

Aus dem C. & O. Vogt Institut für Hirnforschung

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Zilles

**In-vitro Rezeptorautoradiographie und Konnektivitätsanalysen
des Gyrus cinguli bei Makaken**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ahmet Bozkurt

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Priv. Doz. Dr. med. R. Kötter

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. G. Reifenberger

Für meine Eltern und Geschwistern, denen ich alles verdanke.

Cordialiter in modo, fortiter in re. In honorem R.H.

Inhaltsverzeichnis

1. DANKSAGUNG

2. EINLEITUNG

2.1. Einführung

2.2. Grundlagen

2.2.1. Grundbegriffe der Informationsverarbeitung im ZNS

2.2.2. Neurotransmitter

2.2.3. Neurotransmitterrezeptoren

2.2.4. Tracingstudien

2.3. Fragestellung

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Rezeptorautoradiographie

3.1.1. Material

3.1.2. Herstellung der Kryostatschnitte

3.1.3. Bindungsprotokoll

3.1.4. Auflegen und Entwickeln der Filme

3.1.5. Histologie

3.1.6. Auswertung

3.2. Konnektivität

3.2.1. Datenrepräsentation

3.2.2. Grundlagen der koordinaten-unabhängigen Transformation

3.2.3. Konnektivitätsmatrizen

3.3. Statistische Analysemethoden

- 3.3.1. Datenkonditionierung
- 3.3.2. Multidimensionale Skalierung
- 3.3.3. Hierarchische Clusteranalyse
- 3.3.4. Multivariate Varianzanalyse
- 3.3.5. Diskriminanzanalyse

4. ERGEBNISSE

4.1. Rezeptorautoradiographie

- 4.1.1. Zytoarchitektonische Abgrenzung des Gyrus cinguli
- 4.1.2. Rezeptorbindungsdichten
- 4.1.3. Multivariate Varianzanalyse (MANOVA)
- 4.1.4. Rezeptorverteilung
- 4.1.5. Multidimensionale Skalierung (MDS) und Hierarchische Clusteranalyse (HCA)

4.2. Konnektivität

- 4.2.1. Multidimensionale Skalierung und Hierarchische Clusteranalyse

5. DISKUSSION

5.1. Rezeptorautoradiographie

- 5.1.1. Vergleich mit anderen Autoradiographiestudien
- 5.1.2. Vergleich zwischen anteriorem und posteriorem Gyrus cinguli
- 5.1.3. Multivariate Analysen intrazingulärer Rezeptorbindungsdaten
- 5.1.4. Vergleich zwischen der Chemoarchitektur und intraarealer Differenzierung

5.2. Konnektivität

5.2.1. Anzahl der Source und Target Sites

5.2.2. Vergleich der Subkompartimente in 24, 24', 23: Projektionen innerhalb eines Areal

5.2.3. Vergleich der Subkompartimente in 24, 24', 23: Projektionen von allen drei Oberarealen

5.2.4. Projektionssymmetrie (reziproke Verbindungen)

5.2.5. Vergleich AGC und PGC

5.2.6. Vergleich der intraarealen Differenzierung

5.2.7. Multivariate Analysen intrazingulärer Konnektivität

5.3. Zusammenfassende Gliederung des Gyrus cinguli

6. Schlußfolgerung

7. Lebenslauf

8. Literaturverzeichnis

9. Abbildungsverzeichnis

10. Abstract

1 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Rolf Kötter sowie Herrn Prof. Dr. Karl Zilles für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Ing. Axel Schleicher und Frau Fr. Dr. rer.nat. Nicola Palomero-Gallagher möchte ich für die Einarbeitung in die Methoden der Rezeptorautoradiographie danken.

Ein großer Dank gilt der “Studienstiftung des deutschen Volkes“ und insbesondere Frau Hella Kohrs. Ihre Unterstützung erlaubte es mir, im großen Maße mich neben meinem Studium auf meine Dissertation konzentrieren zu können.

Besonderer Dank an Lars Kamper für die gegenseitige und korrektive Unterstützung in all den Jahren.

2 EINLEITUNG

2.1 Einführung

Der Gyrus cinguli (Abbildung 4) ist eine der wichtigsten Strukturen im zentralen Nervensystem (ZNS) beim Primaten und ist an einer Vielzahl komplexer Funktionen wie Emotionen (Papez 1937), Sensorik, Motorik, Kognition, Verhalten etc. (Vogt et al., 1992, Vogt, 1993; Devinky et al., 1995) beteiligt. Er besteht aus mehreren Hirnarealen, die zyto-, myelo-, chemoarchitektonisch, konnektional sowie elektrophysiologisch als homogene Einheiten charakterisierbar sind. Hierbei wird die mikroanatomische Differenzierung in einen anterioren und posterioren Gyrus cinguli durch eine Vielzahl konnektionaler und funktioneller Studien vertreten (Vogt et al., 1978, 1979, 1992; Vogt, 1993).

Der anteriore Gyrus cinguli (AGC) ist hauptsächlich mit der Amygdala, den intralaminären Thalamuskernen, dem Motor- und Prämotorkortex sowie den orbitofrontalen Hirnarealen verbunden (Vogt et al., 1979; Vogt, 1993; Devinky et al., 1995). Funktionell beteiligt sich der AGC an der Verhaltensregulierung (Botvinich et al., 1999), am Schmerzsystem (Vogt et al., 1993; Craig et al., 1996; Petrovic et al., 2002), an emotionalen Funktionen (Davidson et al., 2000) sowie kognitiven Funktionen (MacDonald et al., 2000), am REM-Schlaf (Maquet et al., 1996) und an der "Belohnungserwartung" (Shidara und Richmond, 2002).

Der posteriore Gyrus cinguli (PGC) ist vorwiegend mit den anterioren und laterodorsalen Thalamuskernen, dem auditorischen Assoziationskortex, dem parahippokampalen Kortex, dem primär visuellen Kortex und dem lateralen Präfrontalkortex (Vogt et al., 1979; Vogt, 1993) verbunden. Funktionell zeichnet sich der PGC vor allem durch Beteiligung an der visuell-räumlichen Wahrnehmung (Olson et al., 1993), am räumlichen Gedächtnis (Vogt et al., 1992; Sutherland und Hoelsing, 1993) sowie am REM Schlaf (Maquet et al., 1996) aus.

2.2 Grundlagen

2.2.1 Grundbegriffe der Informationsverarbeitung im ZNS

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist ein Informationsnetz, mit dem Sinneseindrücke von außen und Muskelaktivitäten mit dem Zentralnervensystem sowie untereinander verbunden sind. Alle drei Bereiche, die Sinneszellen, die Nervenzellen sowie die Muskelzellen sind elektrisch aktiv und sind Quelle, Leiter sowie Empfänger von bioelektrischen Signalen.

Das ZNS ist durch zwei Zelltypen charakterisiert, u.z. den Nervenzellen (Neurone) und der Gliazellen (Glia). Neurone sind, aufgrund ihrer elektrochemischen Erregungsbildung und Erregungsleitung, die eigentlichen Funktionsträger des Nervensystems. Ihnen obliegt die Aufgabe der Informationsverarbeitung, wohingegen Gliazellen als „Stützzellen“ für die Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase verantwortlich sind.

Die Nervenzellen bestehen aus dem Soma (Zellkörper), den Dendriten, Axonen (Neuriten) und Synapsen. Dendriten sind Fortsätze am Soma, mit denen die Nervenzelle Informationen von anderen Nervenzellen empfängt (afferente Strukturen). Axone übermitteln die Information von einer Nervenzelle an andere Nervenzellen (efferente Strukturen), wobei jede Nervenzelle nur ein Axon hat, das jedoch viele Verästelungen (Terminalbaum) bildet.

Am Ende von Axonen und Dendriten befinden sich Verdickungen bzw. Synapsen, welche Kontaktstellen zwischen den einzelnen Nervenzellen bilden. Interneurale Synapsen sind meist axo-dendritisch, axo-somatisch und axoaxonisch.

Bei der synaptischen Informationsübertragung werden mit hoher Präzision und Geschwindigkeit Informationen von einer Nervenzelle auf eine andere übertragen. Man kann zwischen chemischen und elektrischen Synapsen, sowie gemischten Formen unterscheiden. An elektrischen Synapsen, die auch Nexus (Macula communicans) oder Gap junctions genannt werden, treten benachbarte Zellmembranen miteinander in direkten Kontakt. An der chemischen Synapse erfolgt die Übertragung des Nervenimpulses durch Neurotransmitter, die

von den Nervenzellen gebildet und an den Synapsen freigesetzt werden. Auf der postsynaptischen Seite befinden sich Transmitterrezeptoren, die bei Aktivierung durch direkten oder indirekten Einfluß auf Ionenkanäle Potentialänderungen bewirken. Das Aktionspotential der Präsynapse wird in ein chemisches und wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt (Zilles und Rehkämper, 1998; Schmidt et al., 2000; Schmidt und Schaible, 2001).

2.2.2 Neurotransmitter

Die Erregungsübertragung im ZNS zeichnet sich durch das Zusammenspiel von Neurotransmittern und Rezeptoren aus. Aktionspotentiale lösen die Freisetzung (Release) von chemischen Botenstoffen (Neurotransmittern) aus dem präsynaptischen Axonende aus, die sich im synaptischen Spalt ausbreiten und nicht-kovalent an prä- oder postsynaptischen Rezeptoren binden. Die Neurotransmitterrezeptoren sind integrale Proteine der Zellmembran von Neuronen und Gliazellen mit einer Verbindung zum Intra- und Extrazellulärraum.

Die Definition von Neurotransmittern beinhaltet, daß chemische Substanzen, wie z.B. Acetylcholin, Aminosäuren, Monoamine, eine Reihe von Kriterien erfüllen müssen, bevor die Transmittereigenschaft eines Moleküls angenommen werden kann:

- Das präsynaptische Neuron verfügt über die entsprechenden Enzyme (z.B. Cholinacetyltransferase für Acetylcholin, Dopamin- β -hydroxylase für Noradrenalin, Tryptophan-5-hydroxylase für Serotonin) für die Synthese von Neurotransmittern.
- Der Neurotransmitter muß in den Axonterminalen präsynaptisch nachweisbar sein.

- Die direkte Applikation des Neurotransmitters muß am postsynaptischen Neuron die gleiche Reizantwort auslösen wie durch eine direkte, elektrische Stimulation des präsynaptischen Neurons.
- Die Neurotransmitterwirkung muß durch antagonistische Substanzen blockierbar sein.
- Es müssen Enzym- und Transportmechanismen für die Entfernung des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt vorhanden sein.
- Es müssen Rezeptoren auf der prä- oder postsynaptischen Seite für den Neurotransmitter vorhanden sein.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien unterteilt man die so definierten Neurotransmitter weiter in sogenannte klassische Transmitter mit kurzen und schnell eintretenden Effekten (Transmitter im engeren Sinne) und Peptiden (z.B. ACTH, ANF, AT-II, Oxytocin, Vasopressin, VIP, Opioiden etc.) mit langsamen und langanhaltenden Effekten (Neuromodulatoren). Entgegen dem lange postulierten Dale-Prinzip (ein Neuron synthetisiert nur einen Transmitter), können mehrere klassische Neurotransmitter oder ein Neurotransmitter in Kombination mit Neuropeptiden in einem Axonterminal kolokalisiert sein (Zilles und Rehkämper; Schmidt et al., 2000; Schmidt und Schaible, 2001).

2.2.3 Neurotransmitterrezeptoren

Die Neurotransmission, d.h. die Wirkung von Neurotransmittern bei der Erregungsübertragung, hängt von den Eigenschaften der Rezeptoren ab, welche Proteinmoleküle sind, die in die post- oder präsynaptische Membran von Neuronen und Gliazellmembranen eingebaut sind. Ein Neurotransmitter kann an verschiedene Rezeptoren binden und je nach Rezeptor exzitatorische oder inhibitorische Wirkungen entfalten. Ein

Transmitterrezeptor dagegen bindet nur einen Neurotransmitter mit hoher Affinität. Aufgrund der Bindung an Rezeptoren können Transmitter oder synthetisch hergestellte, transmitter-ähnliche Substanzen auch als Liganden (lat. ligare: binden) bezeichnet werden.

Bei den Rezeptoren können die ionotropen Rezeptoren von den metabotropen Rezeptoren unterschieden werden. Die ionotropen Rezeptoren besitzen ligandengesteuerte Kanäle, die die Zellmembran perforieren, während die metabotropen Rezeptoren keine Ionenkanäle enthalten, sondern über second-messenger Systeme verfügen. Die Stimulation ionotroper Rezeptoren führt durch Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes zu einer vorübergehenden Erhöhung der Membranleitfähigkeit für bestimmte Ionen (z.B. Na^+ , K^+ und Ca^{++} Ionen für AMPA und NMDA Rezeptoren). Metabotrope Rezeptoren wirken über Rezeptor-assoziierte Proteine, sogenannte G-Proteine (GTP hydrolysierende Proteine: G_s = stimulierendes G-Protein; G_i = inhibierendes G-Protein; G_q = chemotaktisches G Protein), auf Second Messenger (z.B. Ca^{++} , cAMP, IP3) ein, die wiederum die Aktivität intrazellulärer Enzyme (z.B. Proteinkinasen) beeinflussen.

Die selektive Durchlässigkeit der Zellmembran für bestimmte Ionen bewirkt, daß in Ruhe das Zellinnere im Vergleich zum Extrazellulärraum negativ geladen ist. Dieses Ruhemembranpotential beträgt in Abhängigkeit vom Neuronentyp ca. -70 mV. Der Einstrom von Kationen (Na^+ , Ca^{++}) in das Neuron bewirkt eine Depolarisation, das als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird. Wenn die Summation dieser relativ kleinen Depolarisationen das Schwellenpotential überschreitet, entstehen Aktionspotentiale, die über das Axon fortgeleitet werden und nachgeschaltete Neurone erreichen. Das Muster seiner Aktionspotential-Aktivität ist entscheidend für den Beitrag eines Neurons zur Informationsverarbeitung im Nervensystem. Rezeptoren, die auf die Bindung ihres jeweils spezifischen Transmitters eine Depolarisation der Zelle bewirken oder die Frequenz der Aktionspotentiale erhöhen, werden als exzitatorisch, solche die zu einer Hyperpolarisation

führen, als inhibitorisch bezeichnet (Zilles und Rehkämper, 1998; Schmidt et al., 2000; Schmidt und Schaible, 2001).

Muskarinische Rezeptoren

Die Rezeptoren für Acetylcholin (ACh) können durch die ACh-Agonisten Muskarin und Nikotin in zwei Gruppen, den sogenannten nikotinergen und muskarinischen ACh-Rezeptoren, eingeteilt werden (Yamamura, 1974).

Muskarinische Rezeptoren sind die am weitesten verbreiteten cholinergen Rezeptoren des ZNS (Yamamura, 1974). Folgende zwei, auf unterschiedlichen Kriterien basierenden Klassifikationen stehen zur Verfügung: Die erste Klassifikation unterteilt muskarinische Rezeptoren auf der Basis ihrer relativen Affinität zum Agonisten in SH- (= super high), H- (= high) und L- (=low) Rezeptoren (Birdsall et al., 1978), wohingegen die weiter verbreitete zweite Klassifikation mit M₁- und M₂-Rezeptoren auf der selektiven Affinität zum Antagonisten Pirenzepin (M₁: hohe Affinität; M₂: niedrige Affinität) beruht (Hammer et al., 1980; Watson et al., 1983). Daß beide Klassifikationen sich jedoch nicht ausschließen, zeigt sich insofern, als daß M₁ und M₂ Rezeptoren (basierend auf der zweiten Klassifikation) in einen SH, H und L Affinitätsstatus für Agonisten (basierend auf der ersten Klassifikation) unterteilt werden konnten (Kellar et al., 1985; Luthin und Wolfe, 1984; Schwartz, 1986; Spencer et al., 1988). Es zeigt sich, daß die Anzahl für Rezeptoren im H und SH Affinitätsstatus für Agonisten unter M₂ Rezeptoren höher war als unter M₁ Rezeptoren (Cortes und Palacios, 1986; Kellar et al., 1985; Messer und Hoss, 1987; Potter et al., 1983; Quirion und Boka, 1986; Schwartz, 1986; Spencer et al., 1988). Somit scheinen sich M₂ Rezeptoren mit Rezeptoren im H-Affinitätsstatus für Agonisten bzw. M₁ Rezeptoren mit Rezeptoren im L-Affinitätsstatus für Agonisten gleichsetzen zu lassen. Tatsächlich zeigte

sich, daß die Verteilung von M_1 Rezeptoren im Gehirn der von L-Rezeptoren ähnelte, während die Verteilung von M_2 Rezeptoren der kombinierten Verteilung von H- und SH-Rezeptoren gleich (Messer und Hoss, 1987; Quirion und Boka, 1986).

Adrenerge (α -) Rezeptoren

Die zwei Hauptgruppen der α -Adrenozeptoren (α_1 und α_2) wurden bisher in die vier jeweiligen Untergruppen α_{1A} - α_{1D} und α_{2A} - α_{2D} (Ruffolo et al., 1994) weiter unterteilt. Diskrepanzen aufgrund pharmakologisch und molekularbiologisch definierter Subklassen haben in der Vergangenheit zu größeren Kontroversen geführt. Die gegenwärtig akzeptierte Nomenklatur definiert drei Subklassen für die beiden α -Adrenozeptoren: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} und α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} (Watson und Girdlestone, 1995). In der vorliegenden Studie haben wir α_1 -Adrenozeptoren mit [3 H]prazosin (Ruffolo et al., 1994; Watson und Girdlestone, 1995) sowie α_2 -Adrenozeptoren mit [3 H]UK-14304 markiert (Watson und Girdlestone, 1995; Limberger et al., 1995; Trendelenburg et al., 1995, 1996a,b).

Glutamaterge Rezeptoren

L-Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS (Lipton und Rosenberg, 1994). Rezeptoren für die exzitatorisch wirkende Aminosäure Glutamat können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden (Watson und Girdlestone, 1995): (1) die ionotrope Gruppe mit den NMDA, AMPA und Kainat Rezeptoren sowie (2) die metabotrope Gruppe mit den sieben Untergruppen mGlu₁-mGlu₇.

Die Bindung von Glutamat am AMPA Rezeptor öffnet den vom Rezeptor gebildeten Ionenkanal, durch den ein starker Na⁺-Einstrom sowie ein schwacher K⁺-Ausstrom stattfindet.

Insgesamt kommt es durch die Aktivierung des AMPA-Rezeptors zu einer schnellen Depolarisation. Im Gegensatz dazu, führt die Glutamatbindung am NMDA-Rezeptor zu einer langsamen Depolarisation durch den Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} Ionen. Glutamat bewirkt daher insgesamt ein biphasisches depolarisierendes Potential mit einer schnellen AMPA und einer langsamen NMDA Komponente. Die Funktion des Kainat Rezeptors ist noch weitgehend ungeklärt. Dieser metabotrope Rezeptor wirkt indirekt über G-Proteine und das entsprechende second-messenger System auf nicht-ligandengesteuerte Ionenkanäle (Erhöhung des Ca^{2+} Ein- und K^+ -Ausstroms) und dadurch auf das Membranpotential ein. Jeder dieser pharmakologisch definierten ionotropen und metabotropen Glutamat Rezeptorentypen bildet durch Variationen der Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten noch einmal unterschiedliche Rezeptorsubtypen. Dadurch wird eine hohe funktionelle Differenzierung der Glutamatwirkung ermöglicht (Watson und Girdlestone, 1995).

Die Subtypen der Glutamatrezeptoren werden nach ihren stärksten Agonisten bezeichnet: AMPA Rezeptoren werden durch ihre selektive Affinität zum Agonisten α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole (AMPA) oder Quisqualate (Cha et al., 1988; Monaghan et al., 1983) charakterisiert, während der Kainat Rezeptor hohe Affinität zum Agonisten Kainat aufweist (Monaghan et al., 1983). Zu berücksichtigen ist die Tatsache, daß Kainat auch AMPA Rezeptoren aktiviert, wenn auch in einer 100-fach geringeren Affinität als zum Kainat Rezeptor. NMDA Rezeptoren spielen quantitativ die größte Rolle unter den glutamatergen Rezeptoren und werden durch ihre Affinität zum Agonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) charakterisiert (Monaghan et al., 1983). MK-801 wirkt mit einer hohen Affinität antagonistisch am NMDA Rezeptor, zeigt aber gleichzeitig, wenn auch nur sehr gering, eine Affinität an den übrigen Glutamat Rezeptoren (Wong et al., 1988).

GABAerge Rezeptoren

GABA (γ -amino-Buttersäure) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS der Säugetiere (Krenjevic, 1976) und bindet an drei Untergruppen von GABA Rezeptoren: GABA_A, GABA_B, und GABA_C (Cherubini & Strata, 1997; Sivilotti und Nistri, 1990). Eine Stimulation des ionotropen GABA_A Rezeptors öffnet für einen relativ kurzen Zeitraum den integralen Ionenkanal für Cl⁻, während der ebenfalls ionotrope und mit einem Chloridkanal ausgestattete GABA_C Rezeptor mit einer länger andauernden Kanalöffnung reagiert. Diese Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Cl⁻ verringert den Effekt depolarisierender Transmitter, kann die Aktionspotentialfrequenz herabsetzen und wirkt daher inhibitorisch. Dagegen kann der langsamere metabotrope GABA_B Rezeptor nicht nur die Leitfähigkeit der Membran für CA²⁺ Ionen verringern, sondern auch über die Öffnung von K⁺ Kanälen eine direkte Hyperpolarisation der Zelle in Form eines inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) bewirken (Zilles und Rehkämper, 1998).

Der ionotropische GABA_A Rezeptor ist sensibel für Muscimol und Bicuculline (Whiting et al., 1995; Rabow et al., 1995). Der metabotropische GABA_B Rezeptor sowohl für Muscimol als auch für Bicuculline unsensibel ist, aber dafür selektiv Baclofen bindet (Drew et al., 1984; Hill und Bowery, 1981; Sivilotti und Nistri, 1990). Der GABA_C Rezeptor ist unsensibel für Baclofen, bindet aber den Antagonisten Picrotoxin (Cherubini & Strata, 1997).

