

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

NADPH-Diaphorase-positive putaminale Interneurone:
Morphologie und Stereologie bei Gesunden und Schizophrenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Silvia Johannes
aus Bad Neustadt a. d. Saale

Würzburg, August 2006

Referent: Prof. Dr. rer. nat. P. Riederer

Korreferent: Prof. Dr. med. W. Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. med. G.Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

	Seite
I.1 NO	1
I.1.1 NO-Synthasen	1
I.1.1.1 NO-Synthase-Isoformen	1
I.1.1.2 Struktur	3
I.1.1.3 Reaktionsablauf	5
I.1.1.4 Regulation	6
I.1.2 Wirkungen von NO	9
I.2 Putamen	11
I.2.1 Topographie	11
I.2.2 Entwicklung	11
I.2.3 Neurone und Neurotransmitter	12
I.2.3.1 Projektionsneurone	12
I.2.3.2 Interneurone	13
I.2.4 Chemoarchitektur	14
I.2.5 Verschaltungen	15
I.2.5.1 Afferenzen	15
I.2.5.2 Efferenzen	16
I.2.6 Funktion	18
I.3 Claustrum	18
I.3.1 Topographie, Morphologie und Entwicklung	18
I.3.2 Neurone und Neurotransmitter	18
I.3.3 Verschaltungen	19
I.3.4 Funktion	19
I.4 Schizophrene Psychosen	20
I.4.1 Definition und Symptomatologie	20
I.4.2 Übersicht über bisher bekannte pathogenetische Grundlagen	20

II. Fragestellung	22
 III. Material und Methoden	
III.1 Verwendete Materialien	24
III.2 Puffer	24
III.3 Verwendete Geräte	25
III.4 Aufarbeitung der Gehirne	25
III.4.1 Herkunft der Gehirne	25
III.4.2 Angaben zu den Patienten	26
III.4.3 Histopathologische Voruntersuchungen	26
III.4.4 Fixierung, Verarbeitung und Lagerung	27
III.5 NADPHd-Färbung	27
III.5.1 Theoretische Grundlagen	27
III.5.2 Vorbereitung der Schnitte	28
III.5.3 Färbung	28
III.5.4 Nachbehandlung und Lagerung	29
III.6 Auswertung	29
III.6.1 Morphologische Kriterien	29
III.6.2 Camera lucida-Zeichnungen	30
III.6.2.1 Prinzip des Abbe'schen Zeichenapparates	30
III.6.2.2 Bestimmung von Maßstab und Größe	32
III.6.3 Verteilung der verschiedenen Typen	32
III.6.4 Sholl-Analyse	32
III.6.5 Topologische Analyse	33
III.6.5.1 Klassifikation der Dendritenbäume	33
III.6.5.2 Summe der Segment-Ordnungen C	35
III.6.5.3 Summenweglängen von Verzweigungs- und Endpunkten p und p_e	35
III.6.5.4 Topologischer Durchmesser D	35
III.6.5.5 $PSAD$ -Werte als Maß der Asymmetrie	35
III.6.6 Zelldichte	37

IV. Ergebnisse

IV.1 Qualität der Färbung	38
IV.2 NADPHd-positive Neurone des Putamens Gesunder	39
IV.2.1 Morphologie	42
IV.2.1.1 NADPHd I	42
IV.2.1.2 NADPHd II	43
IV.2.1.3 NADPHd III	45
IV.2.1.4 NADPHd IV	47
IV.2.1.5 NADPHd V	48
IV.2.1.6 NADPHd VI	49
IV.2.1.7 NADPHd VII	50
IV.2.1.8 NADPHd IIX	51
IV.2.1.9 NADPHd IX	52
IV.2.1.10 NADPHd X	53
IV.2.1.11 NADPHd XI	55
IV.2.1.12 NADPHd XII	57
IV.2.2 Sholl-Analyse der Prototypen	60
IV.2.2.1 Systematische Darstellung der Dendriten im Sholl-Raster	60
IV.2.2.2 Weitergehende Analyse	67
IV.2.3 Topologische Analyse	71
IV.2.4 Verteilung der Klassen NADPHd-positiver Interneurone	77
IV.3 Veränderte NADPHd- positive Neurone im Gehirn Schizophrener	78
IV.3.1 Morphologische Unterschiede	78
IV.3.2 Numerische Abweichungen	83
IV.4 NADPHd-positive Neurone im menschlichen Claustrum	87
IV.5 NADPHd-positive Neurone der Capsulae externa et extrema des Menschen	93

V. Diskussion	
V.1 Methodische Überlegungen	99
V.1.1 NADPHd-Färbung	99
V.1.2 Camera lucida-Zeichnungen	103
V.1.3 Statistisch-morphologische Analysemethoden	104
V.2 Ergebnisse	105
V.2.1 NADPHd-positive Interneurone im Striatum Gesunder	105
V.2.1.1 Klassifikation striataler NADPHd-positiver Neurone	105
V.2.1.2 Bedeutung morphologisch basierter Klassifikationssysteme	106
V.2.1.3 Bedeutung striataler NADPHd-positiver Neurone	106
V.2.1.4 Implikationen einer erweiterten Typologie nitrinerner striataler Interneurone	109
V.2.2 NADPHd-positive Neurone im Putamen Schizophrener	110
V.2.2.1 Auffälligkeiten NADPHd-positiver Neurone im Putamen Schizophrener	111
V.2.2.2 Bedeutung des Striatums in der Pathogenese schizophrener Psychosen.	111
V.2.2.3 Bedeutung von NO in der Pathogenese schizophrener Psychosen	112
V.2.2.4 Abnormalitäten nitrinerner striataler Interneurone: Ursache oder Folge schizophrener Erkrankungen?	117
V.2.3 NADPHd-positive Neurone des Claustrums und der Capsulae externa et extrema	120
V.2.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	120
V.2.3.2 Bedeutung NADPHd-positiver Neurone des Claustrums	120
V.2.3.3 NADPHd-positive Neurone der das Claustrum umgebenden Kapseln	124
VI. Zusammenfassung	127
VII. Literaturverzeichnis	128

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholin-Esterase
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
bp	<i>base pairs</i>
C	Summe aller Segmentordnungen
\bar{C}	Mittelwert der Summe der Segment-Ordnungen
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaM	Calmodulin
CaM/Ca ²⁺	Calmodulin-Calcium-Komplex
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAPON	<i>carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS</i>
CB	Calbindin
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
Colls	Colliculus superior
CR	Calretinin
D	topologischer Durchmesser eines Dendritenbaumes
D ₁	D ₁ -Dopamin-Rezeptor
D ₂	D ₂ -Dopamin-Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DYN	Dynorphin
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
ENK	Enkephalin
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EP	Anzahl der Endpunkte eines Neurons
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid

FMN	Flavin-Adenin-Mononucleotid
FR	Formatio reticularis
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
GS	Gesamtzahl aller Segmente eines Neurons
GTP	Guanosintriphosphat
GW	Gestationswoche
H ₄ Bip	Tetrahydrobiopterin
Hbn	Habenula
HCl	Salzsäure
HE	Haematoxylin-Eosin
ICWM	<i>interstitial cells of the white matter</i>
IF	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IS	Anzahl der Intersegmente eines Neurons
Kap.	Kapitel
LAMP	<i>limbic system-associated membrane protein</i>
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LTD	<i>long-term depression</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
m	männlich
<i>m</i>	Gesamtzahl der Endigungen eines Neurons
<i>m_s</i>	Gesamtzahl der Segmente eines Neurons
M ₂	M ₂ -Muskarin-Rezeptor
\bar{M}	Mittelwert
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
<i>n</i>	Grad eines Stammdendritenbaumes
<i>n_s</i>	Anzahl der Segmente eines Stammdendritenbaumes
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)

Abkürzungsverzeichnis

NADH/H ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NADPHd	NADPH-Diaphorase
NADPH/H ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NBT	Nitroblautetrazolium
Ncl.	Nucleus
NK1	Neurokinin 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
Npp	Nucleus pedunculopontinus
NPY	Neuropeptid Y
Nret	Nucleus reticularis
Nst	Nucleus subthalamicus
NT	Neurotensin
p	Summenweglänge von Verzweigungs- und Endpunkten
\bar{p}	Mittelwert von p
p_e	Summenweglänge der Endpunkte
PAS	Perjodsäure-Schiff
PBS	<i>phospat buffered saline</i>
PDZ	<i>PSD-95 discs large / ZO-1 homology domain</i>
PIN	<i>protein inhibitor of nNOS</i>
PMI	<i>post mortem</i> -Intervall
PSAD	<i>proportional sum of absolute deviations</i>
\overline{PSAD}	Mittelwert des PSAD
$PSAD_{Soma}$	PSAD des Somas
\overline{PSAD}_{total}	Mittelwert der PSAD-Werte von Unterbäumen und Soma
PSD-95	<i>post synaptic density protein-95</i>
PV	Parvalbumin

<i>r</i>	Grad des kleineren Unterbaumes
Ref.	Referenz
<i>s</i>	Grad des größeren Unterbaumes
SD	Stammdendriten
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNP	single nucleotide polymorphism
SNr	Substantia nigra pars reticulata
SOM	Somatostatin
SP	Substanz P
Sz	Schizophrenie
Tab.	Tabelle
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TH	Tyrosin-Hydroxylase
Thal	Thalamus
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VP	Anzahl der Verzweigungspunkte eines Neurons
w	weiblich
ZNS	Zentralnervensystem

I. Einleitung

I.1 NO

In den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts postulierten Forschergruppen einen vom Endothel produzierten Botenstoff, der zu einer Dilatation der Gefäße und damit im Organismus zur Senkung des Blutdruckes führte. Gemäß dieser Vorstellung wurde er *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) genannt [128]. Knapp zehn Jahre dauerte es, EDRF als das gasförmige Molekül Stickstoffmonoxid (NO) zu identifizieren [127,176].

Bei NO handelte es sich um den ersten entdeckten gasförmigen Mediator, der beschrieben wurde. Mittlerweile ist mit CO ein weiterer gasförmiger Botenstoff [358] bekannt.

NO zeichnet sich durch eine hohe Lipophilie aus, die eine Diffusion über Entfernungen bis zu 600 µm - dem Durchmesser mehrerer Zellen - erlaubt. Begrenzt wird diese Fähigkeit durch ein ungepaartes Elektron in einem antibindenden $2p\pi$ -Orbital [335], das eine hohe Reaktivität des Moleküls und damit auch seine nur kurze Lebensdauer von ca. drei bis sieben Sekunden bedingt [23,175]. Diese Radikal-Eigenschaft ist außerdem für einige Funktionen von NO verantwortlich (siehe Kap. I.1.2).

I.1.1 NO-Synthasen

Bakterien nutzen eine Nitritreduktase zur Herstellung von NO, während sich eukaryonte Zellen eines anderen Enzym-Typs bedienen, nämlich der NO-Synthasen (NOS). Sie katalysieren eine Oxidationsreaktion, in deren Verlauf aus der Aminosäure L-Arginin NO freigesetzt wird [314].

I.1.1.1 NO-Synthase-Isoformen

In den Jahren 1990, 1991 und 1992 gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen drei Isoformen der NO-Synthasen zu isolieren und klonieren [49,122,284]. Nach dem Ort ihres ersten Nachweises wurden sie neuronale (nNOS), induzierbare (iNOS) und endotheliale (eNOS) NOS genannt. Ihre Genloci wurden auf den Chromosomen 12, 17

Einleitung

und 7 lokalisiert, auf denen sie als *single copy*-Gene vorliegen [152], wobei das Gen von NOS-I den komplexesten Aufbau aufweist [156] (Tab. I.1).

Weitere Charakteristika der NOS-Isoformen sind in Tabelle I.1 aufgelistet:

	NOS-I	NOS-II	NOS-III
Erstmals nachgewiesen in	Kleinhirn	Aktivierte Makrophagen	Endothel
Alternative Bezeichnungen	nNOS ncNOS bNOS	iNOS macNOS	eNOS ecNOS
Genlokus	12q24.2-12q24.3	17cen-q11.2	7q35-7q36
Genstruktur	29 Exons, 28 Introns	26 Exons, 25 Introns	26 Exons, 25 Introns
Gengröße	240 kbp	37 kbp	21-22 kbp
Aminosäuren	1434	1153	1203
Molekularmasse	161kDa	131kDa	133kDa
V_{max} [nmol L-Citrullin / mg/min]	>300	>1600	15
K_m [µM] (Affinität zu L-Arginin)	~2	~2,8	2,9
Membrangebundener Anteil	Niedrig	Niedrig	Hoch
Posttranslationale Modifikationen	Phosphorylierung	Phosphorylierung? Calmodulin	Phosphorylierung Palmitinsäure Myristinsäure
Vorkommen (Auswahl)	Neurone Quergestreifte Muskulatur	Makrophagen Hepatozyten Astrozyten Glatte Muskulatur	Endothelzellen Epithelzellen Kardiomyozyten

Tab. I.1: Charakteristika der NOS-Isoformen.

I.1.1.2 Struktur

Prinzipiell besitzen alle Isoformen den gleichen Aufbau mit einer Aminosäurehomologie untereinander, die zwischen 51 und 57% liegt [6,123]. Ihre Tertiärstruktur lässt sich grob in eine Oxygenase- und eine Reduktase-Domäne unterteilen. Die N-terminale Oxygenase-Domäne beinhaltet die Bindungsstellen für Tetrahydrobiopterin (H₄Bip), L-Arginin und Häm und zeigt Übereinstimmung mit Cytochrom P450-Enzymen [236,237,315]. In der C-terminalen Reduktase-Domäne befinden sich die Bindungsstellen für Flavin-Adenin-Mononucleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). Hinsichtlich ihrer N-Termini zeigen die Isoformen nur geringe Verwandtschaft. Diese Sequenzen scheinen daher Isoenzym-spezifische regulatorische Aufgaben zu übernehmen, wie z. B. die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme [163]. Eine schematische Darstellung des prinzipiellen Aufbaus der NOS-Isoformen findet sich in Abbildung I.1.

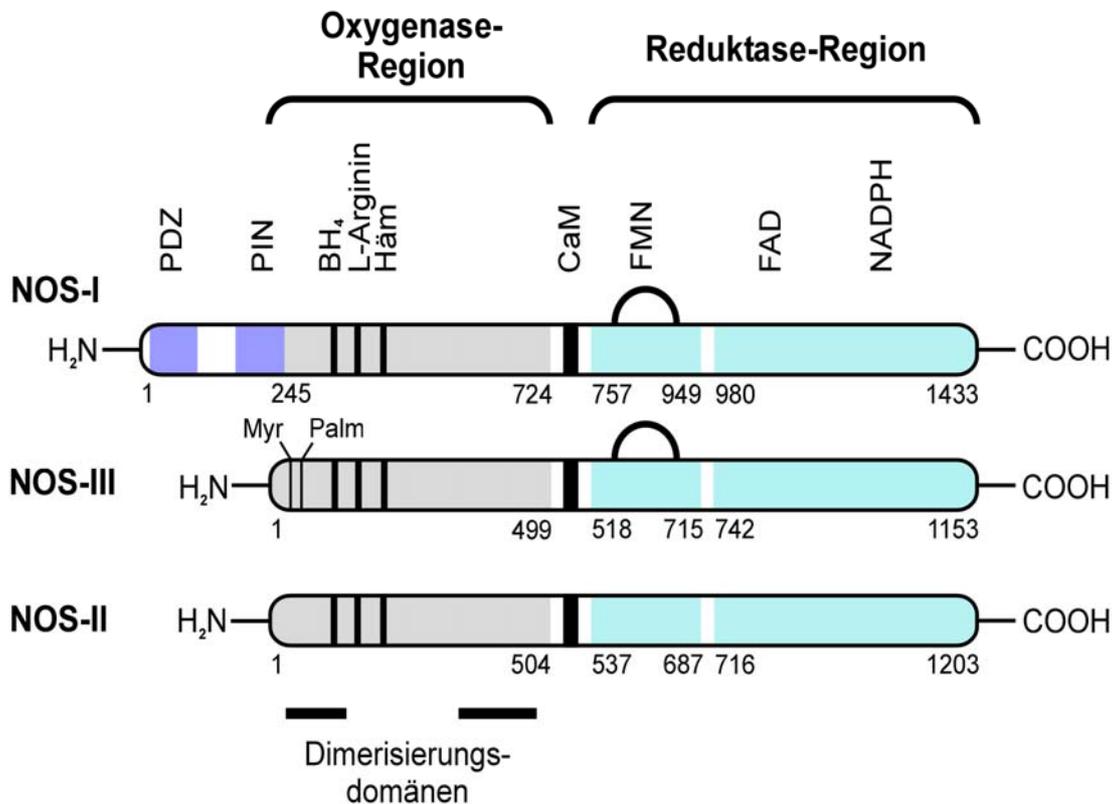


Abb. I.1: Grundstruktur der NOS-Isoformen (Modifiziert nach Ref. [6]). Die Zahlen am Anfang und Ende jeder Domäne beziehen sich auf den jeweiligen Aminosäurerest an dieser Stelle. Für NOS-III sind die Orte der Myristoylisierung und Palmitoylisierung, für NOS-I und NOS-III die autoinhibitorischen Sequenzen in Form von Bögen innerhalb der FMN-Regionen dargestellt. Neben den dargestellten Formen von NO-Synthasen sind verschiedene Splicevarianten beim Menschen von NOS-I (z. B. TnNOS (Testes), nNOS μ (Penis, Urethra) und nNOS-2 (Neuroblastomzellen)) und NOS-II (iNOS_{8,9} (Epithelzellen, Alveolarmakrophagen)) bekannt.

Diese Reduktase-Domäne ist für die NADPH-Diaphorase-Aktivität der NOS verantwortlich [314]. Diese Eigenschaft zeigt sich außergewöhnlich resistent gegenüber Gewebefixativen wie Aceton und Formaldehyd. Neben den physiologischen Substraten Cytochrom c und Cytochrom P450 reduziert die Diaphorase auch für histochemische Zwecke interessante Substanzen wie Methylenblau, Hexacyanoferrat (III) und Tetrazoliumsalze. Die histochemisch einfache NADPH-Diaphorase-Reaktion wurde schon lange zum Anfärben von Neuronen verwendet [10,222], ohne dass man genauer verstand, welche Neurone hiermit zur Darstellung kommen. Mittlerweile ist klar, dass die NADPH-Diaphorase identisch mit NOS-I ist [48,84,172,315] und somit durch diese Reaktion spezifisch NOS-I-positive Neurone nachgewiesen werden.

Alle drei Isoformen der NO-Synthase scheinen über die NADPH-Diaphorase-Aktivität zu verfügen [228,344], bei NOS-III wurde sie in der Vergangenheit jedoch nicht so intensiv dokumentiert, wie es bei NOS-I der Fall war.

I.1.1.3 Reaktionsablauf

NO-Synthasen sind nur in ihrer homodimeren Form katalytisch aktiv (Abb. I.2). Die Dimerisierung wird über zwei Regionen der Oxygenase-Domäne vermittelt, die die Bindungsstelle für H₄Bip beinhalten und zur Bildung des aktiven Zentrums beitragen, in dem sich die Bindungsstellen für Häm und L-Arginin befinden. Die Dimerisierungsdomäne verfügt über zwei Cystin-Reste pro Monomer, die entweder eine Disulfid-Brücke ausbilden oder ein Zink-Ion zwischen den beiden Monomeren binden. [224,290]. Die dimere Form wird u. a. durch die Bindung von Häm, H₄Bip und L-Arginin stabilisiert.

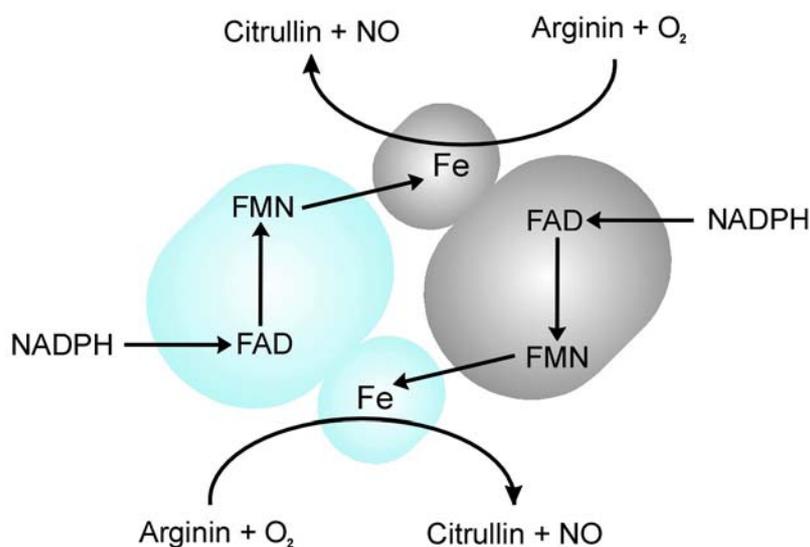


Abb. I.2: NO-Synthase. Während der NO-Synthase erfolgt der Elektronenfluss von einem NOS-Monomer zum anderen.

Das Grundprinzip der von NOS katalysierten NO-Produktion besteht darin, dass NO aus molekularem Sauerstoff und einem terminalen Guanidinostickstoffatom (N^ω) eines Arginin-Moleküls gebildet wird. Als stabiles Zwischenprodukt entsteht dabei N^ω-Hydroxyarginin [339] (Abb. I.3).

Einleitung

Bei dieser Oxidationsreaktion findet der Elektronenfluss vom Reduktionsäquivalent NADPH/H⁺ über FMN und FAD zum Häm nicht innerhalb desselben Monomers statt, sondern von der Reduktase-Domäne des einen Monomers zum anderen [326] (Abb. I.2). Die Bedeutung der Flavine beruht darauf, dass sie dem zwei-Elektronen-Donator NADPH erlauben, seine Elektronen auf den ein-Elektron-Akzeptor Häm zu übertragen [6]. Der Elektronentransfer zwischen den Flavinen zeigt in Abwesenheit von CaM/Ca²⁺ eine langsamere Geschwindigkeit [238] als in seiner Anwesenheit, so dass hier offensichtlich ein Kontrollpunkt von CaM zu sehen ist. Da sich die Redox-Potentiale durch die Bindung von CaM/Ca²⁺ kaum ändern, ist der CaM-Effekt wohl eher kinetischer als thermodynamischer Natur [261].

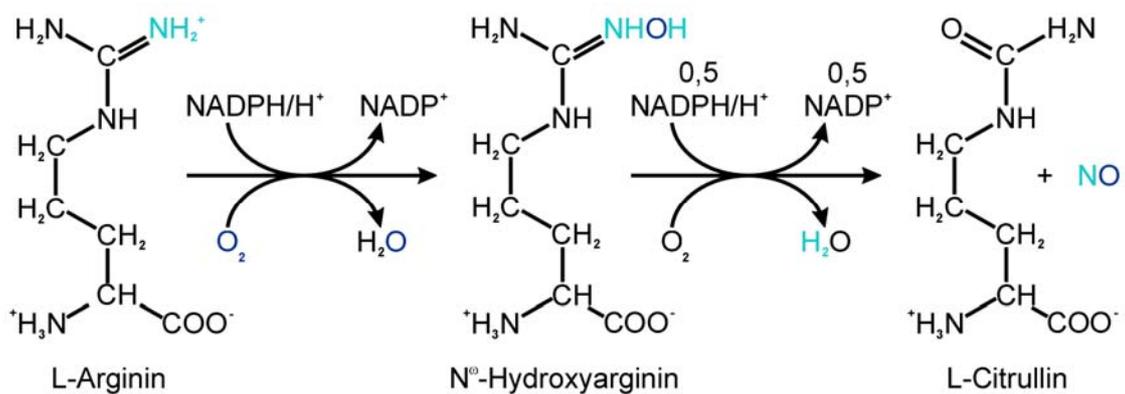


Abb. I.3: NO-Biosynthese. In einer ersten Monoxygenase-Reaktion findet eine zwei-Elektronen-Oxidation von L-Arginin zu N^ω-Hydroxyarginin statt. Dieser Schritt ähnelt dabei den Reaktionen von Cytochrom P450-Enzymen. N^ω-Hydroxyarginin wird im zweiten Schritt unter Freisetzung von NO zu L-Citrullin oxidiert. Sowohl über Endprodukte als auch über die Stöchiometrie und den genauen Reaktionsmechanismus existieren kontroverse Vorstellungen [6].

I.1.1.4 Regulation

NO-Synthasen können über ihre Expression, Lokalisation und Aktivität reguliert werden. Die Expression kann sowohl durch mechanische Reize als auch durch verschiedene Zytokine beeinflusst werden. Für die N-terminalen Sequenzen von NOS-I und NOS-III sind lokalisatorische Funktionen bekannt:

Charakteristisch für NOS-I ist eine sog. PDZ-Region (*PSD-95 discs large / ZO-1 homology domain*). Die PDZ-Region umfasst im Wesentlichen die Aminosäuren 14-89 [100]. Für diese Region wurden verschiedene Bindungsmotive ermittelt [312,338]. Wichtige Liganden sind dabei die Neuronen-spezifischen Proteine PSD-95 und PSD-93 (*post synaptic density protein*) [52], die die Bindung von NOS-I an andere Moleküle vermitteln: Im Skelettmuskel liegt NOS-I an $\alpha 1$ -Syntrophin assoziiert vor, das mit dem sarkolemmalen Dystrophin einen Komplex bildet [51,165]. In Neuronen führt die PDZ-Region über eine Interaktion u. a. mit PSD-93 und PSD-95 zur Bildung eines ternären Komplexes mit der 2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors [52,71]. NO nimmt an diesem Rezeptor die Rolle eines *second messengers* von Glutamat ein. Eine Stimulation des NMDA-Rezeptors führt also zu einer Aktivierung von NOS-I und damit zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase. Dabei reguliert NO bzw. das Radikal Nitroxyl den NMDA-Rezeptor in einer Feedback-Schleife negativ [234]. Ein inhibitorischer Mechanismus unklarer Signifikanz wird durch den sog. Protein Inhibitor der NOS-I (PIN) vermittelt, der durch die Destabilisierung der dimeren Struktur von NOS-I deren Enzymaktivität hemmt [181]. Die PIN-Bindungsstelle im Bereich der Aminosäuren 163 bis 245 stellt eine weitere NOS-I-spezifische Domäne dar, die außerhalb der bereits beschriebenen Domänen liegt und sowohl NOS-II als auch NOS-III fehlt [108].

Der N-Terminus von NOS-III setzt sich aus ca. 70 Aminosäuren zusammen. In dieser Region findet posttranslational bzw. cotranslational die kovalente Bindung von Palmitin- bzw. Myristinsäure statt, über die die Bindung an die plasmalemmalen Caveolae stattfindet [63,132,243,319,320].

CaM ist unentbehrlich für die enzymatische Aktivität aller drei NOS-Isoformen [50], wobei diese sich jedoch in ihrer Ca^{2+} -Abhängigkeit unterscheiden: NOS-I und NOS-III benötigen viel höhere Ca^{2+} -Konzentrationen, um katalytisch aktiv zu sein. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass NOS-I und NOS-III im Unterschied zu NOS-II über eine autoinhibitorische Sequenz verfügen, die den Elektronentransfer behindert, solange kein $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$ gebunden ist [305]. Erst durch die Bindung von $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$ wird diese autoinhibitorische Domäne in eine andere sterische Konformation gebracht und damit das Enzym in seine aktive Form überführt. CaM allein ist dazu nicht in der Lage. Da

Einleitung

NOS-II nicht über diese inhibitorische Sequenz verfügt, reicht hier im Gegensatz zu NOS-I und NOS-III die irreversible, alleinige Bindung von CaM zur Aktivierung aus. Dennoch ist auch bei NOS-II unter Extrembedingungen eine Aktivitätssteigerung durch Ca^{2+} zu finden [336,357].

CaM steigert den Elektronenfluss von NADPH zu den Flavinen als auch zu artifiziellen Elektronen-Akzeptoren wie Ferricyanid [130] und Cytochrom c sowie von der Reduktase-Domäne zum Häm [129].

Weitere Regulationsmechanismen, die die Aktivität beeinflussen, sind in Tabelle I.2 aufgezählt.

	NOS-I	NOS-II	NOS-III
Expression			
Mechanisch (Scherstress)	-	-	Induziert
TNFα, IFγ, IL-1	Hemmen	Induzieren	Hemmen
Glucocorticoide, TGFβ, IL-4 und -10	-	Hemmen Induktion	-
Aktivität			
Ca$^{2+}$-abhängig (CaM-vermittelt)	Ja	Nein*	Ja
Phosphorylierung	Moduliert	?	Moduliert
Endogenes Methylarginin (ADMA)	Hemmt	Hemmt	Hemmt
Lokalisation			
Myristoylisierung Palmitoylisierung Caveolin-1	-	-	Ja
PDZ/PSD-95	ja	-	-

*CaM bindet an NOS-II konstitutiv, d. h. auch bei erniedrigtem Ca^{2+} .

Tab. I.2: Regulationsmechanismen der NOS-Isoformen. Es wurde nach Regulation von Expression, Lokalisation und Aktivität der verschiedenen NOS-Isoformen unterschieden.

I.1.2 Wirkungen von NO

NO agiert als Signalmolekül, Neurotransmitter und Hormon, aber auch – abhängig von seiner Konzentration – als Zellgift.

Was den Botenstoff NO von vielen anderen Botenstoffen unterscheidet, ist die Tatsache, dass er nicht vesikulär gespeichert wird, sondern nach Bedarf synthetisiert wird. NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclase, die aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) bildet. cGMP beeinflusst eine Vielzahl nachgeschalteter Enzyme, über die verschiedene Effekte, wie z. B. Ca^{2+} -Einstrom oder eine Steigerung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) verursacht werden. Als Botenstoff übernimmt NO z. B. Aufgaben im zentralen und peripheren Nervensystem, im Herz-Kreislauf-System und der Niere.

Um als Zellgift, also zytostatisch, zytotoxisch und mutagen wirken zu können, sind höhere und/oder längere Einwirkzeiten von NO erforderlich [314]. Dieser Zustand wird bei pathologischen Zuständen (z. B. aktivierte Leukozyten) durch Induktion von NOS-II erreicht, die große Mengen an NO produziert. Aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit tritt NO mit vielen Molekülen in Wechselwirkung. Die Bildung von Hydroxylradikalen, Nitrosothiolen und Nitrosaminen, die Hemmung von Enzymen oder DNA-Mutationen sind mögliche Auswirkungen. Diese Effekte sind sowohl als pathophysiologischer Faktor u. a. bei cerebralen Ischämien und septischem Schock bekannt, aber auch physiologischerweise in der unspezifischen Immunabwehr zur Abtötung von Bakterien und Parasiten. Weitere physiologische und pathophysiologische Funktionen von NO sind in Tabelle I.3 wiedergegeben.

Einleitung

Ort	Physiologie	Pathophysiologie
Herz-Kreislauf-System	Vasodilatation	Hypotension <i>Capillary leak syndrome</i> Reperfusionsschäden Septischer Schock
Thrombozyten	Aggregationshemmung	
Immunsystem	Unspezifische Immunabwehr	Inflammatorische Gewebeschädigung Transplantatabstoßung
Lunge	Regulation des Ventilations-/ Perfusionsverhältnisses	Asthma bronchiale
Pankreas	Modulation der Insulinfreisetzung	Diabetes mellitus
Niere	Regulation von Perfusion und Reninfreisetzung	Nierenversagen
Urogenitaltrakt	Penile Erektion	
Gastrointestinaltrakt	Regulation von Motilität und Peristaltik	
ZNS	Gedächtnis Lernen Verhalten	Neurotoxizität Epilepsie Migräne Morbus Alzheimer HIV-Demenz

Tab. I.3: Funktionen von NO in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.
Dargestellt ist eine Auswahl bisher bekannter Rollen von NO.

I.2 Putamen

I.2.1 Topographie

Das Putamen ist ein gut 5 cm³ großes Kerngebiet [316] unterhalb des kortikalen Mantels des Telencephalons. Neben Nucleus (Ncl.) caudatus, Globus pallidus, Substantia nigra und Ncl. subthalamicus zählt es zu den Kerngebieten der Basalganglien. Als Teil des Corpus striatum wird es durch die kortikofugalen und -petalen Fasern der Capsula interna vom ca. 13% kleineren [316] Ncl. caudatus getrennt. Verbunden sind diese beiden Kerngebiete durch den ventral gelegenen Ncl. accumbens und über striäre Zellbrücken, die zum streifigen Aussehen des Striatums führen und damit zur Namensgebung beitragen.

Funktionell kann das Striatum – und damit auch das Putamen – in zwei Teilbereiche untergliedert werden: Das ventrale Striatum umfasst v. a. den Ncl. accumbens sowie den striatalen Bereich des Tuberculum olfactorium und erhält hauptsächlich limbische Afferenzen. Demgegenüber empfängt das dorsale Striatum überwiegend Afferenzen aus kortikalen und thalamischen Gebieten, die nicht zum limbischen System gehören (siehe Kap. I.2.5). Das dorsale Striatum wird durch die Hauptmasse von Putamen und Ncl. caudatus gebildet und entspricht dem klassischen Neostriatum.

I.2.2 Entwicklung

Grundlage für die Histogenese des Striatums ist die Bildung von Neuronen in definierten Bereichen des sich entwickelnden Gehirns, die durch verschiedene Formen von Zell-Migration in die Anlage des späteren Striatums einwandern [157]:

In der 5. Woche werden am Boden der Seitenventrikel die Ganglienhügel (Eminentiae ventriculares) als starke Verdickung der Ventrikulär- und Subventrikulärzone erkennbar. Diese Struktur stellt im fetalen Gehirn eine wichtige proliferative Zone für verschiedene Kerngebiete dar [347]. In der 6. Woche bildet sich auf der ventrikulären Oberfläche in longitudinaler Richtung der Sulcus interstriatalis aus, der den Ganglienhügel in ein mediales und ein laterales Kompartiment untergliedert [289]. Die Neurone des Striatums gehen aus beiden Kompartimenten hervor. Dabei scheinen im Bereich des medialen Ganglienhügels vorwiegend die Interneurone gebildet zu werden, während im lateralen Teil hauptsächlich die Projektionsneurone entstehen [85,235,270].

Die Untergliederung des Striatums in Striosomen und extrastriosomale Matrix wird bereits durch einen differenten Einwanderungszeitpunkt der jeweiligen Neurone festgelegt: Die striosomalen Neurone werden zuerst generiert und bilden ein striatales Primordium. Durch eine massive Einwanderung später entstandener Matrix-Neurone in dieses Primordium wird das Mosaik-Muster des Striatums vervollständigt [352]. Wie in anderen Kerngebieten auch ist die Entwicklung des Striatums zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen. Postnatal erfolgt eine Reduktion der Neuronenzahl, bis das adulte Niveau erreicht ist [113].

I.2.3 Neurone und Neurotransmitter

Da Ncl. caudatus und Putamen nicht nur durch ihre gemeinsame Entwicklung und ihren Feinbau, sondern auch funktionell eine Einheit bilden, werden beide Kerngebiete gemeinsam als Striatum besprochen.

Wie alle anderen größeren Kerngebiete des ZNS setzt sich das Striatum aus Projektionsneuronen (Golgi-Typ I-Zellen) und lokalen Interneuronen (Golgi-Typ II-Zellen) zusammen. Insgesamt enthält das Striatum etwa 100 Millionen Neurone [316].

I.2.3.1 Projektionsneurone

Projektionsneurone besitzen einen mittelgroßen Zellkörper von ca. 12-20 μm im Durchmesser, von dem vier bis fünf dünne Dendriten ihren Ausgangspunkt nehmen. Sie weisen im Gegensatz zu den Interneuronen zahlreiche *spines* an ihren Dendriten auf [377], weshalb sie auch *medium-sized spiny neurons* genannt werden. Anhand der Ausdehnung ihres Dendritenbaumes und des Verzweigungsmusters des Axons lassen sich zwei Typen unterscheiden [95]: Typ I *medium-sized spiny neurons* sind kleiner, aber dafür häufiger als Typ II *medium-sized spiny neurons*.

Projektionsneurone stellen den weitaus größten Anteil der Neurone des Striatums [47,143,201,292]. Offensichtlich verwenden sie alle γ -Amino-Buttersäure (GABA) als Haupttransmitter [263,295]. Daneben werden – je nach Zielort des Neurons (siehe Kap. I.1.5) – verschiedene Neuropeptide koexprimiert, deren genaue Funktion noch immer unbekannt ist. Dazu gehören Enkephalin (ENK), Substanz P (SP), Dynorphin (DYN) und Neurotensin (NT) [17,42,107,145,154,168]. Außerdem ist eine Unterscheidung

durch das Vorhandensein der Calcium-bindenden Proteine Calbindin (CB) und Calretinin (CR) möglich [135,285].

Medium-sized spiny neurons besitzen sowohl rezeptive als auch projizierende Funktion. Axone von extrinsischen Afferenzen enden dabei vorwiegend distal im Dendritenbaum, während intrinsische Afferenzen die proximale somatodendritische Region bevorzugen [275].

Neben diesen mittelgroßen Projektionsneuronen existiert bei Katzen eine Klasse großer Neurone, die auch efferent zu sein scheint [97,182]. Der Nachweis dieser Neurone beim Menschen steht allerdings noch aus.

I.2.3.2 Interneurone

Interneurone machen weniger als 15% der Neurone im Striatum aus [143], dennoch gibt es eine große morphologische Vielfalt. Anhand dieser morphologischen Unterschiede wurden Golgi-basierte Klassifikationen erstellt [47,144,221,383] und beim Menschen drei bis vier, bei der Ratte mehr als acht [68] Subtypen definiert. Im Vergleich zu den Projektionsneuronen besitzen Interneurone kaum *spines*. Aufgrund ihrer Größe kann man die striatalen Interneurone zwei Kategorien zuordnen: große und mittelgroße Interneurone. Letztere lassen sich auf der Basis ihrer neurochemischen Ausstattung in weitere drei Gruppen unterteilen: Die erste exprimiert γ -Amino-Buttersäure (GABA) sowie Parvalbumin (PV) [79], die zweite Somatostatin (SOM) [94,342], Neuropeptid Y (NPY) [330] und die NADPH-Diaphorase (NADPHd) [362] und die dritte und letzte Gruppe Calretinin (CR) [31,73].

Große Interneurone zeichnen sich durch die Expression der Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) aus und sind daher als cholinerge Interneurone anzusehen. Sie repräsentieren weniger als 2% aller striatalen Zellen [282] und stellen damit die seltenste der vier Haupttypen von striatalen Interneuronen dar. Für das menschliche Striatum konnte folgende Häufigkeitsverteilung striataler Interneurone gefunden werden (+, Vorhandensein des genannten Leitproteins): ChAT+ < NADPHd+ < PV+ < CR+ [74].

Im menschlichen Striatum verteilen sich die beschriebenen Typen von Interneuronen gleichmäßig von rostral nach caudal, CR- und PV-positive Neurone sind jedoch im Ncl. caudatus häufiger als im Putamen zu finden. Bei Affen ist insgesamt die Interneuronendichte höher als bei Ratte und Mensch [381].

I.2.4 Chemoarchitektur

Obwohl Ncl. caudatus und Putamen einen homogenen makroskopischen Aspekt bieten, zeigte sich, dass alle bekannten Neurotransmitter ein bestimmtes Verteilungsmuster aufweisen und dadurch zwei histochemisch unterschiedliche Kompartimente definieren: Striosomen (*patches*) und extrastriosomale Matrix. Neben histochemischen Unterschieden unterstützt auch die Organisation von afferenten und efferenten Verbindungen diese Kompartimentierung (siehe Kap. I.1.5).

Die Striosomen bilden ein dreidimensionales Labyrinth in der extrastriosomalen Matrix und machen ca. 10-20% des Gesamtvolumens des Striatums aus [145,150,278]. Zuerst wurde diese Heterogenität durch Unterschiede im Vorkommen der Acetylcholin-Esterase (AChE) entdeckt [150]. Mittlerweile sind weitere Marker für diese Unterteilung bekannt, so dass sich folgendes Bild ergibt: Striosomen sind reich an ENK [148,151], CR [124], SP [44] und LAMP (*limbic system-associated membrane protein*) [286], aber arm an AChE und Tyrosin-Hydroxylase (TH) [114,149], während die extrastriosomale Matrix eine starke Immunoreaktivität für AChE [150], CB [170,286] und PV [32,170,286] aufweist.

Alle Klassen von striatalen Projektions- und Interneuronen kommen in beiden Bereichen vor [74]. Trotzdem scheinen sich die Projektionsneurone insofern an die Grenzen der beiden Kompartimente zu halten, als dass sowohl Dendritenbaum als auch Axonkollaterale streng in dem Kompartiment verbleiben, in dem sich das dazugehörige Soma befindet [277,366,367]. Cholinerge und NADPHd-positive Interneurone dagegen befinden sich hauptsächlich an den Grenzen der beiden Zonen. Sie überschreiten mit ihren Dendriten und Axonen die Demarkationslinien der Kompartimente, so dass sie vermutlich als Bindeglied fungieren und Interaktionen zwischen den Projektionsneuronen beider funktioneller Bereiche vermitteln [69,74,135,146,147,188].

Die Striosomen an sich lassen sich wiederum in zwei Kompartimente unterteilen, deren chemoarchitektonische Zusammensetzung sich entlang der rostrocaudalen Achse des Striatums stark ändert [286].

In der peripheren Randzone der Striosomen liegt eine stärkere Immunoreaktivität für ENK, LAMP, CB, CR und ChAT als im Zentrum vor. Das Vorkommen von PV und der isoliert vorliegenden intrastriosomalen NADPHd-positiven Interneuronen ist in beiden Zonen gleichmäßig [286]. Mehr als 95% der NADPHd-positiven Neurone umgeben jedoch die Striosomen als Cluster [204,248,308].

I.2.5 Verschaltungen

I.2.5.1 Afferenzen

Das Striatum ist das Hauptrezeptionsorgan der Basalganglien. Im Striatum selbst ist das *medium-sized spiny neuron* das Hauptziel intrinsischer und extrinsischer Afferenzen [275]. Striatale Interneurone erhalten kaum extrinsischen Input, sie stellen vielmehr die Quelle der intrinsischen GABAergen, cholinergen und somatostatergen Afferenzen dar (siehe Kap. I.2.3). Extrinsische Afferenzen stammen v. a. von Kortex, Thalamus und der Substantia nigra (pars compacta).

Ca. 80% aller striatalen Synapsen sind kortikaler Natur [275]. In unterschiedlichem Ausmaß beteiligen sich fast alle funktionellen Areale des Kortex daran, v. a. aber die des motorischen, prämotorischen und somatosensorischen Kortex. Die Endpunkte der kortikostriatalen Projektion finden sich überwiegend ipsilateral [212] und je nach Ursprungsort topisch gegliedert im Striatum wieder: Somatosensorische, motorische und prämotorische Areale projizieren dabei somatotop in postkommissurale Gebiete des Striatums [120,121], assoziative kortikale Areale projizieren zum Ncl. caudatus und zum rostralen Putamen [138,384], Axone limbischer Kortexregionen, der Amygdala und des Hippokampus enden vorzugsweise im ventralen Striatum [8,211]. Jedes Projektionsneuron scheint dabei konvergente Inputs aus vielen kortikalen Arealen zu erhalten, so dass nur eine Aktivitätssteigerung erreicht wird, wenn viele kortikale Neurone feuern [331].

Thalamische Afferenzen entstammen hauptsächlich den intralaminären Kerngebieten, aber ebenso – wenn auch geringer – aus den Mittellinien- und bestimmten Relais-

Kernen [28]. Das wichtigste Kerngebiet ist hierbei der zentromediane parafaszikuläre Komplex [275]. Kortikale und thalamische Afferenzen des Striatums sowie Afferenzen aus den Amygdalae verwenden Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter [199,200,240,301].

Als Quelle dopaminerger Innervation ist die Substantia nigra (pars compacta) (SNc) und der Area tegmentalis Tsai anzusehen [125,210]. Serotonerge Afferenzen haben ihren Ausgangspunkt in den Raphe-Kernen [332].

Auch im afferenten System des Striatums ist die Dichotomie zwischen Striosomen und extrastriosomaler Matrix erkennbar: Limbische Hirnareale projizieren vorwiegend in die Striosomen, wohingegen die extrastriosomale Matrix eher Afferenzen empfängt, die im direkten Bezug zu sensomotorischen Prozessen stehen [98].

I.2.5.2 Efferenzen

Als Outputorgane des Striatums sind die Projektionsneurone gleichzeitig Ursprung verschiedener Regelkreise, die klassischerweise in eine direkte und eine indirekte Schleife unterschieden werden [5,7]. Der Regelkreis der direkten Schleife beginnt in Projektionsneuronen, die neben GABA SP und DYN sowie vorwiegend den D₁-Dopamin-Rezeptor (D₁) exprimieren. Diese Neurone enden direkt im Globus pallidus internus. Die Projektionsneurone des indirekten Weges dagegen sind ENK-positiv und exprimieren überwiegend den D₂-Dopamin-Rezeptor (D₂) [5,136,137].

Die direkte Schleife verläuft über das innere Segment des Globus pallidus (GPi) zum Thalamus und von dort zum Kortex, die indirekte Schleife über das äußere Segment des Globus pallidus (GPe) bzw. über die Substantia nigra (pars reticulata) (SNr) zuerst zum Ncl. subthalamicus (Nst) und danach erst zum Thalamus und zum Kortex. Beide Schleifen stammen v. a. von den Projektionsneuronen der extrastriosomalen Matrix ab. Striosomale Projektionsneurone senden ihre Axone hauptsächlich zur SNc [134,183].

Mittlerweile stellt sich jedoch zunehmend heraus, dass diese Darstellung der Verschaltungen innerhalb der Basalganglien zu stark vereinfacht ist [274,331]. So scheinen striatofugale Axone über starke Kollateralisationen zu verfügen, mit denen sie mehr als nur eine der striatalen Empfängerstrukturen GPe, GPi und SNr erreichen [190,273]. Auch die Rolle des GPe wurde offensichtlich unterschätzt: Nachdem der

I.2.6 Funktion

Die Basalganglien und damit auch das Striatum haben größte Bedeutung für das extrapyramidal-motorische System. Diese Bedeutung kann am besten an Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Huntington abgeschätzt werden. Pathogenetisch liegt beiden Erkrankungen eine Degeneration in Strukturen der Basalganglien zugrunde. Daneben spielen diese basalen Kerngebiete aber auch eine wichtige Rolle in der Planung von Bewegung, in der Programmauswahl und für das motorische Gedächtnis. Außerdem werden die Basalganglien mit bestimmten Formen von Substanz-Abhängigkeit, Zwangserkrankungen und schizophrenen Psychosen in Verbindung gebracht [145].

I.3 Claustrum

I.3.1 Topographie, Morphologie und Entwicklung

Zwischen den Fasermassen von Capsula externa und Capsula extrema eingebettet liegt unter dem Inselkortex das Claustrum, ein subkortikales Kerngebiet von ca. 1000 mm³ Volumen und einer Neuronenzahl von etwa 11 Millionen [250], über das noch immer vergleichsweise wenig bekannt ist.

Seinen Ursprung hat der endopiriforme Anteil des Claustrums im ventralen Pallium, der insuläre Anteil zusätzlich im lateralen Pallium [293].

Makroskopisch stellt sich das Claustrum als dünne, sagittal gestellte Lammelle grauer Substanz dar, die rostral am breitesten ist und sich nach caudal verdünnt. Es existieren mehrere Einteilungen, die das Claustrum aufgrund histologischer und funktioneller Kriterien in verschiedene Abschnitte unterteilen [53,87,119,216,230,231,250,288].

I.3.2 Neurone und Neurotransmitter

Neurone des Claustrums lassen sich vereinfacht in zwei Hauptgruppen unterteilen: große Neurone, die viele dendritische *spines* besitzen, und *spine*-lose Neurone unterschiedlicher Größe [46,250,333]. Braak definiert fünf Typen: *spine*-tragende Neurone mit wenig Lipofuscin-Granula gehören zu Typ I, große *spine*-tragende Neurone mit groben Pigment-Granula zu Typ II. Die Typen III bis V zählen zu den

spine-losen Neuronen, die entweder groß und pigmentlos (III), klein und Pigmentbeladen (IV) oder klein und pigmentlos (V) sind [46]. Typ I Neurone stellen danach die Projektionsneurone und machen über 90% aller Neurone des Claustrums aus [333]. Bei der Katze gibt es Hinweise darauf, dass sich die Projektionsneurone je nach Ziel ihres Axons morphologisch unterscheiden lassen [303]. Interneurone verwenden als Neurotransmitter GABA [258,259] und exprimieren CB und PV [101].

I.3.3 Verschaltungen

Das Claustrum unterhält vielfältige reziproke Verbindungen zum Kortex, die im Claustrum topographisch organisiert sind: Das vordere Drittel des Claustrums verfügt v. a. über Verbindungen zum motorischen, das mittlere zum somatosensorischen und das hintere zum visuellen und auditorischen Kortex [75,213,220,232,233,245]. Im paraamygdalären Teil existieren Verbindungen zu limbischen Strukturen der Temporallappens, besonders zum entorhinalen Kortex [250].

I.3.4 Funktion

Insgesamt gesehen existieren nur wenige Anhaltspunkte über mögliche Funktionen des Claustrums. Dennoch gibt es Hinweise, dass das Claustrum eine wichtige Rolle spielt bei der Übertragung von Information vom Neokortex via Cortex entorhinalis zur Hippokampus-Formation [11,375,378]. Damit ist es wahrscheinlich wichtig für Mechanismen der Erinnerung. So kommt es z. B. bei Morbus Alzheimer v. a. im paraamygdalären Teil zu einem starken Neuronenverlust [252,253]. Eine weitere mögliche Bedeutung des Claustrums mag in der Transmission von Informationen von neokortikalen Arealen zum limbischen System liegen [251]. Im Lichte elektrophysiologischer und neuroanatomischer Studien scheint das Claustrum zudem ein multisensorisches Kerngebiet zu sein, in dem die Integration von Informationen stattfindet [205].

