

Aus dem Institut für Physiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
des Universitätsklinikums Benjamin-Franklin
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Kirsch
Arbeitsgruppe : Prof. Dr. med. U. Grüsser-Cornehls

**Verlauf und zentrale Termination der Calbindin D-28k immunopositiven
Subpopulation primärer vestibulärer Afferenzen in der Maus (*Mus musculus*).**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Holger Vogten
aus Nordhorn

2001

Referent: Frau Prof. Dr. med. U. Grüsser-Cornehls

Korreferent: Prof. Dr. K.-H. Mauritz

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Disputationsdatum: 09.10.2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	1
1 Einleitung	3
1.1 Vestibuläres System	
1.2 Primär vestibuläre Afferenzen (PVA)	4
1.2.1 Somatotopie und vestibulo-cerebelläre Projektionen	
1.2.2 Kurze historische Übersicht mit Spezies-Vergleich	5
1.3 Vestibuläre Kerne (VN)	8
1.4 Cerebellum	9
1.5 Calbindin D-28k(Calb) im Gehirn	11
1.6 Problembeschreibung, Fragestellung und Zielsetzung	13
1.7 Auswahl der Versuchstiere	14
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Versuchstiere	
2.2 Operationen	17
2.2.1 OP-Ziel und -Forderungen	
2.2.2 Anatomie	
2.2.3 Wahl des Zugangswegs	18
2.2.4 Intraoperative Hilfs-Modelle	
2.2.5 Anästhesie	
2.2.6 Chirurgie	
2.2.7 Postoperative Pflege	22
2.3 Materialgewinnung	
2.3.1 Narkose	
2.3.2 Präparation der Versuchstiere	
2.3.3 Perfusion	
2.3.4 Präparation und Entnahme von Gehirn und Ganglion vestibuli (VG)	23
2.4 Schneiden	24
2.5 Immuncytochemie	
2.5.1 Blockierung der endogenen Peroxidasen und Präinkubation	
2.5.2 Kontrollen	25
2.5.3 Antiserenlösung	
2.5.4 Erster Antikörper (AK)	
2.5.5 Zweiter AK	
2.5.6 Avidin-Biotin-Komplex-Methode	
2.5.7 Peroxidase-Anti-Peroxidase-(PAP) Methode	
2.5.8 Diaminobenzidin-(DAB) Reaktion	
2.5.9 Aufziehen und Eindeckeln der Schnitte	
2.6 Auswertung	26
2.6.1 Camera-lucida-Zeichnungen	
2.6.2 Bestimmung der Kerngebiete	
2.6.3 Fotografieren	

	Seite
3	Ergebnisse 27
3.1	Eigenschaften der Färbung mit anti-Calb und DAB 29
3.2	Verlauf von primär vestibulären Afferenzen im Hirnstamm 31
3.2.1	Vestibuläre Kerne
3.2.1.1	Nucleus vestibularis inferior (IVN) 33
3.2.1.2	Nucleus vestibularis medialis (MVN)
3.2.1.3	Nucleus vestibularis lateralis (LVN)
3.2.1.4	Nucleus vestibularis superior (SVN)
3.2.2	Weitere PVA im Hirnstamm 34
3.3	Termination von PVA im Hirnstamm
3.4	Faserverlauf und Termination von PVA im Kleinhirn 35
3.4.1	Nucleus cerebellaris medialis (MCN)
3.4.2	Nucleus cerebellaris interpositus (ICN)
3.4.3	Nucleus cerebellaris lateralis (LCN)
3.5	Termination von PVA im Kleinhirncortex
3.5.1	Uvula 39
3.5.2	Nodulus
3.6	Weitere Calb-positive Zellen, Fasern und Artefakte
3.6.1	Überlebende Purkinje-Zellen (PC) 40
3.6.2	Calb-positive auditorische Fasern 41
3.6.3	Calb-positive Zellen der unteren Olive
3.6.4	Pia mater und Blutgefäße
3.6.5	Läsion des Nervus facialis (N.VII)
3.6.6	Repräsentativität der Schnitte
4	Diskussion 42
4.1	Methodenkritik
4.1.1	Einfluss überlebender PC auf die Identifikation Calb-positiver PVA
4.1.2	Calb in auditorischen Fasern
4.1.3	Calb in der unteren Olive und im Nervus intermedius 43
4.2	Methodenvergleich
4.3	Ergebnisvergleich
4.3.1	Bestätigung der Ergebnisse 44
4.3.2	Unterschiede zu bisherigen Ergebnissen 45
4.4	Bedeutung der Ergebnisse
4.4.1	Die Purkinje-Zell-Degeneration(<i>pcd</i>)-Maus als Modelltier für eine Subpopulation der PVA
4.4.2	Validität der PC-deprivierten Mutanten für die selektive Darstellung Calb-positiver PVA 46
5	Zusammenfassung und Summary 47
6	Literaturverzeichnis 49

5 Zusammenfassung

Die primär vestibulären afferenten Neurone und Fasern (PVA) enthalten eine Subpopulation, die mit einer Immunfärbung gegen das Calcium-bindende Protein Calbindin D-28k (Calb) darstellbar ist. Sie bildet im vestibulären Ganglion die Gruppe der großen Bipolarneurone mit ihren dicken Axonen, überwiegend irregulärem Spontanentladungsmuster und phasischem Antwortverhalten auf vestibuläre Stimulation. Sie erhalten ihre Informationen von den zentralen Regionen der peripheren Vestibularorgane über Calyx-Endigungen an Typ-I-Haarzellen.

