiert. Für die Stimulation mit Homocysteinsäure ist es typisch, dass eine auftretende Vokalisation innerhalb von wenigen Sekunden nach der Injektion beginnt und nicht länger als 30 s andauert. Um sicher zu gehen, dass die Reaktion auf eine weitere Homocysteinsäureinjektion nicht noch die von der vorhergehenden Injektion ist, lagen zwischen 2 Homocysteinsäureinjektionen mindestens 7 Minuten.

3.4.2 Verwendung von Kainsäure

Einige Positionen, an denen elektrisch Vokalisation auslösbar war und die zuvor mit Homocysteinsäure auf Vokalisation getestet wurden, wurden an einem anderen Versuchstag mit Kainsäure untersucht. An diesen Positionen wurden 5 - 15 nl Kainsäure (0,65 mM) injiziert. Nach der Injektion von Kainsäure dauert es in der Regel bis zu 1,5 Minuten, ehe die Vokalisation beginnt. Das Tier vokalisiert auch

bei geringen Injektionsmengen relativ lange (bis zu 4 Minuten). Um auch hier sicher zu gehen, dass eine bestimmte Reaktion des Tieres einer bestimmten Kainsäureinjektion zuzuordnen ist, lagen zwischen den einzelnen Kainsäureinjektionen mindestens 15 Minuten.

3.4.3 Verwendung von Kynurensäure

Zur Ausschaltung der Strukturen wurde unter anderem der Glutamat-Rezeptor-Antagonist Kynurensäure verwendet. An den zuvor elektrisch und pharmakologisch auf Vokalisation getesteten Positionen wurden innerhalb des PAGs an 4 Positionen (2 Echoortungslautpositionen rostral, eine auf jeder Seite und 2 Kommunikationslautpositionen caudal, eine auf jeder Seite) und innerhalb des NBICs an einer Position 200 nl Kynurensäure (75 mM) injiziert.

Die elektrische Reizung, pharmakologische Ausschaltung und anschließende erneute elektrische Reizung erfolgte auf 3 verschiedene Arten: 1.) Elektrische Reizung innerhalb der Struktur (PAG oder NBIC), anschließende pharmakologische Ausschaltung dieser Struktur und erneute Reizung innerhalb der ausgeschalteten Struktur. 2.) Elektrische Reizung im PAG, anschließende pharmakologische Ausschaltung des ipsilateral, kontralateral (zum Auslöseort gelegenen) oder beider NBICs mit anschließender erneuter Reizung im PAG. 3.) Elektrische Reizung im NBIC, pharmakologische Ausschaltung des ipsilateral, kontralateral, rostral, caudal gelegenen oder des gesamten PAGs, erneute Reizung im NBIC. Mit der nach der pharmakologischen Ausschaltung durchgeführten elektrischen Reizung wurde im ersten Fall überprüft, ob generell eine Ausschaltung der Struktur durchführbar ist. Im Falle der zweiten und dritten beschriebenen Methode konnte überprüft werden, inwiefern sich für die Auslösung von Vokalisation das PAG und der NBIC gegenseitig beeinflussen bzw. bedingen.

3.4.4 Verwendung von Muscimol

Die mit Kynurensäure durchgeführten Ausschaltungen wurden an anderen Versuchstagen mit Muscimol wiederholt. Dazu wurde in der gleichen Weise vorgegangen, wie unter 2.4.3 beschrieben. Die Injektionsmenge betrug an jeder Position 150 nl der 3,5 mM Muscimol-Lösung.

3.5 Tracerinjektionen

Am Ende der Versuchsreihe wurde bei jedem Tier mindestens ein Tracer injiziert. Als Tracer dienten Biotin-Dextran-Amin (BDA), Weizenkeimagglutinierte Meerrettichperoxidase (WGA-HRP) und mit Alexa Fluor 488 markiertes Dextran (Alexa 488-Dextran). BDA und WGA-HRP wurden mittels Iontophorese und Alexa 488-Dextran per Druck injiziert.

Für die Injektion von BDA wurde eine 10 %ige Lösung hergestellt und in eine Glaselektrode gefüllt. Der Innendurchmesser der Glaselektrode an der Spitze betrug 12 - 15 μm . Die Injektion erfolgte über 12 Minuten bei 3 μA positivem Strom. Der Strom wurde dazu über 24 Minuten in einem 5 s Rhythmus an- und ausgeschaltet (24 Minuten on/off). Das diente dazu, dass sich aus der Elektrode ausgetriebener Tracer im Gewebe verteilen und Verstopfungen der Elektrodenspitze vermindert werden konnten. Nach der Injektion wurde die Elektrode 3 Minuten vor Ort belassen und dann zügig herausgefahren. Das Tier wurde nach einer Tracerlaufzeit von 7 Tagen perfundiert.

Das gleiche Procedere wurde bei der Injektion von WGA-HRP durchgeführt. Die Konzentration von WGA-HRP betrug 1,5 %, der Injektionsstrom von 1 μA wurde über die Dauer von 12 Minuten (on/off) appliziert. Das Tier wurde 3 Tage nach der WGA-HRP-Injektion perfundiert.

Für die Injektion von Alexa 488-Dextran wurde eine Glaselektrode (Innendurchmesser der Spitze 12 - 15 μm) mit einer 10 %igen Alexa 488-Dextran-Lösung befüllt. Die Glaselektrode wurde an die vorgesehene Position gefahren und 40 nl des Inhalts per Druck injiziert. Anschließend wurde die Elektrode zügig herausgefahren. Für das dann anzuwendende Prinzip der Elektroporese wurde eine Reizelektrode 800 μm oberhalb von der Injektionsstelle positioniert. An dieser Position wurde mit 7 Pulsfolgen (mit 1 ms Pulslänge, 100 Hz Pulsrate, 800 ms Pulsfolgendauer und 40 μA) elektrisch stimuliert. Diese Stimulation wurde alle 200 μm , bis zu der Position 400 μm unterhalb der Injektionsstelle, wiederholt. Danach wurde die Stimulationselektrode zügig herausgefahren. Das Tier wurde 7 Tage nach der Injektion von Alexa 488-Dextran perfundiert.

3.6 Perfusion

Nach Abschluss aller Experimente und Tracerinjektionen wurden die Tiere mit einer Letaldosis von 10 ml/kg Körpergewicht Pentobarbital (16 mg/ml) euthanasiert. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz freigelegt. In die linke

Hauptkammer des Herzens wurde eine Kanüle eingeführt und die rechte Vorkammer mit einer Schere eröffnet. Über die Kanüle wurde zunächst eine erwärmte und mit Liquemin versetzte 0,9 %ige NaCl-Lösung zur Durchspülung des Kreislaufsystems geschickt. Anschließend wurde im Falle einer vorherigen Alexa 488-Dextran- oder BDA-Injektion, 4 %iges Formalin für 45 min mit einer Geschwindigkeit von 3,8 ml/min infundiert. Anschließend wurde das Gehirn herauspräpariert und zur Kryoprotektion in 15 %ige und danach in 25 %ige Saccharoselösung gelegt.

Wurde zuvor WGA-HRP injiziert, wurde nach der Spülung mit 0,9 %igem NaCl 45 Minuten lang 1 %iges Formalin mit 1,25 % Glutaraldehyd intracardial infundiert. Anschließend wurde jeweils 15 Minuten 5 %ige und 10 %ige Saccharoselösung perfundiert. Danach wurde das Gehirn herauspräpariert und in 22,5 %ige Saccharoselösung verbracht.

Das jeweilig auf die ein oder andere Art vorbereitete Gehirn wurde nach einem Tag in der Saccharoselösung in einer Plexiglas-Einbettform in Normposition platziert. Die Form wurde dann mit einem Gelatine-Albumin-Gemisch, welches mit Glutaraldehyd versetzt wurde, ausgegossen und somit das Gehirn in einen Block eingebettet. Nach Festwerden des Blockes wurde dieser aus der Plexiglasform genommen und für ca. 5 Minuten in -45°C kaltes Isopentan gelegt. Danach wurde der Block in ein luftdicht verschlossenes Gefäß verbracht und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

3.7 Histologie

Der tiefgefrorene Block mit dem Gehirn wurde auf einem Objektisch fixiert und im Gefriermikrotom eingespannt. Die Temperatur in der Kammer des Gefriermikrotoms wurde auf -14°C gestellt, die des Objektisches auf -16°C . Der Block wurde parallel zum Messer ausgerichtet, sodass das Gehirn gerade geschnitten wurde und die einzelnen Schnitte (Schnittdicke $40\ \mu\text{m}$) mit denen des Normatlas vergleichbar waren. Gehirne, in die WGA-HRP injiziert wurde, wurden in 4 parallele Serien unterteilt. Zwei Serien wurden sofort auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen, die anderen beiden wurden mit Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) nach Mesulam und Brushart (1979) gefärbt. Die ungefärbten Schnittserien wurden mit Kresylviolett gefärbt und die TMB-gefärbten Serien wurden mit Neutralrot gegengefärbt. Ebenfalls 4 Schnittserien wurden nach der Injektion von BDA ins Gehirn angefertigt. Auch hier wurden 2 Serien direkt auf Objektträger aufgezogen. Die anderen beiden Serien wurden mit 3'-3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid nach Adams (1977) gefärbt und mit Cyto-

chrome C nach Wong-Riley (1979) gegengefärbt. Die ersten beiden Schnittserien wurden mit Kresylviolett gefärbt. Im Anschluss an alle Färbungen wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckt.

Alle auf diese Weise gefärbten Schnitte wurden in einem Durchlichtmikroskop (Polyvar, Reichert, Wien, Österreich) angesehen und gegebenenfalls fotografiert. Alle Schnitte wurden eingescannt (Epson Perfection 4990 Photo, Seiko Epson Corporation, Japan) und archiviert.

Wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488-Dextran injiziert, wurden die Schnitte direkt auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen. Noch ehe die Schnitte vollkommen trocken waren, wurden sie mit Vectashield[®] (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt. Anschließend wurden sie unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager M1, Carl Zeiss Werk Göttingen, Deutschland) ausgewertet und fotografiert (Axio Cam MRc, Carl Zeiss Werk Göttingen, Deutschland).

3.8 Auswertung

3.8.1 Auswertung der Vokalisationen

Die VEE-Soundaufnahmen wurden in .wav-Dateien konvertiert und in das Programm BatSound Pro eingelesen. Unter Berücksichtigung der Auslöseposition im Gehirn und der Auslöseschwelle der Vokalisation wurde im Zuge der Auswertung anhand des Spektrogramms die Anzahl der im Spektrogramm sichtbaren Harmonischen (sofern vorhanden), die Harmonische mit der Hauptenergie und die Start- und Endfrequenz der ersten sichtbaren Harmonischen bestimmt. Anhand des Spektrogramms jeder Vokalisation wurden die Latenz (Zeit vom Stimulusbeginn bis zum Vokalisationsbeginn) und die Lautlänge der Vokalisation ermittelt. Anhand dieser Parameter fand die Zuordnung in die Kategorien Echoortungslaute und Kommunikationslaute statt. Innerhalb der Kommunikationslaute erfolgte eine Zuordnung zu den bei Pistohl (1998) dargestellten Lauttypen anhand der zuvor ermittelten Parameter.

3.8.2 Feststellung der Stimulations- und Injektionspositionen

In jedem Tier wurde in jeder Struktur mindestens eine elektrische Läsion gesetzt. Dazu wurde am Ende des ersten Elektrodentraktes, der in Normposition in einer Struktur gefahren wurde, ein Gleichstrom mit $-4 \mu\text{A}$ über 8 Minuten appliziert (Grass Stimulator S48, Quincy, USA). Im Zuge der Vernarbung waren durch die

Einwanderung von Gliazellen in dieses Gebiet die Positionen, an denen Läsionen gesetzt wurden, nach der Kresylviolett-färbung der Schnitte sehr gut erkennbar. Die einzelnen Schnitte mit den Positionen der Läsionen wurden mit den Schnitten im Normatlas verglichen und die genaue Lokalisation der Läsionen ermittelt. Unter Berücksichtigung der Schnittdicke (40 μm) und der individuellen Gesamtlänge des Gehirns wurden die restlichen Reizpositionen relativ dazu auf den Normatlas übertragen und auf repräsentative Schnittebenen zusammengefasst.

4. Ergebnisse

4.1 Im PAG ausgelöste Vokalisationen

4.1.1 Elektrisch ausgelöste Vokalisationen

In 11 Tieren wurde das PAG mittels elektrischer Reizung auf Vokalisation untersucht. Es konnte an 517 Positionen Vokalisation ausgelöst werden. An 348 Positionen waren Echoortungslaute und an 169 Positionen Kommunikationslaute auslösbar.

4.1.1.1 Echoortungslaute

Die elektrisch ausgelösten Echoortungslaute waren mit einer Dauer von 0,8 bis 3 ms typischerweise sehr kurz.

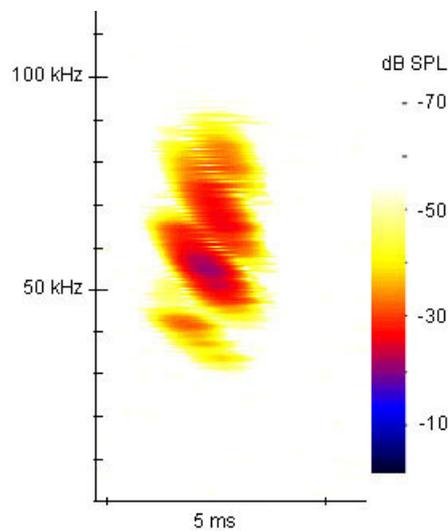


Abbildung 4.1: Spektrogramm eines im rostralen Bereich des PAGs elektrisch ausgelösten Echoortungslauts.

Im Frequenz-Zeit-Diagramm (Abb. 4.1) wiesen Echoortungslaute in der Regel 3-4 sichtbare Harmonische auf ($n = 307$). Die erste Harmonische war in ihrer Amplitude sehr schwach und damit nicht sichtbar. Die Hauptenergie lag meist auf der

dritten Harmonischen ($n = 274$). Die Startfrequenz der dritten Harmonischen lag bei $65,2 \pm 4,2$ kHz und die Endfrequenz betrug $44,8 \pm 2,6$ kHz.

Die Echoortungslaute waren von von der Rostrocaudal-Ebene $7980 \mu\text{m}$ bis zur Rostrocaudal-Ebene $11004 \mu\text{m}$, also über das ganze PAG hinweg, auslösbar (siehe Abb. 4.2).

4.1.1.2 Kommunikationslaute

Die Kommunikationslautpositionen waren anders verteilt als die Echoortungslautpositionen (Verteilung der Echoortungs- und Kommunikationslautpositionen siehe Abb. 4.2). Im rostralen Bereich von $7980 - 8484 \mu\text{m}$ des PAGs waren keinerlei Kommunikationslaute auslösbar. Auch im Bereich von $8484 - 8988 \mu\text{m}$ waren nur an wenigen Positionen Kommunikationslaute auslösbar. Diese Positionen beschränkten sich ausschließlich auf den dorsalen Bereich des PAGs. In den rostrocaudal-Ebenen $8988 - 9996 \mu\text{m}$ ($9250 \mu\text{m}$ und $9750 \mu\text{m}$ in Abb. 4.2) waren Kommunikations- und Echoortungslaute gleichermaßen auslösbar, eine Eingrenzungen auf bestimmte (ventrale oder dorsale) PAG-Bereiche war nicht erkennbar. Im Bereich von $9996 - 11004 \mu\text{m}$ ($10250 \mu\text{m}$ und $10750 \mu\text{m}$ in Abb. 4.2) waren die Positionen, an denen Kommunikationslaute auslösbar waren im ventralen Bereich des PAGs auf laterale Positionen konzentriert.

Die ausgelösten Vokalisationen waren in acht Kategorien zu gliedern: 6 Lauttypen, wie sie auch bei Pistohl (1998) beschrieben wurden und 2 Kombinationen dieser Lauttypen. Folgende Lauttypen konnten ausgelöst werden (die Namensgebung beruht auf Pistohl (1998) bzw. Pistohl & Esser (1998): Lauttyp 1, Lauttyp 4, Lauttyp 6, Lauttyp 7, Lauttyp 8, Lauttyp 13, und Mischformen aus Lauttyp 1 und Lauttyp 4, und Lauttyp 13 und Lauttyp 1.

Lauttyp 1 (Abb. 4.3), der bei Pistohl (1998) als Drohlaut bezeichnet wird, konnte mit einer Latenz von $49 - 54$ ms an 3 Positionen im PAG im Bereich von $8988 - 9996 \mu\text{m}$ ausgelöst werden. Er ist mit $11 - 16$ ms Dauer deutlich kürzer als er bei Pistohl (1998) beschrieben wird. Alle Drohlaute besaßen eine sehr geringe Auslöseschwelle von $5 - 6 \mu\text{A}$. Der Laut hat einen geräuschhaften Charakter und überstreicht einen Frequenzbereich von $6,2 - 70$ kHz. Die Startfrequenz des Lautes liegt bei $6,7 \pm 0,5$ kHz ($n = 12$).

Der Lauttyp 4 (Abb. 4.4) oder der sogenannte Laut am Streitende ist an 57 Positionen über den ganzen Bereich des PAGs auslösbar, über den Kommunikationslaute ausgelöst werden konnten (siehe Abb. 4.5). Der Lauttyp 4 konnte mit einer Latenz von $61 \pm 30,5$ ms und einer durchschnittlichen Lautlänge von $7 \pm 4,5$ ms ausgelöst werden. Alle Laute wiesen 4 - 5 Harmonische auf. Die Startfrequenz der

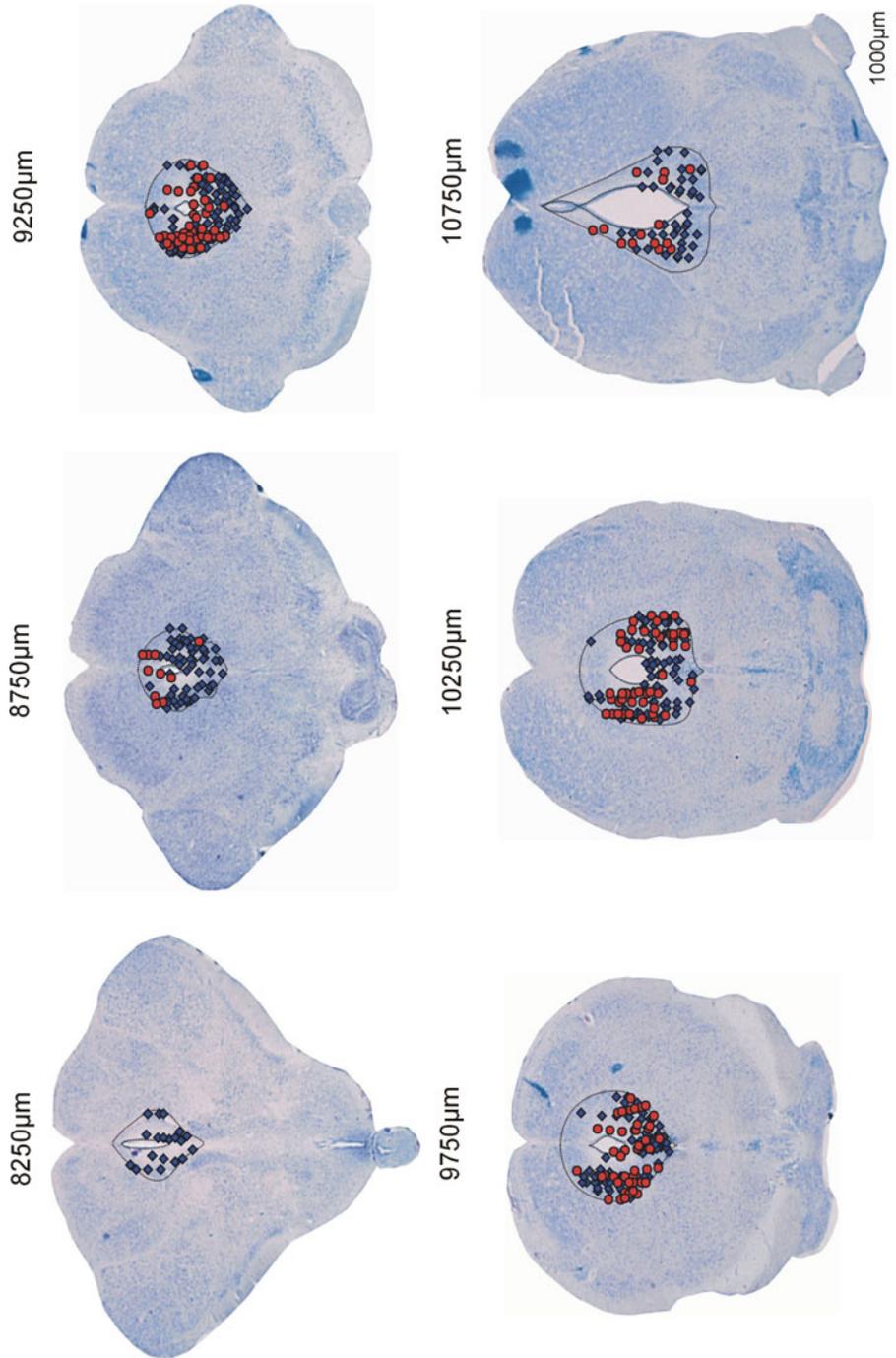


Abbildung 4.2: Verteilung der Positionen an denen elektrisch Echoortungs- und Kommunikationslaute ausgelöst werden konnten. Dargestellt ist der jeweilige Schnitt aus dem Normalatlas mit rostrocaudaler Lage in µm. Blaue Rauten - Echoortungslautpositionen, rote Kreise - Kommunikationslautpositionen.

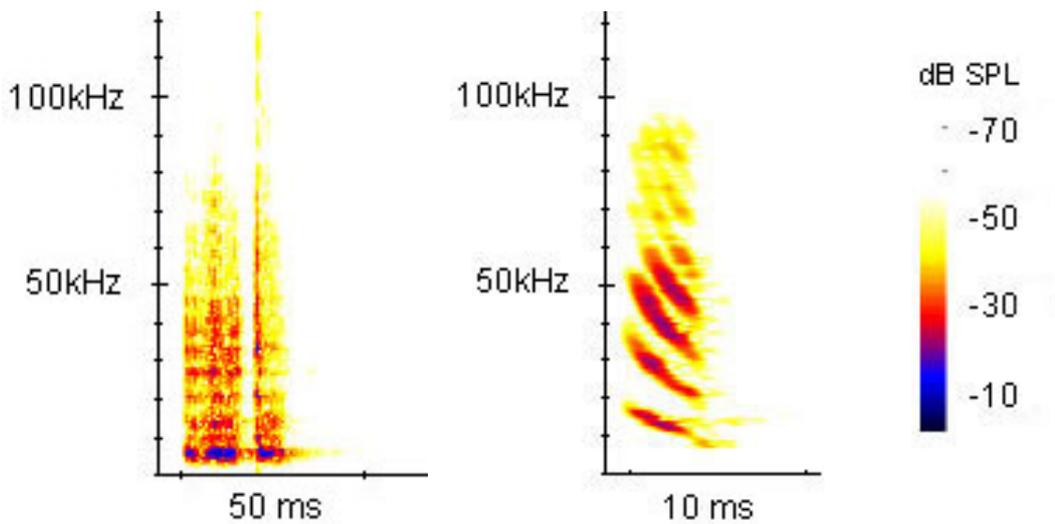


Abbildung 4.3: Spektrogramm des Lauttyps 1.

Abbildung 4.4: Spektrogramm des Lauttyps 4.

ersten Harmonischen lag bei $20 \pm 1,5$ kHz ($n = 100$). An 49 % der Positionen waren die Laute mit einer Reizschwelle von bis zu $20 \mu\text{A}$ auslösbar. Eine höhere Schwelle von $> 20 - 50 \mu\text{A}$ war an 33 % der Positionen für eine Auslösung des Lauttyps 4 notwendig und an 18 % der Positionen waren die Laute nur mit über $50 \mu\text{A}$ auslösbar.

Weiterhin konnte der kurze Zirplaut oder Lauttyp 6 (Abb. 4.6 A) an 23 PAG-Positionen ausgelöst werden. Die Startfrequenz der dritten Harmonischen lag bei $49,5 \pm 2$ kHz ($n = 100$). Ab einem Schalldruck von -50 dB SPL werden die Komponenten des Lautes im Spektrogramm dargestellt. Alle untersuchten Laute hatten 3 sichtbare Harmonische. In 34 % der Fälle war es die zweite Harmonische, die die Hauptenergie trug. In den anderen Fällen lag die Hauptenergie auf der dritten Harmonischen. Die Einteilung der ausgelösten Laute erfolgte zum einen anhand der angegebenen Parameter und zum anderen anhand der bei Pistohl (1998) angegebenen Lautlänge, die für kurze Zirplaute mit 1,5 bis 3,4 ms beschrieben wird. Der Lauttyp 6 ist erst ab der Rostrocaudal-Ebene von $8988 \mu\text{m}$ auslösbar und kann öfter in caudalen Bereichen des PAGs ($9492 - 11004 \mu\text{m}$) evoziert werden. Die Positionen an denen dieser Laut hervorgerufen werden konnte, befinden sich hauptsächlich in Bereichen von $300 - 800 \mu\text{m}$ lateral der Mittellinie ($n = 21$), selten in der Nähe des Aquädukts ca. $100 \mu\text{m}$ lateral ($n = 2$).

Lauttyp 7 (Abb. 4.6 B) oder der mittellange Zirplaut war an 19 Positionen im PAG auslösbar. Wie bei Lauttyp 6 erfolgte die Darstellung der Lautkomponenten ab einem Schalldruck von -50 dB SPL. In 58 % der Laute waren 3 Harmonische sichtbar

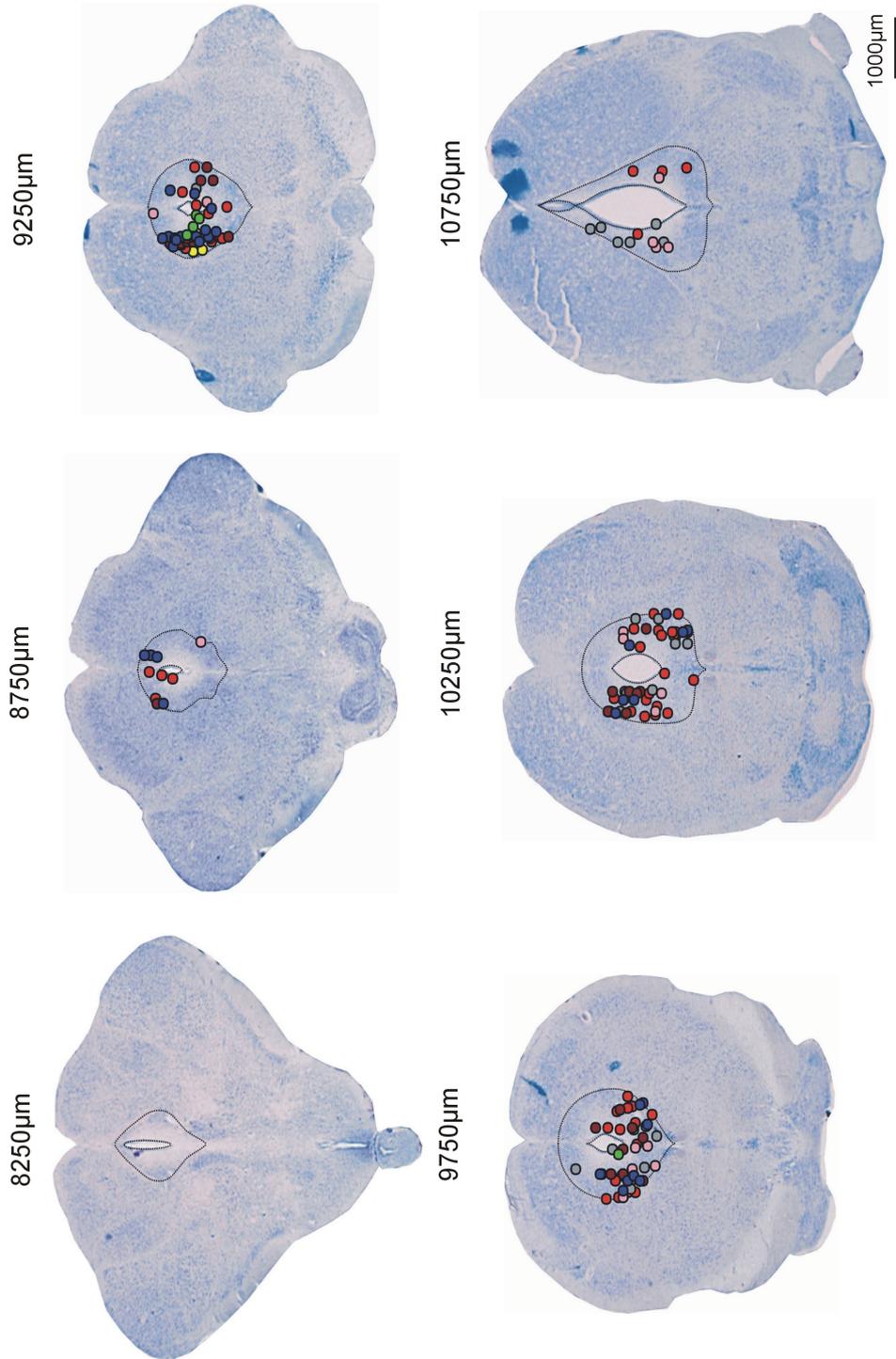


Abbildung 4.5: Verteilung der Positionen an denen elektrisch Kommunikationslaute ausgelöst werden konnten. Dargestellt ist der jeweilige Schnitt aus dem Normalatlas mit rostro-caudaler Lage in μm . Verschiedenfarbige Kreise kennzeichnen verschiedene Kommunikationslautpositionen: gelb - Lauttyp 1, rot - Lauttyp 4, grau - Lauttyp 6, rosa - Lauttyp 7, hellblau - Lauttyp 8, braun - Lauttyp 13, blau - Mischform aus Lauttyp 4 und Lauttyp 1, grün - Mischform aus Lauttyp 13 und Lauttyp 1.

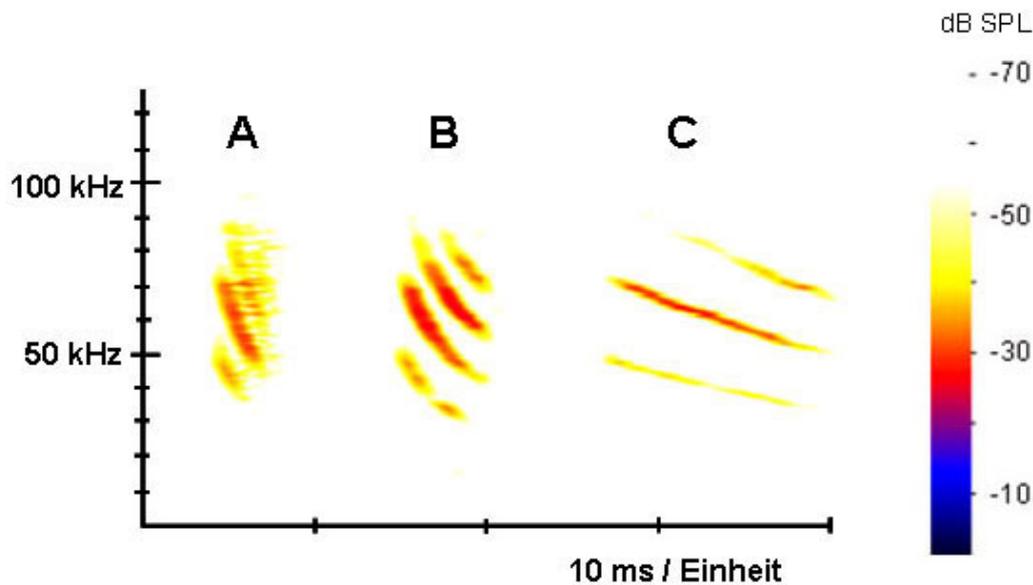


Abbildung 4.6: Spektrogramme des kurzen (A), mittellangen (B) und langen (C) Zirplauts.

und in 42 % waren es 4 Harmonische. In 75 % der Fälle trug die zweite Harmonische die Hauptenergie, in 25 % war es die dritte Harmonische. Die Startfrequenz der zweiten Harmonischen lag bei $71 \pm 5,1$ kHz ($n = 83$). Die ausgelösten Zirplaute wurden dem Lauttyp 7 zugeordnet, wenn sie die oben beschriebenen Parameter und eine Lautlänge von 3,5 bis 9,4 ms aufwiesen (Pistohl, 1998). Der Lauttyp 7 war über alle Rostrocaudal-Ebenen von 8484 - 11004 μm in 26% mit Schwellen unter 20 μA , in 47% mit mittleren Schwellen von >20 - 50 μA und in 26% mit Schwellen über 50 μA auslösbar. Es fiel auf, dass sich die meisten Positionen an denen dieser Lauttyp evoziert werden konnte, in caudalen Bereichen von 9492 - 11004 μm befanden ($n = 15$), jedoch nur 4 Positionen im Bereich von 8484 - 9492 μm lagen. Ein Zusammenhang zwischen Reizschwellen mit denen der Lauttyp 7 ausgelöst werden konnte und der räumlichen Lage der Positionen, an denen der Lauttyp 7 auslösbar war, war nicht erkennbar.

Der lange Zirplaut oder Lauttyp 8 (Abb. 4.6 C) war lediglich an 2 Positionen auf der Ebene von 9492 - 9996 μm mit wenigen aufgenommenen Lauten auslösbar. Die Startfrequenz der zweiten Harmonischen lag bei $70,1 \pm 1,2$ kHz, die Hauptenergie lag auf der zweiten Harmonischen ($n = 6$) und die Latenz dieses Lauttyps lag bei $46,2 \pm 11,6$ ms. Abbildung 4.7 zeigt die Verteilung der verschiedenen Zirplaute über das PAG.

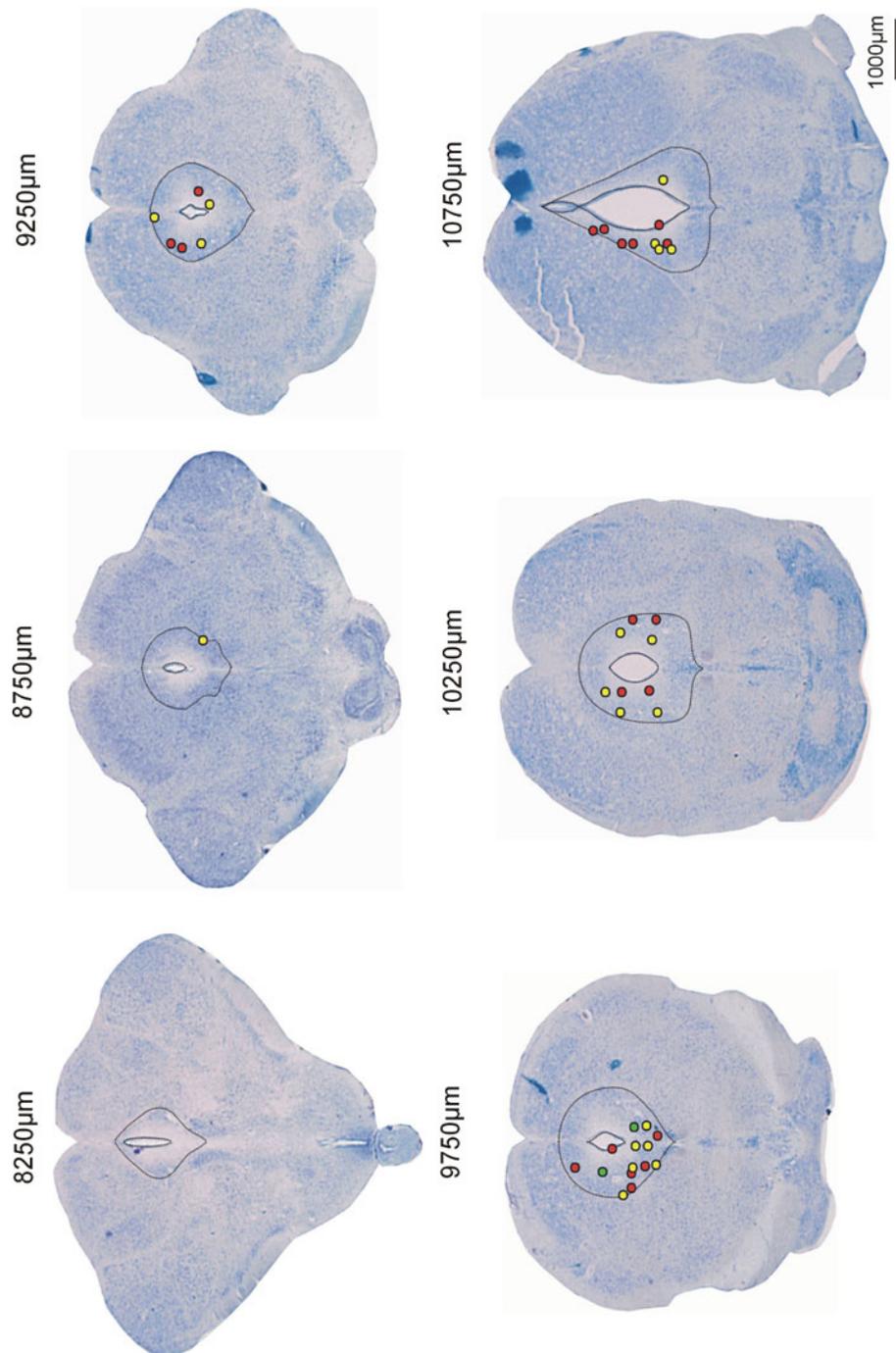


Abbildung 4.7: Verteilung der Positionen an denen elektrisch kurze (rote Kreise), mittellange (gelbe Kreise) und lange (grüne Kreise) Zirplaute ausgelöst werden konnten. Dargestellt ist der jeweilige Schnitt aus dem Normalatlas mit rostro-caudaler Lage in μm mit den Auslösepositionen.