Die Aufklärung der Funktion des Claustrums benötigt jedoch weitere Untersuchungen.

I.4 Schizophrene Psychosen

I.4.1 Definition und Symptomatologie

Schizophrene Psychosen sind chronische Erkrankungen des Gehirns, die ihren Ausdruck in pathologischen mentalen Funktionen und gestörtem Verhalten finden. Klinisch fallen sowohl Positiv-Symptome wie Wahn, Halluzinationen und Ich-Störungen auf, als auch Negativ-Symptome wie Affektverflachung und Spracharmut sowie Störungen grundlegender kognitiver Funktionen wie Aufmerksamkeit und Gedächtnis.

Die Lebenszeitinzidenz beträgt ca. 1% unabhängig von Kulturkreis, Land oder Rasse [54]. Die Erkrankung bricht in mehr als der Hälfte der Fälle zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr aus, so dass sie von großer medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung ist [379].

I.4.2 Übersicht über bisher bekannte pathogenetische Grundlagen

Die Vulnerabilität für Schizophrenie steht in klarem Zusammenhang mit genetischen Faktoren [346]. Die genetische Grundlage ist jedoch sicherlich heterogen, was sich nicht zuletzt an der Vielzahl von replizierten *linkage*-Befunden an verschiedenen Chromosomen (z. B. 1, 6, 8, 10, 12, 13 und 22) zeigt [287].

Neben diesen Vulnerabilitätsloci wurde eine Vielzahl von histopathologischen Veränderungen des Gehirns gefunden, die Volumen, histologischen Aufbau sowie Anzahl, Morphologie und Zusammensetzung der Neurone betreffen [25,26,40,41,105,106,218,219,271,318]. Zu den am längsten bekannten neuropathologischen Veränderungen bei schizophrenen Erkrankungen zählen Erweiterungen des Ventrikelsystems [55,64,82,184]. Daneben gibt es Befunde an kortikalen Arealen des Temporal-, Frontal- und Parietallappens, an den subkortikalen Kerngebieten der Basalganglien und des Thalamus sowie am Corpus callosum, wobei pathologische Veränderungen der Assoziationscortices und Strukturen des limbischen Systems einschließlich der Hippokampus-Formation und der Regio entorhinalis zunehmend in den Vordergrund treten [25,27,106,133,223,322].

Weitere pathologische Veränderungen sind für Stoffwechsel und Rezeptoren bestimmter Neurotransmitter bekannt. Dabei stehen offensichtlich glutamaterge,

GABAerge und dopaminerge Systeme sowie NMDA- und nicotinerge Rezeptoren im Zentrum [214,223,268,276,379].

Als gemeinsamer Ausgangspunkt all dieser Veränderungen wird eine Entwicklungsstörung mit Störung der Neuronenmigration und Dyskonnektivität spezifischer neuronaler Schaltkreise diskutiert [39], deren Ursache in einer genetischen Vulnerabilität sowie in äußeren Faktoren infektiöser, autoimmuner, toxischer oder traumatischer Natur während Schwangerschaft und früher Kindheit zu vermuten sind [24,25,27,106,215,223,241,379].

II. Fragestellung

Aufgrund des weit verbreiteten Vorkommens von NO-Synthasen und aufgrund der vielfältigen Funktionen, die von ihnen produziert NO in zahlreichen Verarbeitungsprozessen einnimmt, ergeben sich in Verbindung mit der zentralen Stellung des Striatums im Funktionieren des Gehirns und den Möglichkeiten der in der vorliegenden Arbeit angewendeten NADPHd-Färbung folgende Fragestellungen:

- Lässt die NADPHd-Färbung eine Einteilung NADPHd-positiver Neurone im menschlichen Putamen anhand morphologischer Kriterien zu?
- Wenn ja, inwieweit lassen sich die so klassifizierten NADPHd-positiven Neurone im menschlichen Putamen in bereits bestehende Klassifikationssysteme eingliedern?
- Welchen Neuronentypen lassen sie sich zuordnen?
- Gibt es bisher nicht beschriebene Neuronentypen?
- Wie ist ihre Häufigkeit und wie sind diese Neurone im Normalfall im Putamen verteilt?

Da Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises eine große sozioökonomische Bedeutung zukommt, aber zu deren Pathogenese noch immer wenig bekannt ist, sollten ausgehend von den oben genannten Befunden Vergleiche zwischen NADPHd-positiven Neuronen im Putamen Gesunder und Schizophrener gezogen werden, um Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle solcher Neurone für die Pathogenese schizophrener Erkrankungen ziehen zu können. Ziel dabei war es, Aussagen zu folgenden Fragen zu treffen:

- Gibt es morphologische Unterschiede zwischen NADPHd-positiven Neuronen im Striatum Gesunder und Schizophrener?
- Unterscheiden sich in den beiden Gruppen Anzahl und Dichte dieser Neurone?

Daneben boten sich aufgrund der anatomischen Nachbarschaft Untersuchungen des Claustrums und der das Claustrum umgebenden Capsulae an. Ziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob in diesen Regionen NADPHd-positive Neurone vorkommen bzw. ob die dort vorkommenden NADPHd-positiven Neurone sich in bereits vorbestehende Klassifikationen einordnen lassen.

III. Material und Methoden

III.1 Verwendete Materialien

Für diese Doktorarbeit wurden folgende Materialien verwendet:

Dimethylsulfoxid, Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland

Entellan[®], Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycerin, AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Malonsäure, Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland

NADPH, Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland und

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Natriumazid, Merck, Darmstadt, Deutschland

Nitroblautetrazolium, Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland

PBS, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland

Trisoxymethylaminomethan, Merck, Darmstadt, Deutschland

Triton-X, Sigma Chemical, Deisenhofen, Deutschland

III.2 Puffer

Um einen Tris-Puffer pH 7,4 zu erhalten, wurde eine Mischung aus Lösung 1 (24,3 g 0,2M Trisoxymehtylaminomethan in 1000 ml Aqua bidest. gelöst) und Lösung 2 (0,1N Salzsäure) und Aqua bidest. im Verhältnis 25:40:35 hergestellt. Für 2 L Tris-Puffer wurden also 12,15 g Trisoxymethylaminomethan in 500 ml Aqua bidest. gelöst und mit 800 ml HCl sowie 700 ml Aqua bidest. versetzt.

III.3 Verwendete Geräte

Digitalkamera: Nikon CoolPix 990, Nikon, Düsseldorf, Deutschland

Magnetrührer: IKAMAG[®] RCT, Janke & Kunkel GmbH & Co.KG,
IKA[®] Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland

Mikroskope und Zubehör:

JENAMED 2, Zeiss, Jena, Deutschland

Nf-Reihe, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Projektionszeichenapparat nach Abbe (PK 10x) ,
Carl Zeiss, Göttingen

Okularmikrometer, Carl Zeiss, Göttingen

Okularmessplatte, Carl Zeiss, Göttingen

Schüttler: IKA-Vibrax-VXR, Janke & Kunkel GmbH & Co.KG,
IKA[®] Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland

Vibratom: Campden Instruments, Sileby, Leics., Großbritannien

Waage: BP 1200, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Wasserfilter: MILLI-Q, Millipore S. A., Molsheim, Frankreich

III.4 Aufarbeitung der Gehirne

III.4.1 Herkunft der Gehirne

Grundlage dieser Doktorarbeit waren insgesamt acht Gehirne, die allesamt im Rahmen von Autopsien gewonnen und von der *Brain Bank* der Universität Würzburg (Dr. med. D. Senitz) zur Verfügung gestellt wurden. Die Studie erfüllte die ethischen Richtlinien der Universität Würzburg.

III.4.2 Angaben zu den Patienten

Die Probanden, vier Frauen und vier Männer, waren im Durchschnitt im Alter von 60 Jahren verstorben. Fünf von ihnen wiesen in ihrer Anamnese keinerlei neurologische Erkrankung auf, drei litten an Schizophrenie. Die für die vorliegenden Untersuchungen relevanten Daten sind in Tabelle III.1 aufgeführt.

Fall	Alter [J]	Geschlecht	Gehirngewicht [g]	PMI [h]	Todesursache	Schizophrenie-Subtyp	Krankheitsdauer [J]	Letzte Neuroleptika-Medikation
Kontrollen								
A	91	w	1050	24	Herzversagen			
B	50	m	1640	35	Vergiftung			
C	52	m	1590	40	Myokardinfarkt			
D	37	m	1420	37	Myokarditis			
E	63	w	1330	18	Ertrinken			
\bar{M}	58,6		1406	31				
Schizophrenie								
P	42	w	1110	43	Ersticken	Residual nach katonischer Sz	24	Haloperidol, Quetiapin, Levomepromazin
Q	67	m	1400	67	Ertrinken	Residual nach paranoider Sz mit katonischen Anteilen	46	Clozapin, Melperon
R	76	w	1230	36	Lungenembolie	Residual nach paranoider Sz	20	Clozapin, Haloperidol, Flupentixol
\bar{M}	61,7		1247	49			30	

Tab. III.1: Angaben zu den untersuchten Gehirnen. Verwendete Abkürzungen: PMI *post mortem*-Intervall, \bar{M} , Mittelwert; m, männlich; w, weiblich; Sz, Schizophrenie.

III.4.3 Histopathologische Voruntersuchungen

Die Gehirne der Kontrollgruppe zeigten makroskopisch keinerlei pathologische Veränderungen. Histologisch wurden die Gehirne mit Hilfe verschiedener Routinefärbungen zum Ausschluss bis dato unbekannter neurologischer Erkrankungen untersucht. Dafür wurden HE- und PAS-Färbungen sowie die Färbungen nach Nissl,

Palmgren, Heidenhain und van Gieson verwendet [37]. Bei keiner dieser Färbungen konnten Hinweise auf neurologische Erkrankungen gefunden werden.

III.4.4 Fixierung, Verarbeitung und Lagerung

Zur Fixierung wurden die Gehirne 10 Tage lang in einer PBS-gepufferten 4%igen Paraformaldehyd-Lösung bei pH 7,4 aufbewahrt. Danach wurden die das Striatum enthaltenden Gewebeblöcke mit Hilfe eines Vibratoms seriell in 75 µm dicke Scheiben geschnitten. Die so erhaltenen Schnitte wurden bei 4°C gekühlt in einer Mischung aus 50% Tris-Puffer (pH 7,4), 50% Glycerin und 0,02% Natriumazid gelagert. Die Lagerungsdauer betrug zwischen 5 und 50 Monaten, wobei die unterschiedlichen Aufbewahrungszeiten die späteren Ergebnisse der NADPH-Diaphorase (NADPHd)-Färbung nicht beeinflussten.

III.5 NADPHd-Färbung

III.5.1 Theoretische Grundlagen

Für die Untersuchung des Hirngewebes wurden die Eigenschaften der NADPH-Diaphorase der NO-Synthase [10,222,314,369] genutzt. Neben den physiologischen Substraten Cytochrom c und Cytochrom P450 reduziert NOS auch die für histochemische Zwecke interessante Substanzen Methyleneblau, Hexacyanoferrat (III) und Tetrazoliums Salze. In dieser Doktorarbeit kam Nitroblautetrazolium (NBT) zum Einsatz. Dieses wird durch die Enzym-katalysierte Reduktion in das wasserunlösliche blaue Diformazan umgewandelt, so dass Zellen, die NOS-I aufweisen ähnlich einer Golgi-Imprägnation [313,362] angefärbt werden.

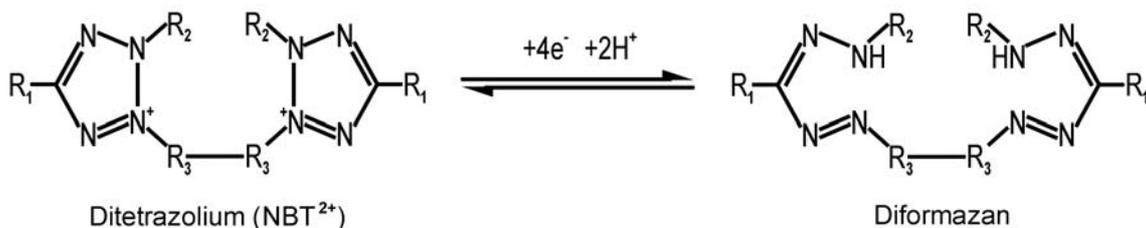


Abb. III.1: Die NADPH-Diaphorase-Reaktion. Für NBT gilt: $R_1 = C_4H_3$, $R_2 = p\text{-NO}_2C_6H_4$, $R_3 = m\text{-CH}_3OC_6H_4$

Die NADPH-Diaphorase-Eigenschaft der NO-Synthase stellt eine gegenüber vielen Gewebefixativen hoch resistente katalytische Funktion dar. Diese Eigenschaft unterscheidet es von vielen anderen NBT-reduzierenden Enzymen, die durch das Einwirken der Fixative ihre Funktionsfähigkeit verlieren. Daher wird durch diese einfache histochemische Reaktion spezifisch NOS-I nachgewiesen.

III.5.2 Vorbereitung der Schnitte

Von jedem Gehirn wurden mehr als 10 Schnitte untersucht. Hierzu wurden die einzelnen Scheiben in jeweils 5 ml Tris-Puffer 30 Minuten lang auf dem Schüttler gewaschen, um Rückstände der zur längerfristigen Lagerung verwendeten Glycerin-Mischung zu entfernen.

III.5.3 Färbung

Im Verlauf wurden verschiedene Versuche unternommen, die Qualität der NADPH-Färbung zu optimieren. Dazu gehörten u. a. auch die Zugabe von Malonsäure, eine Erhöhung der Konzentrationen von NBT und NADPH auf das 1,5 bzw. 2fache sowie der Einsatz von Mikrowellenstrahlen (15 Minuten bei 90 Watt). Durch keine dieser Verfahren konnte eine entscheidende Verbesserung erreicht werden. Als einzige Optimierung blieb am Ende eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 21 Stunden erhalten.

Zur Färbung wurden die einzelnen Schnitte nach ihrer Reinigung in jeweils 1 ml der Färbelösung transferiert. Diese setzte sich folgendermaßen zusammen: In Tris-Puffer (pH 7,4) wurden mit Hilfe eines Magnetrührers DMSO (final 1,2%), NBT (0,4 mg/ml), NADPH (2 mg/ml) und – als letztes – Triton X (final 0,3%) gelöst. Für 100 ml Färbelösung bedeutete das, dass zu 98,5 ml Tris-Puffer 200 mg NADPH, 40 mg NBT und 1,2 ml DMSO zugegeben und solange auf dem Magnetrührer gemischt wurden, bis alles vollständig gelöst war. Erst dann wurden 0,3 ml Triton X zugesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Frequenz des Rührers so niedrig gehalten wurde, dass sich kein Schaum bildete. Die Färbegefäße, in denen die Gewebeschnitte in 1 ml Färbelösung inkubiert wurden, verfügten über einen genügend großen Querschnitt, um eine zu starke Faltung der Schnitte zu vermeiden. Es war aber dennoch gewährleistet,

dass das Gewebe vollständig von der Färbelösung überdeckt war. Die 21stündige Inkubation fand bei Raumtemperatur auf einem Schüttler statt. Die Verdunstung der Färbelösung wurde durch Deckel auf den Inkubationsgefäßen vermieden.

Während der gesamten Verarbeitung, also sowohl während Herstellung der Färbelösung als auch während der Inkubation, wurde auf strengen Lichtschutz geachtet.

III.5.4 Nachbehandlung und Lagerung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte aus der Färbelösung entfernt und gründlich in Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurden sie auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und am Ende mit Entellan[®] eingedeckt. Aufgrund der Tatsache, dass keine aggressiven Maßnahmen zur Dehydratation, wie z. B. aufsteigende Alkohol-Reihen, vorgenommen wurden, konnten Artefakte durch Schrumpfung weitestgehend vermieden werden.

Die fertigen Präparate wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert, ohne dass sich selbst nach mehreren Monaten Verschlechterungen der Qualität der Anfärbung ergaben.

III.6 Auswertung

III.6.1 Morphologische Kriterien

Nach Färbung gemäß der oben genannten Methode bestand die erste Phase der Auswertung zunächst darin, die NADPHd-positiven Zellen des Putamens gesunder Probanden zu sichten, um einen ersten Überblick über die Morphologie der vorhandenen Neurone zu erhalten. Folgende Merkmale wurden dabei beachtet:

- Anzahl der vom Soma abgehenden Dendriten sowie deren Anordnung am Soma
- Anzahl und Art der Verzweigungen der Dendritenäste
- Länge der Dendriten
- Durchmesser und Verlauf der Dendritenäste
- Größe und Form des vom Dendritenbaum abgedeckten Areals
- Symmetrie des Neurons

Nach diesen Kriterien wurden insgesamt mehr als 5000 Neurone an einem JENAMED-Mikroskop beurteilt, also mehr als 1000 Neurone pro zur Verfügung stehendem Kontrollegehirn.

III.6.2 Camera lucida-Zeichnungen

Von den gut 5000 untersuchten Neuronen wurden wiederum mehr als 120 prototypische Zellen als Camera lucida-Zeichnungen dargestellt. Die auf diese Weise abgebildeten Neurone wurden so ausgewählt, dass sie sich einerseits durch eine hervorragende Anfärbung auszeichneten, andererseits aber auch einen repräsentativen Überblick über die unterschiedlichen Morphologien der NADPHd-positiven Neurone im Putamen ermöglichten.

III.6.2.1 Prinzip des Abbe'schen Zeichenapparates

Die graphische Darstellung erfolgte mit einem Carl Zeiss-Mikroskop der Nf-Reihe, das über einen Projektionszeichenapparat nach Abbe verfügte, dessen Prinzip im Wesentlichen einer Weiterentwicklung der Camera lucida entspricht.

Im Unterschied zur Camera lucida liegt diesem Zeichenapparat nicht ein Prisma zugrunde, sondern ein aus zwei rechtwinkligen Prismen zusammengesetzter Würfel. Die Hypothenusenfläche des unteren Prismas ist so versilbert, dass in der Mitte ein Streifen frei bleibt, durch den hindurch das mikroskopische Bild zu sehen ist. Da dem ebenfalls zum Zeichenapparat gehörenden, schräg stehenden Spiegel sowohl die versilberte Fläche des Zeichenwürfels als auch die Zeichenfläche zugekehrt sind, kann man gleichzeitig das Bild im Mikroskop und die Zeichenfläche sehen. Der Aufbau des Zeichenapparates ist schematisch in Abbildung III.2 dargestellt.

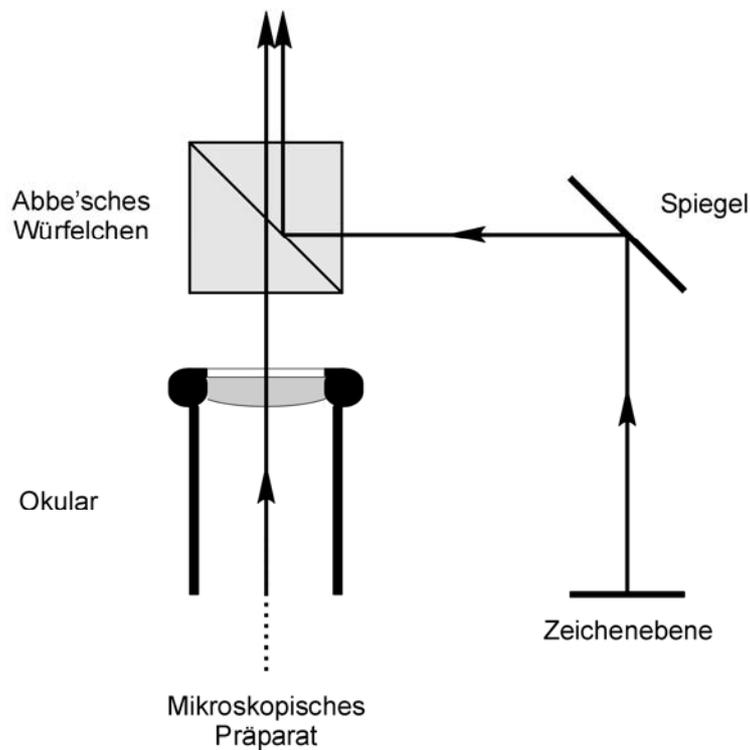


Abb. III.2: Zeichensapparat nach Abbe. Dargestellt ist der jeweilige Strahlengang ausgehend vom mikroskopischen Präparat sowie ausgehend von der Zeichenebene.

Das Abbe'sche Würfelchen ist in der Lage, die doppelte Ablenkung bei der Sichtbarmachung des Zeichenpapiers in zwei räumlich weit auseinander liegende Ablenkungen aufzutrennen. Diese Eigenschaft erlaubt auch auf horizontaler Zeichenfläche ein verzerrungsfreies Nachzeichnen der mikroskopierten Strukturen, wenn sowohl das mikroskopische Präparat als auch die Zeichenebene scharf eingestellt sind. Darin liegt der Vorteil im Vergleich zur Camera lucida, bei der die Zeichenfläche schräg stehen muss.

Zur Helligkeitsabstufung des Mikroskopbildes wurden verschiedene Graugläser in den Strahlengang eingeschaltet.

III.6.2.2 Bestimmung von Maßstab und Größe

Um spätere Aussagen zur Größe der jeweiligen Neurone machen zu können, wurde der Maßstab der Darstellung bei Verwendung eines 10er Okulars und eines 40er Objektivs bestimmt. Hierzu dienten ein Okularmikrometer und eine Okularmessplatte, mit deren Hilfe der Skalierung des Okularmikrometers eine Größe zugeordnet werden konnte. Damit eine spätere Vergleichbarkeit der einzelnen Zellen gewährleistet werden konnte, wurde bei den Zeichnungen weder Okular noch Objektiv ausgewechselt, so dass der Aufbau immer demjenigen bei der Maßstabsbestimmung entsprach.

Aus den rund 120 Abbildungen wurden die 12 Prototypen der in dieser Arbeit definierten Klassen von Neuronen ausgewählt, die im Folgenden mit verschiedenen Methoden tiefer gehend ausgewertet wurden (s. u.). Dabei kamen die beiden großen Vorteile der Camera lucida-Methode zum Tragen: Die aus dieser einfachen und schnellen Methode resultierenden Zeichnungen eigneten sich sehr gut, um weitere Untersuchungen ohne großen Aufwand daran vorzunehmen.

III.6.3 Verteilung der verschiedenen Typen

Um eine Aussage über die prozentuale Verteilung der einzelnen NADPHd-positiven Neuronen-Typen des Putamens treffen zu können, wurde zufällig ein Schnitt pro Gehirn ausgewählt, in dem das gesamte Putamen lichtmikroskopisch untersucht wurde. Alle angefärbten Zellen, die einer morphologischen Kategorisierung zugänglich waren (n=502), wurden einer der neu definierten Klassen zugeordnet. Bezogen auf diese 502 ausgewerteten Neurone wurde der relative Anteil der einzelnen Subtypen bestimmt.

III.6.4 Sholl-Analyse

Zur weiteren Differenzierung der Prototypen wurde nach der Methode von Sholl [325] vorgegangen. Zunächst wurden zwei Raster erstellt: Eines, um die Auswertung vorzunehmen, das zweite, um die Ergebnisse dieser Auswertung festzuhalten. Das erste Raster bestand aus konzentrischen Kreisen, deren Radien sich – analog zum Maßstab der Camera lucida-Zeichnungen – entsprechend um 25 µm unterschieden. Diesem ähnlich bestand das zweite Raster jedoch nicht aus konzentrischen Kreisen, sondern aus parallelen Linien mit identischem Abstand. Für die Auswertung wurde das Kreisraster

so über die Neuronen-Darstellungen projiziert, dass der Mittelpunkt des Somas mit dem des Rasters übereinstimmte. Von diesem Mittelpunkt aus wurden die Entfernungen der Verzweigungspunkte und der weitesten Ausdehnung der Dendriten vom Mittelpunkt bestimmt, welche aufgrund des verschlungenen Verlaufes nicht immer mit den Endpunkten der einzelnen Dendriten übereinstimmten. Diese Bezugspunkte wurden in das Linien-Raster übertragen und gemäß dem Verzweigungsmuster miteinander verbunden. Auf diese Weise entstand eine übersichtliche Darstellung der einzelnen Dendritenbäume, deren Verzweigungsmuster und Ausdehnung.

Diese graphische Darstellung der Dendriten wurde darüber hinaus noch weiter analysiert, indem die Anzahl der vorhandenen Dendritenäste, Endpunkte und Verzweigungspunkte in ebenfalls jeweils 25 μm breiten, konzentrisch verlaufenden Bereichen bestimmt wurde. Bei der Zählung der Segmente wurde der jeweilige Ast nur einmal berücksichtigt, auch wenn dieser aufgrund seines gewundenen Verlaufes mehrfach in der untersuchten Zone angetroffen werden konnte. Die Anzahl des jeweiligen Parameters wurde gegen die Entfernung in einem Punkte-Diagramm aufgetragen.

III.6.5 Topologische Analyse

Als weitere Möglichkeit, Neurone genauer zu analysieren, kam die topologische Analyse [348,349,353-355,359-361] bei den prototypischen Neuronen zur Anwendung. Mit ihrer Hilfe konnte den bisher vorwiegend morphologischen Unterscheidungskriterien der Dendritenbäume ein Zahlenwert zugeordnet werden, d. h. dass durch diese Methode nur die mathematische Form, aber nicht die absolute Größe der untersuchten Objekte von Interesse ist.

III.6.5.1 Klassifikation der Dendritenbäume

Als Ausgangspunkt dieses Verfahrens wurden die einzelnen Dendritenbäume der Neurone, die jeweils von den Hauptdendriten und deren Verzweigungen gebildet werden, klassifiziert. Dieser Einordnung lag das System von Verwer und van Pelt [354,359] zugrunde, das zum einen die Segmente, die sich zwischen zwei Verzweigungspunkten befinden, und zum anderen die Verzweigungs- und Endpunkte

einer bestimmten Ordnung zuteilt. Gemäß dieser Vorgehensweise erhielten diejenigen Parameter, die sich zentrumsnah befanden, die mit 0 niedrigste Ordnung. Ausgehend vom Zentrum erhöhte sich die Ordnung der Segmente nach jedem Verzweigungspunkt um 1. Analog dazu nahm die Ordnung der Verzweigungspunkte nach zentrifugal zu. Die Ordnung der Endpunkte orientierte sich an derjenigen der Verzweigungspunkte. Jeder Endpunkt hat eine um 1 höhere Ordnung als die ihm vorangehende Abzweigung (Abb. III.3).

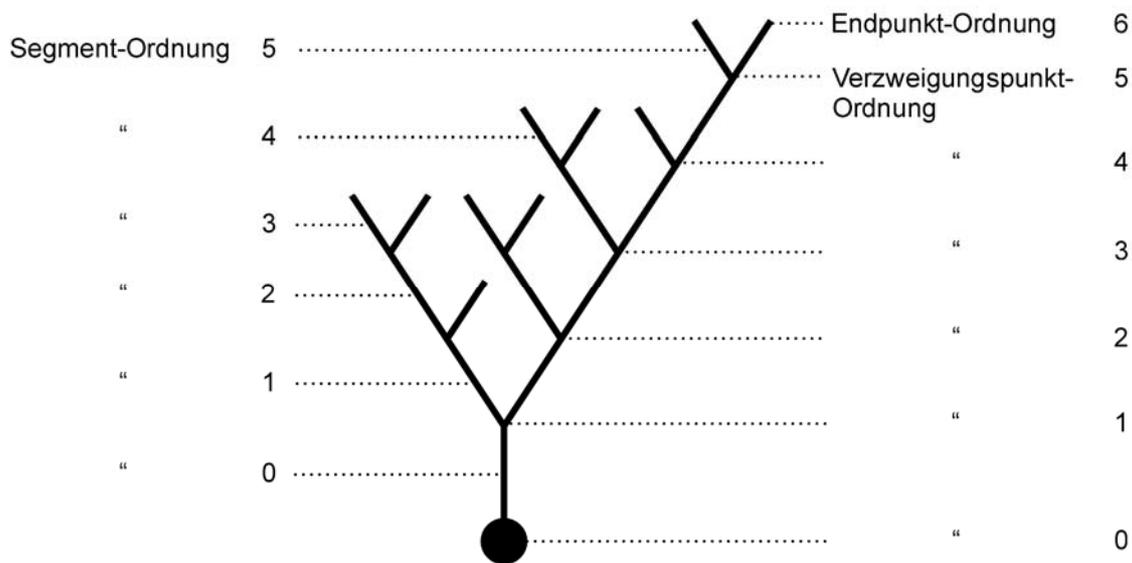


Abb. III.3: Systematische Gliederung eines Dendritenbaumes. Zuteilung der Verzweigungs- und Endpunkte sowie der Segmente zu einer bestimmten Ordnung nach [359].

Für diesen Dendritenbaum gilt: $n = 10$, $n_s = 19$, $C = 54$, $\bar{C} = 2.84$, $p = 70$, $\bar{p} = 3.84$, $p_e = 43$, $n(r,s) = 10 (3,7)$, Verzweigungsmuster: $10 (3 7(2 5(2 3)))$

Die Anzahl der Endpunkte wurde außerdem zur Definition des Grades n des Dendritenbaumes herangezogen. Daraus ließ sich mit

$$n_s = 2n - 1$$

die Anzahl der Segmente n_s berechnen.

Die vom ersten Zweiteilungspunkt des Dendriten ausgehenden Unterbäume ließen sich anhand der Anzahl ihrer Endpunkte, also anhand ihres Grades, unterscheiden. Der kleinere der beiden wurde mit r , der größere mit s gekennzeichnet.

Auf diese Weise konnten alle Unterbäume, die aus einem Verzweigungspunkt hervorgingen, und somit das Verzweigungsmuster eines Dendriten mit Zahlen beschrieben werden.

Ausgehend von dieser Systematisierung ließen sich verschiedene Parameter festlegen:

III.6.5.2 Summe der Segment-Ordnungen C

Wie der Name bereits sagt, wurden hierfür die Zahlenwerte der einzelnen Segment-Ordnungen addiert. Dividiert durch die Anzahl der Segmente des zugehörigen Baumes ergab sich als Mittelwert \bar{C} .

III.6.5.3 Summenweglängen von Verzweigungs- und Endpunkten p und p_e

Im Gegensatz zu C wurden bei der Bestimmung von p nicht die Segment-Ordnungen, sondern die Ordnungen der Verzweigungs- und Endpunkte addiert. Der Unterschied zu p_e beruhte darin, dass bei p_e nur die Endpunkt-Ordnungen berücksichtigt wurden. Analog zu \bar{C} wurde der Mittelwert von \bar{p} durch Division durch die Anzahl der Segmente bestimmt. Für die Beziehung von \bar{C} zu \bar{p} gilt:

$$\bar{C} = \bar{p} - 1$$

III.6.5.4 Topologischer Durchmesser D

Um diesen festzulegen, wurde die vorhandene Anzahl der von den Segmenten durchschrittenen Ordnungen gezählt. Anhand des topologischen Durchmessers ließen sich nicht nur Rückschlüsse auf die Menge der vorhandenen Verzweigungen schließen, sondern auch auf die Asymmetrie, da symmetrische Aufzweigungsmuster bei gleichem Grad n nicht so hohe Ordnungen erreichen wie asymmetrische.

III.6.5.5 PSAD-Werte als Maß der Asymmetrie

Darüber hinaus lässt sich als Maß für die Asymmetrie einem definierten Aufzweigungspunkt der so genannte *PSAD* (*proportional sum of absolute deviations*) berechnen. Für aus zwei Untereinheiten bestehenden Dendritenbäume gilt:

$$PSAD = (n - 2r)/(n - 2)$$

Der *PSAD* kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei der Wert 1 das Verzweigungsmuster mit der größten Asymmetrie und der Wert 0 das mit der größten Symmetrie darstellt.



Abb. III.4: Baumsymmetrie. Abbildung A zeigt einen Dendritenbaum höchster Symmetrie, dem ein *PSAD*-Wert von 0 zuzuordnen ist. Abbildung B dagegen stellt einen sich asymmetrisch verzweigenden Dendritenbaum dar, der einen *PSAD*-Wert von 1 besitzt.

Dementsprechend konnte die Asymmetrie eines gesamten Baumes dadurch bestimmt werden, dass an allen Verzweigungspunkten, die $n > 3$ Endpunkte nach sich ziehen, der jeweilige *PSAD* und aus den so erhaltenen Zahlenwerten der Mittelwert (\overline{PSAD}) berechnet wurde.

Um nun den *PSAD* des Somas bestimmen zu können, wurde das Soma als multipler Aufzweigungspunkt betrachtet. Dies bedeutete, dass nicht wie bisher nur zwei Unterbäume ihren Ursprung von diesem Punkt nahmen, sondern mehrere. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, kam folgende Formel zur Anwendung:

$$PSAD = \left[\frac{m}{2(m-1)(n-m)} \right] \sum_{i=1}^m [r_i - (n/m)]$$

wobei m der Anzahl der Unterbäume, r_i dem Grad des i ten Unterbaumes und n , wie bereits erwähnt, der Anzahl der Endpunkte entsprechen. Der $PSAD_{Soma}$ gibt somit an, ob an diesem multiplen Verzweigungspunkt – in diesem Fall also dem Soma – eine symmetrische oder asymmetrische Aufteilung stattfindet.

Aus den *PSAD*-Werten der einzelnen Unterbäume und des Somas ließ sich als Mittelwert der \overline{PSAD}_{total} bestimmen. Damit wird der Asymmetrie des kompletten Neurons ein Zahlenwert zugeordnet.

III.6.6 Zelldichte

Als Grundlage für die Bestimmung der Zelldichte diente ein Objektmikrometer, d. h. ein mit Maßstab versehener Objektträger, mit dessen Hilfe der Durchmesser eines Gesichtsfeldes bestimmt wurde. An einem Mikroskop der Nf-Reihe von Carl Zeiss ergab sich bei Verwendung eines 10/0.22 Objektivs in Kombination eines 10x/18L-Okulares ein Durchmesser von 1,633 mm. Daraus ließ sich die Fläche eines Gesichtsfeldes berechnen, die 2,094 mm² betrug. Unter Berücksichtigung der Schnittdicke von 75 µm ergab sich ein Volumen von 0,157 mm³. Diese Angaben machten die Berechnung der Zellzahl pro mm² und mm³ möglich. Gezählt wurden jeweils alle in einem Gesichtsfeld sichtbaren Somata, wobei für jeden Schnitt zehn Gesichtsfelder ausgewertet wurden, die sich sowohl in den Rand- als auch in den zentralen Anteilen des Putamens befanden. Die Auswahl dieser Felder erfolgte makroskopisch, um eine möglichst repräsentative Aussage zur Zelldichte zu treffen. Die verwendeten 25 Schnitte der schizophrenen Gruppe und 22 Schnitte der gesunden Vergleichsgruppe stammten aus unterschiedlichen Bereichen des Putamens, um eventuelle Unterschiede in der Dichte der NADPHd-positiven Neurone zwischen rostralen und kaudalen Anteilen feststellen zu können.

IV. Ergebnisse

IV.1 Qualität der Färbung

Aufgrund der ausgezeichneten, homogenen Anfärbung von Soma und Dendritenbaum NADPHd-positiver Neurone in allen in dieser Studie verwendeten Gehirnen war es möglich, die einzelnen Zellen anhand der im Methodenteil erwähnten morphologischen Kriterien zu unterscheiden und sie mit weitergehenden Analyseverfahren genauer zu untersuchen.

Für die Qualität der Färbung spielte weder die *post mortem*-Zeit, die bis zu 72 Stunden betragen hatte, noch das Alter oder sonstige intervenierenden Variablen eine Rolle. Gehirne jedoch, die länger als fünf Jahre in ungepuffertem Formalin fixiert worden waren, wiesen trotz verschiedener Optimierungsversuche (siehe Kap. III.5.3) keinerlei Enzymaktivität im verwendeten Färbeansatz auf: Supra-optimale Konzentrationen der Enzym-Substrate konnten ebenso wenig wie der Zusatz von Malonsäure oder der Einsatz von Mikrowellenstrahlung daran etwas ändern. Eine Lagerungsdauer von weniger als 50 Monaten schien dagegen keinen negativen Effekt auf die Funktionsfähigkeit der NADPH-Diaphorase zu haben. Für die vorliegende Arbeit wurden deshalb lediglich Gehirne mit einer Lagerungsdauer von weniger als 50 Monaten verwendet.

Wenn auch die Anfärbung von Neuronen in allen untersuchten Gehirnen von gleich bleibender Qualität war, so traf dies nicht auf die Hintergrundfärbung zu. Sie unterschied sich sowohl in ihrem Farbton als auch in ihrer Intensität, was in Abbildung IV.14 (S. 58/59) deutlich zum Ausdruck kommt. Dabei zeigten Schnitte ein und desselben Gehirns ein variables Färbeverhalten, ohne dass dadurch allerdings die Untersuchungen beeinträchtigt wurden.

Alle in diesem Kapitel gezeigten Neuronen-Abbildungen entsprechen – soweit nicht anders beschrieben – Camera lucida-Zeichnungen.

IV.2 NADPHd-positive Neurone des Putamens Gesunder

Im Gegensatz zur Golgi-Imprägnation kamen im hier angewandten NBT-basierten enzymhistochemischen Verfahren nur Interneurone und große mutmaßliche Projektionsneurone, wie sie von Leontovich [221] beschrieben wurden, zur Darstellung. Eine positive Anfärbung von mittelgroßen Projektionsneuronen oder *dwarf cells* [47] konnte nicht beobachtet werden.

Innerhalb des Putamens zeigten NADPHd-positive Neurone bezüglich ihrer Häufigkeit eine gleichmäßige Verteilung von rostral nach kaudal. Sie neigten jedoch zur Cluster-Bildung, was in Übereinstimmung zu ihrer Lokalisation bezüglich der Striosomen zu sehen ist.

Die NADPHd-positiven Interneurone konnten auf der Grundlage morphologischer Kriterien in 12 unterschiedliche Typen (NADPHd I bis NADPHd XII) eingeteilt werden (Tab. IV.1 und Abb. IV.1). In diesen Zelltypen fanden sich nicht nur alle von anderen Autoren bereits beschriebenen Klassen wieder [47,144,189,221,381,383], sondern auch neue, bisher nicht beschriebene.

Ergebnisse

Typ	Soma- größe, - form	Dendriten			Größe des Den- driten- baumes [µm]	Symmetrie	Zuordnung bei: Braak Graveland Leontovich
		Zahl	Form	Ver- zweigungs grad			
I	Mittelgroß groß, halbmond- förmig	4-6	Geschlängelt, mitteldick	Niedrig	300	Asymmetrisch	Typ II - -
II	Groß, gestreckt	3-4	Geschlängelt, dick	Früh und wiederholt	500 – 600	Bipolar	- - <i>Giant stretched</i>
III	Groß, oval – polygonal	2-3	Dick	Spät, niedrig	500	Asymmetrisch	Typ III <i>Spiny II</i> <i>Giant reticular</i>
IV	Groß, rund	Viele	Dünn	Niedrig	300	Symmetrisch rund	Typ IV - <i>Giant hairy (?)</i>
V	Groß, ellipsoid	Ca. 6	Dicke Stämme	Früh, mittel – hoch	250	Symmetrisch rund	- - -
VI	Mittelgroß, rund	Ca. 4	Leicht geschlängelt, dicke Stämme	Früh, mittel	250	Symmetrisch rund	Typ V - -
VII	Mittelgroß, oval – rund	4-6	Dünn, geradlinig	Mittel	250	Asymmetrisch	Typ V - -
IIIX	Mittelgroß, oval	2	Dünn, lang	Zwei symmetrische Äste	350	Bipolar	- <i>Small neuron</i> -
IX	Mittelgroß, oval	2	Mitteldick, lang	Zwei symmetrische Äste	250	Bipolar	- <i>Small neuron</i> -
X	Mittelgroß, dreieckig	4-5	Unterschied- licher Durchmesser, geradlinig	Niedrig	400	Asymmetrisch	- - <i>Large reticular</i>
XI	Mittelgroß, rund	> 6	Mittel – dünn, z.T. geschlängelt	Mittel	400	Symmetrisch rund	- - -
XII	Mittelgroß – groß, tränenförmig	6	Leicht geschlängelt	Niedrig	300	symmetrisch	- - -

Tab. IV.1: Übersicht NADPHd-positiver Interneurone des menschlichen Putamens. Neben der Beschreibung der morphologischen Kriterien wurde der Vergleich zu früheren Klassifikationen von Braak [47], Graveland [144] und Leontovich [221] gezogen.

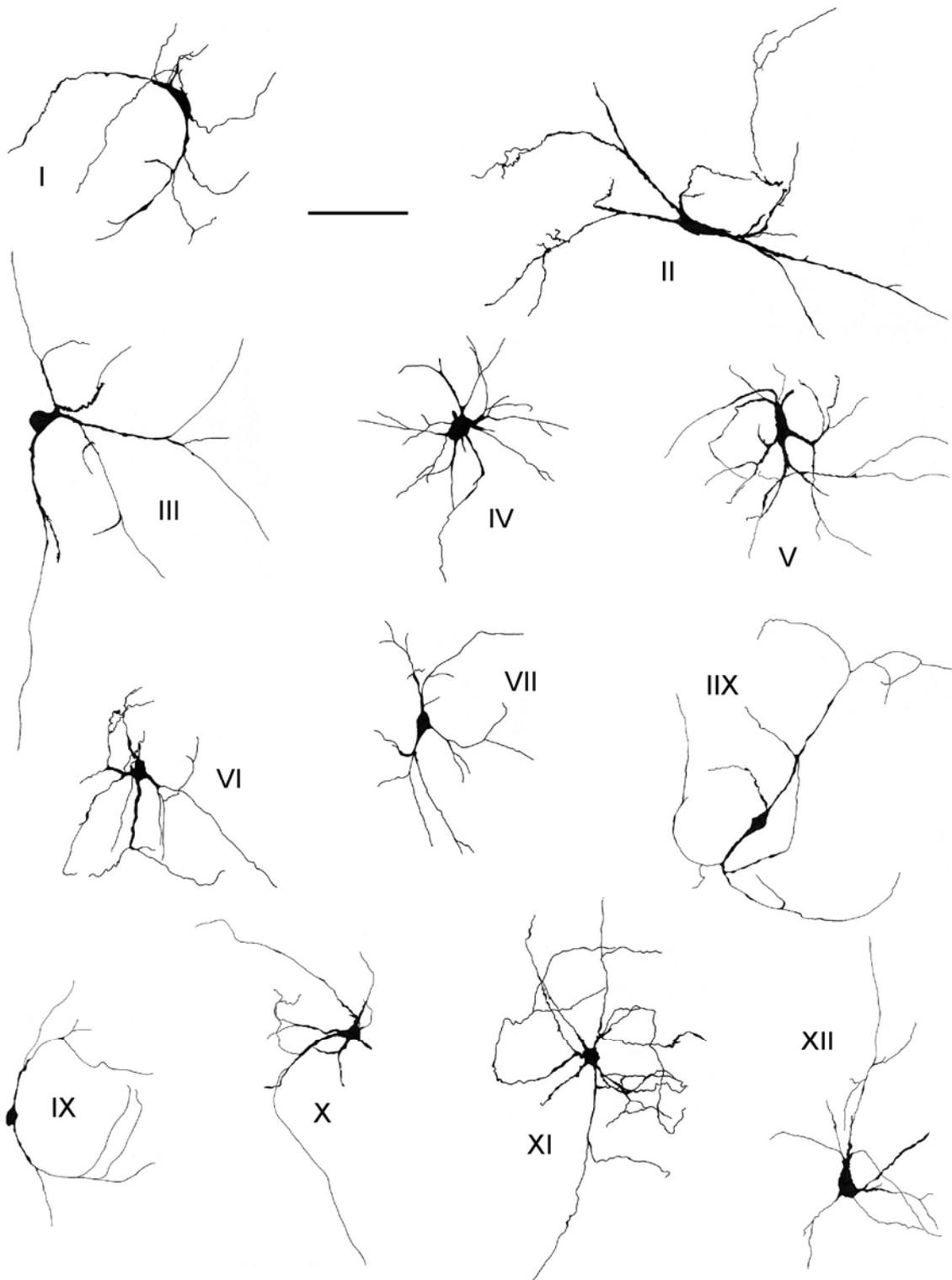


Abb. IV.1: Prototypische NADPHd-positive Interneurone des menschlichen Putamens. Die Klassifikation erfolgte anhand morphologischer Kriterien (siehe Text). Der Balken entspricht 100 μ m.

IV.2.1 Morphologie

IV.2.1.1 NADPHd I

Als markantestes Merkmal der NADPHd I-Neurone (Abb. IV.2) erscheint das lange, bogenförmig gekrümmte Soma, von dessen Polen nur wenige, relativ dicke Dendritenstämme entspringen. Diese Dendritenstämme setzen in ihrem Verlauf die Krümmung des Somas fort. Sie verzweigen sich vergleichsweise selten und zeigen vor allem in untergeordneten Abschnitten einen geschlängelten Verlauf. Als weiteres Charakteristikum dieses Neuronentyps sind häufig somatische *spines* zu finden. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten [307] als Hinweis darauf zu werten, dass NOS-I auch an der subsynaptischen Membran vorhanden ist. Aufgrund dieser morphologischen Parameter scheinen NADPHd I-Neurone den Typ II Neuronen nach Braak [47] zu entsprechen (Tab. IV.1).

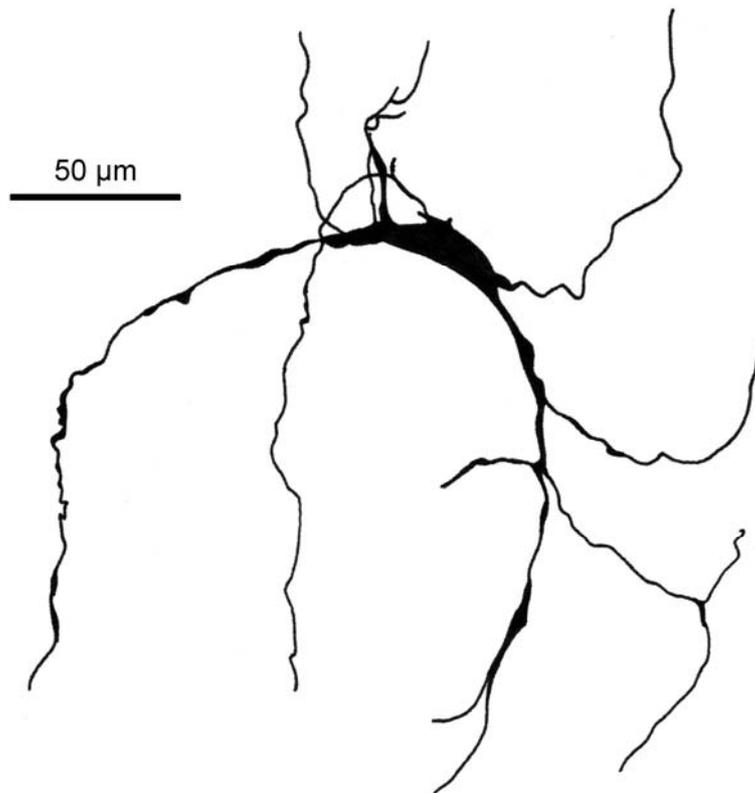


Abb. IV.2: NADPHd I.

IV.2.2 NADPHd II

NADPHd II-Neurone gehören zu den striatalen Neuronen mit der größten Ausdehnung, was in Abbildung IV.3 gut zum Ausdruck kommt. Auch sie besitzen ein gestrecktes, bipolares Soma, an dessen Polen wenige, aber dickere Dendritenstämme als bei NADPHd I-Neuronen ihren Ursprung haben. Damit ähneln sie den *giant stretched cells* von Leontovich [221]. Der Durchmesser der Dendriten nimmt kontinuierlich mit zunehmender Entfernung vom Soma ab, wobei sie insgesamt gerader verlaufen als die Dendriten der NADPHd I-Neurone, wenngleich in entfernteren, dünneren Ästen auch geschlängelte Strecken vorhanden sind. In ihren Anfangsabschnitten zeigen die Dendriten eine ungleichmäßige Oberfläche, die sie aber im weiteren Verlauf verlieren.



IV.2.1.3 NADPHd III

Im Unterschied zu den beiden ersten Neuronentypen mit länglichem Perikaryon weisen NADPHd III-Neurone ein großes ovales oder polygonales Soma auf. Sehr wenige Dendriten verlassen an entgegengesetzten Seiten als dicke Stämme den Zellkörper. In unterschiedlichen Abständen finden sich die ersten Verzweigungspunkte, an denen sich der Durchmesser des Dendriten verringert. Insgesamt verzweigen sich die Dendriten dieses Typs selten und verlaufen relativ geradlinig in viele verschiedene Richtungen. Daraus resultiert ein ausgedehnter, aber nicht sehr dichter Dendritenbaum (Abb. IV.4). Ähnlich den NADPHd II-Neuronen besitzen die Dendriten zu Beginn eine sehr ungleichmäßige Oberfläche. Alle diese Charakteristika lassen eine Zuordnung zu den Typ II-Zellen von Braak [47] bzw. den *giant reticular cells* von Leontovich zu [221] (Tab. IV.1).

NADPHd II- und III- Neurone besitzen die ausgedehntesten Dendritenbäume unter allen der in dieser Arbeit definierten Klassen.