Serotoninerge Rezeptoren

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, daß 5-Hydroxytryptamin (5-HT) Rezeptoren in mehrere Rezeptorgruppen (5-HT₁ – 5HT₇) unterteilt werden können (Hoyer et al., 1994; Watson and Girdlestone, 1995; Boess and Martin, 1994; Saxena, 1994; Peroutka, 1993; Radja et al., 1991; Zifa and Fillion, 1992; Aghajanian, 1981; Nelson et al., 1980, Uphouse, 1997). Insbesondere

die intensiv erforschten 5-HT₁ (A, B, D, D α , D β , E, F) und 5-HT₂ (A-C) Rezeptoren können in weitere Untergruppen eingeteilt werden (Peroutka 1988; Hoyer et al., 1985; Middlemiss and Fozard, 1983; Gozlan et al., 1983; Pazos and Palacios, 1985; Pedigo et al., 1981). Die 5-HT₁ und 5-HT₂ Rezeptorgruppen sind G-Protein assoziiert und inhibieren die Adenylatzyklase (5-HT₁) bzw. aktivieren die Phospholipase C (5-HT₂) (Apud et al., 1992; Zgombick et al., 1993).

2.2.4 Tracing-Studien

Die Ermittlung anatomischer Projektionen in Tracing-Studien (engl. to trace: aufspüren, eine Spur verfolgen) erfolgt anhand von Tracing-Substanzen, die sich innerhalb der projizierenden Neurone ausbreiten. Hierdurch kommt es zur Lagemarkierung der Zellkörper und Zellfortsätze (Abb. 1). Besonders wichtig ist dabei die Art der Applikation (intrazellulär versus extrazellulär) und die intrazelluläre Transportrichtung (anterograd versus retrograd). Bei der Applikation der Tracing-Substanz wird zwischen der intrazellulären (direkten) Methode zur Markierung einer einzelnen Zelle und der extrazellulären (indirekten) Methode unterschieden. Bei der zuletzt genannten Methode kommt es zur Aufnahme der Tracing-Substanz durch mehrere umliegende Neuronen, wodurch ganze Neuronenpopulationen verfolgen können. Bei der intrazellulären Transportrichtung unterscheidet man den anterograden (vom Zellkörper zu den Axonterminalen) und den retrograden (von den Axonterminalen zum Zellkörper hin) Transport der Tracing-Substanz.

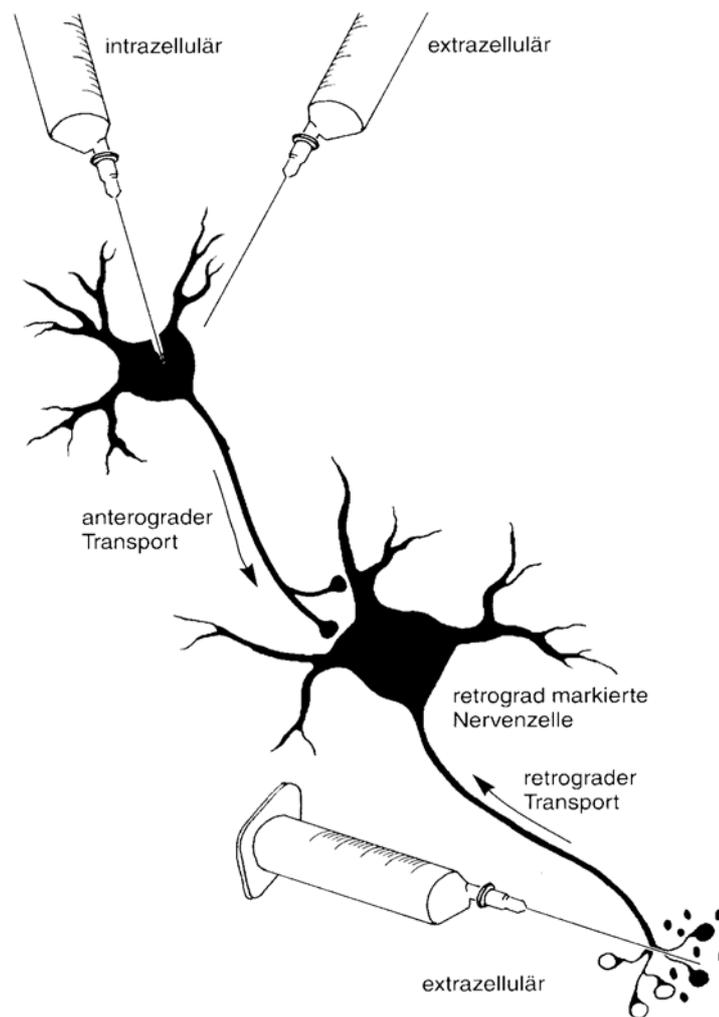


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Injektion und des Transportes der Tracingsubstanz.

Die Transporteigenschaft der jeweiligen Tracing-Substanz ist nicht nur für die Ermittlung des „Sender“- und „Empfängerareals“ von Bedeutung, sondern auch für die anschließende quantitative Auswertung. Retrograd markierte Zellkörper lassen sich einzeln identifizieren und damit leichter quantifizieren als anterograd markierte Axonterminale. Die weit überwiegende Zahl der Tracing-Studien ist semiquantitativ und klassifiziert die Gesamtstärke einer anatomischen Verbindung nach subjektiven Kriterien in die Kategorien stark, mittel und schwach. Weitere, sehr wichtige Unterscheidungsmerkmale von Tracing-Substanzen sind einerseits die unterschiedlichen Ausbreitungsverhalten und andererseits die notwendigen

Nachweisverfahren, wie z.B. Fluoreszenz, Immuncytochemie, Autoradiographie, die die Genauigkeit der Darstellbarkeit beeinflussen. Die in den letzten Jahren zunehmende Verwendung viraler Tracer ermöglicht einen transsynaptischen Transport. Sie eignen sich daher, um nicht nur direkte (monosynaptische), sondern auch polysynaptische Projektionen und damit Neuronenketten darzustellen.

Die Ermittlung der gesuchten Verbindungsmuster setzt eine genaue Kenntnis der Lage der Hirnstrukturen voraus, deren anatomische Grenzen durch mikrostrukturelle (Zytoarchitektur, Rezeptor- oder Enzymverteilung) sowie funktionelle Kriterien (Elektrophysiologie) festgelegt werden. In der klassischen anatomischen Nomenklatur wird im Kortex von „Arealen“ oder „Feldern“ bzw. im Subkortex von „Kernen“ oder „Nuclei“ gesprochen. Im Rahmen der vorliegenden systematischen Datenfassung in der CoCoMac-Datenbank (siehe Material und Methoden) wird der einheitliche Begriff „BrainSite“ verwendet. Eine Gruppe solcher BrainSites definiert dann eine spezifische „Hirnkarte“. Unterschiede in der Auflösung oder eine völlige Inkongruenz zwischen verschiedenen Hirnkarten können die Vergleichbarkeit und weiterführende Analysen beeinträchtigen.

2.3 Fragestellung

In der hier vorliegenden Dissertation wurden die intrinsischen Transmitterrezeptordichten im Gyrus cinguli beim Makakengehirn durch in-vitro Rezeptorautoradiographie quantitativ bestimmt. Darüberhinaus wurde die entsprechende intrazinguläre Konnektivität, d.h. die Projektionen von zingulären Arealen zu zingulären Arealen, beim Makaken anhand moderner Datenbankwendungen und -auswertungen auf der Grundlage publizierter Literaturdaten analysiert.

Die Ermittlung der Rezeptorverteilung in Kombination mit Analysen der strukturellen Konnektivität soll als ein bimodaler Ansatz eine bisher vorhandene Lücke in der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung schließen. Durch die kombinierte Evaluation der Rezeptor- mit der Konnektivitätsverteilung ist eine bessere Bewertung und Interpretation bisheriger anatomischer sowie funktioneller Teilergebnisse zur Knüpfung von Struktur-Funktionsbeziehungen möglich.

Rezeptoren dienen dem Informationstransfer vom prä- zum postsynaptischen Neuron als Grundlage der Interaktion zwischen Hirnarealen. Abhängig von der Identität des Transmitters und des Rezeptors kann der Informationstransfer exzitatorische, inhibitorische oder modulatorische Effekte haben. Die Kombination aus in-vitro Rezeptorautoradiographie und Konnektivitätsanalysen stellt eine konzeptuelle Verbindung zwischen den mikrostrukturellen Eigenschaften und der neuronalen Dynamik von Gehirnregionen her. Dies liefert einen verhaltens- und kontextunabhängigen Ansatz für die Interpretation von in-vivo Studien, wie z.B. anhand von Positronenemissionstomographie (PET) und funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT).

Im Gegensatz zu anderen Strukturen des ZNS, wie z.B. dem Präfrontalkortex (Lidow et al., 1989; Goldman-Rakic et al., 1990), dem visuellen Kortex (Rakic, 1988; Gebhard et al., 1993;

Rosier et al., 1993), dem motorischen und somatosensorischen Kortex (Schwark et al., 1994; Geyer et al., 1997, 1998; Kötter et al., 2001) und dem Hippokampus (Krämer et al., 1995; Martens et al., 1998; Zilles et al., 1991), ist die Verteilung der Neurotransmitterrezeptoren im Gyrus cinguli weitgehend unbekannt.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die folgenden Kernfragen:

Rezeptorautoradiographie

- Wie sehen die chemoarchitektonischen Charakteristika der zytoarchitektonisch definierten zingulären Areale beim Primaten aus?
- Gibt es signifikante Unterschiede in den Rezeptordichten zwischen den einzelnen zingulären Arealen.
- Rostrokaudale (interareale) Differenzierung: Gibt die Rezeptorverteilung Hinweise für die Einteilung des Gyrus cinguli in einen anterioren (AGC) und einen posterioren (PGC) Anteil?
- Dorsoventrale (intraareale) Differenzierung: Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Grad der zytoarchitektonischen Differenzierung und der Rezeptorverteilung innerhalb eines Areals?
- Gibt die Rezeptorverteilung eine Antwort auf die bisher unzureichend beantwortete Frage der Zugehörigkeit des zingulären „Übergangsbereichs“ 24': AGC oder PGC?
- Kann die Ermittlung der Rezeptorverteilung als Erklärungsansatz für die funktionelle Differenzierung des Gyrus cinguli dienen?

Konnektivität

- Was sind die Charakteristika intrazingulärer Konnektivität bzw. des daraus resultierenden Schaltplans?
- Zeigen die intrazingulären Konnektivitätsmuster Parallelen zur Rezeptorverteilung im Gyrus cinguli bzw. in welchen Fragestellungen bietet der bimodale Untersuchungsansatz ergänzende Erklärungsansätze?
- Spiegeln intrazinguläre Konnektivitätsmuster die zytoarchitektonische interareale (rostrokaudale) und intraareale (dorsoventrale) Differenzierung im Gyrus cinguli wider; gibt es eine eindeutige Zuordnung von Area 24' aufgrund der Verbindungsmuster?
- Welche Rolle spielt der intrazinguläre Schaltplan für die funktionelle Gliederung des Gyrus cinguli?

Um die Fragen zu beantworten, quantifizierten wir die Dichten von neun verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren mit Liganden für glutamaterge- (AMPA, Kainat und NMDA), muskarinische- (M_1 und M_2), noradrenerge- (α_1 und α_2), GABAerge- ($GABA_A$) sowie serotoninerge- ($5-HT_2$) Rezeptoren in zytoarchitektonisch definierten zingulären Arealen beim Makakenaffen anhand von in-vitro Rezeptorautoradiographie. In einem zweiten, komplementären Ansatz analysierten wir die intrazinguläre Konnektivität des Makakengehirns mithilfe der CoCoMac-Datenbank (Stephan et al., 2001; Kamper et al., 2002; <http://www.cocomac.org>), der umfangreichsten Sammlung anatomischer Konnektivität beim Makakenaffen.

Die Ergebnisse wurden durch multivariate Analyseverfahren statistisch getestet, die bereits Anwendung für komplexe Datensätze unterschiedlichen Ursprungs fanden, wie z.B. für zytoarchitektonische (Schleicher et al., 1999, 2000) und rezeptorarchitektonische Daten (Geyer et al., 1999; Kötter et al., 2001), sowie anatomische (Young et al., 1995; Young, 1992,

1993; Burns und Young, 2000; Bozkurt et al., 2001, 2002; Hilgetag et al., 2000) und funktionelle (Stephan et al, 2000; Passingham et al., 2002) Konnektivitätsdaten.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Rezeptorautoradiographie

3.1.1 Material

Es wurden fünf erwachsene männliche Makaken im Alter von 3.5–6 Jahren und mit einem Gewicht von 4-4.5 kg untersucht, die keine neurologischen Krankheiten oder Verhaltensauffälligkeiten aufwiesen. Die Tiere wurden mit Ketamin-Hydrochlorid (10 mg/kg Körpergewicht, i.m.) anästhesiert und anschließend mit einer intravenösen Überdosis Natrium-Thiopental euthanasiert. Nach der Kraniotomie wurde die Dura vorsichtig präpariert, die Gehirne umgehend entnommen, die Hemisphären getrennt und in frontale Blöcke geteilt. Die unfixierten Blöcke wurden 10 min bei –40 bis –50 °C in Isopentan schockgefroren und bis zur Inkubation mit den Liganden bei –70 °C gelagert.

3.1.2 Herstellung der Kryostatschnitte

Die Makakengehirne wurden am Abend vor dem Schneiden der Tiefkühlagerung (–70 °C) entnommen und über Nacht bei –20°C zwischengelagert, um die gewünschte Schneidetemperatur zu erreichen. Die Gehirnböcke wurden an einem Kryostat-Mikrotom (PolyCryocut, Reichert-Jung®) in 15 µm dicke Frontalschnitte bei –20 °C geschnitten. Die Schnitte wurden auf vorgekühlten, Chrom-Kalium-Gelatine beschichteten Objektträgern aufgeschmolzen und während des Schneidens bei 4 °C in Glaswiegen gesammelt, die sich in verschlossenen Glasküvetten befanden. Sie wurden anschließend über Nacht bei –25 °C unter Vakuum in einem Exsikkator mit Kieselgel gefriergetrocknet. Alternierende Schnitte wurden nach einheitlichem Schema mit Markscheiden-, Zellkörperfärbung oder für die Rezeptorautoradiographie verwendet.

3.1.3 Bindungsprotokoll

Die rezeptorautoradiographische Ermittlung der Dichte und des Verteilungsmusters von Transmitterrezeptoren wurde nach standardisierten Protokollen durchgeführt (Zilles 1988a, 1991; Zilles et al. 1988, 1991, 1993). Im Folgenden wird das Prinzip mit den drei Arbeitsschritten Vorinkubation, Hauptinkubation und Waschvorgang detailliert beschrieben. Die rezeptorspezifischen Einzelheiten zur Konzentration des Liganden, des Kompetitors, des Puffers, der Inkubationszeit und –temperatur sowie die Art des Waschvorgangs sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Receptor	[³ H]Ligand	Kompetitor	Inkubationspuffer	Vorinkubation	Hauptinkubation	Waschvorgang
AMPA	[³ H]AMPA (10nM)	Quisqualate (10µM)	50mM Tris-acetate (pH 7.2)	3 x 10min bei 4°C in Inkubationspuffer	45min bei 4°C in Inkubationspuffer + 100mM KSCN	4 x 4sec bei 4°C in Inkubationspuffer + 2 x 2sec bei 4°C in Acetone/Glutaraldehyde ¹
Kainate	[³ H]Kainate (8nM)	Kainate (100µM)	50mM Tris-citrate (pH 7.1)	3 x 10min bei 4°C in Inkubationspuffer	45min bei 4°C in Inkubationspuffer + 10mM Ca-acetate	4 x 4sec bei 4°C in Inkubationspuffer + 2 x 2sec at 4°C in Acetone/Glutaraldehyde ¹
NMDA	[³ H]MK-801 (5nM)	MK-801 (100µM)	50mM Tris-HCl (pH 7.2)	15min bei 25°C in Inkubationspuffer	60min bei 25°C in Inkubationspuffer + 30µM Glycine + 50µM Spermidine	2 x 5min bei 4°C in Inkubationspuffer
Muscarinic cholinergic M ₁	[³ H]Pirenzepine (1nM)	Pirenzepine (10µM)	Modifizierte Krebs- Ringer buffer (pH 7.4)	20min bei 25°C in Inkubationspuffer	60min bei 25°C in Inkubationspuffer	2 x 5min bei 4°C in Inkubationspuffer
Muscarinic cholinergic M ₂	[³ H]Oxotremorine-M (0.8nM)	Carbachol (1µM)	20mM Hepes-Tris (pH 7.5) + 10mM MgCl ₂	20min bei 25°C in Inkubationspuffer	60min bei 25°C in Inkubationspuffer	2 x 2min bei 4°C in Inkubationspuffer
α ₁ Adrenoceptor	[³ H]Prazosin (0.2nM)	Phentolamine (10µM)	50mM Tris-HCl (pH 7.4)	30min bei 37°C in Inkubationspuffer	45min bei 30°C in Inkubationspuffer	2 x 5min bei 4°C in Inkubationspuffer
α ₂ Adrenoceptor	[³ H]UK-14304 (1.4nM)	Noradrenaline (100µM)	50mM Tris-HCl (pH 7.7) + 100µM MnCl ₂	15min bei 22°C in Inkubationspuffer	90min bei 22°C in Inkubationspuffer	5min bei 4°C in Inkubationspuffer
GABA _A	[³ H]Muscimol (6nM)	GABA (10µM)	50mM Tris-citrate (pH 7.0)	3 x 5min bei 4°C in Inkubationspuffer	40min bei 4°C in Inkubationspuffer	3 x 3sec bei 4°C in Inkubationspuffer
Serotoninergeric 5-HT ₂	[³ H]Ketanserin (0.5nM)	Mianserin (10µM)	170mM Tris-HCl (pH 7.7)	30min bei 25°C in Inkubationspuffer	120min bei 25°C in Inkubationspuffer	2 x 10min bei 4°C in Inkubationspuffer

Tabelle 1. Bindungsprotokoll

Der Exsikkator mit den Schnitten wurde zwei Stunden vor Beginn der Versuche langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde der Luftdruck ausgeglichen. Die Wiegen mit den Schnitten wurden 5 min in einen kalten Luftstrom gestellt und anschließend in den Vorinkubationspuffer plaziert. Die Vorinkubation wurde ausgeführt, um endogene Substanzen (z.B. Neurotransmitter) zu entfernen, die im Gewebe an den untersuchten Rezeptoren gebunden waren und damit Bindungsstellen für die mit Tritium markierten Liganden blockieren. Der Nachweis der muskarinischen M_1 -Rezeptoren benötigt eine partielle Fixierung der Schnitte in Bouin-Dämpfen. Nach der Vorinkubation wurden die Schnitte einige Sekunden in einen kalten Luftstrom gehalten, um überflüssigen Puffer zu entfernen. Sie wurden dann 15 min auf flachen Behältern mit Bouin-Lösung unter einer Glas-Glocke plaziert. Dann erfolgte die übliche Fixierung. Anschließend wurden die Wiegen jeweils dreimal mit frischem Puffer gewaschen, um den Fixierer zu entfernen.

In der Hauptinkubation wurden die Schnitte mit dem jeweiligen ^3H -markierten Liganden inkubiert, dabei bindet der entsprechende Ligand nicht nur an den spezifischen Rezeptorbindungsstellen, sondern kann sich auch an unspezifische Bindungsstellen heften. Diese Markierung der spezifischen und der unspezifischen Bindungsstellen wird als Gesamtbindung (GB) bezeichnet. Die Ermittlung der unspezifischen Bindung (UB) erfordert die Durchführung eines zweiten Experiments an benachbarten Schnitten. Dazu werden die Schnitte mit dem ^3H -markierten Liganden zusammen mit einem in höherer Konzentration vorliegenden, unmarkierten Liganden (Kompetitor), der mit sehr hoher Affinität am untersuchten Rezeptor bindet, inkubiert. In diesem Experiment findet daher eine Konkurrenz zwischen dem ^3H -markierten Liganden und dem Kompetitor um die spezifischen Bindungsstellen statt. Hierbei werden die spezifischen Bindungsstellen durch den Kompetitor blockiert und im Autoradiogramm werden so nur die unspezifischen Bindungsstellen durch den ^3H -markierten Liganden dargestellt. Die unspezifische Markierung wird von der

Gesamtbindung abgezogen. In der Differenz erhält man die Konzentration der spezifischen (durch den ^3H markierten Liganden) Rezeptorbindungsstellen. Der Ligand wurde im Hauptinkubationspuffer verdünnt, um die gewünschte Zielkonzentration zu erreichen. Aus dieser Lösung wurden drei 100 μl Proben entnommen und im Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR. Packard, Canberra, Australien) gemessen, um die Realkonzentration berechnen zu können, die zur Berechnung der Rezeptordichten im Schnitt benutzt wird. Die Lösung wurde dann auf zwei Koplín-Gefäße verteilt. In das erste Koplín-Gefäß wurden die Schnitte für die Darstellung der Gesamtbindung gestellt. Zu der Lösung im zweiten Koplín-Gefäß wurde der Kompetitor in ungefähr 1000-fach höherer Konzentration als beim ^3H -markierten Liganden zugegeben. In dieser Mischung aus markiertem Ligand und Kompetitor wurden die Schnitte zur Darstellung der unspezifischen Bindung inkubiert.

Nach der Hauptinkubation ist ein Waschvorgang nötig, um den Bindungsprozeß anzuhalten und den ungebundenen Liganden sowie Puffersalze zu entfernen, die Artefakte auf der Filmemulsion verursachen können. Die Schnitte wurden in Pufferlösung gewaschen und anschließend in destilliertes Wasser getaucht. Die Schnitte zur Darstellung der AMPA und Kainat Rezeptoren wurden nicht in destilliertem Wasser gewaschen, sondern mit einer Aceton/Glutaraldehyd-Lösung abgespült und fixiert. Alle Schnitte wurden abschließend unter einem kalten Luftstrom getrocknet.

