

### 3 Ergebnisse

Die einseitige Vestibulotomie beweist, dass alle Fasern und Terminalien der dargestellten Calb-positiven Axone bei operierten und nicht-operierten Mutanten von den Calb-positiven Neuronen des VG stammen, weil sie nach dem erfolgreichen Eingriff ipsilateral komplett verschwinden (siehe Abbildungen Nr. 9, Nr.10 und Nr.11). Die dargestellten Ergebnisse sind in allen komplett vestibulotomierten Mutanten gleich und repräsentativ (Bäurle et al., 1998c).

Abbildung 9:

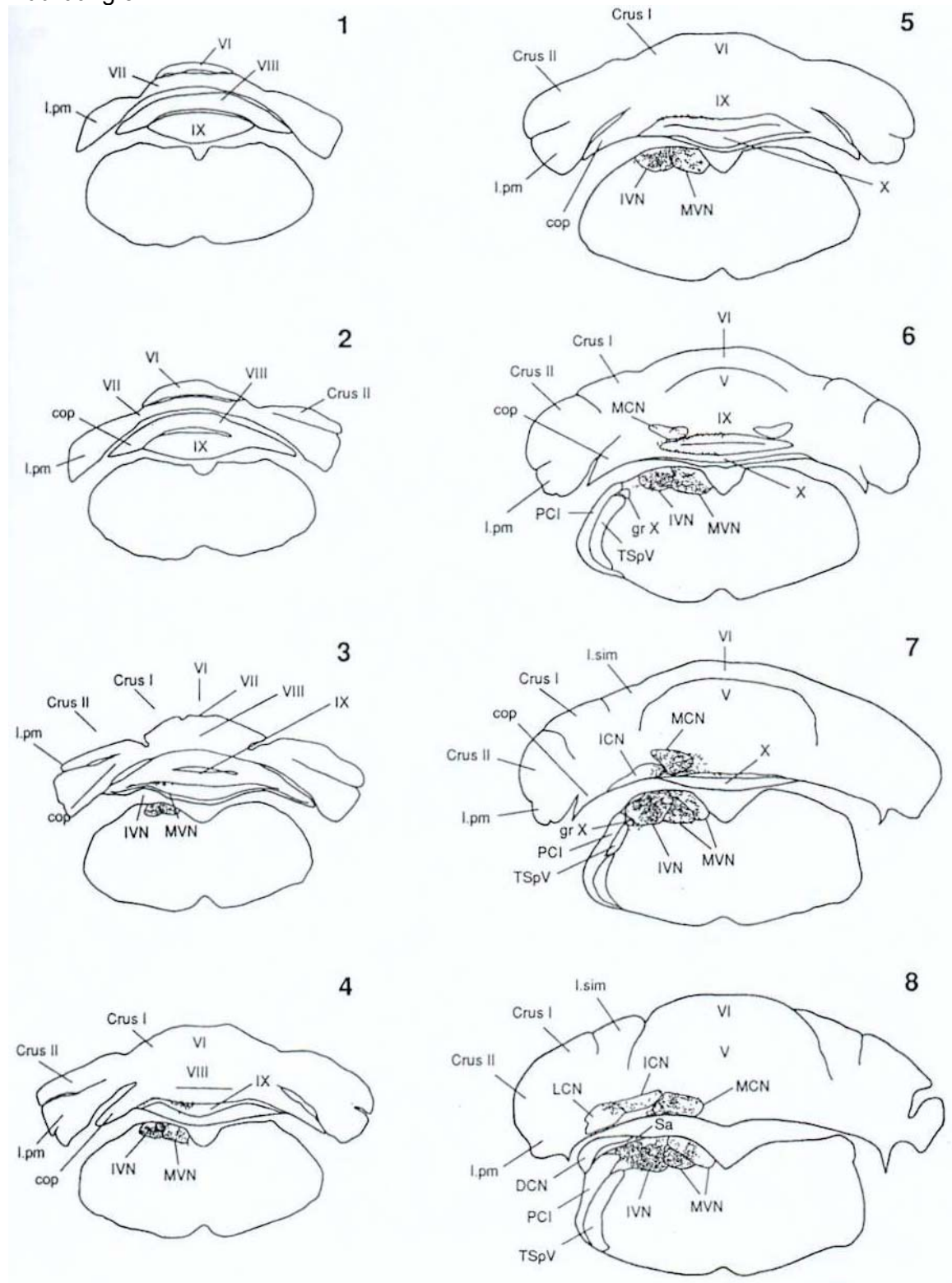
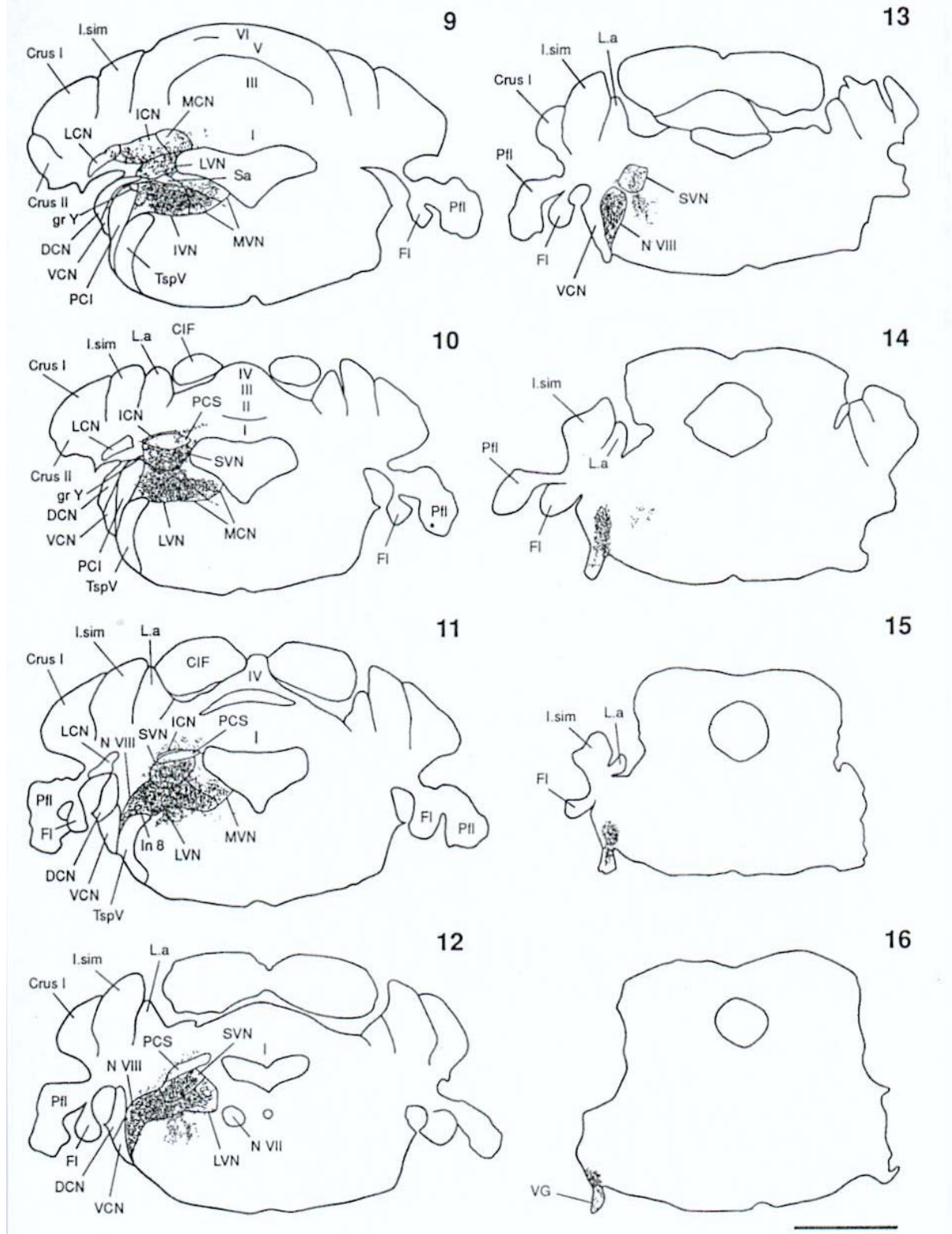