IV.2.1.4 NADPHd IV

Das, was NADPHd IV-Neurone unter allen anderen NADPHd-positiven Interneuronen hervorhebt, ist die Anzahl der vom Soma abgehenden Dendriten. Diese wird von keinem anderen NADPHd-positiven Neuronentyp erreicht (Abb. IV.5). Ebenso auffällig zeigt sich das große runde Soma. Die Abgänge der zahlreichen Dendriten liegen gleichmäßig über das gesamte Soma verteilt, so dass keine Polarität zu erkennen ist. Die Dendriten entspringen teils als dünne, teils als dicke kurze Stämme, aus denen in direkter Nachbarschaft zum Soma dünne Äste hervorgehen. Alle verlaufen geradlinig radiär in alle Richtungen, ohne sich häufig zu überkreuzen, und enden schon nach vergleichsweise kurzem Verlauf. Obwohl NADPHd IV-Neurone nicht zu den Typen mit den häufigsten Aufzweigungen gehören, formen sie doch aufgrund der Menge der Dendriten einen dichten Dendritenbaum, der durch die Kürze der Dendriten nur eine relativ geringe Fläche überdeckt.

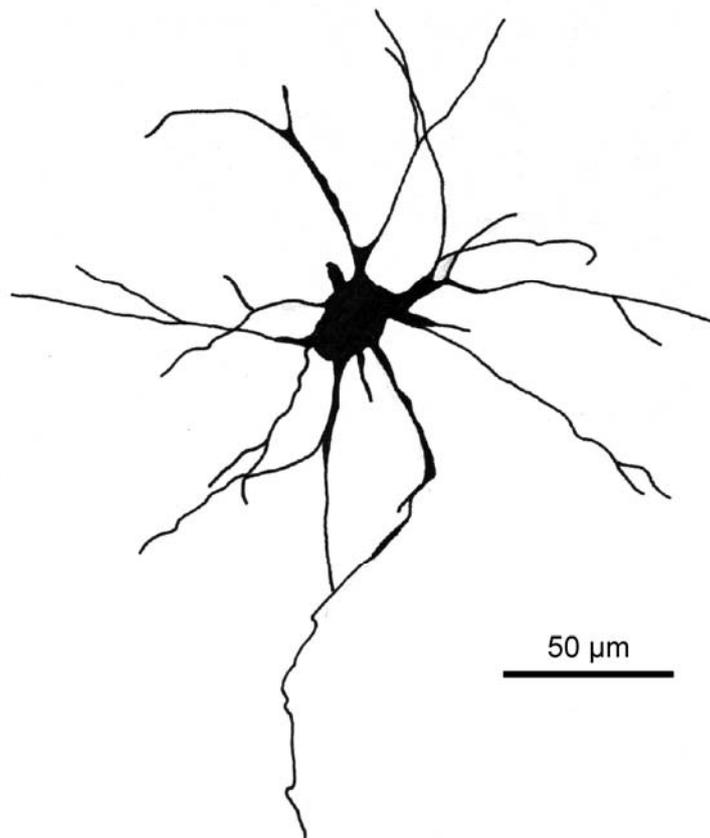


Abb. IV.5: NADPHd IV.

IV.2.1.5 NADPHd V

NADPHd V-Neurone zeichnen sich durch ein schlankes, ellipsoid geformtes Soma aus, wie es in Abbildung IV.6 dargestellt ist. Von diesem nehmen mehrere lange, dicke Dendritenstämme ihren Ursprung, die sich im Vergleich zu NADPHd IV-Neuronen erst spät verzweigen. Die daraus hervorgehenden Äste teilen sich häufiger und verfolgen einen gewundenen Verlauf, der viele gegenseitige Überkreuzungen und einen relativ dichten Dendritenbaum bedingt. Interneurone dieses Typs wurden bisher nicht beschrieben.

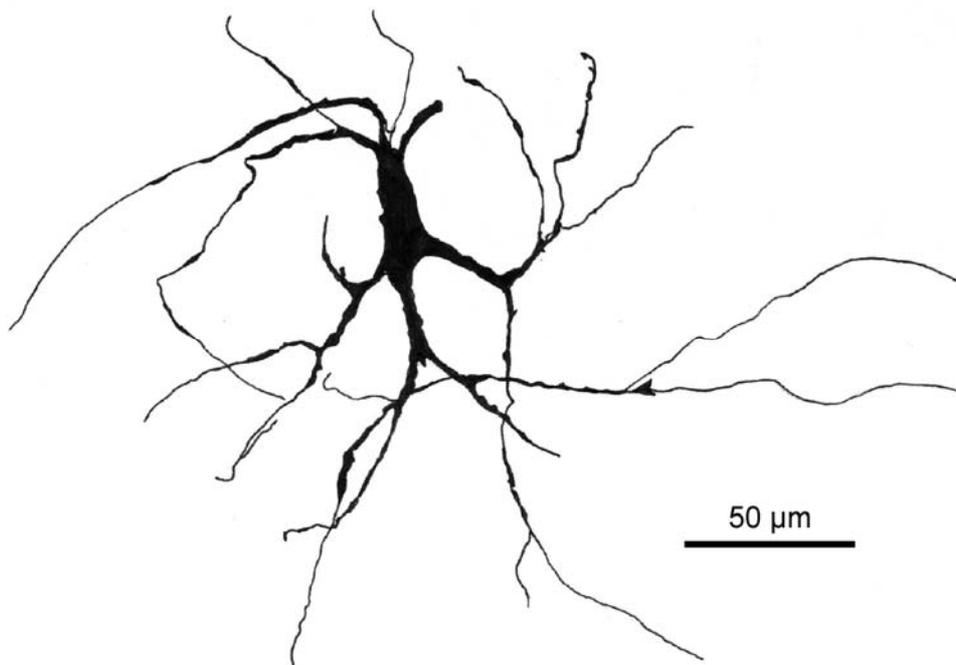


Abb. IV.6: NADPHd V.

IV.2.1.6 NADPHd VI

Die Dendriten von NADPHd VI-Neuronen entspringen als dicke Stämme, die ihren Durchmesser bis zur ersten Verzweigung beibehalten. Der erste Aufzweigungspunkt befindet sich bei diesem Neuronentyp zum Teil in weiter Entfernung, zum Teil in direkter Nachbarschaft zum rundlichen Soma. Die daraus entstehenden sekundären Äste sind erheblich dünner als die Ursprungsdendriten und verlassen dessen Verlaufsrichtung. Es ist dadurch nicht ungewöhnlich, wenn einige Endäste den Dendritenbaum wie einen Kreis einrahmen. Häufig sind eng geschlängelte Abschnitte, die die Verlaufsrichtung jedoch nicht ändern. Insgesamt verlaufen die Dendriten daher relativ geradlinig. Ein Neuron dieses Typs ist in Abbildung IV.7 gezeigt.

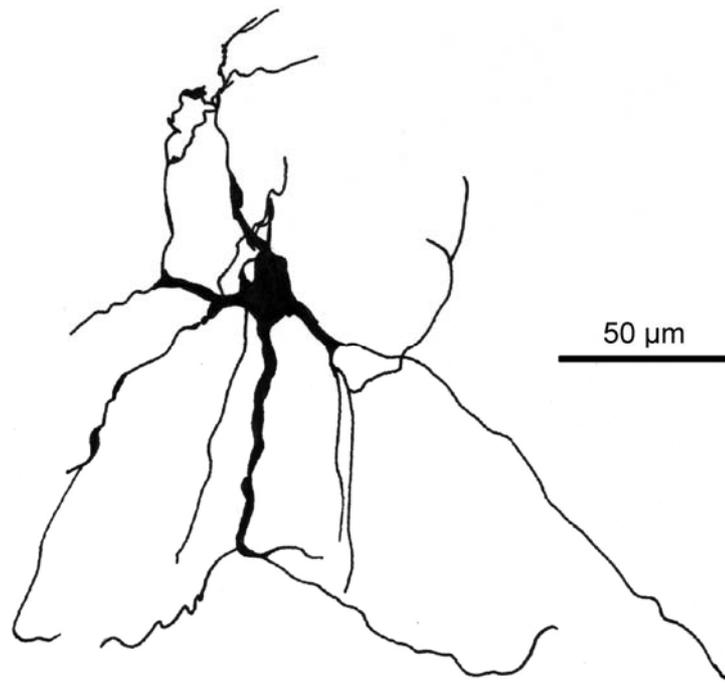


Abb. IV.7: NADPHd VI.

IV.2.1.7 NADPHd VII

Zu einer der häufigsten Untergruppen von Interneuronen im menschlichen Putamen gehören die Neurone des NADPHd VII-Typs. Sie besitzen ein rundes bis ovales Soma, von dem in der Regel drei Dendriten entspringen. Diese sind von Anfang an relativ dünn und zeigen einen ziemlich geradlinigen, eher kurzen Verlauf. Das führt dazu, dass sie sich trotz ihrer häufigen Verzweigungen kaum überschneiden und einen vergleichsweise nur lichten Dendritenbaum ausbilden, wie es in Abbildung IV.8 zu erkennen ist.

Ebenso wie die NADPHd VI-Neurone lassen diese sich im Typ V der Klassifikation nach Braak [47] wieder finden.

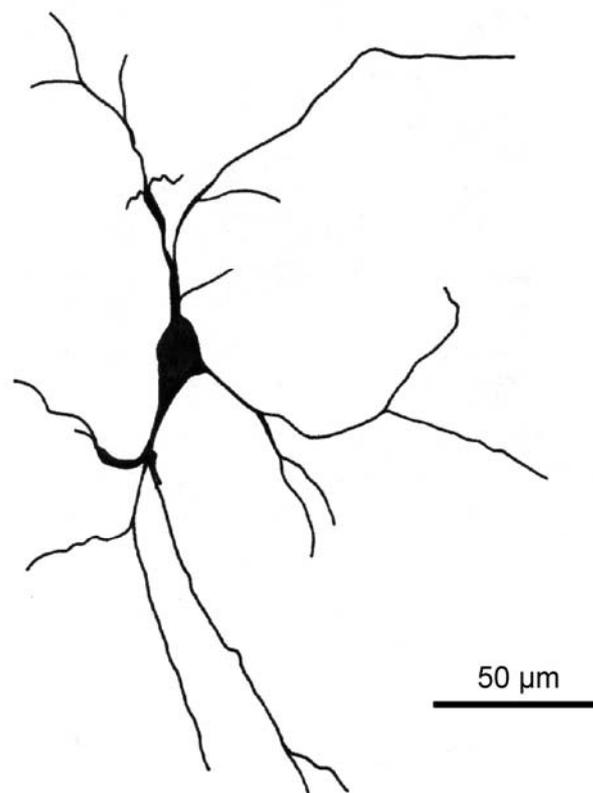


Abb. IV.8: NADPHd VII.

IV.2.1.8 NADPHd IIX

Einen weiteren häufigen Interneuronentyp stellen NADPHd IIX- und IX-Neurone (Abb. IV.9 bzw. IV.10) dar. Beide sind klar bipolar und symmetrisch aufgebaut: Von gegenüberliegenden Polen des Somas nehmen zwei Dendriten ihren Ursprung, die geradlinig in entgegengesetzte Richtungen laufen.

Für NADPHd IIX-Neurone sind ovale bis spindelförmige Somata typisch. Die Stammdendriten verfügen zu Beginn über einen großen Durchmesser. Sie gehen am ersten Aufzweigungspunkt, der sich in einiger Distanz zum Soma befindet, in dünne sekundäre Äste über. Diese wenden sich in ihrem weiteren Verlauf zum Soma zurück, ohne sich häufig zu teilen. Durch ihre hohe Gesamtlänge überdecken die Dendriten ein verhältnismäßig großes Areal.

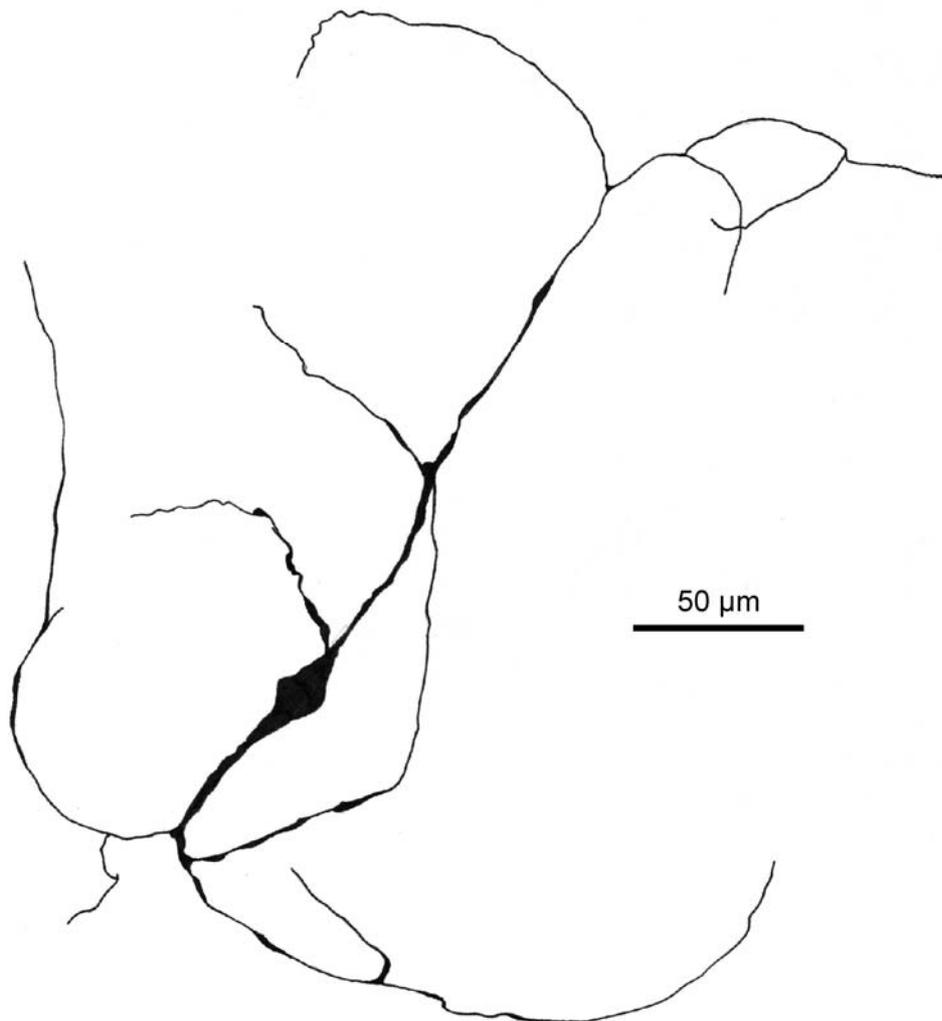


Abb. IV.9: NADPHd IIX.

IV.2.1.9 NADPHd IX

Ähnlich sind NADPHd IX-Neurone charakterisiert. Auch sie besitzen ein ovales Soma und zwei entgegengesetzt abgehende Hauptdendriten. Diese weisen aber geringere Durchmesser auf als diejenigen der NADPHd IIX-Neurone. Weitere Unterschiede liegen in der kleineren Entfernung des ersten Verzweigungspunkt vom Soma und im kleineren Dendritenbaum. Wie bei NADPHd IIX-Neuronen finden sich untergeordnete Äste, die in größerem Bogen Richtung Soma zurücklaufen.

Sowohl NADPHd IIX- als auch IX-Neurone wurden in dieser Form bisher nur von Graveland *et al.* [144] beschrieben. Dort wurden sie den *small neurons* zugeordnet.

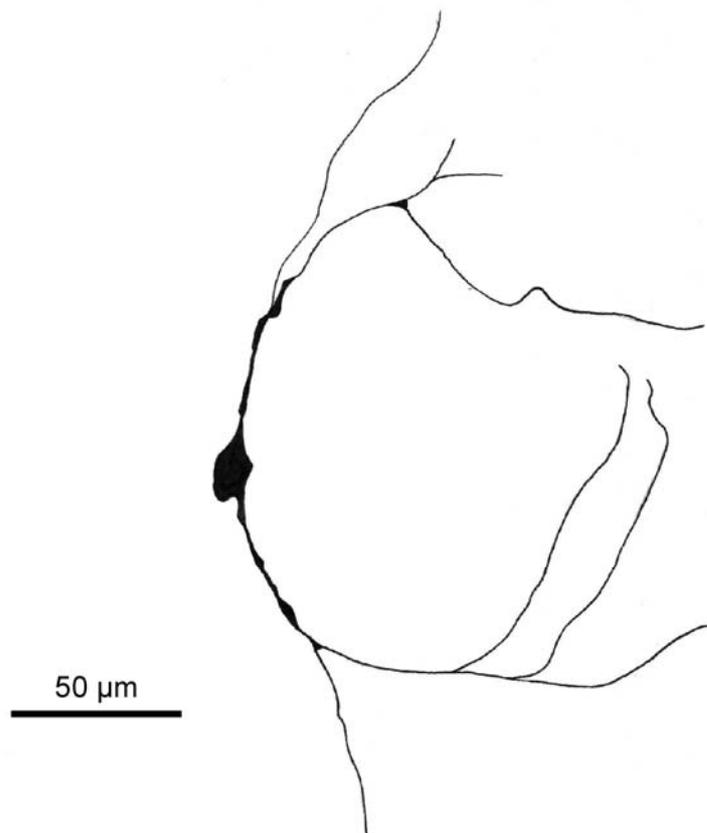


Abb. IV.10: NADPHd IX.

IV.2.1.10 NADPHd X

Signifikant verschieden zu diesen beiden symmetrischen, bipolaren Klassen von Interneuronen erweisen sich NADPHd X-Neurone. Ein Neuron dieses Typs ist in Abbildung IV.11 dargestellt. Sie zeigen einen insgesamt asymmetrischen Aufbau. Vornehmlich von den Ecken des dreieckigen Soma gehen mehrere dicke Dendritenstämme ab, die kontinuierlich an Durchmesser verlieren und einem leicht gewundenen Verlauf folgen. Während einige Dendriten eine beachtliche Länge erreichen, enden die meisten nach kurzer Strecke. Verzweigungen sind eher selten zu sehen. In der Folge entsteht ein nicht sehr dichter, jedoch relativ ausgedehnter Dendritenbaum.

Interneurone dieser Art wurden bisher nicht beschrieben.

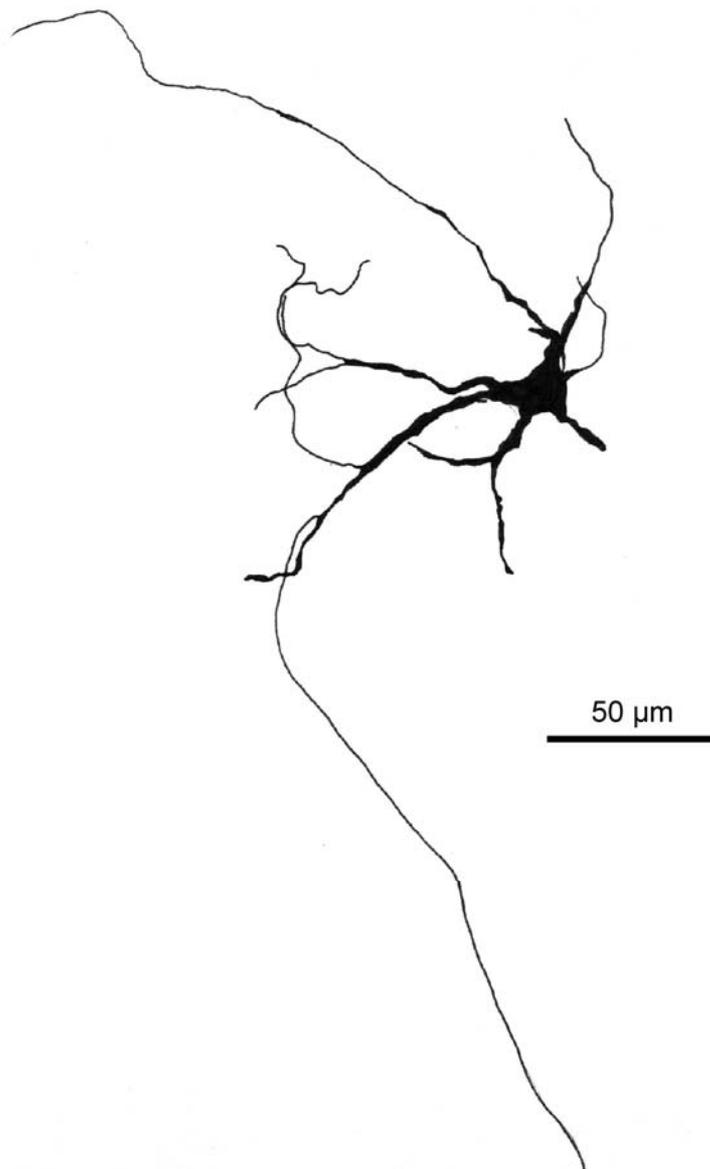


Abb. IV.11: NADPHd X.

IV.2.1.11 NADPHd XI

Ebenso lassen sich NADPHd XI-Neurone zu keiner bekannten Einteilung zuordnen. NADPHd XI-Neurone besitzen einen runden Zellkörper, der Ursprung weniger dicker Dendriten ist. Auch die Anzahl der aus den Stammdendriten hervorgehenden sekundären Äste ist gering. Letztere verzweigen sich allerdings häufiger, so dass insgesamt viele Endäste vorgefunden werden. Einige der längeren Äste verlaufen stark gewunden, einige geradlinig, aber alle Dendriten sind fast durchgehend geschlängelt. Der Dendritenbaum erscheint aufgrund des kurvigen Verlaufes sowie der häufigen Verzweigungen sehr dicht und ist von vielen Überschneidungen gekennzeichnet (Abb. IV.12).

Die Ursprungsorte der Stammdendriten lassen keine bestimmte Anordnung erkennen. Sie befinden sich über den gesamten Zellkörper verteilt und verzweigen sich nicht weit von ihm entfernt.

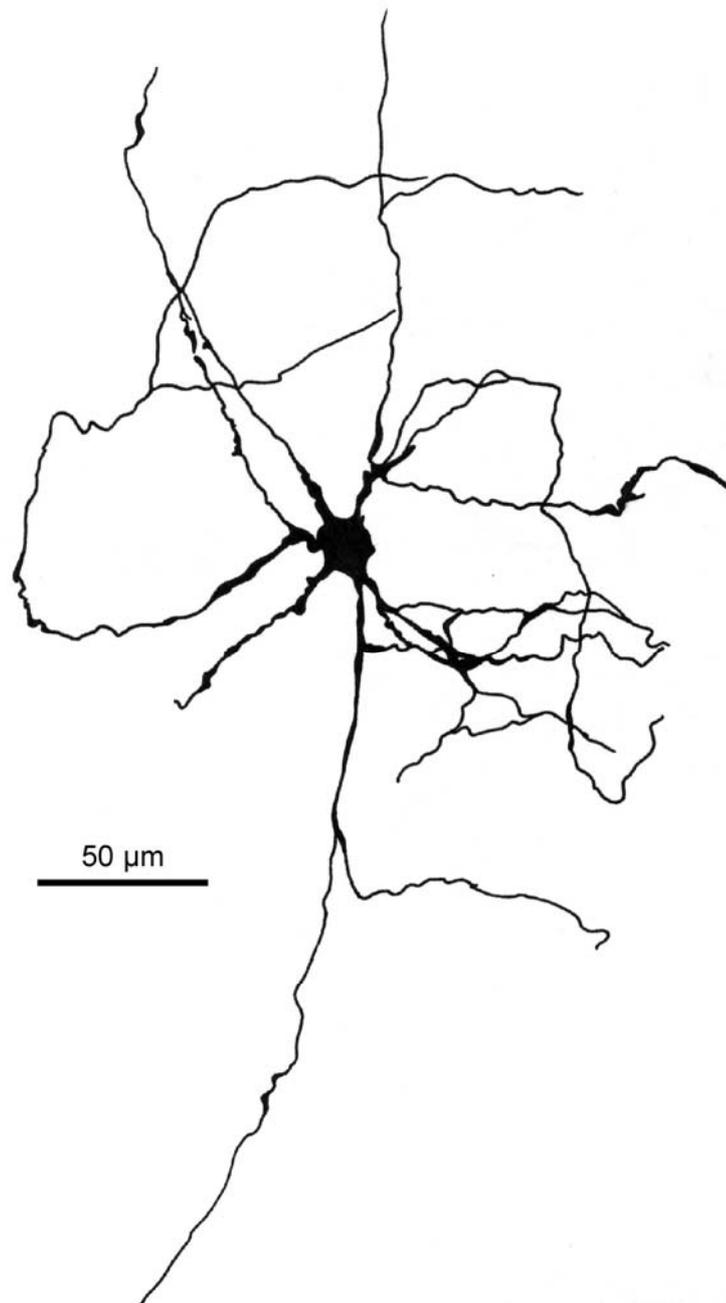


Abb. IV.12: NADPHd XI.

IV.2.1.12 NADPHd XII

Das Soma von NADPHd XII-Neuronen ist groß und tränenförmig. Es dient mehreren Dendriten als Ausgangspunkt, die sich in ihrem Durchmesser erheblich unterscheiden. Gemeinsam ist ihnen jedoch ihr geradliniger Verlauf. Sie verzweigen sich nur selten und bilden daher einen weit weniger dichten Dendritenbaum als NADPHd XI-Neurone. Diese Kombination morphologischer Charakteristika ist mit keinem der bislang definierten Interneuronentypen des menschlichen Striatums in Übereinstimmung zu bringen. Daher scheinen diese Zellen eine eigene Klasse zu bilden. Exemplarisch für diesen Typ steht das Neuron in Abbildung IV.13.

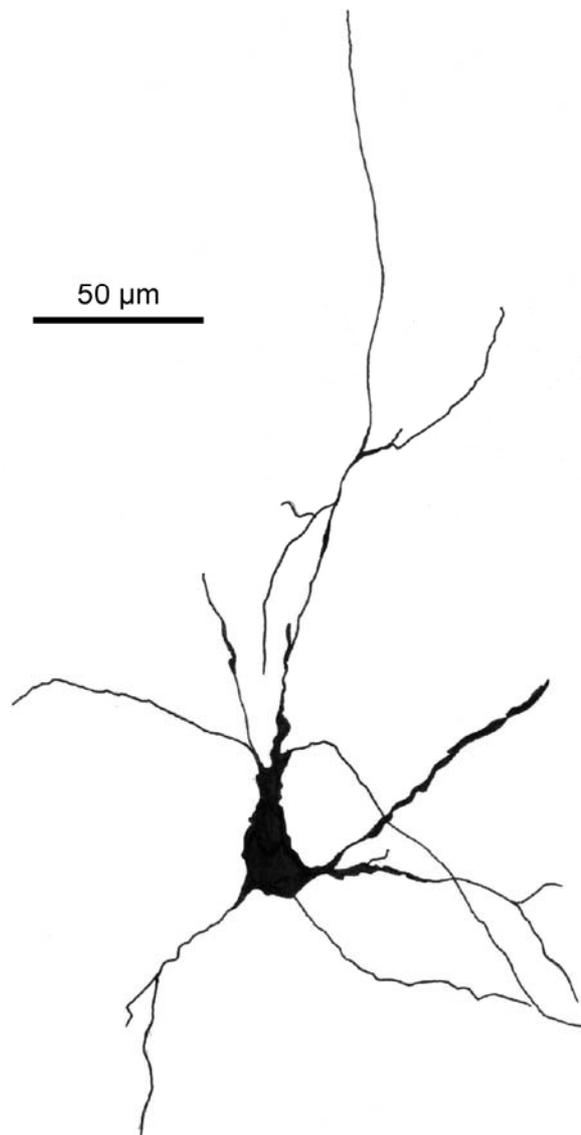


Abb. IV.13: NADPHd XII.

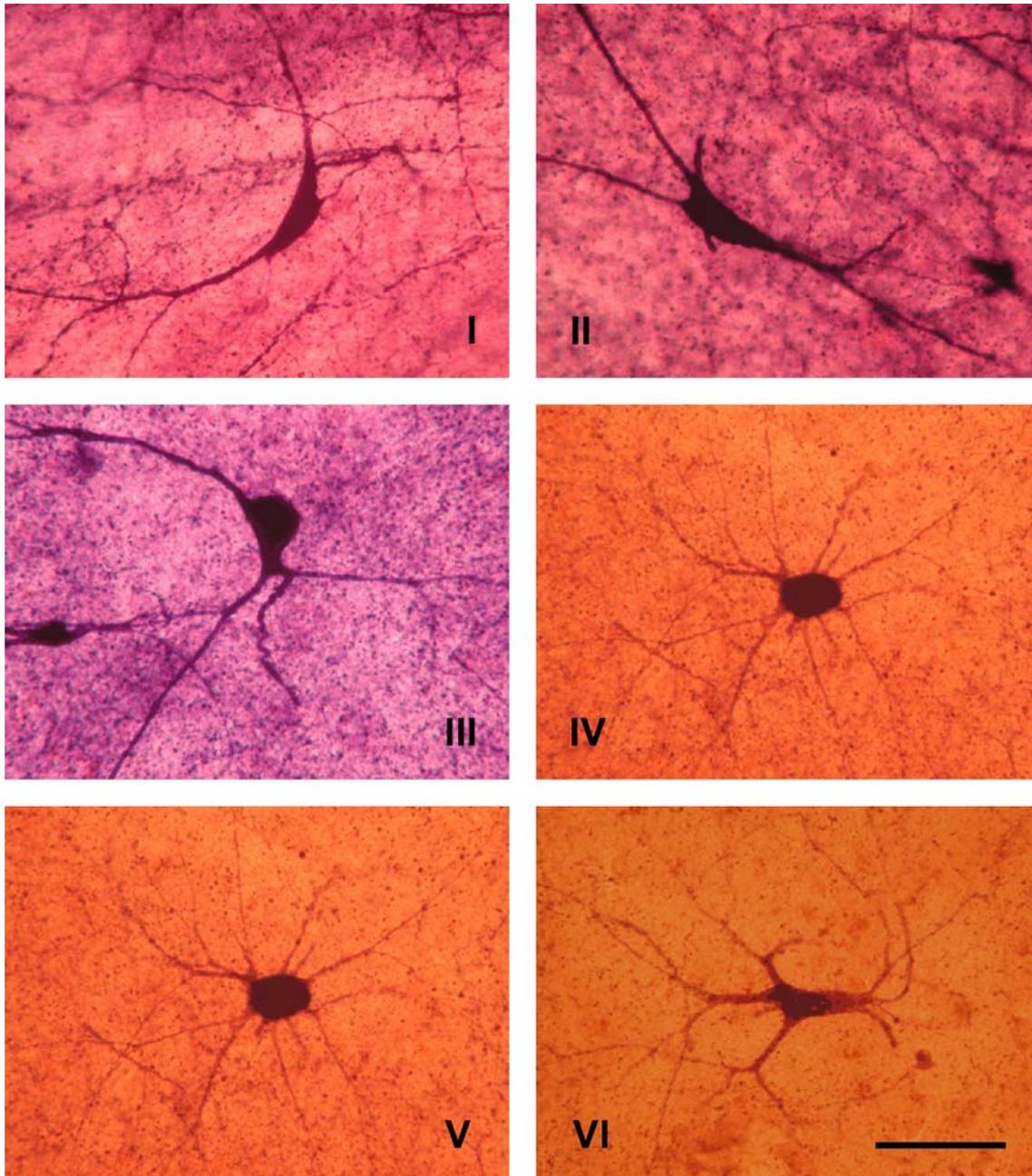


Abb. IV.14: Mikrophotographien der Prototypen NADPHd I bis NADPHd XII. In diesen Photographien ist deutlich der zum Teil erhebliche Unterschied in der Anfärbung des Hintergrundes zu erkennen. Nicht nur der Farbton, sondern auch die Intensität der Hintergrundfärbung variiert von Schnitt zu Schnitt, selbst innerhalb des gleichen Gehirnes. Der Balken entspricht 50 μm .

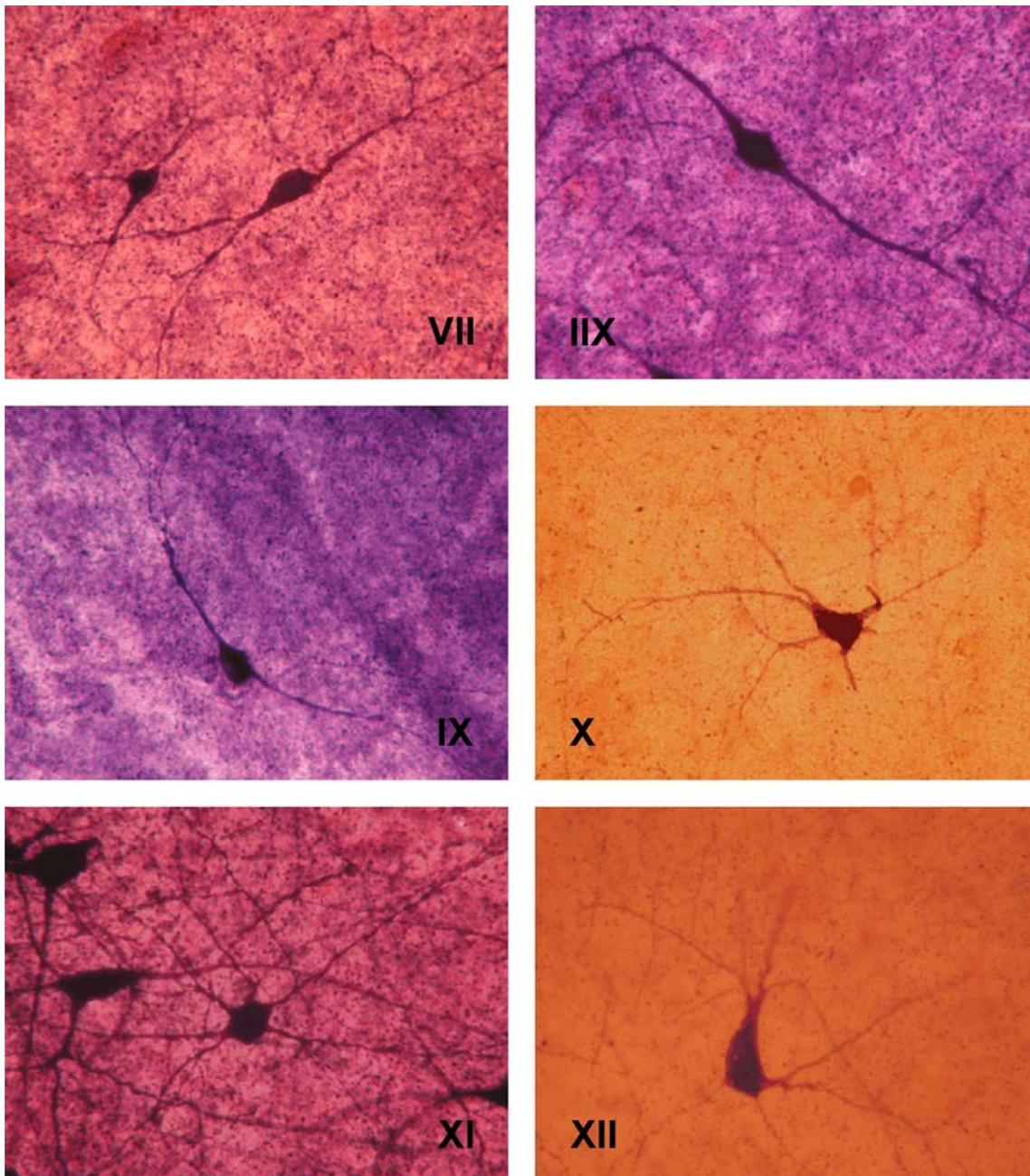


Abb. IV.14: Fortsetzung von Seite 58.

IV.2.2 Sholl-Analyse

IV.2.2.1 Systematische Darstellung der Dendriten im Sholl-Raster

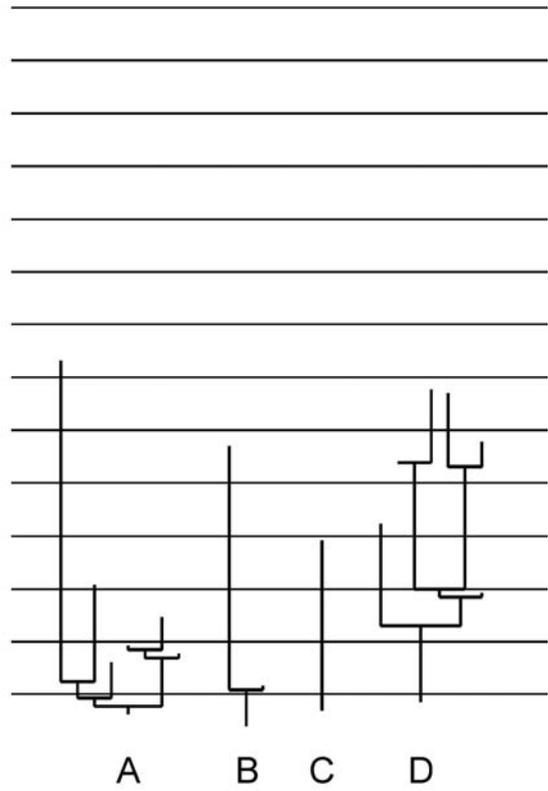
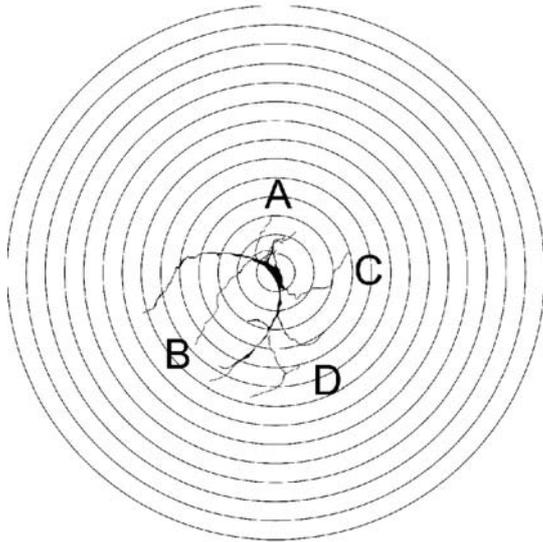
Bei der morphologischen Auswertung der Prototypen wurde klar, dass neben der Form des Somas vor allem der Dendritenbaum für den Unterschied zwischen den einzelnen Prototypen von entscheidender Bedeutung war. Um die Analyse des Dendritenbaums zu vereinfachen und zu objektivieren, wurde das Verfahren nach Sholl angewendet, ein etabliertes Analyseverfahren zur Charakterisierung von Neuronen.

Da in die systematische Darstellung nur die größte Ausdehnung eines Dendriten, dessen Verzweigungspunkte und die dazwischen liegenden Segmente Eingang fanden, wurden die teilweise stark gewundenen Verläufe der einzelnen Äste und Überschneidungen nicht abgebildet. Dies führte dazu, dass die Lokalisation der genannten Parameter leichter erfasst werden konnte. Dies erleichterte nicht nur die Vergleichbarkeit, sondern führte bisweilen dazu, dass Unterschiede hervorgehoben wurden, die bei rein morphologischer Betrachtung kaum auffielen. Besonders deutlich wurde dies – um nur ein Beispiel zu nennen – bei den Prototypen IIX und IX, die sich auf den ersten Blick in ihrer strengen Bipolarität sehr ähnlich sehen. Im Raster der Sholl-Analyse ist aber leicht zu erkennen, dass sie sich nicht nur im Verzweigungsmuster, sondern auch in der Ausdehnung ihrer Dendriten unterscheiden.

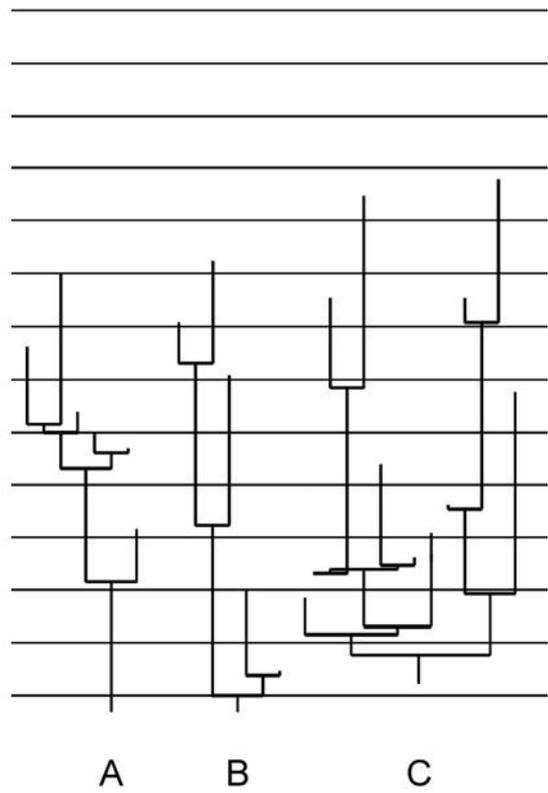
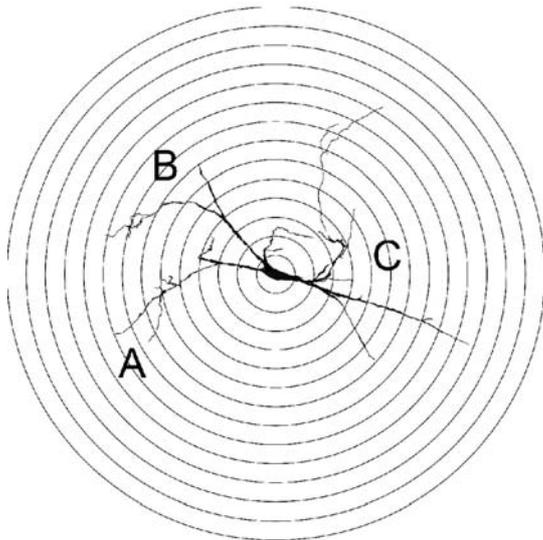
Die Analyse aller Prototypen ist in Abbildung IV.15 dargestellt.

Abb. IV.15 (S.61-66): Sholl-Analyse der Prototypen. Dargestellt sind auf der linken Seite alle 12 Prototypen NADPHd-positiver Interneurone des menschlichen Striatums, über die das Kreisraster der Sholl-Methode gelegt wurde. Dies bildete den Ausgangspunkt für die rechts gegenübergestellten schematischen Aufzweigungsmuster der einzelnen Dendriten. Die Dendriten wurden in beiden Rastern entsprechend mit Großbuchstaben gekennzeichnet. Der Abstand zwischen zwei Kreisen bzw. Linien entspricht jeweils 25 μm .