3.1.4 Auflegen und Entwickeln der Filme

Die Schnitte wurden zusammen mit Eichstandards (Microscales[®], Amersham) auf einen β -strahlenempfindlichen Film (Hyperfilm- ^3H , Amersham) aufgebracht und in Abhängigkeit vom jeweiligen Liganden für 4 bis 8 Wochen im Dunkeln bei 4°C exponiert (Tab. 2). Die Filme wurden bei Raumtemperatur für 5 min mit dem Kodak D19 System entwickelt, dann

für 10 min im Kodak Polymax System fixiert, 30 min unter fließendem Wasser gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Schwärzungen auf dem Film stellen die Autoradiogramme dar. Je höher die Rezeptordichte in einer bestimmten Region des Schnittes, desto dunkler ist diese Stelle im Autoradiogramm.

Expositionszeiten der Liganden	
• 4 Wochen	[³ H]AMPA [³ H]Kainat
• 5 Wochen	[³ H]Pirenzepin [³ H]Muscimol [³ H]MK-801
• 6 Wochen	[³ H]Prazosin [³ H]UK-14304 [³ H]Oxotremorin

Tabelle 2. Expositionszeiten für die verschiedenen Liganden

3.1.5 Histologie

Die histologischen Präparate sind notwendig, um eine zytoarchitektonisch präzise Abgrenzung der einzelnen Regionen und Schichten der Hirnareale nach den üblichen zyto- und myeloarchitektonischen Kriterien zu ermöglichen. Es wurden deshalb eine Silber-Zellkörperfärbung (modifiziert nach Merker 1983) und eine Markscheidenfärbung (modifiziert nach Gallyas 1979) durchgeführt.

Für die Silber-Zellkörperfärbung wurden die unfixierten Kryostatschnitte langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht fixiert. Die Fixierung erfolgte in einer Bodian-Fixierlösung (Tab. 3).

<p style="text-align: center;">Zusammensetzung der Bodian-Fixierlösung</p> <ul style="list-style-type: none">• 180 ml 80% Ethanol• 10 ml 37% Formalin• 10 ml Essigsäure
<p style="text-align: center;">Zusammensetzung des gepufferten Formalins</p> <ul style="list-style-type: none">• 900 ml Aqua dest.• 4 g Natriumhydrogenphosphat Monohydrat• 6.5 g Dinatriumhydrogenphosphat• 100 ml Formalin 37%

Tabelle 3. Angaben über die Zusammensetzung der Bodian-Fixierlösung und des gepuffert Formalins

Nach der Fixierung wurden die Schnitte zweimal je 5 min in destilliertem Wasser gespült, danach für zunächst 3 Stunden in 4 % Ameisensäure gelegt und anschließend über Nacht in konzentrierte Ameisensäure gestellt. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gewaschen und zweimal je 5 min in 1 % Essigsäure gestellt. Unmittelbar vor dem Entwicklungsprozeß wurden die drei Stammlösungen (A, B und C) unter Rühren langsam gemischt. Die Schnitte wurden 15-30 min entwickelt, wobei die Farbeintensität unter einem Mikroskop kontrolliert wurde. Anschließend wurden die Präparate 5 min in 1 % Essigsäure gestellt, 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült und schließlich 10 min im Fixierer (Kodak Polymax Fixierbad) nachfixiert. Vor dem

Eindecken mit DPX wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min in 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und zweimal in absolutem Ethanol) und in Xylol (zweimal je 5 min) entwässert.

<p style="text-align: center;">Zusammensetzung der Ameisensäure-Lösung</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 100 ml konzentrierte Ameisensäure-Lösung ▪ 300 ml 30% H₂O₂ ▪ 600 ml Aqua dest.
<p style="text-align: center;">Zusammensetzung der Entwicklerlösung</p> <p><u>Stammlösung A</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1000 ml Aqua dest. ▪ 50 g Natriumcarbonat <p><u>Stammlösung B</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1000 ml Aqua dest. ▪ 2 g Ammoniumnitrat ▪ 10 g Wolframatokieselsäure <p><u>Stammlösung C</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1000 ml Aqua dest. ▪ 2 g Ammoniumnitrat ▪ 2 g Silbernitrat ▪ 10 g Wolframatokieselsäure ▪ 7.3 ml 37% Formalin <p>Mischungen der Stammlösungen: 100 ml Lösung A + 30 ml Lösung B + 70 Lösung C</p>

Tabelle 4. Angaben über die Zusammensetzung der Bodian-Fixierlösung und des gepuffert Formalins

3.1.6 Auswertung

Die Autoradiogramme wurden mit einem computergestützten Bildverarbeitungsverfahren (Schleicher & Zilles 1988; Zilles & Schleicher 1995) densitometrisch ausgewertet. Zur Digitalisierung wurden die Filme mit den Autoradiogrammen und den Microscales auf eine Beleuchtungseinrichtung mit einer homogenen Ausleuchtung im Bereich des Meßfelds gelegt. Zur Bildverarbeitung wurde eine CCD Video Kamera (Sony C77, Tokyo, Japan) mit einem Makro-Objektiv (S-Orthoplanar 60-mm, Zeiss, Jena) in Verbindung mit einem KS-400[®] Bildverarbeitungssystem (Zeiss[®], Jena) verwendet. In jedem Bild wurden die durch Restinhomogenität der Beleuchtung entstandenen Fehler korrigiert. Dazu wurde durch Aufnahme einer nicht belichteten Stelle im Film ein Referenzbild erzeugt. Damit können die aufnahmebedingten technischen Inhomogenitäten der Grauwertverteilung des homogenen Objekts bei der Aufnahme weiterer Bilder berücksichtigt werden. Die Autoradiogramme sind als Grauwertbilder mit einer Auflösung von 756x512 Pixel und 8-Bit Grauwertauflösung gespeichert. Damit werden die im Autoradiogramm vorkommenden Schwärzungsintensitäten in einer Grauwertskala (0 [Schwarz] bis 255 [Weiß]) abgebildet. Zuletzt wurden die Autoradiogramme ausgedruckt.

Die Microscales[®] ermöglichten die Berechnung einer Transformationskurve, die die Beziehung zwischen den gemessenen Grauwerten und den Rezeptorkonzentrationen in fmol/mg Protein darstellt (Benfenati et al. 1986; Schleicher & Zilles 1988; Zilles & Schleicher 1995). Der Grauwert jedes Pixels eines Bildes wurde mit Hilfe der Transformationskurve in eine Rezeptordichte umgerechnet. In den digitalisierten Autoradiogrammen wird die Verteilung der Rezeptordichten im Gewebe abgebildet. Obwohl einige anatomische Strukturen des Gyrus cinguli im Autoradiogramm erkennbar sind, müssen die Ausdrücke mit histologischen Schnitten überlagert werden, um eine exakte und präzise anatomische Abgrenzung der zingulären Areale zu ermöglichen (Schleicher & Zilles 1988).

Daher wurden die radioaktiv markierten Schnitte nach Entwicklung des Films mit einer Silber-Zellkörperfärbung nachgefärbt. Somit konnte jedes Autoradiogramm mit dem korrespondierenden histologischen Schnitt überlagert werden. Dieses Verfahren war erforderlich, weil die häufig in der Literatur beschriebenen Abgrenzungen an einem benachbarten histologischen Schnitt zu einer signifikanten Verschiebung der Grenzlinien und dadurch zu einem Meßfehler führen könnten. Die optische Überlagerung geschah mit Hilfe eines Olympus© BH2 Mikroskops, an dem eine Kamera Lucida (Zeichenarm) montiert war. So war es möglich, ein ausgedrucktes Autoradiogramm mit dem dazugehörigen histologischen Schnitt zu überlagern. Die ausgedruckten Autoradiogramme mit den eingezeichneten Grenzen wurden dann mittels eines Digitalisiertablets und eines Referenzpunktsystems mit der abgespeicherten Bildmatrix zur Deckung gebracht, um die Rezeptordichte definierter Areale auswerten zu können. Für die einzelnen zingulären Hirnareale wurde so der Mittelwert der Rezeptordichte mehrerer Schnitte eines Gehirnes mit Standardfehler ermittelt.

Diese Werte mußten korrigiert werden, da sie die Sättigungsbedingungen nicht berücksichtigten. Die Umrechnung der Ligandendichte in eine Rezeptorkonzentration pro Proteinmenge (fmol/mg Protein) unter Sättigungsbedingungen wurde durch die folgende Formel ermöglicht (Schleicher & Zilles; Zilles & Schleicher 1995):

$$C_{KB} = \frac{C_B \times (K_D + L)}{L}$$

Dabei sind C_{KB} die korrigierte Rezeptorkonzentration, C_B die Rezeptordichte unter Inkubationsbedingungen, K_D die Dissoziationskonstante und L die Konzentration des Liganden während der Bindungsreaktion. Die korrigierten Werte stellen die Gesamtbindung

bzw. die unspezifische Bindung eines Liganden zum Rezeptor dar. Die Berechnung der spezifischen Bindung erfolgte durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung. Es wurden Gruppenmittelwerte der Rezeptordichten als absolute Rezeptordichten und als Relativwerte berechnet.

3.2 Konnektivität

3.2.1 Datenrepräsentation

Die Daten wurden in der Konnektivitäts-Datenbank „CoCoMac“ (*Collation of Connectivity data on the Macaque brain*; Bozkurt et al., 2001, 2002; Kamper et al., 2002; Stephan et al., 2001; www.cocomac.org) gesammelt. Diese stellt die weltweit umfangreichste Datenbank publizierter Verbindungsdaten beim Makakenaffen dar. Der Inhalt von CoCoMac basiert auf der systematischen und standardisierten Auswertung von publizierten Tracing-Studien. Datenbanktheoretisch handelt es sich um eine relationale Datenbank, deren Einträge in unterschiedlichen und unabhängigen Tabellen repräsentiert werden, die durch hierarchische Relationen miteinander verknüpft werden. Die einzelnen Tabellen in CoCoMac können in die folgenden drei Kategorien eingeteilt werden (siehe auch Tabelle 5):

- (1) Die Tabellen zu bibliographischen Daten enthalten Informationen zu den Autoren, dem Publikationsjahr, der Publikationsart sowie einen direkten Verweis auf den Eintrag einschließlich Zusammenfassung (Abstract) in der „PubMed“-Datenbank (www.pubmed.org).
- (2) Die Tabellen zur Hirnkartierung beinhalten Informationen zu den einzelnen Parzellierungsschemata wie Nomenklatur, Anlehnungen an klassische Kartierungen, Beziehungen zwischen den einzelnen BrainSites der verschiedenen Hirnkarten.
- (3) Die Tabellen zu den experimentelle Befunden enthalten wichtige Daten zu den jeweiligen Versuchen.

Durch Eingabe der methodischen Protokolle ist es möglich, für spätere Analysen nur spezifische Daten zu berücksichtigen, die zum Beispiel durch eine bestimmte Tracing-Substanz oder ein bestimmtes histologisches Verfahren zur Arealabgrenzung erhoben wurden. Die Dateneingabe erfolgt nach operationalisierten Regeln (Stephan et al., 2001; www.cocomac.org). Dabei wird die Beschreibung der Literaturdaten in Text und Bild bei der Eingabe durch Codes für die Präzision der Beschreibung („*precision of data description*“ = „PD-Codes“) dokumentiert. Aufgrund der objektiven und wertungsfreien Dateneingabe geben diese PD-Codes keine Angaben über die inhaltliche Qualität der publizierten Arbeit, sondern dienen bei späteren Berechnungen als Validierungskriterium. Bei der algorithmischen Integration werden nämlich präziser beschriebene Informationen mit besserem PD-Code gegenüber solchen bevorzugt, die weniger präzise beschrieben wurden.

Name der CoCoMac Datentabelle	Inhalte der Datentabelle
„Methods“	<ul style="list-style-type: none"> - Art der Tracing-Substanz - Injektionsmethode (Druck, Iontophorese, Diffusion) - Schichtdicke der histologischen Schnitte
„Methods_Animals“	<ul style="list-style-type: none"> - Anzahl der eingesetzten Tiere mit Angaben über Spezies, Alter, Gewicht, Geschlecht und dem Überlebenszeitraum nach Tracerinjektion
„Methods_RadioactiveTracers“	<ul style="list-style-type: none"> - Mischungsverhältnis der Tracing-Substanzen - Relative oder spezifische Aktivität der Tracing-Substanzen
„Injections“	<ul style="list-style-type: none"> - Name der injizierten BrainSite - Angabe über betroffene Hemisphäre (links, rechts) - Ausdehnung der Injektion in der betroffenen BrainSite - Volumen und Konzentration der injizierten Tracing-Substanz
„Injections_Laminae“	<ul style="list-style-type: none"> - Angabe über die betroffene Laminae der injizierten BrainSite

„LabelledSites_Data“	- Name der angefärbten BrainSiteBrainSite - Ausdehnung der Anfärbung in der betroffenen BrainSiteBrainSite - Dichte der Anfärbung
„LabelledSites_Descriptions“	- Hemisphäre (ipsilateral, kontralateral) - Angefärbte Struktur (Neuronsoma oder –terminal)
„LabelledSites_Data_Laminae“	- Laminäres Verteilungsmuster in einer angefärbten BrainSite
„LabelledSites_Data_QD“	- Quantitative Daten (QD): Neurone pro BrainSite oder Lamina mit absoluter Anzahl oder in Prozent

Tabelle 5: Inhalt der einzelnen CoCoMac Datenbanktabellen. In allen Datenbanktabellen existieren Felder für die jeweiligen PD-Codes, für die Text- bzw. Graphikreferenzen sowie für Originalzitate und Kommentare.

Zusätzlich zu den eigentlichen Verbindungsdaten werden Angaben über die Stärke der Verbindung („strength code“ = SC) und die Tracer-Ausdehnung („extension code“ = EC) im injizierten und im resultierend angefärbten Areal nachgehalten. Für die spätere algorithmische Verwertung werden diese Daten klassifiziert. So wird der SC mit „0“ für nicht vorhandene, „1“ für schwache, „2“ für mittlere, „3“ für starke und „X“ für unbekannte Verbindungsstärken. Der EC „P“ (siehe Abbildung 2) repräsentiert eine partielle, „C“ eine komplette, „X“ eine unbekannte und „N“ eine nicht vorhandene Verbindungsausdehnung. Der EC „N“ wird nur für nicht angefärbte „LabelledSites“ verwendet. Die Beobachterabhängigkeit spielt hinsichtlich der Kriterien für Existenz, Ausmaß und Stärke einer Verbindung eine erhebliche Rolle. Deshalb werden auch diese Daten durch die Vergabe entsprechender PD-Codes hinsichtlich der Genauigkeit ihrer Beschreibung bewertet.

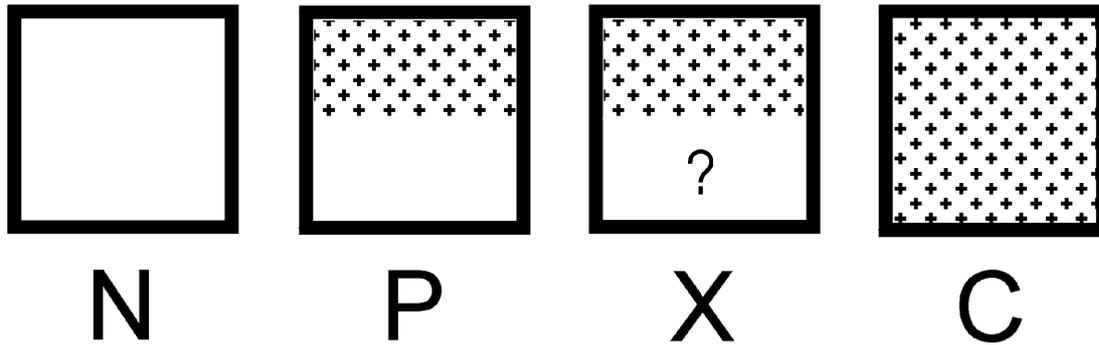


Abbildung 2: Kodierung des Ausmaß der Markierung eines Areals („extension code“). Diese schematische Darstellung entspricht der zweidimensionalen Aufsicht auf ein Kortexareal und berücksichtigt daher nicht die Beiträge der verschiedenen Schichten zu dem Ausmaß der Markierung (Stephan et al., 2001).

3.2.2 Grundlagen der Koordinaten-unabhängigen Transformation

Die Erfassung der „Intermap Relations“ erlaubt es, Konnektivitätsdaten aus unterschiedlichen und teilweise inkongruenten Hirnkarten miteinander zu vergleichen und für spätere Analysen zu integrieren (Stephan et al. 2000a). Dieses Konzept beinhaltet alle möglichen logischen Beziehungen zwischen zwei BrainSites. Diese werden innerhalb von CoCoMac mit einem entsprechenden „Relation Code“ (RC) kodiert (Stephan et al. 2000a; Stephan et al. 2001). So können die BrainSites A und B identisch sein (RC = „I“), A kann größer als B sein (RC = „L“), A kann ein Subareal von B sein (RC = „S“), die Grenzen der beiden Areale können überlappen (RC = „O“) oder die beiden Areale können völlig disjunkt sein (RC = „D“, nicht abgebildet).

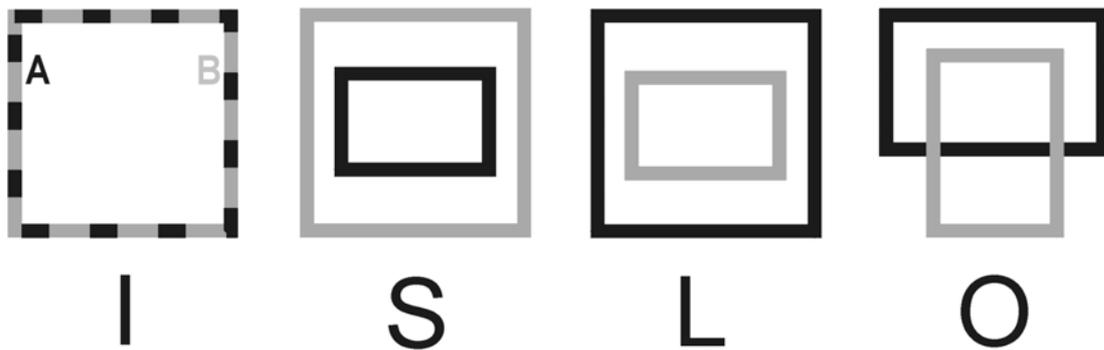


Abbildung 3: Kodierung möglicher Beziehungen („relation code“) zwischen zwei Hirnarealen (Stephan et al. 2001).

Detaillierte Beschreibungen dieser Konzepte wurden bereits publiziert (Stephan et al. 2001) und sind im Manual für die Dateneingabe unter www.CoCoMac.org zur Verfügung gestellt. Dort findet sich auch der Zugang zu CoCoMac-Online, dem Online-Interface von CoCoMac (Kamper et al. 2002; Kötter 2004).

Zum objektiven Transfer von Verbindungsdaten in frei wählbare Hirnkarten anhand eines reproduzierbaren Algorithmus ist es erforderlich, zwei wesentliche Probleme zu lösen. Einerseits werden die in der Literatur beschriebenen und für Tracing-Experimente verwendeten Hirnkarten häufig nur mit einer begrenzten Anzahl anderer Karten in Beziehung gesetzt und die Relationen zu der großen Mehrheit anderer Karten bleibt unerwähnt („Problem unbekannter Relationen“). Andererseits werden die Ergebnisse der Tracing-Studien in verschiedenen und zum Teil inkongruenten Hirnkarten beschrieben („Parzellierungsproblem“). Es ist also notwendig, unbekannte Relationen aus den bekannten abzuleiten. Es wird ein Verfahren benötigt, das den objektiven Transfer der Konnektivitätsdaten in unterschiedliche Hirnkarten erlaubt. Die „Objektive Relationale Transformation“ (ORT) ist eine koordinaten-unabhängige Lösung dieser beiden Probleme. Es handelt sich dabei um eine algorithmische Methode zur effizienten, transparenten und

reproduzierbaren Transformation von Konnektivitätsdaten in frei wählbare Zielkarten. Dies geschieht durch zwei Komponenten: Die erste Komponente von ORT erzeugt einen Relationsgraphen, der alle möglichen Beziehungen zwischen den eingegebenen Hirnarealen enthält und zur Transformation der Konnektivitätsdaten in die gewählte Zielkarte verwandt wird. Grundlage hierfür sind die eingegebenen, über „Relation Codes“ verbundenen Hirnareale und die daraus abgeleiteten Relationen. Den zweiten Schritt stellt die Übersetzung der Konnektivitätsdaten anhand des erzeugten Graphen dar. Bei der algorithmischen Transformation von Konnektivitätsdaten ist nicht nur ein Areal in Ausgangs- und Zielkarte zu beachten, sondern pro Karte sowohl ein Sender- (SourceSite) als auch ein Empfängerareal (TargetSite). Für beide muss eine Zielkarte bestimmt werden, in die die Konnektivitätsdaten übersetzt werden sollen. Durch die Kombination der „Extension Codes“ (EC's) für Source- und TargetSites sowie die Berücksichtigung der Richtung des axonalen Tracing-Transports ergibt sich der resultierende „ProjectionCode“ (PrC), der die tatsächliche Verbindung zwischen zwei Arealen darstellt. Eine ausführliche Darstellung der mathematischen Details von ORT findet sich in Stephan et al. (2000a).

In den hier durchgeführten Analysen wurden die Verbindungsdaten aus CoCoMac für die zingulären Hirnareale in das Parzellierungsschema von Vogt (1993) transformiert, das auch die Basis stellt für die autoradiographische Bestimmung der Rezeptorendichten.

3.2.3 Konnektivitätsmatrizen

Die Datenbank liefert je nach Ausmaß der berechneten Hirnkarten umfangreiche Informationen zu Injektionen, markierten Arealen sowie zusätzliche Detailinformationen (Verbindungsstärken, laminäres Muster etc.), die für eine effiziente Analyse von Konnektivitätsdaten durch ORT in eine zusammenfassende und vereinfachende

Darstellungsweisen transformiert werden. Die Konnektivitätsmatrix ist solch eine Darstellungsweise, in der Konnektivitätsdaten kompakt und abstrakt zusammengestellt werden. Diese Matrizen bilden rechteckige Zahlenschemata, in denen die Ausgangsareale in den Zeilen (SourceSites: Efferenzen) gegen die Zielareale in den Spalten (TargetSites: Afferenzen) aufgetragen werden. An den Schnittpunkten kann die Stärke einer existenten Verbindung abgelesen werden (Tab. 9). Diese Konnektivitätsmatrizen bilden die Ausgangsbasis für weiterführende Analysen (Bozkurt et al., 2001, 2002; Felleman & Van Essen, 1991; Kamper et al., 2002; Kötter et al., 2001a, b, 2002; Passingham et al., 2002; Scannell et al., 1995; Young, 1992, 1993).

