

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

**Der Einfluss des Purkinje-Zell Inputs auf die Parvalbumin
Expression in den tiefen cerebellären Kernen**

Eine Untersuchung an den mutanten Mäusen Staggerer, Nervous und Lurcher

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Muna-Miriam Hoshi
aus Bad Dürkheim

2000

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

Korreferent: Prof. Dr. med. M. Straschill

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 07.09.2001

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einführung</i>	1
1.1	Allgemeine Einleitung	1
1.2	Das Cerebellum	3
1.2.1	Makroskopische Anatomie	3
1.2.2	Histologie	5
1.3	Organisation und Projektionsziele corticofugaler Efferenzen	10
1.3.1	Kleinhirnkerne	10
1.3.2	Vestibuläre Kerne	12
1.4	Cerebelläre Afferenzen	14
1.4.1	Kletterfasern	14
1.4.2	Moosfasern	14
1.4.3	Monoaminerge Afferenzen	15
1.5	Histogenese	15
1.6	Cerebelläre Mutationen bei der Maus	16
1.6.1	Die Staggerer Mutante	17
1.6.2	Die Nervous Mutante	20
1.6.3	Die Lurcher Mutante	22
1.7	Calcium-bindende Proteine als selektive Nervenzell-Marker	25
1.7.1	Parvalbumin	26
1.7.2	Calbindin D-28k	27
1.8	Funktionen und Störungen des Cerebellums	28
1.8.1	Das Mikrozonon- und Mikrokomplexmodell	30
1.8.2	Das Seitenwegmodell	31
1.9	Frühere Untersuchungen als Basis zur Formulierung der Arbeitshypothese	32
1.9.1	Untersuchungen in den Kleinhirn- und vestibulären Kernen der Purkinje Cell Degeneration Mutante	32
1.9.2	Verhaltensbeobachtungen an Mäuse-Mutanten	33
1.10	Arbeitshypothese und Fragestellungen	33
2	<i>Material und Methoden</i>	34
2.1	Versuchstiere	34
2.2	Antikörper	35
2.2.1	anti-Calbindin D-28k	35
2.2.2	anti-Parvalbumin	36
2.3	Immuncytochemie	36
2.3.1	Anästhesie	36
2.3.2	Perfusion	36
2.3.3	Einbettung	37
2.3.4	Vibratomschnitte	37
2.3.5	ABC-Methode	37
2.4	Auswertung und Datenerhebung	40
2.4.1	Quantitativ	40
2.4.2	Statistik	41
2.4.3	Qualitativ	41

3	Ergebnisse	42
3.1	Einführende Bemerkungen	42
3.2	Bestimmung des Purkinje-Zell Verlustes und der Denervation der Kleinhirnerne anhand von Calbindin D-28k Immuncytochemie	42
3.2.1	Wildtypen	42
3.2.2	Staggerer	43
3.2.3	Nervous	43
3.2.4	Lurcher	43
3.3	Parvalbumin in Neuronen der Kleinhirnerne	44
3.3.1	Wildtypen	44
3.3.2	Staggerer	44
3.3.3	Nervous	44
3.3.4	Lurcher	45
3.4	Chronologische Korrelation des Purkinje-Zell Verlustes mit dem Erscheinen Parvalbumin-positiver Neurone in den Kleinhirnerne	53
3.4.1	Nervous	53
3.4.2	Lurcher	53
3.5	Bestimmung der Volumina der Kleinhirnerne	56
3.5.1	Nervous	56
3.5.2	Lurcher	56
4	Diskussion	57
4.1	Technik	57
4.1.1	Fixierung und Inkubation	57
4.2	Existenz einer Abhängigkeit zwischen Purkinje-Zell Verlust und Parvalbumin Expression in den Kleinhirnerne	57
4.2.1	Topographie des corticalen Purkinje-Zell Verlustes und der Reduktion des Purkinje- Zell Inputs in den Kleinhirnerne bei cerebellären Mutanten	58
4.2.2	Topographische Korrelation zwischen Purkinje-Zell-Input Verlust und Parvalbumin Anstieg in den Kleinhirnerne	60
4.2.3	Chronologische Korrelation des Auftretens von Parvalbumin mit der Degeneration der Purkinje-Zellen	61
4.3	Bedingungen für eine Parvalbumin-Elevation in den Kleinhirnerne	62
4.3.1	Bedeutung von Parvalbumin und von Parvalbumin-positiven Neuronen in den Kleinhirnerne	63
4.4	Vergleich mit Studien an anderen Mutanten	65
4.4.1	Purkinje Cell Degeneration Mutante	65
4.4.2	Weaver Mutante	66
4.4.3	Leaner Mutante	68
4.5	Funktionelle Implikationen der Parvalbumin-Expression für die Motorik	69
4.6	Weitere anterograde Effekte des Purkinje-Zell Verlustes	73