Der Lauttyp 13 (Abb. 4.8) konnte an 25 Positionen im PAG-Bereich von 8484 - 10500 μm ausgelöst werden. Die Startfrequenz der ersten sichtbaren Harmonischen lag bei $23 \pm 2,4$ kHz ($n = 100$). Der Laut wies in wenigen Fällen 3-4 (8% der Laute) Harmonische auf, meist jedoch waren 5 und mehr Harmonische zu erkennen (92% der Laute). Die ausgelösten Laute variierten in ihrer Lautlänge. Mit einer mittleren Lautlänge von $15,7 \pm 7,5$ ms wichen sie von den Angaben bei Pistohl (1998) ab.

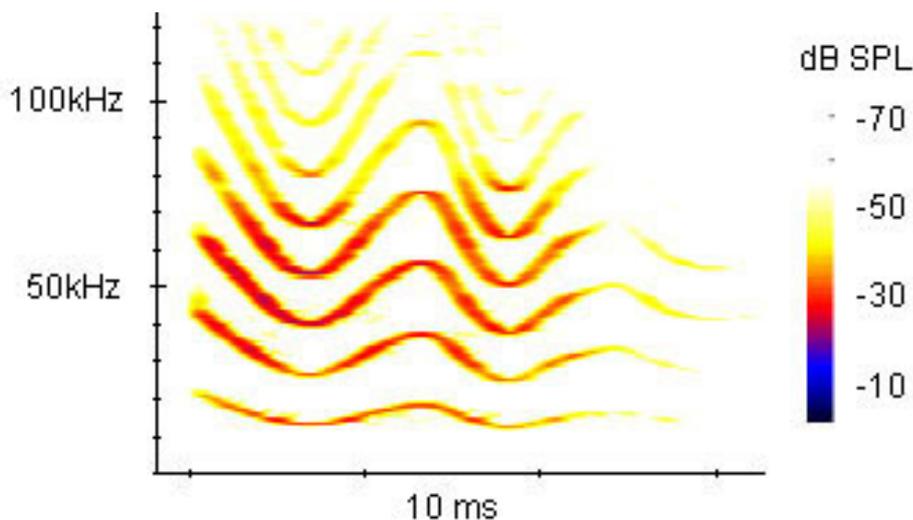


Abbildung 4.8: Spektrogramm des Lauttyps 13.

Eine Lautform, die relativ häufig elektrisch ausgelöst werden konnte, war eine Mischform des Lauttyps 4 und des Lauttyps 1 (Abb. 4.10 A). Diese Lautform trat an 35 Positionen im PAG-Bereich von 8484 - 10500 μm auf (Abb. 4.5). In 60% der Fälle lag die Reizschwelle unter 20 μA , in 34% zwischen 20 und 50 μA und in 6% über 50 μA . Eine Abhängigkeit der Reizschwelle vom Reizort bestand nicht (Abb. 4.9). Die ausgelösten Laute hatten eine durchschnittliche Lautdauer von $6,4 \pm 1,9$ ms, die Startfrequenz der ersten Harmonischen lag bei $16,5 \pm 1,9$ kHz. Die Laute dieses Lauttyps konnten mit einer Latenz von $54,1 \pm 25,5$ ms ausgelöst werden.

Die zweite ausgelöste Mischform zweier Laute bestand aus Komponenten des Lauttyps 13 und des Lauttyps 1 (Abb. 4.10 B). Sie war an 5 Positionen mit einer Latenz von $50,1 \pm 24,6$ ms ($n = 27$) auslösbar. Die Startfrequenz der ersten Harmonischen lag bei $19,2 \pm 1,7$ kHz, die durchschnittliche Lautlänge betrug $30,3 \pm 13,1$ ms. Die Mischform des Lauttyps 13 und des Lauttyps 1 war hauptsächlich auf der Rostrocaudal-Ebene von 8988 - 9492 μm im zentralen Bereich des PAGs auslösbar (siehe Abb. 4.5). Die Reizschwellen mit der die Laute auslösbar waren, lagen an 4 der 5 Positionen zwischen 20 und 50 μA und an einer Position bei 55 μA .

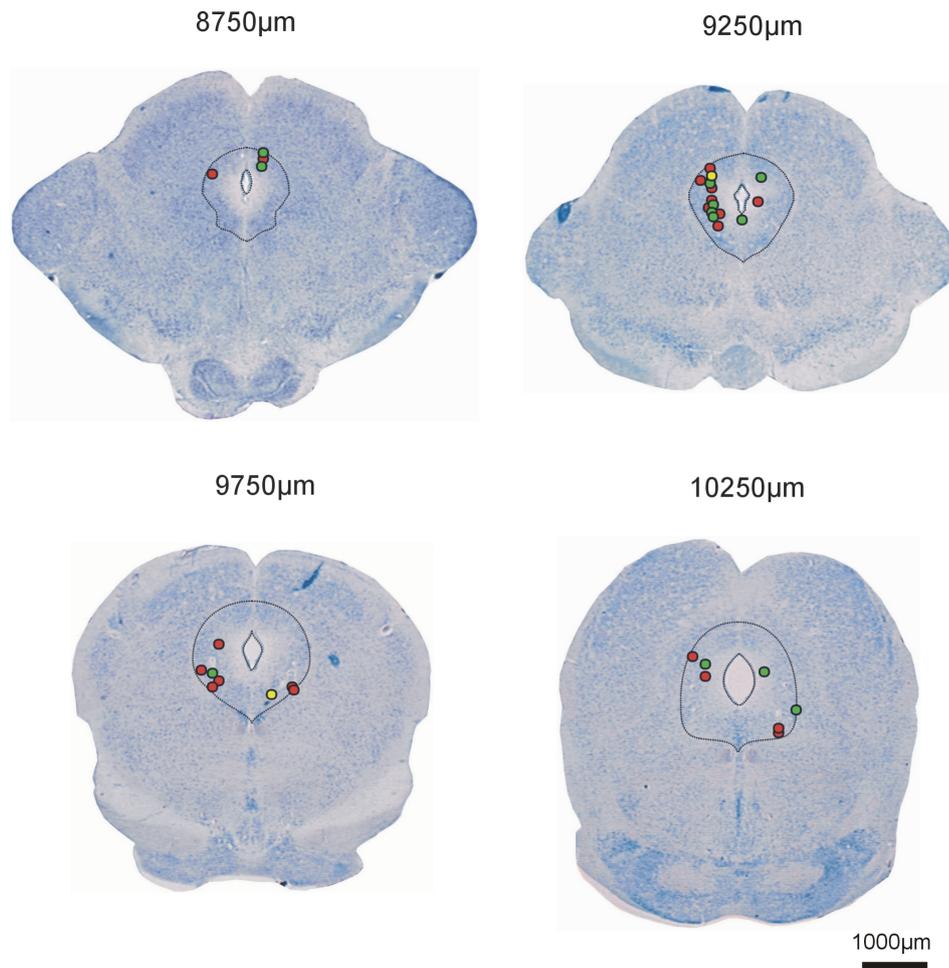


Abbildung 4.9: Verteilung der Reizschwellen der Positionen an denen die Mischform der Lauttypen 4 und 1 ausgelöst werden konnte. Farbige Kreise kennzeichnen verschiedene Reizschwellen: rot $\leq 20 \mu\text{A}$, grün $> 20 \leq 50 \mu\text{A}$, gelb $> 50 \mu\text{A}$.

4.1.1.3 Verteilung der Latenzen

Die im PAG ausgelösten Vokalisationen weisen auffallend kurze Latenzen auf (Abb. 4.12). In rostralen Bereichen von 7980 - 8988 μm findet man nahezu ausschließlich Latenzen unter 40 ms, im Bereich von 8988 - 11004 μm finden sich auch Latenzen von > 40 bis ≤ 60 ms und über 60 ms. Die prozentuale Aufteilung der Latenzen sieht wie folgt aus: rund 83 % der Echoortungslaute und 71 % der Kommunikationslaute haben eine Latenz von ≤ 40 ms. Latenzen zwischen > 40 und ≤ 60 ms haben rund 15 % der Echoortungslaute und rund 9 % der Kommunikationslaute. Eine Latenz von > 60 ms weisen lediglich 1 % der Echoortungslaute und rund 20 % der Kommunikationslaute auf.

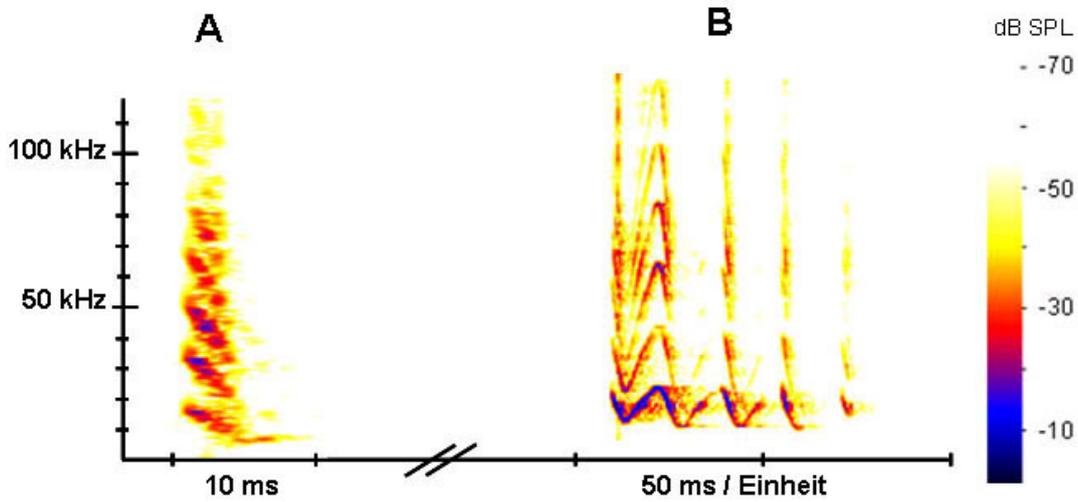


Abbildung 4.10: Spektrogramme der beiden Mischformen des Lauttyps 1 A) mit Lauttyp 4 und B) mit Lauttyp 13.

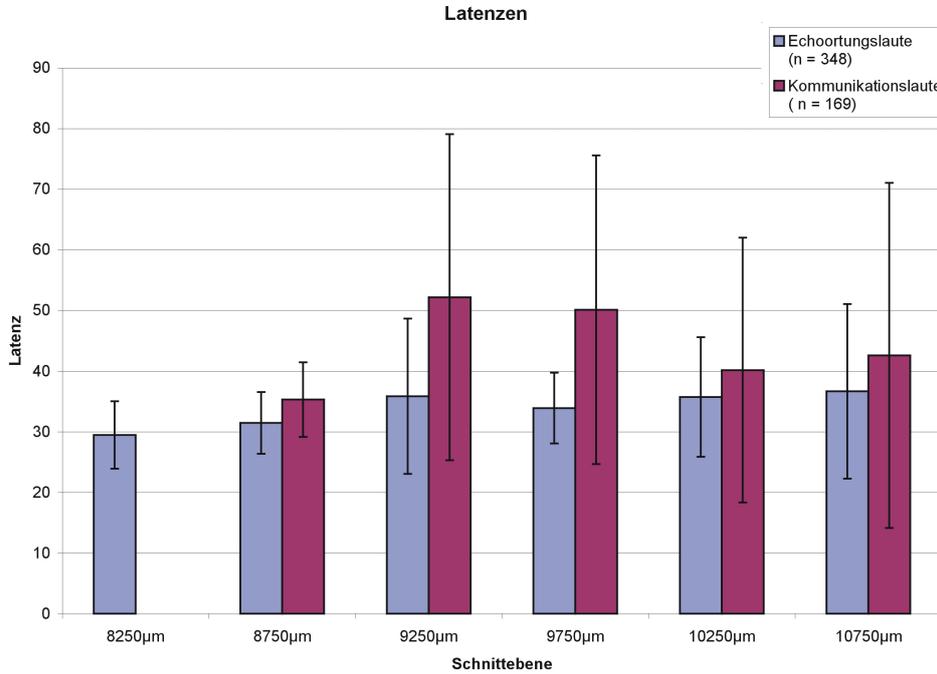


Abbildung 4.11: Verteilung der Latenzen (mit Standardabweichung) der elektrisch ausgelösten Echoortungs- und Kommunikationslaute über die verschiedenen Ebenen des PAGs.

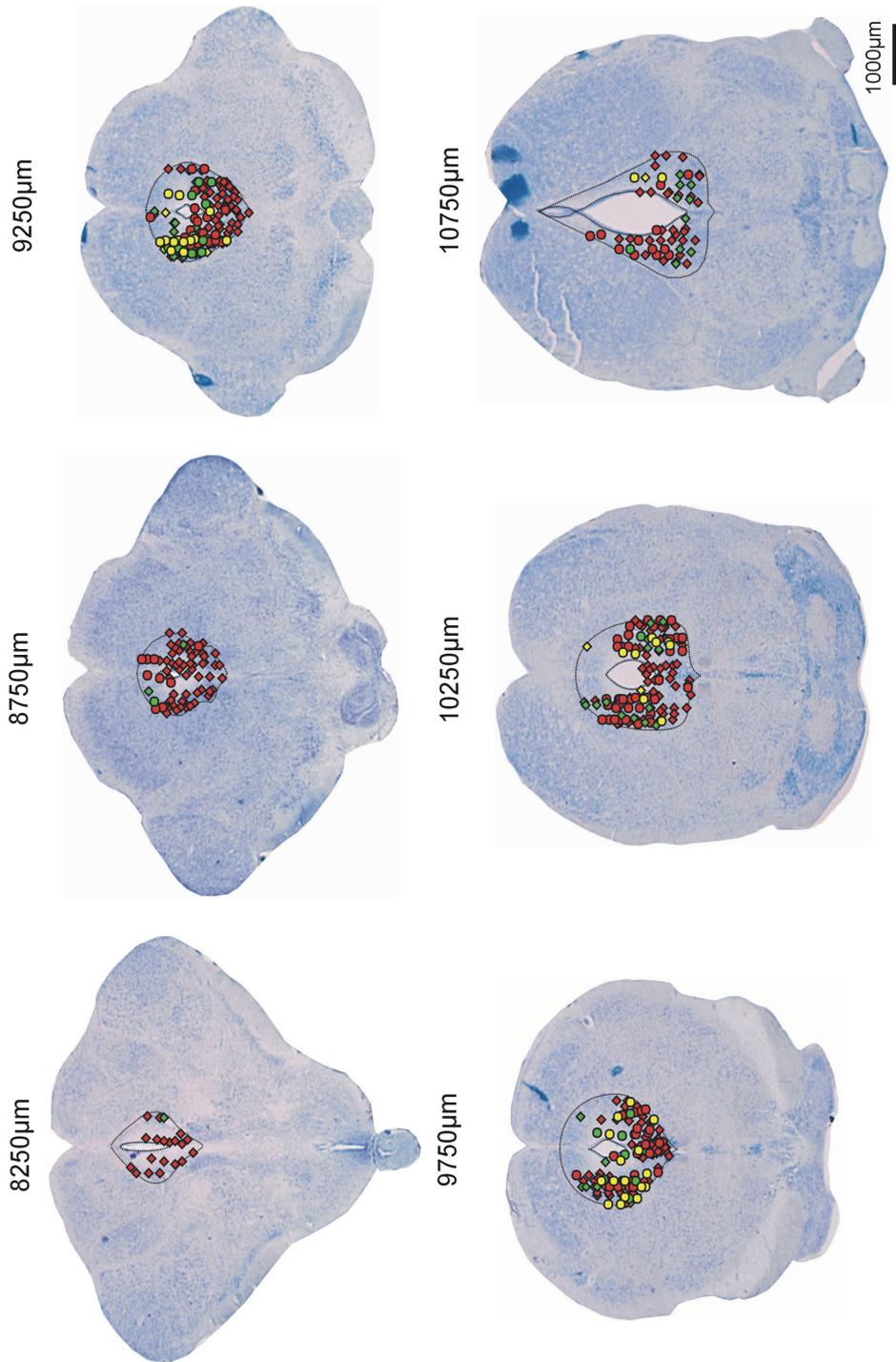


Abbildung 4.12: Verteilung der Positionen an denen Vokalisationen mit verschiedenen Latenzen im PAG ausgelöst werden konnten. Dargestellt ist der jeweilige Schnitt aus dem Nortex mit rostro-caudaler Lage in μm mit den Auslösepositionen. Die Farben und Formen markieren den jeweiligen Lauttyp (Rauten - Echoortungslautpositionen, Kreise - Kommunikationslautpositionen), Kreise - Kommunikationslautpositionen) und Latenzbereich (rot $\leq 40\text{ ms}$, grün $> 40 \leq 60\text{ ms}$, gelb $> 60\text{ ms}$).

Das Diagramm in Abbildung 4.11 zeigt die Verteilung der Latenzen über die Rostrocaudal-Ebenen des PAGs. Im rostralen Bereich sind die Echoortungslaute mit geringen Latenzen auslösbar. Die Echoortungslaute zeigen insgesamt eine geringere Streuung der Latenzen als die Kommunikationslaute. Im rostralen Bereich lassen sich auch die Kommunikationslaute mit geringen Latenzen auslösen und weisen eine geringere Streuung auf. Weiter caudal werden die Latenzen bei den Kommunikationslauten größer und auch die Streuung nimmt zu.

4.1.2 Verteilung der Schwellen

Die im PAG ausgelösten Echoortungslaute konnten in 49 % der Fälle mit Schwellen zwischen > 20 und $\leq 50 \mu\text{A}$, in 23 % mit Schwellen von $\leq 20 \mu\text{A}$ und in 28 % mit $> 50 \mu\text{A}$ ausgelöst werden.

Im Vergleich dazu, ist die Verteilung der Schwellen der Kommunikationslaute wie folgt: rund 48 % der Laute sind mit einer Schwelle von $\leq 20 \mu\text{A}$ auslösbar, 40 % mit Schwellen zwischen > 20 und $\leq 50 \mu\text{A}$ und 14 % mit $> 50 \mu\text{A}$ (Abb. 4.13).

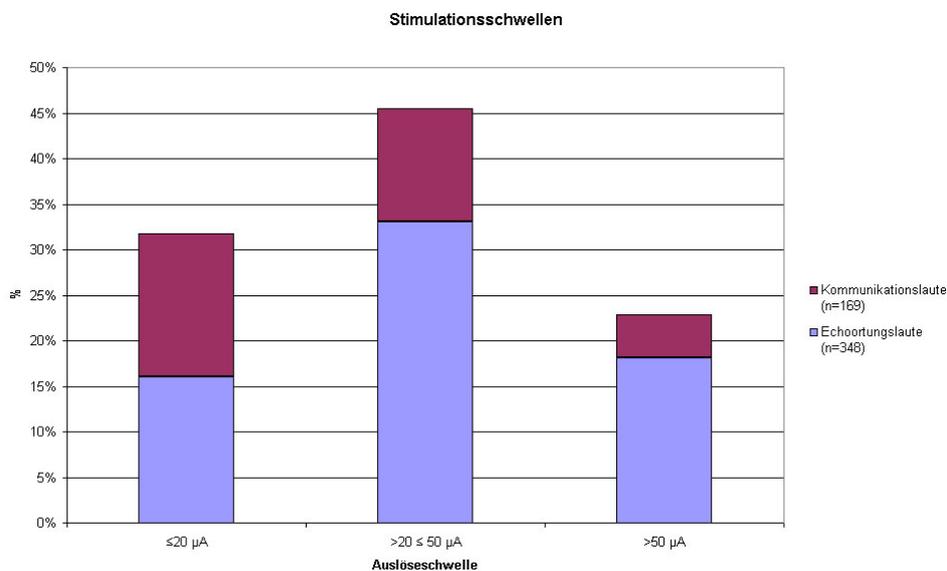


Abbildung 4.13: Prozentuale Verteilung der Laute, die sich mit $\leq 20 \mu\text{A}$, $> 20 \leq 50 \mu\text{A}$ und $> 50 \mu\text{A}$ auslösen lassen.

Mit geringen Schwellen von $\leq 20 \mu\text{A}$ konnten Vokalisationen an Positionen in der Ausdehnung der rostrocaudalen Ebenen von 8988 - 10500 μm hauptsächlich in lateralen Bereichen des PAGs ausgelöst werden (Abb. 4.14). Höhere Schwellen

von $> 50 \mu\text{A}$ finden sich in zentralen Bereichen des PAGs auf den rostrocaudal-Ebenen von 8988 - 9492 μm . Sonst sind die Schwellen, mit denen Echoortungs- und Kommunikationslaute im PAG ausgelöst werden konnten, räumlich gleichmäßig verteilt.

Tabelle 4.1 stellt alle bisher erläuterten Daten in einer Übersicht dar.

4.1.3 Verteilung der Kommunikationslaute unter Berücksichtigung des Verhaltenskontextes

Von allen ausgelösten Kommunikationslauten im PAG waren 59 % zu der Gruppe der Laute mit agonistischem Verhaltenskontext, 26 % zu der Gruppe der nicht-aggressiven und 15 % zu der Gruppe ohne Verhaltenskontext zuzuordnen ($n = 169$).

Im rostralen (Kommunikationslaut-) Bereich von 8484 - 8988 μm sind hauptsächlich Laute auslösbar, die spontan im aggressiven Verhaltenszusammenhang geäußert werden. Weiter caudal verlagert sich die Auslösbarkeit von Kommunikationslauten, die im agonistischen Verhaltenskontext stehen eher in die lateralen Bereiche des PAGs. Im ventro-zentralen Gebiet des PAGs sind von 9492 - 9996 μm hauptsächlich Laute im nicht-aggressiven Verhaltenskontext auslösbar, nur vereinzelt konnten auch Laute mit agonistischem und ohne Verhaltenskontext ausgelöst werden. In anderen rostrocaudal-Ebenen von 9996 - 10250 μm sind im zentralen Bereich des ventralen PAGs bis auf 2 Laute im agonistischen Verhaltenszusammenhang, keine Kommunikationslaute auslösbar. Im caudalen Bereich von 9996 - 10500 μm waren hauptsächlich Laute im nicht-aggressiven Verhaltenskontext auszulösen. Vereinzelt konnten auch Laute im aggressiven Verhaltenszusammenhang evoziert werden, Laute die spontan ohne zuordenbaren Verhaltenskontext geäußert werden, kamen in diesem Bereich nicht zur Auslösung.

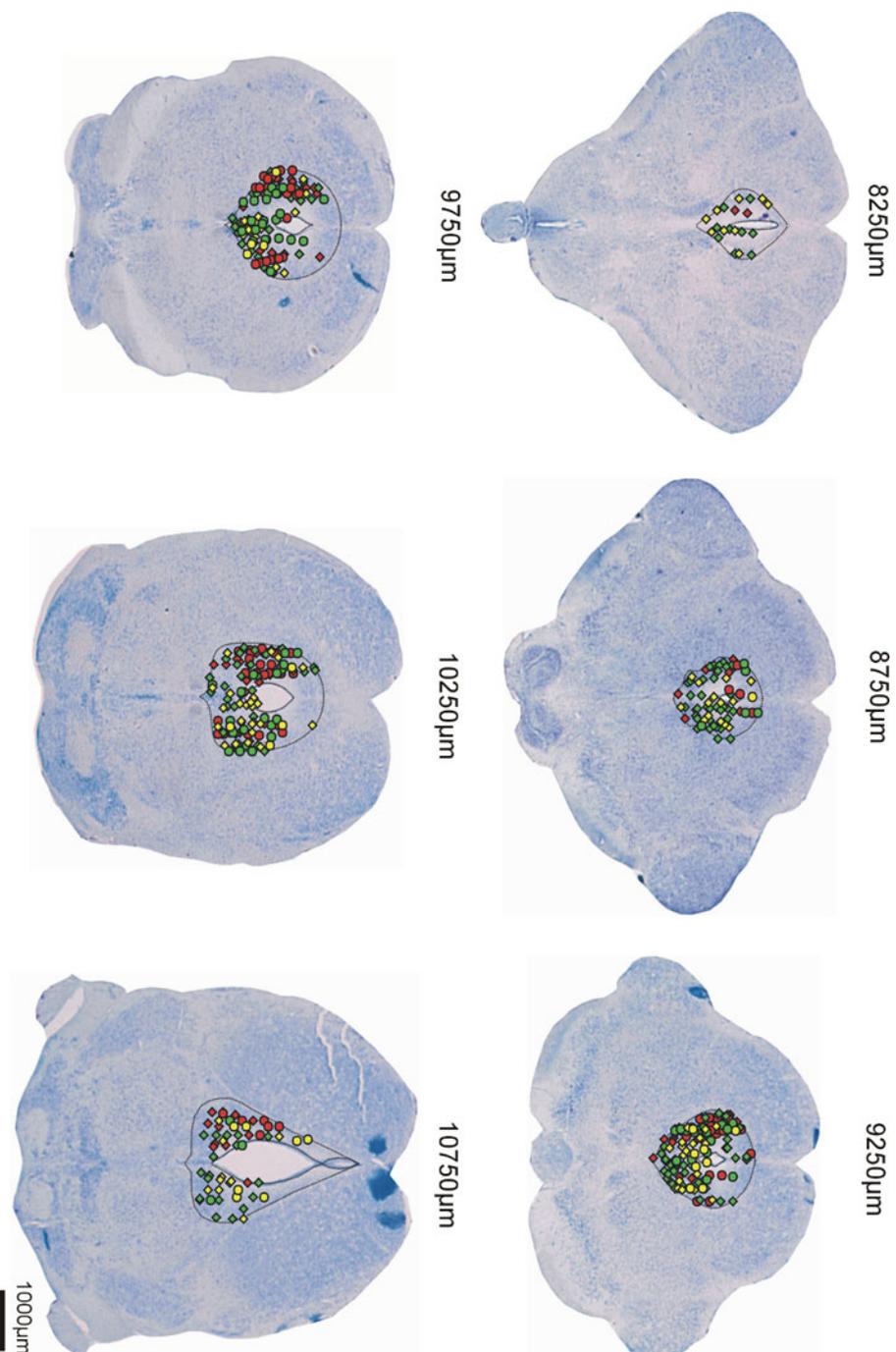


Abbildung 4.14: Verteilung der Schwellen, mit denen die verschiedenen Vokalisationen im PAG ausgelöst werden konnten. Dargestellt ist der jeweilige Schnitt aus dem Normalatlas mit rostro-caudaler Lage in µm mit den Auslösepositionen. Die Farben und Formen markieren den jeweiligen Lauttyp (Rauten - Echoortungslautpositionen, Kreise - Kommunikationslautpositionen) und die Auslöseschwellen (rot $\leq 20 \mu\text{A}$, grün $> 20 \leq 50 \mu\text{A}$, gelb $> 50 \mu\text{A}$).

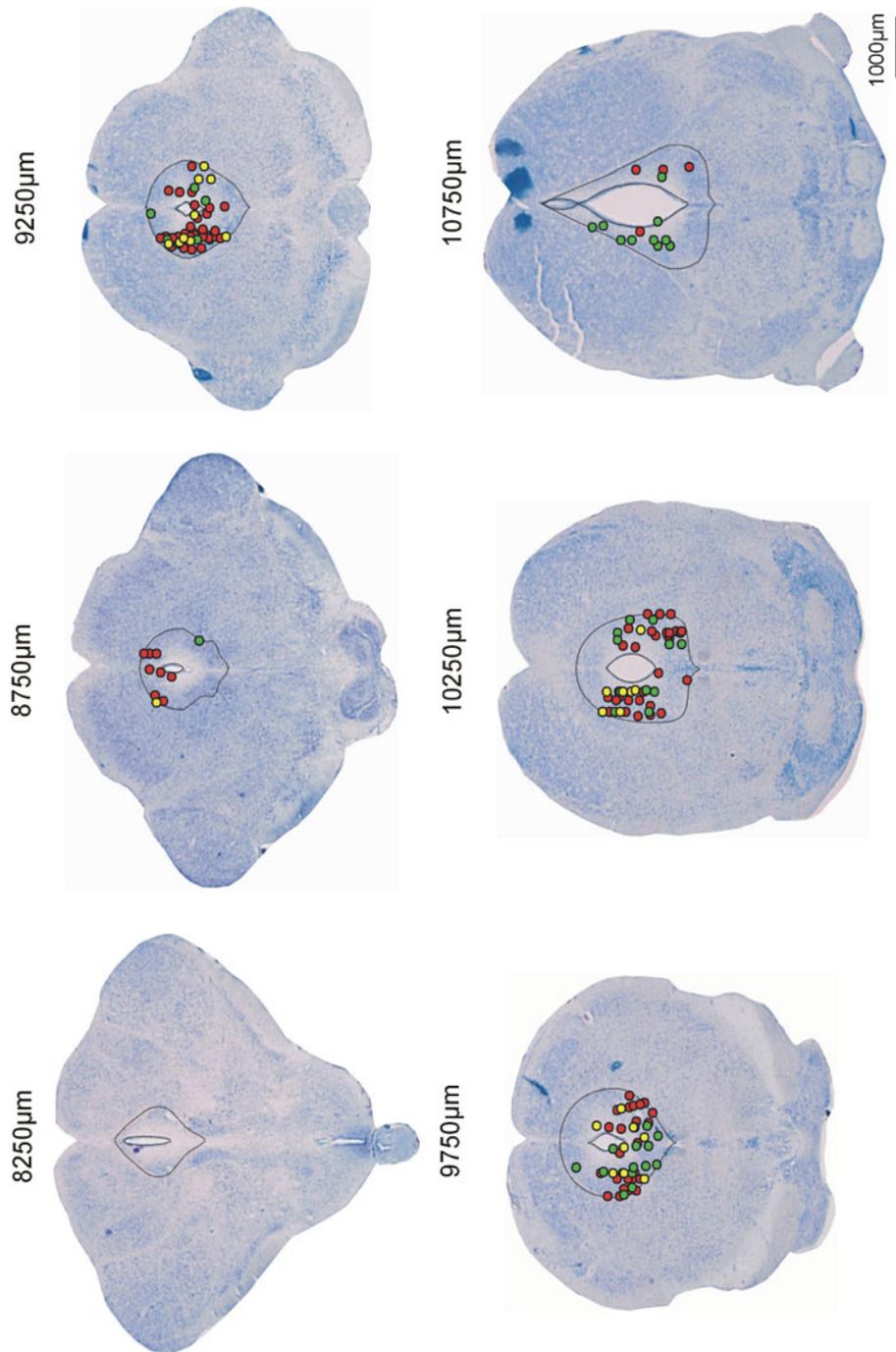


Abbildung 4.15: Verteilung der Kommunikationslautpositionen im Zusammenhang mit dem Verhaltenskontext. Dargestellt ist der jeweilige Schnitt aus dem Normalatlas mit rostro-caudaler Lage in μm mit den Auslösepositionen. Die farbigen Kreise markieren den jeweiligen Kommunikationslauttyp: rot - Laute mit agonistischem Verhaltenskontext, grün - Laute mit nicht-aggresivem Verhaltenszusammenhang, gelb - Laute ohne Verhaltenskontext.

Tabelle 4.1: Übersicht über die ermittelten Parameter elektrisch im PAG ausgelöster Vokalisationen.

Lauttyp	Anzahl Positionen	Latenz (ms)			Schwelle (μm)			Dauer (ms)	Anzahl sichtbare Harmonische	Startfrequenz d. 1. sichtbaren Harmonischen	stärkste Harmonische
		≤ 40	$> 40 \leq 60$	≥ 60	≤ 20	$> 20 \leq 50$	≥ 50				
E	348	84%	14%	6%	24%	49%	27%	0,8 - 3	3 - 4	$42,7 \pm 2,4$	3
LT1	3	0%	100%	0%	100%	0%	0%	11 - 16	/	/	/
LT4	57	58%	7%	35%	49%	33%	18%	$7 \pm 4,5$	4 - 5	$20 \pm 1,5$	3
LT6	23	83%	13%	4%	35%	48%	17%	1,5 - 3,4	3	$49,5 \pm 2$	2 (34%), 3 (66%)
LT7	19	95%	5%	0%	26%	47%	26%	3,5 - 9,4	3 - 4	$51 \pm 1,7$	2 (75%), 3 (25%)
LT8	2	50%	50%	0%	50%	50%	0%	$14,1 \pm 1,9$	3 - 5	$50 \pm 0,4$	2
LT13	25	56%	24%	20%	56%	36%	8%	$15,7 \pm 7,5$	3 - 5	$23 \pm 2,4$	2
LT1 + LT4	35	51%	9%	40%	60%	34%	6%	$6,4 \pm 1,9$	4 - 8	$16,5 \pm 1,8$	1
LT13 + LT1	5	80%	20%	0%	0%	0%	100%	$30,3 \pm 13,1$	5 - 6	$19,2 \pm 1,7$	2

4.1.4 Applikation von Neuropharmaka ins PAG

4.1.4.1 Pharmakologische Auslösung von Vokalisation

Mittels pharmakologischer Reizung im PAG sind sowohl Kommunikationslaute als auch Echoortungslaute auslösbar. Die pharmakologische Auslösbarkeit von Vokalisation wurde an 44 Positionen bei 5 Tieren überprüft. Dazu wurden an 41 Positionen 10 - 50 nl des Glutamat-Agonisten Homocysteinsäure (20 mM) per Druck injiziert. An 27 der 41 Positionen waren sowohl Echoortungslaute (an 6 Positionen) als auch Kommunikationslaute (an 21 Positionen) auslösbar. An 14 Positionen konnten lediglich Nasen-, Ohr- und/oder Körperbewegungen ausgelöst werden. An 3 der insgesamt 44 pharmakologisch getesteten Positionen wurde Kainsäure injiziert. Lediglich an einer dieser 3 Positionen konnte neben Nasen-, Ohr- und/oder Körperbewegungen eine vokale Reaktion (ein Kommunikationslaut) hervorgerufen werden. Die vokale Reaktion (sofern an der getesteten Position evozierbar) trat bei der Applikation von HCA innerhalb der ersten 2 s ein und hielt je nach injizierter Menge an HCA bis zu 30 s an. Bei Kainsäure ist das Auftreten von Vokalisation nach der Injektion verzögert. Es dauert bis zu 30 s, bis das Tier nach der Injektion beginnt, zu vokalisieren und erst nach Minuten erstummt das Tier wieder vollends.

Abbildung 4.16 zeigt die Verteilung der Positionen, an denen pharmakologisch stimuliert wurde. Nicht alle Positionen befanden sich innerhalb des PAGs. Besonders im rostralen Bereich lagen die Positionen, die Vokalisation lieferten bis auf eine Ausnahme außerhalb des PAGs. Weiter caudal lassen sich pharmakologisch hauptsächlich Kommunikationslaute im PAG evozieren. Diese Kommunikationslautpositionen lagen sowohl in zentralen (auf der Rostrocaudal-Ebene von 8988 - 9492 μm) als auch in lateralen Gebieten des PAGs (auf der Rostrocaudal-Ebene von 9492 - 9996 μm).