Abbildung 9:



Abbildungen Nr. 9, 1–16 :

Camera-lucida-Zeichnungen der 50 µm dicken Coronalsschnitte von rostral nach caudal mit je 150 µm Abstand zueinander. Umrandet sind die Kerngebiete und mit Punktierung dargestellt die Terminationsgebiete der PVA in den VN, in den CN und im Kleinhirncortex der *pcd*-Maus nach einseitiger Vestibulotomie (jeweils rechts). Auf der Läsions-Seite fehlen alle Calb-positiven Fasern. Auch ein Überkreuzen von Fasern auf die lädierte Hälfte ist weder im Hirnstamm noch im Cerebellum nachweisbar. Zur Legende siehe Abkürzungen. Maßstab in 1-16: 2000 µm.

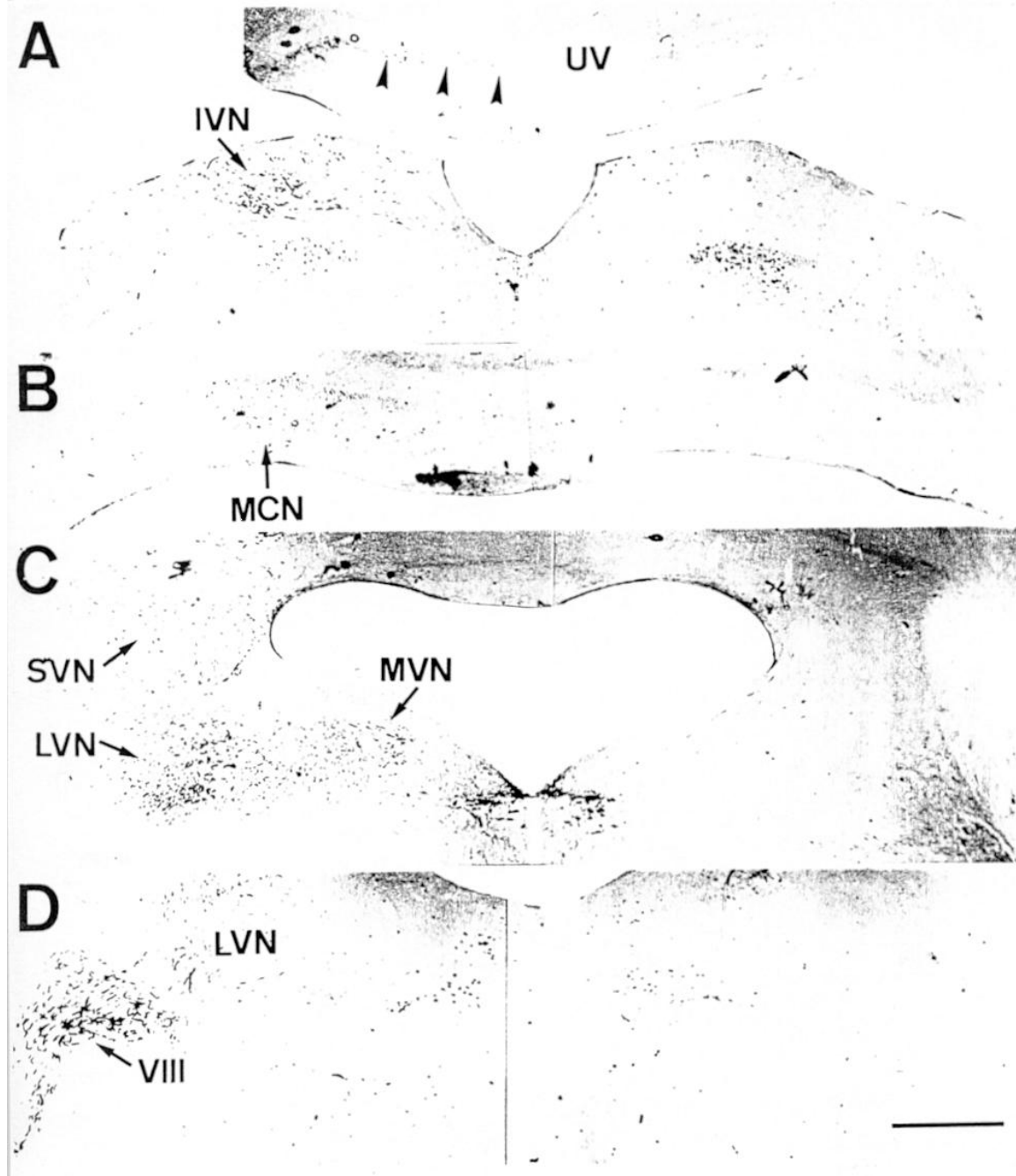
### 3.1 Eigenschaften der Färbung mit anti-Calb und DAB

Ab 5  $\mu\text{m}$  Schnittoberflächen-Entfernung kommt es zu einer Abnahme der allgemeinen Farbintensität bis zu einer Tiefe von 7-8  $\mu\text{m}$ . Alle tiefer liegenden Strukturen bleiben aufgrund der limitierten Eindringtiefe der AK und AK-Komplexe ungefärbt.

Innerhalb der oberflächlichen 5  $\mu\text{m}$  der Calb-positiven PVA ist aber keine Intensitätsabnahme der Färbung zu beobachten, da das Calcium-bindende Protein Calb im gesamten Zytosol der PVA homogen verteilt ist, unabhängig von der Entfernung zum Zellkern (Desmadryl und Dechesne, 1992; Raymond et al., 1993). Dies können wir nach unseren Beobachtungen bestätigen (Bäurle et al., 1998b,1998c). Die Varianz in der Farbintensität liegt somit ausschließlich in der Entfernung zur Schnittoberfläche begründet.

Ein 2. Marker mit gleicher Spezifität und einer gesichert kompletten und konstanten Anfärbung der gesamten Zellen zur direkten Überprüfung durch eine Doppelfärbung ist bislang nicht verfügbar.

Abbildung 10:



Abbildungen Nr.10, A-D :

Von rostral beginnende 50  $\mu\text{m}$  dicke Coronalsschnitte mit Calb-positiven PVA in einer *pcd*-Maus nach einseitiger Vestibulotomie. A: Die Calb-positiven Fasern (Pfeilspitzen) im Kleinhirncortex sind auf den Nodulus und die ventrale Uvula der nicht operierten Seite beschränkt (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-7).

B: In dieser Schnittebene erscheinen die Fasern nur im MCN. Sie zeigen sich in allen VN streng ipsilateral; der IVN in A, der MVN in C, der ventrale Teil des LVN in C und D, und der SVN in C.

Für LCN und ICN siehe Abbildungen Nr. 9, 7-11.