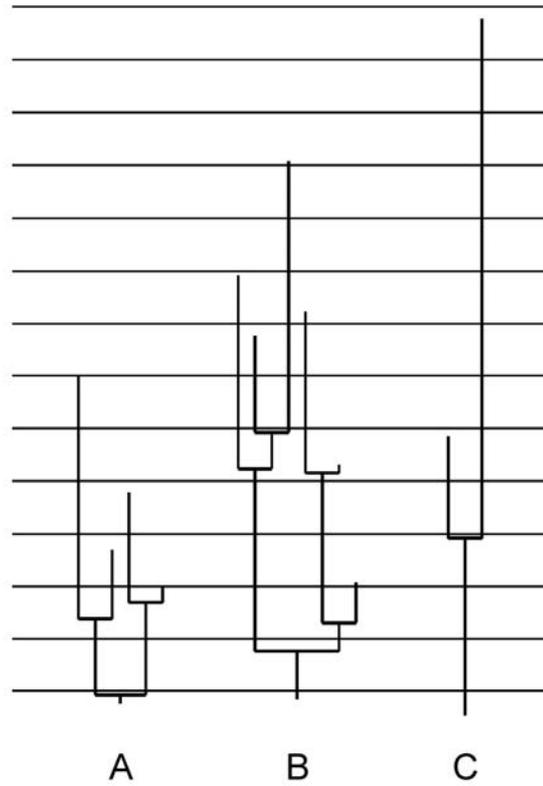
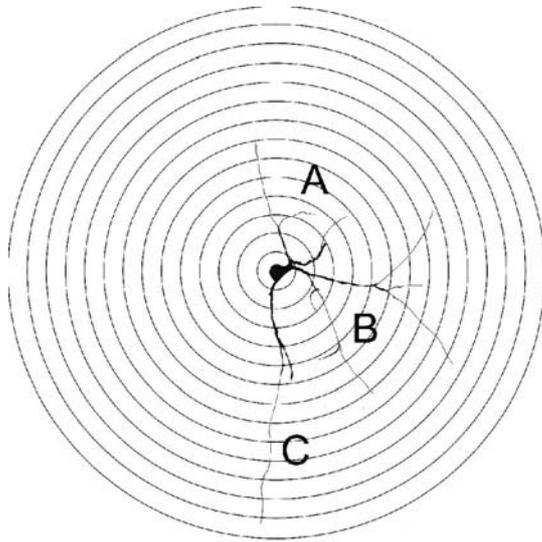
NADPHd I



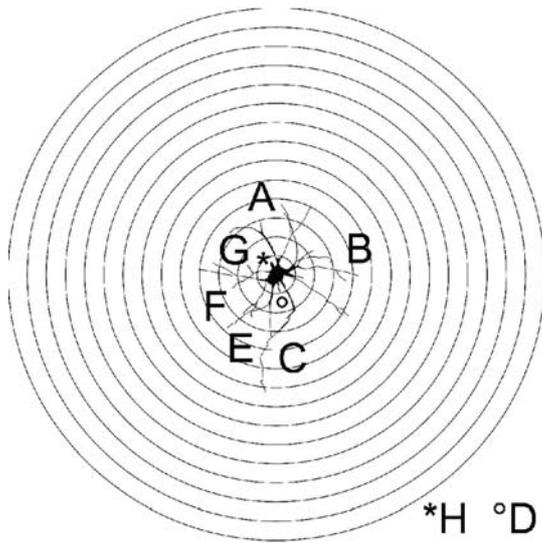
NADPHd II



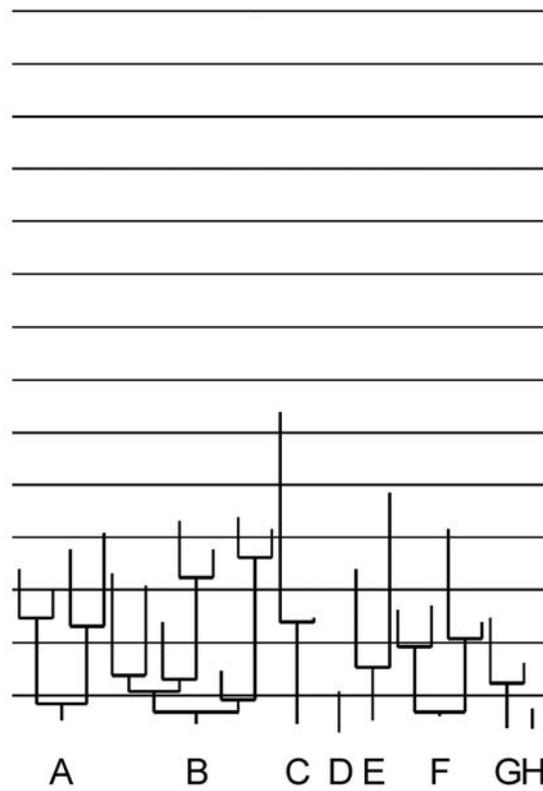
NADPHd III



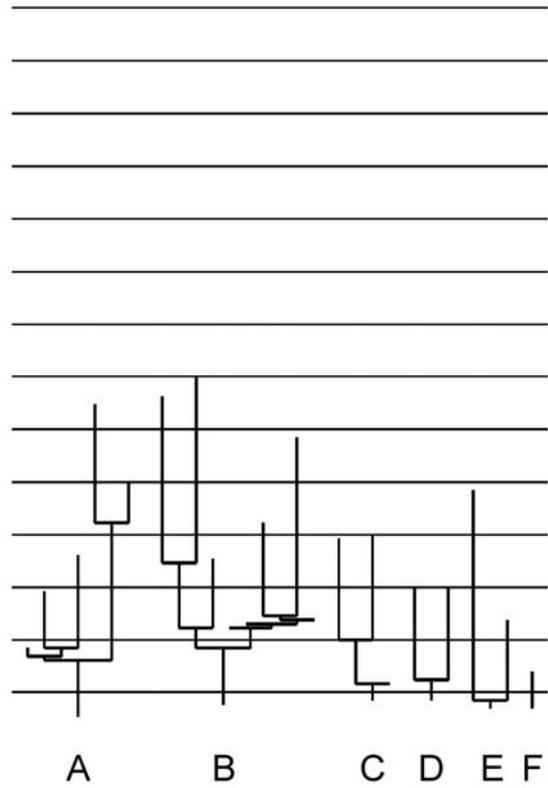
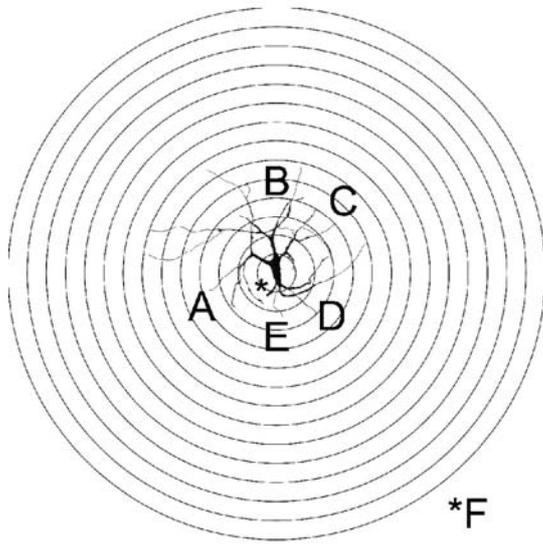
NADPHd IV



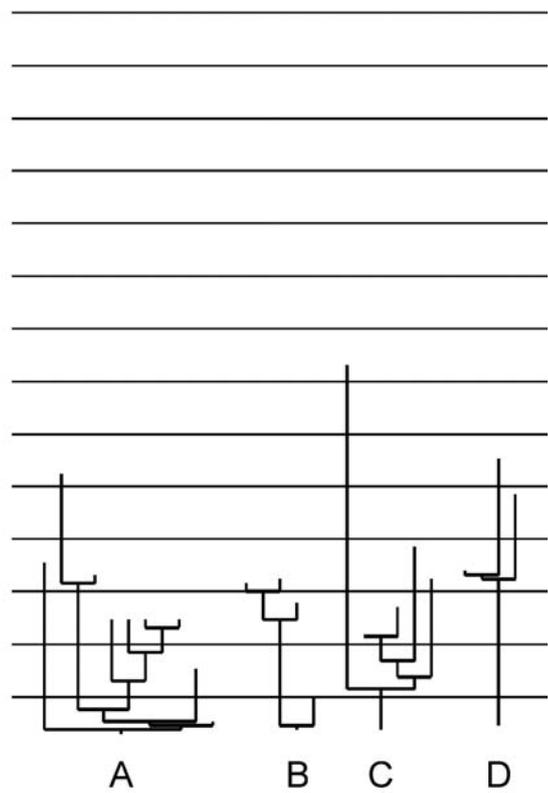
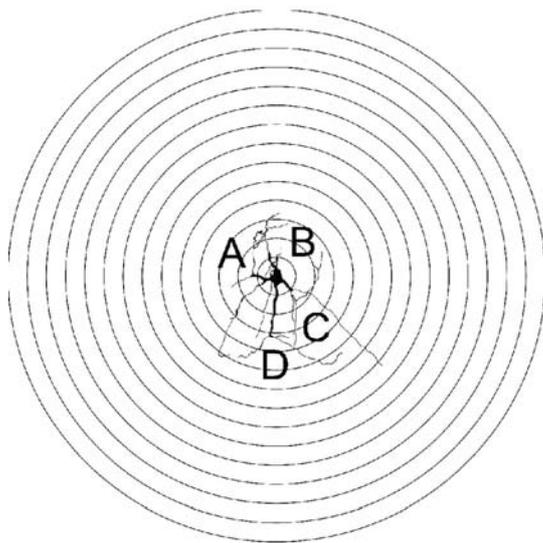
*H °D



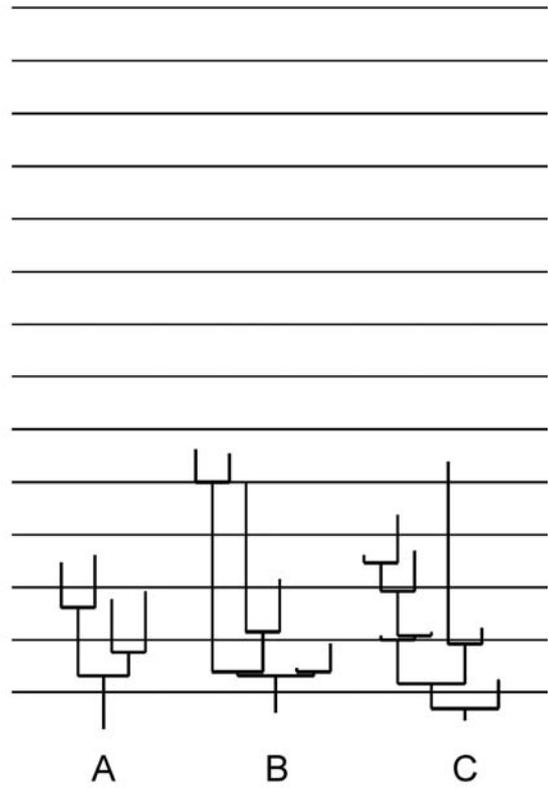
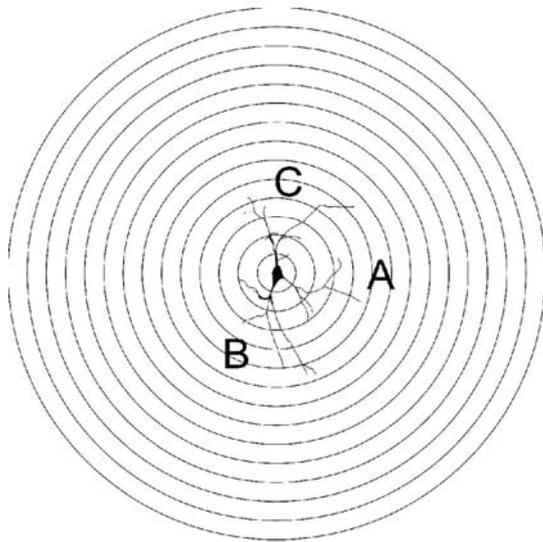
NADPHd V



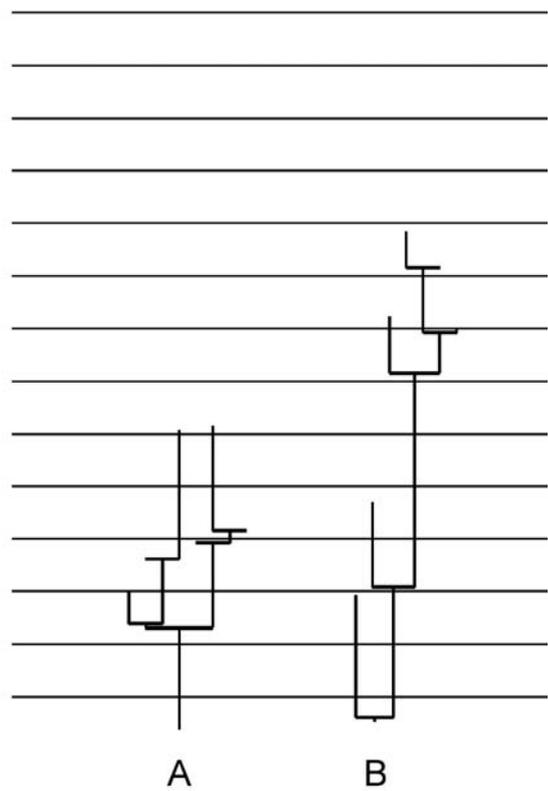
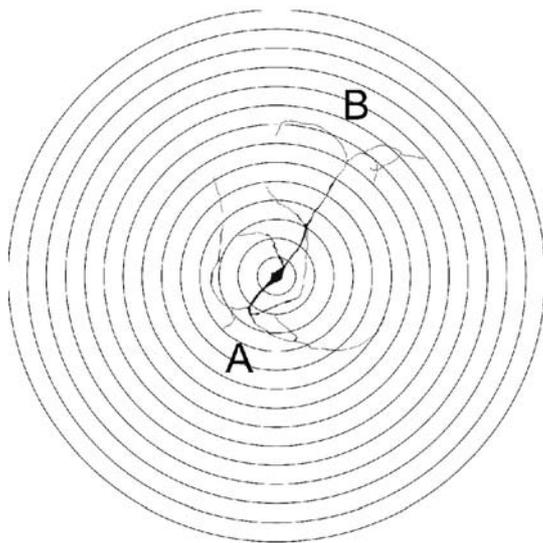
NADPHd VI



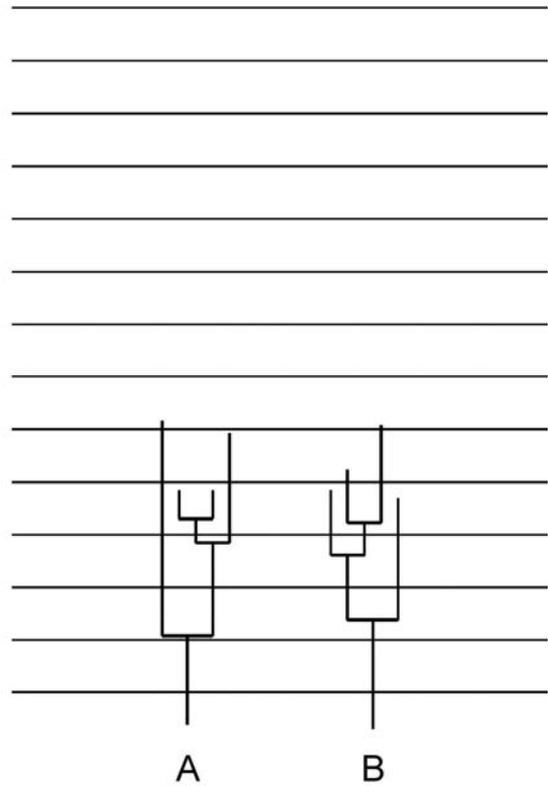
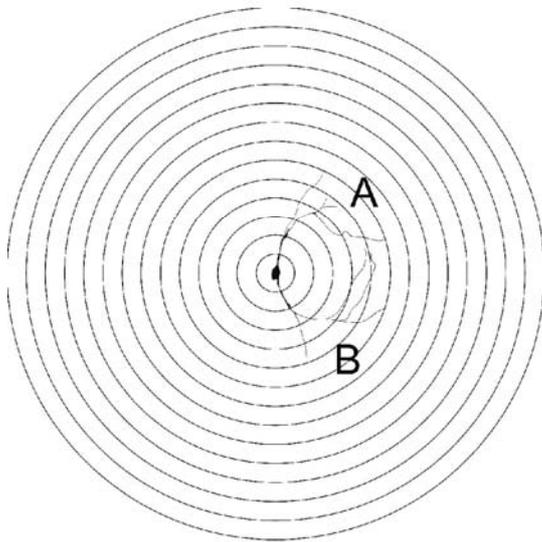
NADPHd VII



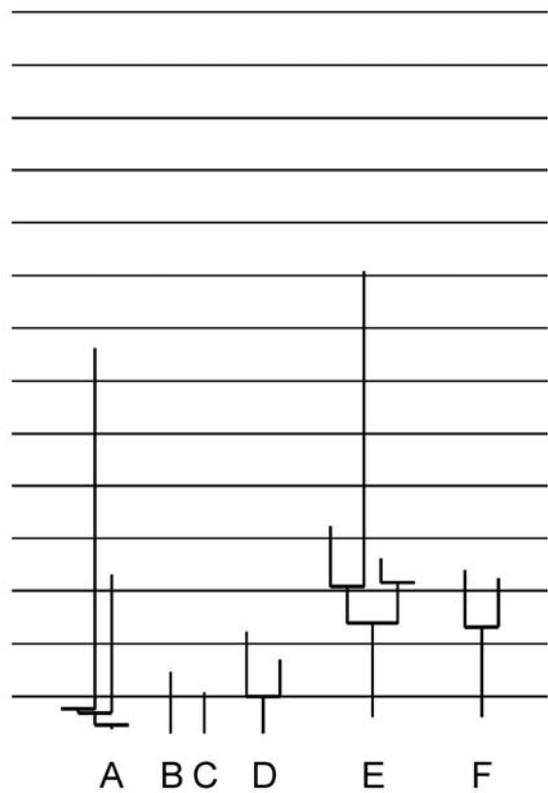
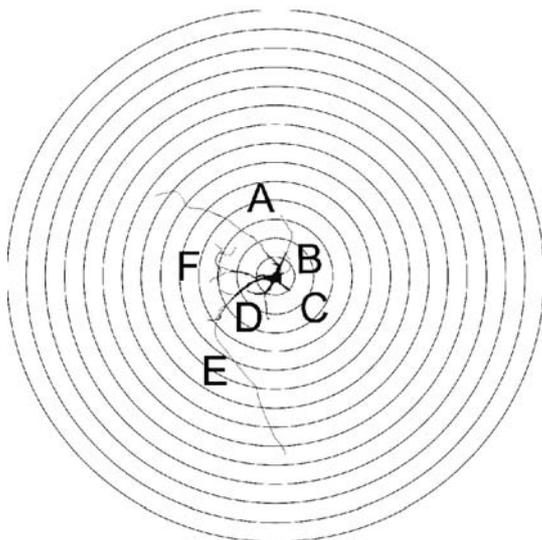
NADPHd IIX



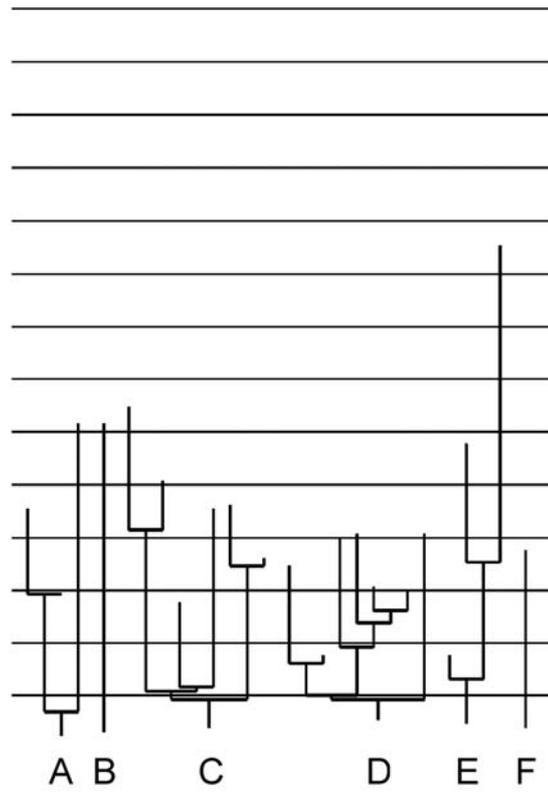
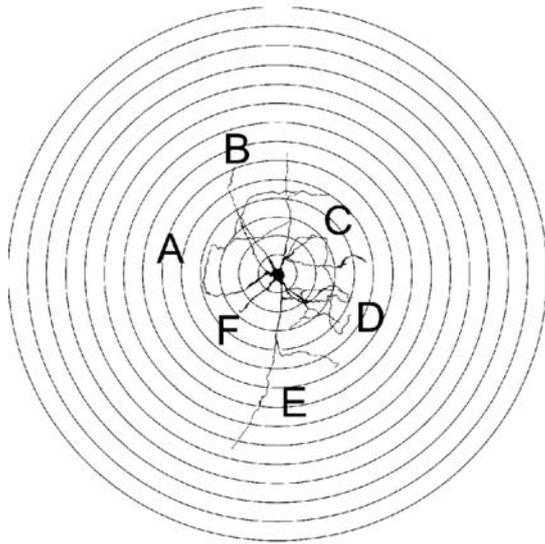
NADPHd IX



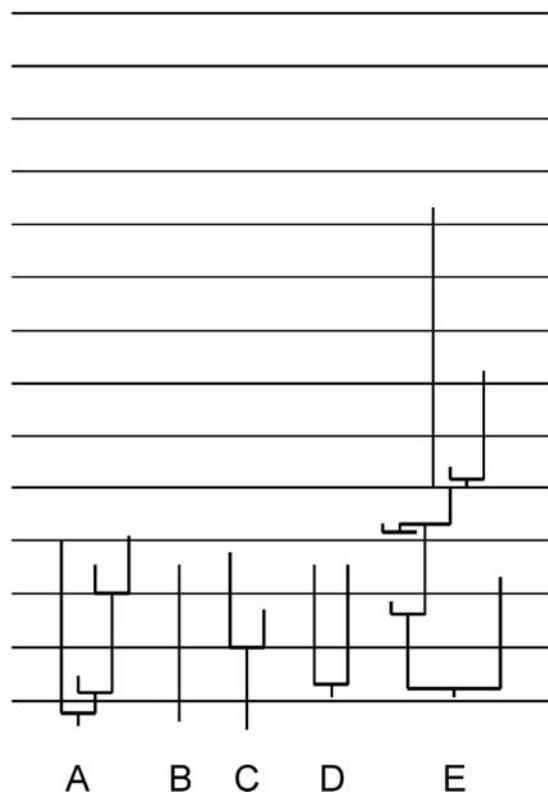
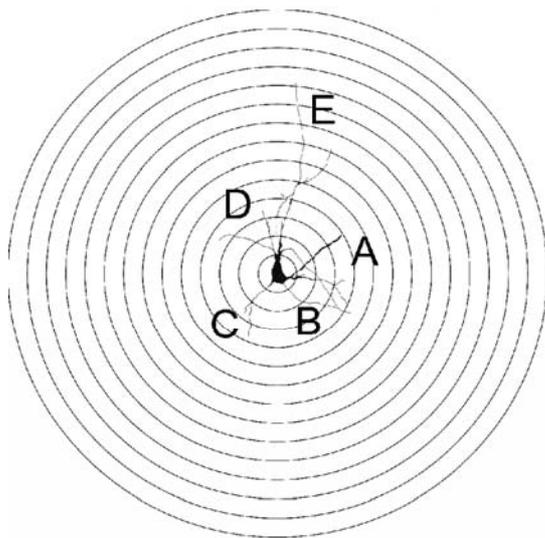
NADPHd X



NADPHd XI



NADPHd XII



IV.2.2.2 Weitergehende Analyse

Eine weitere Vereinfachung der Vergleichbarkeit der Prototypen wurde dadurch erreicht, dass die Anzahl von Intersegmenten, Verzweigungs- und Endpunkten in unterschiedlichen Entfernungen vom Zentrum bestimmt wurden. Die jeweilige Anzahl ergab in einem Diagramm aufgetragen gegen die Entfernung anschauliche Kurven (Abb. IV.16 bis IV.18). Anhand des Kurvenverlaufes konnte leicht bestimmt werden, in welcher Distanz sich die meisten Verzweigungen, die meisten Endpunkte und in engem Zusammenhang damit stehend die Anzahl der zugehörigen Intersegmente befanden. Damit war es möglich, diesen Charakteristika Diagrammkurven zuzuordnen, was wiederum die zuvor rein optischen Eindrücke bestätigte und objektivierte.

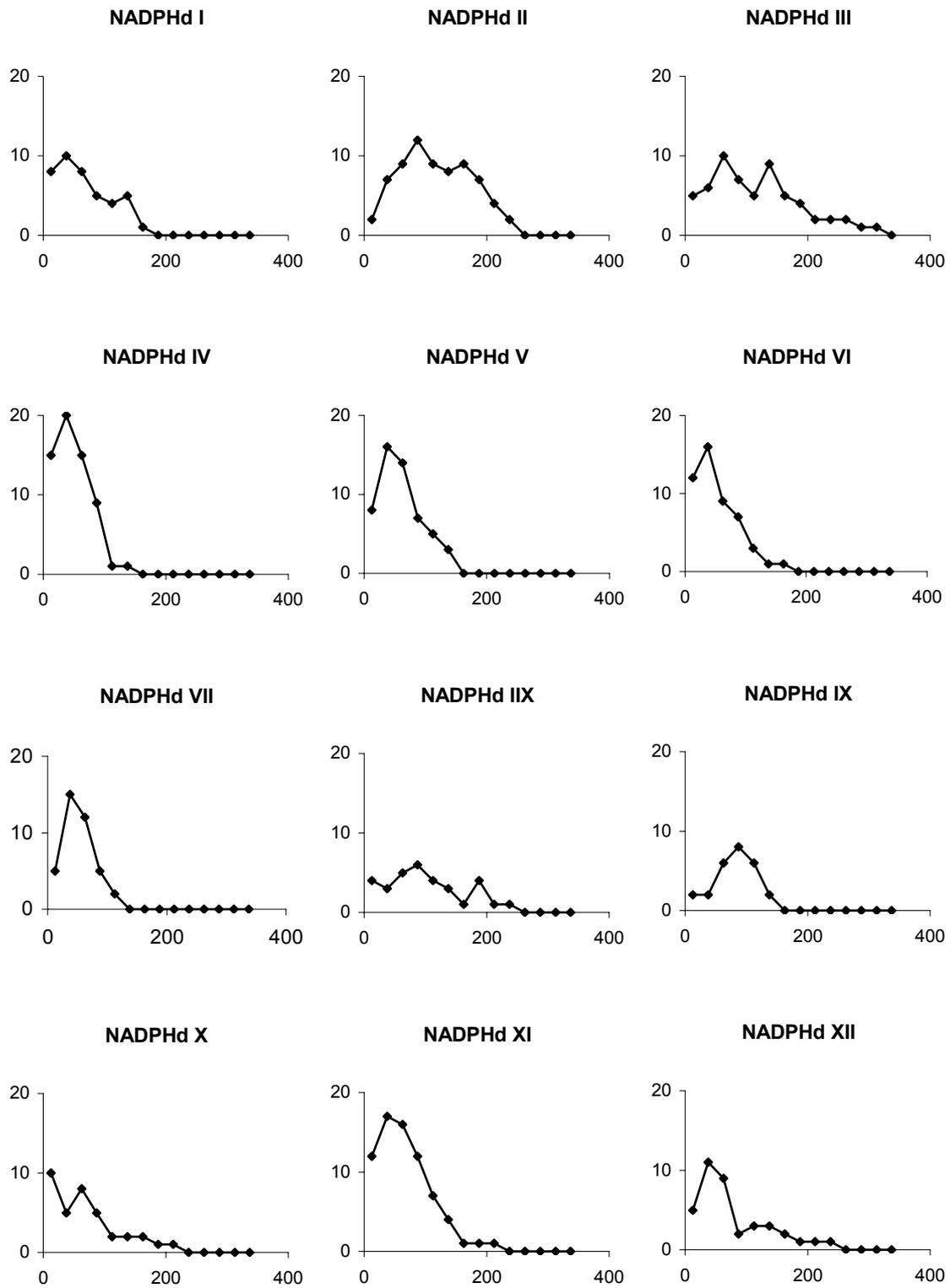


Abb. IV.16: Weitergehende Analyse der Prototypen. Anzahl der Intersegmente der einzelnen Prototypen (y-Achse) aufgetragen gegen ihre Entfernung vom Zentrum [μm] (x-Achse). Gezählt wurden die Segmente in jeweils 25 μm breiten konzentrischen Zonen. Lag der Endpunkt in dieser Zone, so wurde das Endsegment nicht mitgezählt.

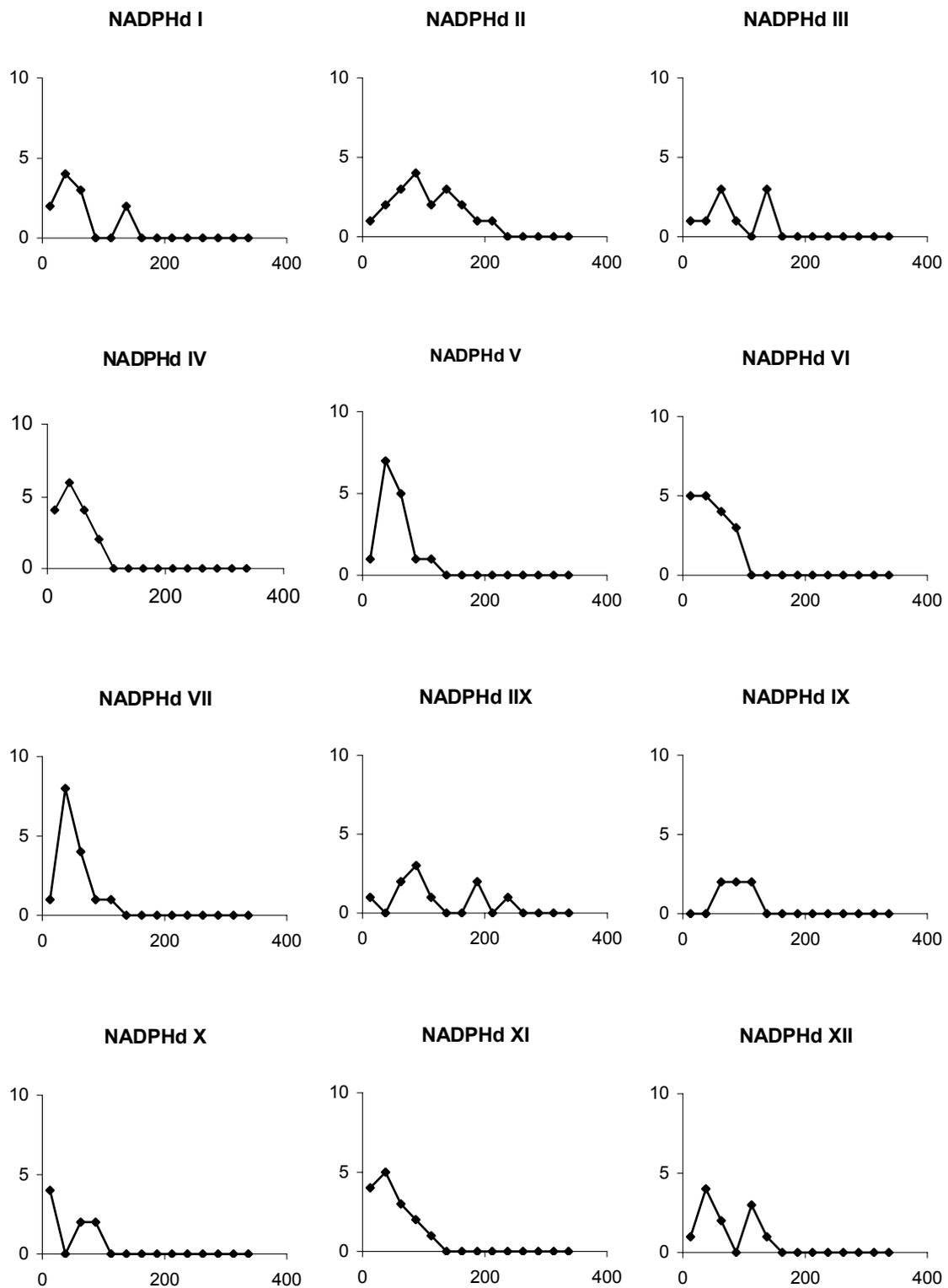


Abb. IV.17: Weitergehende Analyse der Prototypen. Anzahl der Verzweigungspunkte der einzelnen Prototypen (y-Achse) aufgetragen gegen ihre Entfernung vom Zentrum [μm] (x-Achse).

Ergebnisse

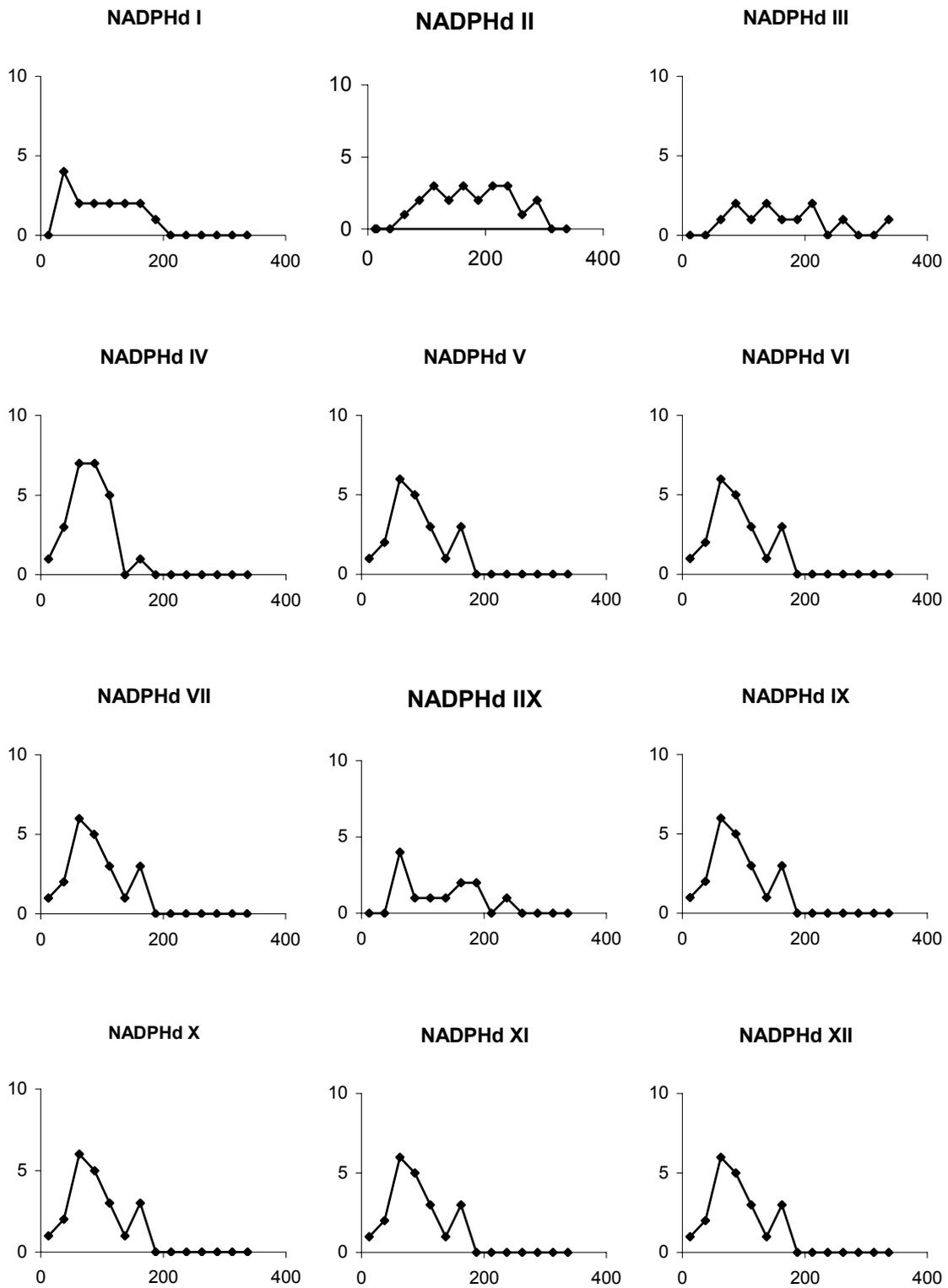


Abb. IV.18: Weitergehende Analyse der Prototypen. Anzahl der Endpunkte der einzelnen Prototypen (y-Achse) aufgetragen gegen ihre Entfernung vom Zentrum [μm] (x-Achse).

IV.2.3 Topologische Analyse

Das Ergebnis des ersten Schritts der topologischen Auswertung der Dendritenbäume, nämlich deren Systematisierung durch zentrifugale Ordnung, ist in Tabelle IV.2 dargestellt.

Von dieser Systematisierung ausgehend erfolgte die weitere Auswertung der einzelnen Dendriten hinsichtlich der Anzahl ihrer Segmente, Verzweigungs- und Endpunkte (Tab. IV.3) sowie der Asymmetrie ihres Verzweigungsmodus (Tab. IV.4).

Tab. IV.2 (S. 72): Systematisierung der einzelnen Dendritenbäume der Prototypen. Die Bezeichnung der einzelnen Dendriten entspricht der in den Sholl-Rastern angewendeten Bezeichnung (siehe Kap. IV.2.2.1, S. 61-66). Verwendete Abkürzungen: n = Anzahl der Endigungen eines Stammdendriten, n_s = Anzahl der Segmente eines Stammdendriten, m = Gesamtzahl der Endigungen des Neurons, m_s = Gesamtzahl der Segmente des Neurons, $n(r,s)$ = Aufzweigungsmuster am ersten Verzweigungspunkt.

Tab. IV.3 (S. 73): Topologische Auswertung der einzelnen Stammdendriten der Prototypen. Verwendete Abkürzungen: n = Anzahl der Endpunkte, n_s = Anzahl der Segmente, C = Summe aller Segmentordnungen mit $\bar{C} = C/n_s$, p = Summe aller Verzweigungs- und Endpunktordnungen mit $\bar{p} = p/n_s$, p_e = Summe aller Endpunktordnungen, D = topologischer Durchmesser, n,r = Grad des Dendritenbaumes mit Grad des kleineren Unterbaumes am ersten Verzweigungspunkt.

Ergebnisse

Typ	Den- drit	N	n _s	M	m _s	Verzweigungsmuster	n(r,s)	Segment- anzahl pro Ordnung
I	A	6	11	15	26	6 (3 3)	6(3,3)	1,2,4,4
	B	2	3			2	2(1,1)	1,2
	C	1	1			1	1	1
	D	6	11			6(1 5(1 4(2 2)))	6(1,5)	1,2,2,2,4
II	A	6	11	22	41	6(1 5(2 3))	6(1,5)	1,2,2,4,2
	B	5	9			5(2 3)	5(2,3)	1,2,4,2
	C	11	21			11(4(1 3) 7(1 6(1 5(2 3))))	11(4,7)	1,2,4,4,4,4,2
III	A	4	7	12	21	4(2 2)	4(2,2)	1,2,4
	B	6	11			6(3 3)	6(3,3)	1,2,4,4
	C	2	3			2	2	1,2
IV	A	4	7	24	40	4(2 2)	4(2,2)	1,2,4
	B	8	15			8(3 5(2 3))	8(3,5)	1,2,4,4,4
	C	2	3			2	2	1,2
	D	1	1			1	1	1
	E	2	3			2	2	1,2
	F	4	7			4(2 2)	4(2,2)	1,2,4
	G	2	3			2	2	1,2
	H	1	1			1	1	1
V	A	5	9	21	36	5(2 3)	5(2,3)	1,2,4,2
	B	8	13			8(3 5(1 4(1 3)))	8(3,5)	1,2,4,4,2,2
	C	3	5			3	3	1,2,2
	D	2	3			2	2	1,2
	E	2	3			2	2	1,2
	F	1	1			1	1	1
VI	A	9	17	21	38	9(1 8(1 7(1 6(2 4(1 3))))))	9(1,8)	1,2,2,2,2,4,2,2
	B	4	7			4(1 3)	4(1,3)	1,2,2,2
	C	5	9			5(1 4(1 3))	5(1,4)	1,2,2,2,2
	D	3	5			3	3	1,2,2
VII	A	4	7	18	33	4(2 2)	4(2,2)	1,2,4
	B	6	11			6(2 4(2 2))	6(2,4)	1,2,4,4
	C	8	15			8(1 7(2 5(1 4(1 3))))	8(1,7)	1,2,2,4,2,2,2
VIII	A	6	11	12	22	6(3 3)	6(3,3)	1,2,4,4
	B	6	11			6(1 5(1 4(1 3)))	6(1,5)	1,2,2,2,2,2
IX	A	4	7	8	14	4(1 3)	4(1,3)	1,2,2,2
	B	4	7			4(1 3)	4(1,3)	1,2,2,2
X	A	4	7	14	22	4(1 3)	4(1,3)	1,2,2,2
	B	1	1			1	1	1
	C	1	1			1	1	1
	D	2	3			2	2	1,2
	E	4	7			4(2 2)	4(2,2)	1,2,4
	F	2	1			2	2	1,2
XI	A	3	5	21	36	3	3	1,2,2
	B	1	1			1	1	1
	C	6	11			6(2 4(2 2))	6(2,4)	1,2,4,4
	D	7	13			7(1 6(2 4(1 3)))	7(1,6)	1,2,2,4,2,2
	E	3	5			3	3	1,2,2
	F	1	1			1	1	1
XII	A	4	7	16	27	4(1 3)	4(1,3)	1,2,2,2
	B	1	1			1	1	1
	C	2	3			2	2	1,2
	D	2	3			2	2	1,2
	E	7	13			7(1 6(1 5(2 3)))	7(1,6)	1,2,2,2,4,2

Typ	Dendrit	n	n _s	C	\bar{C}	p	\bar{p}	p _e	D
I	A	6	11	22	2.00	33	3.00	22	4
	B	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	C	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
	D	6	11	28	2.55	39	3.55	15	5
II	A	6	11	26	2.36	37	3.36	24	5
	B	5	9	16	1.78	25	2.78	17	4
	C	11	21	70	3.33	91	4.33	35	7
III	A	4	7	10	1.43	17	2.43	12	3
	B	6	11	22	2.00	33	3.00	22	4
	C	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
IV	A	4	7	10	1.43	17	2.43	12	3
	B	8	15	36	2.40	51	3.40	33	5
	C	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	D	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
	E	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	F	4	7	10	1.43	17	2.43	12	3
	G	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	H	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
V	A	5	9	16	1.78	25	2.78	17	4
	B	8	15	30	2.00	43	3.00	28	5
	C	3	5	6	1.20	11	2.20	8	3
	D	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	E	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	F	1	1	0	0	1	1.00	1	1
VI	A	9	17	66	3.88	83	4.88	33	8
	B	3	5	12	2.40	19	3.40	13	4
	C	5	9	20	2.22	29	3.22	19	5
	D	3	5	6	1.20	11	2.20	8	3
VII	A	4	7	10	1.43	17	2.43	12	3
	B	6	11	22	2.00	33	3.00	22	4
	C	8	15	48	3.20	63	4.20	39	7
IIIX	A	6	11	22	2.00	33	3.00	22	4
	B	6	11	30	2.73	41	3.73	26	6
IX	A	4	7	12	1.71	19	2.71	13	4
	B	4	7	12	1.71	19	2.71	13	4
X	A	4	7	12	1.71	19	2.71	13	4
	B	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
	C	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
	D	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	E	4	7	10	1.43	17	2.43	12	3
	F	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
XI	A	3	5	6	1.20	11	2.20	8	3
	B	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
	C	6	11	22	2.00	33	3.00	22	4
	D	7	13	36	2.77	49	3.77	31	6
	E	3	5	6	1.20	11	2.20	8	3
	F	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
XII	A	4	7	12	1.71	19	2.71	13	4
	B	1	1	0	0.00	1	1.00	1	1
	C	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	D	2	3	2	0.67	5	1.67	4	2
	E	7	13	38	2.92	51	3.92	32	6

Ergebnisse

Typ	Dendrit	n,r	PSAD	\overline{PSAD}	Typ	Dendrit	n,r	PSAD	\overline{PSAD}
I	A	6,3	0.00	0.00	VII	A	4,2	0.00	0.00
	B	2,1	0.00	-		B	6,2	0.50	0.25
	C	1,0	-	-			4,2	0.00	
	D	6,1	1.00	0.67		C	8,1	1.00	0.90
		5,1	1.00					7,2	0.60
	4,2	0.00			5,1	1.00			
					4,1	1.00			
II	A	6,1	1.00	0.67	IIX	A	6,3	0.00	0.00
		5,2	0.33			B	6,1	1.00	1.00
	B	5,2	0.33	0.33			5,1	1.00	
		C	11,4	0.33		0.73		4,1	1.00
	4,1		1.00						
	7,1		1.00						
		6,1	1.00						
	5,2	0.33							
III	A	4,2	0.00	0.00	IX	A	4,1	1.00	1.00
	B	6,3	0.00	0.00		B	4,1	1.00	1.00
	C	2,1	0.00	-					
IV	A	4,2	0.00	0.00	X	A	4,1	1.00	1.00
	B	8,3	0.33	0.33		B	1,0	-	-
		5,2	0.33			C	1,0	-	-
	C	2,1	0.00	-		D	2,1	1.00	-
	D	1,0	-	-		E	4,2	0.00	0.00
	E	2,1	0.00	-		F	2,1	1.00	-
	F	4,2	0.00	0.00					
	G	2,1	0.00	-					
H	1,0	-	-						
V	A	5,2	0.33	0.33	XI	A	3,1	1.00	-
		8,3	0.33	0.78		B	1,0	-	-
		5,1	1.00			C	6,2	0.5	0.25
		4,1	1.00				4,2	0.00	
	C	3,1	1.00	-		D	7,1	1.00	0.83
	D	2,1	0.00	-			6,2	0.50	
E	2,1	0.00	-		4,1	1.00			
F	1,0	-	-		3,1	1.00	-		
					F	1,0	-	-	
VI	A	9,1	1.00	0.90	XII	A	4,1	1.00	1.00
		8,1	1.00			B	1,0	-	-
		7,1	1.00			C	2,1	0.00	-
		6,2	0.50			D	2,1	0.00	-
		4,1	1.00			E	7,1	1.00	0.78
	B	4,1	1.00	1.00		6,1	1.00		
	C	5,1	1.00	1.00					
		4,1	1.00						
		4,1	1.00						
	D	3,1	1.00	-					

Tab. IV.4: Symmetriegrad der Dendritenbäume der Prototypen. Verwendete Abkürzungen: *PSAD* = *proportional sum of absolute deviations* am jeweiligen Verzweigungspunkt mit dem Mittelwert \overline{PSAD} des jeweiligen Stammdendriten. Für den \overline{PSAD} ist zu beachten, dass er nur für Verzweigungspunkte definiert ist, die zu n>3 Endpunkten führen (siehe Kap. III.6.5.5).

Die Ergebnisse dieser Analyse bildeten die Grundlage für die Auswertung des gesamten Neurons (Tab. IV.5).

Typ	D	C	\bar{C}	p	\bar{p}	p_e	$PSAD_{Soma}$	\overline{PSAD}_{total}
I	12	52	2,00	78	3,00	52	0,55	0,38
II	16	112	2,73	153	3,73	76	0,29	0,62
III	9	34	1,62	55	2,62	38	0,33	0,08
IV	19	62	1,55	102	2,55	71	0,50	0,15
V	18	66	1,83	102	2,83	69	0,42	0,51
VI	20	104	2,74	142	3,74	73	0,29	0,88
VII	14	80	2,42	113	3,42	73	0,20	0,58
IIX	10	42	2,10	62	3,10	41	0,11	0,53
IX	8	24	1,71	38	2,71	26	0,00	0,67
X	13	26	1,18	48	2,18	35	0,50	0,70
XI	18	72	2,00	108	3,00	72	0,48	0,70
XII	15	54	2,00	81	3,00	54	0,52	0,55

Tab. IV.5: Topologische Auswertung der Prototypen. Verwendete Abkürzungen: D = topologischer Durchmesser, C = Summe aller Segmentordnungen, \bar{C} = Mittelwert der Summe der Segment-Ordnungen, p = Summe aller Verzweigungs- und Endpunktordnungen, \bar{p} = Mittelwert der Summe aller Verzweigungs- und Endpunktordnungen, p_e = Summe aller Endpunktordnungen, $PSAD$ = *proportional sum of absolute deviations*, \overline{PSAD}_{total} = mittlerer $PSAD$. Näheres zur Berechnung siehe Kap. III.6.5.

Anhand dieser Zahlenwerte lassen sich über die einzelnen Prototypen folgende Aussagen treffen:

NADPHd V und VI verfügen über den höchsten Verzweigungsgrad, wohingegen NADPHd III, IIX und IX sich selten verzweigen. Der symmetrischste Dendritenbaum aller untersuchten Prototypen, also der Dendritenbaum, der die meisten symmetrischen Aufzweigungen besaß, wurde bei NADPHd III und IV, der asymmetrischste bei den Neuronen NADPHd VI, IX und XII gefunden. NADPHd III erwies sich zudem als insgesamt symmetrischstes, NADPHd VI als asymmetrischstes Neuron unter den Prototypen.

Ergebnisse

Ausgehend von den beiden bereits durchgeführten Methoden zur Auswertung konnte die Gesamtzahl von Segmenten, Intersegmenten, Verzweigungs- und Endpunkten zu bestimmt werden.

Typ	Stamm- den- driten (SD)	Gsamt- zahl Seg- mente (GS)	Inter- seg- mente (IS)	Ver- zwei- gungs- punkte (VP)	End- punkte (EP)	IS / SD	VP / SD	EP / SD	GS / SD
I*	4	26	8	11	15	2*	2,75	3,75	6,5
II	3	41	16	19	22	5,33	6,33	7,33	13,67
III	3	21	6	9	12	2	3	4	7
IV*	8	40	10	16	24	1,25*	2	3	5
V*	6	36	10	15	21	1,67*	2,5	3,5	6
VI	4	38	13	17	21	3,25	4,25	5,25	9,5
VII	3	33	12	15	18	4	5	6	11
IIX	2	22	8	10	12	4	5	6	11
IX	2	14	4	6	8	2	3	4	7
X*	6	22	4	8	14	0,67*	1,33	2,33	3,67
XI*	6	36	11	15	21	1,83*	2,5	3,5	6
XII*	5	27	7	11	16	1,4*	2,2	3,2	5,4

*Dendriten vorhanden, die sich nicht verzweigen.

Tab. IV.6: Anzahl von Stammdendriten, Segmenten, Verzweigungs- und Endpunkten der einzelnen Prototypen. Aus diesen Werten wurden Quotienten gebildet. Einzelheiten siehe Text.

Da der Quotient aus der Anzahl von Verzweigungspunkten zur Anzahl von Stammdendriten jedem Stammdendriten einen Durchschnittswert von Aufzweigungen zuweist, erwies sich dieser Quotient als brauchbares Maß für den Verzweigungsgrad des Dendritenbaumes eines Neurons. Die so berechneten Werte stimmten mit der rein optischen Einschätzung des Verzweigungsgrades, die während der morphologischen Analyse vorgenommen wurde, überein.

IV.2.4 Verteilung der Klassen NADPHd-positiver Interneurone

Bezogen auf 502 klassifizierte Neurone (siehe Kap. III.6.3) ergaben sich folgende prozentuale Anteile der einzelnen Klassen NADPHd-positiver Interneurone im menschlichen Putamen: Mit Abstand am häufigsten waren Neurone des Typs NADPHd IIX zu sehen, die einen Anteil von fast 40 % stellten. Knapp gefolgt wurde diese von den Typen VII und IX, die jeweils ca. 20% der ausgewerteten Neurone ausmachten. In einer Art Mittelfeld bewegten sich die Häufigkeiten der Typen NADPHd I, II, III, VI, X und XII, die allesamt im Bereich zwischen knapp 2 und 6% rangierten. Sehr selten dagegen waren mit jeweils weniger als 1% die übrigen Typen NADPHd XI, IV und V. Die Anteile der einzelnen Typen sind in Tabelle IV.7 aufgelistet.

I	II	III	IV	V	VI	VII	IIX	IX	X	XI	XII
6,4%	2,4%	3,8%	0,2%	0,6%	1,6%	19,9%	38,4%	21,5%	3%	0,6%	3,6%

Tab. IV.7: Verteilung der Klassen NADPHd-positiver Interneurone. Angegeben ist der prozentuale Anteil der einzelnen Typen NADPHd-positiver Neurone im menschlichen Putamen bezogen auf 502 in diese Auswertung eingegangene Neurone.

IV.3 Veränderte NADPHd- positive Neurone im Gehirn Schizophrener

IV.3.1 Morphologische Unterschiede

Um bei schizophrenen Erkrankungen mögliche Veränderungen NOS-positiver striataler Interneurone festzustellen, wurde zuerst geprüft, ob NADPHd-positive Neurone morphologische Auffälligkeiten zeigten. Dazu wurden drei schizophrene und fünf Kontroll-Gehirne nach der NADPHd-Methode gefärbt. Annähernd 1000 Neurone je Gehirn wurden bezüglich der Diagnose verblindet untersucht, wobei die Morphologie der Neurone mit der zuvor erstellten Klassifikation (siehe Kap. IV.2.1) nitrinerg striataler Interneurone verglichen wurde. In den schizophrenen Gehirnen konnten zwei abnormale Neuronentypen gefunden werden. Diese sind in den Abbildungen IV.19 bis IV.22 (S. 79-82) dargestellt. Sie unterschieden sich von allen anderen in der oben genannten Klassifikation beschriebenen NADPHd-positiven Neuronen: Während der erste Typ (Abb. IV.19, IV.20 und IV.21) mit einer Ausdehnung von mehr als 600 µm größer als alle anderen in den Kontrollgehirnen beobachteten nitrinergen Zellen war, stellte im Gegenzug der zweite Typ (Abb. IV.22) mit 150 µm Durchmesser das kleinste Neuron im vorliegenden Untersuchungsgut dar.

Der große Zelltyp zeigte ein großes, unterschiedlich geformtes Soma mit drei bis vier davon ausgehenden dicken, leicht gewundenen Dendriten. Ihr Verzweigungsgrad bewegte sich im Vergleich zu den bereits beschriebenen Neuronen im Mittelfeld. Durch ihre asymmetrische Form und ihre auffallend große Ausdehnung erhielten diese Neurone ein bizarres Aussehen. Dazu trugen auch die plump wirkenden Dendriten bei, deren Oberfläche eine äußerst unregelmäßige Kontur aufwies.

Abb. IV.19 (S. 79): NADPHd-positives, striatales Interneuron eines schizophrenen Patienten. Bei diesem Zelltyp ist neben der Morphologie auch die Ausdehnung auffällig.