3.3 Statistische Analysemethoden

Die Rezeptor- und Konnektivitätsdaten wurden mit zwei unabhängigen multivariaten Verfahren, der multidimensionalen Skalierung (MDS) und der hierarchischen Clusteranalyse (HCA), untersucht. Beide Analysemethoden sind in SYSTAT 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) implementiert. Außerdem wurden die Rezeptordaten mit der multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) und Diskriminanzanalyse ausgewertet.

3.3.1 Datenkonditionierung

Autoradiographische Daten stellen ligandenspezifische Bindungseigenschaften einzelner Areale in der Einheit fmol/mg Protein dar, und sind somit metrische Daten auf der Rationalskala. Im Vergleich dazu repräsentieren Konnektivitätsdaten das direkte Verhältnis zwischen zwei Hirnarealen, wobei die Verbindungsstärke in der Regel binären (existent = 1 vs. nicht-existent = 0) oder ordinalen (nicht-existent = 0, schwach = 1, mittelstark = 2, stark =

3) Charakters hat. Bei Verbindungen, für deren Existenz oder Nicht-Existenz keine Daten publiziert wurden, gingen wir von der Nicht-Existenz aus (siehe Young, 1992). Unbekannte Projektionsstärken wurden (auf der Skala schwach – mittelstark - stark) für den Zweck der statistischen Analyse und, in Anlehnung an vorherige Konventionen, (Scannell et al., 1995; Kötter and Sommer, 2000), als mittelstark (Wert = 2) betrachtet.

In Tracing-Studien werden nur in Ausnahmefällen Informationen über die Anzahl von Axonen, die von einem Areal zum anderen Areal projizieren, gegeben. Meistens besteht die Information zur Projektionsstärke nur aus einer groben und teilweise sehr subjektiven, semi-quantitativen Abschätzung. Die zu analysierenden Ausgangsmatrizen enthalten daher im besten Fall ordinal skalierte Abschätzungen der Dichte (0,1,2,3). Um diese unterschiedlichen, aber komplementären Datenmodalitäten vergleichen bzw. den gleichen multivariaten statistischen Analyseverfahren unterziehen zu können, wurden die Korrelationskoeffizienten berechnet und miteinander verglichen. Im Fall der metrischen Rezeptorbindungswerte der einzelnen zingulären Hirnareale ermittelten wir den Pearson Korrelationskoeffizienten (Systat, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Die graduierten Konnektivitätsvektoren der Verbindungen innerhalb des Gyrus cinguli wurden nach dem Verfahren von Spearman (Systat, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) korreliert.

3.3.2 Multidimensionale Skalierung

Mit Hilfe der multidimensionalen Skalierung (MDS; Bozkurt et al., 2001, 2002; Kötter et al., 2001a, b) werden Objekte entsprechend ihrer Ähnlichkeit in einem hochdimensionalen Raum positioniert und dann unter bestmöglicher Beibehaltung der Abstandsreihenfolge als Punkte in einem Raum kleinerer Dimension (zwei Dimensionen in unserem Beispiel) angeordnet (Backhaus et al. 1996; Borg and Groenen 1997). Mit dem Ziel einer intuitiven Visualisierung

werden möglichst Räume mit maximal drei Dimensionen angestrebt (Young 1992; Young & Harris, 1990; Shepard 1980). Die unvermeidliche Verformung der Konfiguration wurde mit Kruskals Stress Koeffizienten quantifiziert. Diese multivariate Analyseverfahren wurde bereits für Analysen von strukturellen (Young 1992, 1993; Hilgetag et al., 2000; Bozkurt et al., 2001, 2002; Kötter et al., 2001a, b) und funktionellen Konnektivitätsdaten (Stephan et al. 2000b), und Rezeptorbindungsdaten (Kötter et al, 2001) verwendet.

Im Hinblick auf Rezeptordaten werden die Ähnlichkeiten als räumliche Beziehungen von Punkten bzw. Gehirnarealen in einem höherdimensionalen Raum angesehen (Young et al., 1992). Hirnareale mit ähnlichen Rezeptorverteilungen liegen hierbei näher zusammen als Hirnareale mit unterschiedlichen Rezeptorwerten. Durch Reduktion der Dimensionalität in einen zwei- oder dreidimensionalen Raum kann diese Anordnung und somit auch die Topologie der Hirnareale veranschaulicht werden.

Bei den Konnektivitätsdaten liegen Hirnareale mit ähnlichen Verbindungsmustern näher zusammen als solche mit unterschiedlichen Verbindungsmustern. Nach jeder Analyse zeigt der Stress-Wert an, wie gut die Anordnung der einzelnen Elemente im niedriger dimensionalen Raum die tatsächlichen Verhältnisse widerspiegelt. Die Stress-Werte liegen zwischen 0 und 1, wobei Werte nahe 0 eine datengetreue Darstellung anzeigen (Details in Burns & Young, 2000; sowie Backhaus et al., 1996, S. 431ff.).

3.3.3 Hierarchische Clusteranalyse

Bei der hierarchischen Clusteranalyse (HCA; Bozkurt et al., 2001, 2002; Kötter et al., 2001a, b) werden Objekte über Merkmalsvektoren erfasst. Mittels dieser Vektore sollen gleichartige Objekte zu disjunkten Gruppen (Clustern) zusammengefasst werden. Die Objekte innerhalb einer Gruppe sollen möglichst homogen, die einzelnen Cluster dagegen möglichst

unterscheidbar sein. Zu Beginn der Analyse bildete jedes Areal ein eigenes Cluster. Nach Berechnung der Distanzen zwischen allen Arealen wurden die zwei Areale mit der kleinsten Distanz fusioniert und der Prozess wiederholt, bis alle Areale zu einem Cluster verschmolzen waren. Dadurch entstanden bei der HCA Dendrogramme von hierarchischen Clustern, deren Hierarchien durch sukzessive Vereinigung von Objekten entsprechend ihrer Ähnlichkeit geformt wurden. An jedem Punkt des Clusterbaumes können die einzelnen Objekte genau einem Cluster zugeordnet werden. Für die hier vorliegenden Analysen wurde die „complete linkage“ Methode und als Distanzen die normalisierten euklidischen (d.h. Wurzel der mittleren quadrierten) „Assoziationen“ verwendet.

3.3.4 Multivariate Varianzanalyse

Rezeptordichten wurden mittels MANOVA (Multivariate Analysis of Variances, SPSS, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), einer multivariaten Varianzanalyse, auf signifikante Arealunterschiede getestet. Die Rezeptordichten (Mittelwerte der einzelnen Versuchstiere nach einer „missing value“ Abschätzung) wurden als Variablen und die zingulären Hirnareale hingegen als Faktoren betrachtet. Post-hoc Paarvergleiche unter der Bonferroni Korrektur wurden für multiple Vergleiche herangezogen. Werte von $p < 0.05$ wurden als signifikant betrachtet.

3.3.5 Diskriminanzanalyse

Auf der Basis vorangegangener explorativer Analysen wurden die einzelnen zingulären Areale entweder dem AGC (24a,b,c; 24'a,b,c) oder dem PGC (23a,b,c; 29abc, 29d; 30) zugeordnet. Die Diskriminanzanalyse vergleicht die Zentroide der Gruppen und identifiziert

zusätzlich die Rezeptoren, die am stärksten zu einer Differenzierung in einen AGC und PGC beitragen. In einer vorwärts-schrittweisen Prozedur wurden die Variablen mit der höchsten F-to-enter aufsummiert bis F-to-enter unter einen Wert von 0.15 gefallen ist. Die Qualität der Klassifizierung wurde überprüft durch Auslassung einzelner Variablen in einer randomisierten Prozedur (jackknifed classification).

4 Ergebnisse

4.1 Rezeptorautoradiographie

4.1.1 Zytoarchitektonische Abgrenzung des Gyrus cinguli

Die Ermittlung der Rezeptorbindungsichten im Gyrus cinguli erfordert die exakte anatomische Abgrenzung der jeweiligen Hirnareale. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die einzelnen zytoarchitektonischen Kriterien, die zur Arealabgrenzung herangezogen wurden, gegeben. Diese basieren hauptsächlich auf der Hirnkarte bzw. dem Parzellierungsschema von Vogt (1993) (siehe Abbildung 4).

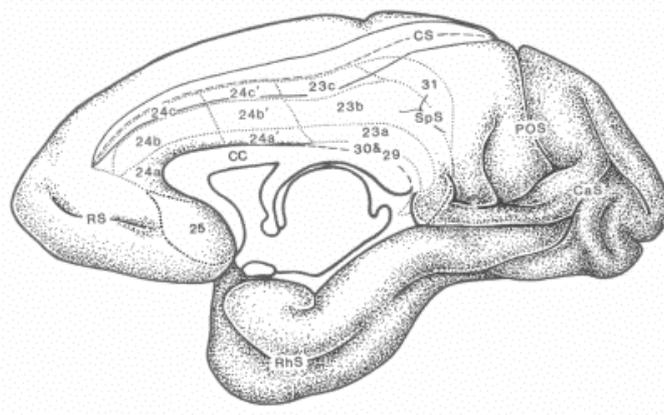


Abbildung 4. Der Gyrus cinguli (Ansicht von medial) im Makakenhirn auf der Basis des Parzellierungsschemas von Vogt (1993).

Der anteriore Gyrus cinguli (AGC) enthält die beiden agranulären Areale 24 und 25, während der posteriore Gyrus cinguli (PGC) das granuläre Areal 23, die retrosplenialen Übergangsareale 29 und 30 sowie das zinguloparietale Areal 31 enthält. Der Bereich zwischen dem anterioren Areal 24 und dem posterioren Areal 23 ist eine Übergangszone und wird 24' bezeichnet.

Ventral vom Genu des Corpus Callosum liegt Area 25, das trotz einer erkennbaren laminären Architektur relativ schwach differenziert ist. Area 25 hat eine undifferenzierte Lamina II-III, die in der Zellkörperfärbung im Vergleich zu den tiefen Schichten schwächer gefärbt ist. Die tiefen Schichten von Area 25 bestehen aus einer prominenten und undifferenzierten Lamina V mit großen Pyramidenzellen und einer schmalen Lamina IV. Area 24 liegt im rostralen Drittel des Gyrus cinguli, bildet die Hauptkomponente des AGC und besitzt 3 Subkompartimente (24a-c) mit einer progressiven Differenzierung in ventro-dorsaler Richtung. Area 24a grenzt an den Sulcus callosus und ist in seiner laminären Architektur relativ homogen. Sanides (1970) klassifiziert dieses an das Indusium griseum grenzende Areal als Periallokortex. Die oberflächlichen Schichten sind weniger zell dicht als die tiefen Schichten, während die Pyramidenzellen in der Lamina Va wesentlich prominenter sind. Area 24b ist differenzierter als Area 24a und wird als Proisokortex klassifiziert. Ihre Lamina III hat eine weniger zell dichte Lamina III, eine relativ einfach geformte Lamina II und eine sehr dicke und zell dichte Lamina Va. Lamina Vb ist klar definiert und Lamina VI ist breiter als in 24a. Der Kortex in der Tiefe des Sulcus callosus enthält Areale, die in rostrokaudaler Richtung eine stetige Differenzierung aufweisen. Area 24c hat relativ einfach differenzierte Laminae II-III, Pyramidenzellen in einheitlicher Größe in Lamina III, und eine Lamina V, deren Pyramidenzellen groß und intensiv gefärbt sind.

Zwischen den zingulären Arealen 23 und 24 liegt eine Übergangszone, die erstmals durch Sarkissov et al. (1955) als „23/24“ eingeführt wurde, und durch Matelli et al. (1991) teilweise als „24d“ wieder aufgenommen wurde. Übernommen wurden die Bezeichnungen bzw. Kriterien von Vogt (1993), der diese Übergangszone als Area 24' bezeichnete. Area 24c' besitzt sehr große Pyramidenzellen, die die Lamina IIIc definieren und ungefähr die gleiche Größe haben wie die Pyramidenzellen in Lamina Va. Area 24c' hat keine Lamina IV und ist daher agranulär. Lamina Va ist zudem sehr zell dicht. Die Areale 24a' und 24b' haben etwas

breitere Laminae II-III als ihre weiter rostral gelegenen Pendants 24a und 24b. Insgesamt hat Area 24' eine zell dichtere Lamina V und große Pyramidenzellen in Lamina V als Area 24, wobei gleichzeitig die absolute Breite von Lamina V und VI abnimmt.

Der posteriore Gyrus cinguli verändert sich am Übergang zu den benachbarten Strukturen sehr stark in der zytoarchitektonischen Differenzierung. Am Splenium des Corpus Callosum befinden sich Teile des allokortikalen Hippokampus und des dorsalen Subikulums, des periallokortikalen Areals 29, der proisokortikalen Areale 30 und 23a und der isokortikalen Areale 23b-c und 31. Area 23 ist das größte zinguläre Areal und bildet die Hauptkomponente des PGC. Jedes Subkompartiment hat 6 Schichten, wobei Area 23a nicht ganz ausdifferenziert ist. Area 23a hat eine Lamina II, die, wie im Areal 24a, noch mit Lamina IIIa-b Pyramidenzellen vermischt ist. Lamina III kann in die Sublaminae IIIa-b mit mittelgroßen und IIIc mit sehr großen Pyramidenzellen unterteilt werden. Lamina IV ist granulär, jedoch im Vergleich zu 23b noch recht schmal. Durch die vorhandene Lamina IV und die relativ differenzierte Lamina II läßt sich 23a als Proisokortex klassifizieren. Area 23b gilt als isokortikales Area, da es eine breite und stark granuläre Laminae II und IV, stark differenzierte Laminae Va und VIa und zellarme Laminae Vb und VIb hat. Area 23c liegt kaudal von 24c' in der Tiefe des Sulcus cinguli und hat Lamina IIIc-Pyramidenzellen, die ungefähr die gleiche Größe haben wie die Pyramidenzellen in Area 24c'. Die Lamina IIIc-Pyramidenzellen sind dabei größer als die größten Lamina Va-Pyramidenzellen. Außerdem hat Area 23c eine Lamina IV und ist daher granulär. Die retrosplenialen Areale 29 und 30 liegen in der Tiefe des Sulcus callosus, wobei Area 29 zwei Subkompartimente hat. Das laterale Kompartiment ist am wenigsten ausdifferenziert und wird nach Vogt (1993) als Area 29l bezeichnet. Synonym für dieses Subkompartiment ist unter anderem RSg1 (Vogt, 1976) oder 29a-c (Vogt, 1985). Area 29l hat eine undifferenzierte granuläre Lamina II-IV und die Laminae V und VI. Area 29m liegt medial von 29l, wobei die Laminae III und IV gut

differenziert werden können. Direkt unterhalb von Lamina I hat Area 29m mittelgroße Pyramidenzellen in der Lamina III, die nicht weiter differenziert werden kann in Sublaminae IIIa-c. Area 30 liegt medial von 29m und ist dysgranulär. Area 30 hat eine Lamina II, die gut von der Lamina III abgrenzbar ist, wobei die Lamina III wiederum in die Sublaminae IIIa-b mit mittelgroßen Pyramidenzellen und IIIc mit großen Pyramidenzellen unterteilt werden kann. Die Lamina III hat insgesamt eine höhere Zelldichte als Area 23a. Lamina IV liegt zwischen IIIc und Va, ist aber von dysgranulärer Natur, da sie eine stark variierende Breite hat und weil die Körnerzellen sich mit Pyramidenzellen aus Lamina IIIc vermischen. Lamina Va ist abgrenzbar in Area 30, jedoch enthält sie nicht so viele große Pyramidenzellen wie in die Lamina Va der benachbarten Area 23a. Deshalb ist diese Lamina in Area 30 nicht so prominent wie in Area 23a. Sowohl Area 29 als auch Area 30 setzen sich bis in den Sulcus calcarinus fort und grenzen somit an den visuellen Kortex. In einer Übergangszone zum medialen parietalen Kortex liegt Area 7m oder Brodmanns (1909) Area 31. Area 31 hat die breiteste Laminae I-IV des gesamten Gyrus cinguli und die größten Lamina IIIc-Pyramidenzellen. Charakteristischerweise sind die Zellen in den supragranulären Schichten säulenartig bzw. vertikal angeordnet.

4.1.2 Rezeptorbindungsichten

Im folgenden Abschnitt wird die Verteilung der Bindungsdichten der untersuchten neun Rezeptoren beschrieben.

Eine detaillierte Übersicht der absoluten Dichtewerte ist in Tabelle 6 gegeben; die graphische Darstellung der ermittelten Bindungsdichten in zingulären Ober- (Abbildung 5) und Unterarealen (Abbildung 6) dient der besseren Veranschaulichung der rostrokaudalen und dorsoventralen Differenzierung im Gyrus cinguli.

	24a	24b	24c	24a'	24b'	24c'	25
AMPA	2113 ± 395	1851 ± 309	2012 ± 342	1777 ± 303	1656 ± 234	1790 ± 320	1978 ± 0
kainate	1908 ± 429	2204 ± 413	2006 ± 384	1954 ± 336	2107 ± 354	1832 ± 309	2399 ± 0
MK801	2312 ± 983	2319 ± 862	2180 ± 867	2904 ± 491	2855 ± 468	2766 ± 456	∅
pirenzepine	1043 ± 314	1002 ± 282	1053 ± 329	1217 ± 213	1243 ± 236	1289 ± 246	965 ± 0
oxotremorine	264 ± 140	291 ± 147	306 ± 160	440 ± 97	496 ± 105	509 ± 109	279 ± 0
prazosin	612 ± 136	614 ± 141	729 ± 157	426 ± 120	517 ± 129	642 ± 139	629 ± 0
UK14304	405 ± 167	443 ± 156	496 ± 187	490 ± 164	539 ± 175	567 ± 180	519 ± 0
ketanserine	354 ± 104	314 ± 84	408 ± 93	458 ± 140	368 ± 118	438 ± 137	327 ± 0
muscimol	4083 ± 581	3720 ± 545	3930 ± 559	∅	∅	∅	4112 ± 0

	23a	23b	23c	29abc	29d	30	31
AMPA	1480 ± 333	1454 ± 287	1508 ± 324	1206 ± 375	1411 ± 373	1487 ± 263	1160 ± 0
kainate	1897 ± 331	2110 ± 409	2116 ± 415	1456 ± 216	1748 ± 232	1887 ± 203	1618 ± 0
MK801	3118 ± 445	3112 ± 448	3157 ± 488	2260 ± 257	2731 ± 267	3067 ± 67	2989 ± 0
pirenzepine	1152 ± 341	1218 ± 310	1352 ± 207	983 ± 106	1137 ± 169	1260 ± 102	1033 ± 0
oxotremorine	688 ± 397	750 ± 458	806 ± 517	1412 ± 1575	1116 ± 1081	904 ± 763	775 ± 579
prazosin	1503 ± 697	1411 ± 718	1563 ± 857	2001 ± 1677	1851 ± 1453	1611 ± 1187	2387 ± 0
UK14304	582 ± 198	541 ± 188	529 ± 183	428 ± 0	465 ± 0	498 ± 0	∅
ketanserine	435 ± 154	401 ± 136	427 ± 133	492 ± 20	552 ± 69	446 ± 136	421 ± 201
muscimol	2189 ± 1022	2294 ± 1072	2306 ± 1079	1713 ± 1055	2207 ± 1388	2524 ± 1549	2086 ± 1335

Tabelle 7. Mittlere Bindungsdichten ± Standardabweichungen in fmol/mg Protein der radioaktiven Liganden in zingulären Subkompartimenten. ∅ = Nicht evaluiert. Werte ohne Standardabweichungen sind Mittelwerte von einem Versuchstier.

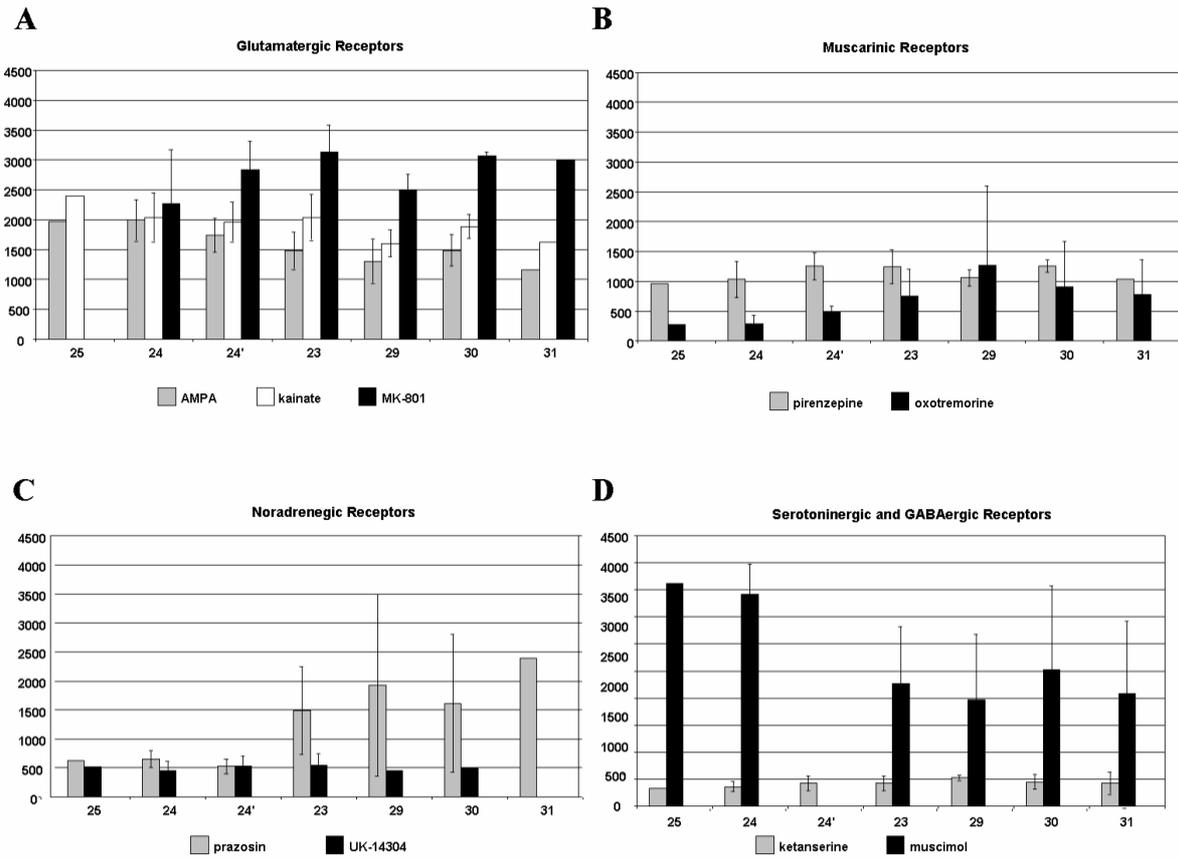


Abbildung 5. Mittlere Bindungsdichten (Ordinate: Dichte in fmol/mg protein) in zingulären Oberarealen von rostral nach kaudal (Abszisse: von links nach rechts). A: Glutamatergic Rezeptoren, B: Muskarinische Rezeptoren, C: Noradrenerge Rezeptoren, D: Serotonerg und GABAerge Rezeptoren.