Auf der operierten rechten Seite fehlen alle Calb-positiven Fasern von der Nervenwurzel des N.VIII (VIII) bis in die VN, in die CN und in den Kleinhirncortex.

Die Mittellinie wird nicht überschritten (siehe Abbildungen Nr.10 A und Nr. 9, 3-11).

Maßstab: 500  $\mu\text{m}$  in A-D.

Das Auftreten der Calb-positiven Fasern in den einzelnen VN und CN, sowie im Kleinhirncortex wird im weiteren in der Reihenfolge der Schnittgewinnung von caudal beginnend beschrieben.

### 3.2 Verlauf von primär vestibulären Afferenzen im Hirnstamm

#### 3.2.1 Vestibuläre Kerne

Die vestibulären Faserbündel (siehe Abbildung Nr.15 A) treten über den ventralen LVN in den vestibulären Kernkomplex ein (siehe Abbildungen Nr. 9, 10-12) und ziehen dann mit ihrem aufsteigenden Teil zu den mehr rostral gelegenen Anteilen von MVN und SVN (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-13).

Der absteigende Nervenast tritt ebenfalls in den ventralen LVN ein (siehe Abbildungen Nr. 9, 10-12) und zieht über den caudalen MVN zum IVN (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-9).

Abbildung 11:

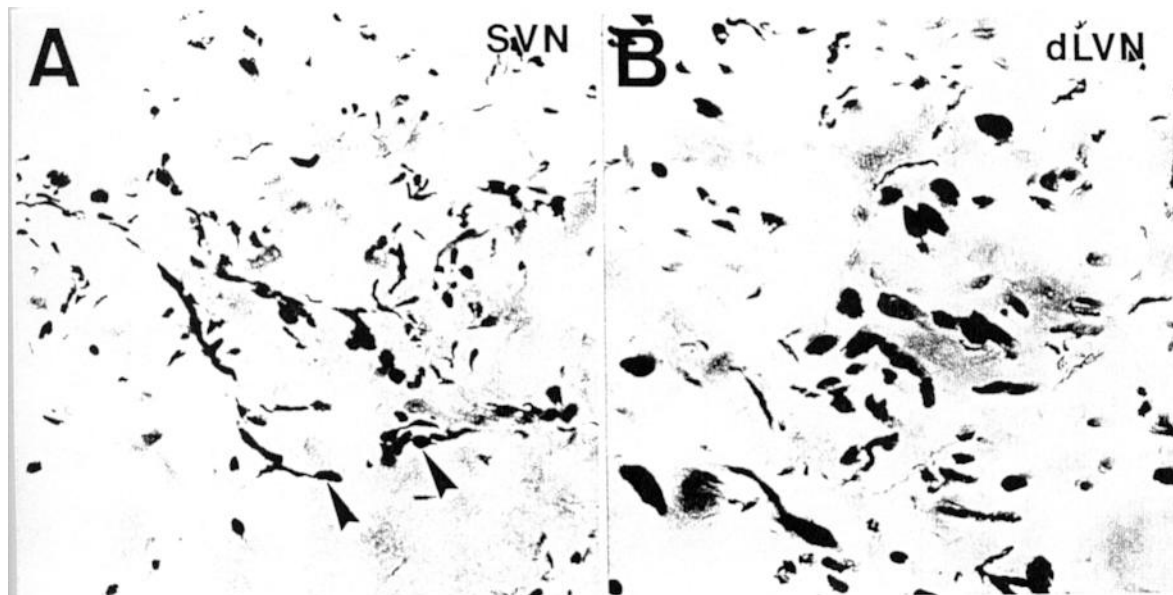
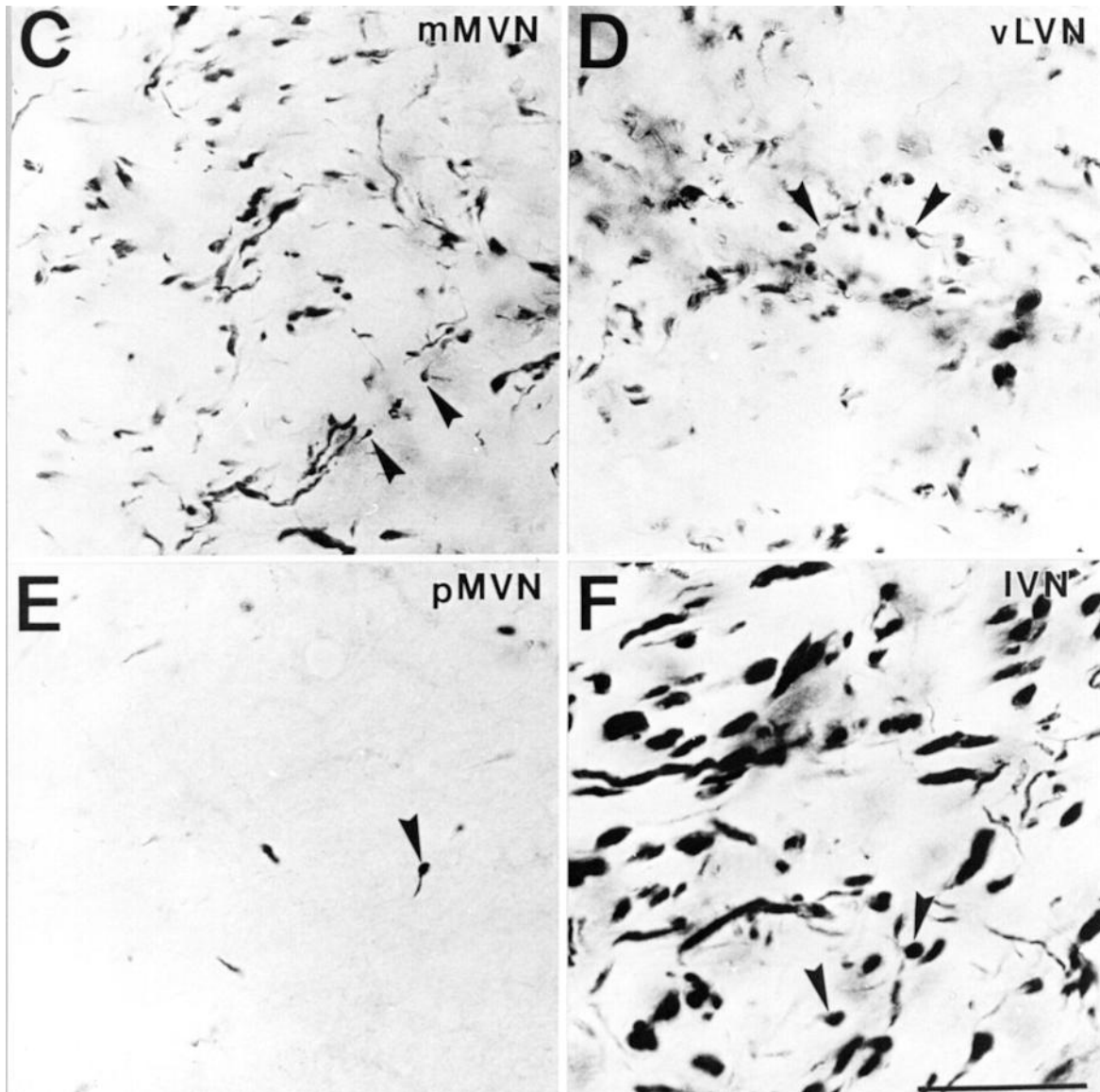


Abbildung 11:



Abbildungen Nr.11, A-F :

Calb-positive PVA in den verschiedenen Untereinheiten der VN (A-F) einer nicht-operierten *pcd*-Maus. Sowohl Fasern als auch Terminalien (Pfeilspitzen) zeigen sich im superioren (SVN; A), im vorderen Teil des lateralen (vLVN; D), im großzelligen Teil des medialen (mMVN; C) und im inferioren (IVN; F) VN. Im dorsalen Teil des lateralen VN (dLVN; B) konnten dagegen nur Fasern, aber keine Terminalien nachgewiesen werden. Im kleinzelligen Teil des medialen VN (pMVN; E) fehlen die Calb-positiven PVA fast vollständig.