Diese Subpopulation ist in der vorliegenden Arbeit in ihrem kompletten Faserverlauf im Hirnstamm und im Kleinhirn einschließlich aller Terminationsgebiete dargestellt.

Um eine Überlagerung Calb-positiver PVA durch die ebenfalls Calb-positiven Purkinje-Zellen zu vermeiden, wurden die Purkinje-Zell-defizitären mutanten Mäuse *Lurcher* und *Purkinje-Zell-Degeneration (pcd)* ausgewählt. Zur definitiven Identifikation Calb-positiver Fasern in Hirnstamm und Kleinhirn wurden diese Mutanten einer einseitigen Durchtrennung des Nervus vestibulocochlearis (N.VIII) unterzogen. 1-3 Wochen postoperativ wurden nach intravitraler Fixation die Hirnpräparate entnommen, coronal geschnitten und immunocytochemisch mit einem Calbindin D-28k-Antikörper aufgearbeitet.

Als Ergebnis ist auf der vestibulotomierten Seite ein kompletter Verlust aller Calb-positiven Fasern des N.VIII nachweisbar. Auf der nicht-operierten Gegenseite zeigen sich entsprechend die Calb-positiven PVA vom vestibulären Ganglion in kontinuierlich ipsilateralem Verlauf durch die vier vestibulären Kerne mit Ausnahme des kleinzelligen Teils des medialen Nucleus vestibularis. Im weiteren Verlauf ziehen diese Fasern durch die Kleinhirnerne, mit abnehmender Dichte vom medialen über den interponierten zum lateralen Nucleus cerebellaris.

Im ipsilateralen Kleinhirncortex sind Calb-positive Fasern auf die rostrale Hälfte der ventralen Uvula und den Nodus beschränkt.

Auch alle Terminalien liegen ipsilateral; Im Hirnstamm im gesamten superioren und inferioren Nucleus vestibularis, im lateralen Teil des medialen und im ventralen Teil des lateralen Nucleus vestibularis, sowie in der akzessorischen Zellgruppe Y, im Nucleus interstitialis von Cajal und in Teilen der *Formatio reticularis*.

In den Kleinhirnkernen sind die Terminalien nur im medialen und lateralen Nucleus cerebellaris nachweisbar.

Im Kleinhirncortex liegt das Projektionsgebiet der Calb-positiven PVA auf die rostrale Hälfte der ventralen Uvula und auf den Nodus begrenzt.

Die Befunde wurden diskutiert, mit den Resultaten anderer Studien verglichen und abgewogen.

Die vorliegende Arbeit erlaubt im Hinblick auf die kontroverse Diskussion über die Ausdehnung der Terminationsgebiete der PVA, den einzuschließenden Mindestumfang genau zu definieren.

Außerdem erweisen sich die *pcd*- und *Lurcher*-Maus durch den mutationsbedingten Verlust ihrer PC als ideale Modelltiere, um die komplette Calb-positive Subpopulation der PVA in ihrem Verlauf zu studieren, einschließlich ihrer Terminationen.

5 Summary

The primary vestibular afferent neurons and fibers (PVA) contain a subgroup which displays immunoreactivity for the calcium binding protein Calbindin D-28k (Calb). These Calb-positive PVA are constituted of especially large bipolar neurons in the vestibular ganglion and are characterized by large-diameter axons, an irregular spontaneous discharge patterns and predominantly phasic firing response to natural vestibular stimulation delivered through innervation of the central regions of the vestibular end organs via calyx-endings on type I vestibular hair cells.

The present study describes the complete course and terminations of this subpopulation of Calb-positive PVA in the vestibular and cerebellar nuclei and the cerebellar cortex of the mouse.

To prevent an overlapping in the staining by Calb-positive PVA from the contralateral side and by also Calb-positive cerebellar Purkinje cells (PC) and their axons, a unilateral transection of the VIIIth nerve in the PC-deficient mutant mice *Lurcher* and *Purkinje cell degeneration (pcd)* was performed. One to three weeks after recovery they underwent intravital fixation. The fixed brains were cut in the coronal plane and subsequently processed for Calb immunocytochemistry.

Vestibulectomy resulted in a complete loss of all ipsilateral Calb-positive fibers. The other side displayed the entire ipsilateral course of Calb-positive primary vestibular input including all terminations. All Calb-positive PVA and terminals are strictly unilateral.