5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	78
7	Appendix	94
8	Danksagung	95
9	Lebenslauf	96

Abkürzungsverzeichnis

ACH	Acetylcholin
anti-Calb	Antikörper gegen Calbindin D-28k
anti-Parv	Antikörper gegen Parvalbumin
Asp	Aspartat
BSA	Rinderserumalbumin
Calb	Calbindin D-28k
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DCN	tiefe cerebelläre Kerne
E	Embryonaltag
GABA	γ -Aminobuttersäure
GIRK 2	G-protein dependent inwardly rectifying K ⁺ channel
Glu	Glutamat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
ICN	Nucleus cerebellaris interpositus
IVN	Nucleus vestibularis inferior
Lc	Lurcher-Mutante
LCN	Nucleus cerebellaris lateralis
LVN	Nucleus vestibularis lateralis
MCN	Nucleus cerebellaris medialis
min.	Minuten
MVN	Nucleus vestibularis medialis
<i>nr</i>	Nervous-Mutante
P	Postnataltag
Parv	Parvalbumin
PBS	Phosphatpuffer
PC	Purkinje Zelle/ Purkinje Zellen
<i>pcd</i>	Purkinje Cell Degeneration-Mutante
ROR α	retinoid-related orphan receptor alpha
<i>sg</i>	Staggerer-Mutante
SVN	Nucleus vestibularis superior
TBS	Trisphosphatpuffer
<i>tg</i>	Tottering-Mutante
<i>tg^{la}</i>	Leaner-Mutante
Tr.	Tractus
VN	vestibuläre Kerne
VOR	vestibulo-oculärer Reflex
<i>wv</i>	Weaver-Mutante
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt morphologische Veränderungen in den Projektionsarealen der PC, den DCN, bei den cerebellären Mäusemutanten *sg*, *nr* und *Lc*, die sich durch ihren selektiven Neuronenverlust im Cerebellum als Modelle für die Untersuchung von mutationsbedingten Störungen und ihren Folgeerscheinungen besonders eignen. Bei der *sg*-Mutante kommt es zu einem PC-Verlust von etwa 75% und darüberhinaus zu einer wahrscheinlich transsynaptischen retrograden Degeneration von Körnerzellen und Neuronen der unteren Olive. Der PC-Verlust bei den anderen beiden Mutanten ist umfangreicher: bei *nr* beträgt er zwischen 92 und 97%, bei *Lc* über 97%. Vergleichbar mit *sg* kommt es auch hier zu sekundären degenerativen Veränderungen in unterschiedlichen Neuronenpopulationen des Cerebellums. Durch die direkten und indirekten Auswirkungen der Mutation kommt es also zu einer Umorganisation der synaptischen Verbindungen des cerebellären Cortex und damit auch zu einer Veränderung funktioneller Eigenschaften, die sich in einer Alteration motorischer Fähigkeiten äußert.

Gegenstand dieser Arbeit war die Frage, inwieweit es bei diesen Mutanten in den DCN, die in direkter Verbindung mit dem cerebellären Cortex stehen, zu Veränderungen kommt, die eventuell mit einer Kompensation mutationsbedingter Defizite in Zusammenhang gebracht werden können. Entscheidend bei der Beurteilung solcher Veränderungen ist immer der Vergleich mit den Verhältnissen im intakten System.