Maßstab: 40  $\mu$ m in A-F.

#### 3.2.1.1 IVN (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-9 und Nr.10 A)

Die am weitesten caudal liegenden Calb-positiven Fasern zeigen sich im IVN gestreut, aber mit ventraler Präferenz (siehe Abbildung Nr.10 A), caudal eher ungerichtet, nach rostral mit vielen quergeschnittenen kräftigeren Fasern (siehe Abbildung Nr.11 F) und, im Gegensatz zum MVN, mit großer Faserdichte (siehe Abbildungen Nr.10, A+C). Die laterale Fasergrenze erscheint ausgedünnt und hat 2 zangenartige Ausläufer, die in einigen Schnitten isoliert stehen. Die Fasern lassen sich nach rostral bis zum caudalen SVN verfolgen. Direkte mediale Begrenzung ist der MVN.

#### 3.2.1.2 MVN (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-11 und Nr.10 C)

Von lateral treten im caudalen Anteil horizontal ziehende Fasern ein, die sich nach rostral ventrikulwärts anteromedial verlagern, dorsolateral treten überwiegend quer getroffene Fasern in Erscheinung.

Das MVN-Kerngebiet deckt sich mit dem Fasergebiet am besten, bis auf eine anteriore Faserstreuung, vereinzelte anteromediale Ausläufer zum Nucleus praepositus hypoglossi, sowie eine abnehmende Faserdichte, besonders nach medial und anterior zum begrenzenden 4. Ventrikel. In diesem parvozellulären Teil des MVN erscheinen die Fasern fast abwesend im Vergleich zum magnozellulären Teil des Kerns (siehe Abbildungen Nr.11, C+E).

#### 3.2.1.3 LVN (siehe Abbildungen Nr. 9, 9-12 und Nr.11, B+D)

Das Kerngebiet liegt lateral von MVN und 4. Ventrikel. Die Faserdichte ist mit der im schwer abgrenzbaren IVN vergleichbar. Die Fasern verlaufen ähnlich ungeordnet und zum großen Teil quer zur Schnittrichtung (siehe Abbildung Nr.10 C).

#### 3.2.1.4 SVN (siehe Abbildungen Nr. 9, 10-13 und Nr.11 A)

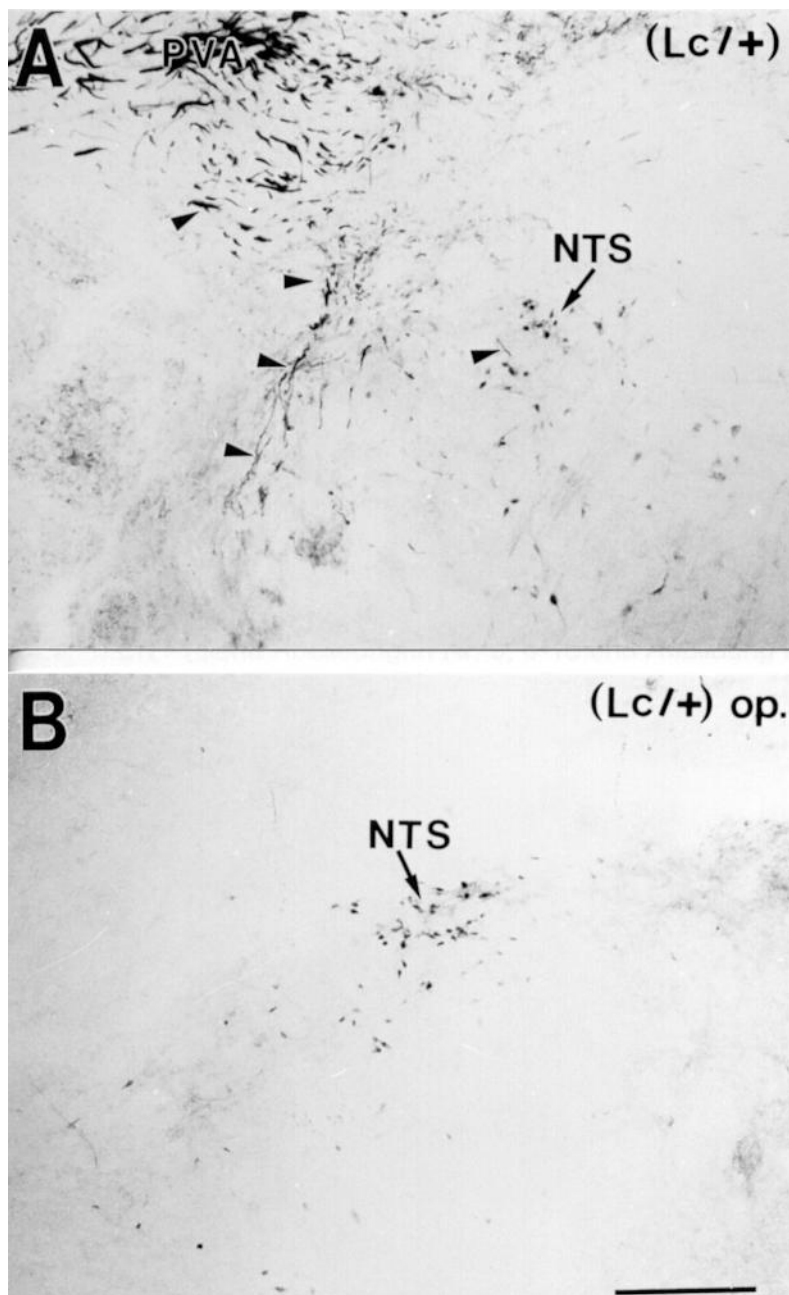
Das Kerngebiet ist hinsichtlich der Faserdarstellung vergleichbar mit dem MVN und damit von geringerer Faserdichte als der LVN (siehe Abbildung Nr.10 C) oder IVN, aber wie diese im Fasergebiet lateral des 4. Ventrikels eingebettet. Kern- und Fasergebiet korrelieren ebenfalls nicht miteinander. Der Faserverlauf ist relativ ungeordnet, mit einem Überwiegen von quer getroffenen Fasern im medialen und von horizontalen Fasern im lateralen Teil.

### 3.2.2 Weitere PVA im Hirnstamm

Des weiteren zeigen sich auf Höhe des ventralen LVN einige absteigende Fasern zur Formatio reticularis und zum überwiegend rostralen Teil des Tractus solitarius (siehe Abbildung Nr.12 A), stets unter Wahrung der Ipsilateralität.



Abbildung 12:



Abbildungen Nr.12, A+B  
Calb-positive PVA auf der Höhe  
des rostralen Anteils des Trac-  
tus nuclei solitarii (NTS) einer  
*Lurcher*-Maus nach Vestibulo-  
tomie der rechten Seite.

(A) Auf der intakten Gegen-  
seite verlassen einige PVA  
(Pfeilspitzen) die Wurzel des  
N.VIII und ziehen zum NTS und  
zur benachbarten Formatio  
reticularis.