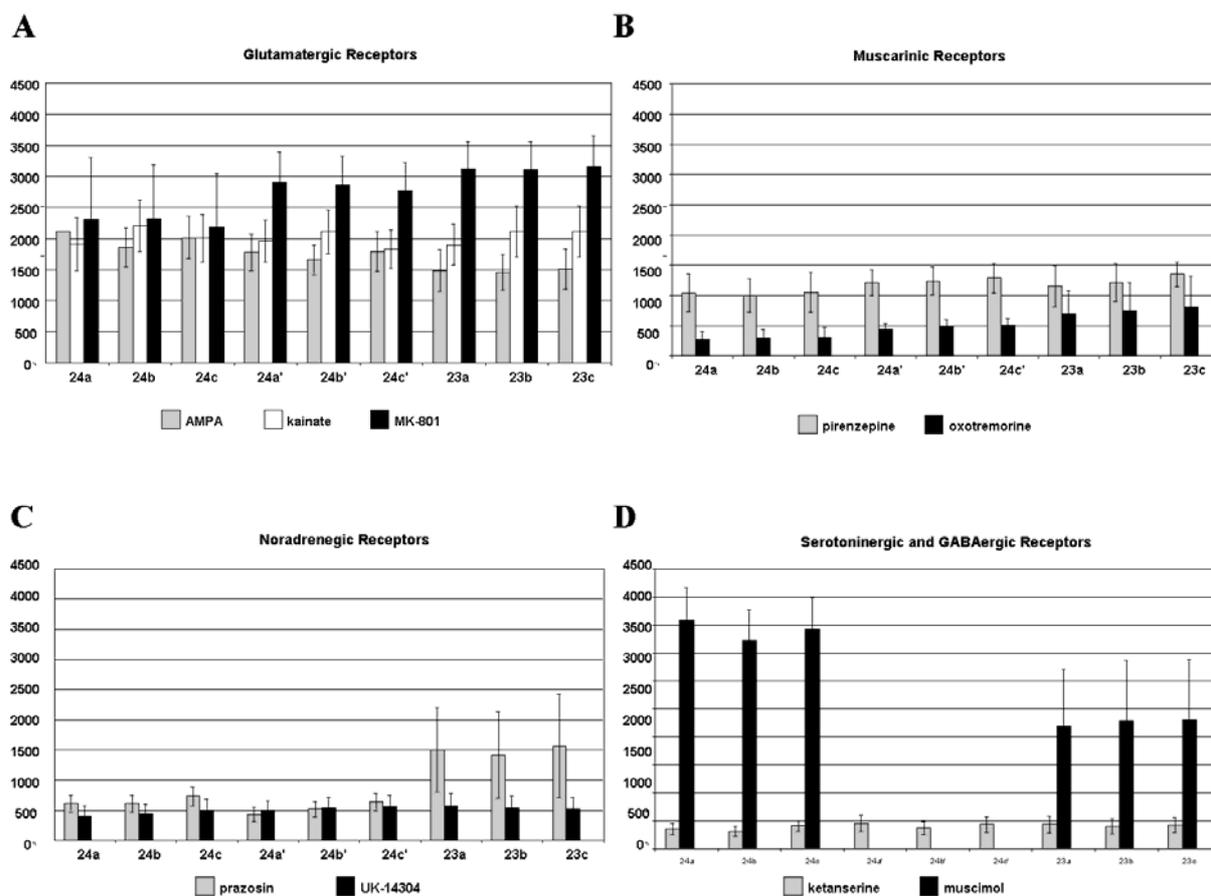


Abbildung 6. Mittlere Bindungsdichten (Ordinate: Dichte in fmol/mg protein) in zingulären Unterarealen von rostral nach kaudal (Abszisse: von links nach rechts). A: Glutamaterge Rezeptoren, B: Muskarinische Rezeptoren, C: Noradrenerge Rezeptoren, D: Serotonerg und GABAerge Rezeptoren.

4.1.3 Multivariate Varianzanalyse (MANOVA)

Die Rezeptordichten wurden mittels MANOVA auf signifikante Arealunterschiede getestet.

Die interarealen Unterschiede waren signifikant ($p < 0.05$, $F = 394.908$).

Die signifikanten Unterschiede zeigten sich bei Arealpaarungen, bei dem der eine Partner dem AGC und der andere Partner dem PGC zugeordnet werden konnte; eine Ausnahme bildete hierbei der Vergleich zwischen Area 24c und Area 24b' für GABA_A Rezeptoren (Tabelle 7).

Area 1	Area 2	Rezeptor	p-Wert
24a	23a	AMPA	0.030
	23b	AMPA	0.025
	23c	AMPA	0.043
	29abc	AMPA	0.012
	29d	AMPA	0.043
	23a	GABA _A	0.021
	23b	GABA _A	0.019
	23c	GABA _A	0.020
	29abc	GABA _A	0.016
	29d	GABA _A	0.033
	30	GABA _A	0.049
	29abc	M ₂	0.020
	24b	29abc	GABA _A
29abc		M ₂	0.023
24c	29abc	AMPA	0.026
	23a	GABA _A	0.014
	23b	GABA _A	0.013
	23c	GABA _A	0.013
	24b ^c	GABA _A	0.049
	29abc	GABA _A	0.012
	29d	GABA _A	0.024
	30	GABA _A	0.036
	29abc	α ₂	0.025
24b ^c	24c	GABA _A	0.049
24c ^c	29abc	AMPA	0.042
	29abc	UK-14304	0.047
23a	24a	AMPA	0.030
	24a	GABA _A	0.021
	24c	GABA _A	0.014
23b	24a	AMPA	0.025
	24a	GABA _A	0.019
	24c	GABA _A	0.013
23c	24a	AMPA	0.043
	24a	GABA _A	0.020
	24c	GABA _A	0.013
29abc	24a	AMPA	0.012
	24c ^c	AMPA	0.042

	24c	AMPA	0.026
	24a	GABA _A	0.016
	24b	GABA _A	0.050
	24c	GABA _A	0.012
	24a	M ₂	0.020
	24b	M ₂	0.023
	24c	M ₂	0.025
	24c'	α ₂	0.047
29d	24a	AMPA	0.043
	24a	GABA _A	0.033
	24	GABA _A	0.024
30	24a	GABA _A	0.049
	24c	GABA _A	0.036

Tabelle 8: Liste über signifikante Arealunterschiede (Area 1 versus Area 2) in Bezug auf Rezeptorbindungsichten; ermittelt durch MANOVA mithilfe der Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche.

4.1.4 Rezeptorverteilung

Glutamaterge Rezeptoren

Es zeigte sich eine eindeutige Präferenz für [³H]AMPA Bindungsstellen in anterioren zingulären Arealen. Area 24a zeigte die höchste Bindungsdichte für [³H]AMPA im Gegensatz zu den weiter posterior gelegenen Arealen, wo vor allem Area 29abc und 31 die niedrigsten Dichtewerte aufzeigten. Bezogen auf die Subkompartimente der Areale 24, 24' und 23, wurden die niedrigsten Werte im Subkompartiment "b" gefunden. Darüberhinaus waren die Dichteunterschiede in den anterioren zingulären Arealen größer als in den posterioren Arealen.

Die Dichte an [³H]Kainat Bindungsstellen war in den Arealen 25 und 24b am höchsten, während Area 29abc die niedrigste Bindungsdichte aufwies. Im Gegensatz zu [³H]AMPA

konnten im Subkompartiment "b" von Area 24 und 24' höhere Bindungsdichten nachgewiesen werden als im höherdifferenzierten Subkompartiment "c" oder niedrigerdifferenzierten Subkompartiment "a". Generell konnte ein absteigender Gradient in rostrokaudaler Richtung nachgewiesen werden. Dieser Gradient war aber nicht stetig, da die [³H]Bindungsdichte in Area 24' niedriger war als im weiter posterior gelegenen Areal 23.

Die Bindungsdichten von [³H]MK-801 wiesen einen rostrokaudal ansteigenden Gradienten auf, mit der Ausnahme von Area 29abc, das die zweitniedrigste Dichte zeigte. Die höchste Dichte konnte in Area 23c gefunden werden, während Area 24c die niedrigste Dichte aufwies.

Muskarinische Rezeptoren

Bindungsstellen von [³H]Pirenzepin waren am höchsten konzentriert in Area 23c, während Area 25 und 29abc die niedrigste Dichte aufwiesen. Wie in Area 24' zeigte sich eine dorsoventrale Abnahme auch in Area 23 mit einer höheren Streuung rostral als kaudal.

Die niedrigste Bindungsdichte von [³H]Oxotremorin konnte in Area 24 beobachtet werden, speziell im ventralen Subkompartiment 24a, während in der kaudalen Area 29abc die maximale Bindungsdichte gefunden werden konnte.

[³H]oxotremorin Bindungsstellen waren in den rostralen Arealen (25 und 24) oder transitionalen Area 24' niedriger konzentriert als in kaudalen Arealen (23, 29, 30, und 31) mit einem ventrodorsalen absteigenden Gradienten in den Arealen 24, 24' und 23.

Noradrenerge Rezeptoren

Die Bindungsdichte von [³H]Prazosin stieg von rostral nach kaudal und von ventral nach dorsal. Die höchste Bindungsdichte konnte in den Arealen 29abc und 31, die niedrigste Dichte in Area 24a' gefunden werden.

Die [³H]UK-14304 Bindung war minimal in Area 24a und maximal in Area 23a. In den übrigen zingulären Arealen zeigte das Bindungsmuster eine relativ homogene Verteilung. Eine Abnahme der Bindungsdichte von dorsal nach ventral zeigte sich in den Arealen 24 und 24', während sich in Area 23 ein Anstieg in dieser Richtung beobachten ließ.

Serotoninerge Rezeptoren

Die Bindungsdichte von [³H]Ketanserin war maximal in Area 29d und minimal in Area 24b. Die Bindungsdichte zeigte einen ansteigenden Gradienten von rostral nach kaudal mit einer homogenen Verteilung bzw. mit einer geringeren Streuung in den Subkompartimenten von Area 23 als von den Arealen 24 oder 24'. In diesen Arealen zeigte sich die niedrigste Dichte durchgehend im Subkompartiment "b".

GABAerge Rezeptoren

Die [³H]Muscimol Bindung war am höchsten in den rostralen Arealen 24a und 25 und am niedrigsten im kaudalen Areal 29abc. In Area 24 zeigte sich ein dorsoventraler absteigender Gradient, während das kaudale Areal 23 einen ansteigenden Gradienten in dieser Richtung verzeichnete.

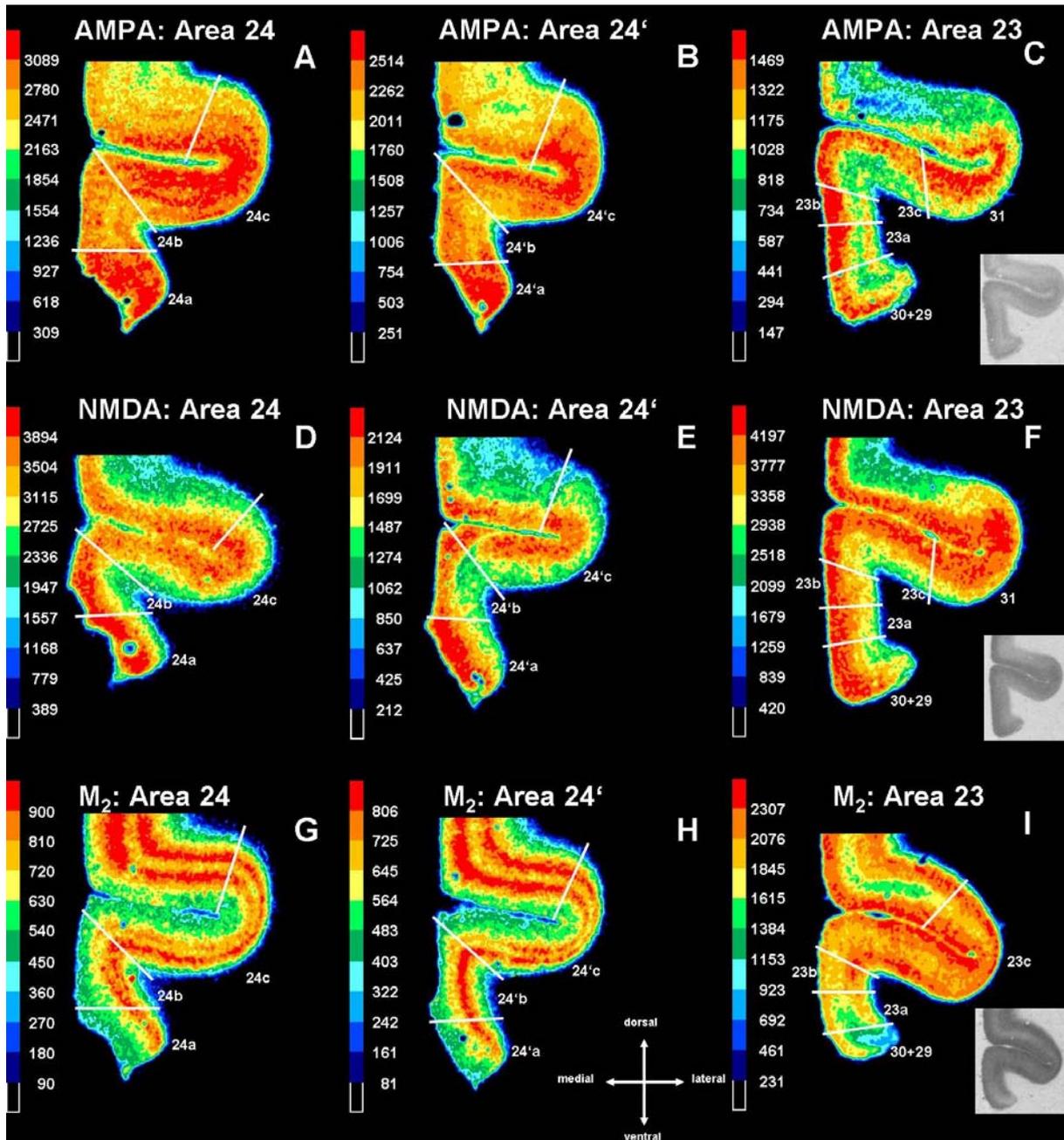


Abbildung 7. Exemplarische farbkodierte Autoradiographiebilder in koronarer Schnittrichtung für den AMPA- (obere Zeile; A-C), NMDA- (mittlere Zeile; D-F), und M₂-Rezeptor (untere Zeile; G-I).

Angeordnet sind die Koronarschnitte nach ihrer anatomischen Lokalisation im Gyrus cinguli mit dem jeweiligen anterioren Areal 24 in der ersten Spalte (A,D,G), dem Übergangsbereich 24' in der zweiten Spalte (B,E,H) und dem posterioren Areal 23 in der dritten Spalte (C,F,I).

Die Schwärzungen auf den strahlenempfindlichen Originalfilmen sind in den Abbildungen C,F,I zu sehen. Je höher die Rezeptordichte in einer bestimmten Region des Schnittes, desto dunkler ist diese Stelle im Autoradiogramm (siehe Material & Methoden). Zur besseren Visualisierung wurden die unterschiedlichen Graustufen in 12 Farbstufen (schwarz bis rot) transformiert, die den entsprechenden Rezeptordichten entsprechen (siehe linksbündige Farbskalen mit Dichtewerten in fmol/mg Protein).

4.1.5 Multidimensionale Skalierung und Hierarchische Clusteranalyse

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Rezeptorbindungsdaten wurden zwei weiteren und unabhängigen multivariaten statistischen Verfahren unterzogen. Hierarchische Clusteranalysen der korrelierten (normalisierten) Bindungsdaten brachten zwei Gruppen mit den Arealen 24a-c und 24a-c' in einer ersten Gruppe und mit den Arealen 23a-c, 29 und 30 in einer zweiten Gruppe (Abb. 8A) hervor. Diese Konstellation wurde durch die multidimensionale Skalierung bestätigt (Abb. 8B).

Die orthogonale Korrelation derselben Bindungsdaten (um Ähnlichkeiten der Rezeptortypen zu zeigen) (Abb. 8C,D) zeigte, welche Rezeptoren eine ähnliche Verteilung über die einzelnen Areale aufwiesen. Die hierarchische Clusteranalyse brachte zwei Gruppen hervor: [³H]muscimol, [³H]AMPA und [³H]kainate hatten eine sehr ähnliche Verteilung über die einzelnen zingulären Areale hinweg (Abb. 8C); wie in Tabelle 6 und Abbildung 5 dargestellt, zeigten sich sehr hohe Bindungswerte in AGC und niedrige Werte in PGC. Diese erste Gruppe separierte sich klar von einer zweiten Gruppe mit Rezeptoren, die vorzugsweise im PGC vorkommen und sich in zwei Untergruppen aufteilen, mit [³H]UK-14304, [³H]pirenzepin und [³H]MK-801 in der einen Untergruppe, und [³H]ketasnerin, [³H]oxotremorin und [³H]prazosin in der anderen Untergruppe. Auch hier bestätigte die multidimensionale Skalierung die Aufteilung der Liganden in zwei Gruppen und drei Untergruppen (Abb. 8D).

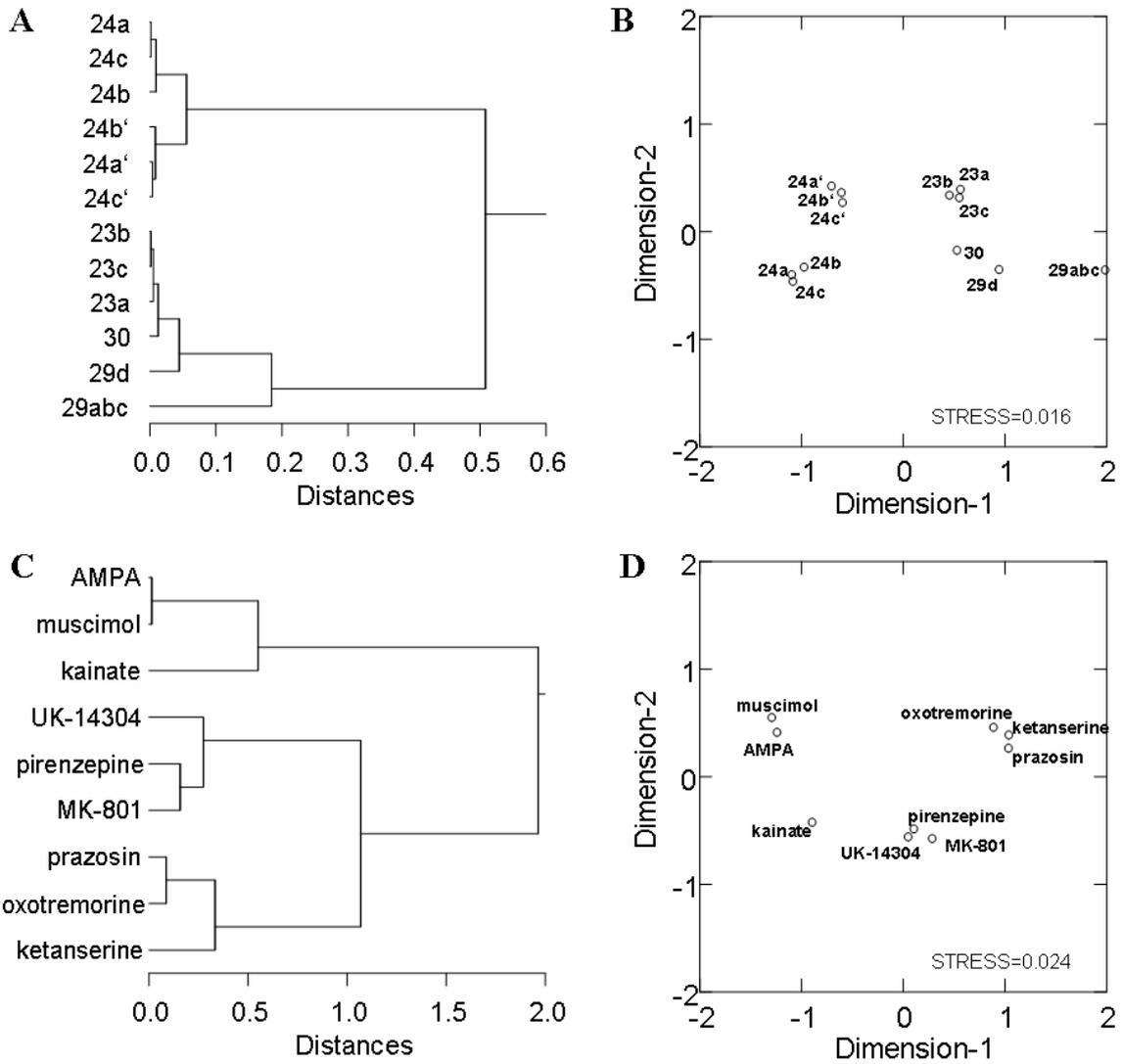


Abbildung 8. Darstellung charakteristischer Bindungsmuster im Gyrus cinguli mittels hierarchischer Clusteranalyse (A, C) und multidimensionaler Skalierung (B, D). Die Ähnlichkeiten zwischen Arealen in A und B und die Ähnlichkeiten zwischen Rezeptoren in C and D basieren auf den gleichen Werten (siehe Tabelle 3). Der Stress-Wert zeigt an, wie gut die Anordnung der einzelnen Elemente im niedriger dimensionalen Raum die tatsächlichen Verhältnisse widerspiegelt, wobei Werte nahe null eine bessere Darstellung anzeigen.