4.1.4.2 Pharmakologische Ausschaltung des PAGs

Bei 2 Tieren wurde an 9 Elektrodentrakten versucht, die Auslösbarkeit von Vokalisation zu blockieren. Dazu wurde in jedem Trakt an 2 - 9 Punkten, die 200 μm voneinander entfernt untereinander lagen, elektrisch gereizt. Dann wurden an einer oder mehreren dieser Reizpunkte 200 - 400 nl des Glutamat-Antagonisten Kynurensäure (75mM) bzw. 150 nl des GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muscimol (3,5 mM) injiziert. Anschließend wurde wieder an allen zuvor getesteten Positionen elektrisch stimuliert. An allen getesteten Positionen war nach der Kynurensäure- bzw. Muscimolinjektion elektrisch keine Vokalisation auslösbar, selbst wenn der Reizort und der Injektionsort bis zu 800 μm voneinander entfernt lagen.

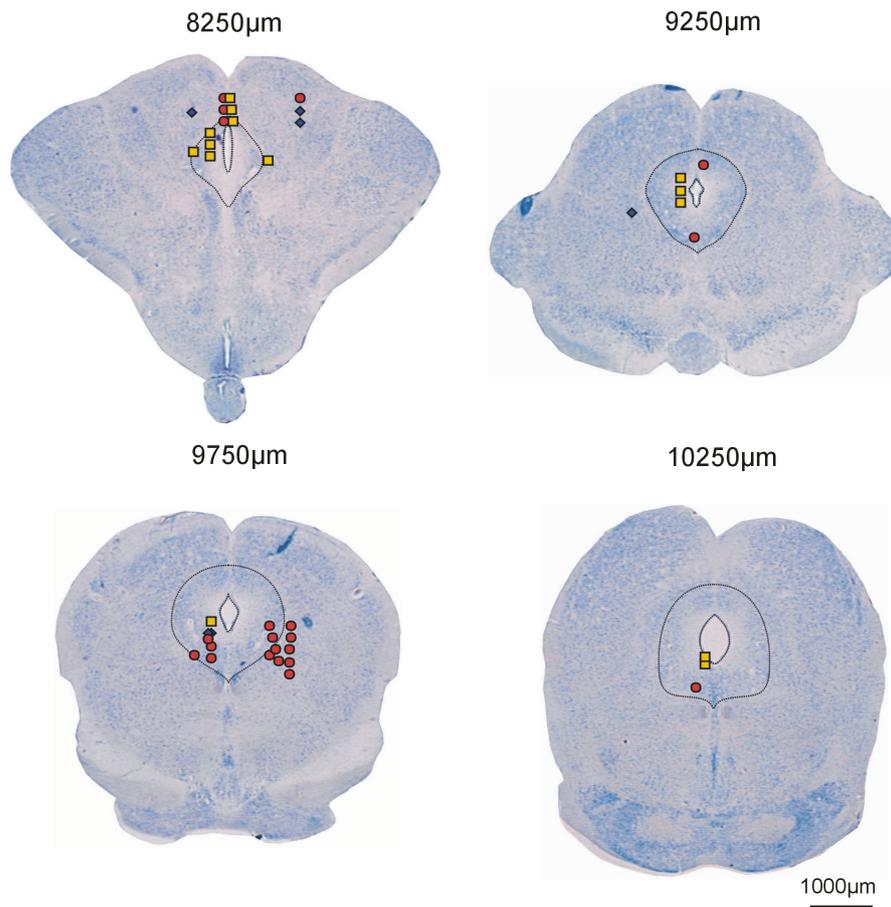


Abbildung 4.16: Verteilung der Positionen an denen mit Homocysteinsäure stimuliert und ggf Vokalisation ausgelöst wurde: blaue Rauten - Echoortungslautpositionen, rote Kreise - Kommunikationslautpositionen, gelbe Quadrate - Positionen ohne Vokalisation.

Abbildung 4.17 zeigt die Stimulationsorte an denen nach Injektion von 200-400 nl Kynurensäure (75 mM) bzw. 150 nl Muscimol (3,5 mM) keine Vokalisation mehr auslösbar war. Wurde an mehr als einer Position Kynurensäure injiziert, so überschritt die Summe der Einzelinjektion nie das Volumen von 400 nl. Muscimol wurde immer nur an einer Position injiziert. Der Effekt, der mit Kynurensäure erzielt wurde, konnte ebenso gut mit Muscimol erzielt werden. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Neuropharmaka war die Wirkdauer. Muscimol blockierte die Vokalisation um ein Drittel bis um die Hälfte länger als Kynurensäure.

Die Ausschaltung mit Kynurensäure oder Muscimol war reversibel, d.h nach 22 Stunden ließen sich die vor der Ausschaltung evozierten Vokalisationen mit der gleichen Schwelle elektrisch auslösen und auch die Spontanvokalisation des Tieres war wieder vorhanden.

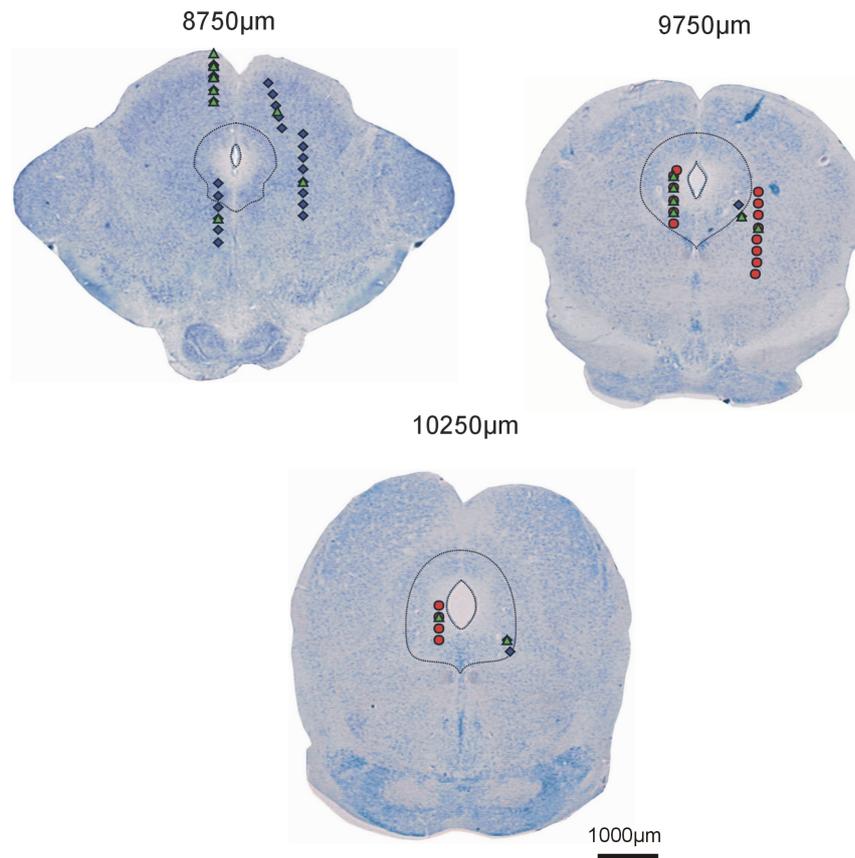


Abbildung 4.17: Darstellung der Elektrodenstränge, die nach elektrischer Auslösung auf pharmakologische Ausschaltung überprüft wurden. An allen dargestellten Echoortungslaut- (blaue Rauten) und Kommunikationslautpositionen (rote Kreise) war nach Injektion von Kynurensäure bzw. Muscimol (Injektionsorte - grüne Dreiecke) keine Vokalisation mehr auslösbar.

Neben der Blockade der elektrischen Auslösbarkeit von Vokalisation war zu beobachten, dass auch jegliche Spontanvokalisation des Tieres ausblieb. Auch auf äußere Reize wie Anpusten oder Berührung reagierte das Tier zwar mit der üblichen Schreck- bzw. Abwehrreaktion, nicht jedoch vokal.

4.2 Auslösbarkeit von Vokalisation im NBIC

4.2.1 Elektrische Auslösung von Vokalisationen

Sowohl im Gebiet des NBICs als auch im Umfeld lassen sich Echoortungslaute (in 45 % der Fälle) und die den Echoortungslauten strukturell sehr ähnlichen kurzen

Zirplaute (in 54 % der Fälle) elektrisch auslösen. Alle ausgelösten Laute sind in ihrer Dauer mit 0,6 - 3 ms recht kurz und haben 3 bis 4 im Spektrogramm sichtbare Harmonische, wobei die 3. Harmonische immer die Hauptenergie trägt. Die Laute lassen sich mit geringen Schwellen von unter 15 μ A (in 78 % der Fälle) auslösen. Die Latenzen vom Stimulusbeginn bis zum Vokalisationsbeginn sind mit 26 - 47 ms ähnlich kurz wie bei den im PAG ausgelösten Vokalisationen.

Abbildung 4.18 gibt einen Überblick über die elektrisch ausgelösten Echoortungs- und Kommunikationslaute im NBIC und in der Nähe dieses Gebiets.

Da die kurzen Zirplaute mit $2,6 \pm 0,3$ ms Länge (Pistohl, 1998; Pistohl & Esser, 1998) schwer von den Echoortungslauten zu unterscheiden sind, wurde eine Lautanalyse durchgeführt. Dafür wurden 100 Echoortungslaute und 100 mittellange Zirplaute (da diese eindeutig als Zirplaute zu kategorisieren waren) betrachtet. Die Start- und Endfrequenzen der einzelnen Harmonischen wurden mittels eines zweiseitigen T-Tests ausgewertet (2 unverbundene Stichproben). Diese Analyse ergab, dass die Endfrequenz der zweiten Harmonischen innerhalb von Echoortungs- und kurzen Zirplauten signifikant unterschiedlich sind. Somit sind die kurzen Zirplaute anhand der Endfrequenz der zweiten Harmonischen eindeutig als Zirplaut einordenbar.

Die hier im NBIC ausgelösten Vokalisationen dienten lediglich zum Auffinden des NBICs und zur Identifikation späterer Injektionsstellen. Es wurden 74 Auslöseorte erfasst und betrachtet. Davon lagen 21 Positionen im NBIC bzw. im unmittelbaren Randbereich desselben. Die grundlegenden Eigenschaften dieser dort ausgelösten Vokalisationen spiegeln aber die Ergebnisse der Diplomarbeit "Vokalisationsauslösung durch Mikrostimulation im Bereich des NBIC bei der Fledermaus *Phyllostomus discolor*" von Christoph Romanowski wider.

4.2.2 Pharmakologische Auslösung von Vokalisation

An 60 Positionen wurden 10 - 50 nl Homocysteinsäure (20 mM) und an 31 Positionen 5 - 15 nl Kainsäure (0,65 mM) injiziert, um pharmakologisch Vokalisation zu evozieren. Dabei wurde an 24 Positionen an unterschiedlichen Versuchstagen sowohl mit Homocysteinsäure als auch mit Kainsäure der Test auf Vokalisation durchgeführt. Mit beiden Neuropharmaka konnten an den meisten Positionen körperliche Reaktionen wie Nasen- oder Ohrbewegungen hervorgerufen werden, eine vokale Reaktion war jedoch weder mit Homocysteinsäure noch mit Kainsäure zu erzielen. Alle pharmakologisch untersuchten Gebiete zeigt die Abbildung 4.19.

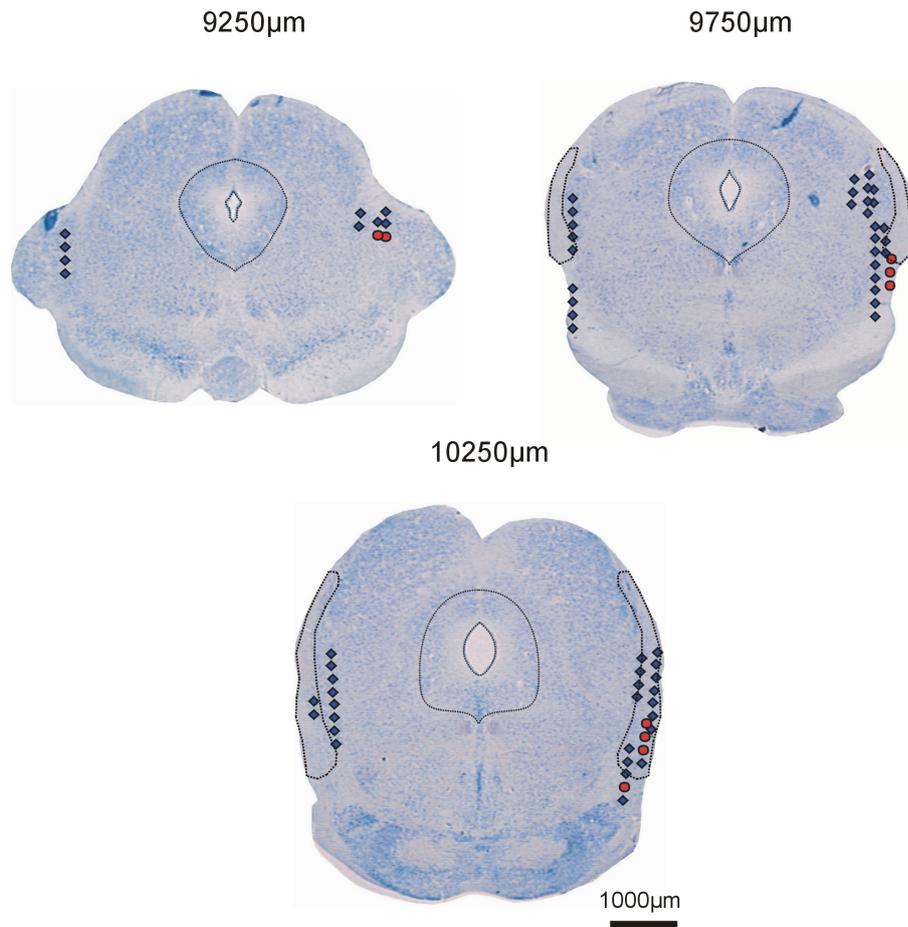


Abbildung 4.18: Auslösepositionen von im NBIC (umrandete Struktur rechts und links) und Umgebung elektrisch evozierten Echoortungs- (blaue Rauten) und Kommunikationslauten (rote Kreise).

Besonders auf der Rostrocaudal-Ebene 10250 µm, die 504 µm (von 9996 - 10500 µm) umfasst, konnten mehrere Positionen direkt im NBIC und im unmittelbaren Umfeld pharmakologisch stimuliert werden. Trotz Untersuchungen mit beiden Neuropharmaka konnte keine Vokalisation evoziert werden. Die getesteten Positionen der Ebene 9250 µm (8988 - 9492µm) trafen nicht den NBIC. Auf der Ebene 10750 µm (9996 - 10500 µm) befanden sich nur 2 Injektionsstellen an denen Kain-säure appliziert wurde innerhalb des NBICs, auch hier war keine Vokalisation evozierbar. Auffällig war im Zusammenhang sowohl mit der elektrischen als auch der pharmakologischen Stimulation ein Herunterklappen des Ohrs, kontralateral zum Reizort. Bei der elektrischen Stimulation erfolgte dieses Abknicken in der Frequenz des Stimulus, bei der pharmakologischen Stimulation knickte das Ohr für wenige Minuten dauerhaft herunter.



Abbildung 4.19: Darstellung der Homocysteinsäureinjektionspunkte (orangefarbene Quadrate) und Kainsäureinjektionspunkte (blaue Kreuze). Die Struktur des NBIC ist das im lateralen Bereich umrandete Gebiet. An keinem der eingezeichneten Injektionsorte war mittels pharmakologischer Stimulation Vokalisation auslösbar.

4.3 Ausschaltung des NBICs

4.3.1 Auswirkung der Ausschaltung des NBICs auf im selben NBIC ausgelöste Vokalisationen

In 2 Tieren wurde an 2 Positionen getestet, ob zuvor elektrisch ausgelöste Vokalisation durch eine Injektion eines Glutamat-Antagonisten (Kynurensäure) bzw. eines GABA-Agonisten (Muscimol) blockiert werden konnte. Dazu wurde zunächst elektrisch gereizt und dann das Stimulationsgebiet mit 200 nl Kynurensäure (75 mM) bzw. 250 nl Muscimol (3,5 mM) ausgeschaltet und dann erneut an dieser Position stimuliert.

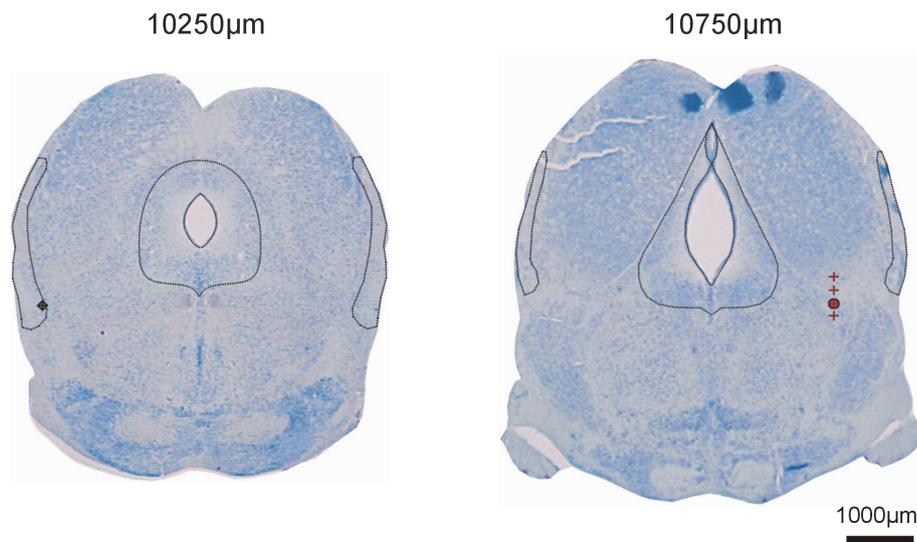


Abbildung 4.20: Darstellung der Auslösepunkte (Raute - Echoortungslautposition, Kreis - Kommunikationslautposition) und Injektionsstellen (Kreuze) von Kynurensäure (links) bzw. Muscimol (rechts). Beide ausgelösten Laute waren blockierbar. Die mit Muscimol getestete Position lag nicht im NBIC.

An den getesteten Positionen konnte zuvor ein Echoortungslaut mit $20 \mu\text{A}$ (Abb. 4.20, links) und ein Laut des Lauttyps 6 mit $15 \mu\text{A}$ (Abb. 4.20, rechts) ausgelöst werden. An der Position des Echoortungslautes wurden 200 nl Kynurensäure (75 mM) und an der des Lauttyp-6-Lauts 250 nl Muscimol (3,5 mM) injiziert. Bereits 5 Minuten nach der Injektion konnte keiner der Laute mit seiner Schwelle von 15 bzw. $20 \mu\text{A}$ ausgelöst werden. Der überprüfte Echoortungslaut lag im ventralen Teil des NBICs. Die Position des ausgelösten Kommunikationslauts lag ca. $900 \mu\text{m}$ vom NBIC entfernt. Die Vokalisationen an beiden Testpunkten ließen sich durch eine Injektion von Kynurensäure bzw. Muscimol blockieren.

4.3.2 Auswirkung der Ausschaltung des NBICs auf im kontralateralen NBIC ausgelöste Vokalisationen

Bei 2 Tieren wurde an 3 Positionen überprüft, inwiefern eine Ausschaltung der kontralateral gelegenen entsprechenden Struktur, Einfluss auf die in der ipsilateralen Struktur elektrisch ausgelösten Vokalisation hat. Zuerst wurde ein Laut ausgelöst, danach Kynurensäure bzw. Muscimol in die kontralateral zum Auslöseort gelegene Struktur injiziert und erneut an der bereits zuvor getesteten Position elektrisch gereizt. An allen Positionen stiegen die Auslöseschwellen für den zuvor ausgelös-

ten Echo- bzw. Zirplaut geringfügig an, jedoch nie mehr als $10 \mu\text{A}$. Abbildung 4.22 zeigt die Spektrogramme eines elektrisch ausgelösten Zirplauts vor und nach der Injektion von 200 nl Kynurensäure in den NBIC kontralateral zum Reizort.

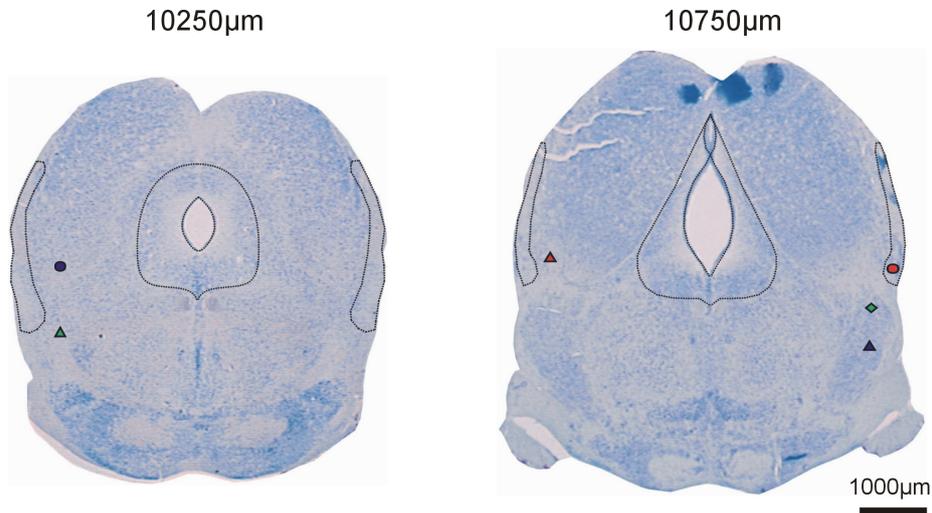


Abbildung 4.21: Auslösepunkte der Kommunikationslaute (Kreise) und des Echoortungslautes (Raute) im NBIC und dazugehörige Kynurensäure-Injektionsstellen im Gebiet des kontralateralen NBICs (den Auslösepositionen farbige Dreiecke).

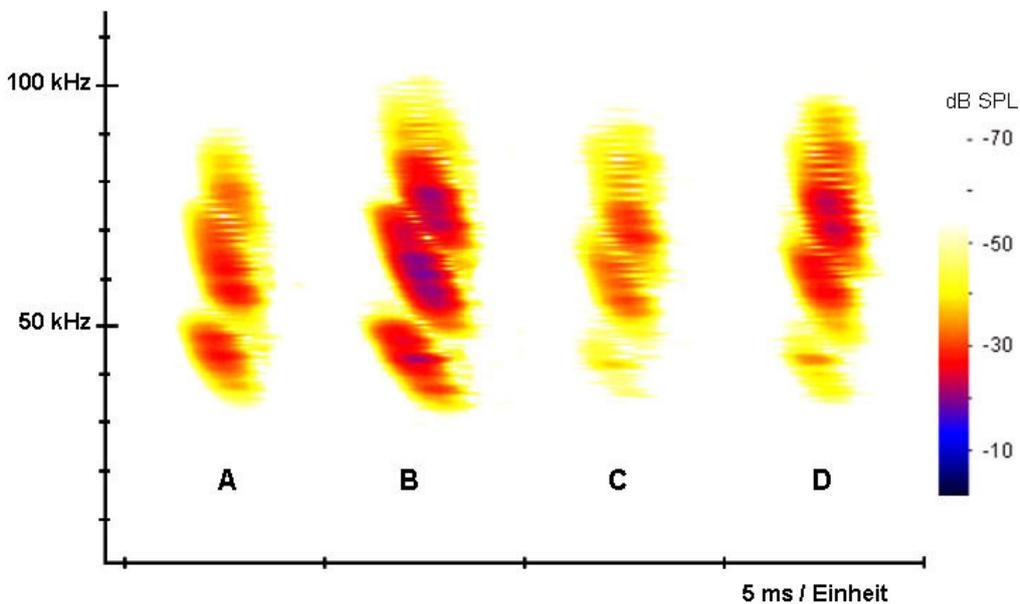


Abbildung 4.22: Spektrogramme eines mit $10 \mu\text{A}$ im NBIC ausgelösten Zirplauts A) vor Ausschaltung des kontralateralen NBICs, B) 10 Minuten danach, C) 40 Minuten danach und D) 90 Minuten danach.

Die Darstellung in Abb. 4.21 zeigt die Lage der Auslöse- und Ausschaltpositionen für dieses Experiment. Daraus ist zu erkennen, dass nur ein Auslösepunkt direkt im NBIC lag, der dazugehörige Injektionspunkt auf der kontralateralen Seite aber den NBIC um ca. 200 μm verfehlte. Während der Injektion des Glutamat-Antagonisten knickte das kontralateral zur Kynurensäure-Injektionsstelle gelegene Ohr herunter. Somit war der NBIC mindestens teilweise von der Ausschaltung betroffen.

Diese Position 200 μm vom NBIC entfernt ist auch die, an der die unter 4.22 dargestellten Vokalisationen evoziert und der zeitliche Verlauf nach der Injektion von Kynurensäure im kontralateralen NBIC dokumentiert werden konnte. Die anderen Reiz- und Injektionsorte lagen weiter vom NBIC entfernt. Es war an diesen Positionen während und nach den Injektionen nicht das typische Ohrknicken zu beobachten.

4.3.3 Auswirkungen der Ausschaltung des NBICs auf im PAG ausgelöste Laute

In 4 Tieren wurde überprüft, inwiefern eine Ausschaltung des NBICs elektrisch im PAG ausgelöste Vokalisationen beeinflusst. Dazu wurden sowohl Echoortungslaute als auch Kommunikationslaute im Gebiet des PAGs evoziert. Dann wurde Kynurensäure in den NBIC injiziert. Nach der Ausschaltung des ipsi- bzw. kontralateralen NBICs wurde erneut im PAG stimuliert.

Eine Ausschaltung des NBICs kontralateral zum Auslöseort im PAG hatte keinerlei Einfluss auf den ausgelösten Laut. Im PAG oder angrenzendem Tegmentum ausgelöste Laute waren nach wie vor mit der gleichen Reizschwelle auslösbar.

Abbildung 4.23 zeigt die Positionen, an denen Vokalisation ausgelöst wurde. In allen Fällen war vor und nach der Kynurensäureinjektion die gleiche Vokalisation mit der gleichen Schwelle auslösbar.

4.3.3.1 Beeinflussbarkeit von im PAG ausgelösten Echoortungs- und Kommunikationslauten durch Ausschaltung des ipsilateralen NBICs

In 4 Tieren wurde an 12 PAG-Positionen elektrisch ausgelöste Vokalisation (7 Echoortungslautpositionen und 5 Kommunikationslautpositionen) auf den Einfluss einer im Gebiet des ipsilateralen NBICs durchgeführten Kynurensäureinjektion überprüft.

In 10 Fällen kam es zu einem Ausbleiben der Vokalisation nach einer Kynurensäureinjektion in das Gebiet des NBICs, in 2 Fällen war die Vokalisation weiterhin

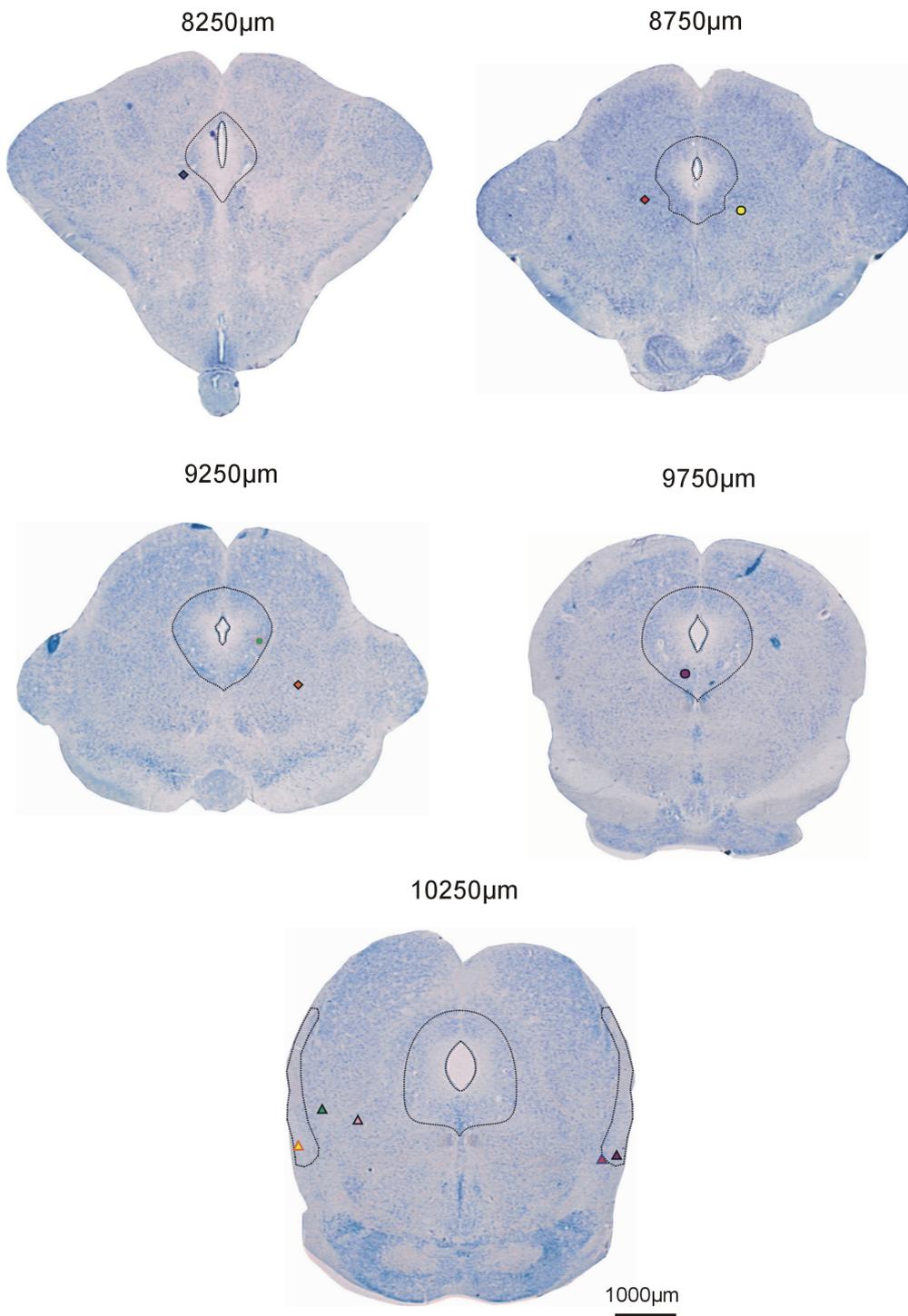


Abbildung 4.23: Verteilung der Positionen, an denen elektrisch Echoortungs- (Rauten) und Kommunikationslaute (Kreise) im PAG und Umgebung ausgelöst wurden und die mit Kynurensäureinjektionen in das kontralateral gelegene NBIC-Gebiet (farbig entsprechende Dreiecke) nicht blockiert werden konnten.

auslösbar. Nicht alle getesteten Auslöse- und Injektionspositionen kamen im gewünschten Gebiet zu liegen:

Ein Echoortungslaut und ein Kommunikationslaut auf den Ebenen 8750 μm und 9250 μm waren durch eine Kynurensäureinjektion in den NBIC nicht blockierbar. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Echoortungslaut, dessen zugehörige Injektionsstelle direkt im NBIC lag, 450 μm vom PAG entfernt in der *Formatio reticularis* ausgelöst wurde. Der Kommunikationslaut liegt im PAG, jedoch befindet sich die Kynurensäureinjektionsstelle außerhalb des NBICs, 300 μm entfernt (im IC).

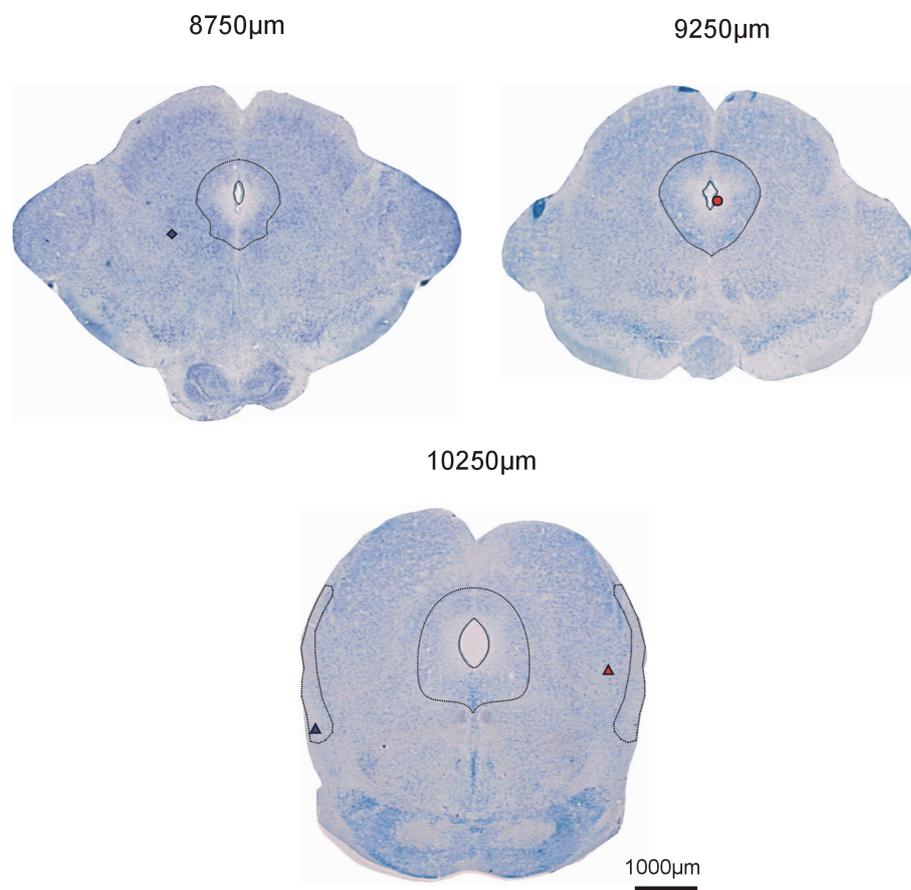


Abbildung 4.24: Positionen an denen elektrisch Vokalisation ausgelöst werden konnte, die nicht mit einer Kynurensäureinjektion in den ipsilateralen NBIC bzw. in das den NBIC umgebende Gebiet blockiert werden konnte. Auslösepositionen: 1 Echoortungslautposition (Raute), 2 Kommunikationslautpositionen (Kreise), Kynurensäureinjektionsstellen - farbig den Auslösepositionen entsprechende Dreiecke.

An 4 Positionen konnten Echoortungslaute ausgelöst werden, die mit einer Injektion von Kynurensäure in den ipsilateralen NBIC blockiert werden konnten. Kei-

ne der 4 getesteten Echoortungslautpositionen lag direkt im PAG, 2 jedoch lagen sehr dicht am PAG (max. 100 μm entfernt) im angrenzenden Tegmentum. Eine Echoortungslautposition war über 700 μm vom PAG entfernt und lag somit in der *Formatio reticularis*, eine andere lag 250 μm vom PAG entfernt und befand sich in der *Formatio reticularis mesencephali* (FRM).

