

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Primäre vestibuläre Afferenzen (PVA) bipolarer Neurone (BN) im Ganglion vestibulare (VG) verbinden die peripheren vestibulären Haarzellen des Labyrinths mit den vestibulären Kernen und dem Kleinhirn. Eine Schädigung der PVA kann sowohl Symptome zentraler als auch peripherer vestibulärer Störungen verursachen. Andererseits erwiesen sich BN und PVA gegenüber der Schädigung oder dem Verlust der peripheren Gleichgewichtsorgane und der zentralen Zielzellen als sehr resistent.

Die Symptome bei cerebellären und vestibulären Mutanten der Maus werden durch periphere und zentrale vestibuläre Dysfunktion hervorgerufen. Der Einfluss dieser Störungen auf das Überleben der BN war bisher nicht bekannt und ist in der vorliegenden Studie untersucht worden.

Aus diesem Grund wurde die Gesamtneuronenzahl im VG der cerebellären Mutanten *weaver* (*wv/wv*), *Lurcher* (*Lc/+*) und *purkinje cell degeneration* (*pcd/pcd*) sowie in den vestibulären Mutanten *jerker* (*je/je*), *shaker-1* (*sh/sh*) und *Varitint-waddler* (*Va/+*) mit Hilfe stereologischer Methoden bestimmt. Zusätzlich wurde die Subpopulation großer Bipolarneurone, die Typ I-Haarzellen mit Calyx-Endigungen innerviert und durch irreguläre Aktivität und phasische Entladungsmuster charakterisiert ist, quantitativ erfasst, indem diese Population selektiv mit Antikörpern gegen das Calcium-bindende Protein Calretinin (Calr) markiert wurde. Die quantitativen Parameter wurden an Semidünnschnitten ermittelt, und die Absolutzahl der Neurone des vestibulären Ganglions mit Hilfe der „physical disector“-Methode determiniert.

Die Gesamtneuronenzahl im VG von Wildtyp-Mäusen betrug 3431 ( $\pm 125.19$ ). 509 ( $\pm 38.98$ ) dieser Neurone waren Calr-positiv und entsprachen einem Anteil von etwa 15% an der Gesamtneuronenzahl. Obwohl die Gesamtzahl bipolarer Neurone weder bei cerebellären noch bei vestibulären Mutanten signifikant reduziert war, zeigte sich eine deutliche Reduktion Calr-positiver Neurone von 23% bei *jerker* und 34% bei *shaker-1*. Diese beiden Mutanten wiesen auch eine geringere Zellgröße und ein reduziertes Ganglienvolumen auf.

Der signifikanten Reduktion Calr-positiver Bipolarneurone könnte ein realer Zellverlust zu Grunde liegen, der aufgrund der geringen Größe dieser Subpopulation im Vergleich zur Gesamtneuronenzahl unterhalb des Signifikanzniveaus liegt. Die Zahl Calr-positiver Neurone

könnte aber auch als Ergebnis einer Down-Regulation der Calr-Expression in diesen Neuronen reduziert sein. Da die Mutationen in *jerker* und *shaker-1* Mutanten die Aktinbündelung in den Stereozilien der Haarzellen beeinträchtigen, ist eine gestörte sensorische Transduktion anzunehmen, die zu einem reduzierten Input der Haarzellen auf die PVA führen könnte. Als Konsequenz könnte sich eine geringere Anforderung an eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferaktivität, wiedergegeben durch eine hohe Expression von Calr, ergeben, die zu einer Reduktion des Calr-Gehaltes unter die immunocytochemische Nachweisbarkeit in einigen dieser Neurone führen könnte.

Diese Ergebnisse erhärten frühere Befunde, dass bipolare Neurone hochresistent gegenüber zentraler Zielzelldeprivation und peripherer vestibulärer Schädigung sind, und zeigen, dass geringfügige Änderungen der Proteinkomposition einer geringen Zahl von Bipolarneuronen oder ein Weiterbestehen spezifischer Bipolarneurone zu den vestibulären Symptomen in diesen Mutanten beitragen könnten.

## SUMMARY

The primary vestibular afferents (PVA) of bipolar neurons (BN) in the vestibular ganglion (VG) connect the peripheral vestibular hair cell sensors of the labyrinth with the vestibular nuclei and the cerebellum in the CNS. Thus, damage to PVA may cause symptoms characteristic for central as well as for peripheral vestibular disorders, BNs and PVA have been shown to outlive extensive damage or loss of vestibular end organs as well as central target deprivation for a long time and in many instances. In cerebellar and vestibular mutant mice vestibular symptoms are evoked by peripheral and central vestibular dysfunction or cell loss, respectively. However, the impact of these disturbances on the maintenance of BPs in these mutants is not known.

In the present study, the total number of BNs was estimated in the VG of the cerebellar mutants *weaver (wv/wv)*, *Lurcher (Lc/+)* and *purkinje cell degeneration (pcd/pcd)* and in the vestibular mutants *jerker (je/je)*, *shaker-1 (sh/sh)* and *Varitint-waddler (Va/+)* using unbiased stereological methods. Moreover, the total number of BNs expressing the calcium-binding protein Calretinin (Calr), which is a selective marker of a subpopulation of large-diameter PVA with calyx-endings, irregular activity and phasic response dynamics, was quantified by combined physical disector stereology and Calr-immunocytochemistry on semithin sections.

In result, the total number of BNs in the VG of wild-types was 3431 ( $\pm 125.19$ ) and the number of Calr-positive BNs was 509 ( $\pm 38.98$ ), corresponding to about 15% of the total BN population. Although the complete number of BNs was neither reduced significantly in cerebellar nor in vestibular mutants, the number of Calr-positive BNs showed a clear reduction by 23% in *je/je* and 34% in *sh/sh*. Both, *je/je* and *sh/sh*, showed an additional decrease in cell size and ganglionic volume. The significant reduction of Calr-positive BNs in *je/je* and *sh/sh* might result from a true cell loss, which, due to the small size of this subpopulation, does not reach the level of significance with respect to the complete population of all BNs. Alternatively, the number of Calr-positive BNs is decreased as a consequence of a downregulation of Calr-expressing in these neurons. As in both, *je/je* and *sh/sh*, the mutations affect actin-bundling in stereocilia of hair cells, sensory transduction is likely to be disturbed in these mutants, and this in turn might lead to a reduced hair cell input on PVA. In consequence, there is no further need for a high calcium-buffering capacity,

reflected by high level expression of Calr, leading to a decrease in Calr-content beyond immunocytochemical detectability in some of these neurons.

These results do not only support the view, that BNs are highly resistant to central target deprivation and peripheral vestibular damage, but also indicate that more subtle alterations in the protein composition of relatively few BNs or in the maintenance of specific BNs may contribute to the vestibular symptoms in these mutants.