4.2 Konnektivität

4.2.1 Multidimensionale Skalierung und Hierarchische Clusteranalyse

Die multidimensionale Skalierung (MDS) gruppierte die Areale aufgrund ihrer intrazingulären Konnektivität in die folgenden drei Cluster: (i) 24a, 24a', 23a, 24b', (ii) 24b, 24c, 23b, 23c, 24c', 25, (iii) 29, 30 (Abb. 9). Bei genauerer Betrachtung der Konnektivitätsmatrix ließ sich diese Gruppierung eindeutig nachvollziehen, wobei man sowohl die Afferenzen als auch die Efferenzen miteinbeziehen mußte. Der erste Cluster bestand aus 6 zingulären Arealen, wovon aber nur zwei Areale (23b und 23c) eindeutig dem PGC zugeordnet werden konnten. Dieser Cluster beinhaltete insgesamt 22 bekannte Efferenzen (25 → 24c, 24c'; 24b → 25, 24c, 23b, 23c; 24c → 25, 24a, 24b, 24c', 23c; 24c' → 24a, 24b, 23c; 23b → 25, 24c, 24c', 23a, 23c; 23c → 24c, 24c', 23b). Der zweite Cluster bestand aus 4 Arealen, u.z. einem eindeutig anterioren Areal (24a), zwei transitionalen Arealen (24a', 24b') und einem eindeutig posterioren Areal (23a) mit insgesamt 17 bekannten Efferenzen (24a → 24c, 24a', 24c', 23a, 23b, 23c; 24a' → 23a; 24b' → 24c', 23b; 23a → 24a, 24b, 24c, 24a', 24b', 24c', 23b, 23c). Das Unterscheidungsmerkmal in den efferenten Verbindungsmerkmale dieser beiden Cluster lag darin, daß die Areale in dem zweiten Cluster vornehmlich zu anterioren und transitionalen Arealen (15 von 22 Efferenzen) projizierten mit relativ gleichmäßiger und reger Beteiligung der jeweiligen 6 Senderareale. Im Gegensatz dazu sendeten die Areale des ersten Clusters aber zusätzlich (zu den anterioren und transitionalen Arealen) auch zu posterioren Arealen (7 von 17 Efferenzen), während hierbei nur zwei Areale (24a und 23a) die meisten Efferenzen übernahmen. Die Betrachtung der afferenten Verbindungsmuster zeigte ein weiteres Unterscheidungskriterium, das darin lag, daß die Areale des zweiten Clusters weitaus stärkere Empfängereigenschaften (27 Afferenzen) aufwiesen als der erste Cluster (9 Afferenzen).

Die hierarchische Clusteranalyse (HCA) bestätigte weitgehend die MDS Ergebnisse und fügte zwei weitere Cluster hinzu: (i) 24b', 23a, (ii) 29, 30, (iii) 24c, 24c', (iv) 25, (v) 24a, 24b, 23c,

(vi) 24a', 23b (Abb. 9). Die Ergebnisse dieser beiden unabhängigen Methoden deckten sich bis auf zwei Arealpaare, die in der MDS-Darstellung noch innerhalb eines Clusters waren (24a und 24a' bzw. 24b und 23b) und in der HCA-Darstellung diese Cluster durchbrachen und zwei neue Arealpaare bzw. zwei neue Cluster (24a und 24b bzw. 24a' und 23b) bildeten.

	A25	A24a	A24b	A24c	A24'a	A24'b	A24'c	A23a	A23b	A23c	A29	A30
A25		0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A24a	0		0	1	2	0	1	2	2	1	1	1
A24b	2	0		1	0	0	0	0	2	1	1	1
A24c	1	2	2		0	0	3	0	0	2	2	2
A24'a	0	0	0	0		0	0	2	0	0	0	0
A24'b	0	0	0	0	0		2	0	1	0	0	0
A24'c	0	2	2	0	0	0		0	0	2	2	2
A23a	0	2	2	1	2	2	2		2	1	1	1
A23b	2	0	0	1	0	0	1	1		1	1	1
A23c	0	0	0	1	0	0	3	0	1		0	0
A29	0	0	0	1	0	0	2	0	2	1		1
A30	0	2	2	1	0	0	2	2	2	2	0	

Tabelle 9. Matrix intra-zingulärer Konnektivität mit Source Sites (Senderareal) und Target Sites (Empfängerareal) in der ersten Spalte bzw. Zeile. Die Verbindungsstärke ist dargestellt auf der Skala 0 = nicht-existent, 1 = schwach, 2 = mittelstark, 3 = stark. Nicht bekannte Projektionen (grau hinterlegt) erhalten eine 0, unbekannte Verbindungsstärken wurden als 2 = mittelstark gewertet (siehe Methodenkapitel; Young et al., 1992; Scannell et al., 1995; Kötter und Sommer, 2000).

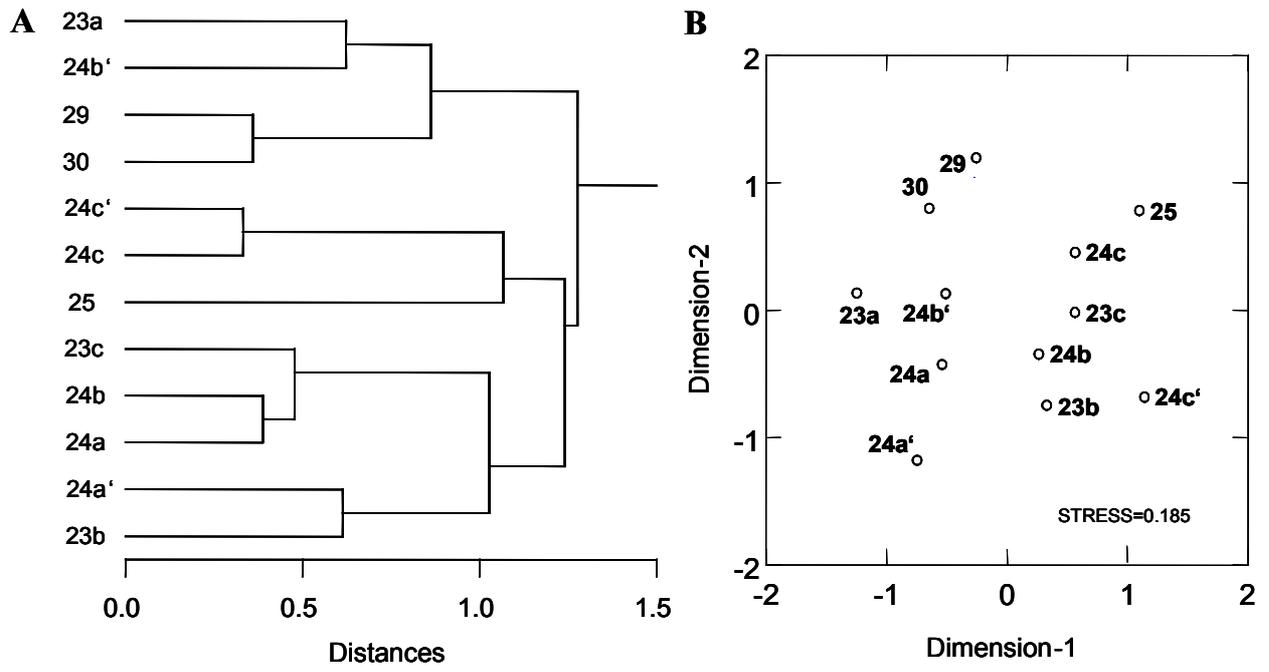


Abbildung 9. Darstellung des intrazingulären Konnektivitätsmusters mittels hierarchischer Clusteranalyse (A) und multidimensionaler Skalierung (B) basierend auf der Konnektivitätsmatrix (siehe Tabelle 9).

5 Diskussion

5.1 Rezeptorautoradiographie

5.1.1 Vergleich mit anderen Autoradiographiestudien

Trotz der großen Bedeutung für die Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung im Gehirn gibt es nur eine geringe Anzahl autoradiographischer Studien, die sich mit dem Gyrus cinguli befassen. Im zunächst folgenden Abschnitt wurden alle autoradiographische Studien berücksichtigt und verglichen, die in einem inhaltlichen Zusammenhang zu der vorliegenden Arbeit stehen.

Serotoninerge Rezeptoren

Die serotoninergen Rezeptoren im menschlichen Gyrus cinguli wurde durch Pazos et al. (1987b) anhand von [³H]Ketasnerin untersucht. Es wurden höhere Dichtewerte in den Schichten I, III, und V von Brodmann's Area 23 gefunden als in den entsprechenden Schichten von Area 24. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, da auch wir einen absteigenden Dichtegradienten für 5-HT₂-Rezeptoren von dem kaudal gelegenen Areal 23 über das transitionale Areal 24' bis hin zum rostralen Areal 24 gefunden haben.

Muskarinische Rezeptoren

Cortes et al. (1987) verglichen die Verteilung der muskarinischen Rezeptoren in den Arealen 24 und 23 von Brodmann anhand von [³H]N-methylscopolamine ([³H]NMS) in Kombination mit Carbachol für M₁-Rezeptoren und mit Pirenzepin für M₂-Rezeptoren im menschlichen Gyrus cinguli. Für M₂-Rezeptoren beobachteten sie in den Schichten III und V von Area 24

niedrigere Dichtewerte als in den entsprechenden Schichten von Area 23. In Übereinstimmung mit Cortes et al. (1987), fanden wir einen ansteigenden Gradienten von anterioren zu posterioren Regionen mit signifikant höheren Werten von M₂-Rezeptoren im kaudalen zingulären Areal 23 als im transitionalen Areal 24' und rostralen Areal 24. Unsere Daten über die Verteilung von M₁-Rezeptoren stimmen ebenfalls mit ihren Ergebnissen überein, da ihre Messungen in Area 24 niedrigere Dichtewerte aufwiesen als die entsprechenden Schichten in Area 23.

Glutamaterge Rezeptoren

Drei autoradiographische Studien berichten am Rande von Ergebnissen über die Verteilung glutamaterger Rezeptoren im zingulären Kortex (Rainbow et al, 1984; Jansen et al, 1989; Young et al, 1990). Beim Makaken untersuchten Young et al. (1990) Quisqualate und NMDA Rezeptoren in Area 24 durch den Vergleich äußerer und innerer Schichten. Dabei fanden sie höhere Dichtewerte von NMDA in den äußeren und höhere Dichten von Quisqualate in den inneren Schichten von Area 24. Wir können unsere Ergebnisse nicht direkt mit den Resultaten von Jansen et al. (1989) vergleichen, da wir unsere Quantifizierungen in den einzelnen zingulären Arealen mit Durchschnittswerten über die einzelnen Schichten hinweg vorgenommen haben. Hierbei fanden wir generell eine höhere Anzahl von NMDA als AMPA Rezeptoren sowohl im rostralen Areal 24 als auch im transitionalen Areal 24'. Beim Menschen untersuchten Jansen et al. (1989) glutamaterge Rezeptorsubtypen im anterioren Gyrus cinguli ohne Spezifizierung der einzelnen Areale. Sie beobachteten höhere Dichtewerte von NMDA und AMPA Rezeptoren in den Schichten 1-3 als in den Schichten 5-6 und 4 sowie gleichzeitig höhere Kainat Rezeptordichten in den Schichten 5-6 als in 1-3 und 4. Tendenziell fanden sie höhere Dichten an NMDA als AMPA und Kainat Rezeptoren im

AGC. Diese Beobachtungen bestätigen größtenteils unsere Daten über die Areale 24 und 24' beim Makaken, da wir höhere Dichten von NMDA als AMPA und Kainat Rezeptoren finden konnten. Rainbow et al. verwendeten [³H]AMPA bei der Ratte und fanden 296 fmol/mg Protein im zingulären Kortex ohne Spezifizierung der zingulären (Sub-)Areale.

5.1.2 Vergleich zwischen anteriorem und posteriorem Gyrus cinguli

Die mittleren Bindungsdichten der zingulären Areale zeigten ein charakteristisches Muster. Es gab einen direkten Zusammenhang zwischen der topographischen Position der Areale (anterior vs. posterior) (Abb. 5), den Bindungsdichten (maximal vs. minimal [Tabelle 6] bzw. hoch vs. niedrig [Abb. 5-6]) und der Ähnlichkeit der Bindungsmuster (Abb. 8) für die radioaktiven Liganden der großen Rezeptorklassen.

Der anteriore Gyrus cinguli zeigte eine hohe Dichte der drei glutamatergen Rezeptoren (AMPA, Kainat, NMDA) und des GABA_A Rezeptors, während die anderen Rezeptoren dort relative niedrige Werte aufwiesen. Anders verhielt sich die Verteilung im posterioren Gyrus cinguli, wo die α_1 - und M₂-Rezeptoren annähernd gleiche oder sogar höhere Bindungsdichten aufwiesen als die glutamatergen Rezeptoren. Alpha-2 und 5-HT₂-Rezeptoren zeigten durchgehend nur niedrige Dichtewerte.

Innerhalb der glutamatergen Rezeptorklasse zeigten NMDA Rezeptoren durchgehend höhere Dichtewerte als die Kainat Rezeptoren, diese wiederum höhere Werte als die AMPA Rezeptoren. Adrenerge α_1 -Rezeptoren zeigten höhere Dichtewerte als α_2 -Rezeptoren, ebenso wie muskarinische M₁-Rezeptoren höhere Werte aufwiesen als M₂-Rezeptoren (Abbildungen 5-6, Tabelle 6).

Die anterioren zingulären Areale 24 und 24' zeigten die höchsten Werte für GABA_A Rezeptoren und hohe bis mittlere Konzentrationen für die drei glutamatergen Rezeptoren. Nur

geringe Dichtewerte konnten für noradrenerge α_1 und α_2 , muskarinische M_1 und M_2 sowie serotoninerge 5-HT₂ Rezeptoren gefunden werden. Der posteriore Gyrus cinguli zeigte höchste Dichtewerte für den NMDA Rezeptor. Hohe bis mittlere Dichtewerte wurden dort für GABA_A, für α_1 , AMPA und Kainat Rezeptoren gefunden, während α_2 -Rezeptors, 5-HT₂- und die muskarinischen M_1 und M_1 Rezeptoren generell nur niedrige Dichten aufwiesen (Abbildungen 5-6, Tabelle 6).

Maximale Dichtewerte der noradrenergen und muskarinischen Bindung wurden in kaudalen Arealen gefunden. Zwei glutamaterge Rezeptoren (AMPA und Kainat) zeigten den maximalen Wert in rostralen Arealen, während der dritte glutamaterge Rezeptor (NMDA) seine maximalen Werte in kaudalen Arealen besaß. Der minimale Dichtewert der noradrenergen und muskarinischen Rezeptoren (mit der Ausnahme von [³H]pirenzepin) wurden in rostralen zingulären Arealen ermittelt. Glutamaterge Rezeptoren hatten ihre minimalen Bindungsdichten sowohl in rostralen (NMDA) als auch in kaudalen Arealen (AMPA und Kainat) (Tabelle 6).

Drei der neun verwendeten Liganden ([³H]prazosin, [³H]oxotremorin und [³H]MK-801) zeigten eine präferentielle Bindung an den PGC. Drei weitere Liganden ([³H]muscimol, [³H]AMPA und [³H]kainate) zeigten höhere Dichten im AGC. Die verbliebenen drei Liganden ([³H]UK-14304, [³H]ketasnerin und [³H]pirenzepin) zeigten ein relativ homogenes Verteilungsmuster ohne spezifische regionale Präferenz. (Abb. 5-6)

Rostral	Maximale Bindungsdichte	Minimale Bindungsdichte	
	24	GABA _A AMPA kainate	α ₂ 5-HT ₂ NMDA M ₂
	24'	-	α ₁
	23	α ₂ NMDA M ₁	-
	29	5-HT ₂ M ₂ α ₁	kainate GABA _A M ₁ AMPA
	30	-	-
	Kaudal		

Tabelle 6. Zuordnung der maximalen und minimalen Rezeptordichten in den zingulären Hirnarealen. In der ersten Spalte zeigt der Pfeil die topographische Anordnung der Areale von rostral nach kaudal an. In der zweiten und dritten Spalte ist eingetragen, in welchem Areal die maximale bzw. minimale Bindungsdichte des jeweiligen Liganden gefunden werden konnte. Man beachte, daß ein Ligand nur in einem Areal eine maximale und minimale Bindungsdichte besitzt. Ein Areal jedoch kann mehrere maximale oder minimale Bindungsdichten verschiedener Liganden aufweisen.

5.1.3 Multivariate Analysen intrazingulärer Rezeptorbindungsdaten

Multivariate statistische Analyseverfahren (MDS, HCA) bestätigten die Aufteilung des Gyrus cinguli in eine anterioren und posterioren Gyrus cinguli. HCA und MDS zeigten eine klare Differenzierung des Gyrus cinguli mit den Arealen 24a-c und 24a-c' in einer ersten Gruppe sowie den Arealen 23a-c, 29 und 30 in einer zweiten Gruppe (Abb. 8). Ferner zeigte sich, daß der Übergang zwischen AGC und PGC nicht abrupt erfolgte, sondern kontinuierlich durch

das zytoarchitektonische Übergangsareal 24', das hierbei jedoch eine deutlichere Assoziation zum AGC als zum PGC zeigte.

Die orthogonale Korrelation derselben Bindungsdaten (um Ähnlichkeiten der Rezeptortypen zu zeigen) (Abb. 8C,D) zeigt, welche Rezeptoren eine ähnliche Verteilung über die einzelnen Areale aufweisen. HCA und MDS brachten zwei Gruppen hervor: [³H]muscimol, [³H]AMPA und [³H]kainate hatten eine sehr ähnliche Verteilung über die einzelnen zingulären Areale hinweg (Abb. 8C); wie in Tabelle 6 und Abbildung 5 gezeigt, zeigten sich sehr hohe Bindungswerte in AGC und niedrige Werte in PGC. Diese "fast excitatory" und "fast inhibitory" Rezeptoren (erste Gruppe) separierten sich klar von den modulatorischen Rezeptoren (zweite Gruppe), die vorzugsweise im PGC vorkommen und sich in zwei Untergruppen aufteilen, mit [³H]UK-14304, [³H]pirenzepin und [³H]MK-801 in der einen, und [³H]ketasnerin, [³H]oxotremorin und [³H]prazosin in der anderen Gruppe.

5.1.4 Vergleich zwischen der Chemoarchitektur und intraarealer Differenzierung

Neben der anteroposterioren Aufteilung in zytoarchitektonisch niedriger differenzierten anterioren Arealen und höher differenzierten posterioren Arealen zeigte sich eine intraareale zytoarchitektonische Differenzierung von ventral nach dorsal für die noradrenergen und muskarinischen Rezeptoren: Die ventrodorsale Anordnung der Subkompartimente in den Arealen 24, 24' und 23 stand in einem klaren Zusammenhang mit einem kontinuierlich ansteigenden Gradienten von dem ventralen Subkompartiment "a" über "b" zum dorsalen Subkompartiment "c".

Hier zeigte sich also ein klarer Zusammenhang zwischen der quantitativen Bindungsdichte und dem Grad der zytoarchitektonischen Differenzierung mit höheren Bindungsdichten in

höher differenzierten bzw. niedrigeren Bindungsdichten in niedriger differenzierten (Sub-) Arealen.

5.2 Konnektivität

5.2.1 Anzahl der Source und Target Sites

Im Vergleich der intrazingulären Efferenzen (siehe Tabelle 9) wies Area 23a mit 8 Target Sites (= Zielarealen) die meisten Efferenzen auf, gefolgt von den Arealen 30 (7 Target Sites), 24a (6 Target Sites), 24c, 23b, 29 (mit jeweils 5 Target Sites), 24b (4 Target Sites), 24c' und 23c (mit jeweils 3 Target Sites), 24b' und 25 (mit jeweils 2 Target Sites) und Area 24a' mit den wenigsten Efferenzen (1 Target Site).

Im Vergleich der intrazingulären Afferenzen (siehe Tabelle 9) erhielt Area 24c' mit 9 Source Sites (= Quellarealen) die meisten Afferenzen, gefolgt von den Arealen 24c und 23 c (mit jeweils 8 Source Sites), 23b (7 Source Sites), 24a, 24b, 23a (mit jeweils 4 Source Sites), 25 (3 Source Sites), 24a' (2 Source Sites) und den Arealen 24b' und 30 mit wenigsten (1 Source Site) und 29 ohne Afferenzen (0 Source Sites).

Diese sehr einfache quantitative Bestimmung deutet an, daß die Anzahl der Efferenzen nicht mit der antero-posterioren und dorso-ventralen Anordnung der zingulären Areale und somit nicht mit der zytoarchitektonischen Differenzierung in diesen Richtungen korrelierte. Bei den Afferenzen zeigte sich auch keine Korrelation zur antero-posterioren, jedoch zur dorsoventralen Anordnung und somit zur intraarealen Differenzierung. Die höher differenzierten dorsalen Subkompartimente "c" erhielten eine höhere Anzahl an Afferenzen als die weniger differenzierten Subkompartimente "a" und "b".

Auffallend verhielt sich das Übergangsbereich 24', das im Gegensatz zu Area 24 und 23 sowohl weniger Efferenzen als auch weniger Afferenzen aufwies.