The fibers traverse all four vestibular nuclei except for the parvocellular part of the medial vestibular nucleus and they cross all three subdivisions of the cerebellar nuclei.

Calb-positive terminations in the brainstem were restricted to the superior and to the inferior vestibular nucleus, to the ventral part of the lateral and to the lateral part of the medial vestibular nucleus, to the small cell group Y, to Cajal's interstitial nucleus and to certain areas of the reticular formation.

Calb-positive PVA terminations in the cerebellar nuclei were present in the medial and lateral cerebellar nuclei. Terminals in the cerebellar cortex were restricted only to the narrow posterior vermal areas of the rostral half of the ventral uvula and of the nodulus.

Photographs of the preparates were taken, the results were evaluated, compared to those of other studies and discussed.

Regarding the controversial discussion about the dimension of the vestibulocerebellum the present study can define the minimum distribution and extension of all PVA.

In conclusion we found that the cerebellar mutant mice, *Purkinje cell degeneration (pcd)* and *Lurcher*, provide excellent tools to selectively investigate the complete subdivision of Calb-positive PVA including their terminals.

Danksagung

Frau Professor Dr. med. U. Grüsser-Cornehls spreche ich meinen Dank für die gute Betreuung meiner Arbeit aus, insbesondere für ihre uneingeschränkt wohlwollende Unterstützung und ihr stets motivierendes und persönliches Engagement.

Herrn Dr. J. Bäurle danke ich für die geduldige Einführung in die angewandten Methoden, für

sein stets offenes Ohr, hilfreiche Anmerkungen und einige gute Tips, für die Anwendung zahlreicher Motivationsmöglichkeiten und einen Einblick in die Regeln des institutionären Forschungsbetriebs, vor allem für sehr viel organisatorische Unterstützung und die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit.

Frau H. Wolynski danke ich für ihre stets freundliche Unterstützung im Labor und Mithilfe bei den formalen Korrekturen.

Lebenslauf

Geboren	am 16.04.1965 in Nordhorn (Niedersachsen)	
Eltern	Josef Vogten, Polizeibeamter im Ruhestand Rosmarie Vogten, geb. Schaumburg, Einzelhandelskauffrau	
Schule	1972-75 1975-76 1976-82 1982-85	Grundschule Stadflur Hauptschule Deegfeld Realschule Deegfeld Allgemeines Gymnasium am Stadtring
Militärdienst	1985-86	Marine-Sanitätsausbildung auf Sylt und auf der Fregatte „Augsburg“
Berufsausbildung	1986-89	Augenoptiker-Lehre in Nordhorn und Osnabrück
Studium	Okt.1990 Aug.1992 Aug.1993 Aug.1995 Mai 1997 Jun.-Dez. 97	Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität (FU) Berlin Physikum Erstes Staatsexamen Zweites Staatsexamen Drittes Staatsexamen Grundstudium Italienisch an der FU Berlin
Beruf	1989-97 Jan.1998 1998-99 Jan.-März 00 Apr. 2000- März 2001 Apr.-Sep. 01	Vollzeit- und Teilzeit-Augenoptiker in Berlin Augen-AiP im Zentralklinikum Augsburg (Lehrkrankenhaus der Universität München) Augen-AiP und Assistenzarzt im Kantonsspital Aarau (KSA), Schweiz Assistenzarzt in der Otto-von-Guericke-Universitäts-Augenklinik Magdeburg Klinisch-wissenschaftlicher Mitarbeiter für die Glaukomsprechstunde der Universitäts-Augenklinik Basel Assistenzarzt der Universitäts-Augenklinik Basel

Forschung

- Apr.1996 Versuche zur intraoperativen Härtung
von Osteosynthesematerialien im KSA
- Jan.-Feb. 97 Forschungspraktikum in der Augenpathologie
der Johns Hopkins University in Baltimore (USA)
- Apr. 2000-
März 2001 Klinische Glaukomforschung an der Universitäts-
Augenklinik Basel

Veröffentlichungen

- J. Bäurle, H. Vogten, U. Grüsser-Cornehls : Course and Targets of the Calbindin D-28k Subpopulation of Primary Vestibular Afferents. (1998) J. Comp. Neurol., 402, 111-128.
- J. Sucker, M. Zvistic, H. Vogten : Stereosehen vor und nach Katarakt-Extraktion mit Kunststofflinsenimplantation. (2000) Ophthalmologe, 97, 676-681.
- H. Vogten, S. Orgül, M. Gekkieva, K. Gugleta, P.W. Hasler, J. Flammer : Correlation between retrobulbar color Doppler imaging and laser Doppler flowmetry in the choroid or the optic nerve head of patients with primary open angle glaucoma. (2001) Wintertagung Schweizerische Ophthalmologische Gesellschaft (SOG). Basel.
- H. Vogten, S. Orgül, K. Gugleta, J. Flammer : The Relevance of Color Doppler Imaging Measurement for Optic Nerve Head Blood Flow in Glaucoma Patients. (2001) Jahrestreffen SOG. St. Gallen.