(B) Dagegen fehlen auf der  
geschädigten Seite der glei-  
chen Maus alle Calb-positiven  
PVA, während die mit Calb  
anfärbbaren Zellkörper des  
NTS (Pfeile) weiterhin sichtbar  
bleiben.

Maßstab: 200 µm

### 3.3 Termination von PVA im Hirnstamm

Calb-positive Terminalien sind in den vier VN zu finden, bis auf den dorsalen LVN (siehe Abbildung Nr.11 B) und den parvozellulären Teil des MVN (siehe Abbildung Nr.11 E) an der Grenze zum 4. Ventrikel.



Ausserdem fanden wir Terminalien im Nucleus interstitialis Cajal (In 8) sowie in der kleinen Zellgruppe Y (gr Y), nicht jedoch in den anderen vestibuloakzessorischen Gruppen (E, F, G, L, SV, X, Z).

### 3.4 Faserverlauf und Termination von PVA im Kleinhirn

Faserverlauf: Auch im Kleinhirn zeigt sich eine Abwesenheit der Fasern auf der vestibulotomierten Seite, was die kontralateral vorhandenen Fasern eindeutig als PVA identifiziert (siehe Abbildung Nr.13 A).

Die Fasern erreichen das Kleinhirn entweder nach Durchtritt des SVN über eine Route entlang der ventralen und caudalen Grenzen des superioren Pedunculus cerebellaris oder nach Durchtritt durch den LVN über den juxtarestiformen Körper des inferioren Pedunculus cerebellaris.

Dort streuen sie mit unterschiedlicher Dichte in die CN, wobei sich die meisten Fasern nach medialem Eintritt und Ausdehnung zum posterioren Vermis über den gesamten MCN verteilen (siehe Abbildungen Nr. 9, 7-9). Der ICN und LCN erhalten weniger Fasern (siehe Abbildungen Nr. 9, 7-11).

Termination: Im Gegensatz dazu finden sich terminale Verbindungen der PVA mit den Neuronen der CN fast ausschließlich im LCN (siehe Abbildung Nr.13 A). Im MCN und ICN sind trotz größerer Faserdichte (siehe Abbildung Nr.14 G) kaum Terminalien nachweisbar.

#### 3.4.1 MCN (siehe Abbildungen Nr. 9, 6-10 und Abbildung Nr.10 B)

Der ventrolateral zur Uvula liegende CN mit der caudal weitesten Ausdehnung ist der MCN. Er ist mundähnlich geformt und dorsal an der Seitenbegrenzung des 4. Ventrikels eingebettet. Er wird anteromedial von dickeren horizontalen Fasern durchsetzt und dorsolateral von wenigen, vorwiegend ungeordnet verlaufenden Fasern.

#### 3.4.2 ICN (siehe Abbildungen Nr. 9, 7-11)

Der ICN liegt langgestreckt weit anterolateral zwischen MCN und LCN und wird zentral von überwiegend ungeordnet bis quer verlaufenden Fasern angesteuert und medial von horizontalen Fasern, die sich im ganzen Kerngebiet ausbreiten. Auf rostralen Schnitten ziehen lateral einige horizontal verlaufende Fasern in den medialen LCN.

#### 3.4.3 LCN (siehe Abbildungen Nr. 9, 8-11)

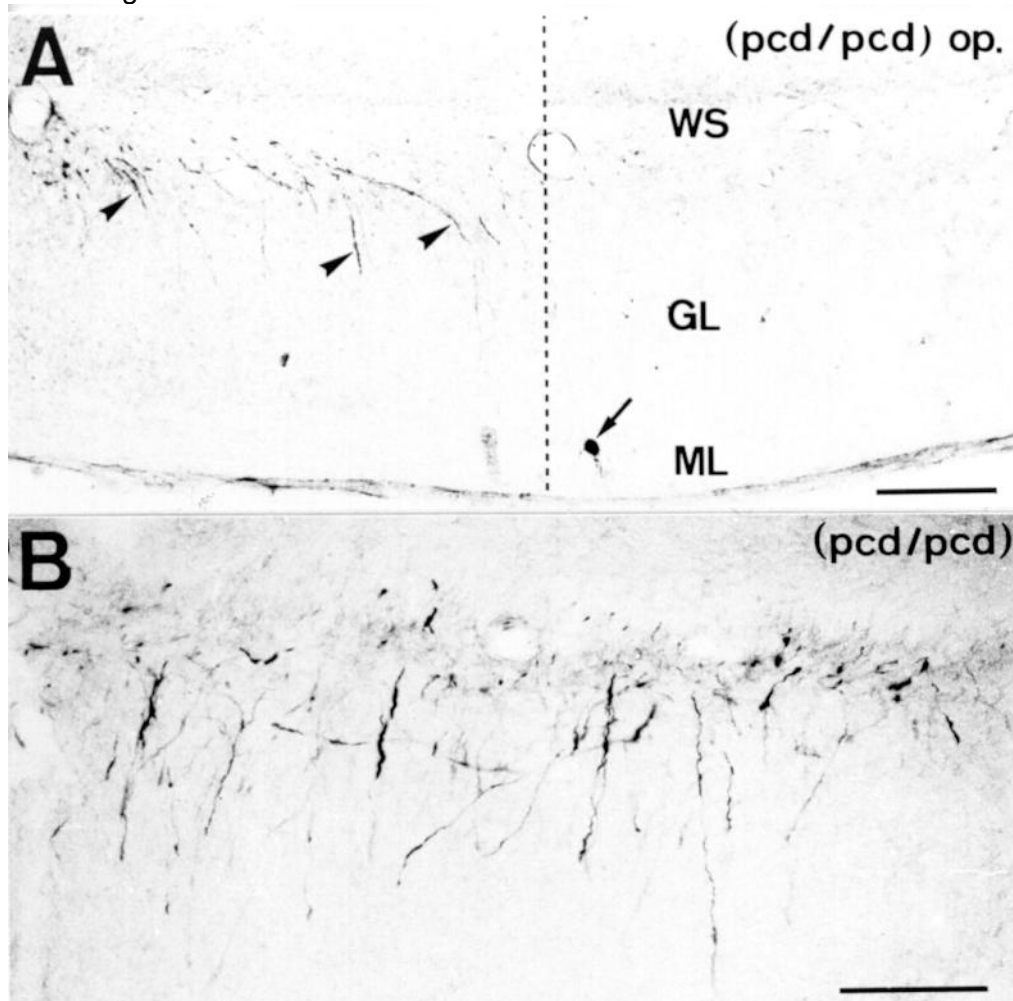
Er wird nur dorsomedial von vereinzelt vorwiegend horizontalen Fasern des angrenzenden ICN durchsetzt, zeigt aber viele Terminalien (siehe Abbildung Nr.13 D).

### 3.5 Termination von PVA im Kleinhirncortex

Nachdem die Fasern in ihrem Verlauf nach rostral die CN durchzogen haben, steuern sie ihre cerebellären Terminationsgebiete in Nodulus und Uvula an.

In der Kleinhirnrinde zeigen sich ebenso ausschließlich kontralateral zur lädierten Seite umschriebene kleine Gebiete von Calb-positiven Fasern und Terminalien (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-7 und Nr.13 A).