Der Arbeit zugrunde liegen Untersuchungen in den DCN von *pcd*-Mutanten, die unter einer fast vollständigen Degeneration der PC-Population leiden. Immunocytochemisch konnte in den Neuronen der DCN dieser Mutanten die Expression des Calciumbindenden Proteins Parv nachgewiesen werden, was in Wildtypen nicht möglich ist. Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Parv-Expression bei cerebellären Mutationen mit PC-Verlust eine generelle Antwort als Folge des reduzierten PC-Inputs darstellen könnte. Immunocytochemisch wurde diese These an den DCN der Mutanten *sg*, *nr* und *Lc* überprüft. Die quantitative Reduktion der PC-Population wurde anhand von Antikörpern gegen Calbindin D-28k, einem

spezifischen PC-Marker, dokumentiert. In alternierenden Schnitten wurde die Immunocytochemie mit Antikörpern gegen Parvalbumin durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Abhängigkeit zwischen der Expression von Parv in den DCN und dem PC-Verlust besteht, wobei das quantitative Ausmaß, die Topographie und Chronologie des PC-Verlustes die entscheidenden Einflussgrößen sind, die über Vorhandensein oder Fehlen von Parv in den DCN entscheiden. Es konnte bewiesen werden, dass 1.) nur ein extremer PC-Input Verlust in den DCN, der eine bestimmte Schwelle überschreitet, zu einer Parv Elevation führt, 2.) Parv genau in den Arealen, in denen es zum PC-Input Verlust kommt, exprimiert wird und 3.) der PC-Terminalien Verlust in den DCN beginnen muss, bevor Parv-positive Neurone in den DCN erstmals sichtbar werden, also auch ein chronologischer Zusammenhang zwischen Terminalienverlust und Parv Elevation besteht. Diese Befunde wurden im Kontext von immunocytochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen an anderen Mutanten diskutiert.

Trotz ihres nahezu kompletten PC-Verlustes weisen *pcd*-Mutanten relativ geringe motorische Defizite auf. Diese in Relation zum Ausmaß des PC-Verlustes diskreten motorischen Störungen sind bei nahezu allen Mutanten, die Parv in Neuronen der DCN exprimieren, zu beobachten. Das Vorhandensein von Parv wird mit erhöhter Aktivität entsprechender Neurone in Verbindung gebracht, und Parv wird vorwiegend in inhibitorischen Neuronen lokalisiert. Möglicherweise kommt es also durch die Expression von Parv in den DCN zur Wiederherstellung verlorengangener Hemmung, was sich stabilisierend auf die motorischen Fähigkeiten auswirkt. Die Elevation von Parv in den DCN der Mutanten ist demnach das Ergebnis anterograder Effekte in einem Projektionsareal der PC und stellt einen Kompensationsmechanismus dar, der von Nutzen für die Motorik ist.

Diese möglichen funktionellen Implikationen der Parv-Elevation für die Motorik der Tiere wurden ebenfalls im Vergleich mit Untersuchungen an anderen Mutanten und mit Transplantationsversuchen embryonaler PC, die über einen anderen Weg die Rekonstituierung verlorener Hemmung erreichen sollen, kritisch diskutiert.

Abschließend wurde ein weiterer anterograder Effekt des PC-Verlustes, die Reduktion des Volumens in den DCN von *nr* und *Lc*, im Vergleich mit anderen cerebellären Mäusemutanten besprochen.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Grüsser-Cornehls für die Auswahl des Themas der Dissertation, ihre Unterstützung und immerwährende Ansprechbarkeit im Verlauf der Arbeit.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Doktor Bäurle für die intensive Betreuung während der Experimente und des Verfassens der Dissertation, seine unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion, sowie für seine kritischen Einwände, die ich stets als stimulierend und konstruktiv erlebt habe.

Ebenso möchte ich Frau Wolynski Dank sagen für die Einführung in die Laborarbeit und ihre Hilfsbereitschaft bei der Beschaffung der Literatur und bei Korrekturarbeiten. Herrn Holzner danke ich sehr für seine Hilfe bei den Photoarbeiten.

Lebenslauf

Name:	Muna-Miriam Hoshi	
Geburtsdatum:	09. August 1971	
Geburtsort:	Bad Dürkheim	
Abitur:	1990	Gymnasium Wiesloch
Medizinstudium:	1991-93	Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
	1993-98	Freie Universität, Berlin
Praktisches Jahr:	1997-98	Chirurgie, St. Josef Krankenhaus, Berlin
		Innere Medizin, St. Clara Spital, Basel, CH
		Neurologie, Charité, Berlin
Berufliche Tätigkeit:	02/99-02/00	Ärztin im Praktikum Neurologische Universitätsklinik des Kantonsspitals Basel
	seit 05/00	Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin Neurologische Abteilung des Klinikums Grosshadern der Ludwig Maximilians Universität München