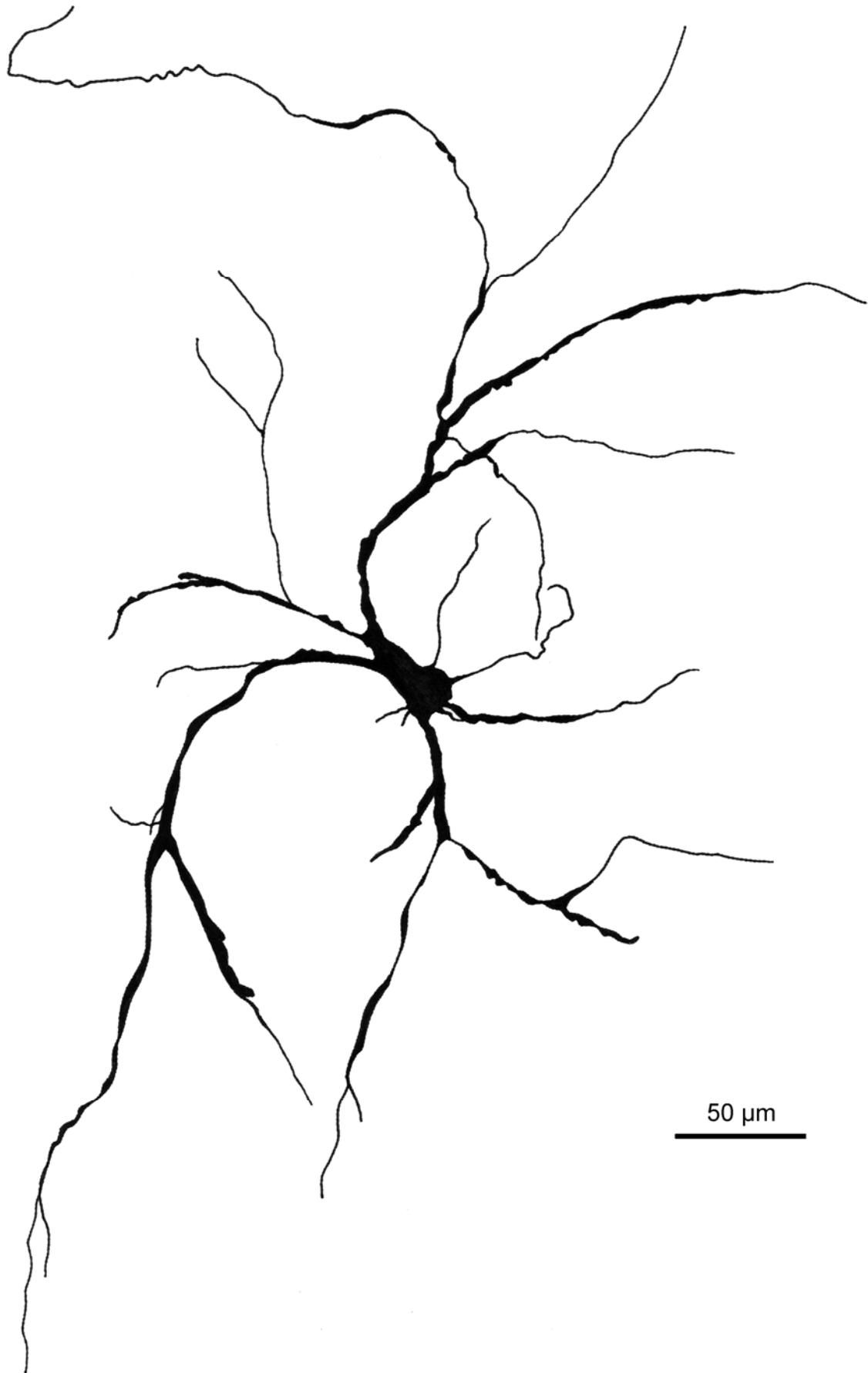




Abb. IV.20: NADPHd-positives, striatales Interneuron eines schizophrenen Patienten.



Abb. IV.21: NADPHd-positives, striatales Interneuron eines schizophrenen Patienten.

Ein völlig anderes Bild bot sich dagegen bei den kleinen Neuronen: Sie verfügten über ein rundes, mittelgroßes Soma. Dort nahmen vier dicke und kurze Dendriten ihren Ausgangspunkt, die sich kaum verzweigten. Bemerkenswert bei diesen Zellen ist die Tatsache, dass sie sich nur in zwei der drei untersuchten schizophrenen Gehirnen fanden.

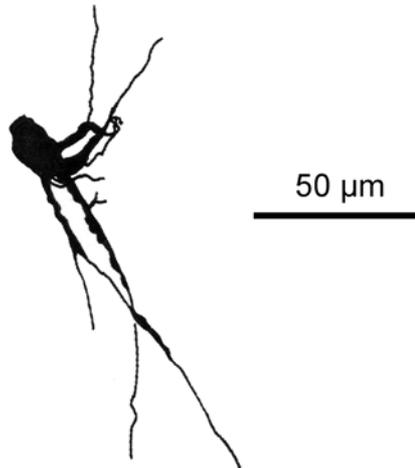


Abb. IV.22: NADPHd-positives, striatales Interneuron eines schizophrenen Patienten.
Diese Art Neuron war v. a. aufgrund ihrer geringen Größe auffällig.

Mikrophotographien der beschriebenen NADPHd-positiven Neurone im Putamen Schizophrener finden sich in Abbildung IV.23.

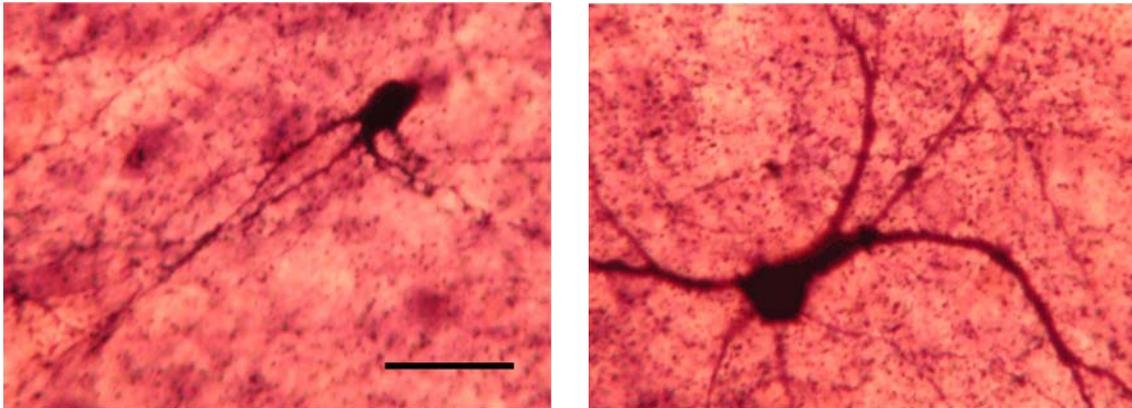


Abb. IV.23: Mikrophotographien auffälliger Neurone im Striatum Schizophrener. Der Balken entspricht 100 μm .

IV.3.2 Numerische Unterschiede

Neben der Suche nach morphologischen Unterschieden zwischen NADPHd-positiven Interneuronen schizophrener Gehirne und gesunder Kontrollgehirne wurde auch nach numerischen Abweichungen gesucht. Um zu diesem Gesichtspunkt Aussagen treffen zu können, wurden gemäß der Methodenteil beschriebenen Vorgehensweise insgesamt über 4200 NADPHd-positive Neurone in 25 Schnitten der schizophrenen Gruppe und 22 Schnitten der Kontrollgruppe ausgezählt. Anhand der zuvor bestimmten Parameter wurde der Mittelwert der Neuronenzahl pro mm^3 berechnet.

Aus der so durchgeführten Auszählung ergab sich für das Putamen der schizophrenen Gruppe ein Mittelwert von 54 ± 62 Neuronen / mm^3 , für das Putamen der gesunden Vergleichsgruppe ein Mittelwert von 130 ± 44 Neuronen / mm^3 . Damit lag der Mittelwert der schizophrenen Gruppe signifikant unter dem der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U Test).

Das Ergebnis dieser numerischen Untersuchung wird in der Abbildung IV.24 veranschaulicht (man beachte die logarithmische Ordinate). Der Unterschied in der Neuronendichte wird nicht nur in der statistischen Auswertung deutlich, sondern auch bei Betrachtung der Präparate in kleinen Vergrößerungen (Abb. IV.25 und IV.26).

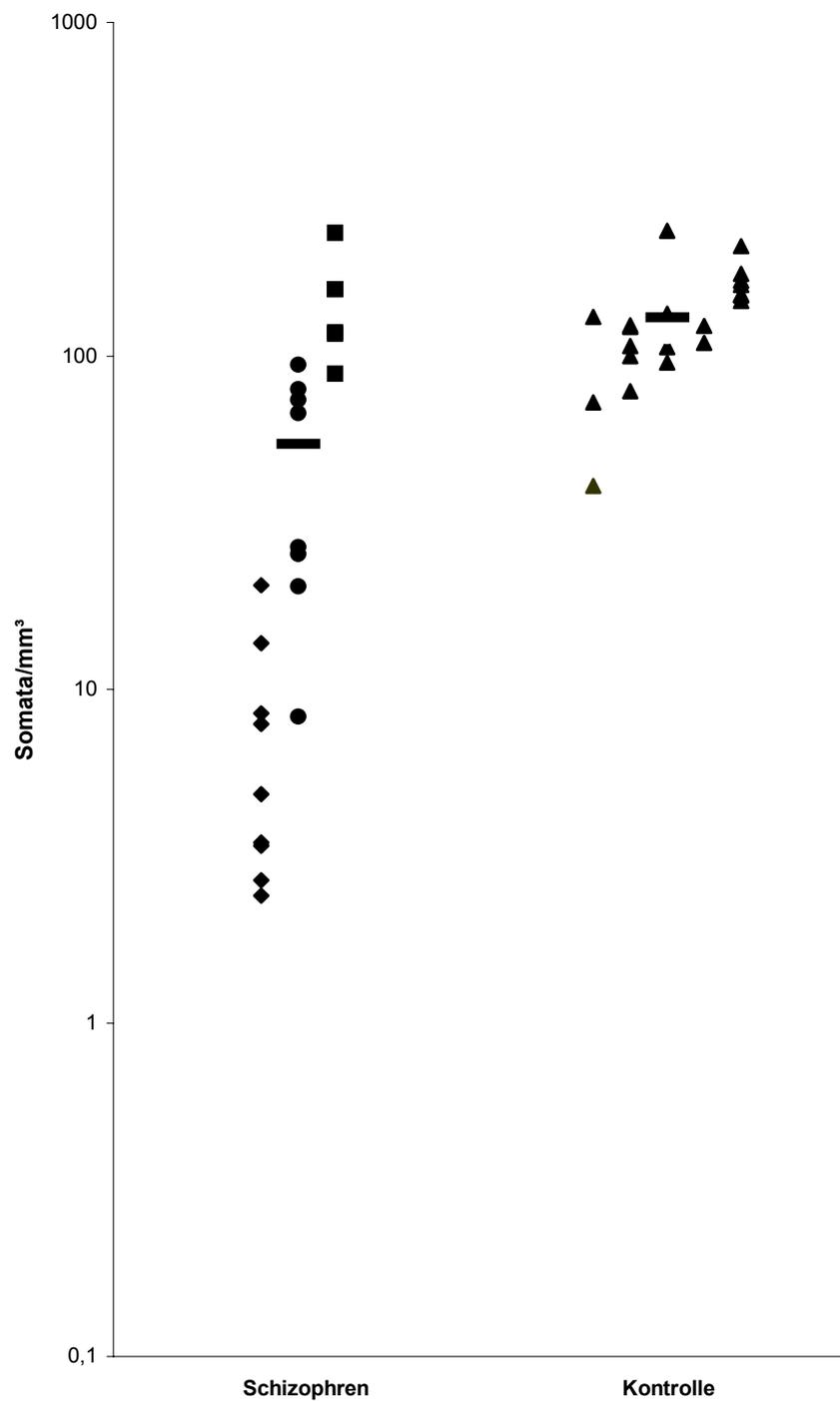


Abb. IV.24: Zelldichtevergleich. Rauten stehen für das Gehirn P, Kreise für das Gehirn Q und Quadrate für das Gehirn R der schizophrenen Gruppe (Tab. III.1, S. 26), Dreiecke für Gehirne der gesunden Kontrollgruppe. Die Balken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten der untersuchten Gruppen.

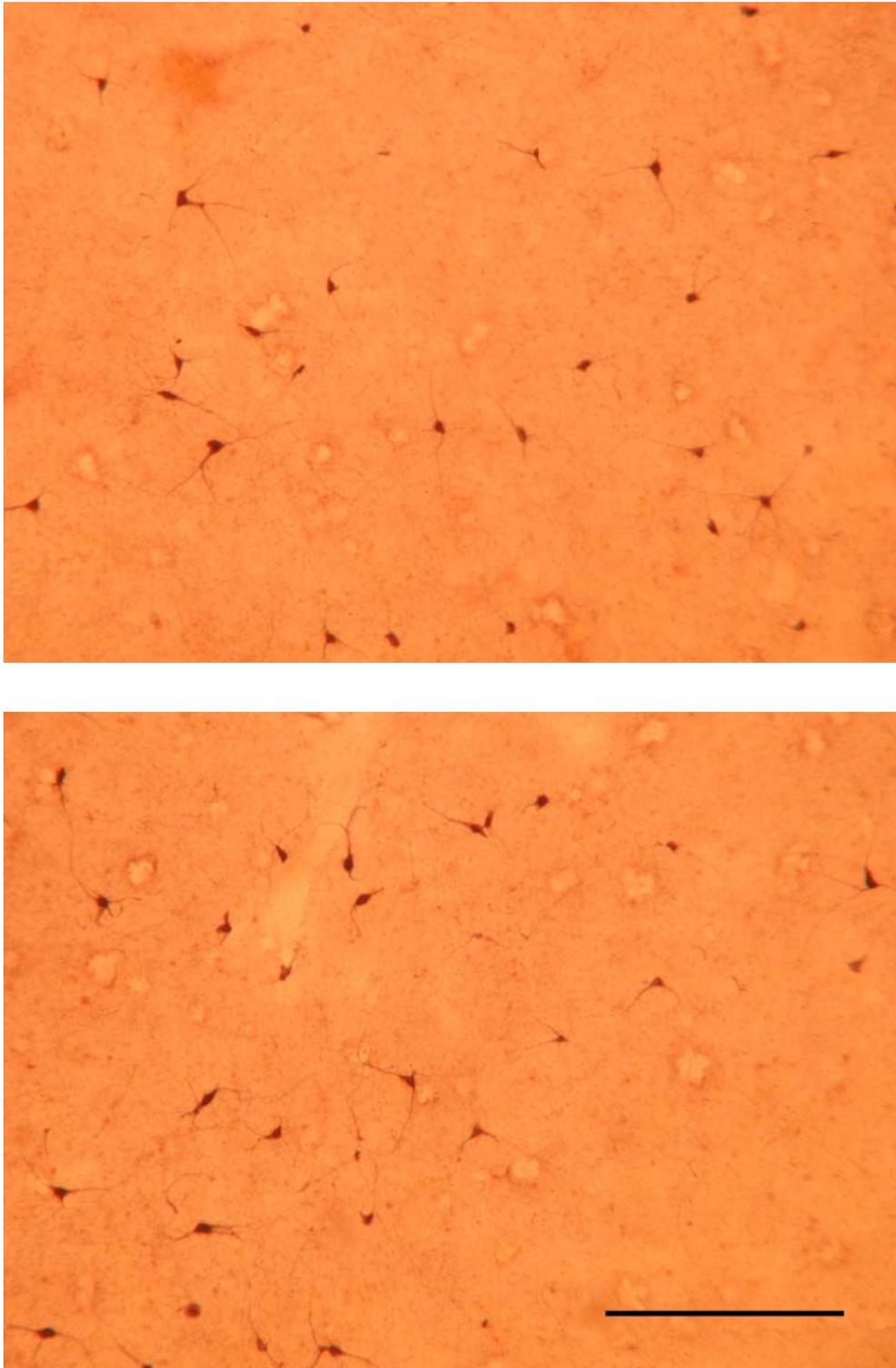


Abb. IV.25: Übersichtsaufnahmen eines Kontrollgehirns. Die Aufnahme erfolgte im Putamen bei 40facher Vergrößerung. Der Balken entspricht 400 μm .

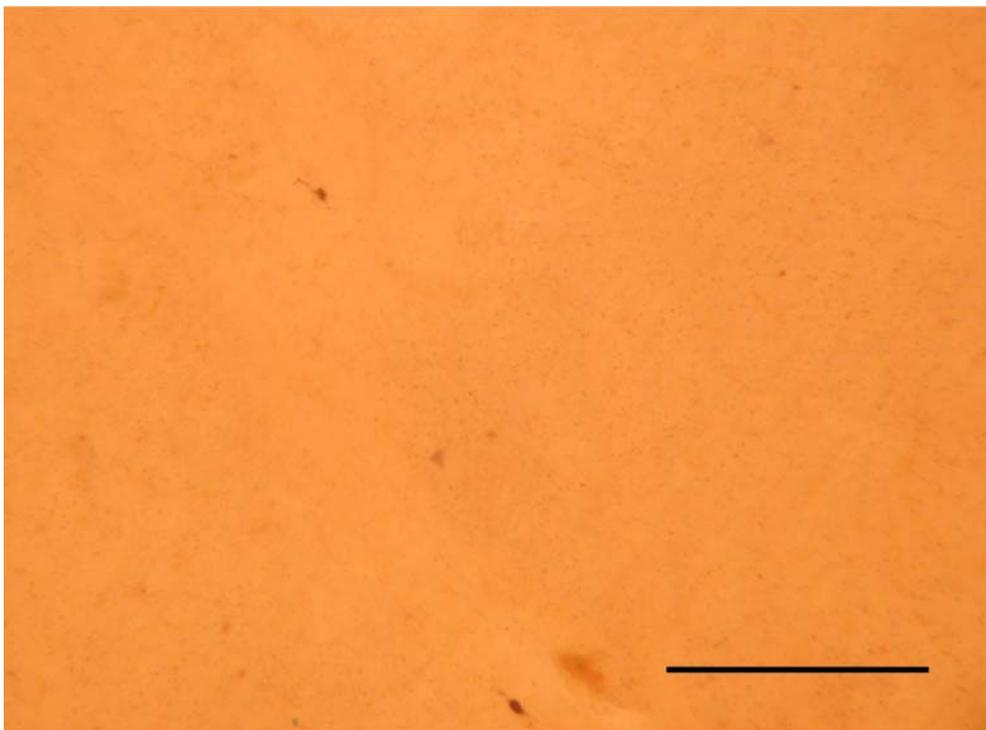


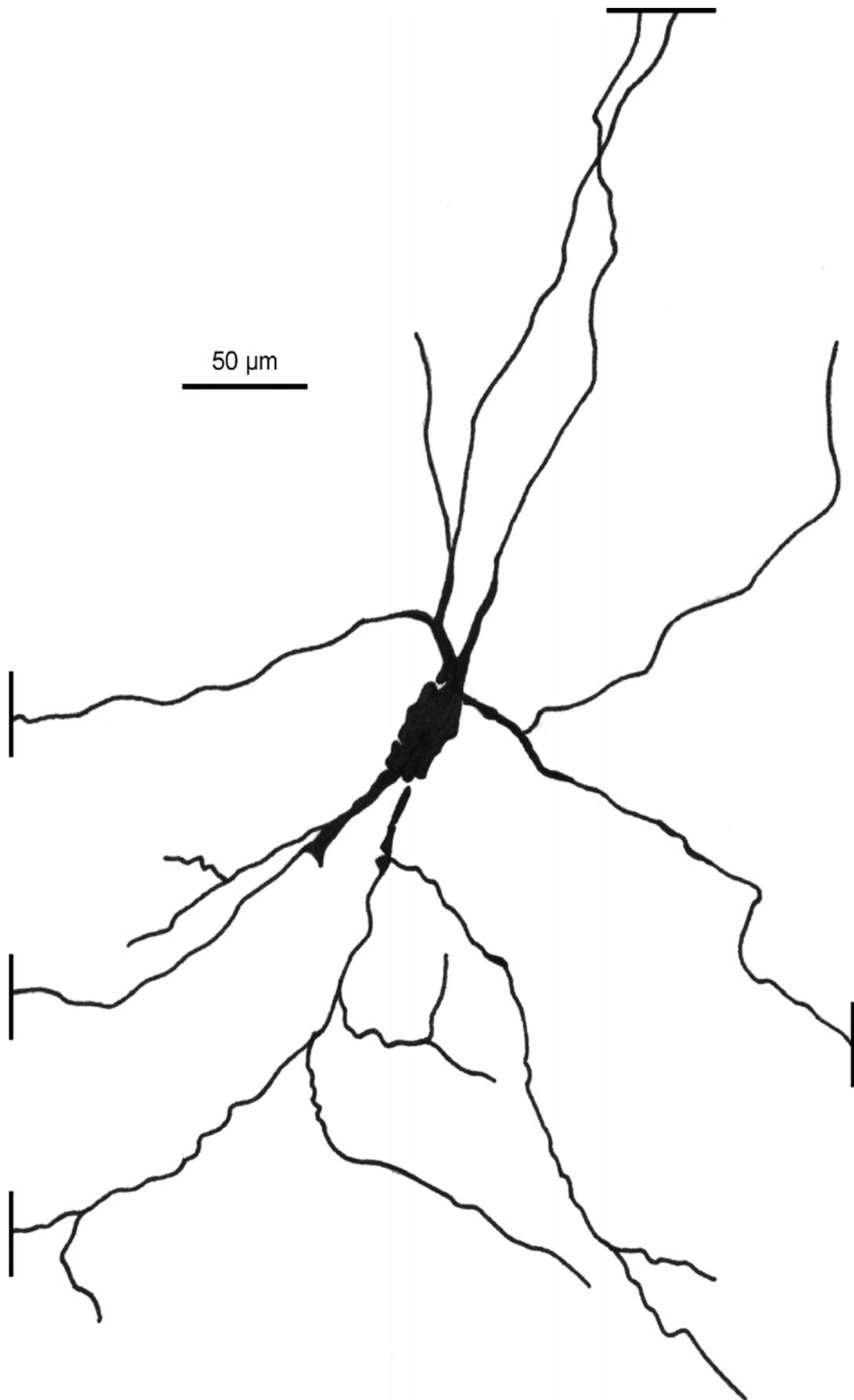
Abb. IV.26: Übersichtsaufnahme eines schizophrenen Gehirns. Die Aufnahme erfolgte ebenfalls in 40facher Vergrößerung und in vergleichbarer anatomischer Lokalisation innerhalb des Putamens. Der Balken entspricht wiederum 400 μm .

IV.4 NADPHd-positive Neurone im menschlichen Claustrum

Im Claustrum fanden sich NADPHd-positive Neurone, die eine ebenso exzellente Anfärbung aufwiesen wie die NADPHd-positiven Neurone des Putamens. Da die Anzahl der im Claustrum untersuchten NADPHd-positiven Neurone die im Putamen bei weitem unterschritt, wurde darauf verzichtet, eine allzu differenzierte Klassifikation vorzunehmen. Anhand ihrer Morphologie konnten – zumindest im vorliegenden Untersuchungsgut – folgende Neuronenformen unterschieden werden:

Die erste Form imponierte durch Ausdehnung und Dichte des Dendritenbaumes. Von einem rundlichen, im Vergleich zum Dendritenbaum eher kleinen Soma entspringen vier bis fünf dicke Stammdendriten, die sich erst in einigem Abstand zum Soma in viele dünne Äste aufzweigen, die zentrifugal in alle Richtungen des Raumes zeigen. Aufgrund ihres nur leicht gewundenen Verlaufes kommt es kaum zu Überkreuzungen der einzelnen Äste. Ein Neuron dieser Morphologie ist exemplarisch in Abbildung IV.27 dargestellt. Es lässt sich den großen *spine*-losen Neuronen nach Braak [46] zuordnen.

Abb. IV.27 (S. 88): **NADPHd-positives Neuron des menschlichen Claustrums.** Dendriten, die aufgrund ihrer Ausdehnung nicht vollständig abgebildet werden konnten, wurden durch eine Linie abgesetzt.



In Bezug auf Ausdehnung und Dichte des Dendritenbaumes kommt die zweite Neuronenform dem nahe (Abb. IV.28). Der Unterschied zu der zuerst beschriebenen Form liegt in ihrem eher bipolaren Aufbau: An den Polen des relativ großen, ovalen Somas nehmen jeweils mehrere, dünne wie dicke Stammdendriten ihren Ausgangspunkt. Die ersten Verzweigungen befinden sich bereits nah am Zellkörper. Die Äste der dicken Dendriten verlieren dabei schnell an Durchmesser. Einige der daraus resultierenden Äste ändern im Verlauf die Richtung. Insgesamt gesehen teilen sich die Dendriten nur selten. Neurone dieser Morphologie lassen sich am ehesten mit den großen *spine*-losen Neuronen nach Braak [46] vergleichen.

Abb. IV.28 (S.90): **NADPHd-positives Neuron des menschlichen Claustrums.** Der Balken entspricht 50 μm . Dendriten, die aufgrund ihrer Ausdehnung nicht vollständig abgebildet werden konnten, wurden durch eine Linie abgesetzt.



Die dritte Form (Abb. IV.29) zeichnet sich durch den geringen Verzweigungsgrad seiner Dendriten und seinen dadurch nur sehr lichten Dendritenbaum aus. Vom rundlichen Soma gehen meist drei dicke Dendritenstämme ab, die mit jeder Aufzweigung dünner werden. Die einzelnen Dendriten verzweigen sich kaum mehr als zweimal. Alle Äste nehmen einen relativ geradlinigen Verlauf.

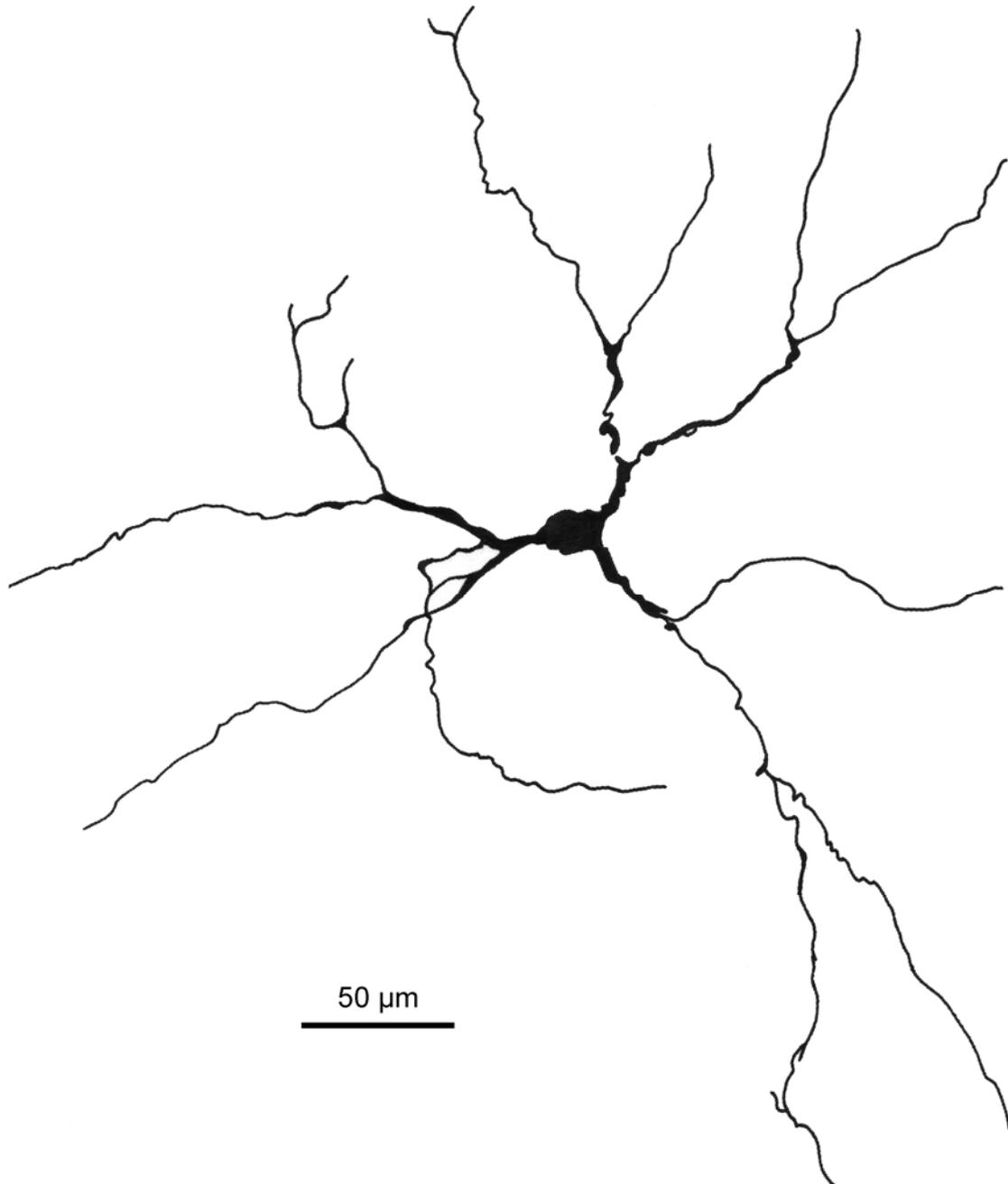


Abb. IV.29: NADPHd-positives Neuron des menschlichen Claustrums.

Damit entspricht diese Form wahrscheinlich den kleinen *spine*-losen Neuronen nach Braak [46].

Die vierte Form, die keiner bislang publizierten Einteilung zuzuordnen ist, entsprach einem kleinen, strikt bipolar aufgebauten Neuron. Der Ursprung der beiden Stammdendriten befindet sich an gegenüberliegenden Punkten des fast kreisrunden Somas. Der Verzweigungsgrad der Dendriten kann sich stark unterscheiden. V. a. die dünnen Endäste zeigen einen geschlängelten Verlauf (Abb. IV.30). Mikrophotographien von Neuronen der beschriebenen Formen sind in Abbildung IV.31 dargestellt.

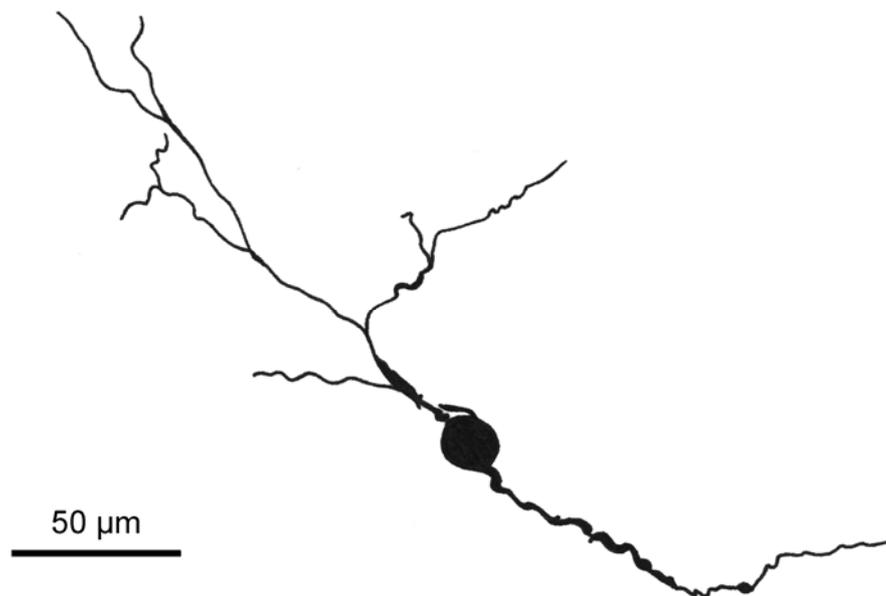


Abb. IV.30: NADPHd-positives Neuron des menschlichen Claustrums.

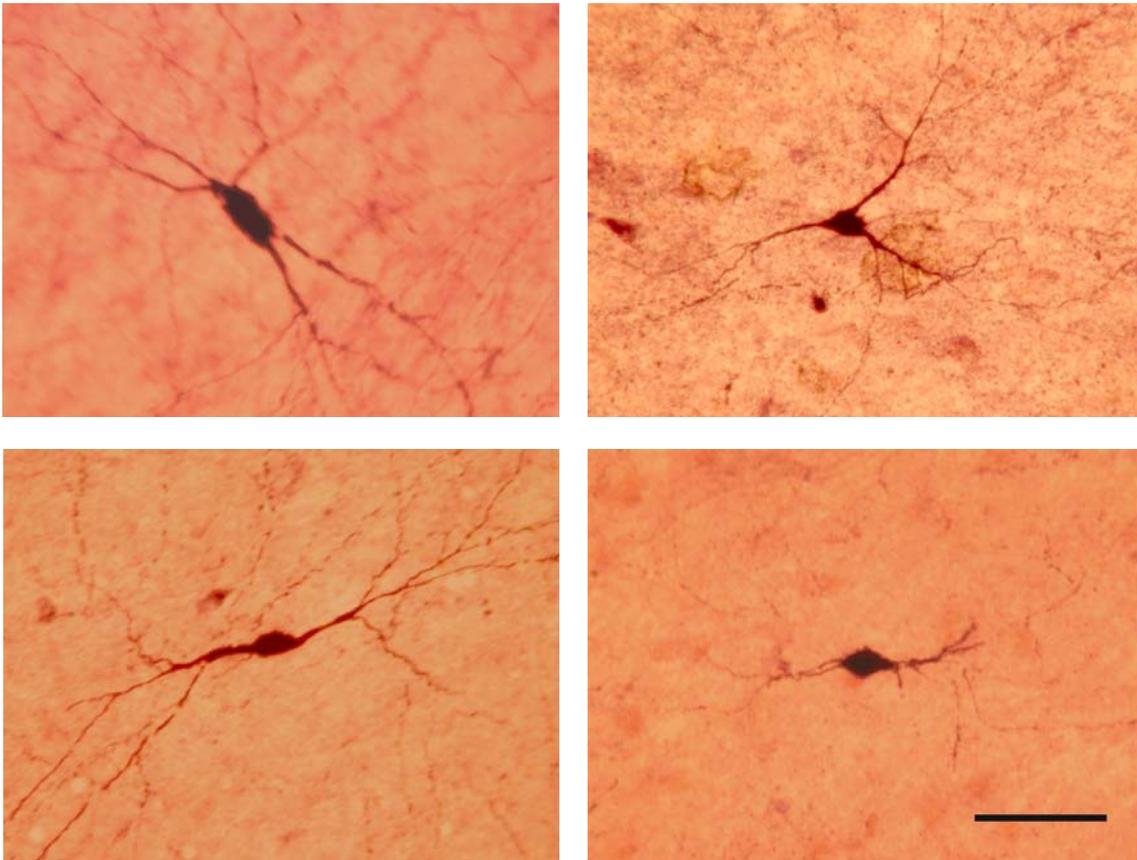


Abb. IV.31: Mikrophotographien NADPHd-positiver Neurone des menschlichen Claustrums. Der Balken entspricht 100 μm .

IV.5 NADPHd-positive Neurone der Capsulae externa et extrema des Menschen

Während der Untersuchung der bereits erwähnten Kerngebiete fielen auch NADPHd-positive Neurone in der das Claustrum umgebenden weißen Substanz auf. Sowohl in der Capsula externa als auch in der Capsula extrema konnten in den Präparaten aller untersuchten Gehirne solche Neurone beobachtet werden. Die Qualität ihrer Anfärbung entsprach der der NADPHd-positiven Neurone von Putamen und Claustrum. Die Neurone der weißen Substanz unterschieden sich zum Teil erheblich in ihrer Ausdehnung und im Verzweigungsgrad ihrer Dendriten. V. a. große Neurone verfügten über eine bipolare Ausrichtung ihres Dendritenbaumes, der häufig parallel zum Faserverlauf in den beiden Kapseln verlief. Beispiele der vorgefundenen Neurone sind als Camera lucida-Zeichnungen bzw. als Mikrophotographien in den Abbildungen IV.32 bis IV.35 (S. 94 – 97) bzw. IV.36 (S. 98) dargestellt.

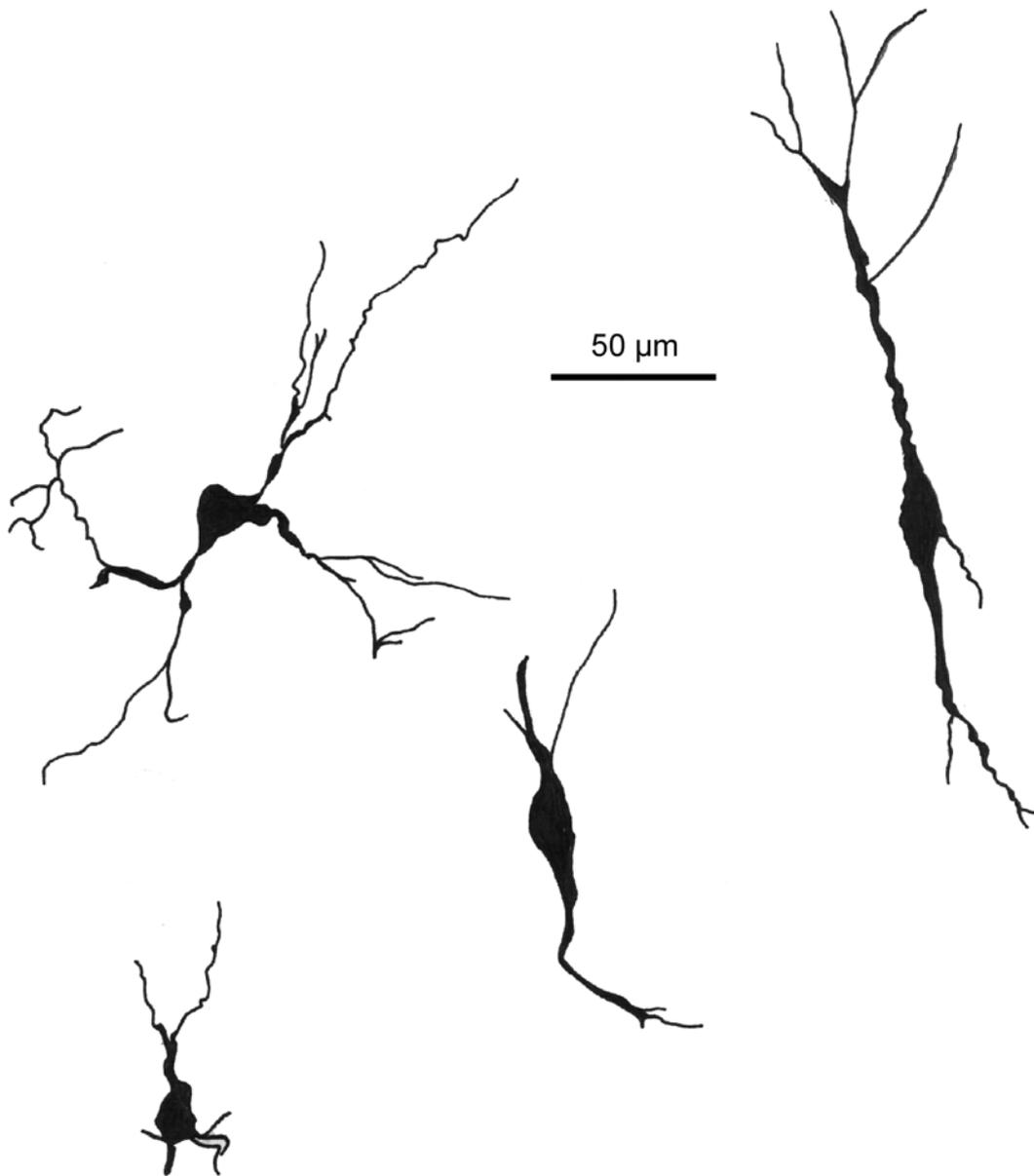


Abb. IV.32: NADPHd-positive Neurone der Capsula externa. Dargestellt sind Beispiele kleiner Neurone.

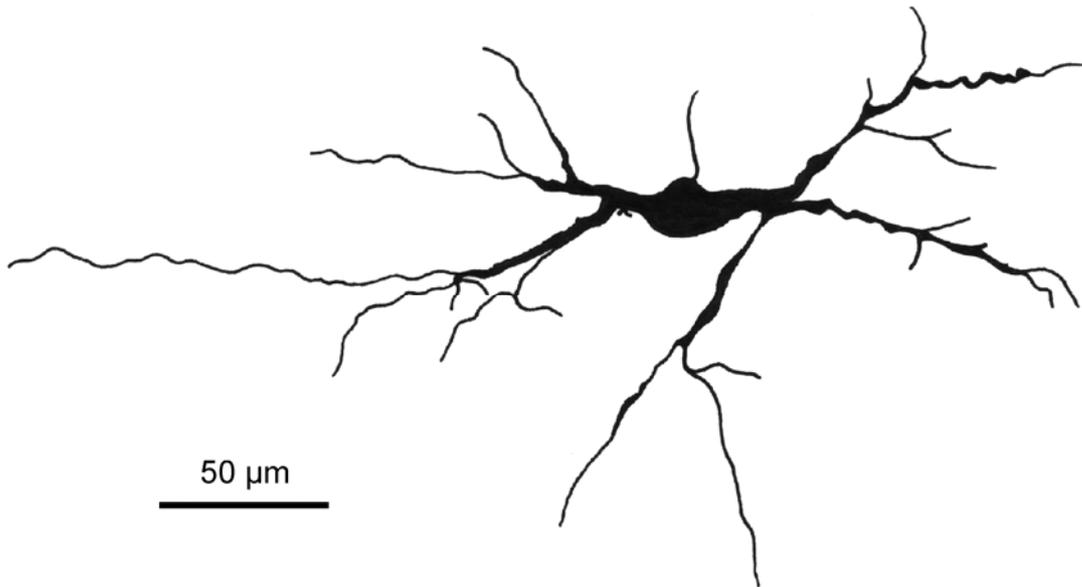


Abb. IV.33: NADPHd-positives Neuron der Capsula externa. Dargestellt ist ein mittelgroßes Neuron mit einem relativ dichten Dendritenbaum.

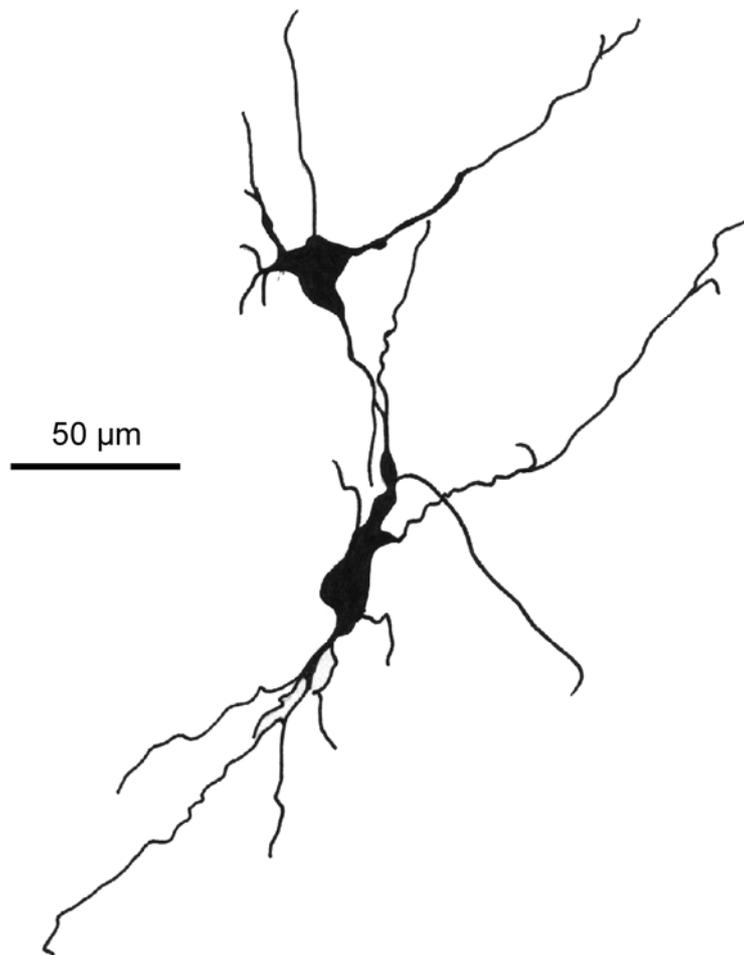


Abb. IV.34: NADPHd-positive Neurone der Capsula externa. Dargestellt sind zwei mittelgroße Neurone, wie sie auch im Präparat nebeneinander lokalisiert sind.

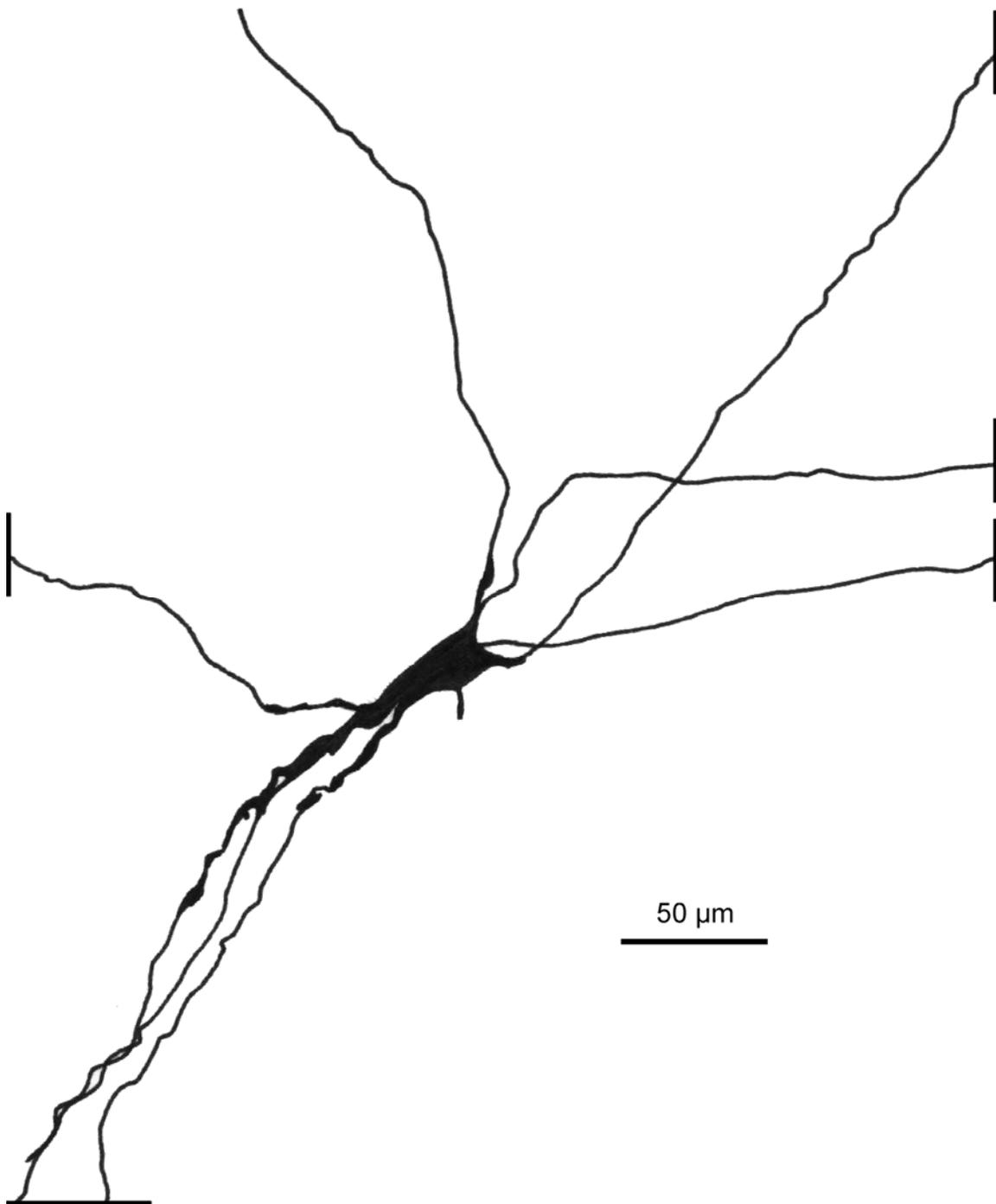


Abb. IV.35: NADPHd-positives Neuron der Capsula externa. Dargestellt ist ein großes, bipolar ausgerichtetes Neuron, dessen Dendriten sich kaum verzweigen. Dendriten, die nicht vollständig abgebildet sind, wurden durch eine Linie abgesetzt.

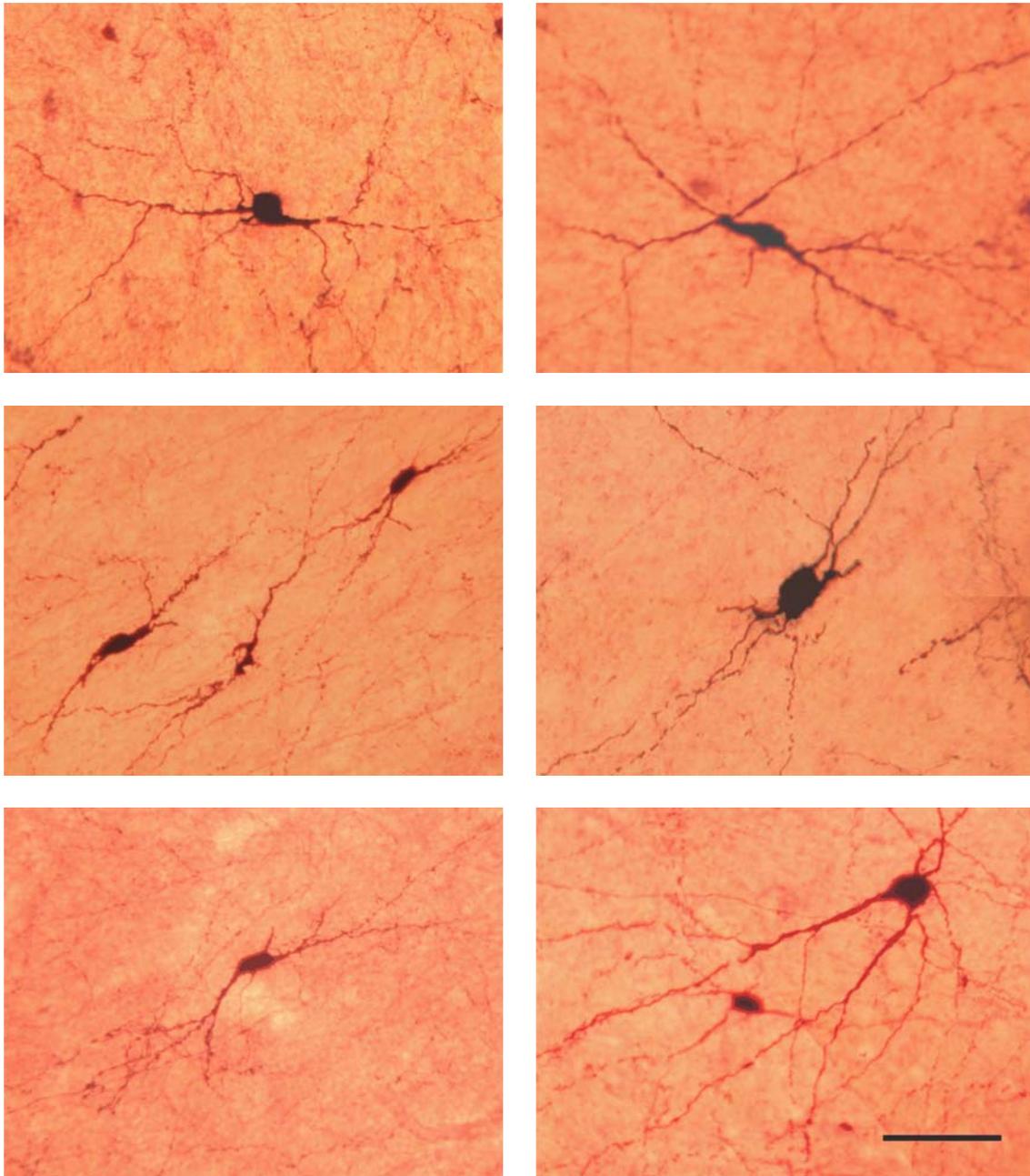


Abb. IV.36: NADPHd-positive Neurone der das Claustrum umgebenden Kapseln. Der Balken entspricht 100 μ m.