Abbildung 13:



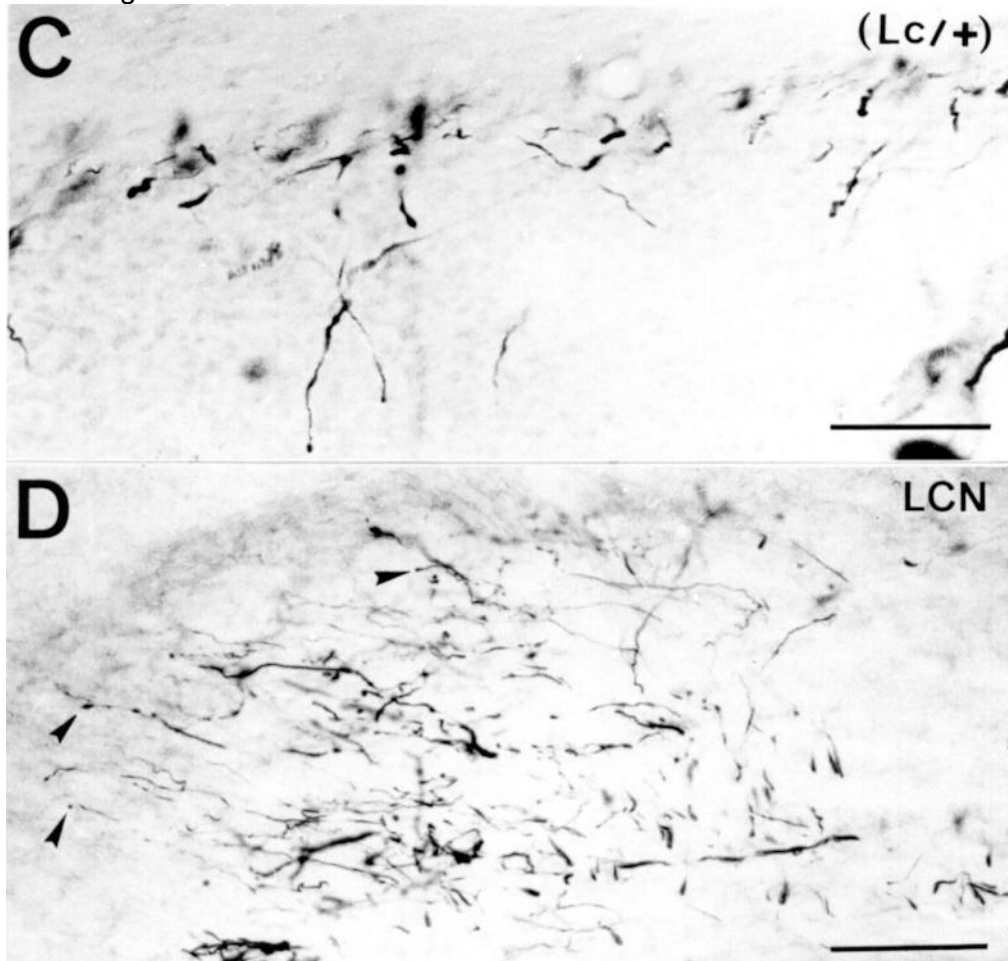
Abbildungen Nr.13, A+B :

A: Calb-positive PVA (Pfeilspitzen) in der Uvula einer *pcd*-Maus nach Vestibulotomie (op.) der rechten Seite. Nach ihrem Austreten aus der Weißen Substanz (WS) erreichen die Calb-positiven PVA die Körnerschicht (GL) der ventralen Uvula, wo sie Terminaläste abgeben (siehe folgende Abbildungen Nr.14, A+B und D+E). Die Mittellinie zwischen den beiden Kleinhirn-Hälften wurde gestrichelt markiert und verdeutlicht die strenge Ipsilateralität der Fasern. Der Pfeil markiert eine der wenigen nicht vollständig degenerierten PC in der Molekularschicht (ML).

B: Calb-positive PVA in einer nicht-operierten *pcd*-Maus. Im Gegensatz zur vestibulotomierten *pcd*-Mutante sind die Calb-positiven PVA hier bilateral verteilt.

Maßstäbe: 150  $\mu$ m in A und 100  $\mu$ m in B.

Abbildung 13:



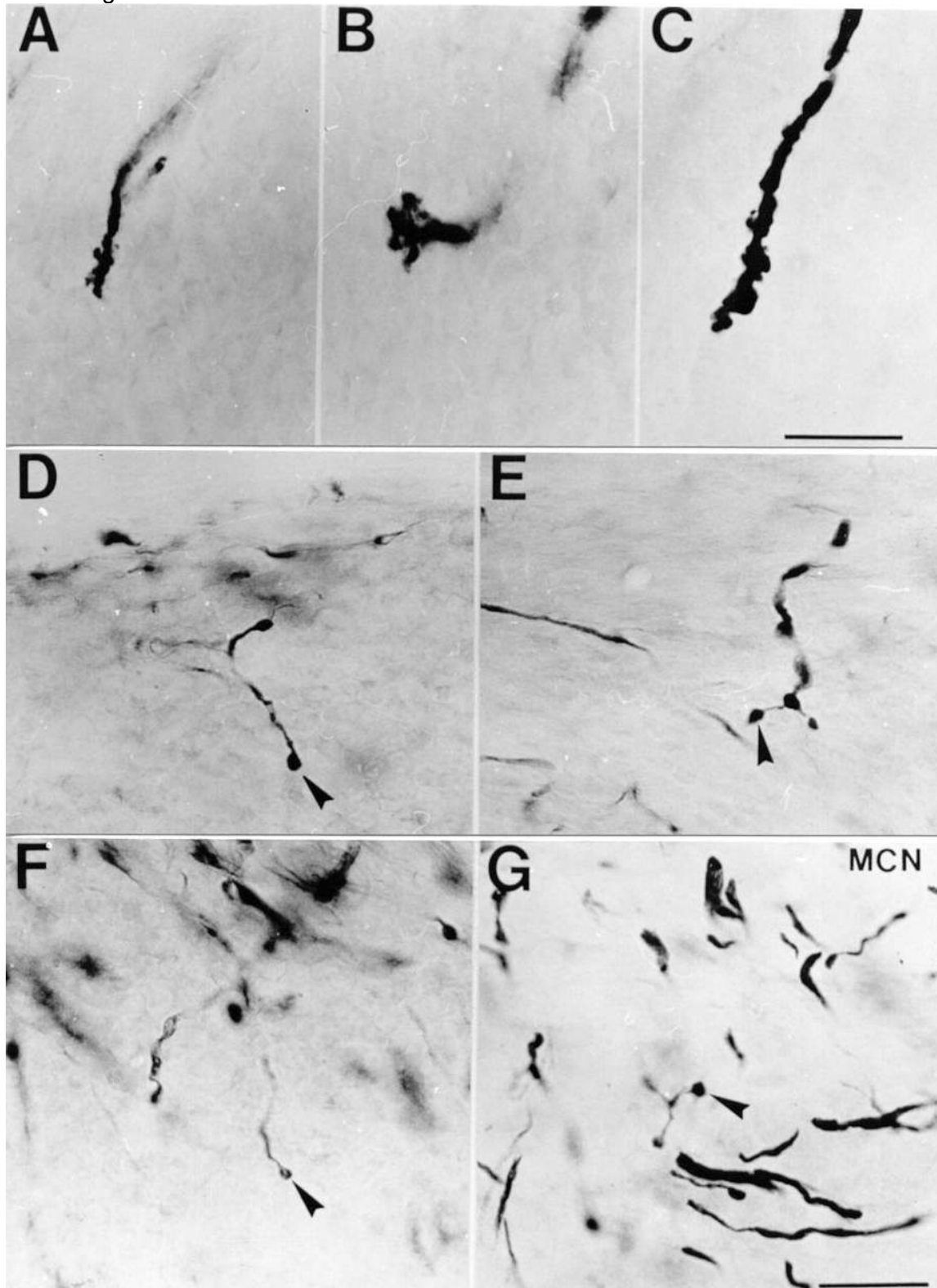
Abbildungen Nr.13, C+D :

C: Calb-positive PVA in der Uvula einer nicht operierten *Lurcher*-Mutante. Die Faser-Dichte erscheint hier geringer als in der *pcd*-Mutante.

