

1. EINFÜHRUNG

1.1. Allgemeine Einleitung

Die motorischen Störungen, die durch Schädigungen des vestibulären Systems hervorgerufen werden, führen zu einer klinischen Symptomatik, die mit zu den eindrucksvollsten unter den motorischen Dysfunktionen zählt. Die motorischen Fehlleistungen betreffen nahezu alle Aspekte, sowohl der Körperhaltung als auch der Bewegungsausführung, und erzeugen in der Akutphase ein Syndrom, das durch den Mangel an Integration körpereigener Bewegungen und statischer Reaktionen mit dem räumlichen Kontext und der Orientierung des Körpers im Raum gekennzeichnet ist. Dem ausgeprägten motorischen Phänotyp bei vestibulären Schädigungen steht eine weitgehende Unsicherheit gegenüber, einzelne Symptome und Fehlfunktionen bestimmten Komponenten zuzuordnen. Eine Sonderstellung nehmen dabei die primären vestibulären Afferenzen (PVA) ein, die die peripheren Haarzellsensoren mit dem ZNS verbinden und damit die sensorischen Informationen den motorischen Zentren des ZNS zugänglich machen. Schädigungen der PVA können sowohl Symptome peripherer als auch zentraler Störungen hervorrufen. Die multisensorische Natur der motorischen Kontrolle innerhalb des zentralen vestibulären Systems erschwert die Abgrenzbarkeit zu anderen sensorischen Ataxien zusätzlich, ebenso die weitreichende Restitution durch vestibuläre Kompensation. Mit Hilfe einer Reihe morphologischer und funktioneller Kriterien lassen sich vestibuläre Bipolarneurone und ihre PVA in verschiedene Subpopulationen unterteilen. Die jeweilige physiologische Funktion dieser Subpopulationen ist aber bis heute nicht hinreichend geklärt. Calretinin (Calr), ein Calcium-bindendes Protein (CaBP), ist ein selektiver Marker der großen Bipolarneurone mit phasisch-tonischen PVA.

In der vorliegenden Arbeit wurden vestibuläre Mutanten mit und ohne degenerative Veränderungen im vestibulären Ganglion (VG) und im Gleichgewichtsorgan sowie cerebelläre Mutanten zur Untersuchung der Einflüsse zentraler und peripherer Schädigung auf die Vulnerabilität der genannten Subpopulationen ausgewählt.

Da die hier dargestellten experimentellen Befunde an cerebellären und vestibulären Mutanten erhoben wurden und sehr enge vestibulo-cerebelläre Interaktionen bestehen, werden im Folgenden beide Systeme kurz eingeführt.

1.2. Makroskopische Anatomie des Kleinhirns

Das Kleinhirn ist das Integrationszentrum für die Koordination und Feinabstimmung von Bewegungsabläufen. Es befindet sich in der hinteren Schädelgrube und sitzt der Medulla oblongata und dem Pons von dorsal her auf und bildet so das Dach des 4. Ventrikels. Durch die drei Kleinhirnstiele, den Pedunculus cerebellaris superior, medius und inferior, ist das Kleinhirn mit dem Hirnstamm verbunden. Durch diese Pedunculi cerebellares empfängt das Cerebellum seine Afferenzen vorwiegend über den mittleren und unteren Kleinhirnstiel und entsendet seine Efferenzen vorwiegend über den oberen Kleinhirnstiel. Eine Duraduplikatur, das Tentorium cerebelli, trennt das Klein- vom Großhirn.

Die Oberfläche des Kleinhirns ist bei makroskopischer Betrachtung ähnlich wie die des Großhirns durch zahlreiche Fissurae in Lobi unterteilt. Erkennbar sind zwei Hemisphären, die durch den Vermis voneinander getrennt sind.

Aus funktionellen und z.T. entwicklungsgeschichtlichen Gründen lässt sich nach Brodal (1981) das Cerebellum in drei Anteile gliedern:

Das *Vestibulocerebellum*, das oft mit dem entwicklungsgeschichtlich ältesten Teil des Kleinhirns, dem Archicerebellum, gleichgesetzt wird, und vor allem aus dem Nodus und dem Flocculus besteht. Beide weisen enge funktionelle Verbindungen zum Vestibularapparat des Innenohrs auf und bilden zusammen den Lobus flocculonodularis.

Das *Spinocerebellum*, oft mit dem Palaeocerebellum gleichgesetzt, erhält den Hauptteil seiner Afferenzen aus dem Rückenmark und besteht überwiegend aus dem Vermis und den paravermalen Zonen.

Das *Pontocerebellum*, phylogenetisch als Neocerebellum jüngster Anteil des Kleinhirns, erhält seine Afferenzen größtenteils aus den Brückenkernen und steht über den Pons funktionell in enger Beziehung zum Großhirn. Es besteht aus den beiden Hemisphären.