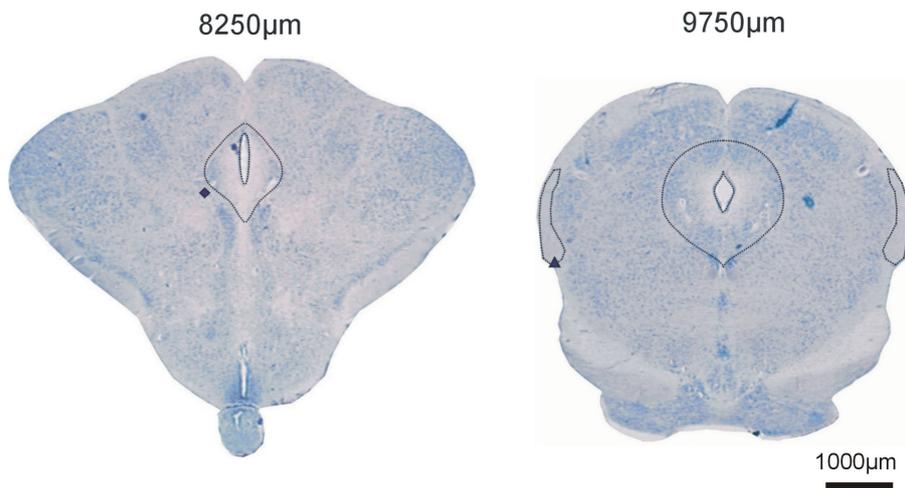


Abbildung 4.25: Nahe dem PAG ausgelöster Echoortungslaut (Raute auf Ebene 8250 μm) und dazugehörige NBIC-Position an der 150 nl Kynurensäure injiziert wurden. Die Kynurensäureinjektion an angegebener Stelle führte zum Ausbleiben der elektrisch evozierten Vokalisation.

Abbildung 4.25 zeigt im linken Bild eine Position an der ein Echoortungslaut mit 8 μA ausgelöst wurde (blaue Raute). Danach wurden an der im rechten Bild angegebenen Position (blaues Dreieck) 150 nl Kynurensäure (75 mM) injiziert. Direkt nach der Injektion von Kynurensäure in den ipsilateral zur Stimulationsposition gelegenen NBIC war die Vokalisation nicht mehr mit 8 μA auslösbar. Erst eine Reizstärke von 15 μA hatte eine vokale Reaktion zur Folge. Nach 15 Minuten reichten die 15 μA nicht mehr für eine Vokalisationsauslösung. Am Tag darauf, 22 Stunden nach der Kynurensäureinjektion in den NBIC lag die Vokalisationsschwelle bei 20 μA .

Ein interessantes Beispiel für die Blockade im PAG ausgelöster Laute zeigt Abbildung 4.26. Hier wurde zum einen ein Echoortungslaut im ventralen Bereich des PAGs ausgelöst und an verschiedenen Versuchstagen durch Injektion von 200-250 nl Kynurensäure an unterschiedlichen NBIC-Positionen versucht, zu beeinflussen. Zwei Injektionspositionen lagen im bzw. in unmittelbarer Nähe des NBICs (50 μm entfernt). Der dritte Injektionsort lag 450 μm vom NBIC entfernt. Trotz der unterschiedlichen Lokalisationen der Injektionspositionen konnte der im ventralen

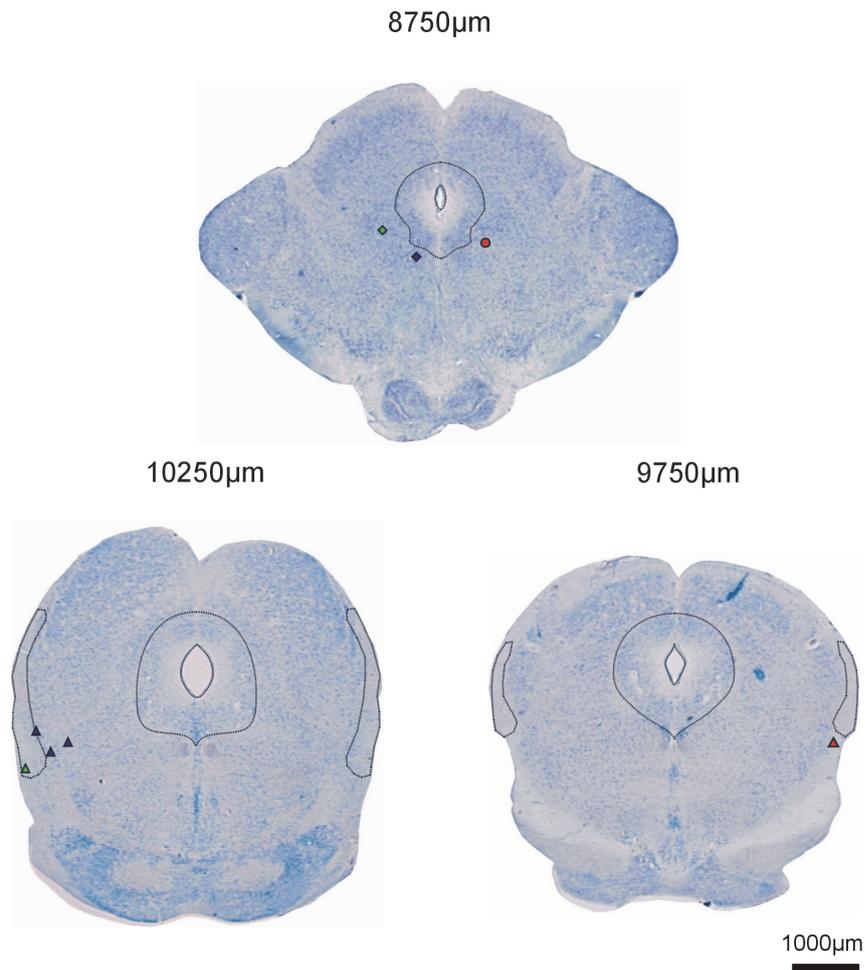


Abbildung 4.26: Nahe dem PAG ausgelöste Echoortungslaute (Rauten) und ein Kommunikationslaut (Kreis) mit jeweils dazugehöriger Kynurensäureinjektionsposition im NBIC-Gebiet (farbig entsprechende Dreiecke). Alle elektrisch ausgelösten Vokalisationen blieben nach der Injektion von Kynurensäure aus.

PAG-Bereich ausgelöste Echoortungslaut in allen drei Fällen blockiert werden. Die Zeitspanne bis zur Blockade der Vokalisation variierte. Die Injektion im NBIC und die 450 μm vom NBIC entfernt hatten ein unmittelbares Ausbleiben der Vokalisation nach Injektion zur Folge. Nach der Injektion von Kynurensäure (75 mM, 250 nl) an der Position 50 μm entfernt vom NBIC dauerte es 30 Minuten bis die Vokalisation nicht mehr ausgelöst werden konnte. Die in Abbildung 4.26 mit einem grünen Viereck dargestellte Position, kennzeichnet eine Echoortungslautposition, die direkt nach der Injektion in den NBIC (grünes Dreieck in Abbildung 4.26) blockiert werden konnte. Die Auslöseposition dieses Echoortungslauts lag 360 μm vom PAG entfernt.

Auf der gleichen Ebene (8750 μm in Abbildung 4.26) konnte ein kurzer Zirplaut ausgelöst werden (gekennzeichnet durch einen roten Kreis), der 15 Minuten nach einer Injektion von 250 nl Kynurensäure in die Nähe des ipsilateralen NBICs (100 μm entfernt) blockiert werden konnte.

Auf der Ebene 9250 μm konnte 600 μm vom PAG entfernt ein Echoortungslaut in der Formatio reticularis mit einer Schwelle von 60 μA ausgelöst werden (Abbildung 4.27).

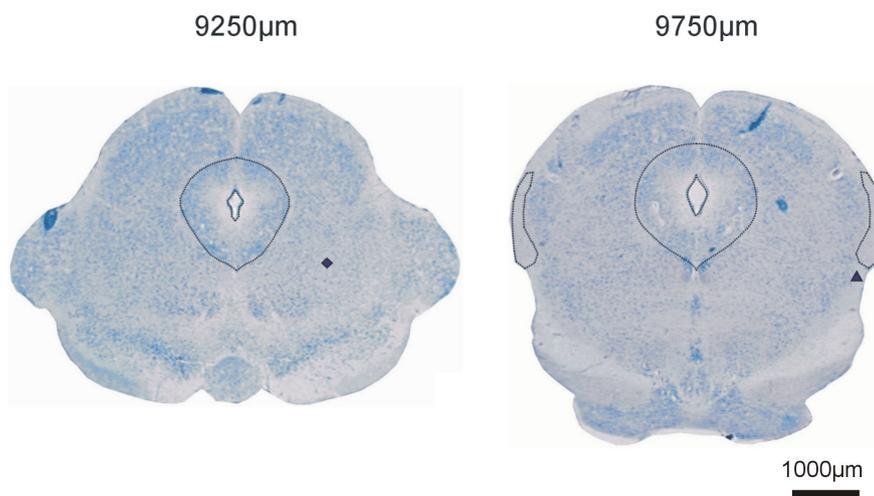


Abbildung 4.27: Position eines in der Formatio reticularis (600 μm vom PAG entfernt) ausgelösten Echoortungslauts (blaue Raute, links), der mit einer Kynurensäureinjektion (blaues Dreieck, rechts) 100 μm vom NBIC entfernt, blockiert werden konnte.

Nach der Injektion von 350 nl Kynurensäure in die Nähe des ipsilateralen NBICs (100 μm entfernt) war nach 5 Minuten keine Vokalisation mehr auslösbar. Erst nach 200 Minuten konnte wieder mit 60 μA der ursprüngliche Echoortungslaut ausgelöst werden.

Abbildung 4.28 zeigt 2 Positionen im PAG (roter und gelber Kreis) an denen Kommunikationslaute ausgelöst werden konnten, die mit Injektionen in den NBIC und in die Substantia nigra blockiert werden konnten. Der dritte Kommunikationslaut auf dieser Ebene (grüner Kreis) wurde in der Formatio reticularis ausgelöst. Er konnte ebenfalls mit einer Injektion von Kynurensäure in den NBIC (grünes Dreieck) blockiert werden.

Interessant ist die Position, die in der Abbildung 4.28 durch den gelben Kreis gekennzeichnet wird. Ehe die Auslösung des Lauts vollständig blockiert werden konnte, veränderte sich der Laut (siehe Abbildung 4.29). Ursprünglich konnte mit 50 μA eine Mischform aus Lauttyp 1 und Lauttyp 4 ausgelöst werden. Direkt nach

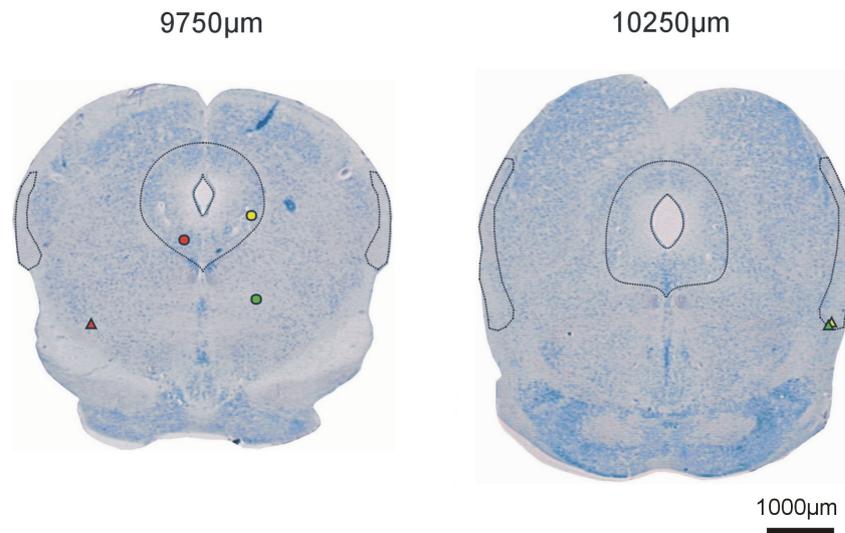


Abbildung 4.28: Auslöseorte von Kommunikationslauten im PAG (Kreise) und dazugehörige Injektionsorte von Kynurensäure im NBIC (farbig entsprechende Dreiecke). Alle Vokalisationen waren mit der dazugehörigen Kynurensäureinjektion an den gekennzeichneten Stellen blockierbar.

der Injektion von Kynurensäure in den NBIC sah der ausgelöste Laut so aus, wie vor der Injektion und war auch mit 50 μ A auslösbar. Fünf Minuten nach der Kynurensäureinjektion war ein Laut des Lauttyps 13 und wiederum 10 Minuten später (15 Minuten nach der Kynurensäureinjektion) ein abwärts frequenzmodulierter Laut mit 50 μ A auslösbar. Dieser war nicht zu einem von Pistohl (1998) beschriebenen Lauttyp zuordenbar. Erst 120 Minuten nach der Kynurensäureinjektion in den NBIC konnte wieder der ursprüngliche Drohlaut vom PAG aus ausgelöst werden.

Tabelle 4.2 stellt die im und um das PAG ausgelösten Vokalisationen mit den dazugehörigen Ausschaltpositionen im und um den NBIC und die Dauer bis zur Blockade der Vokalisation dar.

4.4 Ausschaltung des PAGs und Auswirkung auf im NBIC ausgelöste Laute

Bei 2 Tieren wurden 4 NBIC Positionen darauf getestet, inwiefern eine Vokalisation bei ausgeschaltetem PAG auslösbar ist. Dazu wurde zunächst im NBIC stimuliert und danach das PAG mittels 4 Kynurensäureinjektionen (2 im rostralen Teil des PAGs und 2 im caudalen Teil des PAGs) ausgeschaltet. Anschließend wurde wieder im NBIC stimuliert.

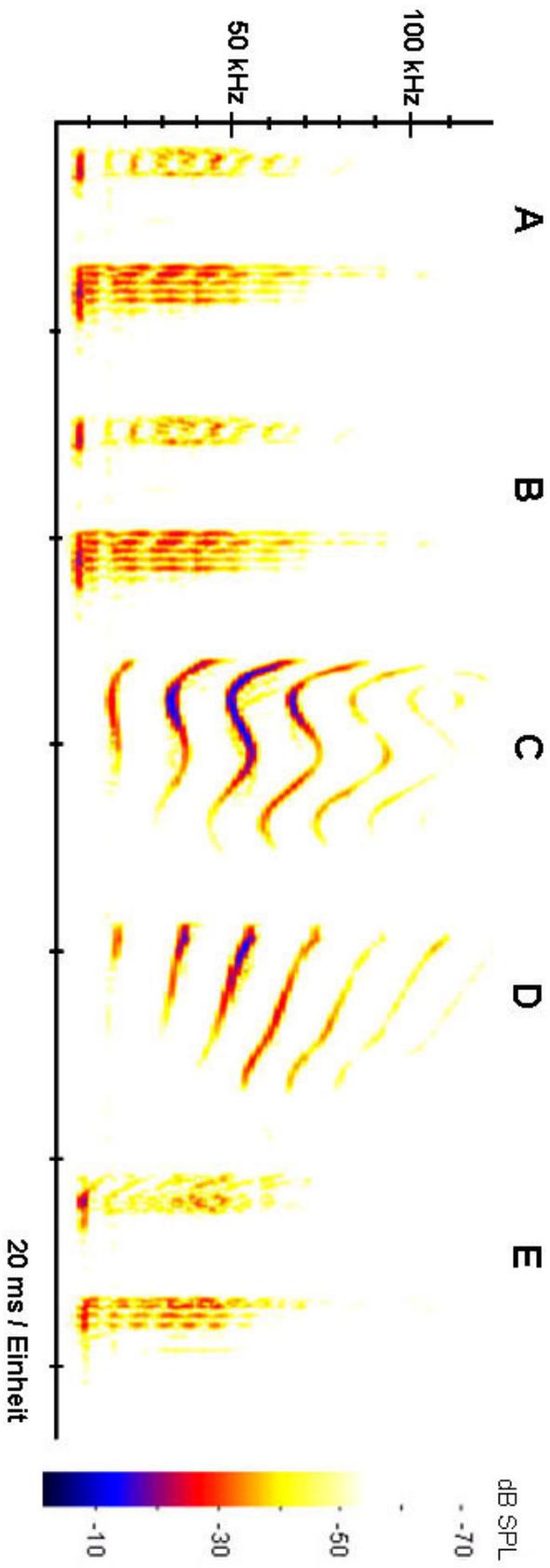


Abbildung 4.29: Spektrogramme eines im PAG ausgelösten Kommunikationslauts A) vor Ausschaltung des ipsilateralen NBICs, B) direkt danach, C) 5 Minuten danach, D) 15 Minuten danach und E) 150 Minuten danach.

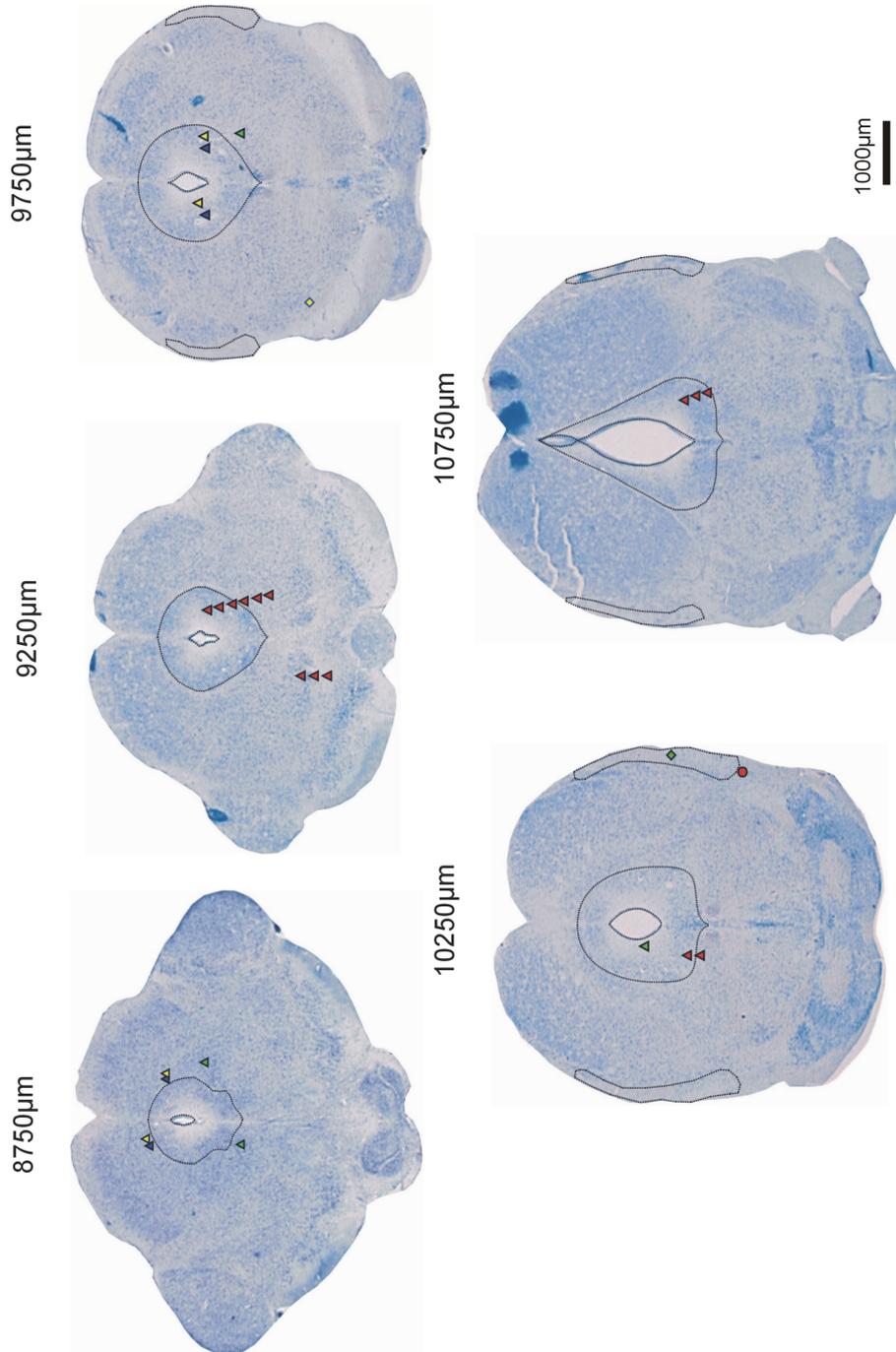


Abbildung 4.30: Übersicht über Auslösepositionen von Echoortungs- und Kommunikationslauten (Kreise) im NBIC und Ausschaltpositionen (farbig entsprechende Dreiecke) im PAG. Der Echoortungs- (Ebene 9750 µm) und der Kommunikationslaut (Ebene 10250 µm) waren durch Kynurensäureinjektionen ins PAG nicht blockierbar. Für den zeitlichen Verlauf der Auslösbarkeit des Echoortungs- und Kommunikationslauten im NBIC (Ebene 10250 µm) siehe Text.

Abbildung 4.30 zeigt auf den Ebenen 9750 μm und 10250 μm je einen Auslöseort für Echoortungslaute (Rauten) und auf der Ebene 10250 μm eine Position an der ein Kommunikationslaut (des Lauttyps 6) ausgelöst werden konnte. Der ausgelöste und mit verschiedenen Kynurensäureinjektionen ins PAG getestete Echoortungslaut auf Ebene 9750 μm lag in der Substantia nigra und war durch eine Ausschaltung des PAGs nicht beeinflussbar. Er war vor und nach allen Kynurensäureinjektionen mit 8 μA auslösbar.

Der Kommunikationslaut des Lauttyps 6 war am ventralen Rand des NBICs (siehe Abb. 4.30, Ebene 10250 μm) sowohl vor als auch nach der Kynurensäureinjektion ins PAG mit 9 μA auslösbar. Wie in Abbildung 4.30 zu sehen ist, trafen nicht alle Kynurensäureinjektionen das PAG. Die Lokalisation der Injektionspunkte betrifft die rostralen und caudalen Teile des PAGs, ipsilateral zum Auslöseort im NBIC und den caudalen ventralen Teil des PAGs, kontralateral zum Auslöseort im NBIC. Nach der Injektion von insgesamt 600 nl Kynurensäure (75 mM) in diese Gebiete des PAGs blieb die Spontanvokalisation des Tieres aus.

Der Echoortungslaut, dessen Position auf der Ebene 10250 μm in Abbildung 4.30 mit einem grünen Viereck dargestellt ist, nimmt während der Ausschaltung des PAGs einen besonderen Verlauf. Vor den Injektionen ist der Laut mit 20 μA auslösbar. Direkt und 5 Minuten nach jeder der 4 Injektionen ist er nach wie vor mit 20 μA auslösbar, verändert aber zunehmend seine Struktur. Zehn Minuten nach der letzten Injektion von Kynurensäure ins PAG ist der Laut nur noch mit 40 μA auslösbar. Eine Stunde nach der letzten Injektion lässt er sich nicht mehr mit dieser Schwelle auslösen. Am Folgetag, 22 Stunden nach der letzten Kynurensäureinjektion ist der Laut wieder mit 20 μA auslösbar, ist jedoch im Vergleich zum Vortag in seiner Struktur leicht verändert.

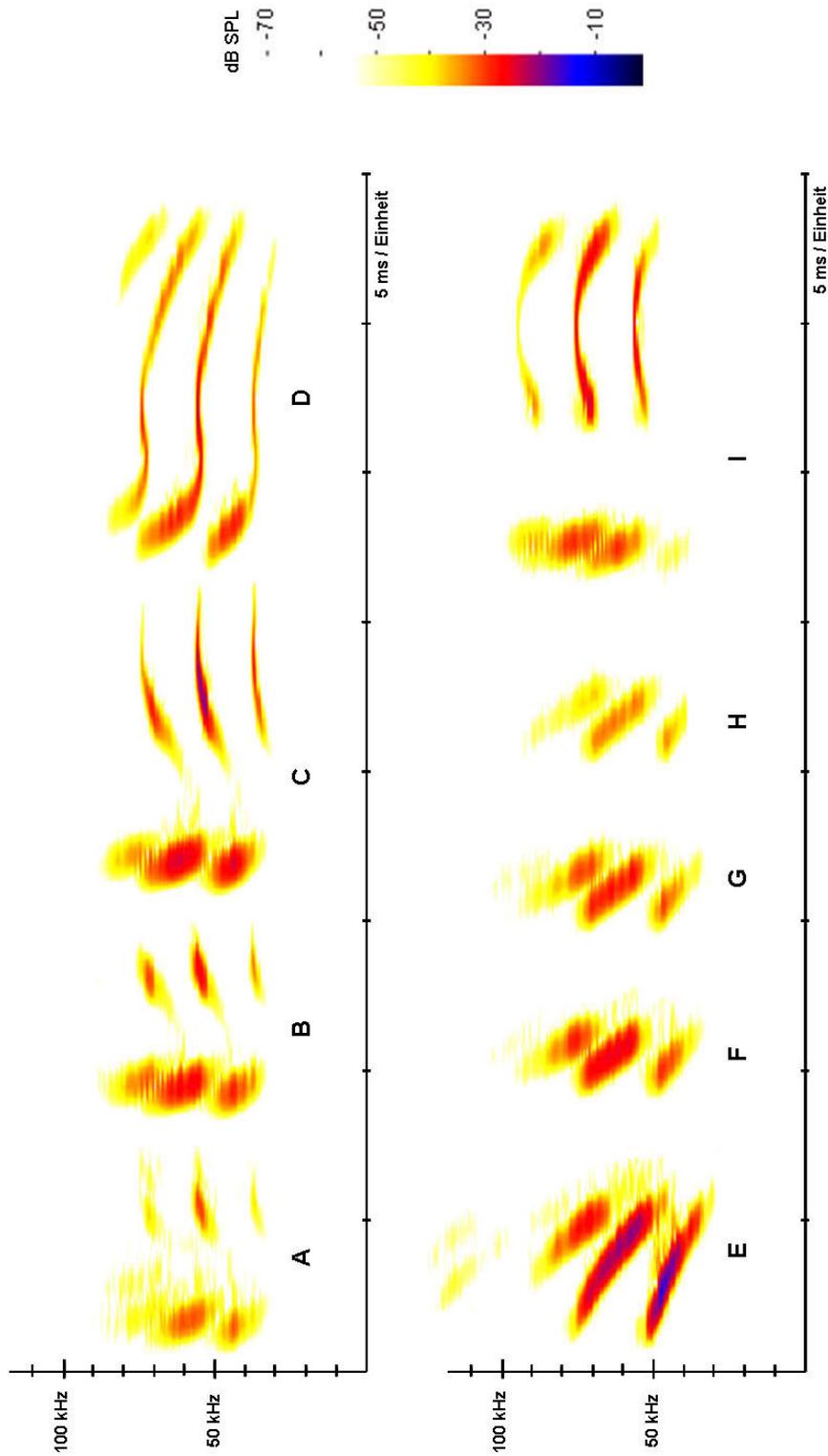


Abbildung 4.31: Spektrogramme eines im NBIC ausgelösten Kommunikationslauts A) vor der Injektion von Kynurensäure in das PAG, B) 5 Minuten nach der 1. Kynurensäureinjektion, C) 5 Minuten nach der 2. Kynurensäureinjektion, D) 5 Minuten nach der 3. Kynurensäureinjektion, E) 5 Minuten nach der 4. Kynurensäureinjektion, F) 10 Minuten nach der 4. Kynurensäureinjektion, G) 20 Minuten nach der 4. Kynurensäureinjektion, H) 30 Minuten nach der 4. Kynurensäureinjektion und I) 22 Stunden nach der 4. Kynurensäureinjektion in das PAG.

Tabelle 4.2: Übersicht über die Positionen an denen Vokalisation ausgelöst (PAG) und Kynurensäure injiziert (NBIC) wurde, einschließlich der zeitlichen Angabe des Eintretens der Blockade der ausgelösten Vokalisation.

Auslöseposition	Ausgelöster Laut	Injektionsposition Kynuren-säure	Eintreten der Blockade nach Injektion
50 µm ventrolateral vom PAG	Echoortung	ventraler NBIC	sofort
100 µm ventral vom PAG	Echoortung	ventraler NBIC	sofort
100 µm ventral vom PAG	Echoortung	50 µm ventral vom NBIC	30 min
100 µm ventral vom PAG	Echoortung	450 µm medial vom ventralen NBIC	sofort
Formatio reticularis (360 µm lateral vom PAG)	Echoortung	ventraler NBIC	sofort
100 µm ventrolateral vom PAG	Kommunikation	ventraler NBIC	15 min
Formatio reticularis(600 µm ventrolateral vom PAG)	Echoortung	100 µm ventral vom NBIC	5 min
PAG	Kommunikation	Substantia nigra	sofort
PAG	Kommunikation	ventraler NBIC	sofort
Formatio reticularis (500 µm ventrolateral vom PAG)	Kommunikation	ventraler NBIC	sofort

4.5 Tracerinjektionen

In 9 Tieren wurden Tracer injiziert. Dazu wurden Biotin-Dextran-Amin (BDA), Weizenkeimagglutinierte Meerrettichperoxidase (WGA-HRP) und mit Alexa Fluor 488 markiertes Dextran (Alexa 488-Dextran) verwendet.

4.5.1 BDA

Bei 3 Versuchstieren wurde nach Abschluss der Untersuchungen BDA in das PAG injiziert. Dazu wurde bei allen 3 Tieren BDA (10 %) an eine Kommunikationslautposition injiziert. Die Injektion des Tracers BDA erfolgte iontophoretisch, beim ersten Tier 12 Minuten (on/off) bei den beiden anderen Tieren 24 Minuten (on/off) lang.

Die Injektionsstelle von BDA ist in Abbildung 4.32 mit einem roten Punkt gekennzeichnet. Zuvor ließ sich an dieser Position im PAG elektrisch ein Kommunikationslaut mit 30 μ A auslösen. Nachdem die Injektion unter den oben genannten Parametern erfolgte, wurde das Tier nach 7 Tagen perfundiert und das Gehirn geschnitten und gefärbt. Die Injektionsstelle im Originalschnitt zeigt Abbildung 4.33.

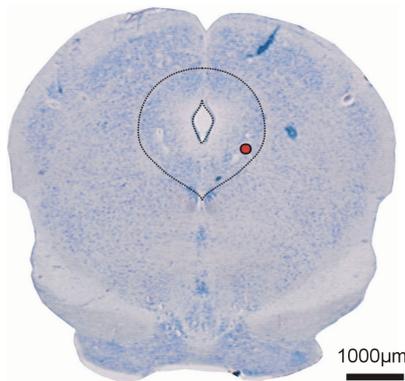


Abbildung 4.32: Injektionsposition von BDA (roter Kreis) auf dem Normhirnschnitt.

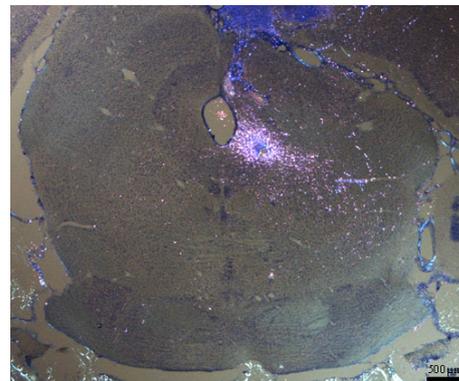


Abbildung 4.33: Injektionsstelle von BDA im Originalschnitt.

BDA wird von den Neuronen aktiv aufgenommen und vorwiegend anterograd transportiert. Das Ergebnis des anterograden Transports erkennt man in Abbildung 4.34.

In Abbildung 4.34 sind im polarisierten Licht rosa leuchtend die Markierungen zu sehen, die 7 Tage nach der Injektion von BDA ins PAG auftreten. Bild 4.34 A zeigt die Projektion ipsilateral zur Injektionsstelle in den lateralen parabrachialen Nucleus bis hin in den Trigeminskern. In 4.34 B ist die Projektionen zum ipsilateral zur Injektionsstelle im PAG gelegenen Nucleus Ambiguus (NA) und Fasern, die

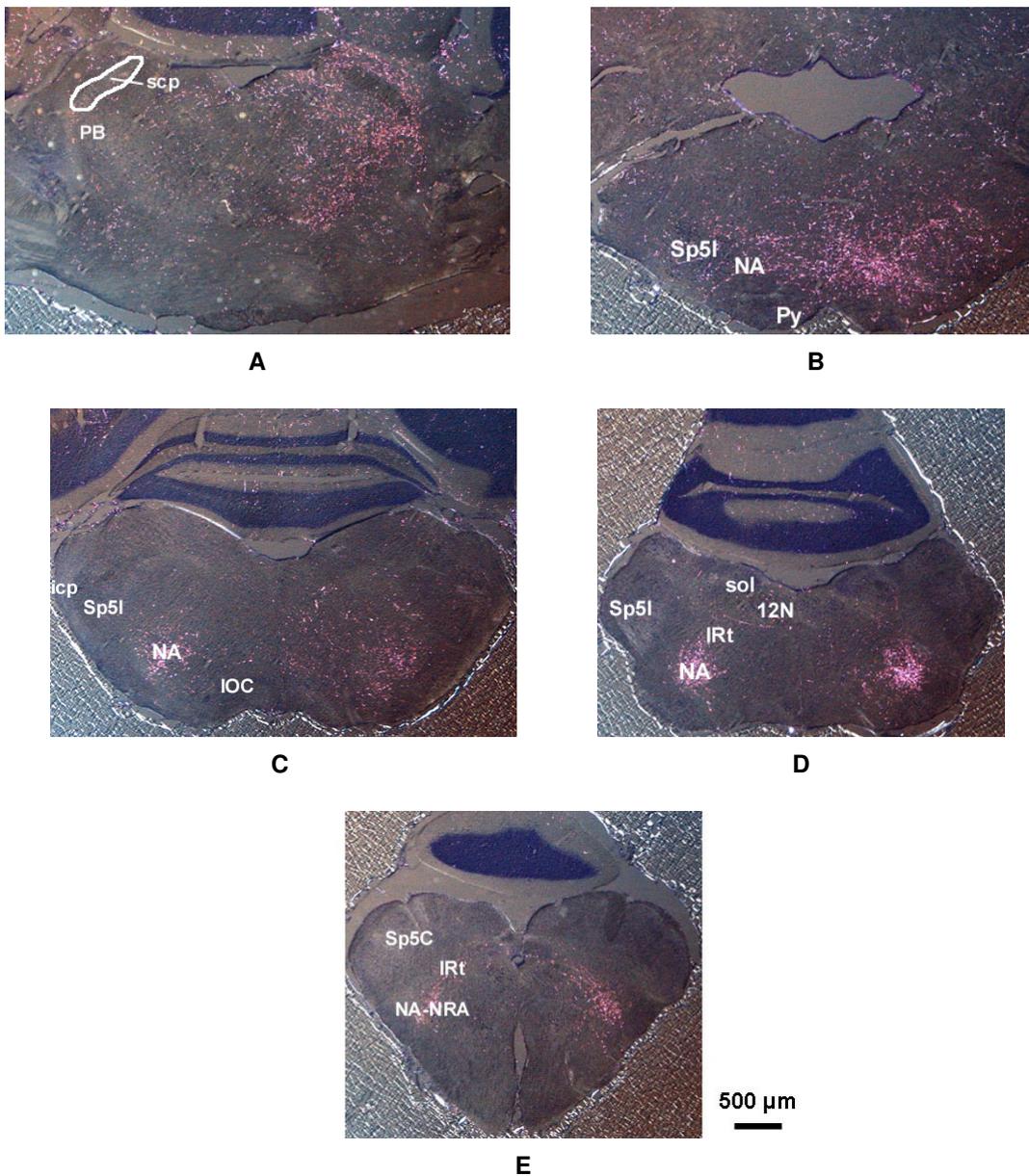


Abbildung 4.34: BDA-markierte Gebiete im Hirnstamm 7 Tage nach Injektion von BDA in das PAG (an eine Echoortungslautposition) aufgenommen im polarisierten Licht. A) Projektion ipsilateral zur Injektionsstelle in den lateralen parabrachialen Nucleus, B) Projektion zum ipsilateralen Nucleus ambiguus, C) und D) ipsi- und kontralateral markierter Nucleus ambiguus, E) Markierungen im Nucleus ambiguus - Nucleus retroambiguus. Abkürzungen: 12N Hypoglossuskern, icp inferiorer cerebellärer Pedunculus, IOC inferiorer Oliven-Komplex, IRt intermediärer retikulärer Kern, scp superiorer cerebellärer Pediculus (Brachium conjunctivum), sol Tractus solitarius, Sp5C caudaler Subnucleus des spinalen Trigemuskerns, Sp5I interpolärer Subnucleus des spinalen Trigemuskerns.

zum kontralateralen Nucleus Ambiguus ziehen zu sehen. Abbildung 4.34 C und D zeigen BDA-Markierungen in beiden NAs, sowohl ipsi- als auch kontralateral zur Injektionsstelle. Bild 4.34 E zeigt Markierungen sehr weit hinten im Hirnstamm im Gebiet des Nucleus ambiguus - Nucleus retroambiguus.