5.2.2 Vergleich der Subkompartimente in 24, 24', 23: Projektionen innerhalb eines Areals

Untersucht man die Projektionen der Subkompartimente innerhalb eines Areals zueinander (siehe Tabelle 9), so zeigte sich in Area 24, daß "c" zu den beiden anderen Subkompartimenten ("a" und "b") Efferenzen aufwies, "a" und "b" jedoch nur nach "c" projizierten! In Area 23 zeigten sich Projektionen von "a" und "b" zu den jeweils beiden anderen Subkompartimenten, nicht jedoch zu Area 23c, das nur nach "b" projiziert. In Area 24' zeigte sich ein anderes Bild, wo die Subkompartimente "a" und "c" keine Projektionen zu den jeweils beiden anderen Subkompartimenten aufwiesen; Area 24b' lediglich nach 24c'.

Aus Sicht der Afferenzen sah es in allen drei Oberarealen (24, 24', 23) so aus, daß das dorsale Subkompartiment "c" jeweils Afferenzen von den beiden anderen Subkompartimenten erhielt (mit der Ausnahme vom Subkompartiment "a" in 24'). Das Subkompartiment "b" erhielt in Area 23 von den anderen Subkompartimenten Afferenzen, in Area 24 nur von "c" und in 24' von keinem der anderen Subkompartimenten. Das ventrale Subkompartiment "a" erhielt die wenigsten Afferenzen, und zwar in 24 nur von "c" und in 23 von "b", jedoch keine in 24'.

Es zeigt sich also, daß das Subkompartiment "a" (mit Abstand gefolgt von "b") die meisten Projektionen sendete und empfing, "a" jedoch die geringste Interaktion zu den anderen Subkompartimenten aufwies.

Zusammenfassend zeigt sich, daß das Subkompartiment "c" (>"b" >"a") die meisten Afferenzen innerhalb eines Areals von den beiden übrigen Subkompartimenten erhielt und somit die größten Empfängereigenschaften aufwies. Bei den Efferenzen zeigt sich ein anderes Bild, wo in Area 24 das Subkompartiment "c" die größten Sendereigenschaften zeigte, in Area 23 jedoch sowohl "a" als auch "b".

5.2.3 Vergleich der Subkompartimente in 24, 24', 23: Projektionen von allen drei Oberarealen

	A24a	A24b	A24c	A24'a	A24'b	A24'c	A23a	A23b	A23c
A24a		0	1	2	0	1	2	2	1
A24b	0		1	0	0	0	0	2	1
A24c	2	2		0	0	3	0	0	2
A24'a	0	0	0		0	0	2	0	0
A24'b	0	0	0	0		2	0	1	0
A24'c	2	2	0	0	0		0	0	2
A23a	2	2	1	2	2	2		2	1
A23b	0	0	1	0	0	1	1		1
A23c	0	0	1	0	0	3	0	1	

Tabelle 10. Konnektivitätsmatrix der zingulären Unterareale mit den Subkompartimenten a-c von 24, 24' und 23.

Beleuchtet man die intraareale Differenzierung der Areale in die Subkompartimente "a-c", so zeigt sich, daß das dorsale und am meisten differenzierte Subkompartiment "c" in allen drei Oberarealen jeweils die meisten Afferenzen erhielt, während "a" und "b" sich ungefähr die Waage hielten. Bei den Efferenzen zeigt sich ein ausgewogeneres Bild, da in Area 24 und 23 "a" jeweils mehr Efferenzen hatte als "b" und "c". In Area 24' jedoch sendete "c" mehr als in "a" und "b".

5.2.4 Projektionssymmetrie (reziproke Verbindungen)

Im Vergleich der Projektionssymmetrie (= Source Site und Target Site sendeten reziproke Projektionen) zeigt sich, daß Area 25 sich reziprok zu Area 24c verhielt, d.h. es sendete nach 24c, empfing aber auch von 24c. Area 24 zeigt genauso viele reziproke Projektionen wie Area 23 (jeweils 8), mit Abstand gefolgt von 24' (insgesamt 3).

Area 24a wies drei reziproke Verbindungen (24c, 24c', 23a) auf, 24b eine (24c) und 24c vier (25, 24a-b, 23c). Area 23a unterhielt drei reziproke Verbindungen (24a, 24a', 23b), 23b zwei

(23a,c) und 23c ebenfalls drei (24c, 24c, 23b). Area 24a' hatte lediglich eine reziproke Verbindung (23a), 24b' keine und 24c' lediglich zwei (24a, 23c). Die Areale 29 und 30 besaßen keine reziproken Verbindungen.

Auch hier zeigt sich, daß sich Area 24 und 23 in der Projektionssymmetrie sehr ähnlich waren und es zu keiner anteroposterioren Aufgliederung des Gyrus cinguli durch die intrazinguläre Konnektivität kam. Aber wie in der vorhergegangenen Analysen zeigt sich, daß sich Area 24' wieder von den beiden anderen zingulären Arealen unterschied.

5.2.5 Vergleich AGC und PGC

Bei der Aufgliederung des Gyrus cinguli in anteriore Areale (AGC: 25, 24, 24') und posteriore Areale (PGC: 23, 29, 30) lassen sich auffällige Unterschiede in den Konnektivitätsmustern zeigen.

Vergleicht man die Projektionen innerhalb des AGC bzw. PGC, so zeigt sich eine starke Verflechtung innerhalb des AGC, wo alle anteriore Areale miteinander verbunden waren, mit der Ausnahme von Area 24', die nicht nach Area 25 projizierte. Innerhalb des PGC zeigt sich diese starke Verflechtung nicht, da Area 23 zu keinem der anderen posterioren Areale Efferenzen sendete, aber von allen Afferenzen erhielt. Im Vergleich dazu verhielt sich Area 29 spiegelbildlich, da es zu allen anderen posterioren Arealen sendete, aber keine Projektionen erhielt.

Vergleicht man die Konnektivität zwischen AGC und PGC, so zeigt sich ebenfalls ein sehr einseitiges Verbindungsmuster. Während anteriore Areale nur wenige Projektionen zum PGC sendeten (Area 24 und 24' nur nach 23), so sendeten fast alle posterioren Areale zum AGC.

5.2.6 Vergleich der intraarealen Differenzierung

Beleuchtete man die intra-areale Differenzierung der Areale in die Subkompartimente "a-c", so zeigte sich, daß das dorsale und am meisten differenzierte Subkompartiment "c" in allen drei Oberarealen jeweils die meisten Afferenzen erhielt, während "a" und "b" sich auf einem niedrigeren Niveau ungefähr die Waage hielten. Bei den Efferenzen zeigte sich ein ausgewogeneres Bild, da in Area 24 und 23 "a" mehr Efferenzen hatte als "b" und "c". In Area 24 jedoch sendete "c" mehr als in "a" und "b".

5.2.7 Multivariate Analysen intrazingulärer Konnektivität

Die Ergebnisse der multivariaten Analysen zeigt die Komplexität anatomischer Konnektivität, die aus Gründen einer besseren Übersichtlichkeit in einer Matrix dargestellt wird. Mittels MDS und HCA (siehe Methodenkapitel) wurden Gruppen von Arealen aufgrund ihres Verbindungsmusters identifiziert; unter Berücksichtigung möglichst vieler Kriterien bzw. Eigenschaften (qualitative Aspekte wie Verbindungsstärken; quantitative Aspekte wie Anzahl an existenten und nicht-existenten Verbindungen; Ähnlichkeiten der Source Sites und Target Sites; Spezifität der Projektionen etc.) der insgesamt 132 Projektionen, mit dem Ziel, die maximale Anzahl an Gemeinsamkeiten innerhalb sowie die maximale Anzahl an Unterschieden zwischen den Gruppen bzw. Clustern zu finden.

MDS zeigte hierbei keine Aufgliederung des Gyrus cinguli in einen AGC und PGC. Es befinden sich im Gegenteil in den beiden ersten Clustern sowohl anteriore als auch posteriore Areale als Zeichen eines ähnlichen Konnektivitätsmusters. Lediglich der dritte Cluster bestand nur aus posterioren Arealen.

Anders verhielt es sich jedoch mit der intraarealen Differenzierung. Offensichtlich spiegelte das intrazinguläre Konnektivitätsmuster den Grad der zytoarchitektonischen Differenzierung

wider, da sich im ersten Cluster vor allem die niedrig differenzierten ventralen Subkompartimente "a" von Area 24, 24' und 23 befanden. Im zweiten Cluster befanden sich hauptsächlich die höher differenzierten medialen und dorsalen Subkompartimente "b" und "c".

Die hierarchische Clusteranalyse (HCA) bestätigte weitgehend die MDS Ergebnisse (Abb. 9).

5.3 Zusammenfassende Gliederung des Gyrus cinguli

Auf der Basis der autoradiographischen Rezeptoruntersuchungen kann der Gyrus cinguli in einen anterioren und posterioren Gyrus cinguli (AGC und PGC) unterteilt werden. Dabei enthält AGC nicht nur die Areale 24 und 25, sondern auch das transitionale Areal 24'. Im Vergleich dazu besteht PGC aus den Arealen 23, 30, 29 und 31. Während die Rezeptoruntersuchungen eindeutig die Gliederung des Gyrus cinguli in einen AGC und PGC belegen, zeigen die multivariaten und semiquantitativen Konnektivitätsanalysen der intrazinguläre Verbindungen, daß sich die beiden anterioren zingulären Areale 24 und 24' zusätzlich durch unterschiedliche Verbindungsmuster unterscheiden. Diese Spezialisierung des Gyrus cinguli in einen AGC und PGC sowie einer Subdifferenzierung des AGC in die beiden Areale 24 und 24' finden ihr funktionelles Korrelat in den Untersuchungen von Vogt et al. (1992) und Devinsky et al. (1995). Dort wird der PGC als die "posterior evaluative region" und AGC als die "anterior executive region" beschrieben, wobei letzterer weiter unterteilt werden kann in die Komponenten für "affect" und "cognition". Die Affektregion wird vor allem durch die Area 24 und die Kognitionsregion durch die Area 24' gebildet.

Die Komplexität der konnektionalen Organisation im Gyrus cinguli konnte durch unsere multivariaten Analysen verdeutlicht werden. Van Hoesen et al. (1993) vertreten die These des "rostral and caudal feedback systems". Beim "rostral feedback system" verläuft der generelle

Informationsfluß von posterioren zu anterioren zingulären Arealen, während beim “caudal feedback system“ die Information zurück zu jenen Arealen fließt, die vormals zu den anterioren Arealen projizierten. Das “rostral feedback system“ der intrazingulären Konnektivität soll es posterioren zingulären Arealen ermöglichen, die anterioren Effektorareale zu regulieren, während das “caudal feedback system“ der Modulation posteriorer Areale durch den AGC dienen soll. In die gleiche inhaltliche Richtung gehen auch Gabriel und Sparenberg (1987) bzw. Baleyrier und Mauguère (1980), indem sie die These aufstellen, daß anteriore und posteriore zinguläre Areale nicht funktionell unabhängige kortikale Einheiten darstellen, sondern vielmehr für die Aufrechterhaltung ihrer spezifischen Funktionen aufeinander angewiesen seien und sich gegenseitig beeinflussen.

Diese Thesen für ein intrazinguläres Kommunikationsnetzwerk konnten wir durch unsere multivariaten und semiquantitativen Konnektivitätsanalysen belegen. Sowohl im MDS als auch in der HCA bildeten anteriore und posteriore zinguläre Areale mit ihren Subkompartimenten gemeinsame Cluster (siehe Abb. 9). In den semiquantitativen Analysen zeigten Area 24 und Area 23 als die zentralen Strukturen des AGC und PGC intensive reziproke Verbindungen. Sowohl die Subkompartimente von Area 24 sendeten Efferenzen zu Subkompartimenten von Area 23, als auch Area 23 ihrerseits sendete Projektionen in die Gegenrichtung, im Sinne eines parallel ausgerichteten rostrocaudalen intrazingulären Netzwerkes (24a→23a-c, 24b→23b-c, 24c→23c bzw. 23a→24a-c, 23b→24c, 23c→24c).

6 Schlußfolgerung

Der bimodale Ansatz durch Verknüpfung moderner Rezeptorautoradiographie und innovativer Konnektivitätsanalysen zeigt die Komplexität in der Struktur und Funktion des Gyrus cinguli. Es konnte verdeutlicht werden, daß der Einsatz unterschiedlicher und ergänzender Untersuchungsansätze notwendig ist, um eine hinreichende Struktur-Funktionsbeziehung herzustellen. Die im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehenden Kernfragen (siehe Einleitung) konnten folgendermaßen beantwortet werden:

- Der Gyrus cinguli zeigte aufgrund der Rezeptorverteilung eine (interareale) Differenzierung in rostrokaudaler Richtung mit einem anterioren (AGC) und posterioren (PGC) Anteil. Eine Separation des Gyrus cinguli aufgrund des intrazingulären Projektionsmusters konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil, es ergab sich eine starke projektorische Verflechtung zwischen anterioren und posterioren zingulären Arealen.
- Das zytoarchitektonische Übergangsareal 24' konnte rezeptorautoradiographisch eindeutig dem AGC zugeordnet werden.
- Je weiter die räumliche Entfernung der zingulären Areale war, desto signifikanter waren die Unterschiede in der Rezeptorausstattung.
- Es bestand ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Grad der intraarealen Differenzierung einerseits und der Rezeptorausstattung bzw. dem Projektionsverhalten andererseits. Je stärker die zytoarchitektonische Differenzierung war, desto höhere Rezeptorwerte ergaben sich für die noradrenergen (α_1 und α_2) und die muskarinischen (M_1 und M_2) Rezeptoren bzw. desto höher war die Anzahl der Afferenzen.

Die so ermittelten strukturellen Beziehungsmuster des Gyrus cinguli dienen als Erklärung für elementare funktionelle Gliederungen des Gyrus cinguli. Die unter anderem von Vogt et al. (1992) und Devinsky et al. (1995) beschriebene funktionelle Zuordnung des rostralen Anteils des Gyrus cinguli als „anterior executive region“ und des kaudalen Anteils des Gyrus cinguli als „posterior evaluative region“ findet ihr strukturelles Korrelat in der rezeptorautoradiographisch nachgewiesenen Separation des Gyrus cinguli in eine AGC bzw. PGC. Die von anderen Autoren, wie z.B. Gabriel and Sparenberg (1987) oder Van Hoesen et al. (1993), in den Mittelpunkt gestellten Hypothesen über das Wirken des Gyrus cinguli in Bezug auf ein gegenseitiges Beeinflussen von anterioren und posterioren Arealen („rostral and caudal feedback system“) finden ihr strukturelles Korrelat in der Evaluation des intrazingulären Verschaltungsplanes, der durch die Konnektivitätsanalysen eine überaus starke und reziproke Interaktion zwischen AGC und PGC zeigt.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Bozkurt, Ahmet
 Geburtsdatum: 27. April 1977
 Geburtsort: Oberhausen

Schulbildung

1983 – 1987 Otto von Bismarck Grundschule in Oberhausen
 1987 – 1996 Elsa Brändström Gymnasium in Oberhausen

Hochschulausbildung

SS 1997 – WS2002 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Ärztliche Vorprüfung (April 1999)
- Erste Ärztliche Prüfung (April 2000)
- Zweite Ärztliche Prüfung (April 2002)

WS2002 – Praktisches Jahr (PJ) am Universitätsklinikum der
 WS2003 RWTH - Aachen
 05.12.2003 Dritte Ärztliche Prüfung

8 Literaturverzeichnis

Apud JA, Grayson DR, De Erausquin E, Costa E (1992) Pharmacological characterization of regulation of phosphoinositide metabolism by recombinant 5-HT₂ receptors of the rat. *Neuropharmacology* 31:1-8.

Backhaus K, Erichson B, Plinke W, Weiber R (1996) *Multivariate Analysemethoden*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Baleyrier C, Mauguère F (1980) The duality of the cingulate gyrus in monkey. Neuroanatomical study and functional hypotheses. *Brain* 103:525-554.

Berger W, Deckert J, Hartmann J, Krotzer C, Kornhuber J, Ransmayr G, Heinsen H, Beckmann H, Riederer P (1994) Memantine inhibits [³H]MK-801 binding to human hippocampal NMDA receptors. *Neuroreport* 5:1237-40.

Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC (1978) The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 14:723-36.

Boess FG, Martin IL (1994) Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33:275-317.

Bonner TI (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci* 12:148-51.

Borg I, Groenen P (1997) *Modern multidimensional scaling*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Botvinick M, Nystrom LE, Fissell K, Carter CS, Cohen JD (1999) Conflict monitoring versus

selection-for-action in anterior cingulate cortex. *Nature* 402:179-81.

Bozkurt A, Kamper L, Stephan KE, Kötter R (2001) Organization of primate amygdalo-prefrontal projections. *Neurocomputing* 38-40: 1135-1140.

Bozkurt A, Kamper L, Stephan KE, Kötter R (2002) The structural basis of information transfer from medial temporal lobe to prefrontal cortex in the macaque monkey. *Neurocomputing* 44-46: 753-758.

Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM, Brann MR (1989) Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* 35:469-76.

Burns GA, Young MP (2000) Analysis of the connectional organization of neural systems associated with the hippocampus in rats. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:55-70.

Bussey TJ, Muir JL, Everitt BJ, Robbins TW (1996) Dissociable effects of anterior and posterior cingulate cortex lesions on the acquisition of a conditional visual discrimination: facilitation of early learning vs. impairment of late learning. *Behav Brain Res* 82:45-56.

Cha JH, Greenamyre JT, Nielsen EO, Penney JB, Young AB (1988) Properties of quisqualate-sensitive L-[³H]glutamate binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *J Neurochem* 51:469-78.

Cortes R, Palacios JM (1986a) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat brain. I. Quantitative autoradiographic studies. *Brain Res* 362:227-38.

Cortes R, Probst A, Tobler HJ, Palacios JM (1986b) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the human brain. II. Quantitative autoradiographic studies. *Brain Res* 362:239-53.

Cortes R, Probst A, Palacios JM (1987) Quantitative light microscopic autoradiographic

localization of cholinergic muscarinic receptors in the human brain: forebrain. *Neuroscience* 20:65-107.

Craig AD, Reiman EM, Evans A, Bushnell MC (1996) Functional imaging of an illusion of pain. *Nature* 384:258-60.

Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL (2000) Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation-a possible prelude to violence. *Science* 289:591-4.

Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA (1995)

Drew CA, Johnston GA, Weatherby RP (1984) Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)- baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett* 52:317-21.

Gabriel M, Sparenberg S (1987) Posterior cingulate cortical lesions eliminate learning-related unit activity in the anterior cingulate cortex. *Brain Res* 409:151-57.

Gebhard R, Zilles K, Schleicher A, Everitt BJ, Robbins TW, Divac I (1993) Distribution of seven major neurotransmitter receptors in the striate cortex of the New World monkey *Callithrix jacchus*. *Neuroscience* 56:877-85.

Geyer S, Matelli M, Luppino G, Schleicher A, Jansen Y, Palomero-Gallagher N, Zilles K (1998) Receptor autoradiographic mapping of the mesial motor and premotor cortex of the macaque monkey. *J Comp Neurol* 397:231-50.

Geyer S, Schleicher A, Zilles K (1999) Areas 3a, 3b, and 1 of human primary somatosensory cortex. *Neuroimage* 10:63-83.

Geyer S, Schleicher A, Zilles K (1997) The somatosensory cortex of human: cytoarchitecture and regional distributions of receptor-binding sites. *Neuroimage* 6:27-45.

Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Gallager DW (1990) Overlap of dopaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci* 10:2125-38.

Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M (1983) Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 305:140-2.

Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC (1980) Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 283:90-2.

Hilgetag CC, Burns GA, O'Neill MA, Scannell JW, Young MP (2000a) Anatomical connectivity defines the organization of clusters of cortical areas in the macaque monkey and the cat. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:91-110.

Hilgetag CC, O'Neill MA, Young MP (2000b) Hierarchical organization of macaque and cat cortical sensory systems explored with a novel network processor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:71-89.

Hill DR, Bowery NG (1981) 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290:149-52.

Hofner G, Wanner KT (1996) Characterisation of [3H]MK-801 binding and its cooperative modulation by pig brain membranes. *J Recept Signal Transduct Res* 16:297-13.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.

Hoyer D, Engel G, Kalkman HO (1985) Molecular pharmacology of 5-HT₁ and 5-HT₂ recognition sites in rat and pig brain membranes: radioligand binding studies with [3H]5-HT,

[3H]8-OH-DPAT, (-)[125I]iodocyanopindolol, [3H]mesulergine and [3H]ketanserin. *Eur J Pharmacol* 118:13-23.

Jansen KL, Faull RL, Dragunow M (1989) Excitatory amino acid receptors in the human cerebral cortex: a quantitative autoradiographic study comparing the distributions of TCP, [3H]glycine, L-[3H]glutamate, [3H]AMPA and [3H]kainic acid binding sites. *Neuroscience* 32:587-607.

Johnson M, Perry RH, Charlton FG, Moses MA, Court JA, Perry EK (1989) Distribution of [3H]MK801 binding in the normal aged human hippocampus. *Brain Res* 499:184-7.

Kamper L., Bozkurt A., Rybacki K., Geissler A., Gerken I., Stephan K.E., Kötter R. (2002) An Introduction to CoCoMac-Online. The Online-Interface of the Primate Connectivity Database CoCoMac. In: Kötter R. (ed.) *Neuroscience Databases – A Practical Guide*. Kluwer Academic, Norwell, MA, pp. 155-169.

Kellar KJ, Martino AM, Hall DP Jr, Schwartz RD, Taylor RL (1985) High-affinity binding of [3H]acetylcholine to muscarinic cholinergic receptors. *J Neurosci* 5:1577-82.

Kötter R. (in press) Online retrieval, processing, and visualization of primate connectivity data from the CoCoMac database. *Neuroinformatics*.

Kötter R & Sommer FT (2000) Global relationship between structural connectivity and activity propagation in the cerebral cortex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 127-134.