V. Diskussion

V.1 Methodische Überlegungen

V.1.1 NADPHd-Färbung

Bei allen wissenschaftlichen Studien stellt sich die Frage, ob die angewandten Methoden auch das darstellen, was man untersuchen möchte. Gleiches gilt für die vorliegende Arbeit. Was sind also die biochemischen Grundlagen der NADPHd-Färbung und was wird durch sie dargestellt?

Als Diaphorase werden im Allgemeinen Flavoproteine bezeichnet, die das reduzierte Koenzym Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) wieder zu NADH/H^+ und NADPH/H^+ oxidieren, wobei der dabei freigesetzte Wasserstoff auf verschiedene Akzeptoren übertragen werden kann. Diese Enzyme werden zur Gruppe der Dehydrogenasen gerechnet. Daher verwundert es nicht, dass die NADPH-Diaphorase-Färbung ihren eigentlichen Ursprung in der Histochemie der Dehydrogenasen hat. Bei ihren Untersuchungen auf diesem Gebiet stellten Thomas und Pearse bereits 1961 an unfixierten Gefrierschnitten des ZNS fest, dass es infolge der Reduktion des synthetischen Chromogens Nitroblautetrazolium in Gegenwart von NADPH zur Darstellung von so genannten *solitary active cells* kam. Scherer-Singler *et al.* bedienten sich dieser Technik 1983 um das Verteilungsmuster dieses Enzyms im Rattenhirn zu beschreiben [313]. Grundlage dieser Versuche war formaldehyd- und glutaraldehydfixiertes Gewebe. Weil die Anfärbbarkeit trotz Fixierung gegeben war, schlossen die Autoren, dass es sich bei der detektierten NADPH-Diaphorase (NADPHd) um ein formaldehyd- und glutaraldehydresistentes Enzym handelt.

Die NADPHd-Reaktion wurde über Jahrzehnte intensiv zur Untersuchung des ZNS verschiedener Spezies genutzt, ohne genaue Kenntnis darüber zu besitzen, was die Neurone, die sich anfärbten, von denjenigen unterschied, die sich nicht anfärbten. Erst zu Beginn der 90er Jahre gelang es verschiedenen Forschergruppen, die molekulare Identität der NADPH-Diaphorase aufzuklären:

1991 stellten Hope und Kollegen in Homogenaten von Rattengehirnen mithilfe mehrerer methodischer Ansätze fest, dass es sich bei der NADPH-Diaphorase um eine NO-Synthase handelt [172]. Die Arbeitsgruppe um Bredt fand heraus, dass in Neuronen die NADPH-Diaphorase [48] mit der mRNA der NOS-I kolokalisiert war, und untermauerten damit den Identitätsnachweis beider Enzyme. Damit etablierten sie neben anderen die NADPHd-Reaktion als eine histochemische Markierungsmöglichkeit für die NO-Synthase. Nachdem großes Interesse an Vorkommen und Funktion von NOS bestand und noch immer besteht, wird diese Färbemethode auch heute noch in zahlreichen Arbeiten benutzt.

Nach heutigem Stand der Kenntnis ist die Diaphorase-Eigenschaft in der Reduktase-Domäne der NO-Synthase zu lokalisieren [228,314,344]. Zwar besitzen alle drei NOS-Isoformen Diaphorase-Aktivität [228,344], dennoch kann die NADPHd-Histochemie je nach NOS-Isoform variieren [48,84,102,172,315]. Zum Nachweis von NOS-II und NOS-III wurde diese Methode jedoch in der Vergangenheit weniger ausführlich dokumentiert, als es bei NOS-I der Fall war, was nicht zuletzt daran liegen mag, dass im ZNS vorwiegend NOS-I exprimiert wird.

Die Diaphorase-Eigenschaft zeigt sich außergewöhnlich resistent gegenüber Gewebefixativen wie Aceton und Formaldehyd. Neben den physiologischen Substraten Cytochrom c und Cytochrom P450 können durch sie auch die für histochemische Zwecke interessante Substanzen Methyleneblau, Hexacyanoferrat (III) und Tetrazoliumsalze reduziert werden. Beide Eigenschaften prädestinieren die NADPH-Diaphorase dazu, ihre katalytische Fähigkeit für histochemische Färbungen zu nutzen. Da neben NOS auch andere Enzyme über Diaphorase-Fähigkeiten verfügen, ist es gerade die ausgeprägte Resistenz der zur NOS gehörigen NADPH-Diaphorase gegenüber Gewebefixativen, die die (Pseudo-)Enzymspezifität der NADPH-Diaphorase bedingt: Während andere Diaphorasen durch die Fixierung ihre katalytische Aktivität verlieren, behält allein NOS diese Fähigkeit bei und die Diaphorasereaktion kann dadurch zum spezifischen Nachweis von NOS herangezogen werden [239]. Unterschiedliche Fixierungsbedingungen lassen zwar die Selektivität der NADPHd-Histochemie unangetastet, können aber die Färbintensität beeinflussen [334]. Eine Ausnahme davon bildet die zu schwache Fixierung, die allem Anschein nach einen

Aktivitätsverlust der NADPH-Diaphorase verursacht und in deren Folge sich zu wenige Zellen anfärben [140].

Trotz des Nachweises der Identität zwischen NADPH-Diaphorase und NOS scheint die Anzahl NADPHd-positiver Neurone nicht unbedingt der Anzahl immunhistochemisch gefärbter NOS-I-positiver Neurone zu entsprechen: Im menschlichen Hippokampus liegen Hinweise darauf vor, dass nicht alle NOS-I-positiven Neurone auch NADPHd-positiv reagieren und damit die Zahl NOS-I-positiver Neurone unterschätzt wird [99]. Kritisch muss jedoch angemerkt werden, dass die Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper etwas fragwürdig ist, da der Befund einer Expression von NOS-I in CA1-Pyramidenzellen bislang von keiner Arbeitsgruppe repliziert werden konnte, auch nicht auf mRNA-Ebene. Es ist nicht bekannt, inwieweit diese Fehlermöglichkeit auch für andere Hirnregionen zutrifft. Ein möglicher Grund für die Divergenz mag im Unterschied der Prinzipien liegen, auf denen Enzym- und Immunhistochemie basieren: Während die eine Färbetechnik die Funktionsfähigkeit eines Enzyms voraussetzt und nutzt, beruht die andere dagegen auf der Bindung des Antikörpers an bestimmte Strukturelemente. Diese könnten jedoch ebenfalls durch die Einwirkung eines denaturierenden Agens verändert werden. Ein weiterer möglicher Grund für die Divergenz mag darin bestehen, dass die NADPHd-Färbung vom Aktivitätsniveau der NOS abhängt und vornehmlich zum Zeitpunkt der Fixierung aktive NOS zur Darstellung bringt [247]. Für das Striatum von Ratten allerdings gelang Kharazia und Schmidt der Nachweis der kompletten Kollokalisierung von NADPHd und NOS-I [193].

Obwohl mittlerweile neue Färbetechniken etabliert wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die NADPHd-Färbung noch immer ein adäquates Mittel zur Untersuchung NOS-I-positiver Neurone darstellt. Einem minimalen Aufwand steht ein großes Analyse-Potential gegenüber, weil sich im Vergleich zu immunhistochemischen Fluoreszenz-Färbungen nicht nur Anzahl und Verteilung, sondern auch die Morphologie von Soma und Dendritenbaum besser beurteilen lassen. Darüber hinaus lassen sich die Untersuchungen so häufig wie nötig an einfachen Lichtmikroskopen durchführen, ohne dass gefärbte Präparate durch die Untersuchung Schaden nehmen und damit Informationen verloren gehen würden.

Gegenüber rein histologischen Färbetechniken wie Versilberungen bietet diese Färbung den Vorteil, dass Aussagen über die Enzymausstattung des positiven Neurons getroffen und damit Rückschlüsse auf funktionelle Netzwerke gezogen werden können. Im Striatum erwies es sich zudem als günstig, dass nicht alle Neurone angefärbt wurden, wie es bei Versilberungen der Fall ist. Da im Striatum die weitaus meisten Neurone Projektionsneurone sind und diese wiederum keine NADPH-Diaphorase exprimieren, kamen hauptsächlich Interneurone zur Darstellung, mit der Folge dass insgesamt weniger Neurone untersucht werden mussten, um eine Einteilung der Interneurone vornehmen zu können.

Problem aller enzymhistochemischen Färbungen ist, dass sie die Funktionsfähigkeit des entsprechenden Enzyms voraussetzen. Ihre hohe Resistenz gegenüber vielen Gewebefixativen unterscheidet die NADPH-Diaphorase der NOS von vielen anderen Enzymen. Das führt einerseits dazu, dass die nach Fixierung detektierte Diaphorase-Aktivität eigentlich nur auf die Reduktase-Domäne der NOS zurückgeführt werden kann, und andererseits dazu, dass bei relativ frischem Gewebe die Funktionsfähigkeit dieses Enzyms praktisch immer gegeben ist. Bei Gewebe jedoch, das länger als 5 Jahre in ungepuffertem 4%igem Formalin gelagert worden war, war die katalytische Aktivität der Diaphorase zusammengebrochen und eine Färbung nicht mehr möglich. Daran änderten auch Optimierungsversuche nichts: Eine Steigerung der Substratkonzentrationen von NBT und NADPH auf das 1,5- und 2fache hatte lediglich eine stärkere Hintergrundfärbung zur Folge. Die Neurone an sich zeigten in anfärbbarem Gewebe keine bessere Darstellung, in nicht anfärbbarem Gewebe waren weiterhin keine positiven Zellen zu erkennen. Die Behandlung mit Mikrowellen, eine in früheren Studien vorgeschlagene Optimierungsmöglichkeit, resultierte bei allen Proben in einer äußerst ungleichmäßigen Anfärbung, in der bei keinem der Schnitte eine Auswertung möglich war. Der Zusatz von Malonsäure – wie er in manchen Anleitungen empfohlen wird – führte gar dazu, dass in keinem der Präparate – egal ob in vorhergehenden NADPHd-Färbungen bereits positive Ergebnisse erzielt worden waren oder nicht – angefärbte Neurone zu finden waren.

Trotz der genannten Einschränkungen ist die NADPHd-Färbung ein einfaches, aber wirkungsvolles Mittel, NADPHd-positive Neurone präzise in ihrer Gesamtheit

darzustellen: Sowohl Soma als auch Dendritenbaum und Fasernetzwerke dieser Neurone lassen eine gleichmäßige, Golgi-ähnliche [173,307,313] Färbung erkennen. Dies ist auf die intrazelluläre Lokalisation der NOS-I zurückzuführen, die an prä- und postsynaptische Bereichen des Neurolemms [19,62], an die äußere Mitochondrien-Membran, an das endoplasmatische Reticulum sowie an Mikrotubuli [21] assoziiert, innerhalb von *spines* [14] oder frei im Zytosol [21] vorliegen kann. Diese Untersuchungen erfolgten allerdings zum Großteil durch immunozytochemischen Nachweis der NOS-I. Hope und Vincent beobachteten als Ergebnis der NADPHd-Reaktion eine vorwiegend membrangebundene Färbung und schlossen daraus, dass es sich um ein membrangebundenes Enzym handelt [173]. Rothe *et al.* [299] lokalisierten in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung NOS-I als Enzym an sich hauptsächlich zytosolisch, also von Membranen entfernt, während das Reaktionsprodukt der NADPH-Diaphorase sich an Membranen angelagert fand.

V.1.2 Camera lucida-Zeichnungen

1814 stellte Giovanni Battista Amici das Prinzip der Camera lucida vor. Ernst Abbe entwickelte dieses Prinzip weiter und führte seinen darauf basierenden mikroskopischen Zeichenapparat ein. Mit diesen Methoden standen der damals noch jungen mikroskopischen Forschung Methoden zur Verfügung, exakte Abbilder von Zellen und Zellgruppen zu schaffen, die einer breiteren Öffentlichkeit zugänglich waren, als es beim mikroskopischen Präparat der Fall gewesen wäre. So verwundert es kaum, dass diese Technik ab der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts in medizinischen Abhandlungen häufig zum Einsatz kam, lange bevor mikrophotographische Aufnahmeverfahren verfügbar waren.

Trotz der heute weit verbreiteten digitalen Aufnahmetechniken, hat dieses Verfahren seine Bedeutung nicht vollständig verloren: Auch heute noch – fast zwei Jahrhunderte später – wird diese Methode zur Erstellung und Illustration morphologischer Studien herangezogen.

Der Grund für diese Tatsache zeigte sich auch im Verlauf dieser Studie: Mithilfe des Abbe'schen Zeichenapparates konnten sehr leicht exakte Abbildungen der Neurone angefertigt werden. Gegenüber Mikrophotographien hatte diese Technik den großen

Vorteil, dass mit einfachsten Hilfsmitteln und ohne großen Aufwand das Neuron und sein gesamter Dendritenbaum nachgezeichnet werden konnten. Weder Größe noch Ausdehnung in verschiedene Ebenen stellte aufgrund der Möglichkeiten am Lichtmikroskop dabei ein Problem dar: Durch unterschiedliche Fokussierung konnten Dendritenabschnitte in allen Ebenen des Präparates, durch Verschieben von Präparat und Zeichenpapier auch entfernte Anteile abgebildet werden. Die so entstandenen Zeichnungen erwiesen sich als hervorragende Grundlage für weitere Auswertungen, da sie nur das erwünschte Neuron ohne störende Nachbarzellen oder umgebendes Faserwerk darstellten.

V.1.3 Statistisch-morphologische Analysemethoden

Ziel der angewendeten Analyse-Verfahren war es, als Werkzeug für die Zuordnung von Neuronen zu unterschiedlichen Gruppen zu fungieren bzw. eine objektive Bestätigung für die zuvor rein morphologisch gewonnene Einteilung zu liefern. Diese Ziele wurden jedoch nur zum Teil erreicht.

Zusammenfassend lässt sich zur Sholl-Analyse [325] und zur topologischen Analyse [348,349,353-355,359-361] sagen, dass sie – wenn überhaupt – nur als Hilfsmittel dienen können, Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen, die morphologisch definiert wurden, zu untermauern und ihnen objektive Zahlenwerte zuzuordnen. Dies bedeutet aber nicht nur, dass kaum neue Erkenntnisse durch die beiden genannten Verfahren zu gewinnen sind, sondern dass zum Teil sogar morphologisch eindeutig unterschiedliche Neurone laut den Ergebnissen dieser Auswertungen sich kaum voneinander unterscheiden. Dies traf überwiegend auf die topologische Analyse zu, in der die Dimension des einzelnen Neurons keine Beachtung findet, obwohl die Ausdehnung des Dendritenbaumes und die Länge der einzelnen Dendriten und ihrer Segmente sehr zu den Unterschieden zwischen den einzelnen Neuronentypen beitragen. Ein weiteres Problem der topologischen Analyse bestand darin, dass als Ergebnis den Neuronen eher abstrakte Werte zugeordnet wurden, die teilweise nur schwer nachvollzogen werden konnten.

Die Darstellung des Dendritenbaumes im Scholl-Raster erwies sich als probates Mittel, seine Grundstruktur klar abzubilden, da verschlungene Dendriten-Verläufe und

gegenseitige Überkreuzungen dadurch strukturiert wiedergegeben werden konnten. Auf diese Weise konnte die Systematik und Ausdehnung des Dendritenbaumes auf einen Blick erfasst werden. Dieser Umstand brachte bei gleichzeitiger Anwendung beider Methoden den Vorteil mit sich, dass aus den Sholl-Rastern das Verzweigungsmuster sowie die Anzahl von Segmenten, End- und Verzweigungspunkten leicht für die topologische Analyse abgeleitet werden konnten.

Trotz allem erwies sich letztendlich die Beurteilung der Morphologie von Soma und Dendritenbaum als bestes Werkzeug für die Einteilung von Neuronen. Ihre Ergebnisse erschienen am plausibelsten und waren am leichtesten auf „neue“, unbekannte Zellen anwendbar. Nichts desto weniger hat auch diese Methode ihre Nachteile: Die Beurteilung der Morphologie setzt eine gewisse Erfahrung im Arbeiten mit morphologischen Fragestellungen voraus. Eine mehr oder minder starke Subjektivität des Untersuchers bleibt immer erhalten. Die größte Schwierigkeit besteht allerdings darin, dass selbst Neurone innerhalb klar definierter Gruppen nie identisch sind und strukturelle Variationen aufweisen, die eine eindeutige Zuordnung bisweilen schwierig machen. Das mag ein Grund dafür sein, weshalb diese operationalisierte und kategoriale Herangehensweise an die Zuordnung der Neurone nicht unbedingt in den Ergebnissen dimensionaler oder topologischer Verfahren reflektiert wird.

V.2 Ergebnisse

V.2.1 NADPHd-positive Interneurone im Striatum Gesunder

V.2.1.1 Klassifikation striataler NADPHd-positiver Neurone

Mithilfe der in der vorliegenden Arbeit angewandten NADPHd-Färbung war es möglich, eine Klassifikation striataler NADPHd-positiver Neurone des menschlichen Striatums aufzustellen. Dabei konnten auf morphologischer Basis insgesamt 12 Typen (NADPHd I bis NADPHd XII) unterschieden werden (siehe Kap. IV.2), die sich nur zum Teil in bereits etablierten, Golgi-basierten Klassifikationen wieder fanden. Böckelmann *et al.* [38] teilten in ihrer Untersuchung NADPHd-positive Neurone in drei weniger differenzierte Kategorien ein: multipolare, trianguläre und bipolare

Nervenzellen. Diese Grundformen finden sich auch in den 12 neu definierten Typen der vorliegenden Studie wieder.

V.2.1.2 Bedeutung morphologisch basierter Klassifikationssysteme

Da jede am Präparat nachgewiesene Struktur letztlich Resultat eines molekularen Vorgangs ist, stellen sowohl die (Enzym-)Histochemie als auch die Immunhistochemie eine Verbindung zwischen Morphologie und Funktion her. Dies trifft insbesondere für die in dieser Arbeit angewandte NADPHd-Färbung zu, die Aussagen zu beiden Aspekten ermöglicht.

Ein auf diese Weise im Gesunden ermittelter „Normalzustand“ der Morphologie kann also nicht nur als Grundlage dienen für den Nachweis von Veränderungen in der Morphologie, sondern auch von Veränderungen in der Funktion. Die in dieser Studie vorgenommene Klassifikation NADPHd-positiver Neurone des menschlichen Striatums bei neurologisch gesunden Patienten sollte den Normalzustand beschreiben, von dem ausgehend nach Veränderungen bei verschiedenen Erkrankungen des ZNS gesucht werden kann.

V.2.1.3 Bedeutung striataler NADPHd-positiver Neurone

In früheren Untersuchungen konnte eine Zunahme der Anzahl von striatalen Interneuronen im Verlauf der Phylogenese gezeigt werden [104,171,188,189,209]. Man kann wohl davon ausgehen, dass Interneurone beim Primaten eine größere Rolle in der integrativen und funktionellen Organisation des Neostriatums spielen, als es im Gehirn von Nagern der Fall ist. In dieser Hinsicht könnte eine ausführlichere morphologische Klassifikation der Interneurone des menschlichen Striatums weitere Einsichten in die Vielfalt und Organisation striataler Neurone liefern.

Beim Primaten machen Interneurone etwa 10-25% aller striatalen Neurone aus. Sie können aufgrund ihres unterschiedlichen Protein-Expressionsusters in vier Hauptkategorien eingeteilt werden: Calretinin-(CR-)positive Zellen, Parvalbumin-(PV-)positive Zellen, Cholin-Acetyltransferase-(ChAT-)positive cholinerge Zellen und NOS-positive Zellen. NADPHd/NOS-I-positive Neurone koexprimieren außerdem NK1-Rezeptoren, Somatostatin (SOM) und Neuropeptid Y (NPY) [204,317]. NO hat

offensichtlich einen bedeutenden Einfluss auf die neuronale Aktivität des Striatums [96], was sich in den Verschaltungen dieser Interneurone widerspiegelt: Nitrinerge Neurone empfangen Afferenzen von glutamatergen Neuronen des Kortex [300,364], von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra [126] sowie von Substanz P-exprimierenden Projektionsneuronen [225] und bilden Synapsen sowohl mit cholinergen Interneuronen [363] als auch mit GABAergen Projektionsneuronen [94,342].

Mit elektrophysiologischen Methoden konnten im Striatum zwei in ihren Entladungsmustern differente Neuronenpopulationen unterschieden werden. Dabei gelten die sich nur sporadisch entladenden Neurone als Projektionsneurone, die kontinuierlich sich entladenden Neurone dagegen als Interneurone [376]. Diese beiden Neuronenarten lassen sich zusätzlich durch ihre Reaktion auf NO unterscheiden: Während sporadisch feuernde Neurone mit Hemmung auf NO reagieren, zeigen kontinuierlich feuernde Neurone keinerlei signifikante Änderung in Menge und Muster der Entladung [310]. Das von Interneuronen produzierte NO übt also einen inhibitorischen Einfluss auf Projektionsneurone [310,373] aus, aktiviert aber cholinerge Neurone [67,153] und erleichtert die Freisetzung von Glutamat und Dopamin im Striatum [370,372]. Analog dazu vermindern NOS-Inhibitoren die Dopamin-Freisetzung [45,309] und führen im Tiermodell zu Bewegungsstörungen [88,90], was die wichtige Stellung von NO innerhalb der Regulation von Bewegungen unterstreicht [16].

Darüber hinaus zeigt sich die enge Verbindung zwischen nitrinergem und monoaminergen Systemen [196] an der direkten Interaktion von NO mit Dopamin- [198,229,283], Serotonin- [18] und Noradrenalin-Transportern [192]: NO hemmt die jeweiligen Transporter und führt dadurch zu einer Zunahme dieser Monoamine im synaptischen Spalt. Da die NOS-I-abhängige Produktion von NO in enger Abhängigkeit zum NMDA-Rezeptor steht, stellt NO eine nicht-Rezeptor-gebundene Verbindung zwischen glutamatergem und monoaminergen Systemen her.

Neben der Kontrolle von Bewegungen besitzt das Striatum auch große Bedeutung für Lernen und Speichern motorischer Fähigkeiten. Zu diesem Zweck existieren zwei Formen synaptischer Plastizität an kortikostriatalen glutamatergen Synapsen. Als

zelluläres Substrat dieser Vorgänge wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen, die zur längerfristigen Änderung in der Effektivität der synaptischen Transmission striataler Projektionsneurone beitragen: *long-term potentiation* (LTP) und *long-term depression* (LTD). Calabresi und Kollegen konnten neben Glutamat und Dopamin NO aus striatalen Interneuronen als einen entscheidenden Faktor für letztere identifizieren. In ihren Untersuchungen verhinderte eine Applikation von NOS-I-Inhibitoren die Ausbildung einer LTD [65]. Im Gegenzug scheinen im Striatum hohe, experimentell erzeugte Konzentrationen von NO bzw. dessen *second messenger* cGMP alleine zu genügen, um eine LTD auszulösen [66]. NO kann demzufolge auch als wichtiger Faktor im Erlernen und Abspeichern motorischer Fähigkeiten angenommen werden.

O'Donnell und Grace konnten eine weitere physiologische Wirkung von NO demonstrieren: Das infolge einer Aktivierung kortikostriataler Afferenzen synthetisierte NO bewirkt eine Zunahme der Permeabilität von *gap junctions* zwischen Projektionsneuronen und kann dadurch funktionell zusammenhängende striatale Subsysteme synchronisieren [262]. Analog zu diesem Mechanismus stellt auch die Nitrosylierung von Monoamin-Transportern eine Form von nicht-synaptischer Neurotransmission dar, die ebenfalls dazu geeignet zu sein scheint, lokale Neuronenverbände zu synchronisieren [197]

Durch die Modulation der synaptischen Erregbarkeit striataler Projektionsneurone und die Verstärkung ihrer elektrischen Kopplung, kann NO das Gleichgewicht im Verhältnis zwischen Input und Output verändern, was wiederum Einfluss auf die Zielneurone in nachgeschalteten Kerngebieten hat [371]. Als Antwort auf kortikale oder pallidale Inputs regulieren sie daneben wahrscheinlich auch den lokalen Blutfluss im Striatum [141].

Aus dem Gesagten ergibt sich, dass NADPHd-positive Interneurone und das von ihnen synthetisierte NO eine zentrale Stellung für Integration und Verarbeitung von konvergenten motorischen Informationen innerhalb des striatalen Netzwerkes einnehmen [372].

V.2.1.4 Implikationen einer erweiterten Typologie nitriterger striataler Interneurone

Obwohl man bis jetzt davon ausging, dass NOS-I nur in kleinen bis mittelgroßen Interneuronen vorkommt, konnten dennoch in dieser Arbeit auch große (bis 600 μm) NADPHd-positive Interneurone gefunden werden. Ob diese Interneurone nun eine Untergruppe von Projektionsneuronen repräsentieren oder nicht, muss noch weiter untersucht werden. Da sie aber Typ III-Neuronen von Braak und den als efferent geltenden *giant reticular cells* von Leontovich ähneln [221], liegt es nahe, die Existenz zumindest einiger NOS-I-positiver Projektionsneurone anzunehmen. In diesem Fall würden sich Unterschiede in der Morphologie in unterschiedlichem Funktionieren und/oder in unterschiedlichen physiologischen Fähigkeiten widerspiegeln. Man kann nur darüber spekulieren, ob dies auch auf andere Klassen von Interneuronen zutrifft.

Bis jetzt wurde – trotz der momentanen extensiven Forschung auf diesem Gebiet – keine ausführliche Klassifikation NADPHd-positiver Neurone im menschlichen Striatum vorgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurden bereits bestehende Klassifikationssysteme striataler Interneurone mithilfe der NADPHd-Färbung erweitert und ergänzt. Auf diese Weise konnte ein Ausgangspunkt für weitere histopathologische Untersuchungen der Neurone geliefert werden, die wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei mehreren neurologischen Erkrankungen spielen. Es sollte dennoch nicht außer Acht gelassen werden, dass im menschlichen Striatum höchstwahrscheinlich noch weitere, morphologisch distinkte Neuronentypen existieren, die sich aus Neuronen zusammensetzen, die NOS-I nicht exprimieren. Da NOS-negative Neurone in dieser Studie nicht untersucht wurden, lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob und inwiefern diese in den hier beschriebenen Typen ihre Entsprechung finden.

Schwierigkeiten morphologisch basierter Klassifikationssysteme liegen darin begründet, dass man sogar innerhalb eng gefasster Neuronentypen mit strukturellen Variationen als auch neuronaler Plastizität rechnen muss (siehe Kap. V.1.3). Daher ist es unumgänglich, die angewendeten morphologischen Kriterien so klar wie möglich zu definieren. Während der Analyse von 5000 Zellen kristallisierten sich die einzelnen operationalen Kriterien immer stärker heraus und setzten sich zunehmend voneinander ab, so dass sich die daraus resultierenden Neuronenklassen so klar wie möglich voneinander

unterschieden. Trotz dieser Optimierung kann die hier vorliegende Einteilung nicht als definitiv angesehen werden. Dieses Klassifikationssystem kann also nur eine Arbeitshypothese anbieten, die morphologische und physiologische Untersuchungen miteinander in Zusammenhang setzt. Letztlich ist auch unklar, ob sich die unterschiedlichen Neuronentypen nicht auch (im Sinne neuronaler Plastizität) ineinander umwandeln können – ob sie also unterschiedlichen funktionalen Zuständen entsprechen – oder ob der Typ einer Zelle bereits bei deren Entstehung determiniert ist. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie muss jedoch davon ausgegangen werden, dass das Striatum des Menschen eine größere Heterogenität aufweist als bisher angenommen. Neuere Konzepte der Informationsverarbeitung im menschlichen Striatum (z. B. Ref. [43,331,374]) könnten so von der Einbeziehung anspruchsvollerer Modelle profitieren, die detaillierte morphologische Einteilungen striataler Interneurone mit mutmaßlich differentem Funktionieren verbinden. Dies muss allerdings noch in weiteren Studien etabliert werden. Daraus könnten wichtige Rückschlüsse auf die Pathogenese nicht nur von Morbus Huntington, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, sondern auch von schizophrenen Psychosen gezogen werden.

V.2.2 NADPHd-positive Neurone im Putamen Schizophrener

Ausgehend von den vielfältigen Funktionen des Putamens und von der zentralen Stellung von NO innerhalb des putaminalen Funktionierens mag es kaum verwundern, dass für mehrere neurodegenerative Erkrankungen Erkenntnisse über Veränderungen NADPHd-positiver Neurone vorliegen: Böckelmann und Kollegen konnten zeigen, dass bei Morbus Parkinson nicht nur die Gesamtzahl von Neuronen im Putamen vermindert ist, sondern insbesondere die Anzahl NADPHd-positiver Neurone [38]. Im Gegensatz dazu fand Mufson *et al.* eine Aussparung NADPHd-positiver Neurone des Putamens im Rahmen von Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer [255]. Die Neurone wiesen allerdings auch morphologische Veränderungen auf. Ähnliches konnte für Morbus Huntington gezeigt werden: Die Arbeitsgruppe um Ferrante demonstrierte ebenfalls eine Aussparung NADPHd-positiver Neurone von der im Verlauf auftretenden, Erkrankungs-bedingten Neurodegeneration [115,116]. Ziel der hier vorliegenden Arbeit

war es nun, analog zu den erwähnten neurodegenerativen Erkrankungen Auffälligkeiten NADPHd-positiver Neurone im Rahmen schizophrener Psychosen aufzuzeigen.

V.2.2.1 Auffälligkeiten NADPHd-positiver Neurone im Putamen Schizophrener

Im Untersuchungsgut dieser Studie konnten im Striatum schizophrener Patienten Veränderungen sowohl hinsichtlich der Dichte NADPHd-positiver Neurone als auch hinsichtlich ihrer Morphologie festgestellt werden: Im Putamen zeigte sich eine verminderte Neuronendichte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Manche Neurone wiesen eine bizarre Gestalt mit zum Teil verplumpten Dendriten auf, wie sie in der Kontrollgruppe nicht beobachtet werden konnten (Abb. IV.19 bis IV.22, S. 79-82).

V.2.2.2 Bedeutung des Striatums in der Pathogenese schizophrener Psychosen

Wie können diese Befunde nun in das gegenwärtige Konzept der Pathogenese schizophrener Störungen integriert werden?

Vieles deutet darauf hin, dass das Striatum in die Pathogenese schizophrener Psychosen involviert sein könnte: Neuropsychiatrische Erkrankungen wie Morbus Huntington und Morbus Wilson, die bekanntermaßen das Striatum betreffen, sind in ihrem klinischen Erscheinungsbild nicht nur durch ihre motorischen Dysfunktionen, sondern auch durch psychopathologische Auffälligkeiten geprägt, die einzelnen Symptomen schizophrener Psychosen ähneln [4,83]. Überdies können Medikamente, die gegen hypokinetische Bewegungsstörungen eingesetzt werden und von denen angenommen wird, dass sie im Striatum wirken – insbesondere L-DOPA und Dopaminagonisten –, psychotische Symptome verursachen [118]. Motorische Auffälligkeiten wie Hyper- und Akinesien, Parakinesien, Grimmassieren, Stereotypien und ähnliches können aber auch bei Medikamenten-naiven schizophrenen Patienten beobachtet werden, was bedeuten könnte, dass das Striatum sowohl in der Pathogenese der motorischen als auch der psychiatrischen Symptome involviert sein könnte [171]. Davon abgesehen wurden in einer Reihe von Untersuchungen bereits verschiedene Veränderungen auf histologischer und neurochemischer Ebene im Striatum Schizophrener gefunden. Dazu gehören u. a. Volumenzunahme des Striatums [59,162,167,218], Zu- [26] sowie Abnahme der Zellzahl [272], eine Verkleinerung dendritischer *spines* [296] und Abnormalitäten im

glutamatergen [15], dopaminergen [155,158,257] und cholinergen System des Striatums [86,171]. Eine verminderte, durch Neuroleptika allerdings normalisierbare metabolische Aktivität des Striatums bei Schizophrenen zählt außerdem zu dieser Reihe von Befunden [60,61,93,169,244,327].

Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, das Striatum und seine Komponenten im Hinblick auf Schizophrenie zu untersuchen. Gegenstand dieser Arbeit waren die nitrinergen Neurone dieses Kerngebiets, deren Transmitter NO bereits in Zusammenhang mit der Pathogenese schizophrener Störungen gebracht wurde.

V.2.2.3 Bedeutung von NO in der Pathogenese schizophrener Psychosen

Forschungsergebnisse aus vier Bereichen lieferten Hinweise auf eine Beteiligung von NO an der Pathogenese schizophrener Erkrankungen: Da Veränderungen im Gehirn Schizophrener in einer weitgehend akzeptierten Theorie als Entwicklungsstörung aufgefasst werden (siehe Kap. I.4), kann das erste Indiz in der bedeutenden Rolle von NO während der Entwicklung des Nervensystems gefunden werden [77]:

Im sich entwickelnden Gehirn weist NOS ein differenziertes Expressionsmuster auf: Im Striatum von Nagern sind NOS-positive Neurone von Tag E18 an vorhanden. Sie erscheinen im ventrolateralen Teil zuerst und bleiben bis zum Tag 3 nach der Geburt auch auf diesen Bereich konzentriert. Ihre Dichte nimmt bis zur ersten postnatalen Woche kontinuierlich zu, ist am 5. Tag *post partum* am höchsten, verringert sich danach aber aufgrund des Volumenwachstums des Striatums. Die Anzahl NADPHd-positiver Neurone hat ihr Maximum erst 3 bis 4 Wochen postnatal. Ihre volle Aktivität entfalten sie bis zum 14. Tag *post partum* [256]. Ähnliches gilt für das menschliche Gehirn: Im Striatum menschlicher Feten treten erste NOS-I-positive Neurone ca. in der 13. Gestationswoche (GW) auf und nehmen in ihrer Anzahl kontinuierlich zu, bis sie im Putamen mit 23-24 GW und im Ncl. caudatus etwas später mit 33-36 GW ihren numerischen Höhepunkt erreichen. Während das Gehirn an Volumen gewinnt, vermindert sich die Anzahl NOS-positiver Neurone, bis der Level Erwachsener erreicht ist. Dieser Verlauf mit anfänglicher Zunahme, Höhepunkt und anschließender Wiederabnahme kann in vielen Gehirnregionen zwar zeitlich versetzt, aber in seinem Verlauf immer gleich beobachtet werden. Die Bedeutung dieses Expressionsmusters ist noch

nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung mag sein, dass die vorübergehende Überproduktion von NOS-I nicht nur zur Vulnerabilität der einzelnen Entwicklungsphasen in den verschiedenen Gehirnabschnitten, sondern auch zur Neuronenreifung beiträgt und damit eine wichtige Stellung innerhalb der Entwicklung von Gehirnfunktionen einnimmt [266].

Erste Hinweise für das enge Zusammenspiel zwischen nitrinerem und dopaminergem System im Striatum findet man bereits in den ersten Tagen nach der Geburt: Zu diesem Zeitpunkt befinden sich nitrinerge Neurone mit Tyrosin-Hydroxylase-positiven Nervenzellen zu *patches* zusammengelagert [256].

Mit der Beeinflussung von Neuronenreifung und Synaptogenese nimmt NO eine wichtige Stellung innerhalb der ZNS-Entwicklung ein [131,164,264,380]. Im Gegenzug führen Störungen der NO-Freisetzung, wie sie z. B. durch Störungen bei der Migration NADPHd-positiver Neurone verursacht werden können, zu Mängeln in der Reifung und im Aufbau funktioneller Verbindungen von Neuronen, was Fehlfunktionen des ZNS nach sich zieht.

In verschiedenen Studien konnte im Tiermodell die Bedeutung von NO für den physiologischen Ablauf der Gehirnentwicklung gezeigt werden. Dabei führten Manipulationen am nitrineren System bei den Versuchstieren zu stabilen pathologischen Veränderungen. Manipulationen, die sich auf die Gehirnentwicklung auswirkten, führten im Gegenzug zu Veränderungen im nitrineren System:

Influenza-Virus-Infektionen *in utero*, ein etablierter Risikofaktor schizophrener Psychosen, verursachten im Hippokampus von Ratten sowohl Kurzzeit- als auch Langzeiteffekte. Diese konnten von Fatemi und Kollegen nicht nur in Form von Veränderungen von Zelldichte und Morphologie, sondern eben auch in Form einer anfänglichen Zunahme der NOS-Expression [112] beobachtet werden, die bis zur Adoleszenz erhalten blieb, aber im erwachsenen Gehirn von einer Abnahme der NOS-Expression gefolgt wurde [110]. Die von Anfang an bestehende Atrophie der Pyramidenzellen blieb im reifen Gehirn aber erhalten [111].

Läsionen des ventralen Hippokampus bei neugeborenen Ratten sind als Tiermodell für Schizophrenie etabliert [227]. Als zelluläre Grundlage für die Verhaltensänderungen, die nach solchen Läsionen auftreten, fanden Bernstein und Kollegen eine Reduktion der

Geamtneuronenzahl sowie eine signifikante Zunahme NOS-positiver Neurone im Präfrontal- und Entorhinal-Kortex [33]. Diese Veränderungen erwiesen sich als stabil. Die Ähnlichkeiten zu Befunden bei schizophrenen Menschen weist einerseits auf die Validität dieses Modell, andererseits aber auch auf die Beteiligung von NOS-I an der Pathogenese schizophrener Psychosen hin.

Vaid *et al.* konnten bei vernachlässigten neugeborenen Ratten eine Verminderung NADPHd-positiver Neurone in der Fascia dentata und im Ammonshorn demonstrieren [350]. Dies ist insofern von Bedeutung, da postnataler Stress in Form von sensorischer Deprivation emotionale Verhaltensänderungen im Erwachsenenalter bedingt, die schizophrenen Krankheitsbildern ähnlich sind. Allerdings wurde die Aussagekraft dieser Studie durch Untersuchungen von Veenman und Kollegen relativiert [356].

Black *et al.* schlussendlich demonstrierten nachhaltige Veränderungen infolge einer neonatalen NOS-Inhibition: Während bei männlichen Ratten aus dieser Manipulation Defizite in der *pre-pulse startle inhibition* sowie eine Überempfindlichkeit für Amphetamin resultierten, entwickelten weibliche Ratten allein eine Überempfindlichkeit gegenüber Phencyclidin. Ein Teil dieser Auffälligkeiten kann auch bei Schizophrenen beobachtet werden [35]. Männliche Ratten zeigten nach neonataler Verabreichung eines NOS-I-Inhibitors zudem Defizite in ihren sozialen Interaktionen, die interessanterweise mit den atypischen Neuroleptika Clozapin und Olanzapin verringert werden konnten [36].

An diese Aspekte hinsichtlich der Entwicklung des ZNS direkt anknüpfend, konnten als zweites Indiz veränderte Verteilungsmuster von NADPHd-positiven Neuronen im dorsolateralen Präfrontal-Kortex und in kortikalen Arealen des lateralen Temporallappens Schizophrener nachgewiesen werden [1,3]. Die Zunahme NADPHd-positiver Neurone in tieferen Schichten der subkortikalen weißen Substanz wurde als Ergebnis einer Migrationsstörung oder einer Störung im Zyklus des programmierten Zelltodes jener Neurone gedeutet. Im Präfrontal-Kortex wurde bei Schizophrenen zudem eine reduzierte NOS-Aktivität trotz normaler NOS-I- und NOS-III-Protein-Level beschrieben [382]. Passend dazu wurde auch ein niedrigerer Spiegel an NO-Metaboliten im Liquor schizophrener Patienten nachgewiesen, der eben auf ein solches Defizit der zentralen NO-Produktion zurückgeführt wurde [291]. Diesen Ergebnissen einer

verminderten NOS-Aktivität steht allerdings der Nachweis einer gesteigerten Expression von NOS-I im präfrontalen Kortex gegenüber [20].

Bernstein und Kollegen fanden im Kleinhirn Schizophrener eine Zunahme NOS-I-exprimierender Purkinje-Zellen [34]. Diesen Ergebnissen ähnlich stellten Karson *et al.* eine höhere NOS-Konzentration im Vermis fest [187]. Aufgrund der Tatsache, dass im Kleinhirn menschlicher Feten zahlreiche Purkinje-Zellen NOS-I-immunoreaktiv sind, diese Anzahl aber in der Kindheit stark abnimmt, um den niedrigen Erwachsenen-Level zu erreichen [266], erscheint der Schluss plausibel, die zu hohe Anzahl solcher Zellen bei Schizophrenen auch auf eine Entwicklungsstörung mit fehlender Reduktion dieser Neurone zurückzuführen [34]. Die aktuellen Befunde zu Auffälligkeiten des nitrinergen Systems bei schizophrenen Erkrankungen auf genetischer, transkriptionaler, proteomischer und histopathologischer Ebene legen in der Summe also nahe, dass es sich nicht einfach um „zuviel“ oder „zuwenig“ NO handelt, sondern dass viel mehr eine komplexe Dysfunktion des gesamten nitrinergen Systems vorliegt.

Drittes Indiz ist die zentrale Stellung von NO im Rahmen der Modulation des striatalen Outputs. Das von NADPHd-positiven Neuronen produzierte NO scheint auf das Gleichgewicht der phasischen und tonischen dopaminergen Transmission des Striatums einzuwirken und als Bindeglied zwischen dem glutamatergen System des (prä-)frontalen Kortex und dem dopaminergen nigrostriatalen System zu fungieren [372].

In Anbetracht ihrer Verschaltungen mit den wichtigsten Transmittersystemen des Striatums (siehe Kap. V.2.1) kann man eine exakte Regulation nitrinerner Neurone annehmen; aufgrund dieser offensichtlichen Komplexität der Interaktionen zwischen NO, Dopamin und Glutamat im Striatum verwundert es nicht, dass eine Störung oder Dysbalance des nitrinergen Systems einen starken Effekt auf den striatalen Output hat. Dies wurde bisher sowohl pharmakologisch [370,372] als auch verhaltensbiologisch [304,337] belegt.

Im Einklang mit diesen Indizien sind als viertes Indiz die Ergebnisse molekulargenetischer Untersuchungen zu werten, die sowohl Schizophrenie-bezogene Polymorphismen innerhalb des NOS-I-Gens als auch innerhalb von Genen NOS-I-assoziiierter Proteine nachweisen konnten:

Shinkai *et al.* untersuchten das Exon 29 des NOS-I-Gens auf Chromosom 12q24 mit Hilfe eines definierten SNPs (*single nucleotide polymorphism*). Dabei fanden sie einen signifikanten Unterschied der Allel-Häufigkeit zwischen der schizophrenen Gruppe und der gesunden Kontrollgruppe, so dass sie einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anfälligkeit für schizophrene Erkrankungen und dem Vorliegen dieses Polymorphismus annahmen [324]. Dieser Befund wurde allerdings durch die Arbeit von Liou *et al.* relativiert, die für einen nur 166 bp entfernt gelegenen *CA-repeat*-Polymorphismus keinen Zusammenhang mit Schizophrenie nachweisen konnten [226]. Ein Haupt-Suszeptibilitäts-Locus für Schizophrenie konnte innerhalb der CAPON-Region auf Chromosom 1q22 lokalisiert werden [56-58,298]. CAPON (*carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS*) wurde von Jaffrey *et al.* als Ligand von NOS-I identifiziert [180]. Es bindet über seinen C-Terminus an die PDZ-Region von NOS-I. Für seinen N-Terminus sind mehrere Liganden bekannt, z. B. Dexas1 [109]. Dexas1 ist ein kleines, an der Signaltransduktion beteiligtes G-Protein [142], dessen NO-abhängige Aktivierung durch die Bindung von CAPON und NOS-I erleichtert wird [179]. Die Bindung an Synapsin I dagegen resultiert in einem ternären Komplex bestehend aus NOS-I, CAPON und Synapsin I. Synapsin I wiederum gehört zu einer Familie von Phosphoproteinen, die in die Synaptogenese und in die Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern involviert ist [117]. Da Synapsine rein präsynaptische Proteine sind [340], könnte der beschriebene ternäre Komplex ein präsynaptisches *targeting* von NOS-I zum Ziel haben [178]. Die postsynaptische Lokalisierung geschieht dagegen über die Bindung von NOS-I via PSD-95 an den NMDA-Rezeptor. CAPON kann insofern darauf Einfluss nehmen, als dass es einen kompetitiven Antagonisten von PSD-95 an der PDZ-Region von NOS-I darstellt [180]. Dies erweist sich in Bezug auf schizophrene Erkrankungen als interessant, da Clinton und Meador-Woodruff bei Schizophrenen eine verminderte Expression von PSD-95 [76] nachweisen konnten; interessanterweise wurde CAPON darüber hinaus mittlerweile in zwei unabhängigen Untersuchungen als Risikogen für schizophrene Erkrankungen identifiziert [58,388].

Die 2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, die als Bindungsstelle des NOS-I/PSD-95-Komplexes identifiziert wurde [71], war ebenfalls Gegenstand genetischer

Untersuchungen. Chiu *et al.* fanden Hinweise darauf, dass genetische Varianten dieser Untereinheit den therapeutischen Effekt von Clozapin im Rahmen schizophrener Erkrankungen beeinflussen [70].

In der Zusammenschau führen alle diese Befunde letztendlich zu der Annahme, dass eine – genetisch- und/oder umweltbedingte – Beeinträchtigung des nitrinergen Systems während Entwicklung und Reifung des Gehirns durchaus zur Pathogenese schizophrener Psychosen beitragen könnte.

V.2.2.4 Abnormalitäten nitrinerner striataler Interneurone: Ursache oder Folge schizophrener Erkrankungen?

Die in dieser Studie gefundenen Auffälligkeiten NADPHd-positiver Neurone im Striatum schizophrener Patienten geben Anlass zu der Annahme, dass striatale nitrinerge Interneurone in die Pathogenese schizophrener Störungen involviert sein könnten. Schwachpunkte dieser Arbeit liegen in der äußerst limitierten Anzahl der untersuchten Gehirne und in den eher uneinheitlichen Befunden. Deshalb sollten die vorliegenden Ergebnisse nur als vorläufig betrachtet werden. Es wurden deshalb weitergehende Analysen unter Verwendung einer großen Stichprobe durchgeführt, die die vorliegenden Befunde bestätigen (Fritzen *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

In jedem der drei untersuchten schizophrenen Gehirne zeigten sich andere Veränderungen: Neurone waren entweder in Morphologie oder Anzahl auffällig. So zeigte sich eine verminderte Dichte NADPHd-positiver Neurone in den Fällen P und Q, während im Fall R (Tab. III.1, S. 26; Abb. IV.24, S. 84) abnormale Neurone zu finden waren.

Einerseits könnte dieser Umstand auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass sich hinter dem Sammelbegriff Schizophrenie eine heterogene Gruppe von Erkrankungen verbirgt. Ebenso heterogen wie die Krankheitsbilder zeigt sich wohl auch die jeweils zugrunde liegende Pathologie [171,195]. Heterogenität und Divergenz der Befunde wären damit erklärbar: Die Patienten P und Q wiesen katatone Symptome auf, der Patient R dagegen litt unter rein paranoiden Symptomen. Andererseits könnten die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Unterschiede aber auch durch verschiedene Stadien der Krankheit begründet sein: Die hirnstrukturellen Veränderungen

schizophrener Erkrankungen scheinen einer Dynamik zu unterliegen und sich im Verlauf zu verändern bzw. zuzunehmen [64,92,185].

Fragen wie diese zu beantworten, war nicht das Ziel dieser Arbeit und können aufgrund der geringen Stichprobe auch nicht beantwortet werden. Bei der Anzahl der zur Verfügung stehenden schizophrenen Gehirne muss desgleichen Zufall als möglicher Einflussfaktor ernst genommen werden. Das Alter als Fehlermöglichkeit hingegen kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die untersuchten Gehirne schizophrener Patienten nicht signifikant älter waren als die der Kontrollgruppe (Tab. III.1, S. 26) und zudem im Striatum nachgewiesen werden konnte, dass sich die Anzahl NADPHd-positiver Zellen im Alter nicht verändert [191].

Sowohl in Hinsicht auf die enge Verknüpfung zwischen dopaminergem und nitrinergem System im Striatum [126,368] als auch in Hinsicht auf kürzlich durchgeführte Studien kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine psychopharmakologische Medikation Einfluss auf NADPHd-positive Neurone und damit auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausübte.