Bei 2 Tieren wurde statt der TIM-Färbung wie beim ersten Tier die TTN-Färbung als Nachweismethode benutzt, um die Injektionsstelle und den Transport von BDA ins PAG sichtbar zu machen. Mittels der TTN-Färbung sind keine Injektionsstellen oder Markierungen von injiziertem und im Tier transportierten BDA nachweisbar. Aus diesen Tieren liegen keine Ergebnisse vor.

4.5.2 WGA-HRP

Bei insgesamt 4 Tieren wurde WGA-HRP injiziert. Bei einem Tier wurde der Tracer an einer Echoortungslautposition und bei einem anderen Tier an einer Kommunikationslautposition im PAG injiziert. Diese beiden Tiere wurden nach 3 Tagen perfundiert. Bei zwei anderen Tieren wurde lediglich zur Lokalisation, jeweils an einer PAG-Position und einer NBIC-Position, WGA-HRP kurz vor der Perfusion des Tieres injiziert. Bei keinem der Tiere, bei denen WGA-HRP injiziert wurde, konnte trotz verschiedener Nachweismethoden (DAB-Cytochrom-Färbung, TTN-Färbung) ein Transport dieses Tracers nachgewiesen werden.

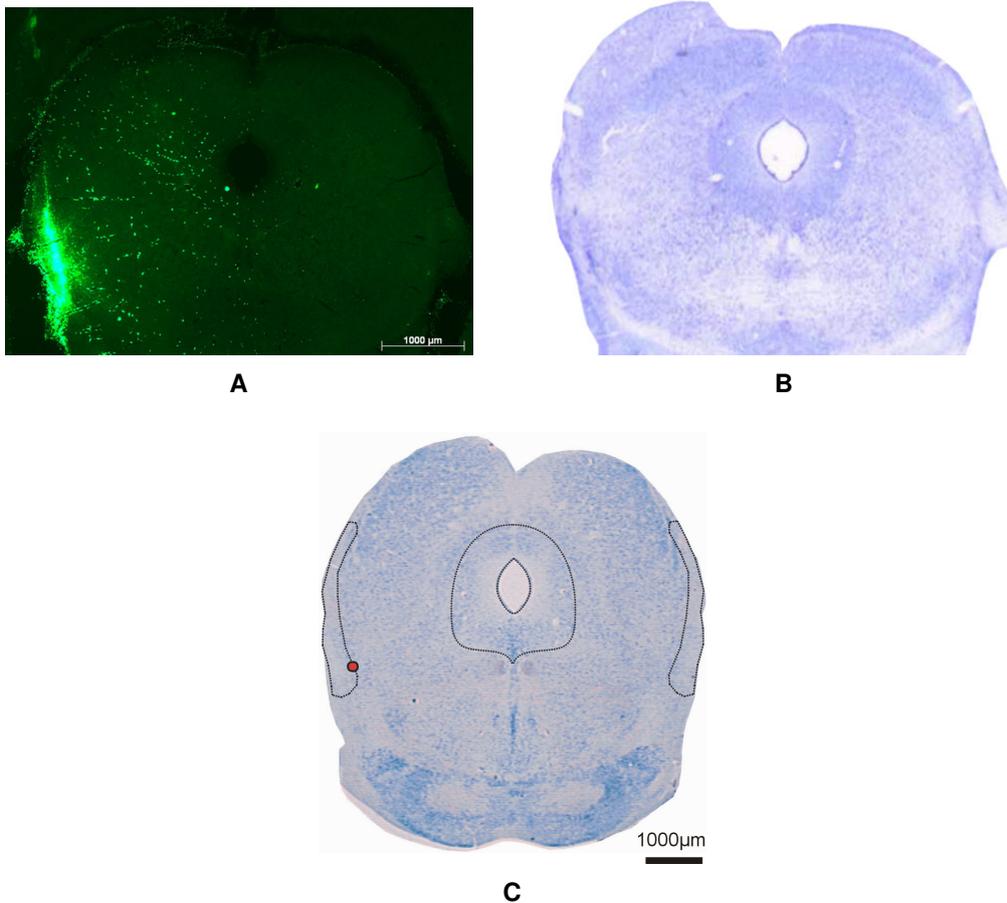


Abbildung 4.35: Injektionsstelle von Alexa 488-Dextran in den NBIC. A) Schnitt im Fluoreszenzlicht (die Injektionsstelle fluoresziert grün). B) nachfolgender, mit Kresylviolett gefärbter Schnitt, C) dazugehöriger Schnitt der Ebene $10250\ \mu\text{m}$ aus dem Normatlas, die Position der Injektionsstelle ist mit einem roten Punkt markiert.

4.5.3 Alexa 488-Dextran

Bei 2 Tieren wurde zum einen im NBIC und zum anderen im PAG 50 nl Alexa 488-Dextran in Form einer 10%igen Lösung mittels Druck injiziert und anschließend wurde eine Elektroporation durchgeführt.

4.5.3.1 Alexa 488-Dextran im NBIC

Bei einem Tier wurde Alexa 488-Dextran unter oben beschriebenen Parametern in den NBIC injiziert. Dieser Stoff wird mit Licht von 493 nm Wellenlänge angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 520 nm.

Auf der Ebene der Injektionsstelle (Abb. 4.35) erkennt man bereits von der In-

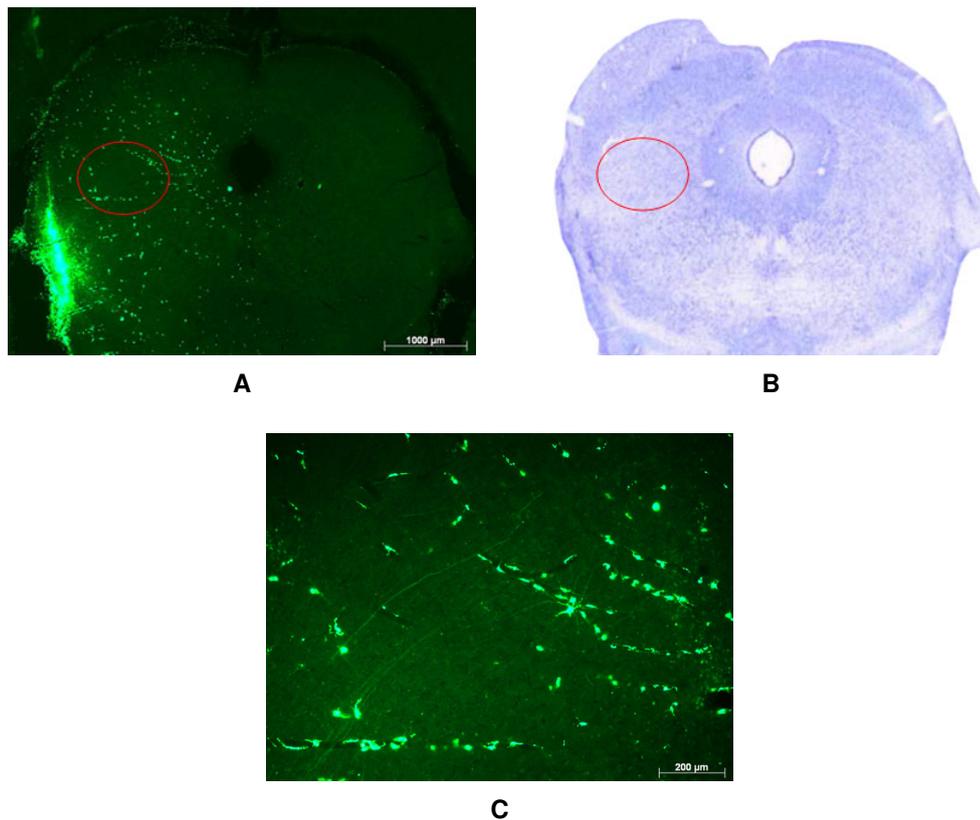


Abbildung 4.36: Projektionen von der Injektionsstelle im NBIC. Übersichtsaufnahme A) im Fluoreszenzlicht, B) im Durchlicht (Kresylviolett gefärbter Schnitt). Vergrößerung des in A rot eingegrenzten Bereichs: C) Fasern und Zellkörper im Bereich des intercolliculären tiefen mesencephalären Nucleus.

jektionsstelle wegziehende Fasern die in Abbildung 4.36 c vergrößert dargestellt sind. Es sind deutlich Fasern und auch vereinzelt Zellkörper erkennbar, die im Bereich des intercolliculären tiefen mesencephalären Nucleus liegen. Diese Struktur weist ausschließlich auf der Seite ipsilateral zur Injektionsstelle Tracermarkierungen auf.

Weiterhin konnten Projektionen von der Injektionsstelle zu Teilen des SC und zum PAG gefunden werden (Abb. 4.37). Beide Strukturen weisen sowohl gefärbte Zellkörper als auch Axone auf. Auch hier treten die Markierungen ausschließlich ipsilateral auf.

Von der Injektionsstelle im NBIC erfolgte ein Transport des Tracers in die Region des ipsilateralen peripedunkulären Nucleus (Abb. 4.38). Wiederum findet man in dieser Region sowohl fluoreszierende Zellkörper als auch Axone.

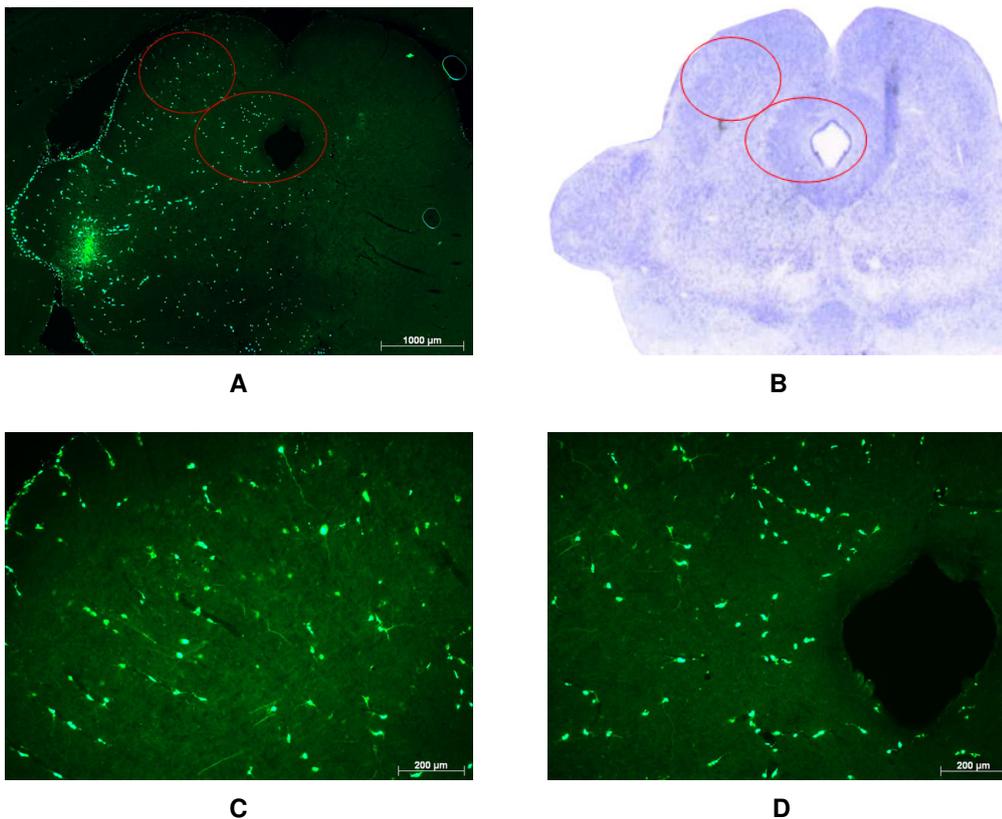


Abbildung 4.37: Projektionen vom NBIC zum PAG. Übersichtsaufnahme A) im Fluoreszenzlicht und B) Durchlicht (Kresylviolett gefärbter Schnitt). Vergrößerungen der in A rot eingegrenzten Gebiete: C) markierte Neurone und Axone in einem Teilgebiet des SC, D) markierte Neurone und Axone im Bereich des PAGs.

4.5.3.2 Alexa 488-Dextran im PAG

In einem weiteren Tier wurde Alexa 488-Dextran mit der oben beschriebenen Methode in das PAG injiziert. Dabei gelangte der Tracer sowohl in Randgebiete des PAGs als auch in das angrenzende Tegmentum (Abb. 4.39).

Nach Injektion von Alexa 488-Dextran ins PAG sind Projektionen in das Gebiet des anterioren cingulären Kortex erkennbar (Abb. 4.40). Über ein Gebiet von ca. 1300 µm von rostral nach caudal (Rostrocaudal-Ebenen im Normhirn 2000 µm - 3300 µm) waren im Bereich des anterioren cingulären Kortex immer wieder markierte Zellkörper mit Dendriten zu finden (Abb. 4.40 c). Die Projektionen vom PAG erfolgten ausschließlich ipsilateral zum Ort der Injektionsstelle, kontralateral sind im cingulären Kortex keinerlei Markierungen zu finden.

Weitere Projektionen konnten im Gebiet der Amygdala (genauer im medialen Bereich des zentralen Kerns der Amygdala) gefunden werden. Die Projektionen in

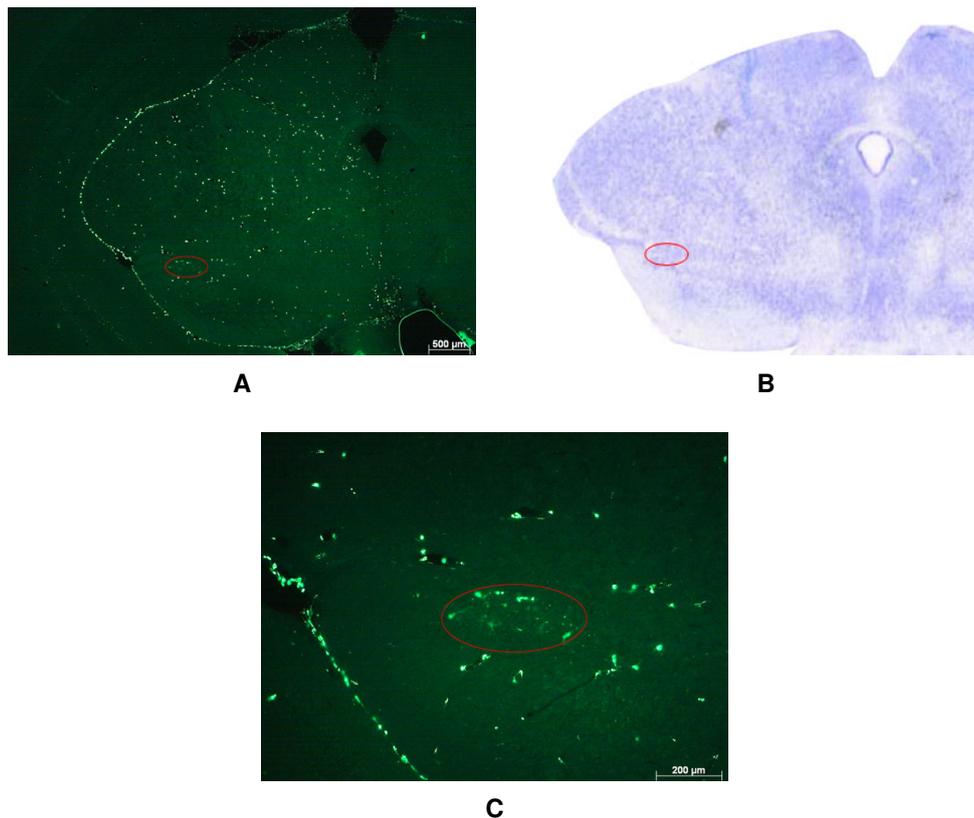


Abbildung 4.38: Markierte Zellen im Bereich des peripedunculären Nucleus. Übersichtsaufnahme des Hirnstamms im Bereich 8500 µm bezgl. Normhirn A) im Fluoreszenzlicht und B) im Durchlicht (Kresylviolett gefärbter Schnitt). Vergrößerung des in A rot eingegrenzten Gebiets: C) markierte Neurone im Gebiet des peripedunculären Nucleus.

dieses Gebiet erfolgten ausschließlich in den caudalen Teil der Struktur und über einen geringeren Rostrocaudal-Bereich von ca. 250 µm hinweg. Im beschriebenen Gebiet waren sowohl markierte Zellkörper mit ihren Dendriten als auch Axone zu finden. Die Projektionen traten ausschließlich ipsilateral auf.

Auch im Gebiet der ipsilateral zum Injektionsort gelegenen Zona incerta (ZI) waren Alexa 488-Dextran markierte Zellkörper zu finden (siehe Abb. 4.41 C). Der Bereich, in dem in der ZI markierte Zellen zu finden waren, erstreckte sich über 1000 µm in der Rostrocaudalen. Die ZI erstreckt sich in der Dorsoventralen über einen relativ schmalen Bereich. Über den Großteil dieses schmalen Gebiets hinweg, sind markierte Zellen zu finden.

Das PAG projiziert weiterhin in die anteriore hypothalamische Region. Dort konnten markierte Zellkörper und Dendriten gefunden werden. Die anteriore hypothalamische Region liegt ventral von der ZI und lateral vom dritten Ventrikel. Die

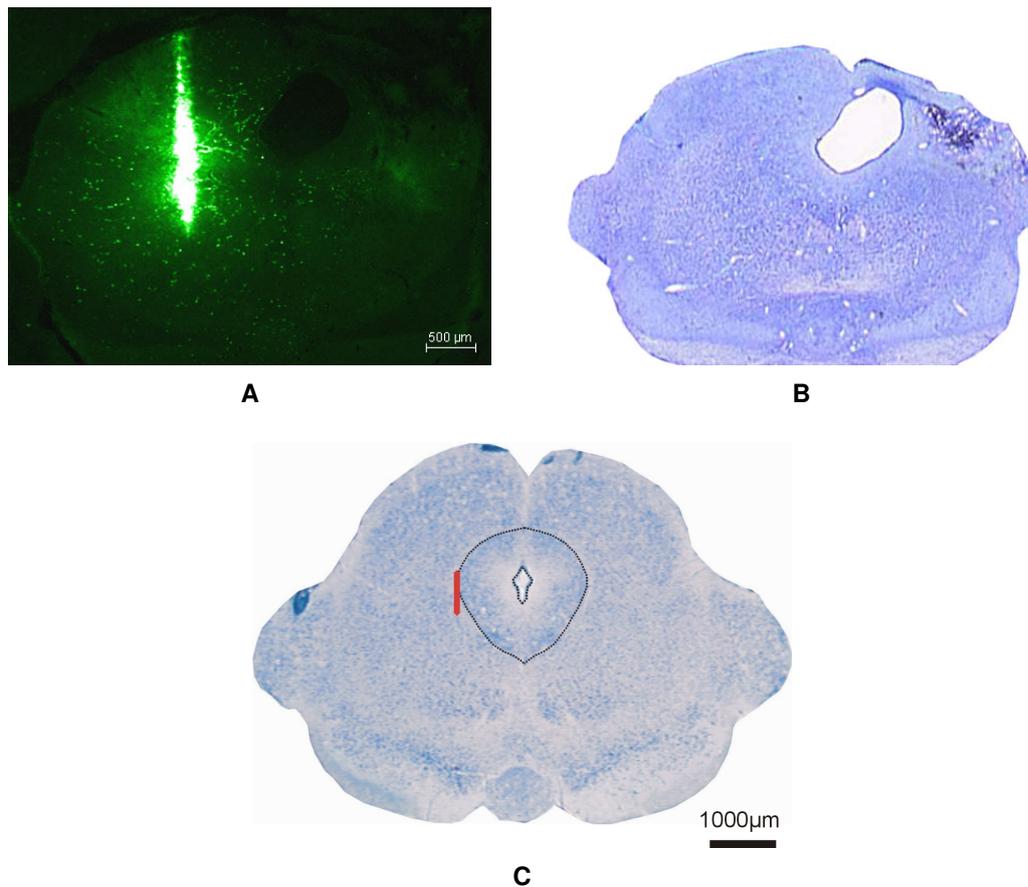


Abbildung 4.39: Injektionsstelle von Alexa 488-Dextran in das PAG. A) Schnitt im Fluoreszenzlicht (die Injektionsstelle fluoresziert grün). B) nachfolgender, mit Kresylviolett gefärbter Schnitt, C) dazugehöriger Schnitt aus dem Normalatlas. Die Position der Injektionsstelle ist als roter Balken gekennzeichnet.

markierten Zellen, Dendriten und Axone traten ausschließlich ipsilateral zur Injektionsstelle im PAG auf. Über die gesamte rostrocaudale Ausdehnung des posterioren Teils der anterioren hypothalamischen Region (ca. 400 µm) hinweg waren markierte Zellen und Axone zu finden.

Es wurden Projektionen sowohl in das Gebiet des parafascikulären thalamischen Kerns als auch in das prerubrale Feld gefunden (Abb. 4.42). Durch den suprafacialen thalamischen Kern und den medialen Lemniscus ziehen Fasern, Zellkörper sind dort nicht zu finden. Zum Gebiet des Fasciculus retroflexus gibt es keine Projektionen (4.42 C).

Vom PAG zur ventralen tegmentalen Region gibt es nur sehr schwache Projektionen, d.h. es sind nur sehr wenige Neurone markiert. Im dorsalen Teil des PAGs sind hingegen deutlichere Faserverläufe zu finden. Hier ziehen markierte Fasern

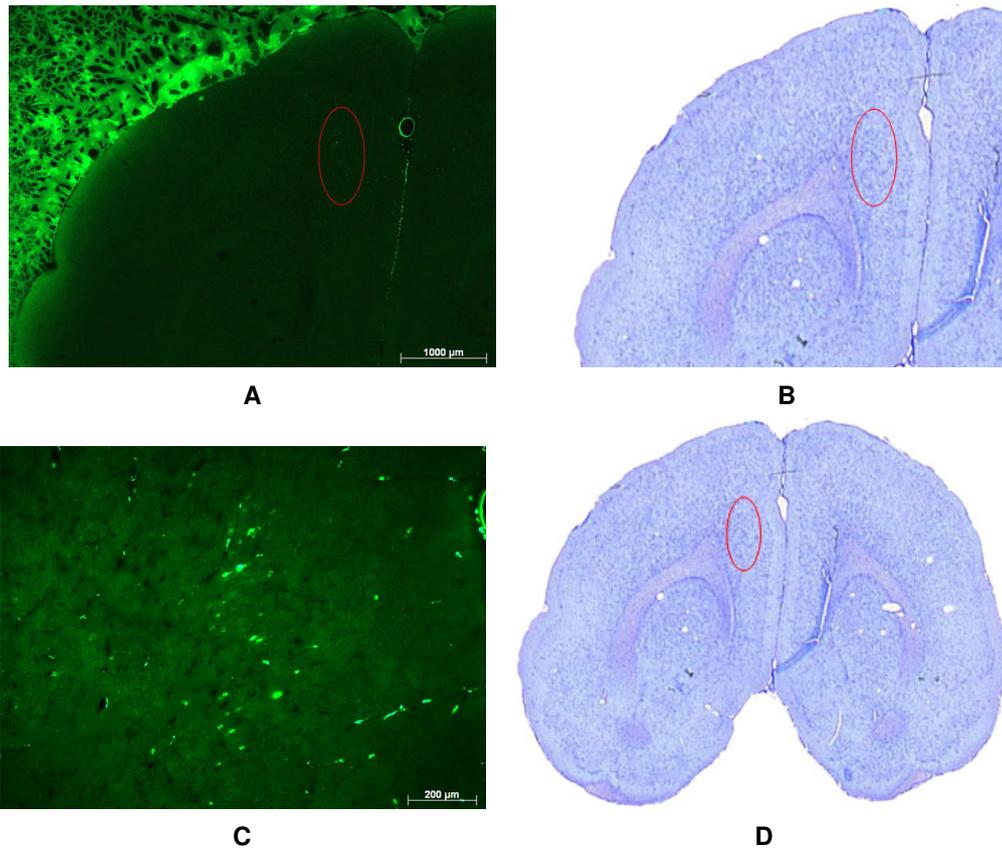


Abbildung 4.40: Projektionen von der Injektionsstelle im PAG zum anterioren Gyrus cinguli. Übersichtsaufnahme A) im Fluoreszenzlicht und B) Durchlicht (Kresylviolett gefärbter Schnitt). Vergrößerung des in A rot eingerahmten Bereichs C) Zellkörper im Gebiet des Gyrus cinguli. D) Übersichtsaufnahme des unter B) teilweise dargestellten Schnittes.

von der Injektionsstelle über die posteriore Kommissur zur kontralateralen Seite des PAGs.

Im lateralen Lemniscus, 750 μm caudal von der Injektionsstelle entfernt sind deutlich Fasern erkennbar, die von der Injektionsstelle in ventrocaudale Richtung ziehen (Abb. 4.43). Es sind in diesem Gebiet keine markierten Zellkörper zu finden. In Abbildung 4.43 (c) erkennbare Zellen sind sehr wahrscheinlich Endothelzellen. Ein Hinweis darauf gibt ihre Lage (meist mit Blutgefäßen assoziiert) und die fehlenden Dendriten.

Im Bereich des pontinen reticulären Nucleus, 1700 μm caudal von der Injektionsstelle gelegen, verlaufen sowohl ipsilateral als auch kontralateral markierte Fasern. Die Tracer-gefüllten Faserabschnitte sind ipsilateral deutlich häufiger vorhanden als kontralateral.

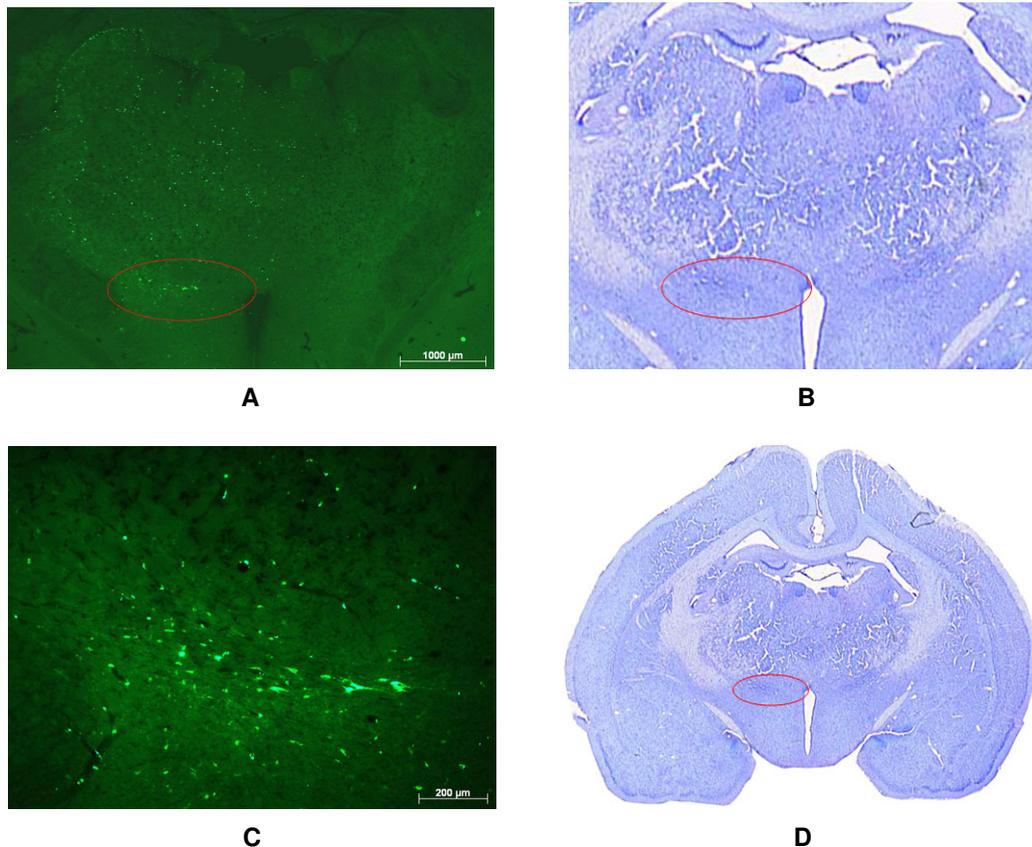


Abbildung 4.41: Projektionen zur Zona incerta. Übersichtsaufnahmen A) im Fluoreszenzlicht und B) im Durchlicht (Kresylviolett gefärbter Schnitt). Vergrößerung der in A rot eingegrenzten Region: C) markierte Zellen in der Zona incerta. D) Übersichtsaufnahme eines ganzen Kresylviolett gefärbten Schnittes dieser Region im Durchlicht.

Auf der Rostrocaudal-Ebene 10600 μm (3350 μm caudal von der Injektionsstelle entfernt) befinden sich in diesem Gebiet ipsilateral zur Injektionsstelle markierte Zellkörper, Dendriten und auch Axone.

Im Gebiet des medialen vestibulären Nucleus sind bilateral markierte Zellen zu finden. Die ipsilateral markierten Zellen befinden sich 3350 μm caudal von der Injektionsstelle auf der Rostrocaudal-Ebene 10600 μm . Kontralateral sind in dieser Hirnstruktur auf der Ebene 12900 μm bis zur Ebene 13200 μm (3650 μm - 3950 μm caudal von der Injektionsstelle) nur sehr wenige Neurone markiert.

Im medialen cerebellären Kern auf der Ebene 12900 μm (3650 μm caudal von der Injektionsstelle) konnten einige schwache Projektionen gefunden werden. Es waren ipsilateral und auch kontralateral von der Injektionsstelle vereinzelt Zellkörper angefärbt.

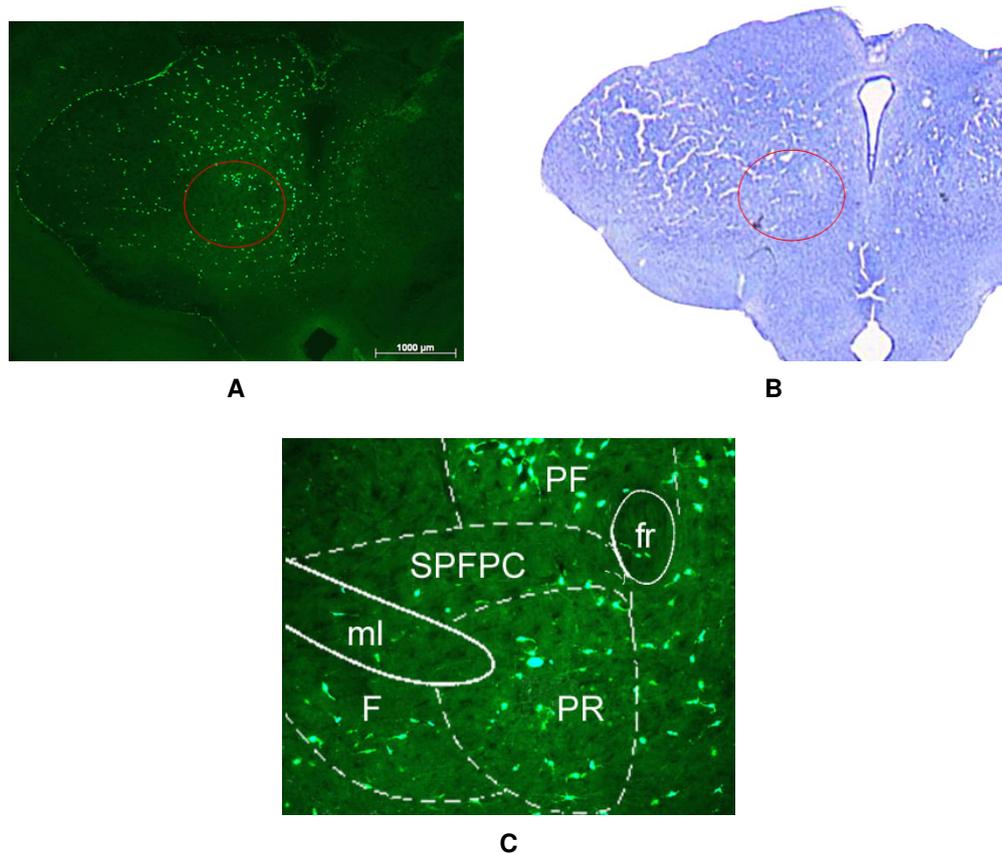


Abbildung 4.42: Projektionen in das Gebiet des parafascikulären thalamischen Kerns, das prerubrale Feld und in den Kern des Felds von Forel. Übersichtsaufnahmen A) im Fluoreszenzlicht und B) im Durchlicht (Kresylviolett gefärbter Schnitt). Vergrößerung des in A rot eingegrenzten Bereichs: C) markierte Zellkörper und Fasern, D) mit schematischer Darstellung der Hirnregionen. Abkürzungen: F Nucleus des Felds von Forel, fr fasciculusretroflexus, ml Medialer Lemniscus, PF parafasciculärer thalamischer Nucleus, PR Prerubrales Feld, SPFPC suprafasciculärer thalamischer Nucleus.

Der posteriore interpostale Nucleus wies ausschließlich ipsilateral von der Injektionsstelle Markierungen auf. In dieser Region, 3650 µm caudal vom Injektionsort, konnten einige wenige markierte Zellkörpern mit Dendriten gefunden werden. Hauptsächlich wies der posteriore interpostale Nucleus aber markierte Fasern auf.

In Hirngebieten die caudal von der Ebene 13200 µm liegen, waren nur sehr wenige und sehr diffuse Markierungen zu finden, die hier nicht weiter aufgeführt werden sollen.

Alle beschriebenen Projektionen von den Injektionsstellen sind in den Tabellen 4.3 und 4.4 zur Übersicht zusammengefasst.

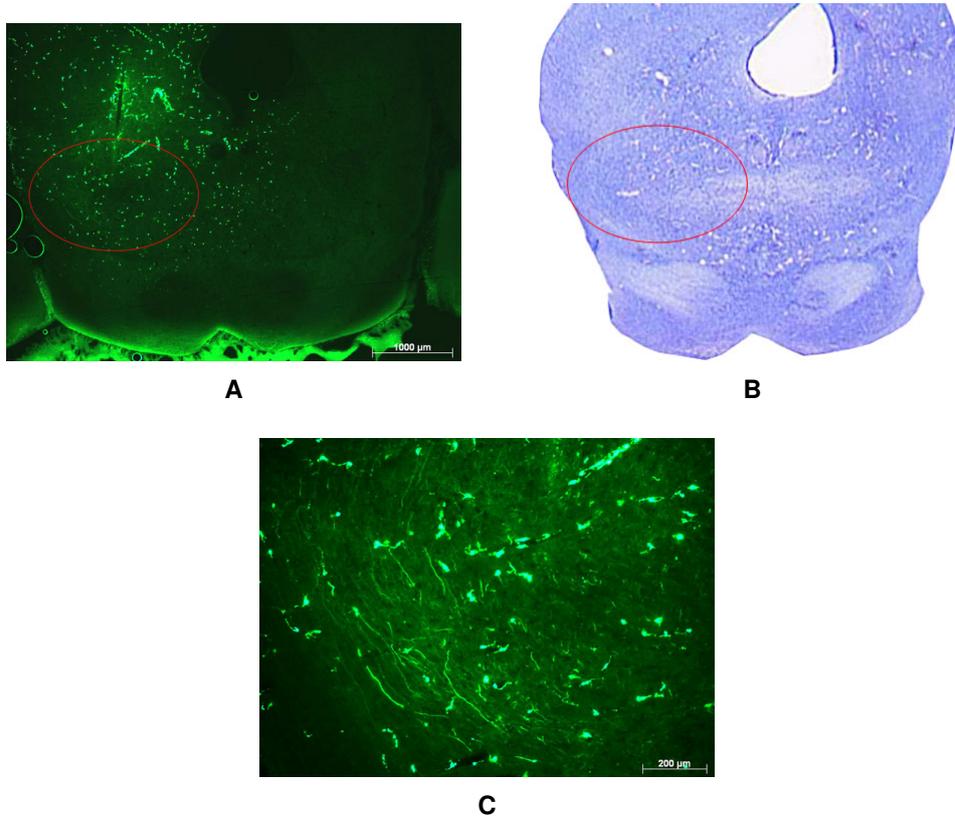


Abbildung 4.43: Von der Injektionsstelle im PAG wegziehende Fasern im Gebiet des lateralen Lemniscus. Übersicht A) im Fluoreszenzlicht und B) im Durchlicht (Kresylviolett gefärbter Schnitt). C) Vergrößerung des in A rot eingegrenzten Gebiets des lateralen Lemniscus.