D: Verteilung von Fasern und Terminalien (Pfeilspitzen) im LCN einer nicht-operierten *pcd*-Mutante.

Maßstäbe: 100  $\mu\text{m}$  in C und 75  $\mu\text{m}$  in D.

Abbildung 14:



Abbildungen Nr.14, A-G:

A-C: Calb-positive Moosfaser-Terminationen in der Uvula (A,B) und im Nodulus (C) einer nicht-operierten *pcd*-Maus. Gezeigt sind „komplexe Moosfaserrosetten“. D-F: „Einfache“ Moosfaser-Endigungen (Pfeilspitzen) aus den Calb-positiven PVA der GL in Uvula (D,E) und Nodulus (F) bei PC-defizitären Mäusen. „Einfache“ Moosfaser-Endigungen sind häufiger als „komplexe“. G: Eine der sehr wenigen Calb-positiven Terminalien (Pfeilspitze), die im MCN von *pcd*- und *Lurcher*-Mutanten nachgewiesen werden können. Maßstäbe in A-C: 20  $\mu$ m, in D-G: 25  $\mu$ m.

### 3.5.1 Uvula (Lobulus IX) (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-7, Nr.10 A und Nr.13 A)

Die Uvula wird nur auf der nicht-operierten Seite angesteuert, im caudolateralen Teil auf Höhe der Verschmelzung mit der Pyramis und im rostralen Teil auf die ventrale Hälfte der Uvula beschränkt, von dort mit einem Übergang in den lateralen Nodus, wie auf weiter rostral liegenden Schnitten dargestellt (siehe Abbildungen Nr. 9, 3-6 und Nr.11 A).

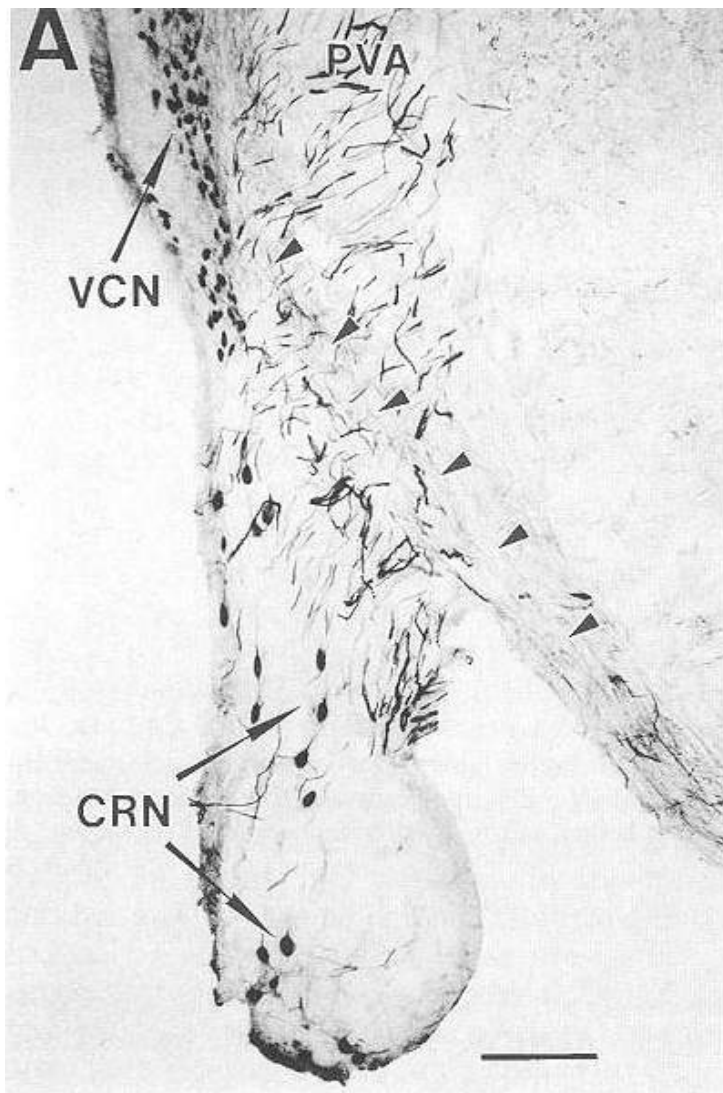
### 3.5.2 Nodus (Lobulus X) (siehe Abbildungen Nr. 9, 5-7)

Die projizierenden Calb-positiven PVA liegen durchweg ipsilateral. Nur wenige Fasern erreichen die Mittelachse, ungeachtet einer rostral zunehmenden Faserdichte. Auch das Terminationsgebiet im anteromedialen Nodus bestätigt die Ipsilateralität der Projektion.

Im Flocculus, im Paraflocculus, in der Lingula (siehe Abbildungen Nr. 9, 9-15) oder in anderen Regionen des Kleinhirncortex (siehe Abbildungen Nr. 9, 1-8) sind keine Calb-positiven Terminalien oder Fasern nachweisbar.

### 3.6 Weitere Calb-positive Zellen, Fasern und Artefakte

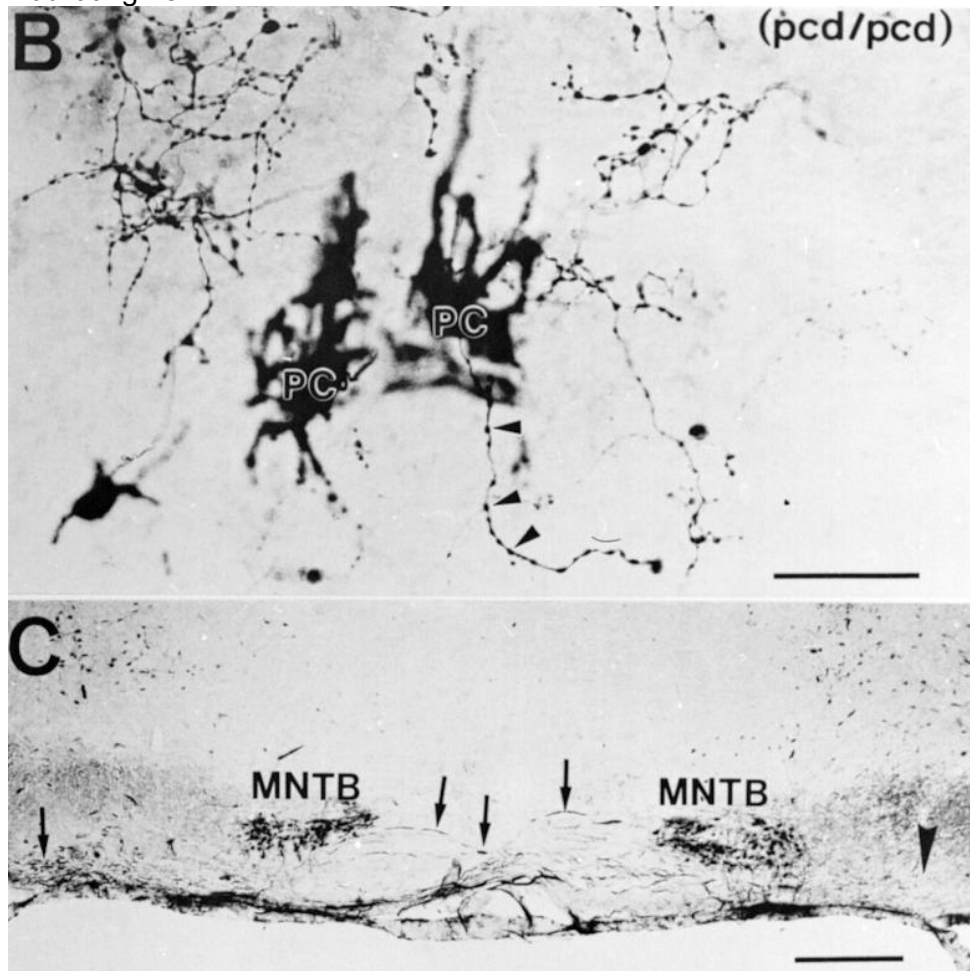
Abbildung 15:



Abbildungen Nr.15 A :

A: Eintritt des N.VIII in den Hirnstamm auf Höhe des ventralen Nucleus cochlearis (VCN) und des Kerns der cochleären Nervenwurzel (CRN). Dünne Calb-positive Fasern (Pfeilspitzen) des VCN überkreuzen ein Bündel von dicken Calb-positiven PVA und ziehen zur oberen Olive (siehe C).

Abbildung 15:



Abbildungen Nr.15, B+C:

B: Überlebende PC im Nodulus einer *pcd*-Maus (siehe auch Abbildung Nr.13 A). Die von den PC ausgehenden typischerweise sehr dünnen Fasern (Pfeilspitzen) zeigen zahlreiche charakteristische Auftreibungen entlang ihres ungerichteten und unregelmäßigen Verlaufs durch die GL.

C: Calb-immungefärbter Schnitt einer *pcd*-Maus auf der Höhe des medialen Trapezkörpers (MNTB) nach einer ausgedehnten Operation, bei der es zu einer Mitschädigung des CRN und von Fasern des VCN kam, die den Stamm des N.VIII überkreuzen (siehe A). Aufgrund dieser Schädigung sind auch die zuführenden Calb-positiven Fasern (Pfeile) auf der operierten rechten Seite (Pfeilspitze) nicht mehr vorhanden. Maßstäbe: 200  $\mu\text{m}$  in A, 50  $\mu\text{m}$  in B und 300  $\mu\text{m}$  in C.

### 3.6.1 Überlebende Purkinje-Zellen (PC) (siehe Abbildung Nr.15 B)

Eine Fraktion Calb-positiver Zellen und Fasern der operationsseitigen Kleinhirnhälfte, die nicht vestibulären Ursprungs sind, stellen die sehr wenigen, unvollständig degenerierten PC von *pcd* und *Lurcher* dar. Ihre Anzahl liegt bei den 50 untersuchten Mutanten zwischen 3 und 46 Zellen, die überwiegend im Nodulus lokalisiert sind (siehe Abbildung Nr.13 A).

Ihre Axone mit den intrakortikalen Ausläufern, sowie den äußerst spärlichen kortikokleären Fasern sind durch charakteristische morphologische Merkmale bezüglich ihrer Gestalt, ihrem Faserverlauf und der Inzidenz ihrer typischen Varikositäten leicht von den PVA zu unterscheiden (Bäurle und Grüsser-Cornehls,1994). Darüberhinaus erreicht die Faser-dicke der PC-Axone kein vergleichbares Kaliber wie die Calb-positiven PVA. Die PVA-Fasern weisen zudem einen geradlinigen und gerichteten Verlauf auf, während die PC-Fasern eher ungerichtet und geschlängelt verlaufen, häufig in weit verzweigten Fasergruppen.

Im Farbvergleich erscheinen die PC-Fasern heller und körniger und ihre degenerativen Kaliberschwankungen verleihen den PC-Fortsätzen ein diskontinuierliches Aussehen. Bei den 50 untersuchten Mutanten zeigten sich die gleichen Ergebnisse.

### 3.6.2 Calb-positive auditorische Fasern

Bei Transsektion des VIII. Hirnnervs werden immer auch die Calb-positiven Fasern von Neuronen des Ganglion spirale (Dechesne und Thomasset, 1988; Spatz und Löhle, 1995; Usami et al., 1995) mitdurchtrennt (siehe Abbildung Nr.15 A).

Diese Fasern enden in den cochleären Kernen. Dennoch wurde in einigen Fällen ein Verschwinden Calb-positiver Fasern im Corpus trapezoideum nach Vestibulotomie beobachtet. Dies war allerdings nur dann der Fall, wenn die Operation auch zur Nekrose der Wurzel des VIII. Hirnnerven führte (siehe Abbildung Nr.15 C). Dort nämlich überkreuzen Calb-positiv sekundär auditorische Fasern vom ventralen cochleären Kern die vestibuläre Nervenwurzel auf ihrem Weg zur oberen Olive über das Corpus trapezoideum (Friauf, 1994; Lohmann und Friauf, 1996). Bei Durchtrennung des Nerven distal der Wurzel des cochleären Nerven bleiben die Fasern im Corpus trapezoideum unversehrt.

### 3.6.3 Calb-positive Zellen der unteren Olive (siehe Abbildung Nr.15 C)

Es kann in unserer Arbeit eine Calb-Immunoreaktivität in den Zellen der inferioren Olive nachgewiesen werden, die sich aber mit zunehmender Distanz so weit reduziert, dass wir die Aussagen von Wassef und Mitarbeitern (1992) bestätigen können, dass alle Kletterfasern Calb-negativ sind und dass auf Höhe des Corpus restiforme keine aus der unteren Olive stammende Immunoreaktivität mehr nachweisbar ist.

### 3.6.4 Pia mater und Blutgefäße

Als auffälligen Nebenbefund fanden wir eine Calb-Positivität der den Kleinhirncortex bedeckenden Pia mater und von wenigen sich schlauchförmig darstellenden Blutgefäßen, die aber wegen ihrer typischen Morphologie und Lokalisation keine Schwierigkeiten bei der Identifizierung der PVA bereiten.

### 3.6.5 Läsion des Nervus facialis (N. VII)

Bei Durchtrennungen des VIII. Hirnnerven kann auch der Nervus intermedius des N. VII mitgeschädigt werden (Carpenter, 1960; Korte, 1979; Gerrits et al., 1989), was in der vorliegenden Arbeit aber keine Konsequenzen hat, weil dieser keine Calb-positiven Fasern führt.

### 3.6.6 Repräsentativität der Schnitte

Ein Anteil von ungefähr 30% der Schnitte wurde für andere Färbungen benutzt, so dass Lücken in der Schnittfolge bestehen. Dazu kommen weitere Lücken durch wenige nicht verwertbare Schnitte. Trotzdem zeigen sich bei den 7 Mutanten mit sicher kompletten Vestibulotomien und gleichzeitig hochwertigen Calb-Färbungen übereinstimmende Ergebnisse.

Ein eventuelles Übersehen kleinerer PVA-Zielgebiete ist praktisch ausgeschlossen, weil der jeweilig fehlende Schnitt unsystematisch immer an einer anderen Stelle liegt und auch bei mehr als 50 unoperierten Mutanten die gleichen Ergebnisse vorliegen.