Morris *et al.* fanden heraus, dass die NADPHd-Färbung u. a. von $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$ und damit offensichtlich vom Aktivitätslevel von NOS-I abhängig ist [247]. Das bedeutet, dass durch diese Färbung nur zum Zeitpunkt der Fixierung aktivierte NOS detektiert wird. Weiterhin zeigten sie, dass nach systemischer Applikation des D_1 -Rezeptor-Antagonisten SCH23390 bei Ratten die Intensität der NADPHd-Färbung in striatalen Neuronen abnahm, während sie durch den D_2 -Rezeptor-Antagonisten Eticlopid gesteigert wurde. Wohlgedenkt wirkte sich die Applikation dieser Substanzen nur auf die Intensität der Färbung, nicht aber auf die Anzahl der angefärbten Neurone aus. Daraus erwachsen für Neuroleptika, die ja an Dopamin-Rezeptoren angreifen, Konsequenzen für die Anfärbbarkeit nitrinerner Neurone. Hinzukommt, dass Haloperidol als klassisches Neuroleptikum die Aktivität der NOS-I *in vitro* [174,177] und *in vivo* [260] – wenn auch nur mit geringer Potenz – hemmt. Die verminderte NOS-Aktivität würde nach den Befunden von Morris *et al.* [247] nicht nur mit einer verminderten Intensität der Anfärbbarkeit NOS-positiver Neurone einhergehen, sondern ging im Tiermodell mit Dyskinesien einher, die sich nach Verabreichung des atypischen Neuroleptikums Olanzapin ebenso wie die Hemmung der NOS-I als reversibel erwiesen

[260]. Die Arbeitsgruppe um Lau fand im Striatum chronisch Haloperidol-behandelter Ratten eine Steigerung von Aktivität, mRNA und Expression von NOS-I [217]. Andreassen *et al.* dagegen fanden nach Langzeit-Applikation von Haloperidol eine – wenn auch nicht signifikante – Abnahme NADPHd-positiver Neurone im Striatum bei Ratten mit ausgeprägten Dyskinesien [13]. Interessanterweise führte die Applikation des NOS-Hemmers N^o-Nitro-L-Arginin während eines Lernprogrammes von neugeborenen Ratten auch zu einer stärkeren positiven Reaktion in der NADPHd-Färbung [281]. Eine ähnliche Zunahme NADPHd-positiver Neurone konnten Del Bel *et al.* nach subchronischer Applikation dieses Hemmers feststellen [89].

Offensichtlich spielt innerhalb des Nebenwirkungsprofils klassischer Neuroleptika diese Wirkung auf die striatale NO-Synthase eine Rolle, insbesondere in Hinblick auf tardive Dyskinesien. Als Ursachen dieser tardiven Dyskinesien werden u. a. eine durch Neuroleptika hervorgerufene Zunahme des oxidativen Stresses und der glutamatergen Neurotransmission diskutiert [345]. Harvey und Bester [160] fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass nach chronischer Haloperidol-Applikation NO im Plasma und cGMP im Striatum vermindert waren. Diese Veränderung blieb auch nach Ende der Haloperidol-Gabe bestehen. Sie schlossen daraus, dass Haloperidol im Striatum eine NO-abhängige neuroprotektive Reaktion auf oxidativen Stress verhindert und damit das Auftreten tardiver Dyskinesien begünstigt. Neuere, atypische Neuroleptika dagegen wie z. B. Olanzapin, Risperidon und Quetiapin führen allem Anschein nach zu keiner Änderung von NOS-I [343], was vielleicht das geringere Auftreten von Bewegungsstörungen bei Anwendung von Atypika erklären könnte.

Unter chronischer Haloperidol-Applikation konnten z. T. widersprüchliche morphologische Veränderungen an *spines* und Synapsen in verschiedenen Studien festgestellt werden [159].

Die genannten Befunde weisen darauf hin, dass für die Auswertung von Untersuchungen wie der hier vorliegenden nicht nur wichtig ist, ob die Patienten mit Neuroleptika therapiert wurden, sondern auch welche Neuroleptika verabreicht wurden. Über eventuelle Auswirkungen auf die Morphologie von Neuronen, die auf eine Neuroleptika-Medikation zurückzuführen sind, ist noch zu wenig bekannt, um eine klare Aussage darüber für die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zu treffen.

In der Zusammenschau können Veränderungen an nitrinergen Neuronen des Striatums Schizophrener also sowohl Ursache als auch Folge der Erkrankung sein. Um eine endgültige Antwort darauf geben zu können, müssen nun weitere Studien folgen.

V.2.3 NADPHd-positive Neurone des Claustrums und der Capsulae externa et extrema

V.2.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im Claustrum und den umgebenden Kapseln angefärbten Neurone wiesen eine ebenso hochwertige, Golgi-ähnliche Anfärbung auf wie die Neurone im Striatum. Morphologisch präsentierten sie sich als *spine*-lose Neurone unterschiedlicher Größe. Im Faserwerk der umgebenden weißen Substanz waren die Neurone häufig parallel zum Faserverlauf gelegen.

V.2.3.2 Bedeutung NADPHd-positiver Neurone des Claustrums

Trotz der Tatsache, dass es sich beim Claustrum um eine relativ große telencephale Struktur handelt, ist beim Menschen zu Aufbau, Chemoarchitektur und Funktion nur wenig bekannt, so dass die Einordnung der Ergebnisse dieser Doktorarbeit schwer fällt. Was ist bisher über das Claustrum bekannt und welche Bedeutung hat NO darin?

Das Claustrum ist bei allen Säugetierarten vorhanden. Im Verlauf der Phylogenese hat es offensichtlich seine Gestalt verändert und an Volumen und Neuronenzahl zugenommen, während sich seine Neuronendichte aber vermindert hat [205]. Anhand von Zytoarchitektur, Verbindungen und immunhistochemischer Eigenschaften lässt sich das Claustrum in zwei Anteile unterteilen: Das Claustrum ventrale weist im Vergleich zum Claustrum dorsale eine höhere Neuronendichte Calbindin-positiver Neuronen auf. Es unterhält vorwiegend Verbindungen zu limbischen Strukturen. Da in der vorliegenden Untersuchung dieser Anteil nicht untersucht wurde, wird hier nicht näher darauf eingegangen.

Das Claustrum dorsale ist v. a. mit isokortikalen Arealen verbunden, deren Projektionszonen im Claustrum topologisch gegliedert sind (siehe Kap. I.3.3). Den Hauptteil der kortikalen Ausgangsregionen bilden motorischer, somatosensorischer,

auditorischer und visueller Kortex. Sadowski *et al.* [302] injizierten Fluoreszenz-Tracer in diese Areale des Kortex und konnten durch retrograden axonalen Transport zwei Hauptzonen im Claustrum demonstrieren, in denen die kortikalen Projektionen organisiert sind. Regionen, in die der motorische Kortex projiziert, überschneiden sich mit denjenigen, in die der somatosensorische Kortex projiziert. Gleiches galt für die Projektionsregionen des auditorischen und visuellen Kortex. Die sensomotorische Zone beansprucht den anterodorsalen Teil, während die visioauditorische den posteroventralen Teil des Claustrums einnimmt. Die Überschneidung der Projektionszonen verschiedener Kortexregionen könnte funktionelle Bedeutung besitzen.

Analog zum Striatum und anderen Kerngebieten des ZNS setzt sich das Claustrum aus Interneuronen und Projektionsneuronen zusammen. Interneurone gelten als inhibitorisch [139,259]. Kowianski *et al.* konnten in Interneuronen die Expression von Neuropeptid Y (NPY), Somatostatin (SOM), vasoaktivem intestinalem Polypeptid (VIP) und NOS-I nachweisen, wobei NPY und SOM wie auch im Striatum mit NOS kolokalisiert vorkamen [208]. Narkiewicz *et al.* fanden in ihren immunhistochemischen Untersuchungen GABA-positive Neurone, die beim Hasen einen Anteil von 12% stellen [139].

Wie in anderen Kerngebieten unterliegen NOS-immunoreaktive Neurone des Claustrums postnatalen Veränderungen. Dazu gehören bei der Ratte eine Zunahme der numerischen Dichte dieser Neurone sowie eine Zunahme des Anteils mittelgroßer und großer NOS-positiver Neurone auf Kosten kleiner NOS-positiver Neurone. Die adulte Verteilung morphologischer Charakteristika NOS-immunoreaktiver Neurone des Claustrums wird am Ende der dritten postnatalen Woche erreicht [207]. Neben diesen morphologischen Veränderungen konnten auch Veränderungen der Ausstattung an Calcium-bindenden Proteinen gefunden werden. NOS/CB-positive Neurone treten ab dem 4. postnatalen Tag auf, während NOS/PV erst ab dem 14. postnatalen Tag beobachtet werden können. NOS/PV/CB-positive Neurone bilden eine definierte Subpopulation, die durch ihr Auftreten zu bestimmten Zeitpunkten und durch die Zunahme ihrer Anzahl eine wichtige Rolle innerhalb des Reifungsprozesses des Claustrums zu spielen scheinen [206]

Projektionsneurone verwenden dagegen wahrscheinlich mit Glutamat einen exzitatorischen Transmitter [279]. Daneben existiert wohl eine Untergruppe von Projektionsneuronen, die sich morphologisch und in ihrer neurochemischen Zusammensetzung von diesen unterscheidet: Switka *et al.* [341] beobachteten NADPHd-positive multipolare und bipolare Nervenzellen im Claustrum. Hinova-Palova berichtete im Gehirn von Katzen von NADPHd-positiven, mittelgroßen bis großen Neuronen mit dreieckigem oder spindelförmigem Soma, die sie als Projektionsneurone ansah [166]. Bestätigt wurde diese Annahme nitrinerner Projektionsneurone von Kowianski und seiner Arbeitsgruppe. Sie konnten mithilfe retrograder Markierung und immunhistochemischer Untersuchungen im Gehirn von Ratten NOS-positive, nach kortikal projizierende Neurone nachweisen [208]. Aufgrund eines dichten, varikösen NPY-positiven Fasernetzwerkes, das die retrograd markierten Projektionsneurone umgab, schloss die Arbeitsgruppe auf direkte synaptische Verbindungen zwischen Interneuronen und Projektionsneuronen im Claustrum. Ein Teil der Interneurone wies eine Kolokalisation von NOS mit SOM sowie von NOS mit NPY auf. Projektionsneurone zeigten keine derartige Kolokalisation, sondern enthielten nur NOS. Das mag bedeuten, dass NOS-positive Projektionsneurone nicht nur morphologisch, sondern auch immunozytochemisch eine eigene Subpopulation claustraler Neurone bilden.

Die in der Studie von Kowianski und dessen Arbeitsgruppe untersuchten Neurone wiesen eine gleichmäßige Verteilung auf, ohne Hinweise auf eine Kompartimentalisierung. Größe und Form der Neurone unterschieden sich ebenso wenig in verschiedenen Teilen des Claustrums. Das veranlasste Kowianski *et al.* zu dem Schluss, dass innerhalb der unterschiedlichen Regionen des Claustrums ähnliche Mechanismen des Informationstransfers vorliegen, egal aus welcher Hirnregion die zu verarbeitende Information stammt. Aufgabe der morphologisch und zytochemisch unterschiedlichen, zumeist aber inhibitorischen Interneurone scheint die Modulation dieser Mechanismen zu sein. Die synaptische Verbindung zwischen absteigenden kortikofugalen und aufsteigenden kortikopetalen Neuronen geschieht wahrscheinlich auf direktem oder indirektem Wege über die synaptische Transmission der claustralen Interneurone.

Für den kortiko-claustro-kortikalen Regelkreis würde sich also folgendes Bild ergeben: Informationen gelangen durch glutamaterge Projektion vom Kortex zum Claustrum. Dort geschieht ihre Verarbeitung unter Modulation der inhibitorischen Interneurone. Der kortiko-claustrale Regelkreis schließt sich mit einer wahrscheinlich exzitatorischen, glutamatergen Projektion des Claustrums zurück zum Kortex [279]. Diese Hypothese scheint dadurch bestärkt zu werden, dass in elektronenmikroskopischen Untersuchungen sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Synapsen im Claustrum gefunden wurden [139,259].

Da das Claustrum fast ausschließlich mit kortikalen Arealen reziproke Verbindungen aufweist, könnte man es als „Satellitenkern“ bezeichnen, der sich verantwortlich zeichnet für die Integration von Inputs aus verschiedenen Kortex-Regionen, bevor diese zum Kortex rückverteilt werden [30]. Die funktionelle Bedeutung der Verschaltungen innerhalb des Claustrums könnte darin liegen, dass dort Informationen aus unterschiedlichen Regionen integriert werden bzw. Informationen aus der einen Region Einfluss auf eine andere Region ausüben könnten. Dieses Bild erhält eine noch größere Komplexität, wenn man die Verbindungen dieses Regelkreises zum kontralateralen Claustrum berücksichtigt. Eine Bedeutung der interhemisphärischen Integration im Claustrum ist für die bilaterale, motorische Koordination innerhalb des auditiven [30] und visuellen Systems [81] bekannt.

Im Unterschied zum Striatum spielen NOS und das von ihr synthetisierte NO nicht nur für die Modulation der Informationsbearbeitung innerhalb des Claustrums eine Rolle, sondern auch in der Übertragung der verarbeiteten Information zum Kortex.

Dennoch sind ähnlich dezidierte Aussagen, wie sie für das Striatum zutreffen, zur Funktion NADPHd-positiver Neurone im Claustrum kaum möglich: Zum einen existiert noch immer keine vollständige Aufarbeitung der Chemoarchitektur und Verschaltungen innerhalb des Claustrums, so dass über das Funktionieren dieses Kerngebiets an sich eigentlich nichts ausgesagt werden kann. Zum anderen ist fast nichts über physiologische Funktionen oder eine Beteiligung des Claustrums an Erkrankungen des ZNS bekannt, aus denen Rückschlüsse auf seine Rolle innerhalb der physiologischen Abläufe des Gehirns gezogen werden könnten. Die bisherige Datenlage weist auf eine potentielle Beteiligung des Claustrums an der (senso)motorischen Kontrolle

[78,80,269,306,323], des willkürlichen Schluckens [386], der Nozizeption [280,328] und der konditionierten Angst [22] hin (interessanterweise spielt NO eine entscheidende Rolle in der Ausbildung konditionierter Angstreaktionen [311]). Pathologische Veränderungen sind im Alter [249,254] sowie im Rahmen des Morbus Alzheimer [252,253,265] und Morbus Parkinson [385] bekannt. Ebenso scheint ein Zusammenhang zwischen Claustrum und Epilepsie zu existieren [246,321,365,387].

V.2.3.3 NADPHd-positive Neurone der das Claustrum umgebenden Kapseln

Wahrscheinlich sind die in dieser Arbeit gefundenen NADPHd-positiven Neurone der Capsulae externa et extrema einer Gruppe von Neuronen zuzurechnen, die sich in den subkortikal gelegenen Fasermassen der weißen Substanz befinden. Solche Neurone werden im Allgemeinen als interstitielle Zellen der weißen Substanz (*interstitial cells of the white matter*, ICWM) bezeichnet. Ihr Vorkommen wurde in verschiedensten Regionen des Telencephalons beschrieben, wobei ihre Dichte im Temporallappen im Vergleich zu Frontal- und Okzipitallappen am größten ist [297]. Sie sind sowohl im Gehirn von Nagern als auch bei Säugetieren einschließlich des Menschen bekannt. Man geht davon aus, dass sie Relikte der während der Entwicklung des Gehirns auftretenden sekundären kortikalen Platte sind, die früh im zweiten Trimester entsteht [202,203]. Dabei gehören sie wohl zu den am ersten gebildeten Neuronen dieser Region. Ihre höchste Dichte erreichen sie während des fetalen und frühen postnatalen Lebensabschnittes. Zum Zeitpunkt der Geburt sind sie in großer Dichte im gesamten Neokortex unterhalb der Lamina multiformis (Lamina VI) vorhanden. Bei Katzen tritt die stärkste Abnahme der absoluten Anzahl dieser Zellen in den ersten vier Wochen *post partum* auf [72]. Ihre Anzahl erreicht den adulten Zustand mit fünf Monaten. Ein ähnlicher Verlauf ist für Menschen und Affen bekannt [202].

Die *cortical subplate* nimmt eine zentrale Stellung ein innerhalb der kortikalen Entwicklung, einschließlich der Neuronenmigration, der Ausbildung der kortikalen Laminae und Säulen sowie der Bildung von kortikothalamischen und thalamokortikalen Fasern [9,91,161].

Beim Erwachsenen befinden sich ICWM getrennt durch eine zellarme, Myelin-reiche Schicht unter dem Kortex und werden zum Teil als siebte und damit tiefste Schicht des

Neokortex gedeutet [294]. Die von ihnen ausgehenden Axone sind Assoziationsfasern, die meist in die direkt darüber liegenden Areale des Neokortex projizieren [242], sich aber durchaus auch bis in zytoarchitektonisch andere kortikale Regionen erstrecken können. 70% dieser nach kortikal projizierenden Neurone sind NADPHd-positiv. ICWM stellen die zahlenmäßig größte Population innerhalb der nitrinergen Neurone [267]. Sie liegen meist in der Nähe subkortikaler Gefäße und scheinen deren Tonus zu regulieren.

ICWM weisen aber auch eine intensive Immunreaktivität für M₂-Muskarin-Rezeptoren auf [329] und sind damit cholinozeptiv. Bis zu 95% dieser M₂-positiven Neurone erweisen sich zudem als NADPHd-positiv. Möglicherweise dienen diese M₂-NADPHd-positiven Neurone als Relais: Die im ZNS v. a. aus dem Ncl. basalis Meynert stammende cholinerge Innervation kann mit Hilfe solcher Neurone die Freisetzung von NO im Kortex und der darunter liegenden weißen Substanz regulieren. Die Degeneration dieser Neurone trägt wahrscheinlich zu einem gewissen Teil der für Morbus Alzheimer berichteten Depletion von M₂-Rezeptoren bei. Im Rahmen von Morbus Alzheimer konnten für eine Subpopulation von ICWM unterhalb der Entorhinal-Region Krankheits-bezogene Veränderungen des Zytoskeletts nachgewiesen werden [351]. Neben der Alzheimer-Demenz scheinen ICWM auch in die Pathogenese schizophrener Erkrankungen involviert zu sein. Gestörte Verteilungsmuster für ICWM wurden in mehreren Arbeiten für verschiedene Regionen nachgewiesen [1-3,103,194,195].

Angesichts der Tatsache, dass sie eine wichtigen Rolle in der Entwicklung des Gehirns einnehmen und schizophrene Erkrankungen wohl als Ergebnis eben einer solchen gestörten Entwicklung zu werten sind, verwundert es kaum, dass ICWM im Rahmen der Pathogenese dieser Erkrankungen von Veränderungen betroffen sind: Die Neurone der sekundären kortikalen Platte dirigieren die Wanderung anderer kortikaler Neurone und bestimmen zu einem bedeutenden Teil deren definitive Lokalisierung [9]. Jones konnte nachweisen, dass auch eine Läsion des Rudiments der Subkortikalplatte im vierten Schwangerschaftsmonat zu einer Unterbrechung der Migration von kortikalen Neuronen führt [186]. Ergebnis dieser Unterbrechung war eine gestörte Ausbildung der neuronalen Verbindungen. Daher werden Malformationen der subkortikalen Schichten

während der kritischen Periode der kortikalen Entwicklung als ein Faktor in der Genese psychotischer Erkrankungen erachtet [12,29,72].

Das Untersuchungsgut der vorliegenden Arbeit erfüllte in keiner Weise die Bedingungen, die eine genauere Untersuchung der gefundenen interstitiellen NADPH-positiven Neuronen erlaubt, geschweige denn einen Vergleich zwischen Schizophrenen und der gesunden Kontrollgruppe zugelassen hätte. Daher beschränken sich die möglichen Aussagen dieser Arbeit einzig und allein auf die Feststellung des Vorkommens solcher Zellen sowie auf die Beschreibung ihrer Morphologie. Die zuvor aufgeführten Befunde zeigen aber, dass diese Neurone ein lohnendes Ziel weitergehender Forschungen wären.

Letztendlich stellen die bisherigen Erkenntnisse nur Puzzleteile dar, die – v. a. in Bezug auf das menschliche Claustrum – weit davon entfernt sind, ein vollständiges Bild von Funktion und Funktionieren abzugeben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden dabei keine Ausnahme.

VI. Zusammenfassung

Die NADPHd-Färbung lässt aufgrund ihrer hervorragenden Darstellung nitrinerner Neurone eine Klassifikation solcher Neurone anhand morphologischer Kriterien zu. Im menschlichen Putamen konnten dabei 12 Neuronentypen (NADPHd I bis XII) unterschieden werden (siehe Kap. IV.2), die nur zum Teil in bereits bestehende Klassifikationssysteme eingeordnet werden konnten.

Ausgehend von dieser Klassifikation ist es möglich, in vergleichenden Studien Veränderungen NADPHd-positiver Neurone im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen festzustellen. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde dabei das Putamen schizophrener Patienten untersucht.

Aufgrund der geringen Anzahl von drei untersuchten schizophrenen Gehirnen ließen sich nur vorläufige Aussagen in Bezug auf Unterschiede NADPHd-positiver Neurone im Putamen Gesunder und Schizophrener treffen (siehe Kap. IV.3). Solche Unterschiede wurden in der Morphologie dieser Neurone gefunden, aber auch in deren Dichte: Im Putamen Schizophrener lag die Dichte NADPHd-positiver Neurone signifikant unter der bei der gesunden Kontrollgruppe ermittelten Dichte. Neben diesem numerischen Unterschied konnten auch morphologisch auffällige Neurone gefunden werden, die in der gesunden Kontrollgruppe nicht vorhanden waren.

Sowohl im Claustrum als auch in der das Claustrum umgebenden weißen Substanz der Capsulae externa et extrema konnten NADPHd-positiv Neurone nachgewiesen werden (siehe Kap. IV.4 bzw. IV.5). Die NADPHd-positiven Neurone des Claustrums ließen sich zum Teil nach bereits bestehenden Einteilungen klassifizieren. In den äußeren Kapseln lagen sie zumeist parallel zur Richtung der Fasermassen angeordnet.

Die NADPHd-Färbung ermöglichte nicht nur eine rein morphologische Untersuchung von Neuronen, sondern ließ auch Rückschlüsse auf funktionelle Aspekte zu. Somit ist diese Methode geradezu zur Untersuchung neuropathologischer Fragestellungen prädestiniert.

VII. Literaturverzeichnis

- [1] Akbarian, S., Bunney, W.E., Jr., Potkin, S.G., Wigal, S.B., Hagman, J.O., Sandman, C.A. and Jones, E.G., Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development, *Arch. Gen. Psychiatry*, 50 (1993) 169-77.
- [2] Akbarian, S., Kim, J.J., Potkin, S.G., Hetrick, W.P., Bunney, W.E., Jr. and Jones, E.G., Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients, *Arch. Gen. Psychiatry*, 53 (1996) 425-36.
- [3] Akbarian, S., Vinuela, A., Kim, J.J., Potkin, S.G., Bunney, W.E., Jr. and Jones, E.G., Distorted distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase neurons in temporal lobe of schizophrenics implies anomalous cortical development, *Arch. Gen. Psychiatry*, 50 (1993) 178-87.
- [4] Akil, M. and Brewer, G.J., Psychiatric and behavioral abnormalities in Wilson's disease, *Adv. Neurol.*, 65 (1995) 171-178.
- [5] Albin, R.L., Young, A.B. and Penney, J.B., The functional anatomy of basal ganglia disorders, *Trends Neurosci.*, 12 (1989) 366-375.
- [6] Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G., Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem. J.*, 357 (2001).
- [7] Alexander, G.E. and Crutcher, M.E., Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing, *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 266-271.
- [8] Alheid, G.F., Heimer, L. and Switzer, R.C., Basal ganglia. In G. Paxinos (Ed.), *The Human Nervous System*, Academic, San Diego, CA, 1990, pp. 483-582.
- [9] Allendoerfer, K.L. and Shatz, C.J., The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex, *Annu. Rev. Neurosci.*, 17 (1994) 185-218.
- [10] Altmann, F.P., Quantitative dehydrogenase histochemistry with special reference to the pentose shunt dehydrogenases, *Prog. Histochem. Cytochem.*, 4 (1972) 225-273.
- [11] Amaral, D.G., Memory: anatomical organization of candidate brain regions. In V.B. Mountcastle, F. Plum and S.R. Geiger (Eds.), *The Nervous System, Vol. Vol. V, Higher Functions of the Brain*, American Physiological Society, Bethesda, ML, 1987, pp. 211-294.
- [12] Andreasen, N.C., Schizophrenia: the fundamental questions, *Brain Res. Rev.*, 31 (2000) 106-112.
- [13] Andreassen, O.A., Finsen, B., Østergaard, K., West, M.J. and Jørgensen, H.A., Reduced number of striatal neurons expressing preprosomatostatin mRNA in rats with oral dyskinesias after long-term haloperidol administration, *Neurosci. Lett.*, 279 (2000) 21-24.
- [14] Aoki, C., Bredt, D.S., Fenstermaker, S. and Lubin, M., The subcellular distribution of nitric oxide synthase relative to the NR1 subunit of NMDA receptors in the cerebral cortex, *Prog. Brain Res.*, 118 (1998) 83-97.

-
- [15] Apericio-Legarza, M.I., Cutts, A.J., Davis, B. and Reynolds, G.P., Deficits of [3 H]D-aspartate binding to glutamate uptake sites in striatal and accumbens tissue in patients with schizophrenia, *Neurosci. Lett.*, 232 (1997) 13-16.
- [16] Araki, T., Mizutani, H., Matsubara, M., Imai, Y., Mizugaki, M. and Itoyama, Y., Nitric oxide synthase inhibitors cause motor deficits in mice, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 11 (2001) 125-133.
- [17] Aronin, N., DiFiglia, M., Graveland, G.A., Schwartz, W.J. and Wu, J.-Y., Localization of immunoreactive enkephalins in GABA synthesizing neurons of the rat neostriatum, *Brain Res.*, 300 (1984) 376-380.
- [18] Asano, S., Matsuda, T., Nakasu, Y., Maeda, S., Nogi, H. and Baba, A., Inhibition by nitric oxide of the uptake of [3 H]serotonine into rat brain synaptosomes, *Jpn. J. Pharmacol.*, 75 (1997) 123-128.
- [19] Atkinson, L., Batten, T.F.C., Corbett, E.K.A., Singfield, J.K. and Deuchars, J., Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus of the solitary tract in relation to vagal afferent inputs, *Neurosci.*, 118 (2003) 115-122.
- [20] Baba, H., Suzuki, T., Arai, H. and Emson, P.C., Expression of nNOS and soluble guanylate cyclase in schizophrenic brain, *NeuroReport*, 15 (2004) 677-680.
- [21] Batista, C.M.C., de Paula, K.C., Cavalcante, L.A. and Mendez-Otero, R., Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the superficial grey layer of the rat superior colliculus, *Neurosci. Res.*, 41 (2001) 67-70.
- [22] Beck, C.H.M. and Fibiger, H.C., Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment, *J. Neurosci.*, 15 (1995) 709-720.
- [23] Beckman, J.S., The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In J. Lancaster (Ed.), *Nitric Oxide: Principles and actions*, Academic Press, San Diego, 1997, pp. 1-82.
- [24] Beckmann, H., Developmental malformations in cerebral structures of schizophrenic patients, *Eur. Arch. Psychiat. Clin. Neurosci.*, 249 Suppl. 4 (1999) 44-47.
- [25] Beckmann, H., Neuropathologie der "endogenen" Psychosen. In H. Helmchen, F. Henn, H. Lauter and N. Sartorius (Eds.), *Schizophrene und affektive Störungen, Vol. 5*, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 2000, pp. 117-146.
- [26] Beckmann, H. and Lauer, M., The human stratum in schizophrenia. II. Increased number of striatal neurons in schizophrenics, *Psychiatry Res.*, 68(2-3) (1997) 99-109.
- [27] Beckmann, H. and Senitz, D., Developmental malformations in cerebral structures in "endogenous psychoses", *J. Neural Transm.*, 109 (2002) 421-431.
- [28] Beckstead, R.M., The thalamostriatal projection in the cat, *J. Comp. Neurol.*, 223 (1984) 313-346.
- [29] Benes, F.M., Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia, *Brain Res. Rev.*, 31 (2000) 251-269.
- [30] Beneyto, M. and Prieto, J.J., Connections of the auditory cortex with the claustrum and the endopiriform nucleus in the cat, *Brain Res. Bull.*, 54 (2001) 485-498.

- [31] Bennett, B.D. and Bolam, J.P., Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat, *Brain Res.*, 609 (1993) 137-148.
- [32] Bennett, B.D. and Bolam, J.P., Localization of parvalbumin-immunoreactive structures in primate caudate-putamen, *J. Comp. Neurol.*, 347 (1994) 340-356.
- [33] Bernstein, H.-G., Grecksch, G., Becker, A., Hollt, V. and Bogerts, B., Cellular changes in rat brain areas associated with neonatal hippocampal damage, *NeuroReport*, 10 (1999) 2307-2311.
- [34] Bernstein, H.-G., Krell, D., Braunewell, K.-H., Baumann, B., Gundelfinger, E.D., Diekmann, S., Danos, P. and Bogerts, B., Increased number of nitric oxide synthase immunoreactive Purkinje cells and dentate nucleus neurons in schizophrenia, *J. Neurophysiol.*, 30 (2001) 661-670.
- [35] Black, M.D., Selk, D.E., Hitchcock, J.M., Wettstein, J.G. and Sorensen, S.M., On the effect of neonatal nitric oxide synthase inhibition in rats: a potential neurodevelopmental model of schizophrenia, *Neuropharmacol.*, 38 (1999) 1299-1306.
- [36] Black, M.D., Simmonds, J., Senyah, Y. and Wettstein, J.G., Neonatal nitric oxide synthase inhibition: social interaction deficits in adulthood and reversal by antipsychotic drugs, *Neuropharmacol.*, 42 (2002) 414-420.
- [37] Böck, P. and Romeis, Zentralnervensystem. In P. Böck (Ed.), *Romeis: Mikroskopische Technik*, Urban & Schwarzenberg, München, 1989, pp. 573-604.
- [38] Böckelmann, R., Wolf, G., Ransmayr, G. and Riederer, P., NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase containing neurons in normal and Parkinson's disease putamen, *J Neural Transm [P-D Sect]*, 7 (1994) 115-121.
- [39] Bogerts, B., The temporolimbic system theory of positive schizophrenic systems, *Schizophr. Bull.*, 23 (1997) 423-435.
- [40] Bogerts, B., Falkai, P., Haupts, M., B., G., Ernst, S. and Tapernon-Franz, U., Post-mortem volume measurements of limbic system and basal ganglia structures in chronic schizophrenics, *Schizophr. Res.*, 3 (1990) 295-301.
- [41] Bogerts, B., Meertz, E. and Schönfeldt-Bausch, R., Basal ganglia and limbic system pathology in schizophrenia: a morphometric study of brain volume and shrinkage, *Arch. Gen. Psychiatry*, 42 (1985) 784-791.
- [42] Bolam, J.P., Clark, D.J., Smith, A.D. and Somogyi, P., A type of aspiny neuron in the rat neostriatum accumulates [³H]-gamma-amino-butyric acid: combination of Golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy, *J. Comp. Neurol.*, 213 (1983) 121-134.
- [43] Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A. and Bevan, M.D., Synaptic organization of the basal ganglia, *J. Anat.*, 196 (2000) 527-542.
- [44] Bolam, J.P., Izzo, P.N. and Graybiel, A.M., Cellular substrate of the histochemically defined striosome/matrix system of the caudate nucleus: a combined Golgi and immunocytochemical study in cat and ferret, *Neurosci.*, 24 (1988) 853-875.
- [45] Bowyer, J.F., Clausing, P., Gough, B., Slikker, J., W. and Holson, R.R., Nitric oxide regulation of methamphetamine-induced dopamine release in caudate/putamen, *Brain Res.*, 699 (1995) 62-70.

-
- [46] Braak, H. and Braak, E., Neuronal types in the claustrum of man, *Anat. Embryol.*, 163 (1982) 447-460.
- [47] Braak, H. and Braak, E., Neuronal types in the striatum of man, *Cell Tissue Res.*, 227 (1982) 319-342.
- [48] Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotuhi, M., Dawson, T.M. and Snyder, S.H., Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase, *Neuron*, 7 (1991) 615-624.
- [49] Bredt, D.S., Hwang, P.M. and Snyder, S.H., Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, *Nature*, 347 (1990) 768-770.
- [50] Bredt, D.S. and Snyder, S.H., Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 682-685.
- [51] Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C. and Bredt, D.S., Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains, *Cell*, 84 (1996) 757-767.
- [52] Brenman, J.E., Christopherson, K.S., Craven, S.E., McGee, A.W. and Bredt, D.S., Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein, *J. Neurosci.*, 16 (1996) 7407-7415.
- [53] Brockhaus, H., Die Cyto- und Myeloarchitektonik des Cortex claustralis und des Claustrums beim Menschen, *J. Psychol. Neurol.*, 49 (1940) 249-348.
- [54] Bromet, E.J. and Fennig, S., Epidemiology and natural history of schizophrenia, *Biol. Psychiatry*, 46 (1999) 142-147.
- [55] Bruton, C.J., Crow, T.J., Frith, C.D., Johnstone, E.C., Owens, D.G.C. and Roberts, G.W., Schizophrenia and the brain: a prospective clinico-neuropathological study, *Psychol. Med.*, 20 (1990) 285-304.
- [56] Brzustowicz, L.M., Hayter, J.E., Hodgkinson, K.A., Chow, E.W.C. and Bassett, A.S., Fine mapping of the schizophrenia susceptibility locus on chromosome 1q22, *Hum. Hered.*, 54 (2003) 199-209.
- [57] Brzustowicz, L.M., Hodgkinson, K.A., Chow, E.W.C., Honer, W.G. and Bassett, A.S., Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-1q22, *Science*, 288 (2000) 678-682.
- [58] Brzustowicz, L.M., Simone, J., Mohseni, P., Hayter, J.E., Hodgkinson, K.A., Chow, E.W.C. and Bassett, A.S., Linkage disequilibrium mapping of schizophrenia susceptibility to the CAPON region of chromosome 1q22, *Am. J. Hum. Genet.*, 74(5) (2004) 1057-63.
- [59] Buchanan, R.W., Breier, A., Kirkpatrick, B., Elkashef, A., Munson, R.C., Gellad, F. and Carpenter, J., W. T., Structural abnormalities in deficit and nondeficit schizophrenia, *Am. J. Psychiatry*, 150 (1993) 59-65.
- [60] Buchsbaum, M.S., The frontal lobes, basal ganglia, and temporal lobes as sites for schizophrenia, *Schiz. Bull.*, 16 (1990) 377-387.
- [61] Buchsbaum, M.S., Haier, R.J., Potkin, S.G., Nuechterlein, K., Bracha, H.S., Katz, M., Lohr, J., Wu, J., Lottenberg, S. and Jerabek, P.A., Frontostriatal disorder of cerebral metabolism in never-medicated schizophrenics, *Arch. Gen. Psychiatry*, 49 (1992) 935-942.

- [62] Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R.J., Schmidt, H.H.H.W. and Valtschanoff, J.G., Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus, *J. Neurosci.*, 22(20) (2002) 8961-8970.
- [63] Busconi, L. and Michel, T., Endothelial nitric oxide synthase - N-terminal myristoylation determines subcellular localization, *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 8410-8413.
- [64] Cahn, W., Pol, H.E., Bongers, M., Schnack, H.G., Mandl, R.C., van Haren, N., Durston, S., Koning, H., van der Linden, J.A. and Kahn, R.S., Brain morphology in antipsychotic-naive schizophrenia: a study of multiple brain structures, *Br. J. Psychiat. Suppl.*, 43 (2002) 66-72.
- [65] Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G.A. and Bernardi, G., Glutamate-triggered events inducing corticostriatal long-term depression, *J. Neurosci.*, 19 (1999) 6102-6110.
- [66] Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Sancesario, G., Morello, M., Giorgi, M., Pisano, A. and Bernardi, G., A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression, *J. Neurosci.*, 19 (1999) 2489-2499.
- [67] Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Giacomini, P., Bernardi, G. and Calabresi, P., Stimulation of nitric oxide-cGMP pathways excites striatal cholinergic interneurons via protein kinase, *J. Neurosci.*, 21 (2001) 1393-1400.
- [68] Chang, H.T., Wilson, C.J. and Kitai, S.T., A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis, *J. Comp. Neurol.*, 208 (1982) 107-126.
- [69] Chesselet, M.-F. and Graybiel, A.M., Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat, *Neurosci.*, 17 (1986) 547-571.
- [70] Chiu, H.-J., Wang, Y.-C., Liou, Y.-J., Lai, I.-C. and Chen, J.-Y., Association analysis of the genetic variants of the N-methyl D-aspartate receptor subunit 2b (NR2b) and treatment-refractory schizophrenia in the Chinese, *Neuropsychobiol.*, 47 (2003) 178-181.
- [71] Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A. and Brecht, D.S., PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 27467-27473.
- [72] Chun, J.J. and J., S.C., Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population, *J. Comp. Neurol.*, 282 (1989) 555-569.
- [73] Cicchetti, F., Beach, T.G. and Parent, A., Chemical phenotype of calretinin interneurons in the human striatum, *Synapse*, 30 (1998) 284-297.
- [74] Cicchetti, F., Prensa, L., Wu, Y. and Parent, A., Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease, *Brain Res. Rev.*, 34 (2000) 80-101.
- [75] Clasca, F., Avendano, C., Roman-Guindo, A., Llamas, A. and Reinoso-Suarez, F., Innervation from the claustrum of the frontal association and motor areas - axonal transport studies in the cat, *J. Comp. Neurol.*, 326 (1992) 402-422.

- [76] Clinton, S.M. and Meador-Woodruff, J.H., Abnormalities of the NMDA receptor and associated intracellular molecules in the thalamus in schizophrenia and bipolar disorder, *Neuropsychopharmacol.*, 29 (2004) 1353-1362.
- [77] Contestabile, A., Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development, *Brain Res. Rev.*, 32 (2000) 476-509.
- [78] Cortimiglia, R., Crescimanno, G., Salerno, M.T. and Amato, G., The role of the claustrum in the bilateral control of frontal oculomotor neurons in the cat, *Exp. Brain Res.*, 84 (1991) 471-477.
- [79] Cowan, R.L., Wilson, C.J., Emson, P.C. and Heizmann, C.W., Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum, *J. Comp. Neurol.*, 302 (1990).
- [80] Crescimanno, G., Salerno, M.T., Cortimiglia, R. and Amato, G., Claustral influence on ipsi- and contralateral motor cortical areas in the cat, *Brain Res. Bull.*, 22 (1989) 839-843.
- [81] Crescimanno, G., Salerno, M.T., Cortimiglia, R. and Amato, G., Effect of claustrum stimulation on neurons of the contralateral medial oculomotor area in the cat, *Neurosci. Lett.*, 114 (1990) 289-294.
- [82] Crow, T.J., Ball, J. and Bloom, S.R., Schizophrenia as an anomaly of development of cerebral asymmetry: a postmortem study as a proposal concerning the genetic basis of the disease, *Arch. Gen. Psychiatry*, 46 (1989) 1145-1150.
- [83] Cummings, J.L., Behavioral and psychiatric symptoms associated with Huntington's disease, *Adv. Neurol.*, 65 (1995) 179-186.
- [84] Dawson, T.M., Brecht, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M. and Snyder, S.H., Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 7797-7801.
- [85] Deacon, T.W., Pakzaban, P. and Isacson, O., The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence, *Brain Res.*, 668 (1994) 211-219.
- [86] Dean, B., Crook, J.M., Oeskin, K., Hill, C., Keks, N. and Copolov, D.L., The density of muscarinic M1 receptors is decreased in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia, *Mol. Psychiatry*, 1 (1996) 54-58.
- [87] Dejerine, J., *Anatomie des centres nerveux*, Paris, 1895.
- [88] Del Bel, E.A., da Silva, C.A. and Guimaraes, F.S., Catalepsy induced by nitric oxide synthase inhibitors, *Gen. Pharmac.*, 30 (1998) 245-248.
- [89] Del Bel, E.A. and Guimaraes, F.S., Sub-chronic inhibition of nitric-oxide synthesis modifies haloperidol-induced catalepsy and the number of NADPH-diaphorase neurons in mice, *Psychopharmacol.*, 147 (2000) 356-361.
- [90] Del Bel, E.A., Souza, A.S., Guimaraes, F.S., da Silva, C.A. and Nucci-da-Dilva, L.P., Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice, *Psychopharmacol.*, 161 (2002) 32-37.
- [91] Del Río, J.A., Martínez, A., Auladell, C. and Soriano, E., Developmental history of the subplate and developing white matter in the murine neocortex. Neuronal organization and relationship with the main afferent systems at embryonic and perinatal stages, *Cerebral Cortex*, 10 (2000) 784-801.

- [92] DeLisi, L.E., Sakuma, M., Tew, W., Kushner, M., Hoff, A.L. and Grimson, R., Schizophrenia as a chronic active brain process: a study of progressive brain structural change subsequent to the onset of schizophrenia, *Psychiatry Res.*, 74 (1997) 131-138.
- [93] Dieken, R.F., Calabrese, G., Merrin, E.L., Fein, G. and Weiner, M.W., Basal ganglia phosphorous metabolism in chronic schizophrenia, *Am. J. Psychiatry*, 152 (1995) 126-129.
- [94] DiFiglia, M. and Aronin, N., Ultrastructural features of immunoreactive somatostatin neurons in the rat caudate nucleus, *J. Neurosci.*, 2 (1982) 1267-1274.
- [95] DiFiglia, M., Pasik, P. and Pasik, T., A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys, *Brain Res.*, 114 (1976) 245-256.
- [96] DiGiovanni, G., Ferraro, G., Sardo, P., Galati, S., Esposito, E. and La Grutta, V., Nitric oxide modulates striatal neuronal activity via soluble guanylyl cyclase: an in vivo microiontophoretic study in rats, *Synapse*, 48 (2003) 100-107.
- [97] Dimova, R.N. and Usunoff, K.G., Cortical projection of giant neostriatal neurons in the cat. Light and electron microscopic horseradish peroxidase study, *Brain Res. Bull.*, 22 (1989) 489-499.
- [98] Donoghue, J.P. and Herkenham, M., Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat, *Brain Res.*, 365 (1986) 397-403.
- [99] Doyle, C.A. and Slater, P., Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus, *Neurosci.*, 76 (1997) 387-395.
- [100] Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. and MacKinnon, R., Crystal structures of a complexed a peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ, *Cell*, 85 (1996) 1067-1076.
- [101] Druga, R., Chen, S. and Bentivoglio, M., Parvalbumin and calbindin in the rat claustrum: an immunocytochemical study combined with retrograde tracing from frontoparietal cortex, *J. Chem. Neuroanat.*, 6 (1993) 399-406.
- [102] Dun, N.J., Dun, S.L., Wong, R.K.S. and Förstermann, U., Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (1994) 2955-2959.
- [103] Eastwood, S.L. and Harrison, P.J., Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis, *Mol. Psychiatry*, 8 (2003) 821-831.
- [104] Eder, M., Vizkelety, T. and Tombol, T., Nerve cells of the rabbit, cat, monkey and human caudate nucleus: a Golgi-study, *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, 28 (1980) 337-363.
- [105] Falkai, P. and Bogerts, B., Cell loss in the hippocampus of schizophrenics, *Eur. Arch. Psychiat. Neurol. Sci.*, 236 (1986) 154-161.
- [106] Falkai, P., Vogeley, K. and Maier, W., Hirnstrukturelle Veränderungen bei Patienten mit schizophrenen Psychosen, *Nervenarzt*, 72 (2001) 331-341.
- [107] Fallon, J.H. and Leslie, F.M., Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain, *J. Comp. Neurol.*, 249 (1986) 293-336.

-
- [108] Fan, J.-S., Zhang, Q., Li, M., Tochio, H., Yamazaki, T., Shimizu, M. and Zhang, M., Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 33472-33481.
- [109] Fang, M., Jaffrey, S.R., Sawa, A., Ye, K., Luo, X. and Snyder, S.H., Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON, *Neuron*, 28 (2000) 183-193.
- [110] Fatemi, S.H., Cuadra, A.E., El-Fakahany, E.E., Sidwell, R.W. and Thuras, P., Prenatal viral infection causes alterations in nNOS expression in developing mouse brains, *NeuroReport*, 11 (2000) 1493-1496.
- [111] Fatemi, S.H., Earle, J., Kanodia, R., Kist, D., Emamian, E.S., Patterson, P.H., Shi, L. and Sidwell, R., Prenatal viral infection leads to pyramidal cell atrophy and macrocephaly in adulthood: implications for genesis of autism and schizophrenia, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 22 (2002) 25-33.
- [112] Fatemi, S.H., Sidwell, R., Akhter, P., Sedgewick, J., Thuras, P., Bailey, K. and Kist, D., Human influenza viral infection in utero increases nNOS expression in hippocampi of neonatal mice, *Synapse*, 29 (1998) 84-88.
- [113] Fentress, J.C., Stanfield, B.B. and Cowan, W.M., Observation on the development of the striatum in mice and rats, *Anat. Embryol. (Berl.)*, 163 (1981) 275-298.
- [114] Ferrante, R.J. and Kowall, N.W., Tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity is distributed in the matrix compartment of normal human and Huntington's disease striatum, *Brain Res.*, 416 (1987) 141-146.
- [115] Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F., Martin, J.B., Bird, E.D. and Richardson, E.P., Jr., Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 46 (1987) 12-27.
- [116] Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Beal, M.F., Richardson, E.P., Jr., Bird, E.D. and Martin, J.B., Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease, *Science*, 230 (1985) 561-3.
- [117] Ferreira, A. and Rapoport, M., The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release, *Cell Mol. Life Sci.*, 59 (2002) 589-595.
- [118] Feuerstein, T.J. and Jurna, I., Antiparkinsonmittel. In W. Forth, D. Henschler, W. Rummel and K. Starke (Eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, pp. 279-284.
- [119] Filimonoff, I.N., The claustrum, its origin and development, *J. Hirnforsch.*, 8 (1966) 503-528.
- [120] Flaherty, A.W. and Graybiel, A.M., Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations, *J. Neurophysiol.*, 66 (1991) 1249-1263.
- [121] Flaherty, A.W. and Graybiel, A.M., Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey, *J. Neurosci.*, 13 (1993) 1120-1137.
- [122] Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I. and Kleinert, H., Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control, *Biochem. Pharmacol.*, 50 (1995) 1321-1332.

- [123] Förstermann, U. and Kleinert, H., Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 352 (1995) 351-364.
- [124] Fortin, M. and Parent, A., Patches in the striatum of squirrel monkeys are enriched with calretinin fibers but devoid of calretinin cell bodies, *Neurosci. Lett.*, 182 (1994) 51-54.
- [125] Freund, T.F., Powell, J. and Smith, A.D., Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons with particular reference to dendritic spines, *Neurosci.*, 13 (1984) 1189-1215.
- [126] Fujiyama, F. and Masuko, S., Association of dopaminergic terminals and neurons releasing nitric oxide in the rat striatum: an electron microscopic study using NADPH-diaphorase histochemistry and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry, *Brain Res. Bull.*, 40 (1996) 121-127.
- [127] Furchgott, R.F. and Vanhoutte, P.M., Endothelium-derived relaxing and contracting factors, *FASEB*, 3 (1989) 2007-2018.
- [128] Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, 288 (1980) 373-376.
- [129] Gachhui, R., Abu-Soud, H.M., Ghosh, D.K., Presta, A., Blazing, M.A., Mayer, B., George, S.E. and Stuehr, D.J., Neuronal nitric oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 5451-5454.
- [130] Gachhui, R., Presta, A., Bentley, D.F., Abu-Soud, H.M., McArthur, R., G., B., Ghosh, D.K. and Stuehr, D.J., Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Calmodulin response is complete within the reductase domain itself, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 20594-20602.
- [131] Gally, J.A., Montague, P.R., Reeke, J., G. N. and Edelman, G.M., The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 3547-3551.
- [132] Garcia-Cardena, C., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J.S. and Sessa, W.C., Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 6448-6453.
- [133] Gaser, C., Nenadic, I., Buchsbaum, B.R., Hazlett, E.A. and Buchsbaum, M.S., Ventricular enlargement in schizophrenia related to volume reduction of the thalamus, striatum, and superior temporal cortex, *Am. J. Psychiatry*, 161(1) (2004) 154-156.
- [134] Gerfen, C.R., The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems, *Nature*, 311 (1984) 461-464.
- [135] Gerfen, C.R., Baimbridge, K.G. and Miller, J.J., The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding proteins and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 8780-8784.