Tabelle 4.3: Übersicht über den Transport des Tracers Alexa 488-Dextran von der Injektionsstelle im NBIC.

Projektionsgebiet	Art der Markierung	Lokalisation
intercolliculärer tiefer mesencephalärer Nucleus	vereinzelt Zellkörper mit Dendriten, deutlich Fasern	ipsilateral
Colliculus superior	Zellkörper mit Dendriten, Fasern	ipsilateral
PAG	Zellkörper mit Dendriten, Fasern	ipsilateral
peripedunkulärer Nucleus	Zellkörper mit Dendriten, Fasern	ipsilateral

Tabelle 4.4: Übersicht über den Transport von Alexa 488-Dextran von der Injektionsstelle im PAG.

Projektionsgebiet	Art der Markierung	Lokalisation
anteriorer cingulärer Kortex	Zellkörper mit Dendriten	ipsilateral
caudaler Teil der Amygdala	Zellkörper mit Dendriten	ipsilateral
Zona incerta	Zellkörper, vereinzelt Dendriten	ipsilateral
anteriore hypothalamische Region	Zellkörper mit Dendriten, Fasern	ipsilateral
parafasciculärer thalamischer Kern	Zellkörper mit Dendriten	ipsilateral
prerubrales Feld	Zellkörper mit Dendriten	ipsilateral
ventrale tegmentale Region	sehr wenige markierte Zellen	ipsilateral
medialer vestibulärer Nucleus	Zellkörper (ipsilateral stärker als kontralateral)	bilateral
pontiner reticulärer Nucleus	Fasern (ipsilateral stärker als kontralateral), wenige Zellkörper mit Dendriten	bilateral (Fasern), ipsilateral (Zellkörper)
medialer cerebellärer Kern	wenige markierte Zellkörper	bilateral
posteriorer interpostaler Nucleus	Fasern, Zellkörper mit Dendriten	ipsilateral
suprafacialer thalamischer Kern	ausschließlich Fasern	ipsilateral
medialer Lemniscus	ausschließlich Fasern	ipsilateral
lateraler Lemniscus	ausschließlich Fasern	ipsilateral
posteriore Kommissur (PAG)	ausschließlich Fasern	ziehen von ipsilateral nach kontralateral

5. Diskussion

5.1 Methoden

5.1.1 Elektrische Reizung

Bei der elektrischen Hirnstimulation werden Nervenzellen in der Umgebung der in das Gehirn eingebrachten Reizelektrode stimuliert. In dieser Arbeit wurde für die Stimulation eine monopolare Elektrode benutzt. Es wurde ein monophasischer Rechteckimpuls angelegt und extrazellulär appliziert.

Um eine Aussage über die mit der elektrischen Stimulation ausgelösten Reaktion treffen zu können, ist es wichtig zu wissen, wie weit sich der elektrische Reiz ausbreitet, d.h. in welchem Ausmaß um die Elektrode Axone depolarisiert werden. Besonders wenn in Strukturen mit geringer räumlicher Ausdehnung stimuliert werden soll, ist es wichtig, sicherzustellen, dass der Stimulus Axone innerhalb der Struktur erreicht und die gezeigte Reaktion auf die Reizung dieser Struktur zurückzuführen ist. Der Strom breitet sich in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich weit aus (Ranck, 1975).

In der Übersichtsarbeit von Ranck (1975) ist beschrieben, dass ein mit einer monopolen Elektrode extrazellulär applizierter Reizstrom von $10\ \mu\text{A}$ und einer Pulsdauer von $200\ \mu\text{s}$ zu einer überschwelligeren Reizung in einem Gebiet von ca. $200\ \mu\text{m}$ Durchmesser um die Elektrode herum führt. Wird der Reizstrom bei gleichbleibender Pulsdauer auf $20\ \mu\text{A}$ erhöht, erweitert sich das um die Elektrodenspitze herum erfasste Gebiet auf ca. $350\ \mu\text{m}$. Die Ausbreitung des elektrischen Reizes erfolgt isotrop von der Elektrodenspitze aus, sofern es sich um ein homogenes Gewebe bezüglich der elektrischen Leitfähigkeit handelt. Mit der Zunahme der Reizstärke wird auch der Wirkungsradius größer.

In dieser Arbeit wurden diesbezüglich PAG-Positionen betrachtet, an denen mit einem sehr geringen Strom von $5\text{ - }10\ \mu\text{A}$ und einer Pulsdauer von $100\ \mu\text{s}$ Vokalisation ausgelöst werden konnten. Um die gleiche vokale Reaktion $200\ \mu\text{m}$ (bei gleichbleibender Pulsdauer von $100\ \mu\text{s}$) von der optimalen Reizposition zu erzielen, muss die Reizstärke um das 3- bis 4-fache erhöht werden.

Das bedeutet, dass die Strukturen, deren Depolarisation zur Auslösung der Vokalisation notwendig sind, auf einen relativ eng begrenzten Bereich konzentriert sind. Das Reizstärke-Distanz-Verhältnis innerhalb des PAGs korreliert trotz der geringeren Pulsdauer von 100 μ s recht gut mit den bei Ranck (1975) beschriebenen Werten.

5.1.2 Applikation von Neuropharmaka

In dieser Arbeit wurde sowohl mit Homocysteinsäure und Kainsäure stimuliert als auch mit Kynurensäure und Muscimol reversibel ausgeschaltet. Wie auch bei der elektrischen Reizung ist es bei der pharmakologischen Stimulation und Ausschaltung wichtig zu wissen, welches Gebiet um die Injektionselektrode herum erfasst wird. Im Gegensatz zur elektrischen Stimulation, die keine Aussage zulässt, ob Axone von Nervenzellen vor Ort oder durchziehende Fasern stimuliert wurden, werden bei der pharmakologischen Stimulation lediglich Strukturen gereizt, die Rezeptoren für den injizierten Wirkstoff aufweisen. Zu diesen Strukturen zählen Zellkörper und Synapsen, da sich an Fasern keine Rezeptoren befinden.

5.1.2.1 Pharmakologische Stimulation mit Homocystein- und Kainsäure

HCA bindet an NMDA-Rezeptoren und wirkt an Nervenzellen stark exzitatorisch. Erst 1986 wurde bekannt, dass HCA in neuronalem Gewebe im Picomolar-Bereich natürlicherweise vorkommt (Do et al., 1986). HCA entsteht unter natürlichen Bedingungen durch Oxidation von Homocystein innerhalb des Methioninstoffwechsels. Es wirkt in höheren Konzentrationen neurotoxisch (Langmeier et al., 2003).

Pro getesteter Position wurden 10 - 50 nl Homocysteinsäure injiziert. Somit wurden in das Gewebe 37 - 183 ng (das entspricht 0,2 - 1 nmol) Homocysteinsäure eingebracht. Die für das Gewebe toxische Konzentration an Homocysteinsäure ist um das 2600-fache höher als die toxische Konzentration von Kainsäure, d.h. es muss mehr HCA in das Gewebe eingebracht werden um die gleiche degenerierende Wirkung wie mit Kainsäure zu erzielen (Nadler et al., 1981). Eine definitiv toxische Konzentration an HCA wird mit 600 nmol also ca. 110 μ g erreicht (Langmeier et al., 2003). Diese Dosis wurde hier um den Faktor 600 unterschritten und kann demzufolge keine Zellschäden verursacht haben. Auch die Histologie der Hirnschnitte bestätigt diese Annahme. In den Gebieten der HCA-Injektionen wurden keine Gewebeveränderungen festgestellt, die mit den angewendeten Färbungen erkennbar gewesen wären.

Eine injizierte Menge von 10 - 50 nl HCA nimmt räumlich ein Volumen eines Würfels mit einer Kantenlänge von 220 - 370 μm ein. Daher ist davon auszugehen, dass unter Berücksichtigung der Konzentration und der Diffusion im Gewebe ein geringfügig größeres Gebiet als das Volumen des Würfels mit oben erwähnten Kantenlängen erfasst wurde. Die Injektion wirkte also relativ lokal und die Vokalisation konnte von einem recht eng begrenzten Gebiet ausgelöst werden.

Kainsäure dockt an Kainrezeptoren an und wirkt stark exzitatorisch, sowie in höheren Konzentrationen neurodegenerativ (Khaspekov et al., 1990). Wegen der Neurotoxizität wird Kainsäure häufig eingesetzt, um Läsionen zu verursachen. Daher ist Kainsäure sehr vorsichtig anzuwenden, wenn, wie in dieser Arbeit, keine Läsionen erwünscht sind. In der vorliegenden Arbeit wurden pro getesteter Position 5 - 15 nl einer 0,65 mM Lösung injiziert. Das bedeutet, dass pro Position 3,2 - 9,75 pmol bzw. 0,7-2,1 ng Kainsäure in das Gewebe eingebracht wurden.

In einer Arbeit von Nadler (1981) wurde die Neurotoxizität von Kainsäure innerhalb des Hippocampus untersucht. Dabei werden bei Dosierungen von 0,047 nmol Kainsäure lediglich wenige Neurone im Hippocampus zerstört. Eine massivere Zerstörung von Zellen tritt ab einer Konzentration von 0,23 nmol ein. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von 3,2 - 9,75 pmol liegen um das 25-fache unter der von Nadler (1981) angegebenen toxischen Konzentration. Dieses Ergebnis wird durch die Kontrolle der histologisch aufgearbeiteten Schnitte bestätigt. Es fanden sich keine auffälligen Gewebeveränderungen in den Gebieten, in die Kainsäure injiziert wurde.

Im Fall der Kainsäureinjektion ist das injizierte Volumen noch geringer als zuvor bei den HCA-Injektionen. Fünf bis 15 nl Kainsäure nehmen ein Volumen eines Würfels mit den Kantenlängen 170 - 250 μm ein. Das von der Kainsäureinjektion erfasste Gebiet erstreckt sich aufgrund der Diffusion also über etwas mehr als das Volumen dieses Würfels. Auch hier erfolgte also eine sehr lokale Applikation, sodass das Auslösegebiet gut abgegrenzt werden kann.

HCA und Kainsäure binden an NMDA- bzw. Kainrezeptoren. Diese Rezeptoren sind postsynaptisch an Synapsen, Zellsomata und Dendriten lokalisiert. Ein Auftreten von Vokalisation nach einer HCA- bzw. Kainsäure-Injektion deutet also auf das Vorkommen von Schaltstellen der Vokalisationsbahn innerhalb des stimulierten Gebietes hin.

Aufgrund der Auslösbarkeit von Vokalisation mit HCA bzw. Kainsäure lässt sich eine Aussage über das Vorkommen von Schaltstellen der Vokalisationsbahn im getesteten Gebiet treffen. Durchziehende Fasern können (anders als bei der elektrischen Reizung) aufgrund der fehlenden Rezeptoren nicht von der pharmakolo-

gischen Reizung erfasst und für die Auslösung einer Vokalisation verantwortlich gemacht werden.

5.1.2.2 Ausschaltung von Hirngebieten mit Muscimol bzw. Kynurensäure

Das PAG und der NBIC wurden mit Kynurensäure oder mit Kynurensäure und auch mit Muscimol reversibel ausgeschaltet. Beide Neuropharmaka riefen eine Blockade der auszuschaltenden Struktur hervor.

Die Auslösung von Vokalisation hängt von der Aktivierung glutamaterger Synapsen ab (Lu & Jürgens, 1993). Kynurensäure bindet an diese ionotropen Glutamaterezeptoren und verhindert somit eine Exzitation. Muscimol bindet an GABA_A-Rezeptoren und hat eine tonisch inhibitorische Wirkung (Lu & Jürgens, 1993).

Um die Qualität von Ausschaltungen zu überprüfen, wurde an 2 Tieren eine Testreihe durchgeführt, bei der an 9 Elektrodentrakten die Wirkung von Kynurensäureinjektionen in das PAG getestet wurde. Es wurde also elektrisch stimuliert, mit der Folge, dass Vokalisation ausgelöst werden konnte, dann wurde Kynurensäure (200 - max. 400 nl) injiziert und erneut an allen zuvor getesteten Positionen elektrisch stimuliert. Diese Testreihe zeigte, dass die Injektion von Kynurensäure alle zuvor auslösbaren Vokalisationen blockierte, auch wenn der Stimulationsort bis zu 800 µm vom Injektionsort entfernt lag.

Im Fall der Ausschaltung des PAGs bei gleichzeitiger Stimulation des NBICs wurden an 4 Positionen Kynurensäureinjektionen durchgeführt. Dabei wurde ein Gesamt-Injektionsvolumen von 600 nl (45 nmol) nicht überschritten. Die im NBIC ausgelösten Vokalisationen sind nicht von einer Kynurensäureinjektion in das PAG, also einer Ausschaltung desselben beeinflussbar. Das könnte bedeuten, dass das PAG keine Bedeutung für die im NBIC ausgelösten Vokalisationen hat oder dass es nicht vollkommen ausgeschaltet werden konnte und somit weiterhin seine notwendige Funktion ausüben konnte. Zuvor wurde mit HCA im PAG versucht, Vokalisation auszulösen. An 27 von 41 getesteten Positionen konnte mit HCA Vokalisation ausgelöst werden. Es befinden sich also Schaltstellen (glutamaterge Synapsen) der Vokalisationsbahn im PAG. Eine Injektion des Glutamat-Antagonisten Kynurensäure muss also eine Blockade dieser Schaltstellen zur Folge haben.

Das in der vorausgegangenen Testreihe injizierte Volumen Kynurensäure lag zudem noch unter dem in der eigentlichen Versuchsreihe verwendeten Gesamtvolumen von Kynurensäure. Somit ist das im Hauptversuch verwendete Volumen von der Reichweite (Blockade von Zellen im Umkreis von mindestens 800 µm um die Injektionsstelle) vollkommen ausreichend.

Lu und Jürgens (1993) bewiesen beim Totenkopffaffen, dass das PAG für die Äußerung von Spontanvokalisation intakt sein muss. In der vorliegenden Arbeit war zu beobachten, dass sowohl bei der dem eigentlichen Versuch vorgelagerten Testreihe als auch bei der Ausschaltung des PAGs bei gleichzeitiger Stimulation im NBIC die Spontanvokalisation des Tieres ausblieb. Auch das weist auf eine ausreichende Blockade der vokalisationsrelevanten Teile des PAGs durch die Kynurensäureinjektionen hin.

Etwas komplexer stellt sich der Sachverhalt im Bezug auf den NBIC dar. Im NBIC der Fledermaus *Phyllostomus discolor* sind, wie bereits in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, keinerlei Vokalisationen mit HCA oder Kainsäure auslösbar. Es befinden sich also keine glutamatergen Synapsen innerhalb des NBICs. Zu diesem Ergebnis kamen auch Jürgens und Richter beim Totenkopffaffen (Richter & Jürgens, 1986; Jürgens & Richter, 1986). Sie explorierten diverse Gebiete elektrisch und pharmakologisch mit Glutamat, NMDA und Quisqualat. In der Region, in der der NBIC zu finden ist, ließ sich in beiden Studien elektrisch Vokalisation auslösen, nicht jedoch pharmakologisch. Das bedeutet, dass keine glutamatergen Schaltstellen der Vokalisationsbahn im Gebiet des NBICs vorhanden sind.

Trotzdem ließ sich in der vorliegenden Arbeit in den Vorversuchen eine im NBIC elektrisch ausgelöste Vokalisation mit einer Kynurensäure- bzw. Muscimolinjektion in dieses Gebiet blockieren. Auch in den Versuchen, in denen nach einer Injektion von Kynurensäure bzw. Muscimol in den NBIC im PAG stimuliert wurde, blieb die vor der Injektion im PAG elektrisch ausgelöste Vokalisation durch die Ausschaltung des NBICs aus. Die Ausschaltung des NBICs erfolgte also im gewünschten Rahmen.

5.1.3 Tracermethoden

Um herauszufinden in welche Gebiete das PAG bzw. der NBIC projizieren, bzw. von welchen Gebieten diese Strukturen ihren Input bekommen, wurde zum einen BDA in das PAG injiziert. BDA wird hauptsächlich anterograd transportiert.

Zum anderen wurde mit Alexa Fluor 488 markiertes Dextran sowohl in das PAG als auch in den NBIC injiziert. Dieser Tracer wird sowohl anterograd als auch retrograd transportiert.

Es wurden auch Injektionen mit Meerrettichperoxidase markiertem Weizenkeimagglutinin (WGA-HRP) durchgeführt. Bei diesen Injektionen war jedoch kein Transport nachweisbar, lediglich die Injektionsstellen waren nach der histologischen Aufbereitung des Hirngewebes erkennbar.

5.1.3.1 BDA

Veenman *et al.* (1992) untersuchten BDA als einen eventuell geeigneten anterograden Tracer. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde neben HRP, WGA oder WGA-HRP hauptsächlich PHA-L (*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin) verwendet. PHA-L hat 2 große Nachteile: zum einen erfordert es eine mehrstufige immunhistochemische Aufarbeitung zur Sichtbarmachung des Tracers und zum anderen berichteten einige Wissenschaftler, dass es unberechenbar in der Wirksamkeit ist. Aufgrund dessen testeten Veenman *et al.* BDA und stellten fest, dass BDA einen geeigneten Tracer für anterograde Markierungsstudien in Taube und Ratte ist.

Sie injizierten BDA iontophoretisch (10%ige Lösung, Durchmesser der Injektionselektrode 20 - 50 μm , Injektionsstrom 2 - 5 μA , Überlebenszeit nach der Injektion 6 - 11 Tage) und arbeiteten die Gehirne mit der ABC-Methode kombiniert mit einer DAB-Färbung auf. Als Resultat waren klar definierte Injektionsstellen und klare Markierungen bis zu 15 mm von der Injektionsstelle entfernt zu sehen.

Auch Rajakumar *et al.* (1993) untersuchten BDA bei der Ratte als retrograden und anterograden Tracer und stellten wie Veenman *et al.* fest, dass die Injektionsstellen, die mit diesem Tracer entstehen, klar definiert und recht eng auf das Gebiet um die Injektionselektrode begrenzt sind. Sie schließen daraus eine geringe Diffusion dieses Stoffes im neuronalen Gewebe. Aufgrund verschiedener Beobachtungen schlossen sie, dass BDA nicht von intakten Fasern aufgenommen und transportiert wird (Rajakumar *et al.*, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde wie bei Veenman *et al.* eine 10%ige Lösung iontophoretisch (3 μA , Innendurchmesser der Injektionselektrode 12 - 15 μm) appliziert und das Tier nach 7 Tagen perfundiert. Die histologische Aufarbeitung erfolgte mit der direkten Avidin Methode (DAV) und anschließender Ammonium-Tungstat-Paratungstat-Färbung (TIM-Färbung). Mittels dieser Färbung waren sowohl Injektionsstellen als auch der Transport des Tracers sehr gut nachzuweisen. Eine BDA-Injektion mit anschließender TTN-Färbung als Nachweismethode liefert nicht die gewünschten Ergebnisse.

Somit ist festzustellen, dass BDA als Tracer in der Fledermaus *Phyllostomus discolor* gut anwendbar ist und auch gute Ergebnisse liefert, sofern im Anschluss an die Injektion die geeignete Nachweismethode gewählt wird.

5.1.3.2 Alexa 488-Dextran

Alexa Fluor 488 ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der mit Licht der Wellenlänge 493 nm angeregt wird und dann ein Licht der Wellenlänge 522 nm emittiert (Panchuk-

Voloshina et al., 1999). Um die Transporteigenschaften in der Zelle zu verbessern, werden Alexa-Fluoreszenz-Farbstoffe oft als Konjugate anderer Stoffe verwendet. So z.B. in der vorliegenden Arbeit als Alexa 488-Dextran oder in der Arbeit von Panchuk-Voloshina *et al.* als Konjugat aus Alexa 488 und einem Goat-anti-mouse Gammaglobulin (GAM). Panchuk-Voloshina *et al.* stellten fest, dass Alexa-Farbstoff-Konjugate nicht die Änderung in ihrem Absorptionsspektrum erfahren, die z.B. für Rhodamin-Farbstoff-Konjugate typisch ist. So fluoresziert das GAM-Konjugat (mit Alexa Fluor 488) stärker, als das GAM-Konjugat mit Fluoreszein-5-isothiocyanat (FITC).

Die Leuchtkraft und Photostabilität des Alexa-Farbstoffes hängt zudem vom Einbettmedium ab. So ist VectaShield[®] für Alexa 488 Konjugate das ideale Einbettmedium (Panchuk-Voloshina et al., 1999), und wurde daher in der vorliegenden Arbeit verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Alexa 488-Dextran mittels Druck in das Gehirn an die gewünschte Position injiziert. Anschließend wurde das Prinzip der Elektroporation angewendet. Dabei unterbricht die Applikation von elektrischem Strom kurzzeitig die Plasmamembran und Moleküle können aufgrund ihrer Ladung in die Zelle gelangen (Young & Feng, 2004).

Die Injektion von Alexa 488-Dextran bedarf keiner weiteren Nachweismethode um den Tracer sichtbar zu machen. Die Hirnschnitte werden lediglich auf Objektträger gezogen und mit VectaShield[®] eingedeckt. In der anschließenden Betrachtung der Hirnschnitte wurde klar, dass der Tracer von den Zellen rund um die Injektionsstelle aufgenommen und transportiert wurde. Es waren markierte Axone und auch Zellkörper erkennbar.

Alexa 488-Dextran stellt also einen geeigneten Tracer zum Nachweis von neuronalen Verbindungen bei der Fledermaus *Phyllostomus discolor* dar.

5.1.3.3 WGA-HRP

Die Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) wurde 1971 als Tracer für neuronale Verbindungen entdeckt. Man fand heraus, dass HRP über die Terminalien aufgenommen und retrograd transportiert wird (Kristensson & Olsson, 1971). Weiterführende Studien begründeten den Nutzen von HRP als leistungsstarkes Werkzeug sowohl für anterograde (Lynch et al., 1974) als auch retrograde Markierungen (LaVail & LaVail, 1972; Nauta et al., 1974).

Freie Lectine wie Weizenkeimagglutinin (WGA) wurden ebenfalls als neuronale Tracer eingesetzt (Schwab et al., 1978; Margolis et al., 1980) und 1979 wurde erstmals von einer höheren Sensitivität von HRP in Kombination mit WGA für re-

trograde Studien innerhalb des Nervensystems berichtet (Gonatas et al., 1979). Die Kombination von HRP und WGA hat 2 entscheidende Vorteile: WGA hat eine Affinität zu Membranoberflächen und begünstigt somit die Aufnahme des Tracer in das Neuron und HRP kann anschließend in der histologischen Aufarbeitung mit Tetramethylbenzindin (TMB) zur Reaktion gebracht und somit sichtbar gemacht werden (Mesulam, 1978).

WGA-HRP wird seither in der Neurobiologie für viele Spezies zur Untersuchung von Verbindungen von Hirnstrukturen verwendet. So z.B. im Fall für Projektionen von und zum PAG bei Katze (Bandler & Tork, 1987; Mouton & Holstege, 1994), Ratte (Beitz, 1989), Kaninchen (Wilson & Kapp, 1991), Meerschweinchen (Kuipers & Klop, 2006), Rhesusaffe (Vanderhorst et al., 2002) und Totenkopffaffe (Dujardin & Jürgens, 2005).

Bei der Fledermaus wurde WGA-HRP bisher bei folgenden Arten erfolgreich angewendet: Schnurrbartfledermaus (*Pteronotus p. parnellii*) (Gordon & O'Neill, 2000; Schuller et al., 1997; Casseday et al., 1989), Hufeisennase (*Rhinolophus rouxi*) (Radtke-Schuller, 2004; Radtke-Schuller et al., 2004; Behrend & Schuller, 2000), Große Braune Fledermaus (*Eptesicus fuscus*) (Huffman & Covey, 1995). Es gibt bisher eine bekannte Studie, in der HRP an der Lanzennase *Phyllostomus discolor* erfolgreich als Tracer eingesetzt wurde (Aschoff & Ostwald, 1987). Untersuchungen mit WGA-HRP wurden bei dieser Fledermausart bisher nicht veröffentlicht und eigene Ergebnisse zeigen, dass WGA-HRP bisher nur nach Festinjektion hoher Konzentrationen transportiert wurde und Ergebnisse lieferte (persönliche Mitteilung Hoffmann).

5.1.4 Einfluss der Sedierung auf die Ergebnisse

Alle Versuchstiere wurden mit einer Initialdosis von 0,1 - 0,25 ml Rompun® der Konzentration 0,04% sediert und während des Versuchs dauerhaft mit 2 - 6 µl Rompunlösung der gleichen Konzentration versorgt. Über den Zeitraum des Versuchs hinweg konnte keine Veränderung in den Auslöseschwellen für Vokalisation festgestellt werden. Auch wenn die Tiere aufgrund von Stress Dosen an der oberen Grenze verabreicht bekamen, blieben die Schwellen der ausgelösten Vokalisation auf dem üblichen Niveau.

An einem Tier wurde Midazolam als Sedativum getestet. Dazu wurde eine Initialdosis von 0,04 ml (0,03mg Midazolam) gegeben und aufgrund der Reaktion des Tieres auf eine Dauerinjektion verzichtet. Midazolam gehört in die Gruppe der Benzodiazepine und verstärkt wie alle Stoffe dieser Gruppe die Wirkung des kör-

pereigenen GABA. Somit werden Nervenzellen im ZNS zumeist gehemmt. Diese Wirkung war anhand der Reaktionen des Tieres sehr deutlich zu sehen. Zuvor unter Rompunsedierung auslösbare Vokalisation war unter Midazolam nicht mehr auslösbar, auch wenn die Schwelle bis auf maximal 80 μ A erhöht wurde. Zudem saß das Tier deutlich ruhiger als unter der Rompunsedierung in der Apparatur und vokalisierte nicht spontan. Daher stellt Rompun für diese Untersuchung das bessere Sedativum dar und wurde für alle Versuche in der angegebenen Konzentration verwendet.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Auslösung von Vokalisation im PAG und im NBIC

5.2.1.1 PAG

Im PAG sind bei unterschiedlichen Tierarten verschiedene, artspezifische Vokalisationen elektrisch und auch pharmakologisch auslösbar (Yajima et al., 1980; Schuller & Radtke-Schuller, 1990; Nonaka et al., 1997; Jürgens & Ploog, 1970; Larson, 1985; Brown, 1915; Lu & Jürgens, 1993; Bandler & Carrive, 1988).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auch im PAG der Fledermaus *Phyllostomus discolor* artspezifische und natürliche Echoortungs- und Kommunikationslaute sowohl elektrisch als auch pharmakologisch auslösbar sind. Die Verteilung der Positionen, an denen sich bestimmte Lautformen auslösen lassen, unterliegt folgender räumlichen Ordnung: Im rostralen Bereich des PAGs bis ca. 8500 μ m sind ausschließlich Echoortungslaute, weiter caudal sind neben Echoortungslauten auch Kommunikationslaute auslösbar. Die räumliche Lage der Positionen, an denen die verschiedenen Lauttypen ausgelöst werden konnten, war also nicht deutlich getrennt. Im caudalen Bereich des PAGs überlappten die Positionen an denen Kommunikations- bzw. Echoortungslaute ausgelöst werden konnten in großem Maße.

Auch beim Totenkopffaffen sind im dorsalen PAG (das entspricht dem rostralen PAG bei der Fledermaus) und im ventrolateralen PAG unterschiedliche Laute auslösbar, deren Positionen in großem Maße überlappen (Jürgens & Ploog, 1970).

Bei der Katze fand man eine topographische Verteilung von Positionen, an denen Laute auslösbar waren mittels Injektionen von HCA (Zhang et al., 1994). Im rostralen PAG konnte dabei Fauchen und im caudalen PAG Heulen, Miauen und seltener Knurren ausgelöst werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass Fauchen zwar im PAG der Katze ausgelöst werden kann, sich aber bei dieser Art der

Vokalisation die Stimmlippen nicht bewegen. Heulen und Miauen ist caudal im PAG der Katze auslösbar und erfolgt ausschließlich mit Stimmlippenbewegung.

Im PAG des Meerschweinchens wurde ebenfalls eine räumlich unterschiedliche Verteilung der Positionen, an denen Vokalisation ausgelöst werden konnte gefunden (Kyuhou & Gemba, 1998). Im rostralen Teil des PAGs konnte mit elektrischer Stimulation ein "low whistle" ein Isolationslaut ausgelöst werden. Im caudalen PAG konnten Kyuhou und Gemba einen Paarungslaut, ein sogenanntes Schnurren auslösen. Die Laute unterscheiden sich insofern, dass der Isolationslaut rund 80 ms lang ist und mehrere Harmonische im Frequenzbereich von 400 Hz bis zu 2,5 kHz besitzt. Der Schnurrlaut ist mit 20 - 30 ms kürzer als der "low whistle" und überstreicht eine Frequenz von 200 - 1500 kHz.

Verschiedene Bereiche des PAGs triggern also anscheinend die Äußerung unterschiedlicher Lauttypen. Eine logische Konsequenz dessen wäre, dass die unterschiedlichen PAG-Bereiche auch von verschiedenen Hirngebieten ihren Eingang bekommen. Kyuhou und Gemba (1998) untersuchten dazu die anatomischen Verbindungen die zu den verschiedenen PAG-Bereichen bestehen. Sie fanden mittels Injektionen von WGA-HRP heraus, dass der Teil des PAGs, in dem der "low whistle" ausgelöst werden konnte starke Eingänge vom ventralen Teil des anterioren cingulären Kortex bekommt. Weniger starke Markierungen fanden die Physiologen im hypothalamischen Kern und im orbitalen Kortex.

Der Teil des PAGs in dem der Schnurrlaut auslösbar war, zeigte starke retrograde Projektionen zum medialen Hypothalamus. Schwächere Projektionen wurden in der Amygdala gefunden, während zum anterioren cingulären Kortex keinerlei Projektionen registriert werden konnten. Somit wird das rostrale PAG beim Meerschweinchen von anderen Strukturen innerviert als das caudale.

In der vorliegenden Arbeit wurde Alexa 488-Dextran in das PAG injiziert. Wie auch bei Kyuhou und Gemba traten unter anderem Projektionen zum Gyrus cinguli und in die hypothalamische Region auf. Da der Tracer eher im rostralen PAG injiziert wurde, decken sich die Ergebnisse mit denen von Kyuhou und Gemba von 1998. Weitere Projektionen von Injektionsstellen verschiedener Tracer werden im Abschnitt 5.6 Tracerinjektionen und Transport beschrieben.

Die in dieser Arbeit elektrisch im PAG ausgelösten Laute unterscheiden sich z.T. in der Lautlänge sehr von den natürlich geäußerten Lauten, die in der Arbeit von Pistohl (1998) beschrieben wurden. So konnten z.B. Laute des Lauttyps 1 in dieser Arbeit mit 11 - 16 ms Länge ausgelöst werden. In der Arbeit von Pistohl wird der Laut mit einer Dauer von rund 149 ms beschrieben. In den anderen Eigenschaften sind die beiden Laute jedoch sehr ähnlich, sodass die Klassifizie-

zung zu diesem Lauttyp erfolgte. Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede in der Lautlänge kann die elektrische Stimulation sein. Mit dem artifiziellen Reiz wird dem gesamten Vokalisationssystem, also auch dem Atmungsapparat ein Muster sozusagen oktroyiert. Das ganze System wird gezwungen im Rhythmus des elektrischen Reizes zu arbeiten. Der Stimulus selbst besteht aus 6 Stimuli mit 15 ms Länge (die ihrerseits aus 15 Stimuli mit 100 μ s Länge und einer 900 μ s langen Pause bestehen). Dieser Stimulus ist möglicherweise nicht in der Lage, einen Laut mit den Eigenschaften des Lauttyps 1 (geräuschhafter Charakter) und einer durchschnittlichen Länge von 149 ms hervorzurufen.

Desweiteren ist bekannt, dass bei der Fledermaus *Eptesicus fuscus* spontan geäußerte Laute von Tieren in Gefangenschaft von kürzerer Dauer, kürzeren Interpulsintervallen und geringerer Variabilität in der Bandbreite gegenüber Lauten von Tieren in freier Wildbahn gekennzeichnet sind (Surlykke & Moss, 2000).

Für die vorliegende Arbeit wurden Labortiere verwendet. Auch wenn das für *Eptesicus fuscus* beschriebene Phänomen innerhalb der Art *Phyllostomus discolor* vorliegen würde, wäre die Zuordnung der Laute der vorliegenden Arbeit zu den einzelnen Lauttypen davon unbeeinflusst, da die Einteilung nach den Daten von Pistohl (1998) erfolgte, die für ihre Studie ebenfalls Labortiere verwendete.

5.2.1.2 NBIC

Im NBIC konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl Echoortungslaute als auch die den Echoortungslauten sehr ähnlichen kurzen Zirplaute mit elektrischer Reizung ausgelöst werden. Diese Arbeit bestätigt die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie an der Fledermaus *Phyllostomus discolor*, in der ebenfalls Echoortungslaute und Zirplaute ausgelöst werden konnten (Romanowski, 2005).

Auch beim Totenkopffaffen sind mit elektrischer Stimulation Vokalisationen im Gebiet des NBIC auslösbar (Richter & Jürgens, 1986; Jürgens & Richter, 1986). Richter und Jürgens überprüften zudem, ob im NBIC auch pharmakologisch Vokalisation auslösbar ist. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass im Gebiet des NBICs weder mit Glutamat, NMDA noch mit Quisqualat Vokalisation auslösbar ist. Das bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in der an keiner NBIC-Position pharmakologisch (mit Homocysteinsäure und/oder Kainsäure) Vokalisation evozierbar war. Der NBIC weist also keine Schaltstellen der Vokalisationsbahn auf, es ziehen aber offensichtlich Fasern der Vokalisationsbahn durch diese Struktur. Bisher wurde bei keiner außer der gerade beschriebenen Tierarten der NBIC näher auf Auslösbarkeit von Vokalisation untersucht.

5.3 Ausschaltung des PAGs bei elektrischer Stimulation im NBIC

Das PAG wurde sowohl mit Kynurensäure als auch Muscimol reversibel ausgeschaltet, während im NBIC (ipsilateral und / oder contralateral) oder angrenzenden Strukturen elektrisch stimuliert wurde. Zwei Stimulationen trafen nicht den NBIC sondern die Substantia nigra. In diesem Gebiet ausgelöste Vokalisation lässt sich auch nach einer PAG-Ausschaltung mit der gleichen Schwelle ($8 \mu\text{A}$) auslösen. Die Substantia nigra hat bei mehreren Spezies eine vokalisationsrelevante Bedeutung. So führt z.B. die elektrische Stimulation dieser Region bei Totenkopffaffen zur Vokalisation (Jürgens & Richter, 1986) und eine Läsion in dieser Region führt zu einer drastischen Veränderung der Vokalisation (Kirzinger & Jürgens, 1985). Es wurden bei der Hufeisennase und der Schnurrbartfledermaus aufsteigende Projektionen von der Substantia nigra zum paralemniscalen Tegmentum gefunden, welches als Bindeglied zwischen der Verarbeitung der Hörinformation und der Vokalisationskontrolle dient (Metzner, 1996; Schuller et al., 1997). Bei der Ratte wurden Projektionen von vokalisationsrelevanten Strukturen wie dem PAG und den tiefen Schichten des Colliculus superior zur Substantia nigra gefunden (Beitz, 1989). Das PAG weist auch beim Kaninchen schwache Projektionen zur Substantia nigra auf (Meller & Dennis, 1991). Bei der Fledermaus und auch anderen Spezies ist bisher keine Verbindung zwischen PAG und Substantia nigra bekannt.

In der vorliegenden Arbeit hat die Ausschaltung des PAGs keinen Einfluss auf die in der Substantia nigra ausgelöste Vokalisation. Geht man von einer hierarchischen Organisation des Vokalisationssystems aus, müsste die Substantia nigra dem PAG nachgeschaltet sein. Damit hat eine Ausschaltung des PAGs, und bei intaktem PAG auch die von dieser Struktur ausgeübte Triggerfunktion, keine Auswirkung auf in der Substantia nigra ausgelöste Vokalisationen. Eine parallele Verschaltung ist aber ebenso denkbar. Das würde bedeuten, dass die Aktivierung der Substantia nigra allein zu einer Vokalisation führt und zusätzliche Signale vom PAG nicht zwingend notwendig sind.