Kötter R, Stephan KE, Palomero-Gallagher N, Geyer S, Schleicher A, Zilles K (2001a) Multimodal characterisation of cortical areas by multivariate analyses of receptor binding and connectivity data. *Anat Embryol (Berl)* 204:333-50.

Kötter R, Hilgetag CC, Stephan KE (2001b) Connectional characteristics of areas in Walker's

map of primate prefrontal cortex. *Neurocomputing* 38-40: 741-746.

Kraemer M, Zilles K, Schleicher A, Gebhard R, Robbins TW, Everitt BJ, Divac I (1995) Quantitative receptor autoradiography of eight different transmitter- binding sites in the hippocampus of the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Anat Embryol (Berl)* 191:213-25.

Leysen JE, Niemegeers CJ, Van Nueten JM, Laduron PM (1982) [³H]Ketanserin (R 41 468), a selective 3H-ligand for serotonin₂ receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Mol Pharmacol* 21:301-14.

Lidow MS, Gallager DW, Rakic P, Goldman-Rakic PS (1989a) Regional differences in the distribution of muscarinic cholinergic receptors in the macaque cerebral cortex. *J Comp Neurol* 289:247-59.

Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Gallager DW, Rakic P (1989b) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors and uptake sites in the neocortex of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 280:27-42.

Limberger N, Trendelenburg AU, Starke K (1995) Subclassification of presynaptic alpha 2-adrenoceptors: alpha 2D- autoreceptors in mouse brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:43-8.

Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-22.

Luthin GR, Wolfe BB (1984a) [³H]Pirenzepine and [³H]quinuclidinyl benzilate binding to brain muscarinic cholinergic receptors. Differences in measured receptor density are not explained by differences in receptor isomerization. *Mol Pharmacol* 26:164-9.

Luthin GR, Wolfe BB (1984b) Comparison of [³H]pirenzepine and

[3H]quinuclidinylbenzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 228:648-55.

MacDonald AW, Cohen JD, Stenger VA, Carter CS (2000) Dissociating the role of the dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex in cognitive control. *Science* 288:1835-8.

Maquet P, Peters J, Aerts J, Delfiore G, Degueldre C, Luxen A, Franck G (1996) Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* 383:163-6.

Martens U, Capito B, Wree A (1998) Septotemporal distribution of [3H]MK-801, [3H]AMPA and [3H]Kainate binding sites in the rat hippocampus. *Anat Embryol (Berl)* 198:195-204.

Merker B (1983) Silver staining of cell bodies by means of physical development. *J Neurosci Methods* 9:235-41.

Messer WS Jr, Hoss W (1987a) Selectivity of pirenzepine in the central nervous system. I. Direct autoradiographic comparison of the regional distribution of pirenzepine and carbamylcholine binding sites. *Brain Res* 407:27-36.

Messer WS Jr, Thomas GJ, Hoss W (1987b) Selectivity of pirenzepine in the central nervous system. II. Differential effects of pirenzepine and scopolamine on performance of a representational memory task. *Brain Res* 407:37-45.

Messer WS Jr, Thomas GJ, Price M, Hoss W (1987c) Selectivity of pirenzepine in the central nervous system. III. Differential effects of multiple pirenzepine and scopolamine administrations on muscarinic receptors as measured autoradiographically. *Brain Res* 407:46-54.

Middlemiss DN, Fozard JR (1983) 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates

between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur J Pharmacol* 90:151-3.

Monaghan DT, Holets VR, Toy DW, Cotman CW (1983) Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H-L- glutamate binding sites. *Nature* 306:176-9.

Nelson DL, Herbet A, Enjalbert A, Bockaert J, Hamon M (1980a) Serotonin-sensitive adenylate cyclase and [3H]serotonin binding sites in the CNS of the rat--I. *Biochem Pharmacol* 29:2445-53.

Nelson DL, Herbet A, Adrien J, Bockaert J, Hamon M (1980b) Serotonin-sensitive adenylate cyclase and [3H]serotonin binding sites in the CNS of the rat--II. Respective regional and subcellular distributions and ontogenetic developments. *Biochem Pharmacol* 29:2455-63.

Olson CR, Musil SY, Goldberg ME (1993) Posterior cingulate cortex and visuospatial cognition. In: *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus* (Vogt BA, Gabriel M, eds), pp366-80. Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser.

Paternain AV, Morales M, Lerma J (1995) Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor- mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* 14:185-9.

Paternain AV, Vicente A, Nielsen EO, Lerma J (1996) Comparative antagonism of kainate-activated kainate and AMPA receptors in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 8:2129-36.

Pazos A, Palacios JM (1985a) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346:205-30.

Pazos A, Cortes R, Palacios JM (1985b) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346:231-49.

Pazos A, Probst A, Palacios JM (1987a) Serotonin receptors in the human brain--III.

Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience* 21:97-122.

Pazos A, Probst A, Palacios JM (1987b) Serotonin receptors in the human brain--IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience* 21:123-39.

Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL (1981) Discrimination of multiple [3H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem* 36:220-6.

Peroutka SJ (1988a) 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes. *Annu Rev Neurosci* 11:45-60.

Peroutka SJ (1988b) 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends Neurosci* 11:496-500.

Peroutka SJ (1993a) 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes and the pharmacology of migraine. *Neurology* 43:S34-8.

Peroutka SJ (1993b) 5-Hydroxytryptamine receptors. *J Neurochem* 60:408-16.

Petrovic P, Kalso E, Petersson KM, Ingvar M (2002) Placebo and opioid analgesia-imaging a shared neuronal network. *Science* 295:1737-40.

Rabow LE, Russek SJ, Farb DH (1995) From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse* 21:189-274.

Rainbow TC, Wiczorek CM, Halpain S (1984) Quantitative autoradiography of binding sites for [3H]AMPA, a structural analogue of glutamic acid. *Brain Res* 309:173-7.

Rakic P, Goldman-Rakic PS, Gallager D (1988) Quantitative autoradiography of major neurotransmitter receptors in the monkey striate and extrastriate cortex. *J Neurosci* 8:3670-90.

Rosier AM, Arckens L, Orban GA, Vandesande F (1993) Laminar distribution of NMDA

receptors in cat and monkey visual cortex visualized by [3H]-MK-801 binding. *J Comp Neurol* 335:369-80.

Ruffolo RR Jr, Hieble JP (1994a) Alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Ther* 61:1-64.

Ruffolo RR Jr, Stadel JM, Hieble JP (1994b) Alpha-adrenoceptors: recent developments. *Med Res Rev* 14:229-70.

Schleicher A, Amunts K, Geyer S, Morosan P, Zilles K (1999) Observer-independent method for microstructural parcellation of cerebral cortex: A quantitative approach to cytoarchitectonics. *Neuroimage* 9:165-77.

Schleicher A, Amunts K, Geyer S, Kowalski T, Schormann T, Palomero-Gallagher N, Zilles K (2000) A stereological approach to human cortical architecture: identification and delineation of cortical areas. *J Chem Neuroanat* 20:31-47.

Schmidt RF, Thews G, Lang F (2000) *Physiologie des Menschen – Lehrbuch und Atlas* (28. Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

Schmidt RF, Schaible HG (2001) *Neuro- und Sinnesphysiologie – Lehrbuch* (4. Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

Schwark HD, Li J, Fuchs JL (1994) Regional distribution of GABAA receptor binding sites in cat somatosensory and motor cortex. *J Comp Neurol* 343:362-9.

Schwartz RD (1986) Autoradiographic distribution of high affinity muscarinic and nicotinic cholinergic receptors labeled with [3H]acetylcholine in rat brain. *Life Sci* 38:2111-9.

Shidara M, Richmond BJ (2002) Anterior cingulate: single neuronal signals related to degree of reward expectancy. *Science* 296:1709-11.

Sleight AJ, Stam NJ, Mutel V, Vanderheyden PM (1996) Radiolabelling of the human 5-HT_{2A} receptor with an agonist, a partial agonist and an antagonist: effects on apparent agonist affinities. *Biochem Pharmacol* 51:71-6.

Spencer DG Jr, Horvath E, Traber J, Van Rooijen LA (1988a) GTP effects in rat brain slices support the non-interconvertability of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci* 42:993-7.

Spencer DG Jr, van Rooijen LA, Horvath E, Dompert W, Traber J (1988b) Neurochemical and behavioural effects of muscarinic acetylcholine receptor agonists. *Trends Pharmacol Sci Suppl*:61-8.

Stephan KE, Zilles K, Kötter R (2000a) Coordinate-independent mapping of structural and functional data by Objective Relational Transformation (ORT). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 37-54.

Stephan KE, Hilgetag CC, Burns GAPC, O'Neill MA, Young MP, Kötter R (2000b) Computational analysis of functional connectivity between areas of primate cerebral cortex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355: 111-126.

Stephan KE, Kamper L, Bozkurt A, Burns GAPC, Young MP, Kötter R (2001) Advanced database methodology for the collation of connectivity data on the macaque brain (CoCoMac). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356: 1159-1186.

Sutherland RJ, Hoising JM (1993) Posterior cingulate cortex and spatial memory: A microlimnology analysis. In: *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus* (Vogt BA, Gabriel M, eds), pp 461-77. Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser.

Trendelenburg AU, Limberger N, Starke K (1995) Subclassification of presynaptic alpha 2-

adrenoceptors: alpha 2D- autoreceptors in guinea-pig atria and brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:49-57.

Trendelenburg AU, Limberger N, Starke K (1996a) The presynaptic alpha-2 autoreceptors in pig brain cortex are alpha-2A. *J Pharmacol Exp Ther* 278:462-7.

Trendelenburg AU, Wahl CA, Starke K (1996b) Antagonists that differentiate between alpha 2A-and alpha 2D- adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353:245-9.

Uphouse L (1997) Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? *Neurosci Biobehav Rev* 21:679-98.

Van Hoesen GW, Morecraft RJ, Vogt BA (1993) Connections of the Monkey Cingulate Cortex. In: *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus* (Vogt BA, Gabriel M, eds), pp249-284. Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser.

Vilaro MT, Wiederhold KH, Palacios JM, Mengod G (1992) Muscarinic M2 receptor mRNA expression and receptor binding in cholinergic and non-cholinergic cells in the rat brain: a correlative study using in situ hybridization histochemistry and receptor autoradiography. *Neuroscience* 47:367-93.

Vogt BA, Pandya DN (1978) Cortico-cortical connections of somatic sensory cortex (areas 3, 1 and 2) in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 177:179-91.

Vogt BA, Rosene DL, Pandya DN (1979) Thalamic and cortical afferents differentiate anterior from posterior cingulate cortex in the monkey. *Science* 204:205-7.

Vogt BA, Finch DM, Olson CR (1992) Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb Cortex* 2:435-43.

Vogt, BA (1993) Structural organization of Cingulate Cortex: Areas, Neurons, and Somatodendritic Transmitter Receptors. In: Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus (Vogt BA, Gabriel M, eds), pp1-64. Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser.

Watson M, Yamamura HI, Roeske WR (1983) A unique regulatory profile and regional distribution of [3H]pirenzepine binding in the rat provide evidence for distinct M1 and M2 muscarinic receptor subtypes. *Life Sci* 32:3001-11.

Watson S, Girdlestone D (1995) TiPS on nomenclature. *Trends Pharmacol Sci* 16:15-6.

Whiting PJ, McKernan RM, Wafford KA (1995) Structure and pharmacology of vertebrate GABAA receptor subtypes. *Int Rev Neurobiol* 38:95-138.

Wong EH, Knight AR, Woodruff GN (1988) [3H]MK-801 labels a site on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain membranes. *J Neurochem* 50:274-81.

Yamamura HI, Snyder SH (1974a) Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1725-9.

Yamamura HI, Snyder SH (1974b) Postsynaptic localization of muscarinic cholinergic receptor binding in rat hippocampus. *Brain Res* 78:320-6.

Yamamura HI, Kuhar MJ, Snyder SH (1974c) In vivo identification of muscarinic cholinergic receptor binding in rat brain. *Brain Res* 80:170-6.

Young AB, Dauth GW, Hollingsworth Z, Penney JB, Kaatz K, Gilman S (1990) Quisqualate- and NMDA-sensitive [3H]glutamate binding in primate brain. *J Neurosci Res* 27:512-21.

Young MP, Scannell JW, O'Neill MA, Hilgetag CC, Burns G, Blakemore C (1995) Non-metric multidimensional scaling in the analysis of neuroanatomical connection data and the

organization of the primate cortical visual system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 348:281-308.

Zgombick JM, Borden LA, Cochran TL, Kucharewicz SA, Weinshank RL, Branchek TA (1993) Dual coupling of cloned human 5-hydroxytryptamine_{1D} alpha and 5-hydroxytryptamine_{1D} beta receptors stably expressed in murine fibroblasts: inhibition of adenylate cyclase and elevation of intracellular calcium concentrations via pertussis toxin-sensitive G protein(s). *Mol Pharmacol* 44:575-82.

Zifa E, Fillion G (1992) 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol Rev* 44:401-58.

Zilles K, Schleicher A, Rath M, Glaser T, Traber J (1986) Quantitative autoradiography of transmitter binding sites with an image analyzer. *J Neurosci Methods* 18:207-20.

Zilles K, Schleicher A, Rath M, Bauer A (1988) Quantitative receptor autoradiography in the human brain. Methodical aspects. *Histochemistry* 90:129-37.

Zilles K, Gross G, Schleicher A, Schildgen S, Bauer A, Bahro M, Schwendemann G, Zech K, Kolassa N (1991) Regional and laminar distributions of alpha 1-adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. *Neuroscience* 40:307-20.

Zilles K, Schlaug G, Matelli M, Luppino G, Schleicher A, Qu M, Dabringhaus A, Seitz R, Roland PE (1995) Mapping of human and macaque sensorimotor areas by integrating architectonic, transmitter receptor, MRI and PET data. *J Anat* 187 (Pt 3):515-37.

Zilles K, Schleicher A (1995) Correlative imaging of transmitter receptor distributions in human cortex. In: *Autoradiography and Correlative Imaging* (Stumpf W, Solomon H, eds), pp277-307. San Diego: Academic Press.

Zilles K, Schlaug G, Geyer S, Luppino G, Matelli M, Qu M, Schleicher A, Schormann T

(1996) Anatomy and transmitter receptors of the supplementary motor areas in the human and nonhuman primate brain. *Adv Neurol* 70:29-43.

Zilles K und Rehkämper G (1998) Funktionelle Neuroanatomie – Lehrbuch und Atlas. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

9 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. Schematische Darstellung der Injektion und des Transportes der Tracingsubstanz.

ABBILDUNG 2. Kodierung des Ausmaß der Markierung eines Areals („extension code“). Diese schematische Darstellung entspricht der zweidimensionalen Aufsicht auf ein Kortexareal und berücksichtigt daher nicht die Beiträge der verschiedenen Schichten zu dem Ausmaß der Markierung (Stephan et al., 2001).

ABBILDUNG 3. Kodierung möglicher Beziehungen („relation code“) zwischen zwei Hirnarealen (Stephan et al 2001).

ABBILDUNG 4. Der Gyrus cinguli (Ansicht von medial) im Makakengehirn auf der Basis des Parzellierungsschemas von Vogt (1993).

ABBILDUNG 5. Mittlere Bindungsdichten (Ordinate: Dichte in fmol/mg protein) in zingulären Oberarealen von rostral nach kaudal (Abszisse: von links nach rechts). A: Glutamaterge Rezeptoren, B: Muskarinische Rezeptoren, C: Noradrenerge Rezeptoren, D: Serotoninerge und GABAerge Rezeptoren.

ABBILDUNG 6. Mittlere Bindungsdichten (Ordinate: Dichte in fmol/mg protein) in zingulären Unterarealen von rostral nach kaudal (Abszisse: von links nach rechts). A: Glutamaterge Rezeptoren, B: Muskarinische Rezeptoren, C: Noradrenerge Rezeptoren, D: Serotoninerge und GABAerge Rezeptoren.

ABBILDUNG 7. Exemplarische farbkodierte Autoradiographiebilder in koronarer Schnittrichtung für den AMPA- (obere Zeile; A-C), NMDA- (mittlere Zeile; D-F), und M₂-Rezeptor (untere Zeile; G-I).

Angeordnet sind die Koronarschnitte nach ihrer anatomischen Lokalisation im Gyrus cinguli mit dem jeweiligen anterioren Areal 24 in der ersten Spalte (A,D,G), dem Übergangsbereich 24' in der zweiten Spalte (B,E,H) und dem posterioren Areal 23 in der dritten Spalte (C,F,I).

Die Schwärzungen auf den strahlenempfindlichen Originalfilmen sind in den Abbildungen C,F,I zu sehen. Je höher die Rezeptordichte in einer bestimmten Region des Schnittes, desto dunkler ist diese Stelle im Autoradiogramm (siehe Material & Methoden). Zur besseren Visualisierung wurden die unterschiedlichen Graustufen in 12 Farbstufen (schwarz bis rot) transformiert, die den entsprechenden Rezeptordichten entsprechen (siehe linksbündige Farbskalen mit Dichtewerten in fmol/mg Protein).

ABBILDUNG 8. Darstellung charakteristischer Bindungsmuster im Gyrus cinguli mittels hierarchischer Clusteranalyse (**A**, **C**) und multidimensionaler Skalierung (**B**, **D**). Die Ähnlichkeiten zwischen Arealen in **A** und **B** und die Ähnlichkeiten zwischen Rezeptoren in **C** and **D** basieren auf den gleichen Werten (siehe Tabelle 3). Der Stress-Wert zeigt an, wie gut die Anordnung der einzelnen Elemente im niedriger dimensionalen Raum die tatsächlichen Verhältnisse widerspiegelt, wobei Werte nahe null eine bessere Darstellung anzeigen.

ABBILDUNG 9. Darstellung des intrazingulären Konnektivitätsmusters mittels hierarchischer Clusteranalyse (**A**) und multidimensionaler Skalierung (**B**) basierend auf der Konnektivitätsmatrix (siehe Tabelle 9).

10 Abstract

Titel: In-vitro Rezeptorautoradiographie und Konnektivitätsanalysen des Gyrus cinguli bei Makaken.

Einleitung: Der Gyrus cinguli ist eine der wichtigsten Strukturen im zentralen Nervensystem (ZNS) beim Primaten und ist an einer Vielzahl komplexer Funktionen wie Emotionen, Sensorik, Motorik, Kognition, Verhalten beteiligt. Der Gyrus cinguli besteht aus mehreren Hirnarealen, die zyto-, myelo-, chemoarchitektonisch, konnektional sowie elektrophysiologisch als homogene Einheiten charakterisierbar sind.

Zielsetzung: Im Gegensatz zu anderen Strukturen des ZNS ist die Verteilung der Neurotransmitterrezeptoren im Gyrus cinguli weitgehend unbekannt. Die Ermittlung der Rezeptorverteilung in Kombination mit Analysen der strukturellen Konnektivität soll als ein bimodaler Ansatz eine bisher vorhandene Lücke in der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung schließen. Durch die kombinierte Evaluation der Rezeptor- mit Konnektivitätsverteilung ist eine bessere Bewertung und Interpretation bisheriger anatomischer sowie funktioneller Teilergebnisse zur Knüpfung von Struktur-Funktionsbeziehungen möglich.

Methode: In der hier vorliegenden Dissertation wurden die Dichten von neun verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren mit Liganden für glutamaterge- (AMPA, Kainat und NMDA), muskarinische- (M1 und M2), noradrenerge- ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), GABAerge- (GABAA) sowie serotoninerge- (5-HT₂) Rezeptoren in zytoarchitektonisch definierten zingulären Arealen (25, 24a-c, 24'a-c, 23a-c, 29-31) beim Makakenaffen anhand von in-vitro Rezeptorautoradiographie quantifiziert. Darüberhinaus wurde die entsprechende intrazinguläre Konnektivität, d.h. die Projektionen von und zu zingulären Arealen, beim Makaken anhand moderner Datenbank Anwendungen und -auswertungen auf der Grundlage publizierter Literaturdaten analysiert.

Ergebnisse: Der Gyrus cinguli zeigte aufgrund der Rezeptorverteilung eine (interareale) Differenzierung in rostrokaudaler Richtung mit einem anterioren (AGC) und posterioren (PGC) Anteil. Eine Separation des Gyrus cinguli aufgrund des intrazingulären Projektionsmusters konnte nicht nachgewiesen. Im Gegenteil, es ergab sich eine starke projektorische Verflechtung zwischen anterioren und posterioren zingulären Arealen. Das zytoarchitektonische Übergangsbereich 24' konnte rezeptorautoradiographisch eindeutig dem AGC zugeordnet werden. Je weiter die räumliche Entfernung der zingulären Areale war, desto signifikanter die Unterschiede in der Rezeptorausstattung. Es bestand ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Grad der intraarealen (zytoarchitektonischen) Differenzierung einerseits und der Rezeptorausstattung bzw. des Projektionsverhaltens andererseits. Je stärker die zytoarchitektonische Differenzierung war, desto höhere Rezeptorwerte ergaben sich für die noradrenergen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) und die muskarinischen (M1 und M2) Rezeptoren bzw. desto höher die Anzahl der Afferenzen.

Diskussion: Die so ermittelten strukturellen Beziehungsmuster des Gyrus cinguli dienen als Erklärung für elementare funktionelle Gliederungen des Gyrus cinguli. Die unter anderem von Vogt et al. (1992) und Devinsky et al. (1995) beschriebene funktionelle Zuordnung des rostralen Anteils des Gyrus cinguli als „anterior executive region“ und des kaudalen Anteils des Gyrus cinguli als „posterior evaluative region“ findet ihr strukturelles Korrelat in der rezeptorautoradiographisch nachgewiesenen Separation des Gyrus cinguli in einen AGC bzw. PGC. Die von anderen Autoren, wie z.B. Gabriel and Sparenberg (1987) oder Van Hoesen et al. (1993), in den Mittelpunkt gestellten Hypothesen über das Wirken des Gyrus cinguli in Bezug auf ein gegenseitiges Beeinflussen von anterioren und posterioren Arealen („rostral and caudal feedback system“) finden ihr strukturelles Korrelat in der Evaluation des intrazingulären Verschaltungsplanes, das durch die Konnektivitätsanalysen eine überaus starke und reziproke Interaktion zwischen AGC und PGC zeigt.