- [136] Gerfen, C.R., Engber, T.A., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J. and Sibley, D.R., D1 and D2 dopamine receptor regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons, *Science*, 250 (1990) 1429-1432.
- [137] Gerfen, C.R. and Young, W.S., Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an *in situ* hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study, *Brain Res.*, 460 (1988) 161-167.
- [138] Goldman, P.S. and Nauta, W.J.H., An intricately patterned prefronto-caudate projection in the rhesus monkey, *J. Comp. Neurol.*, 171 (1977) 369-374.
- [139] Gomez-Urquijo, S.M., Gutiérrez-Ibarluzea, I., Bueno-López, J.L. and Reblet, C., Percentage incidence of γ -aminobutyric acid neurons in the claustrum of the rabbit and comparison with the cortex and putamen, *Neurosci. Lett.*, 282 (2000) 177-180.
- [140] Gonzalez-Hernandez, T., Perez de la Cruz, M.A. and Mantolan-Sarmiento, B., Histochemical and immunohistochemical detection of neurons that produce nitric oxide: effect of different fixative parameters and immunoreactivity against non-neuronal NOS antisera, *J. Histochem. Cytochem.*, 44 (1996) 1399-1413.
- [141] Govsa, F. and Kayalioglu, G., Relationship between nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase-reactive neurons and blood vessels in basal ganglia, *Neurosci.*, 93 (1999) 1335-1337.
- [142] Graham, T.E., Prossnitz, E.R. and Dorin, R.I., Dexras1/AGS-1 inhibits signal transduction from the G_i-coupled formyl peptide receptor to Erk-1/2 MAP kinases, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 10876-10882.
- [143] Graveland, G.A. and DiFiglia, M., The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum, *Brain Res.*, 327 (1985) 307-311.
- [144] Graveland, G.A., Williams, R.S. and DiFiglia, M., A Golgi study of the human neostriatum: neurons and afferent fibers, *J. Comp. Neurol.*, 234 (1985) 317-333.
- [145] Graybiel, A.M., Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia, *TINS*, 13 (1990) 244-254.
- [146] Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W. and Kimura, M., The basal ganglia and adaptive motor control, *Science*, 265 (1994) 1826-1831.
- [147] Graybiel, A.M., Baughman, R.W. and Eckenstein, F., Cholinergic neuropil of the striatum observes striosomal boundaries, *Nature*, 323 (1986) 625-627.
- [148] Graybiel, A.M. and Chesselet, M.-F., Compartmental distribution of striatal cell bodies expressing [Met] enkephalin-like immunoreactivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 7980-7984.
- [149] Graybiel, A.M., Hirsch, E.C. and Agid, Y., Differences in tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity characterize the mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix at maturity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 303-307.
- [150] Graybiel, A.M. and Ragsdale, C.W., Jr., Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylcholinesterase staining, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 (1978) 5723-5726.
- [151] Graybiel, A.M., Ragsdale, C.W., Jr., Yoneoka, E.S. and Elde, R.P., An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the

- striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining, *Neurosci.*, 6 (1981) 377-397.
- [152] Griffith, O.W. and Stuehr, D.J., Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism, *Annu. Rev. Physiol.*, 57 (1995) 707-736.
- [153] Guevara-Guzman, R., Emson, P.C. and Kendrick, K.M., Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic-GMP, *J. Neurochem.*, 62 (1994) 807-810.
- [154] Guevara-Guzman, R., Kendrick, K.M. and Emson, P.C., Effect of substance P on acetylcholine and dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study, *Brain Res.*, 622 (1993) 147-154.
- [155] Gurevich, E.V., Y., B., Shapiro, R.M., Arnold, S.E., Gur, R.E. and Joyce, J.N., Mesolimbic dopamine D3 receptors and use of antipsychotics in patients with schizophrenia, *Arch. Gen. Psychiatry*, 54 (1997) 225-232.
- [156] Hall, A.V., Antoniou, H., Wang, Y., Cheung, A.H., Arbus, A.M., Olson, S.L., Lu, W.C., Kau, C.-L. and Marsden, P.A., Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1), *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 33082-33090.
- [157] Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S. and Ushio, Y., Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum, *Brain Res. Rev.*, 41 (2003) 1-12.
- [158] Harrington, K.A., Augood, S.J., Faull, R.L.M., McKenna, P.J. and Emson, P.C., Dopamine D1 receptor, D2 receptor, proenkephalin A and substance P gene expression in the caudate nucleus of control and schizophrenic tissue: a quantitative cellular *in situ* hybridization study, *Molec. Brain Res.*, 33 (1995) 333-342.
- [159] Harrison, P.J., The neuropathological effects of antipsychotic drugs, *Schizophr. Res.*, 40 (1999) 87-99.
- [160] Harvey, B.H. and Bester, A., Withdrawal-associated changes in peripheral nitrogen oxides and striatal cyclic GMP after chronic haloperidol treatment, *Behav. Brain Res.*, 111(1-2) (2000) 203-211.
- [161] Hatten, M.E., Central nervous system neuronal migration, *Annu. Rev. Neurosci.*, 22 (1999) 511-539.
- [162] Heckers, S., Heinsen, H., Y., H. and Beckmann, H., Cortex, white matter, and basal ganglia in schizophrenia - a volumetric postmortem study, *Biol. Psychiatry*, 29 (1991) 556-566.
- [163] Hemmens, B. and Mayer, B., Enzymology of nitric oxide synthases. In M.A. Titheradge (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 100, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1998, pp. 1-32.
- [164] Hess, D.T., Patterson, S.I., Smith, D.S. and Skene, H.H., Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acid acylation by nitric oxide, *Nature*, 366 (1993) 562-565.
- [165] Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Brecht, D.S. and Lim, W.A., Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex, *Science*, 284 (1999) 812-815.

- [166] Hinova-Palova, D.V., Paloff, A., Christova, T. and Ovtscharoff, W., Topographical distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the cat's claustrum, *Eur. J. Morph.*, 35 (1997) 105-116.
- [167] Hokama, H., Shenton, M.E., Nestor, P.G., Kikinis, R., Levitt, J.J., D., M., Wible, C.G., O'Donnell, B.F., Jolesz, F.A. and McCarley, R.W., Caudate, putamen, and globus pallidus volume in schizophrenia: a quantitative MRI study, *Psychiatry Res.: Neuroimaging*, 61 (1995) 209-229.
- [168] Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R. and Wilson, G., Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977) 3081-3085.
- [169] Holcomb, H.H., Cascella, N.G., Thaker, G.K., Medoff, D.R., Dannals, R.F. and Tamminga, C.A., Functional sites of neuroleptic drug action in the human brain: PET/FDG studies with and without haloperidol, *Am. J. Psychiatry*, 153 (1996) 41-49.
- [170] Holt, D.J., Graybiel, A.M. and Saper, C.B., Neurochemical architecture of the human striatum, *J. Comp. Neurol.*, 384 (1997) 1-25.
- [171] Holt, D.J., Herman, M.M., Hyde, T. M., Kleinman, J.E., Sinton, C.M., German, D.C., Hersh, L.B., Graybiel, A.M. and Saper, C.B., Evidence for a deficit in cholinergic interneurons in the striatum in schizophrenia, *Neurosci.*, 94 (1999) 21-31.
- [172] Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M. and Vincent, S.R., Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 2811-2814.
- [173] Hope, B.T. and Vincent, S.R., Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase, *J. Histochem. Cytochem.*, 37 (1989) 653-661.
- [174] Hu, J., Lee, J.-H. and El-Fakahany, E.E., Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by anti-psychotic drugs, *Psychopharmacol.*, 114 (1994) 161-166.
- [175] Ignarro, L.J., Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties, *FASEB J.*, 3 (1989) 31-36.
- [176] Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 9265-9269.
- [177] Iwahashi, K., Yoneyama, H., Ohnishi, T., Nakamura, K., Miyatake, R., Suwaki, H., Hosokawa, K. and Ichikawa, Y., Haloperidol inhibits neuronal nitric oxide synthase activity by preventing electron transfer, *Neuropsychobiol.*, 33 (1996) 76-79.
- [178] Jaffrey, S.R., Benfenati, F., Snowman, A.M., Czernik, A.J. and Snyder, S.H., Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (2002) 3199-3204.
- [179] Jaffrey, S.R., Fang, M. and Snyder, S.H., Nitrosopeptide mapping: a novel methodology reveals s-nitrosylation of dexas1 on a single cystein residue, *Chem. Biol.*, 9 (2002) 1329-1335.
- [180] Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J.L., Cohen, N.A. and Snyder, S.H., CAPON: A protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95, *Neuron*, 20 (1998) 115-124.

- [181] Jaffrey, S.R. and Snyder, S.H., PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, *Science*, 274 (1996) 774-777.
- [182] Jayaraman, A., Anatomical evidence for cortical projections from the striatum in the cat, *Brain Res.*, 195 (1980) 29-36.
- [183] Jiménez-Castellanos, J. and Graybiel, A.M., Compartmental origins of striatal efferent projections in the cat, *Neurosci.*, 32 (1989) 297-321.
- [184] Johnstone, E.C., Crow, T.J., Frith, C.D., Husband, J. and Kreel, L., Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia, *Lancet*, 30 (1976) 924-926.
- [185] Johnstone, E.C., Owens, D.G., Bydder, G.M., Colter, N., Crow, T.J. and Frith, C.D., The spectrum of structural brain changes in schizophrenia: a study of onset as a predictor of cognitive and clinical impairments and their cerebral correlates, *Psychol. Med.*, 19 (1989) 91-103.
- [186] Jones, E.G., Cortical development and thalamic pathology in schizophrenia, *Schizophr. Bull.*, 23 (1997) 483-501.
- [187] Karson, C.N., Griffin, W.S., Mrak, R.E., Husain, M., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Moore, N.C. and Sturner, W.Q., Nitric oxide synthase (NOS) in schizophrenia: increases in cerebellar vermis, *Mol. Chem. Neuropathol.*, 27 (1996) 275-284.
- [188] Kawaguchi, Y., Neostriatal cell subtypes and their functional roles, *Neurosci. Res.*, 27 (1997) 1-8.
- [189] Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J. and Emson, P.C., Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization, *TINS*, 18 (1995) 527-535.
- [190] Kawaguchi, Y., Wilson, C.L. and Emson, P.C., Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin, *J. Neurosci.*, 10 (1990) 3421-3438.
- [191] Kawamata, T., Nakamura, S., Akiguchi, I., Kimura, J., Kameyama, M., Kimura, H. and Takeda, T., Effect of aging on NADPH-diaphorase neurons in laterodorsal tegmental nucleus and striatum of mice, *Neurobiol. Aging*, 11 (1990) 185-192.
- [192] Kaye, D.M., Wiviott, S.D., Kobzik, L., Kelly, R.A. and Smith, T.W., S-nitrosothiols inhibit neuronal norepinephrine transport, *Am. J. Physiol.*, 272(2 Pt 2) (1997) H875-H883.
- [193] Kharazia, V.N., Schmidt, H.H.H.W. and Weinberg, R.J., Type I nitric oxide synthase fully accounts for NADPH-diaphorase in rat striatum, but not cortex, *Neurosci.*, 62 (1994) 983-987.
- [194] Kirkpatrick, B., Conley, R., Kakoyannis, A., Reep, R.L. and Roberts, R.C., Interstitial cells of the white matter in the inferior parietal cortex in schizophrenia: an unbiased cell-counting study, *Synapse*, 34 (1999) 95-102.
- [195] Kirkpatrick, B., Messias, N.C., Conley, R.R. and Roberts, R.C., Interstitial cells of the white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in deficit and nondeficit schizophrenia, *J. Nerv. Ment. Dis.*, 191 (2003) 563-567.
- [196] Kiss, J.P., Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission, *Brain Res. Bull.*, 52 (2000) 459-466.

-
- [197] Kiss, J.P. and Vizi, E.S., Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission, *TINS*, 24 (2001) 211-215.
- [198] Kiss, J.P., Zsilla, G. and Vizi, E.S., Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors, *Neurochem. Int.*, 45 (2004) 485-489.
- [199] Kita, H. and Kitai, S.T., Amygdaloid projections to the frontal cortex and the striatum in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 298 (1990) 40-49.
- [200] Kitai, S.T., Kocsis, J.D. and Wood, J., Origin and characteristics of the cortico-caudate afferents: an anatomical and electrophysiological study, *Brain Res.*, 118 (1976) 137-141.
- [201] Kölliker, A., *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*, 6. umgearbeitete Auflage edn., Engelmann, Leipzig, 1896.
- [202] Kostovic, I. and Rakic, P., Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon, *J. Neurocytol.*, 9 (1980) 219-242.
- [203] Kostovic, I. and Rakic, P., Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain, *J. Comp. Neurol.*, 297 (1990) 441-470.
- [204] Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Beal, M.F., Richardson, E.P., Jr., Sofroniew, M.V., Cuello, A.C. and Martin, J.B., Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study, *Neurosci.*, 20 (1987) 817-828.
- [205] Kowianski, P., Dziewiatkowski, J., Kowianska, J. and Morys, J., Comparative anatomy of the claustrum in selected species: a morphometric analysis, *Brain Behav. Evol.*, 53 (1999) 44-54.
- [206] Kowianski, P., Morys, J.M., Wojcik, S., Dziewiatkowski, J. and Morys, J., Co-localization of NOS with calcium-binding proteins during the postnatal development of the rat claustrum, *Folia Morphol. (Warsz.)*, 62 (2003) 211-214.
- [207] Kowianski, P., Morys, J.M., Wojcik, S., Dziewiatkowski, J. and Morys, J., Postnatal development of NOS-ir neurons in the rat claustrum, *Folia Morphol. (Warsz.)*, 62 (2003) 11-17.
- [208] Kowianski, P., Timmermans, J.-P. and Morys, J., Differentiation in the immunocytochemical features of intrinsic and cortically projecting neurons in the rat claustrum - combined immunocytochemical and axonal transport study, *Brain Res.*, 905 (2001) 63-71.
- [209] Kubota, Y., Mikawa, S. and Kawaguchi, Y., Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin, *NeuroReport*, 5 (1993) 205-208.
- [210] Kung, L., Force, M., Chute, D.J. and Roberts, R.C., Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the human striatum, *J. Comp. Neurol.*, 390 (1998) 52-62.
- [211] Kunishio, K. and Haber, S.N., Primate cingulostriatal projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input, *J. Comp. Neurol.*, 350 (1994) 337-356.

- [212] Künzle, H., Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*, *Brain Res.*, 88 (1975) 195-209.
- [213] Künzle, J.M., An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (area 6 and 9) in *Macaca fascicularis*, *Brain Behav. Evol.*, 15 (1978) 185-234.
- [214] Kurachi, M.Y., Pathogenesis of schizophrenia: part II. Temporo-frontal two-step hypothesis, *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 57 (2003) 9-15.
- [215] Lafargue, T. and Brasic, J., Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: a central sensory disturbance, *Med. Hypotheses*, 55 (2000) 314-318.
- [216] Landau, E., Le claustrum parvum chez l'homme, *Mem. Soc. Vavd. Sci. Anat.*, 6 (1938).
- [217] Lau, Y.-S., Petroske, E., Meredith, G.E. and Wang, J.Q., Elevated nitric oxide synthase expression in chronic haloperidol-treated rats, *Neuropharmacol.*, 45 (2003) 986-994.
- [218] Lauer, M. and Beckmann, H., The human striatum in schizophrenia. I. Increase in overall relative striatal volume in schizophrenics, *Psychiatry Res.*, 68(2-3) (1997) 87-98.
- [219] Lauer, M., Beckmann, H. and Senitz, D., Increased frequency of dentate granule cells with basal dendrites in the hippocampal formation of schizophrenics, *Psychiatry Res*, 122 (2003) 89-97.
- [220] Le Vay, S. and Sherk, H., The visual claustrum of the cat, *J. Neurosci.*, 1 (1981) 956-980.
- [221] Leontovich, T.A., Large neostriatal neurons in humans and their possible role in neuronal networks, *Neurosci. Behav. Physiol.*, 28 (1998) 252-259.
- [222] Levine, W., Giuditta, A., Englard, S. and Strecker, H.J., Brain diaphorases, *J. New Drugs*, 6 (1960) 28-36.
- [223] Lewis, D.A. and Lieberman, J.A., Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology, *Neuron*, 28 (2000) 325-334.
- [224] Li, H., Raman, C.S., Glaser, C.B., Blasko, E., Young, T.A., Parkinson, J.F., Whitlow, M. and Poulos, T.L., Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 21276-21284.
- [225] Li, J.-L., Dong, Y.-L., Kaneko, T. and Mizuno, N., Direct projections from substance P-containing neurons to nitric oxide synthase-containing interneurons in the rat striatum, *Neurosci. Lett.*, 318 (2002) 133-136.
- [226] Liou, Y.-J., Tsai, S.-J., Hong, C.-J. and Liao, D.-L., Association analysis for the CA repeat polymorphism of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene and schizophrenia, *Schizophr. Res.*, 65 (2003) 57-59.
- [227] Lipska, B.K., Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, *Rev. Psychiatry Neurosci.*, 29 (2004) 282-286.
- [228] Loesch, A., Belai, A. and Burnstock, G., Ultrastructural localization of NADPH-diaphorase and colocalization of nitric oxide synthase in endothelial cells of the rabbit aorta, *Cell Tissue Res.*, 274 (1993) 539-545.

- [229] Lonart, G. and Johnson, K.M., Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [³H]dopamine and [³H]glutamate by striatal synaptosomes, *J. Neurochem.*, 63 (1994) 2108-2117.
- [230] Macchi, G., The ontogenetic development of the olfactory telencephalon in man, *J. Comp. Neurol.*, 95 (1951) 245-305.
- [231] Macchi, G., Sulla morfologia, struttura e rapporti del claustre nell'uomo, *Cervello*, 24 (1951) 1-26.
- [232] Macchi, G., Bentivoglio, M., Minciacchi, D. and Molinari, M., The organization of the claustroneocortical projections in the cat studied by means of the HRP retrograde axonal transport, *J. Comp. Neurol.*, 195 (1981) 681-695.
- [233] Macchi, G., Bentivoglio, M., Minciacchi, D. and Molinari, M., Claustroneocortical projections studied in the cat by means of multiple retrograde fluorescent tracing, *J. Comp. Neurol.*, 215 (1983) 121-134.
- [234] Manzoni, O., Prezeau, L., Marin, P., Deshager, S., Bockaert, J. and Fagni, L., Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors, *Neuron*, 8 (1992) 653-662.
- [235] Marín, O., Anderson, S.A. and Rubenstein, J.L.R., Origin and molecular specification of striatal interneurons, *J. Neurosci.*, 20 (2000) 6063-6076.
- [236] Marletta, M.A., Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 12231-12234.
- [237] Marletta, M.A., Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis, *Cell*, 78 (1994) 927 - 930.
- [238] Matsuda, H. and Iyanagi, T., Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain, *Biochim. Biophys. Acta*, 1473 (1999) 345-355.
- [239] Matsumoto, T., Nakane, M., Pollock, J.S., Kuk, J.E. and Förstermann, U., A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue fixative, *Neurosci. Lett.*, 155 (1993) 61-64.
- [240] McGeer, P.L., McGeer, E.G., Scherer, U. and Singh, K., A glutamatergic corticostriatal path, *Brain Res.*, 128 (1977) 369-373.
- [241] McGrath, J.J., Féron, F.P., Burne, T.H.J., Mackay-Sim, A. and Eyles, D.W., The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: a review of recent developments, *Ann. Med.*, 35 (2003) 86-93.
- [242] Meyer, G., Gonzalez-Hernandez, T., Galindo-Mireles, D., Castaneyra-Perdomo, A. and Ferres-Torres, R., The efferent projections of neurons in the white matter of different cortical areas of the adult rat, *Anat. Embryol.*, 184 (1991) 99-102.
- [243] Michel, T., Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32 (1999) 1361-1366.
- [244] Miller, D.D., Adreasen, N.C., O'Leary, D.S., Rezai, K., Watkins, G.L., Boles Ponto, L.L. and Hichwa, R.D., Effect of antipsychotics on regional cerebral blood flow measured with positron emission tomography, *Neuropsychopharmacol.*, 17 (1997) 230-240.
- [245] Minciacchi, D., Granato, A. and Barbaresi, P., Organization of claustroneocortical projections to the primary somatosensory area of primates, *Brain Res.*, 553 (1991) 309-312.

- [246] Mohapel, P., Zhang, X., Gillespie, G.W., Chlan-Fourney, J., Hannesson, D.K., Corley, S.M., Li, X.M. and Corcoran, M.E., Kindling of claustrum and insular cortex: comparison to perirhinal cortex in the rat, *Eur. J. Neurosci.*, 13 (2001) 1501-1519.
- [247] Morris, B.J., Simpson, C.S., Mundell, S., Macearchern, K., Johnston, H.M. and Nolan, A.M., Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release, *Neuropharmacol.*, 36 (1997) 1589-1599.
- [248] Morton, A.J., Nicholson, L.F.B. and Maull, R.L.M., Compartmental loss of NADPH diaphorase in the neuropil of the human striatum in Huntington's disease, *Neurosci.*, 53 (1993) 159-168.
- [249] Morys, J., Berdel, B., Maciejewska, B., Król, J. and Dziewiatkowski, J., Loss of neurons in the claustrum of aging brain, *Folia Neuropathol.*, 34 (1996) 97-101.
- [250] Morys, J., Berdel, B., Maciejewska, B., Sadowski, M., Sirdowicz, M., Kowianska, J. and Narkiewicz, O., Division of the human claustrum according to its architectonics and morphometric parameters, *Folia Morphol. (Warsz.)*, 55 (1996) 69-82.
- [251] Morys, J., Bobinski, M., Kozłowski, P., Dziewiatkowski, J., Switka, A., Wisniewski, H. and Narkiewicz, O., The pathology of the claustrum in Galloway syndrome indicates the existence of claustrum-entorhinal pathway, *Folia Morphol. (Warsz.)*, 52 (1993) 1-9.
- [252] Morys, J., Bobinski, M., Wegiel, J. and Wisniewski, H.M., Pathology of claustrum-cortical loop in Alzheimer disease, *Acta Neurobiol. Exp.*, 52 (1992) 139.
- [253] Morys, J., Bobinski, M., Wegiel, J., Wisniewski, H.M. and Narkiewicz, O., Alzheimer's disease severely affects areas of the claustrum connected with the entorhinal cortex, *J. Brain Res.*, 37 (1996) 131-137.
- [254] Morys, J., Narkiewicz, O., Maciejewska, B., Wegiel, J. and Wisniewski, H., Amyloid deposits and loss of neurones in the claustrum of the aged dog, *NeuroReport*, 5 (1994) 1825-1828.
- [255] Mufson, E.J. and Brandabur, M.M., Sparring of NADPH-diaphorase striatal neurons in Parkinson's and Alzheimer's diseases, *Neuroreport*, 5 (1994) 705-8.
- [256] Murata, Y. and Masuko, S., Developing patterns of nitric oxide synthesizing neurons in the rat striatum: histochemical analysis, *Dev. Brain Res.*, 141 (2003) 91-99.
- [257] Murray, A.M., Hyde, T.M., Knable, M.B., Herman, M.M., Bigelow, L.B., Carter, J.M., Weinberger, D.R. and Kleinman, J.E., Distribution of putative D4 dopamine receptors in postmortem striatum from patients with schizophrenia, *J. Neurosci.*, 15 (1995) 2186-2191.
- [258] Narkiewicz, O., Nitecka, L. and Mamos, L., Neurons with GABA-like immunoreactivity in the claustrum and adjacent cortex of the rat, *Ver. Anat. Ges.*, 82 (1989) 209-210.
- [259] Narkiewicz, O., Nitecka, L., Mamos, L. and Morys, J., The pattern of the GABA-like immunoreactivity in the claustrum, *Folia Morphol. (Warsz.)*, 47 (1988) 21-30.

-
- [260] Nel, A. and Harvey, B.H., Haloperidol-induced dyskinesia is associated with striatal NO synthase: reversal with olanzapine, *Behav. Pharmacol.*, 14 (2003) 251-255.
- [261] Noble, M.A., Munro, A.W., Rivers, S.L., Robledo, L., Daff, S.N., Yellowless, L.J., Shimizu, T., Sagami, I., Guillemette, J.G. and Chapman, S.K., Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase, *Biochemistry*, 38 (1999) 16413-16418.
- [262] O'Donnell, B.F. and Grace, A.A., Cortical afferents modulate striatal gap junction permeability via nitric oxide, *Neurosci.*, 76 (1997) 1-5.
- [263] Oertel, W.H. and Mugnaini, E., Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems, *Neurosci. Lett.*, 47 (1984) 233-238.
- [264] Ogilvie, P., Schilling, K., Billingsley, M.L. and Schmidt, H.H.H.W., Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis, *FASEB J.*, 9 (1995) 799-806.
- [265] Ogomori, K., Kitamoto, T., Tateishi, J., Sato, Y., Suetsugu, M. and Abe, M., Beta-protein amyloid is widely distributed in the central nervous system of patients with Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.*, 134 (1989) 243-251.
- [266] Ohyu, J. and Takashima, S., Developmental characteristics of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactive neurons in fetal and adolescent human brains, *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 110 (1998) 193-202.
- [267] Okhotin, V.E. and Kalinichenko, S.G., Subcortical white matter interstitial cells: their connections, neurochemical specialization, and role in the histogenesis of the cortex, *Neurosci. Behav. Physiol.*, 33 (2003) 7-26.
- [268] Olney, J.W., Newcomer, J.W. and Farber, N.B., NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia, *J. Psychiatry Research*, 33 (1999) 523-533.
- [269] Olson, C.R. and Graybiel, A.M., Sensory maps in the claustrum of the cat, *Nature*, 288 (1980) 479-481.
- [270] Olsson, M., Bjorklund, A. and Campbell, K., Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence, *Neurosci.*, 84 (1998) 867-876.
- [271] Pakkenberg, B., Post-mortem study of chronic schizophrenic brains, *Br J Psychiatry*, 151 (1987) 744-52.
- [272] Pakkenberg, B., Pronounced reductions of total neuron number in mediodorsal thalamic nucleus and nucleus accumbens in schizophrenics, *Arch. Gen. Psychiatry*, 47 (1990) 1023-1028.
- [273] Parent, A., Charara, A. and Pinault, D., Single striatofugal axons arborizing in both pallidal segments and in the substantia nigra, *Brain Res.*, 698 (1995) 280-284.
- [274] Parent, A. and Cicchetti, F., The current model of basal ganglia organization under scrutiny, *Mov. Disord.*, 13 (1998) 199-202.
- [275] Parent, A. and Hazrati, L.-N., Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop., *Brain Res. Rev.*, 20 (1995) 91-127.
- [276] Pearlson, G.D., Neurobiology of schizophrenia, *Ann. Neurol.*, 48 (2000) 556-566.

- [277] Penney, G.R., Wilson, C.J. and Kitai, S.T., Relationship of the axonal and dendritic geometry of spiny projection neurons to the compartmental organization of the neostriatum, *J. Comp. Neurol.*, 269 (1988) 275-289.
- [278] Penney, J.B., Jr. and Young, A.B., Striatal inhomogeneities and basal ganglia function, *Mov. Disord.*, 1 (1986) 3-15.
- [279] Perez-Cerda, F., Martinez-Millan, L. and Matute, C., Anatomical evidence for glutamate and/or aspartate as neurotransmitters in the geniculo-, claustr-, and cortico-cortical pathways to the cat striate cortex, *J. Comp. Neurol.*, 373 (1996) 422-432.
- [280] Persinger, M.A., Peredery, O., Bureau, Y.R. and Cook, L.L., Emergent properties following brain injury: the claustrum as a major component of a pathway that influences nociceptive thresholds to foot shock in rats, *Percept. Mot. Skills*, 85 (1997) 387- 398.
- [281] Petrovicky, P., Barcal, J. and Myslivecek, J., Nitric oxide synthase (NADPH-diaphorase) content in brain neurons of neonatal rats after inhibitory learning and intervention into nitric oxide metabolism, *Neurosci.*, 89 (1999) 1151-1157.
- [282] Phelps, P.E., Houser, C.R. and Vaughn, J.E., Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses, *J. Comp. Neurol.*, 238 (1985) 286-307.
- [283] Pogun, S.e.a., Nitric oxide inhibits [³H]dopamine uptake, *Brain Res.*, 641 (1994) 83-91.
- [284] Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H.H.W., Nakane, M. and Murad, F., Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 10480-10484.
- [285] Prensa, L., Giménez-Amaya, J.M. and Parent, A., Morphological features of neurons containing calcium-binding proteins in the human striatum, *J. Comp. Neurol.*, 390 (1998) 552-563.
- [286] Prensa, L., Giménez-Amaya, J.M. and Parent, A., Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum, *J. Comp. Neurol.*, 413 (1999) 603-618.
- [287] Pulver, A.E., Search for schizophrenia vulnerability genes, *Biol. Psychiatry*, 47 (2000) 221-230.
- [288] Rae, A.S.L., The form and structure of the human claustrum, *J. Comp. Neurol.*, 100 (1954) 15-39.
- [289] Rager, G., Entwicklung des menschlichen Nervensystems. In D. Drenckhahn and W. Zenker (Eds.), *Benninghoff: Anatomie, Vol. 2*, Urban & Schwarzenberg, München, 1994, pp. 396-433.
- [290] Raman, C.S., Li, H., Martasek, P., Kral, V., Masters, B.S. and Poulos, T.L., Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center, *Cell*, 95 (1998) 939-50.
- [291] Ramirez, J., Garnica, R., Boll, M.-C., Montes, S. and Rios, C., Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study, *Schizophr. Res.*, 68 (2004) 357-361.

- [292] Ramón y Cajal, S., *Striatum*, 1899.
- [293] Reblet, C., Alejo, A., Blanco-Santiago, R.I., Mendizabal-Zubiaga, J., Fuentes, M. and Bueno-Lopez, J.L., Neuroepithelial origin of the insular and endopiriform parts of the claustrum, *Brain Res. Bull.*, 57 (2002) 495-497.
- [294] Reep, R.L., Cortical layer VII and persistent subplate cells in mammalian brains, *Brain Behav. Evol.*, 56 (2000) 212-234.
- [295] Ribak, C.E., Vaughn, J.E. and Roberts, E., The GABA neurons and their axon terminals in the rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry, *J. Comp. Neurol.*, 187 (1979) 261-284.
- [296] Roberts, R.C., Conley, R., Kung, L., Peretti, F.J. and Chute, D.J., Reduced striatal spine size in schizophrenia: a postmortem ultrastructural study, *NeuroReport*, 7 (1996) 1214-1218.
- [297] Roijani, A.M., Emery, J.A., Anderson, K.J. and Massey, J.K., Distribution of heterotopic neurons in normal hemispheric white matter: a morphometric analysis, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55 (1996) 178-183.
- [298] Rosa, A., Fañanás, L., Cuesta, M.J., Peralta, V. and Sham, P., 1q21-q22 locus is associated with susceptibility to the reality-distortion syndrome of schizophrenia spectrum disorders, *Am. J. Med. Genet.*, 114 (2002) 516-518.
- [299] Rothe, F., Canzler, U. and Wolf, G., Subcellular localization of the neuronal isoform of nitric oxide synthase in the rat brain: a critical evaluation, *Neurosci.*, 83 (1998) 259-269.
- [300] Rudkin, T.M. and Sadikot, A.F., Thalamic input to parvalbumin-immunoreactive GABAergic interneurons: organization in normal striatum and effect of neonatal decortication, *Neurosci.*, 88 (1999) 1165-1175.
- [301] Sadikot, A.F., Parent, A., Smith, Y. and Bolam, J.P., Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey, *J. Comp. Neurol.*, 315 (1992) 137-159.
- [302] Sadowski, M., Morys, J., Jakubowska-Sadowska, K. and Narkiewicz, O., Rat's claustrum shows two main cortico-related zones, *Brain Res.*, 756 (1997) 157-152.
- [303] Sadowski, M., Morys, J., Jakubowska-Sadowska, K. and Narkiewicz, O., Some claustral neurons projecting to various neocortical areas show morphological differences, *Folia Morphol. (Warsz.)*, 56 (1997) 65-76.
- [304] Saka, E., Iadarola, M., Fitzgerald, D.J. and Graybiel, A.M., Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (2002) 9004-9009.
- [305] Salerno, J.C., Harris, D.E., Irizzary, K., Smith, S.M., McMillan, K., Martasek, P., Roman, L.J., Masters, B.S.S., Jones, C., Weissman, B.A., Liu, Q. and Gross, S.S., The inhibitory polypeptide of constitutive NOS (cNOS) is the missing control site element of the inducible isoform (iNOS). *2nd International Conference Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide, Vol. Abstract A20*, Los Angeles, CA, 1996.
- [306] Salerno, M.T., Cortimiglia, R., Crescimano, G. and Amato, G., Effect of claustrum activation on the spontaneous unitary activity of frontal eye field neurons in the cat, *Neurosci. Lett.*, 98 (1989) 299-304.

- [307] Sancesario, G., Morello, M., Reiner, A., Giacomini, P., Massa, R., Schoen, S. and Bernardi, G., Nitric neurons make synapses on dual-input dendritic spines of neurons in the cerebral cortex and the striatum of the rat: implication for a postsynaptic action of nitric oxide, *Neurosci.*, 99 (2000).
- [308] Sandell, J.H., Graybiel, A.M. and Chesselet, M.-F., A new enzyme marker for striatal compartmentalization: NADPH diaphorase activity in the caudate nucleus and putamen of the cat, *J. Comp. Neurol.*, 243 (1986) 326-334.
- [309] Sandor, N.T., Brassai, A., Puskas, A. and Lendvai, B., Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat, *Brain Res. Bull.*, 36 (1995) 483-486.
- [310] Sardo, P., Ferraro, G., DiGiovanni, G., Galati, S. and La Grutta, V., Inhibition of nitric oxide synthase influences the activity of striatal neurons in the rat, *Neurosci. Lett.*, 325 (2002) 179-182.
- [311] Schafe, G.E., Bauer, E.P., Rosis, S., Farb, C.R., Rodrigues, S.M. and Ledoux, J.E., Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala, *Eur J Neurosci*, 22 (2005) 201-11.
- [312] Schepens, J., Cuppen, E., Wieringa, B. and Hendriks, W., The neuronal nitric oxide synthase PDZ motif binds to -G(D,E)XV* carboxyterminal sequences, *FEBS Lett.*, 409 (1997) 53-56.
- [313] Scherer-Singler, U., Vincent, S.R., Kimura, H. and McGeer, E.G., Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry, *J. Neurosci. Meth.*, 9 (1983) 229-234.
- [314] Schmidt, H.H.H.W., NO, endogener Botenstoff und Zellgift, *Med. Mo. Pharm.*, 6 (1994) 168-185.
- [315] Schmidt, H.H.H.W., Gagne, G.D., Nakane, M., Pollock, J.S., Miller, M.F. and Murad, F., Mapping of nitric oxide synthase in the rat suggests co-localization with NADPH diaphorase but not soluble guanylyl cyclase and novel paraneural functions for nitric oxide signal transduction, *J. Histochem. Cytochem.*, 40 (1992) 1439-1456.
- [316] Schroder, K.F., Hopf, A., Lange, H. and Thorner, G., [Morphometrical-statistical structure analysis of human striatum, pallidum and subthalamic nucleus], *J. Hirnforsch.*, 16 (1975) 333-350.
- [317] Selden, N., Geula, C., Hersh, L. and Mesulam, M.-M., Human striatum: chemoarchitecture of the caudate nucleus, putamen and ventral striatum in health and Alzheimer's disease, *Neurosci.*, 60 (1994) 621-636.
- [318] Senitz, D. and Beckmann, H., Granule cells of the dentate gyrus with basal and recurrent dendrites in schizophrenic patients and controls. A comparative Golgi study, *J Neural Transm*, 110 (2003) 317-26.
- [319] Sessa, W.C., Barber, C.M. and Lynch, K.R., Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein, *Circ. Res.*, 72 (1993) 921-924.
- [320] Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G. and Michel, T., Acylation targets endothelial nitric oxide synthase to plasmalemmal caveolae, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 6518-6522.

-
- [321] Sheerin, A.H., Nysten, K., Zhang, X., Saucier, D.M. and Corcoran, M.E., Further evidence for a role of the anterior claustrum in epileptogenesis, *Neurosci.*, 125 (2004) 57-62.
- [322] Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M. and McCarley, R.W., A review of MRI findings in schizophrenia, *Schizophr. Res.*, 49 (2001) 1-52.
- [323] Shima, K., Hoshi, E. and Tanji, J., Neuronal activity in the claustrum of the monkey during performance of multiple movements, *J. Neurophysiol.*, 76 (1996) 2115-2119.
- [324] Shinkai, T., Ohmori, O., Hori, H. and Nakamura, J., Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia, *Mol. Psychiatry*, 7 (2002) 560-563.
- [325] Sholl, A.D., Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat, *J. Anat.*, 87 (1953) 387-406.
- [326] Siddhanta, U., Wu, C., Abu-Soud, H.M., Zhang, J., Ghosh, D.K. and Stuehr, D.J., Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 7309-7312.
- [327] Siegel, B.V., Buchsbaum, M.S., Bunney, W.E., Jr., Gottschalk, L.A., Haier, R.J., Lohr, J., Lottenberg, S., Najafi, A., Nuechterlein, K.H. and Potkin, S.G., Cortical-striatal-thalamic circuits and brain glucose metabolic activity in 70 unmedicated male schizophrenics, *Am. J. Psychiatry*, 150 (1993) 1325-1336.
- [328] Sloniewski, P., Morys, J. and Pilgrim, C., Stimulation of glucose utilization in the rat claustrum by pain, *Folia Neuropathol.*, 33 (1995) 163-168.
- [329] Smiley, J.F., Levey, A.I. and Mesulam, M.-M., Infracortical interstitial cells concurrently expressing m₂-muscarinic receptors, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase in the human and monkey cerebral cortex, *Neurosci.*, 84 (1998) 755-769.
- [330] Smith, A.D. and Parent, A., Differential connections of caudate nucleus and putamen in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), *Neurosci.*, 18 (1986) 347-371.
- [331] Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E. and Bolam, J.P., Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia, *Neurosci.*, 86 (1998) 353-387.
- [332] Soghomonian, J.-J., Descarries, L. and Watkins, K.C., Serotonine innervation in adult rat neostriatum. II. Ultrastructural features: a radioautographic and immunocytochemical study, *Brain Res.*, 481 (1989) 67-86.
- [333] Spahn, B. and Braak, H., Percentage of projection neurons and various types of interneurons in the human claustrum, *Acta anat.*, 122 (1985) 245-248.
- [334] Spessert, R. and Layes, E., Fixation conditions affect the intensity but not the pattern of NADPH-diaphorase staining as a marker for neuronal nitric oxide synthase in rat olfactory bulb, *J. Histochem. Cytochem.*, 42 (1994) 1309-1315.
- [335] Stamler, J.S., Single, D.J. and Localzo, J., Biochemistry of nitric oxide and its redox-active forms, *Science*, 258 (1992) 1898-1902.
- [336] Stevens-Truss, R. and Marletta, M.A., Interaction of calmodulin with the inducible murine macrophage nitric oxide synthase, *Biochemistry*, 34 (1995) 15638-15645.

- [337] Stewart, J., Deschamps, S.-E. and Amir, S., Inhibition of nitric oxide synthase does not block the development of sensitization to the behavioral activating effects of amphetamine, *Brain Res.*, 641 (1994) 141-144.
- [338] Stricker, N.L., Christopherson, K.S., Yi, B.A., Schatz, P.J., Raab, R.W., Dawes, G., Bassett, D.E., Jr., Brecht, D.S. and Li, M., PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences, *Nat. Biotechnol.*, 15 (1997) 336-342.
- [339] Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C., Griffith, O.W., Feldman, P.L. and Wiseman, J., N^o-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 6259-6263.
- [340] Sudhof, T.C., Czernik, A.J., Kao, H.T., Takei, K., Johnston, P.A., Horiuchi, A., Kanazir, S.D., Wagner, M.A., Perin, M.S., De Camilli, P. and al., e., Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins, *Science*, 245 (1989) 1474-1480.
- [341] Switka, A., Scheuermann, D.W., Adiaensen, D., Timmermans, J.-P. and Narkiewicz, O., NADPH-diaphorase enzyme activity, serotonin and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry in the claustrum of the domestic cat, *Ann. Anat.*, 176 (Suppl.) (1994) 182.
- [342] Takagi, H., Somogyi, P., Somogyi, J. and Smith, A.D., Fine structural studies on a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.*, 214 (1983) 1-16.
- [343] Tarazi, F.I., Zhang, K. and Baldessarini, R.J., Long-term effects of newer antipsychotic drugs on neuronal nitric oxide synthase in rat brain, *Nitric Oxide*, 7 (2002) 297-300.
- [344] Tracey, W.R., Nakane, M., Pollock, J.S. and Förstermann, U., Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195 (1993) 1035-1040.
- [345] Tsai, G., Goff, D.C., Chang, R.W., Flood, J., Baer, L. and Coyle, J.T., Markers of glutamatergic neurotransmission and oxidative stress associated with tardive dyskinesia, *Am. J. Psychiatry*, 155 (1998) 1207-1213.
- [346] Tsuang, M., Schizophrenia: genes and environment, *Biol. Psychiatry*, 47 (2000) 210-220.
- [347] Ulfing, N., Ganglionic eminence of the human fetal brain - new vistas, *Anat. Rec.*, 267 (2002) 191-195.
- [348] Uylings, H.B.M. and van Pelt, J., Measures for quantifying dendritic arborizations, *Network: Comput. Neural Syst.*, 13 (2002) 397-414.
- [349] Uylings, H.B.M., van Pelt, J. and Verwer, R.W.H., Topological analysis of individual neurons. In J.J. Capowski (Ed.), *Computer Techniques in Neuroanatomy*, Plenum Press, New York, 1989, pp. 215-239.
- [350] Vaid, R.R., Yee, B.K., Shalev, U., Rawlins, J.N.P., Weiner, I., J., F. and Totterdell, S., Neonatal nonhandling and in utero prenatal stress reduce the density of NADPH-diaphorase-reactive neurons in the Fascia dentata and Ammon's horn of rats, *J. Neurosci.*, 17 (1997) 5599-5609.

-
- [351] van de Nes, J.A., Sandmann-Keil, D. and Braak, H., Interstitial cells subadjacent to the entorhinal region expressing somatostatin-28 immunoreactivity are susceptible to development of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 104 (2002) 351-356.
- [352] van der Kooy, G. and Fishell, G., Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments, *Brain Res.*, 401 (1987) 155-161.
- [353] van Pelt, J., Uylings, H.B.M., Verwer, R.W.H., Pentney, R.J. and Woldenberg, M.J., Tree asymmetry - a sensitive and practical measure for binary topological trees, *Bull. Math. Biol.*, 54 (1992) 759-784.
- [354] van Pelt, J. and Verwer, R.W.H., New classification methods of branching patterns, *J. Microscopy*, 136 (1984) 23-34.
- [355] van Pelt, J. and Verwer, R.W.H., Topological properties of binary trees grown with order-dependent branching probabilities, *Bull. Math. Biol.*, 48 (1986) 197-211.
- [356] Veenman, C.L., Lehmann, J., Stöhr, T., Totterdell, S., Yee, B.K., Mura, A. and Feldon, J., Comparisons of the densities of NADPHd reactive and nNOS immunopositive neurons in the hippocampus of three age groups of young nonhandled and handled rats, *Dev. Brain Res.*, 114 (1999) 229-243.
- [357] Venema, R.C., Sayegh, H.S. and Kent, J.D., Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 6435-6440.
- [358] Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V. and Snyder, S.H., Carbon monoxide: a putative neural messenger, *Science*, 259 (1993) 381-383.
- [359] Verwer, R.W.H. and van Pelt, J., A new method for the topological analysis of neuronal tree structures, *J. Neurosci. Meth.*, 8 (1983) 335-351.
- [360] Verwer, R.W.H. and van Pelt, J., Analysis of binary trees when occasional multifurcations can be considered as aggregates of bifurcations, *Bull. Math. Biol.*, 52 (1990) 629-641.
- [361] Verwer, R.W.H., van Pelt, J. and Noest, A.J., Parameter estimation in topological analysis of binary tree structures, *Bull. Math. Biol.*, 49 (1987) 363-378.
- [362] Vincent, S.R., Johansson, O., Hökfelt, T., Skirboll, L., Elde, R., Terenius, L., Kimmel, J. and Goldstein, M., NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities, *J. Comp. Neurol.*, 217 (1983) 252-263.
- [363] Vuillet, J., Dimova, R.N., Nieoullon, A. and Goff, L.K., Ultrastructural relationships between choline acetyltransferase and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum, *Neurosci.*, 46 (1992) 351-360.
- [364] Vuillet, J., Kerkerian, L., Kachidian, P., Bosler, O. and Nieoullon, A., Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum, *Neurosci. Lett.*, 100 (1989) 99-104.
- [365] Wada, J.A. and Tsuchimochi, H., Role of the claustrum in convulsive evolution of visual afferent and partial nonconvulsive seizure in primates, *Epilepsia*, 38 (1997) 897-906.

- [366] Walker, R.H., Arbuthnott, G.W., Baughman, R.W. and Graybiel, A.M., Dendritic domains of medium spiny neurons in the primate striatum: relationships to striosomal borders, *J. Comp. Neurol.*, 337 (1993) 614-628.
- [367] Walker, R.H. and Graybiel, A.M., Dendritic arbors of spiny neurons in the primate striatum are directionally polarized, *J. Comp. Neurol.*, 337 (1993) 629-639.
- [368] Wang, J.Q. and Lau, Y.-S., Dose-related alteration in nitric oxide synthase mRNA expression induced by amphetamine and the full D1 dopamine receptor agonist SKF-82958 in mouse striatum, *Neurosci. Lett.*, 311 (2001) 5-8.
- [369] Weinberg, R.J., Valtschanoff, J.G. and Schmidt, H.H.H.W., The NADPH diaphorase histochemical stain. In M. Feebisch and J.S. Stamler (Eds.), *Methods in nitric oxide research*, John Wiley & Sons Ltd., 1996.
- [370] West, A.R. and Galloway, M.P., Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms, *Neuropharmacol.*, 36 (1997) 1571-1581.
- [371] West, A.R., Galloway, M.P. and Grace, A.A., Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms, *Synapse*, 44 (2002) 227-245.
- [372] West, A.R. and Grace, A.A., Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo, *J. Neurophysiol.*, 83 (2000) 1798-1808.
- [373] West, A.R. and Grace, A.A., The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity states and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded *in vivo*, *J. Neurosci.*, 24 (2004) 1924-1935.
- [374] Wichmann, T. and DeLong, M.R., Functional and pathophysiological models of the basal ganglia, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6 (1996) 751-758.
- [375] Wilhite, B.L., Teyler, T.J. and Hendricks, C., Functional relation of rodent claustral-entorhinal-hippocampal system, *Brain Res.*, 365 (1986) 54-60.
- [376] Wilson, C.J., The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. In G.W. Arbuthnott and P.C. Emson (Eds.), *Progress in Brain Research*, Vol. 99, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 277-297.
- [377] Wilson, C.J. and Groves, P.M., Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, 194 (1980) 599-615.
- [378] Witter, M.P., Room, P., Groenewegen, H.J. and Lohman, A.H., Reciprocal connections of the insular and piriform claustrum with limbic cortex: an anatomical study in the cat, *Neurosci.*, 24 (1988) 519-539.
- [379] Wong, A.H.C. and van Tol, H.H.M., Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27 (2003) 269-306.
- [380] Wu, H.H., Waid, D.K. and McLoon, S.C., Nitric oxide and the developmental remodeling of retinal connections in the brain, *Prog. Brain Res.*, 108 (1996) 273-286.
- [381] Wu, Y. and Parent, A., Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human, *Brain Res.*, 863 (2000) 182-191.

- [382] Xing, G., Chavko, M., Zhang, L.-X., Yang, S. and Post, R.M., Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression, *Schizophr. Res.*, 58 (2002) 21-30.
- [383] Yelnik, J., François, C., Percheron, G. and Tandé, D., Morphological Taxonomy of the neurons of the primate striatum, *J. Comp. Neurol.*, 313 (1991) 273-294.
- [384] Yeterian, E.H. and Pandya, D.N., Prefrontostriatal connections in relation to cortical architectonic organization in rhesus monkey, *J. Comp. Neurol.*, 312 (1991) 43-67.
- [385] Yoshimura, N., Yoshimura, I., Asada, M., Hayshi, S., Fukushima, Y., Sato, T. and Kudo, T., Juvenile Parkinson's disease with widespread Lewy bodies in the brain, *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 77 (1988) 213-218.
- [386] Zald, D.H. and Pardo, J.V., The functional neuroanatomy of voluntary swallowing, *Ann. Neurol.*, 46 (1999) 281-286.
- [387] Zhang, X., Hannesson, D.K., Saucier, D.M., Wallace, A.E., Howland, J. and Corcoran, M.E., Susceptibility to kindling and neuronal connections of the anterior claustrum, *J. Neurosci.*, 21 (2001) 3674-3687.
- [388] Zheng, Y., Li, H., Qin, W., Chen, W., Duan, Y., Xiao, Y., Li, C., Zhang, J., Li, X., Feng, G. and He, L., Association of the carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase gene with schizophrenia in the Chinese Han population, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328 (2005) 809-815.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. P. Riederer, der mir die Möglichkeit gab, in seinem Labor zu arbeiten und diese Doktorarbeit anzufertigen.

Danken möchte ich außerdem meinen beiden Betreuern, Dr. med. A. Reif und Dr. med. M. Lauer, die ihre Funktion als Betreuer sehr ernst nahmen und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten. Ihre Geduld erschöpfte sich selbst nach stundenlangen Diskussionen oder Phasen, die von Misserfolgen geprägt waren, nicht.

Besonderen Dank schulde ich Dr. med. D. Senitz, der mich in die Geheimnisse der Camera lucida einführte und mir alle notwendigen Geräte ausführlich erklärte und zur Verfügung stellte. Seine Ratschläge halfen mir, theoretische Überlegungen in die Praxis umzusetzen.

Für die vielen kleinen Ratschläge, die mir die Arbeit im Labor vereinfachten, bin ich Frau Winnig sehr dankbar.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meiner Familie, ohne die ich nie bis zu diesem Punkt gelangt wäre. Während meines Studiums konnte ich mich immer auf ihre Unterstützung verlassen.