Im NBIC ausgelöste Vokalisationen werden durch eine Ausschaltung des PAGs unterschiedlich beeinflusst. Ein am ventralen Rand des NBICs ausgelöster kurzer Zirplaut konnte durch eine PAG-Ausschaltung nicht blockiert werden. Er war vor und nach der Ausschaltung des PAGs mit einer sehr geringen Schwelle von $9 \mu\text{A}$ auslösbar. Ein in der rostrocaudalen, mediolateralen und dorsoventralen Ausdehnung des NBICs zentral ausgelöster Zirplaut veränderte sich in seiner Lautstruktur

bereits 5 Minuten nach der 2. Injektion von Kynurensäure (200 nl je Injektion) in das PAG. Zehn Minuten nach der 4. Kynurensäureinjektion konnte er nicht mehr mit der ursprünglichen Schwelle von 20 μ A ausgelöst werden. Am Folgetag stellte sich die ausgelöste Vokalisation in den bekannten Parametern dar (Lautstruktur und Auslöseschwelle). Bei beiden getesteten Positionen ist davon auszugehen, dass der vokalisationsrelevante Teil des PAGs ausgeschaltet wurde, da die gleichen Injektionspositionen wie in der vorangegangenen Testreihe verwendet wurden und zudem die Spontanvokalisation des Tieres ausblieb.

Somit scheint der ventrale Teil des NBICs anders in der Vokalisationbahn integriert zu sein als der zentrale Teil. Interpretiert man diese Daten unter Annahme einer hierarchischen Organisation des Vokalisationssystems, müsste man annehmen, dass der ventrale Teil des NBICs dem PAG nachgeschaltet ist. Ein Hinweis für diese Verschaltung sind z.B. bei der Katze nachgewiesene, direkte aufsteigende Verbindungen vom NBIC zum PAG (Kudo et al., 1984). Der zentrale Teil des NBICs hingegen müsste unter Annahme des hierarchischen Konzepts dem PAG nachgeschaltet sein, da eine Ausschaltung des PAGs eine Veränderung und sogar Blockade von im zentralen Teil des NBICs ausgelösten Vokalisationen nach sich zieht. Plausibler klingen diese Daten jedoch unter der Annahme einer parallelen Organisation des Vokalisationssystems. Dabei sind der ventrale und der zentrale Teil des NBIC nicht unterschiedlich mit dem PAG verschaltet, sondern für die Auslösung von Vokalisation vom zentralen Teil des NBICs werden neben der Aktivierung dieses NBIC-Gebiets zusätzlich Signale aus dem PAG benötigt. Für die Auslösbarkeit vom ventralen NBIC bedarf es dieser Signale nicht, es reicht die Aktivierung dieser NBIC-Region.

5.4 Ausschaltung des NBICs bei elektrischer Stimulation im kontralateralen NBIC

Für die Betrachtung des Verhaltens von elektrisch ausgelöster Vokalisation bei Ausschaltung der entsprechenden kontralateralen Struktur kommt von den vorliegenden Ergebnissen nur eine Position in Frage.

Ausgelöst wurde ein Zirplaut im ventralen NBIC der Ebene 10750 μ m. Die Ausschaltung der kontralateralen Struktur erfolgte ebenfalls auf der Ebene 10750 μ m. Der Injektionsort lag jedoch 200 μ m medial vom NBIC entfernt. Wie unter Punkt 5.1.2.2 beschrieben, blockiert eine Injektion von 200 nl Kynurensäure Vokalisationen, die im Umkreis von bis zu 800 μ m Entfernung ausgelöst werden können.

Zudem war das mit der Ausschaltung des NBICs typische Herunterknicken des kontralateralen Ohrs des Tieres zu beobachten.

Der gleiche Injektionsort wurde später zur Ausschaltung des NBICs bei Stimulation des PAGs verwendet und verursachte ein Ausbleiben der im PAG ausgelösten Vokalisation. Dementsprechend kann hier davon ausgegangen werden, dass ein für die Vokalisation entscheidender Teil des NBICs ausgeschaltet werden konnte.

Die Ausschaltung des kontralateralen NBICs hat für eine im anderen NBIC ausgelöste Vokalisation also keine Bedeutung. Die meisten vokalisationsbezogenen Läsionsexperimente lassen auf eine unilaterale Verschaltung schließen. So sind z.B. im Vorderhirn ausgelöste Vokalisationen durch ipsilaterale PAG-Ausschaltung blockierbar. Eine kontralaterale Ausschaltung des PAGs ist hingegen wirkungslos (Jürgens & Zwirner, 1996). Das bedeutet aber auch, dass für elektrisch ausgelöste Vokalisation, vokalisationsrelevante Strukturen nicht gezwungenermaßen bilateral aktiv sein müssen.

5.5 Ausschaltung des NBICs bei elektrischer Stimulation im PAG

An 10 von 12 getesteten Positionen im PAG und in dessen Umgebung konnte Vokalisation ausgelöst werden, die mit einer Kynurensäureinjektion in den NBIC bzw. in die nähere Umgebung desselben blockiert werden konnte. Dabei handelte es sich sowohl um Echoortungslaute als auch Kommunikationslaute die blockiert werden konnten, obwohl im NBIC selbst (ausschließlich mit elektrischer Stimulation) nur Echoortungslaute und Zirplaute, die den Echoortungslauten sehr ähnlich sind, ausgelöst werden konnten. Die Auslösung jeweils eines Echoortungslauts und eines Kommunikationslauts konnte nicht mittels einer Ausschaltung des NBICs blockiert werden.

Der Echoortungslaut, der durch die Ausschaltung des NBICs nicht blockiert werden konnte, wurde in der *Formatio reticularis*, 450 μm vom PAG entfernt auf der Ebene 8750 μm ausgelöst. In der *Formatio reticularis* ist mit elektrischer Stimulation bei Fledermäusen Vokalisation auslösbar, die von natürlicher geäußerter Echoortung nicht zu unterscheiden ist (Suga et al., 1973; Suga et al., 1974). Vokalistionskorreliert sind in der retikulären Formation Zellen aktiv (Suga & Yajima, 1989; Jürgens, 2002; Hage & Jürgens, 2006). Läsionsexperimente zeigen, dass bei der Katze neben der Ausschaltung des *Nucleus retroambiguus* eine Ausschalt-

tung der *Formatio reticularis* zur Blockade einer im PAG ausgelösten Vokalisation führt (Shiba et al., 1997). Es ist bekannt, dass ein Teil der retikulären Formation direkt zu den phonatorischen Motoneuronen projiziert. Sie ist Teil einer Vokalisationsbahn, die vom Motorkortex über die *Formatio reticularis* bis zu den Motoneuronen zieht und für die Äußerung erlernter Vokalisationen zuständig ist. Diese Vokalisationsbahn scheint für angeborene Vokalisationen entbehrlich (Jürgens, 2008). Die hier untersuchten Vokalisationen sind angeborene Vokalisationen, es ist also unter der eben genannten Annahme nicht verwunderlich, dass die Vokalisation nicht blockiert werden konnte.

Bei dem Kommunikationslaut, der nicht blockiert werden konnte, lag die Kynurensäureinjektionsstelle 300 μm vom NBIC entfernt im *Colliculus inferior*. Geht man davon aus, dass bis zu 800 μm entfernte Gebiete von einer Kynurensäureinjektion beeinflusst werden können (siehe 5.1.2.2), traf ein Teil der injizierten Kynurensäure die zentrale Region des NBICs. Das war ungefähr auch an der Position, an der zuvor ein elektrisch ausgelöster Laut mittels einer Kynurensäureinjektion ins PAG blockiert werden konnte. Somit bestätigt dieses Ergebnis wieder die Annahme, dass der zentrale Teil des NBICs anders in die Vokalisationsbahn integriert ist als der ventrale Teil. Geht man unter der Annahme einer parallelen Verschaltung davon aus, dass der zentrale Teil des NBICs durch die Kynurensäureinjektion ausgeschaltet wurde, wird deutlich, dass im PAG ausgelöste Vokalisationen nicht zusätzlich der Signale aus dem zentralen NBIC bedürfen, es reicht eine Aktivierung des PAGs um eine Vokalisation zu evozieren.

Die anderen elektrisch ausgelösten Vokalisationen, die an 10 PAG-Positionen (6 Echoortungslautpositionen, 4 Kommunikationslautpositionen) ausgelöst werden konnten, waren durch eine Kynurensäureinjektion in den NBIC blockierbar. Dabei fällt auf, dass alle wirksamen Kynurensäureinjektionen im ventralen Teil des NBICs lokalisiert sind. Tabelle 4.2 zeigt, wo Vokalisation ausgelöst wurde, wo Kynurensäure injiziert wurde und wie schnell nach der Injektion die Vokalisation blockiert werden konnte.

Aus Tabelle 4.2 ist zu erkennen, dass Echoortungslaute, die 50 - 100 μm vom PAG entfernt ausgelöst wurden, durch eine Injektion von Kynurensäure in ein Gebiet 100 - 450 μm vom NBIC entfernt, blockiert werden können. Die Blockade tritt direkt nach der Injektion des Glutamat-Antagonisten ein. Im NBIC lassen sich ausschließlich Echoortungslaute und Zirplaute auslösen. Trotzdem sind auch im PAG ausgelöste Kommunikationslaute mit Injektionen von Kynurensäure in den ventralen NBIC blockierbar. Somit beschränkt sich die Notwendigkeit des NBICs nicht nur auf die Echoortungs- und Zirplaute, die in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, sondern

auch auf andere Kommunikationslaute, die keine strukturelle Ähnlichkeit mit den Zirplauten aufweisen.

Der NBIC weist aufsteigende Verbindungen zum PAG auf (Kudo et al., 1984). Im PAG ausgelöste Laute können durch eine Ausschaltung des ventralen NBICs blockiert werden. Unter Annahme eines hierarchischen Konzepts müssen PAG und der ventrale Teil des NBICs innerhalb der Vokalisationsbahn nacheinander geschaltet sein, wie auch die Arbeit von Kudo (1984) schließen lässt. Nach diesem Konzept der Hierarchie müsste allerdings der zentrale Teil dem PAG vorgeschaltet sein, da Ausschaltungen im zentralen Teil des NBICs keine Auswirkung auf im PAG ausgelöste Vokalisationen haben und eine Ausschaltung des PAGs ein Ausbleiben von im zentralen NBIC ausgelösten Lauten zur Folge hat. Die unterschiedliche Verschaltung von verschiedenen Regionen einer Struktur innerhalb eines Systems ist eher unwahrscheinlich, so dass für die PAG-NBIC-Beziehung eher eine parallele Verschaltung in Frage kommt. Dabei werden Signale einer Struktur benötigt, damit von einer anderen Struktur Vokalisation ausgelöst werden kann. Bei Stimulation im zentralen NBIC sind Signale aus dem PAG notwendig, damit eine Vokalisation entstehen kann und für die Auslösung von Vokalisation im PAG bedarf es der Signale aus dem ventralen NBIC (siehe Abb. 5.1).

Tabelle 4.2 zeigt weiterhin, dass ein im PAG ausgelöster Kommunikationslaut mit einer Injektion von Kynurensäure in die Substantia nigra blockierbar ist. Wie bereits im Abschnitt 5.3 erwähnt, hat die Substantia nigra eine Bedeutung für die Vokalisation (Jürgens & Richter, 1986; Kirzinger & Jürgens, 1985; Metzner, 1996; Schuller et al., 1997). Es wurden Projektionen vom PAG zur Substantia nigra sowohl bei der Ratte als auch beim Kaninchen gefunden (Beitz, 1989; Meller & Dennis, 1991). Mit den vorliegenden Ergebnissen aus 5.3, dass eine Vokalisation in der Substantia nigra mit einer Kynurensäureinjektion ins PAG nicht blockiert werden kann, eine im PAG ausgelöste Vokalisation aber nach einer Injektion von Kynurensäure in die Substantia nigra ausbleibt, ist zu schließen, dass die Substantia nigra auch bei der Fledermaus *Phyllostomus discolor* eine vokalisationsrelevante Bedeutung hat.

Echoortungslaute und auch Kommunikationslaute die in der *Formatio reticularis* der Ebene 9750 μm ausgelöst werden konnten, waren mit Kynurensäureinjektionen in den ventralen NBIC bzw. 100 μm entfernt davon blockierbar. Die Bedeutung der *Formatio reticularis* für die Vokalisation ist unter Abschnitt 5.5 beschrieben. Die blockierbaren Vokalisationen wurden 1000 μm weiter caudal als die nicht-blockierbare Vokalisation in der *Formatio reticularis* (Rostrocaudal-Ebene 8750 μm) ausgelöst. Es ist also entscheidend, wo in der *Formatio reticularis* eine

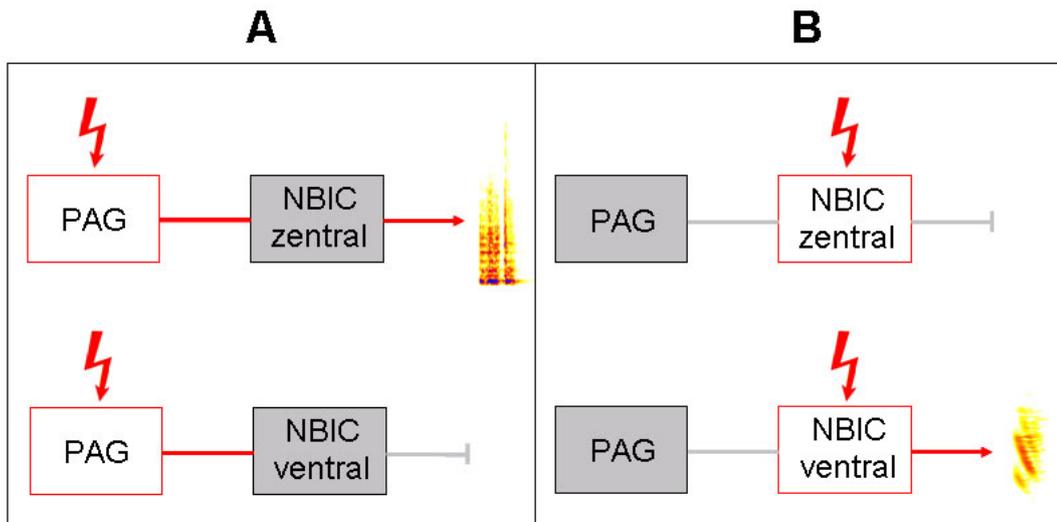


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Auslösbarkeit von Vokalisation A) mittels Stimulation im PAG und Ausschaltung des NBICs und B) mittels Stimulation im NBIC und Ausschaltung des PAGs. Stimulationsgebiete sind mit einem Blitz gekennzeichnet und rot hinterlegt, ausgeschaltete Regionen sind grau hinterlegt. Rote Linien kennzeichnen einen Signaleingang, rote Pfeile kennzeichnen das Auftreten von Vokalisation. Graue Linien kennzeichnen fehlenden Signaleingang bzw. kein Auftreten von Vokalisation.

Vokalisation ausgelöst wird, um sie mit einer Kynurensäureinjektion in den NBIC blockieren zu können. Vom NBIC aus ziehen aufsteigende Fasern zur ventrolateralen retikulären Formation (Kudo et al., 1983).

Beim Totenkopfpaffen lassen sich z.B. kortikal ausgelöste Vokalisationen durch Kynurensäureinjektionen in die *Formatio reticularis myelencephali* blockieren, nicht jedoch durch Injektionen in die dorsorostral davon gelegene *Formatio reticularis pontis oralis* und/oder *Formatio reticularis pontis caudalis* (Jürgens & Ehrenreich, 2007). Kortikal ausgelöste Vokalisationen laufen also nur über den ventrocaudalen Teil der *Formatio reticularis*. Somit sind also weiter caudal in der retikulären Formation ausgelöste Vokalisationen mit einer Kynurensäureinjektion in den NBIC blockierbar, da die caudale *Formatio reticularis* anders als die rostraler gelegene, direkte Verbindungen zum NBIC aufweist.

5.6 Tracerinjektionen und Transport

Die Verbindungen des PAGs bzw. NBICs zu anderen vokalisationsrelevanten Strukturen sollten mit Tracerinjektionen nachgewiesen werden. Dazu wurde einerseits

BDA bzw. Alexa 488-Dextran in das PAG injiziert, andererseits Alexa 488-Dextran in den NBIC. Anschließend wurden die angefertigten Hirnschnitte ausgewertet und mit bereits vorliegenden Daten aus anderen Studien verglichen.

5.6.1 Injektion von BDA bzw. Alexa 488-Dextran in das PAG

Die Auswertung der Hirnschnitte nach der Injektion von BDA und Alexa 488-Dextran ergaben Projektionen vom PAG zu mehreren Strukturen. Diese Gebiete werden hier z.T. noch einmal näher betrachtet. Nach der Injektion von BDA werden Markierungen in den motorischen Gebieten der Vokalisation (parabrachialer Nucleus (PB), Nucleus ambiguus (NA) und Nucleus retroambiguus (NRA)) sichtbar.

Der PB hat einerseits Einfluss auf den Atemrhythmus und andererseits ist er eine zentrale Komponente der motorischen Vokalisationsbahn beim Säuger (Feldman & Gautier, 1976; Jürgens, 2002; Smotherman et al., 2003). Der PB projiziert seinerseits zu laryngealen und respiratorischen Motoneuronenpools (Herbert et al., 1990; Jürgens, 2002). Neuronen in der parabrachialen Region reagieren auf nicht-vokale orale Bewegungen und sind direkt vor Vokalisationsbeginn aktiv (Kirzinger & Jürgens, 1991).

Weiterhin finden sich vom PAG Projektionen zum Nucleus ambiguus (NA) und Nucleus retroambiguus (NRA). Der NA ist vokalisationskorreliert aktiv, wie bei der Ratte nachgewiesen werden konnte (Gonzalez-Lima & Frysztak, 1991). Bei der Katze wurden Projektionen vom PAG zum NRA aufgezeigt (Holstege, 1989). Der NRA projiziert seinerseits zum NA hat aber auch Verbindungen zu Motoneuronen, die die Oral-, Interkostal- und Abdominalmuskeln, die parallel zur Vokalisation aktiviert sind, innervieren. Eine direkte Verbindung vom PAG zum NA wurde in der Fledermaus nachgewiesen (Rübsamen & Schweizer, 1986), jedoch keine Verbindung zwischen NA und NRA. Die Wichtigkeit der Verbindung von PAG und NA-NRA-Komplex für die Vokalisation ist unbestreitbar.

Die Injektion von Alexa 488-Dextran in das PAG führte zu Projektionen in den anterioren Gyrus cinguli. Dort lässt sich mit Mikrostimulation Vokalisation auslösen (Cooler & O'Neill, 1987; von Cramon & Jürgens, 1983), die Struktur ist vokalisationskorreliert aktiv (Jürgens et al., 2002) und es wurden Verbindungen vom anterioren cingulären Kortex zum PAG nachgewiesen (Kyuhou & Gemba, 1998; Jürgens, 1983). Im anterioren Gyrus cinguli ausgelöste Vokalisationen lassen sich mit einer Injektion eines Glutamat-Antagonisten oder GABA-Agonisten ins PAG ipsilateral zur Auslöseposition im cingulären Kortex blockieren (Jürgens & Lu, 1993; Siebert & Jürgens, 2003).

Auch die Zona incerta (ZI) wies markierte Neurone auf. Nach Injektion eines anterograden Tracers ins PAG wurden Markierungen in der ZI beim Kaninchen, Nager und auch Primaten gefunden (Meller & Dennis, 1991; Beitz, 1989; Dujardin & Jürgens, 2005). Die ZI erhält Eingänge von anderen vokalisationsrelevanten Strukturen, z.B. einer Region des medialen Lemniscus im ventrolateralen Pons, deren Stimulation bei der Katze Miauen, Knurren und Fauchen hervorruft (de Lanerolle, 1990).

In der anterioren hypothalamischen Region konnten nach der Injektion von Alexa 488-Dextran markierte Zellen gefunden werden. Es ist bekannt, dass in dieser Region mittels elektrischer und auch pharmakologischer Stimulation Vokalisation auslösbar ist (Martin, 1976; Jürgens & Richter, 1986; Fu & Brudzynski, 1994). Der Hypothalamus ist das Steuerzentrum des vegetativen Nervensystems und übernimmt die Kontrolle von Funktionen wie Aufrechterhaltung der Temperatur, des Blutdrucks, der Osmolarität, er regelt die zirkadiane Rhythmik und den Schlaf und steuert das Sexual- und Fortpflanzungsverhalten. Bei Mäusen wurde beobachtet, dass nach Injektion von Bicucullin in den anterioren Hypothalamus die post-ejakulatorische Vokalisation reduziert wird (Fernández-Guasti et al., 1986). Beim Totenkopffaffen wurden Verbindungen vom Hypothalamus zum PAG gefunden (Jürgens, 1986).

Abschließend ist zu sagen, dass die Projektionen vom PAG zu den einzelnen Strukturen die bereits bestehenden Daten aus anderen Studien und auch in anderen Spezies bestätigen. Die Verbindungen zu den motorischen Kernen wie NA und NRA sind eindeutig aus den Schnitten mit der BDA-Injektion hervorgegangen und untermauern die bisherigen Erkenntnisse für die vom PAG absteigend verlaufende motorische Vokalisationsbahn. Die mittels Alexa 488-Dextran nachgewiesenen Projektionen vom PAG in Vorderhirn- als auch Hirnstammstrukturen variieren in ihrer Intensität, liefern jedoch keine neuen, sondern unterstreichen bereits vorhandene Kenntnisse über die Einbindung des PAGs innerhalb der Vokalisationsbahn.

5.6.2 Injektion von Alexa 488-Dextran in den NBIC

Der NBIC projiziert zum PAG und zum Colliculus superior. Die zentrale Rolle des PAGs für die Vokalisation wurde in dieser Arbeit weitgehend erläutert und auch weiterführend untersucht. Eine Verbindung des NBICs zu diesem wichtigen Vokalisationsgebiet verdeutlicht seine Wichtigkeit auch für die Vokalisation, nachdem er bisher fast ausschließlich unter auditorischen Aspekten untersucht wurde.

Der Colliculus superior (SC) hat seine Funktion für die Auditorik, das visuelle System und auch in der Sensomotorik, besitzt aber auch Efferenzen und Afferenzen zu Strukturen der Vokalisation. So sind im SC bei *Eptesicus fuscus* mit elektrischer Stimulation und pharmakologischer Reizung mit Kainsäure hochfrequente Vokalisationen auslösbar (Valentine et al., 2002). Wie der NBIC projiziert der SC seinerseits zum PAG, der zentralen Struktur innerhalb der Vokalisationsbahn (Mantyh, 1982). Beim Totenkopffaffen wurden Verbindungen von einer ventrolateralen Vokalisationsregion im Pons zum SC gefunden (Hannig & Jürgens, 2006). Der SC weist Verbindungen zum NA auf (Rübsamen & Schweizer, 1986), der einer der wichtigen motorischen Kerne der Vokalisationsbahn darstellt.

In dieser Arbeit konnten Verbindungen vom NBIC zum tiefen mesencephalären Nucleus (NMP) nachgewiesen werden. In diesem Kern können bei der Fledermaus schon mit geringen Strömen artspezifische Vokalisationen ausgelöst werden (Schuller & Radtke-Schuller, 1990). Beim Nager wurden Projektionen vom PAG zum NMP gefunden (Beitz, 1989). Dies ist ein Hinweis auf die Einbindung des NBICs in die Vokalisationsbahn, da Strukturen der Vokalisation, zu denen der NBIC Efferenzen oder Afferenzen besitzt, miteinander verknüpft sind. Jedoch sind auch audio-vokal-aktive Strukturen, wie das paralemniscle Tegmentum mit dem NMP verbunden (Metzner, 1996). Das unterstreicht wiederum die Rolle des NBICs auch in der auditorischen Verschaltung (Schnupp & King, 1997).

Von der Injektionsstelle im NBIC findet man Projektionen zum 1750 µm rostral gelegenen ipsilateralen peripedunkulären Nucleus (PPN). In dieser Struktur wurde vokalisationskorreliert Aktivität nachgewiesen (Jürgens et al., 2002). Diese Projektionen decken sich mit den Ergebnissen bei der Katze. Dort wurden auch direkte Verbindungen vom NBIC zur peripedunkulären Region gefunden (Kudo et al., 1984). Der PPN spielt wie der NBIC auch für die auditorische Verarbeitung eine Rolle. In diesem Zusammenhang führten Tracerinjektionen in den inferioren Colliculus zu Markierungen im NBIC und PPN (Senatorov & Hu, 2002).

In einer Studie an Ratten wurden die retrograden und anterograden Verbindungen der peripedunkulären Region untersucht. Man stellte fest, dass neben Projektionen in andere Gebiete diese Region sowohl anterograd als auch retrograd zum dorsalen und zentralen PAG projiziert (Arnault & Roger, 1987). Zu einer Funktion des PPN innerhalb der Vokalisation wird in der Arbeit keine Stellung genommen, doch wird deutlich, dass der PPN eine Rolle in der Vokalisation spielen muss, da er mit mehreren Strukturen, die die Vokalisation beeinflussen, verschaltet ist. Der Verschaltung mit dem PAG zu Folge könnte er eine Feedback-Funktion übernehmen.

5.7 Der NBIC innerhalb des Vokalisationssystems

Aus dieser Arbeit gehen mehrere Hinweise für die Rolle des NBICs innerhalb der Vokalisation hervor: Im NBIC lassen sich elektrisch sowohl Echoortungslaute als auch Kommunikationslaute auslösen. Die auslösbaren Kommunikationslaute sind ausschließlich vom Lauttyp der kurzen Zirplaute, die in ihrer Struktur stark Echoortungslauten ähneln. Der NBIC ist also sowohl für die Koordination von Kommunikationslauten als auch Echoortungslauten zuständig.

Die Ergebnisse der Tracerstudien bestätigen Projektionen vom NBIC zum PAG, welches eine zentrale Rolle für die Vokalisation spielt. Außerdem finden sich Projektionen zum peripedunkulären Nucleus, der seinerseits vokalisationskorreliert aktiv ist, aber auch eine Rolle in der auditorischen Verarbeitung spielt, ebenso wie der SC, zu dem ebenfalls Projektionen vom NBIC gefunden wurden. Trotz der Projektionen zu vokalisationsrelevanten Gebieten, befinden sich im NBIC keinerlei glutamaterge Schaltstellen der Vokalisationsbahn, da mit den Glutamat-Agonisten Kainsäure und Homocysteinsäure keine Vokalisation vom NBIC aus auslösbar ist. Trotzdem bewirkt eine Applikation von Kynurensäure in das Gebiet des ventralen NBICs ein Ausbleiben elektrisch im PAG ausgelöster Vokalisation. Somit scheint der ventrale NBIC keine auslösende Funktion in der Vokalisationsbahn zu haben, aber zumindest eine parallel triggernde. Er ist sowohl für die Auslösung von Kommunikationslauten als auch Echoortungslauten vom PAG unbedingt notwendig.

Eine Kynurensäureinjektion in das zentrale Gebiet des NBICs beeinflusst eine im PAG ausgelöste Vokalisation nicht. Für die Auslösung von Vokalisation vom zentralen NBIC bedarf es aber eines intakten PAGs. Eine pharmakologische Ausschaltung des PAGs führte zum Ausbleiben der im zentralen NBIC ausgelösten Vokalisation. Diese Ergebnisse deuten auf eine parallele Verschaltung des PAGs und des NBICs innerhalb der Vokalisation hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass die PAG-NBIC-Verschaltung ipsilateral ist. Eine Ausschaltung des kontralateralen NBICs hat keinen Einfluss auf im PAG ausgelöste Vokalisationen.

6. Ausblick

Die Funktion und Einbindung des NBICs in die Vokalisationsbahn konnte mit dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Weiterführend sollten Mikrostimulationsexperimente durchgeführt werden, um eine genauere Abgrenzung des NBICs zu anderen Strukturen und eine Verbesserung der Datenlage zu erhalten. Dabei sollte auch untersucht werden, ob in bestimmten Regionen des NBICs bestimmte Vokalisationstypen auslösbar sind. Der NBIC sollte mit anderen Neuropharmaka als Homocysteinsäure und Kainsäure auf Auslösbarkeit von Vokalisation untersucht werden. Dafür sollten unspezifischere Neuropharmaka verwendet werden wie z.B. Glutamat, welches an alle 3 (AMPA-, NMDA-, Kainat-) Glutamat-Rezeptortypen bindet. Weiterhin wäre eine pharmakologische Stimulation mit GABA-Antagonisten denkbar. Die Verbindungen des NBICs sollten mit weiteren Tracerstudien geklärt werden. Neben Injektionen von Alexa Fluor 488 markiertem Dextran und/oder anderen Fluoreszenstracern, könnten Tracer wie BDA oder HRP verwendet werden. Weitere Untersuchungen, um die Einbindung des NBICs in die Vokalisationsbahn zu klären, könnten darin bestehen, Interaktionen des NBICs mit anderen in der Vokalisationsbahn integrierten Strukturen zu untersuchen. Sinnvoll wäre es auch, zu klären in welcher Verbindung der NBIC mit Strukturen steht, die ausschließlich an der Echoortung beteiligt sind, wie z.B. die PLA. Es sollte zudem geklärt werden, ob absteigende Verbindungen des NBICs direkt zum NA-NRA-Komplex ziehen oder noch andere Strukturen zwischengeschaltet sind. Neuroanatomische Untersuchungen zur Klärung der Verteilung und Morphologie der im NBIC vorkommenden Zellen runden das Bild des NBICs innerhalb der Vokalisationsbahn ab. Weiterhin könnten Untersuchungen von anderen an der Vokalisation beteiligten Strukturen und deren Interaktionen mit dem PAG aufklären, wie die neuronale Verschaltung für die Echoortungslaute und für die Kommunikationslaute der Fledermaus *Phyllostomus discolor* organisiert ist.

A. Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm ³	Kubikmikrometer
μs	Mikrosekunde
12N	Hypoglossuskern
Abb.	Abbildung
AFN	Atipamezol, Flumazenil, Naloxon
Alexa 488-Dextran	mit Alexa Fluor 488 markiertes Dextran
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Aquadest	destilliertes Wasser
BDA	Biotin-Dextran-Amin
Ca	Kalzium
ca.	zirka
CF	konstantfrequent
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DAV	direkte Avidin Methode
dB	Dezibel
engl.	englisch
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
FM	frequenzmoduliert

Abkürzung	Bedeutung
FR	Formatio reticularis
FRM	Formatio reticularis mesencephali
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAM	Goat-anti-mouse Gammaglobulin
h	Stunde
HCA	Homocysteinsäure
HCO	Hydrogencarbonat
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. horseradish peroxidase
Hz	Hertz
IC	Colliculus inferior
icp	inferiorer cerebellärer Pedunkulus
IOC	inferiorer Oliven-Komplex
IRt	intermediärer retikulärer Kern
K	Kalium
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
m	Meter
M	molar
max.	maximal
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMF	Midazolam, Medetomidin, Fentanyl
ms	Millisekunde
MΩ	Megaohm
Na	Natrium
NA	Nucleus ambiguus
NBIC	Nucleus des Brachiums des Inferioren Colliculus
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer

Abkürzung	Bedeutung
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nmol	Nanomol
NMP	tiefer mesencephalärer Nucleus
NRA	Nucleus retroambiguus
PAG	periaquäduktes Grau
PB	parabrachialer Nucleus
PBS	Phosphatpuffer
PBSa	Phosphat gepufferte Saline
pmol	Picomol
PPN	peripedunkulärer Nucleus
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SC	Colliculus superior
scp	superiorer cerebellärer Pediculus (Brachium conjunctivum)
SN	Substantia nigra
sol	Tractus solitarius
Sp5C	caudaler Subnucleus des spinalen Trigeminskerns
Sp5I	interpolärer Subnucleus des spinalen Trigeminskerns
SPL	Schalldruckpegel
TIM	Ammonium-Tungstat-Paratungstat-Färbung
TMB	Tetramethylbenzidin
TTN	Färbung mit TMB über Nacht
WGA	Weizenkeimagglutinin
WGA-HRP	Weizenkeimagglutinierte Meerrettichperoxidase
z.B.	zum Beispiel
ZI	Zona incerta
ZNS	Zentralnervensystem

B. Protokolle

B.1 Präparationsprotokoll zum Aufsetzen des Haltestifts

1. Knochenhaut entfernen (kein Alkohol)
2. Esticid (Phosphatsäure) auftragen (Kollagenanlösung), 10-15 s warten, dann gut mit Wasser abwaschen und trocknen (Druckluft)
3. Denthesive II Komponente A + B (verbindet sich mit Kollagenetzwerk und dringt tief in Knochenporen ein, Gewebe wird hydrophober) 1:1 zusammengeben und mit Pinsel mischen. Dünn auftragen, 30 s warten. Mit Druckluft trocknen bis Oberfläche matt, aber nicht übertrocknen
4. 1 Tropfen Adhesive Bond mit (anderem) Pinsel auftragen, ausdünnen, anblasen und 10 s warten
5. Lichthärtung für 20 s (möglichst nah rangehen, Augen des Tieres abdecken)
6. Charisma (Füllwerkstoff) auf Schädel geben
7. Haltestift in Bonder eintauchen, dann in Charisma drücken
8. Lichthärtung für ca. 40 s - 1 min
9. Fissurenversiegler auftragen und lichthärten

Komponenten sind im Kühlschrank aufzubewahren!

UV-Lampe (Lichtgeber für lichthärtende Kunststoffe): ESPE II Elipar zu beziehen bei: Gustav Stengelin, Dentaldepot, Dr. Hans Kapfingerstr. 32, 94032 Passau.

B.2 Histologische Aufarbeitung

B.2.1 BDA-Nachweis mittels DAV-Methode und anschließender TIM-Färbung

Stammlösungen:

- **PBS** (Phosphatpuffer) 0,2 M; pH 7,4
Lösung A (71,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) + 2000 ml H_2O) und Lösung B (27,2 g KH_2PO_4 + 1000 ml H_2O) im Verhältnis 21 : 4 mischen
- **PBSa** (Phosphat-gepufferte Saline) 0,1 M; pH 7,4
50 ml PBS (0,2 M) + 50 ml Aquadest + 0,9 g NaCl
- **PBSa-X**
PBS + 0,3 % Triton-X
- **EAP** ExtraAvidin-Peroxidase-Standardlösung
1 mg/ml
- **PBN** (Natriumphosphat-Puffer) 0,1 M; pH 6,0
438 ml NaH_2PO_4 (0,2 M) + 62 ml (Na_2HPO_4 (0,2 M)) + 500 ml Aquadest
- **APT** (Ammonium-Tungstat)
10 ml Aquadest + 0,1 g APT
- **TMB** (Tetramethylbenzidin)
50 ml EtOH absolut + 0,1 ml TMB (0,2%) bei 37°C auflösen
- **Glucose-Stammlösung**
0,2 g D-Glucose + 0,8 ml Aquadest + 1 μl 50%ige NaN_3 -Lösung
- **NH_4Cl**
4,8 ml Aquadest + 0,2 g NH_4Cl

Färbung:

DAV (Direkte Avidin Methode)

1. Schnitte (sofern notwendig) auf Raumtemperatur bringen
2. 3 x 15 min in PBSa-X waschen
3. 60 min in 50 ml PBSa (0,05 M) + 0,15 ml Triton-X + 50 μl EAP inkubieren

4. 3 x 10 min in PBSa (0,05 M) waschen
5. anschließend mit TIM-Färbung fortfahren

TIM-Färbung

1. 3 x 3 min in PBN (0,05 M)
2. 20 min Präinkubation (Raumtemperatur, Bewegung)
Präinkubationslösung: 40 ml PBN + 2 ml APT + 0,5 ml TMB + 0,4 ml Glucose-Stammlösung + 0,4 ml NH₄Cl, alles erst kurz vor Gebrauch zusammengeben
3. 5 min Inkubation in neu angesetzter Präinkubationslösung + 43 µl Glucoseoxidase (Sigma)
4. 2 x 2 min in PBN (0,05 M) waschen
5. 2 x 5 min in PBN (0,05 M) waschen
6. 5 min in gekühltem Aquadest waschen
aus Aquadest auf Objektträger aufziehen
7. mit Kresylviolett gegenfärben

B.2.2 TTN-Färbung: Ammonium -Tungstate (Paratungstate) für Tracing über Nacht

Stammlösungen:

- **PBN** (Natriumphosphat-Puffer) 0,1 M; pH 6,0
438 ml NaH_2PO_4 (0,2 M) + 62 ml Na_2HPO_4 (0,2 M) + 500 ml Aquadest
- **APT** (Ammonium-Tungstat)
10 ml Aquadest + 0,1 g APT
- **TMB** (Tetramethylbenzidin)
50 ml EtOH absolut + 0,1 ml TMB (0,2%) bei 37°C auflösen
- **H₂O₂** (0,3%)

Färbung:

1. 2 x 3 min PBN (pH 6,0; 0,05 M)
2. 10 min Präinkubation (Raumtemperatur, Bewegung)
80 ml PBN + 4 ml APT + 2 ml TMB
alles erst kurz vor Gebrauch zusammengeben
3. zur Präinkubationslösung 0,2 ml H₂O₂ zugeben (Raumtemperatur, Bewegung)
4. Schnitte in PBN waschen
5. neue Präinkubationslösung ansetzen, 0,2 ml H₂O₂ zugeben, über Nacht (16 h) bei 4°C, Bewegung inkubieren
6. 10 min Schnitte auf Raumtemperatur bringen
7. 2 x 2 min in PBN waschen
8. 2 x 5 min in PBN waschen
9. 1 x 5 min in Aquadest waschen
10. aus Aquadest auf Objektträger aufziehen
11. mit Kresylviolett gegenfärben

B.2.3 Kombinierte DAB-Cytochrom-Färbung

Stammlösungen:

- **PBS** 0,1 M; pH 7,4
15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 2,2 g KH_2PO_4 + 1000 ml Aquadest
- **Tris/HCl-Puffer** 0,05 M; pH 7,66
375 ml 0,1 N HCl + 6,1 g Tris + 1250 ml Aquadest
- **CoCl₂** 0,5 %
400 mg CoCl_2 + 80 ml Tris/HCl-Puffer

Färbung:

1. übertragen der Gefrierschnitte in 0,1 M PBS
2. 2 x waschen in 0,05 M Tris/HCl-Puffer
3. 5 min beizen in CoCl_2 -Lösung
4. 3 x waschen in Tris/HCl-Puffer
5. 2 x waschen in PBS
6. 5 min Präinkubation
Präinkubationslösung: 45 mg DAB in 2 ml Aquadest lösen + 80 ml PBS
7. 25 min Inkubation in derselben Präinkubationslösung unter Zugabe von 0,25 - 4 ml H_2O_2 (0,375 %)
8. 2 x waschen in PBS
9. Cytochromoxidase-Gegenfärbung: 30 - 60 min Inkubation bei 37°C, im Dunkeln (Inkubationslösung (frisch ansetzen): 90 ml PBS + 60 mg DAB (vorher in 2 ml Aquadest gelöst) + 20 mg Cytochrom C)
10. 2 x waschen in PBS
11. aus PBS auf Objektträger aufziehen, trocknen lassen, entwässern und eindecken

B.2.4 Gegenfärbung mit Kresylviolett

Stammlösungen:

- **PBS** 0,1 M; pH 7,2
Komponente A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,2 M) mit Komponente B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 M) im Verhältnis 19:81 mischen. pH-Wert mit Essigsäure/Natronlauge einstellen
- **Entfetter**
348 ml Chloroform + 48 ml Äther + 48 ml Methanol
- **Kresylviolett**
1 g Kresylviolettacetat + 300 ml H_2O + 9,6 ml konz. Essigsäure, auf 500 ml mit Aquadest auffüllen und filtern

Färbung:

1. 3 min Entfetter
2. 1 min 99% Ethanol
3. 1 min 70% Ethanol
4. 1 min 50% Ethanol
5. 2 x 5-10 s in Aquadest spülen (Bewegung)
6. ca. 1 min 30 s Kresylviolett (vorherige Probefärbung, Färbezeit anpassen, immer wieder bewegen)
7. 2 x 5-10 s in Aquadest spülen (Bewegung)
8. wenige min 50% Ethanol + 0,5 ml Eisessig (Bewegung, differenzieren bis Hintergrund entfärbt, mikroskopische Kontrolle)
9. max. 40 s 70% Ethanol (optische Kontrolle)
10. 2 x 1 min 99% Ethanol
Schnitte gut abtropfen lassen, dann
11. 3 x 5-10 s Xylol (Bewegung)
12. Objektträger aus Xylol heraus mit DePeX eindecken und trocknen lassen

B.2.5 Gegenfärbung mit Neutralrot

Stammlösungen:

- **Acetatpuffer** 0,1 M, pH 3,3
13,6 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ + 95 ml HCl (1 N) + 200 ml Aquadest, pH-Wert mit Eisessig einstellen und auf 1000 ml mit Aquadest auffüllen
- **Neutralrot** pH 4,8
300 ml Aquadest + 3 g Neutralrot + 12,5 ml Acetatpuffer, pH-Wert mit Essigsäure (1%) einstellen und Lösung auf 1000 ml mit Aquadest auffüllen

Färbung:

1. Objektträger mit Schnitten kurz in Aquadest tauchen
2. ca. 2 min Neutralrot
3. kurz in 70% Ethanol (Bewegung)
4. 2 x kurz in 90% Ethanol (Bewegung)
5. 3 x kurz in 99% Ethanol (Bewegung)
6. 2 x 5 min Xylol
7. aus Xylol heraus Schnitte mit DepeX eindecken und trocknen lassen

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung des Kehlkopfes	11
2.2	Hierarchische Organisation der Vokalisation	14
2.3	Fledermaus <i>Phyllostomus discolor</i>	20
2.4	Verschiedene Parameter eines Echoortungslauts	21
3.1	Lage des Gehirns im Schädel der kleinen Lanzennase	26
3.2	Stereotaktische Methode nach Schuller <i>et al.</i> (1986)	27
3.3	Blockschaltbild des Apparaturaufbaus	30
4.1	Spektrogramm eines elektrisch ausgelösten Echoortungslauts	37
4.2	Verteilung der Positionen an denen elektrisch Echoortungs- und Kom- munikationslaute ausgelöst werden konnten	39
4.3	Spektrogramm des Lauttyps 1.	40
4.4	Spektrogramm des Lauttyps 4	40
4.5	Verteilung der Positionen an denen elektrisch Kommunikationslaute ausgelöst werden konnten	41
4.6	Spektrogramme der 3 Zirplauttypen	42
4.7	Verteilung der Positionen an denen die 3 Zirplauttypen ausgelöst werden konnten	43
4.8	Spektrogramm des Lauttyps 13	44
4.9	Verteilung der Reizschwellen der Positionen an denen die Misch- form der Lauttypen 4 und 1 ausgelöst werden konnte	45
4.10	Spektrogramme der beiden Mischformen des Lauttyps 1 mit Lauttyp 4/Lauttyp 13	46
4.11	Verteilung der Latenzen der elektrisch ausgelösten Echoortungs- und Kommunikationslaute über die verschiedenen Ebenen des PAGs	46
4.12	Verteilung der Latenzen mit denen Vokalisationen im PAG ausgelöst werden konnten	47
4.13	Prozentuale Verteilung der Laute, die sich mit unterschiedlichen Schwel- len auslösen lassen	48

4.14	Verteilung der Schwellen mit denen die verschiedenen Vokalisationen im PAG ausgelöst werden konnten	50
4.15	Verteilung der Kommunikationslautpositionen im Zusammenhang mit dem Verhaltenskontext	51
4.16	Verteilung der Positionen an denen mit Homocysteinsäure stimuliert wurde	54
4.17	Darstellung der Elektrodenstränge, die nach elektrischer Auslösung auf pharmakologische Ausschaltung überprüft wurden	55
4.18	Auslösepositionen von im NBIC und Umgebung herum elektrisch ausgelösten Echoortungs- und Kommunikationslauten	57
4.19	Darstellung der Homocysteinsäureinjektionspunkte und Kainsäureinjektionspunkte	58
4.20	Darstellung der Auslösepunkte von Vokalisation und Injektionsstellen von Kynurensäure bzw. Muscimol	59
4.21	Auslösepunkte der Kommunikationslaute und des Echoortungslauts im NBIC und dazugehörige Kynurensäureinjektionsstellen im Gebiet des kontralateralen NBICs	60
4.22	Spektrogramme eines im NBIC ausgelösten Zirplauts vor und nach der Ausschaltung des kontralateralen NBICs	60
4.23	Verteilung von Positionen im PAG und Umgebung an denen Vokalisation ausgelöst werden konnte, die durch eine Kynurensäureinjektion in den kontralateralen NBIC und Umgebung nicht blockierbar war	62
4.24	Positionen an denen elektrisch Vokalisation ausgelöst werden konnte, die nicht mit einer Kynurensäureinjektion in den ipsilateralen NBIC bzw. die Umgebung blockiert werden konnte	63
4.25	Nahe dem PAG ausgelöster Echoortungslaut und dazugehörige NBIC-Position an der Kynurensäure injiziert wurde	64
4.26	Nahe dem PAG ausgelöste Echoortungslaute und ein Kommunikationslaut die durch eine Kynurensäureinjektion in den NBIC blockiert werden konnten	65
4.27	Positionen eines in der Formatio reticularis ausgelösten, und über eine NBIC-Injektion blockierbaren Echoortungslauts	66
4.28	Auslöseorte von Kommunikationslauten im PAG und dazugehörige Injektionsorte von Kynurensäure im NBIC	67
4.29	Spektrogramme eines im PAG ausgelösten Kommunikationslauts vor und nach Ausschaltung des ipsilateralen NBICs	68

4.30 Übersicht über Auslösepositionen von Vokalisation im NBIC und Ausschaltpositionen im PAG	69
4.31 Spektrogramme eines im NBIC ausgelösten Kommunikationslauts vor und nach der Ausschaltung des PAGs	71
4.32 Injektionsposition von BDA (Normhirnschnitt)	73
4.33 Injektionsstelle von BDA (Originalschnitt)	73
4.34 BDA-markierte Gebiete im Hirnstamm nach BDA-Injektion in das PAG	74
4.35 Injektionsstelle von Alexa 488-Dextran in den NBIC	76
4.36 Projektionen vom NBIC zum intercolliculären tiefen mesencephalären Nucleus	77
4.37 Projektionen vom NBIC zum PAG	78
4.38 Markierte Zellen im Bereich des peripedunculären Nucleus	79
4.39 Injektionsstelle von Alexa 488-Dextran in das PAG	80
4.40 Projektionen vom PAG zum anterioren Gyrus cinguli	81
4.41 Projektionen vom PAG zur Zona incerta	82
4.42 Projektionen vom PAG zum parafascikulären thalamischen Kern, pre-rubralen Feld und Kern des Felds von Forel	83
4.43 Von der Injektionsstelle im PAG wegziehende Fasern im Gebiet des lateralen Lemniscus	84
5.1 Schematische Darstellung der Auslösbarkeit von Vokalisation bei Stimulation im NBIC und Ausschaltung des PAGs bzw. bei Stimulation im PAG und Ausschaltung des NBICs	103

Tabellenverzeichnis

4.1	Übersicht über die ermittelten Parameter elektrisch im PAG ausgelöster Vokalisationen	52
4.2	Übersicht über die Positionen an denen Vokalisation ausgelöst (PAG) und Kynurensäure injiziert (NBIC) wurde, einschließlich der zeitlichen Angabe des Eintretens der Blockade der ausgelösten Vokalisation	72
4.3	Übersicht über den Transport des Tracers Alexa 488-Dextran von der Injektionsstelle im NBIC	84
4.4	Übersicht über den Transport von Alexa 488-Dextran von der Injektionsstelle im PAG	85

Literaturverzeichnis

Adams DB (1968) Cells related to fighting behavior recorded from midbrain central gray neuropil of cat. Science 159:894–896.

Arnault P, Roger M (1987) The connections of the peripeduncular area studied by retrograde and anterograde transport in the rat. J Comp Neurol 258:463–476.

Aschoff A, Ostwald J (1987) Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats, and guinea pigs. J Comp Neurol 264:56–72.

Bandler R (1982) Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. Neurosci Lett 30:183–188.

Bandler R, Carrive P (1988) Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. Brain Res 439:95–106.

Bandler R, Shipley M (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends Neurosci 17:379–389.

Bandler R, Tork I (1987) Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connections with solitary tract nuclei. Neurosci Lett 74:1–6.

Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. Prog Neurobiol 46:575–605.

Behrend O, Schuller G (2000) The central acoustic tract and audio-vocal coupling in the horseshoe bat, *Rhinolophus rouxi*. Eur J Neurosci 12:4268–4280.

Beitz AJ (1989) Possible origin of glutamatergic projections to the midbrain periaqueductal gray and deep layer of the superior colliculus of the rat. Brain Res Bull 23:25–35.

Berman A (1968) The Brainstem of the Cat: A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotactic Coordinates Madison.

Bockstaele EV, Aston-Jones G, Pieribone V, Ennis M, Shipley M (1991) Sub-regions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat. J Comp Neurol 309:305–327.

Botez M, Carp N (1968) Nouvelles données sur le problème du mécanisme de déclenchement de la parole. Rev Roum Neurol 5:153–158.

Brown T (1915) Note on physiology of basal ganglia and midbrain of anthropoid ape especially to reference to act of laughter. J Physiol 49:195–207.

Casseday JH, Kobler JB, Isbey SF, Covey E (1989) Central acoustic tract in an echolocating bat: an extralemiscal auditory pathway to the thalamus. J Comp Neurol 287:247–259.

de Lanerolle N (1990) A pontine call site in the domestic cat: behavior and neural pathways. Neuroscience 37:201–214.

Do KQ, Mattenberger M, Streit P, Cuénod M (1986) In vitro release of endogenous excitatory sulfur-containing amino acids from various rat brain regions. J Neurochem 46:779–786.

Düsterhöft F, Häusler U, Jürgens U (2000) On the search for the vocal pattern generator. a single-unit recording study. Neuroreport 11:2031–2034.

Dudel J, Menzel R, Schmidt R (1996) Neurowissenschaft Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Dujardin E, Jürgens U (2006) Call type-specific differences in vocalization-related afferents to the periaqueductal gray of squirrel monkeys (*saimiri sciureus*). Behav Brain Res 168:23–36.

Dujardin E, Jürgens U (2005) Afferents of vocalization-controlling periaqueductal regions in the squirrel monkey. Brain Res 1034:114–131.

Esposito A, Demeurisse G, Alberti B, Fabbro F (1999) Complete mutism after midbrain periaqueductal gray lesion. Neuroreport 10:681–685.

Feldman JL, Gautier H (1976) Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. J Neurophysiol 39:31–44.

Fenzl T, Schuller G (2002) Periaqueductal gray and the region of the paralemiscal area have different functions in the control of vocalization in the neotropical bat, *Phyllostomus discolor*. Eur J Neurosci 16:1974–1986.

- Fenzl T, Schuller G (2005) Echolocation calls and communication calls are controlled differentially in the brainstem of the bat *Phyllostomus discolor*. BMC Biol 3:17.
- Fernández-Guasti A, Larsson K, Vega-Sanabria J (1986) Depression of postejaculatory ultrasonic vocalization by (+)-bicuculline. Behav Brain Res 19:35–39.
- Fu XW, Brudzynski SM (1994) High-frequency ultrasonic vocalization induced by intracerebral glutamate in rats. Pharmacol Biochem Behav 49:835–841.
- Gonatas NK, Harper C, Mizutani T, Gonatas JO (1979) Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. J Histochem Cytochem 27:728–734.
- Gonzalez-Lima F, Frysztak RJ (1991) Functional mapping of the rat brain during vocalizations: a 2-deoxyglucose study. Neurosci Lett 124:74–78.
- Gooler DM, O'Neill WE (1987) Topographic representation of vocal frequency demonstrated by microstimulation of anterior cingulate cortex in the echolocating bat, *Pteronotus parnelli parnelli*. J Comp Physiol [A] 161:283–294.
- Gordon M, O'Neill WE (2000) An extralemiscal component of the mustached bat inferior colliculus selective for direction and rate of linear frequency modulations. J Comp Neurol 426:165–181.
- Guillemin G, Kerr S, Smythe G, Smith D, Kapoor V, Armati P, Croitoru J, Brew B (2001) Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. J Neurochem 78:842–853.
- Hage SR, Jürgens U (2006) On the role of the pontine brainstem in vocal pattern generation: a telemetric single-unit recording study in the squirrel monkey. J Neurosci 26:7105–7115.
- Hannig S, Jürgens U (2006) Projections of the ventrolateral pontine vocalization area in the squirrel monkey. Exp Brain Res 169:92–105.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. J Comp Neurol 293:540–580.
- Holstege G (1989) Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. J Comp Neurol 284:242–252.

- Huffman RF, Covey E (1995) Origin of ascending projections to the nuclei of the lateral lemniscus in the big brown bat, *ptesicus fuscus*. J Comp Neurol 357:532–545.
- Jürgens U (1983) Afferent fibers to the cingular vocalization region in the squirrel monkey. Exp Neurol 80:395–409.
- Jürgens U (1986) The squirrel monkey as an experimental model in the study of cerebral organization of emotional vocal utterances. Eur Arch Psychiatry Neurol Sci 236:40–43.
- Jürgens U (1988) Central control of monkey calls In Primate vocal Communication. Todt, Goedeking, Symmes.
- Jürgens U (1994) The role of the periaqueductal grey in vocal behaviour. Behav Brain Res 62:107–117.
- Jürgens U (1998) Neuronal control of mammalian vocalization, with special reference to the squirrel monkey. Naturwissenschaften 85:376–388.
- Jürgens U (2000) Localization of a pontine vocalization-controlling area. J Acoust Soc Am 108:1393–1396.
- Jürgens U (2002) Neural pathways underlying vocal control. Neurosci Biobehav Rev 26:235–258.
- Jürgens U (2008) The neural control of vocalization in mammals: A review. J Voice in Press.
- Jürgens U, Ehrenreich L (2007) The descending motorcortical pathway to the laryngeal motoneurons in the squirrel monkey. Brain Res 1148:90–95.
- Jürgens U, Lu CL (1993) The effects of periaqueductally injected transmitter antagonists on forebrain-elicited vocalization in the squirrel monkey. Eur J Neurosci 5:735–741.
- Jürgens U, Ploog D (1970) Cerebral representation of vocalization in the squirrel monkey. Exp Brain Res 10:532–554.
- Jürgens U, Pratt R (1979) Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. Brain Res 167:367–378.
- Jürgens U, Richter K (1986) Glutamate-induced vocalization in the squirrel monkey. Brain Res 373:349–358.

- Jürgens U, Zwirner P (1996) The role of the periaqueductal grey in limbic and neocortical vocal fold control. Neuroreport 7:2921–2923.
- Jürgens U, Ehrenreich L, Lanerolle NCD (2002) 2-deoxyglucose uptake during vocalization in the squirrel monkey brain. Behav Brain Res 136:605–610.
- Keay K, Bandler R (2001) Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. Neurosci Biobehav Rev 25:669–678.
- Khaspekov LG, Stastný F, Viktorov IV, Lisý V (1990) Cytotoxic effect of glutamate and its agonists on mouse hippocampal neurons. J Hirnforsch 31:635–643.
- Kirchhof J, Hammerschmidt K (2006) Functionally referential alarm calls in tamarins (*saguinus fuscicollis* and *saguinus mystax*) - evidence from playback experiments. Ethology 112:346–354.
- Kirzinger A, Jürgens U (1985) The effects of brainstem lesions on vocalization in the squirrel monkey. Brain Res 358:150–162.
- Kirzinger A, Jürgens U (1991) Vocalization-correlated single-unit activity in the brain stem of the squirrel monkey. Exp Brain Res 84:545–560.
- Kish D (1982) Evaluation of an echo-mobility training program for young blind people Master's thesis, University of Southern California.
- Kiss C, Ceresoli-Borroni G, Guidetti P, Zielke C, Zielke H, Schwarcz R (2003) Kynurenate production by cultured human astrocytes. J Neural Transm 110:1–14.
- Kittelberger J, Land B, Bass A (2006) Midbrain periaqueductal gray and vocal patterning in a teleost fish. J Neurophysiol 96:71–85.
- Konishi M, Knudsen E (1979) The oilbird: hearing and echolocation. Science 204:425–427.
- Kristensson K, Olsson Y (1971) Uptake and retrograde axonal transport of peroxidase in hypoglossal neurons. electron microscopical localization in the neuronal perikaryon. Acta Neuropathol 19:1–9.
- Kudo M, Itoh K, Kawamura S, Mizuno N (1983) Direct projections to the pretectum and the midbrain reticular formation from auditory relay nuclei in the lower brainstem of the cat. Brain Res 288:13–19.

- Kudo M, Tashiro T, Higo S, Matsuyama T, Kawamura S (1984) Ascending projections from the nucleus of the brachium of the inferior colliculus in the cat. Exp Brain Res 54:203–211.
- Kuipers R, Klop EM (2006) Neurons in the guinea pig (*cavia porcellus*) lateral lumbosacral spinal cord project to the central part of the lateral periaqueductal gray matter. Brain Res 1101:43–50.
- Kyuhou S, Gemba H (1998) Two vocalization-related subregions in the midbrain periaqueductal gray of the guinea pig. Neuroreport 9:1607–1610.
- Langmeier M, Folbergrová J, Haugvicová R, Pokorný J, Mares P (2003) Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. Epilepsia 44:299–304.
- Larson CR (1985) The midbrain periaqueductal gray: a brainstem structure involved in vocalization. J Speech Hear Res 28:241–249.
- Larson CR, Kistler MK (1984) Periaqueductal gray neuronal activity associated with laryngeal emg and vocalization in the awake monkey. Neurosci Lett 46:261–266.
- Larson CR, Kistler MK (1986) The relationship of periaqueductal gray neurons to vocalization and laryngeal emg in the behaving monkey. Exp Brain Res 63:596–606.
- Larson C (1991) On the relation of PAG neurons to laryngeal and respiratory muscles during vocalization in the monkey. Brain Res 552:77–86.
- LaVail JH, LaVail MM (1972) Retrograde axonal transport in the central nervous system. Science 176:1416–1417.
- Liebig J (1853) Über kynurensäure. Justus Liebigs Ann Chem 86:125–126.
- Lu CL, Jürgens U (1993) Effects of chemical stimulation in the periaqueductal gray on vocalization in the squirrel monkey. Brain Res Bull 32:143–151.
- Lynch G, Gall C, Mensah P, Cotman CW (1974) Horseradish peroxidase histochemistry: a new method for tracing efferent projections in the central nervous system. Brain Res 65:373–380.
- Mantyh PW (1982) The ascending input to the midbrain periaqueductal gray of the primate. J Comp Neurol 211:50–64.

Margolis TP, Marchand CMF, Kistler HB, LaVail JH (1980) Anterograde transport of wheat germ agglutinin: direction of transport dependent on selective binding. Neurosci Abstr 6:503.

Martin JR (1976) Motivated behaviors elicited from hypothalamus, midbrain, and pons of the guinea pig (*cavia porcellus*). J Comp Physiol Psychol 90:1011–1034.

Meller ST, Dennis BJ (1991) Efferent projections of the periaqueductal gray in the rabbit. Neuroscience 40:191–216.

Mesulam MM (1978) Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neuro-histochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. J Histochem Cytochem 26:106–117.

Metzner W (1996) Anatomical basis for audio-vocal integration in echolocating horseshoe bats. J Comp Neurol 368:252–269.

Morest DK, Oliver DL (1984) The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. J Comp Neurol 222:209–236.

Mouton LJ, Holstege G (1994) The periaqueductal gray in the cat projects to lamina viii and the medial part of lamina vii throughout the length of the spinal cord. Exp Brain Res 101:253–264.

Nadler JV, Evenson DA, Cuthbertson GJ (1981) Comparative toxicity of kainic acid and other acidic amino acids toward rat hippocampal neurons. Neuroscience 6:2505–2517.

Nauta HJ, Pritz MB, Lasek RJ (1974) Afferents to the rat caudoputamen studied with horseradish peroxidase. an evaluation of a retrograde neuroanatomical research method. Brain Res 67:219–238.

Neuweiler G (1993) Biologie der Fledermäuse Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Nonaka S, Takahashi R, Enomoto K, Katada A, Unno T (1997) Lombard reflex during pag-induced vocalization in decerebrate cats. Neurosci Res 29:283–289.

Nuttin B, Gabriëls L, Cosyns P, Gybels J (2000) Electrical stimulation of the brain for psychiatric disorders. CNS Spectr 5:35–39.

- Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung WY, Haugland RP (1999) Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. J Histochem Cytochem 47:1179–1188.
- Pistohl D (1998) Struktur und funktion sozialer laute bei der kleinen lanzennase, *phylostomus discolor* (chiroptera, phyllostomidae) Master's thesis, Universität Ulm.
- Pistohl D, Esser KH (1998) The vocal repertoire of the lesser spear-nosed bat (*phylostomus discolor*). Zoology 101 (Suppl. I):84.
- Radtke-Schuller S (2004) Cytoarchitecture of the medial geniculate body and thalamic projections to the auditory cortex in the rufous horseshoe bat (*rhinolophus rouxi*). i. temporal fields. Anat Embryol (Berl) 209:59–76.
- Radtke-Schuller S, Schuller G, O'Neill WE (2004) Thalamic projections to the auditory cortex in the rufous horseshoe bat (*rhinolophus rouxi*). ii. dorsal fields. Anat Embryol (Berl) 209:77–91.
- Rajakumar N, Elisevich K, Flumerfelt BA (1993) Biotinylated dextran: a versatile anterograde and retrograde neuronal tracer. Brain Res 607:47–53.
- Ranck JB (1975) Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. Brain Res 98:417–440.
- Rübsamen R, Schweizer H (1986) Control of echolocation pulses by neurons of the nucleus ambiguus in the rufous horseshoe bat, *rhinolophus rouxi*. ii. afferent and efferent connections of the motor nucleus of the laryngeal nerves. J Comp Physiol [A] 159:689–699.
- Richter K, Jürgens U (1986) A comparative study on the elicibility of vocalization by electrical brain stimulation, glutamate, aspartate and quisqualate in the squirrel monkey. Neurosci Lett 66:239–244.
- Romanowski C (2005) Vokalisationsauslösung durch mikrostimulation im bereich des nucleus des brachiums des inferioren colliculus bei der fledermaus *Phyllostomus discolor*. Master's thesis, LMU München.
- Rother G, Schmidt U (1982) Der einfluss visueller information auf die echoortung bei *phylostomus discolor* (chiroptera). Zeitschrift für Säugetierkunde 47 (6):324–334.

Sallagundala N, Yakimova K, Tzschentke B (2007) Effect of gabaergic substances on firing rate and thermal coefficient of hypothalamic neurons in the juvenile chicken. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 148:374–381.

Schnupp JW, King AJ (1997) Coding for auditory space in the nucleus of the brachium of the inferior colliculus in the ferret. J Neurophysiol 78:2717–2731.

Schuller G (1998) Neural mechanisms of vocal control in bats In presented at INABIS '98, 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada.

Schuller G, Fischer S, Schweizer H (1997) Significance of the paralemniscal tegmental area for audio-motor control in the moustached bat, *pteropus p. parnellii*: the afferent off efferent connections of the paralemniscal area. Eur J Neurosci 9:342–355.

Schuller G, Radtke-Schuller S (1990) Neural control of vocalization in bats: mapping of brainstem areas with electrical microstimulation eliciting species-specific echolocation calls in the rufous horseshoe bat. Exp Brain Res 79:192–206.

Schuller G, Radtke-Schuller S, Betz M (1986) A stereotaxic method for small animals using experimentally determined reference profiles. J Neurosci Methods 18:339–350.

Schwab ME, Javoy-Agid F, Agid Y (1978) Labeled wheat germ agglutinin (wga) as a new, highly sensitive retrograde tracer in the rat brain hippocampal system. Brain Res 152:145–150.

Sem-Jacobsen C, Torkildsen A (1960) Depth recording and electrical stimulation in the human brain. In Electrical studies on the unanesthetized brain. E.R. Ramey and D.S. O'Doherty.

Senatorov VV, Hu B (2002) Extracortical descending projections to the rat inferior colliculus. Neuroscience 115:243–250.

Shiba K, Umezaki T, Zheng Y, Miller AD (1997) The nucleus retroambiguus controls laryngeal muscle activity during vocalization in the cat. Exp Brain Res 115:513–519.

Siebert S, Jürgens U (2003) Vocalization after periaqueductal grey inactivation with the gaba agonist muscimol in the squirrel monkey. Neurosci Lett 340:111–114.

Simonyan K, Jürgens U (2003) Efferent subcortical projections of the laryngeal motorcortex in the rhesus monkey. Brain Res 974:43–59.

Skaliora I, Doubell TP, Holmes NP, Nodal FR, King AJ (2004) Functional topography of converging visual and auditory inputs to neurons in the rat superior colliculus. J Neurophysiol 92:2933–2946.

Skultety FM (1962) Experimental mutism in dogs. Arch Neurol 6:235–241.

Smotherman M, Zhang S, Metzner W (2003) A neural basis for auditory feedback control of vocal pitch. J Neurosci 23:1464–1477.

Stone T (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. Pharmacol Rev 45(3):309–379.

Suga N, Schlegel P, Shimozawa T, Simmons J (1973) Orientation sounds evoked from echolocating bats by electrical stimulation of the brain. J Acoust Soc Am 54:793–797.

Suga N, Simmons JA, Shimozawa T (1974) Neurophysiological studies on echolocation systems in awake bats producing cf-fm orientation sounds. J Exp Biol 61:379–399.

Suga N, Yajima Y (1988) Auditory-vocal integration in the midbrain of the moustached bat: periaqueductal gray and reticular formation. In The physiological control of mammalian vocalization. J.D. Newman.

Suga N, Yajima Y (1989) Auditory-vocal integration in the midbrain of the mustached bat: periaqueductal grey and reticular formation. In The physiological control of mammalian vocalization. J.D. Newman.

Surlykke A, Moss CF (2000) Echolocation behavior of big brown bats, *ptesicus fuscus*, in the field and the laboratory. J Acoust Soc Am 108:2419–2429.

Temel Y, Wilbrink P, Duits A, Boon P, Tromp S, Ackermans L, van Kranen-Mastenbroek V, Weber W, Visser-Vandewalle V (2007) Single electrode and multiple electrode guided electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced parkinson's disease. Neurosurgery 61:346–55; discussion 355–7.

Thoms G, Jürgens U (1987) Common input of the cranial motor nuclei involved in phonation in squirrel monkey. Exp Neurol 95:85–99.

- Toda H, Hamani C, Fawcett AP, Hutchison WD, Lozano AM (2008) The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. J Neurosurg 108:132–138.
- Valentine DE, Sinha SR, Moss CF (2002) Orienting responses and vocalizations produced by microstimulation in the superior colliculus of the echolocating bat, *ptesicus fuscus*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 188:89–108.
- Vanderhorst VGJM, Terasawa E, Ralston HJ (2002) Estrogen receptor-alpha immunoreactive neurons in the ventrolateral periaqueductal gray receive monosynaptic input from the lumbosacral cord in the rhesus monkey. J Comp Neurol 443:27–42.
- von Cramon D, Jürgens U (1983) The anterior cingulate cortex and the phonatory control in monkey and man. Neurosci Biobehav Rev 7:423–425.
- Wilson A, Kapp BS (1991) Midbrain periaqueductal gray projections to the dorso-medial medulla in the rabbit. Brain Res Bull 27:625–630.
- Yajima Y, Hayashi Y, Yoshii N (1980) The midbrain central gray substance as a highly sensitive neural structure for the production of ultrasonic vocalization in the rat. Brain Res 198:446–452.
- Young P, Feng G (2004) Labeling neurons in vivo for morphological and functional studies. Curr Opin Neurobiol 14:642–646.
- Zhang SP, Bandler R, Davis PJ (1995) Brain stem integration of vocalization: role of the nucleus retroambiguus. J Neurophysiol 74:2500–2512.
- Zhang SP, Davis PJ, Bandler R, Carrive P (1994) Brain stem integration of vocalization: role of the midbrain periaqueductal gray. J Neurophysiol 72:1337–1356.
- Zhang W, Hayward L, Davenport PW (2007) Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. Auton Neurosci 134:45–54.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Gerd Schuller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, die Unterstützung in fachlichen Belangen, den Freiraum, den er mir in der experimentellen Arbeit ließ und die Überarbeitung meines Manuskripts.

Prof. Dr. Benedikt Grothe danke ich für die fachliche Unterstützung, die Hilfestellung bei Problemen und das Interesse an meiner Arbeit.

Dank an Thomas Fenzl für die Einarbeitung in das diffizile Gebiet der Elektrophysiologie bei der Fledermaus, Andreas Nixdorf für Programmierungen im VEE, Uwe Firzlaß für fruchtbare Diskussionen und Lesen des Manuskripts, Sven Schörnich für die Unterstützung im Computerbereich, Holger Görlitz für die Hilfe bei der Statistik und den Echoortungslauten und Susanne Hoffmann für viele aufschlussreiche Gespräche, ihre Hilfe bei Experimenten und das Lesen des Manuskripts.

Ariane Santoso und Gabi Schebesch sind nicht nur Kolleginnen, sondern im Lauf der Zeit gute Freundinnen geworden, die ich nicht mehr missen möchte. Danke für die fachlichen Diskussionen, die Unterstützung im privaten Bereich und die tollen Partys.

Claudia Schulte danke ich für die Unterstützung im Histolabor und manch kurzweilige Unterhaltung. Horst König danke ich für den technischen Support. Dieter Leippert sei für seine Hilfe bei Fledermausproblemen und der Versorgung der Tiere gedankt. Herrn Grundei und seinen Mitarbeitern in der Werkstatt danke ich für die Herstellung des ein oder anderen Setup-Teils, besonders wenn es mal wieder schnell gehen musste.

Diese Arbeit wurde z.T. finanziert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Schu 390/7 - 1).

Prof. Dr. Jürgens danke ich dafür, dass er die Neurobiologie für mich interessant gemacht hat und auch nach Abschluss meiner Diplomarbeit reges Interesse an meiner Arbeit gezeigt und mich immer unterstützt hat.

Sandra Kausche und Britta Schwellnus danke ich für die seelische und moralische Unterstützung, auch in schwierigen Zeiten. Es ist gut zu wissen, dass ich Freunde wie Euch habe, auf die ich mich jederzeit 100%ig verlassen kann.

Meinem Freund Thomas Lauf danke ich für die wunderbaren Jahre an seiner Seite, die hilfreichen fachlichen Diskussionen und die technische Unterstützung beim Schreiben der Arbeit.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mich in meinen Entschlüssen immer unterstützt und bestärkt und nie den Glauben an mich verloren haben. Sie halfen mir, meinen Weg bis hierher zu finden und ich weiß, dass ich auch in Zukunft auf ihre Unterstützung zählen kann. Danke!

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Silvana Siebert
Geburtsdatum: 18.06.1977
Geburtsort: Heilbad Heiligenstadt
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1984 - 07/1991 Grundschule/Realschule Gerbershausen
09/1991 - 07/1992 Realschule Wüstheuterode
09/1992 - 06/1996 staatl. Gymnasium Heilbad Heiligenstadt
06/1996 Abschluss Abitur

Studium

10/1996 - 02/2002 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen,
Schwerpunkt Zoologie
02/2002 - 10/2002 Diplomarbeit in der Abteilung Neurobiologie
des Deutschen Primatenzentrums
11/2002 Abschluss Hauptdiplom

Promotion

06/2003 - 10/2008 Biozentrum der LMU, Abteilung Neurobiologie, Martinsried
Betreuung Prof. Dr. Gerd Schuller

Veröffentlichung

Siebert, S. und Jürgens, U.

„Vocalization after periaqueductal grey inactivation with the GABA agonist muscimol in the squirrel monkey.“

Neurosci Lett. 2003 Apr 10;340(2):111-4.

Poster

Siebert, S. und Schuller, G.

'Vocalization in bats: Interactions between periaqueductal grey and nucleus of the brachium of the inferior colliculus.'

Poster auf der 5th Forum of European Neuroscience

Siebert, S. und Jürgens, U.

'The effect of periaqueductal grey blockade on vocalization elicited from the lower brainstem in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*).'

Poster auf der 29. Göttinger Neurobiologentagung

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....