Die wichtigste und gebräuchlichste Gliederung geht auf die corticofugale Projektion des Cerebellums, beschrieben von Jansen und Brodal (1940, 1942), zurück. Nach dieser Gliederung besteht das Kleinhirn aus drei longitudinalen, topographisch organisierten Zonen, die in die tiefen cerebellären Kerne und den vestibulären Kernkomplex projizieren. Die mediale Zone (Pars media) projiziert zum Nucleus fastigii (Nucleus cerebellaris medialis) und in die vestibulären Kerne, die intermediäre (Pars intermedia) zum Nucleus interpositus (beim

Menschen weiter unterteilt in Nucleus globosus und Nucleus emboliformis), und die laterale Zone (Pars lateralis) zum Nucleus dentatus (Nucleus cerebellaris lateralis).

Im Sagittalschnitt erkennt man durch die starke Fältelung der cerebellären Rinde den sogenannten Arbor vitae. Im Horizontalschnitt stellen sich paarig angelegte Kleinhirnerne innerhalb des Marklagers dar. Beim Menschen größter und am lateralsten gelegener Kern ist der Nucleus dentatus, medial von ihm folgt der Nucleus emboliformis, dem sich der oft zweigeteilte Nucleus globosus (dann Nuclei globosi) anschließt, und schließlich liegt als ältester Kern der Nucleus fastigii in der Mitte des Marklagers des Wurmes.

1.3. Mikroskopische Anatomie des Kleinhirns

Im Kleinhirn sind mehr als die Hälfte aller Neurone des gesamten Gehirns lokalisiert (Trepel, 1999). Die meisten dieser Neurone befinden sich in der stark gefalteten und dadurch vergrößerten Rinde, die sich in drei Schichten unterteilen lässt, die Körnerschicht (Stratum granulosum), die Purkinje Zellschicht (Stratum purkinjense) und die Molekularschicht (Stratum moleculare). In allen Schichten findet sich Neuroglia unterschiedlichen Differenzierungsgrades.

Moosfasern enden an den in der Körnerschicht gelegenen Körnerzellen, deren Axone in die Molekularschicht projizieren und sich parallel zu den Kleinhirnwindungen als Parallelfasern verzweigen. Diese Parallelfasern enden an den in der Molekularschicht gelegenen und weit verzweigten Dendritenbäumen der Purkinje Zellen (PC) und Korbzellen. Kletterfasern verzweigen sich ebenfalls am Dendritenbaum einer PC. Die Korbzellen bilden mit ihren Fortsätzen sogenannte „Faserkörbe“ um die Perikaryen der PC. Die PC sind die einzigen Neurone, die aus dem cerebellären Cortex in die Kleinhirn- und vestibulären Kerne projizieren.

1.3.1. Die Körnerschicht

Die Körnerschicht (Stratum granulosum) ist die dem Mark angrenzende und zellreichste Schicht der Rinde. Sie besteht zum größten Teil aus Körnerzellen, doch auch Somata von Golgi-, Lugaro- und „Pale“-Zellen liegen in dieser Schicht.

Mit Ausnahme der Afferenzen der unteren Olive, die als Kletterfasern in der Molekularschicht an den PC-Dendriten enden, ziehen alle Afferenzen des Kleinhirns als Moosfasern zu den Körnerzellen. Die Parallelfasern der Körnerzellen sind die einzigen Interneurone des Kleinhirncortex, die exzitatorische Wirkung auf ihre Zielzellen ausüben. Sie setzen Glutamat als Transmittersubstanz frei (Crepel and Audinat, 1991). Das Verhältnis von Körner- zu Purkinje Zellen beträgt mehrere Hundert zu Eins (Smolyaninov, 1971).

Die Golgi-Zellen liegen innerhalb der Körnerschicht und vermitteln durch ihren Transmitter GABA inhibitorische Impulse auf eine große Population von Körnerzellen (Palay and Chan-Palay, 1974; Crepel and Audinat, 1991). In der oberen Hälfte der Körnerschicht befinden sich vorwiegend die sog. großen Golgi-Zellen. Die kleinen Golgi-Zellen liegen in der unteren Körnerschicht. Während die Dendritenbäume der großen Golgi-Zellen in gleicher Ausrichtung wie die PC-Dendriten bis zur Pia mater aufsteigen, sind die dendritischen Aufzweigungen der kleinen Golgi-Zellen zum großen Teil auf die Körnerschicht beschränkt. Die Dendritenbäume der großen und kleinen Golgi-Zellen, die sich in der Molekularschicht befinden, werden durch Parallelfasern der Körnerzellen innerviert.

Die in Nissl-Präparaten blass erscheinenden und daher als Pale-Zellen bezeichneten Zellen wurden von Altmann und Bayer (1977) erstmals beschrieben, allerdings blieb ungeklärt, ob es sich um Glia oder Neurone handelt. Pale-Zellen liegen in der Körnerschicht und treten vorwiegend in Regionen auf, die stark durch vestibuläre Afferenzen innerviert werden. Mugnaini et al. (1994) bezeichneten diese Zellen als „unipolar brush cells“, exzitatorische glutamaterge Interneurone der Körnerschicht, die sich mit Antikörpern gegen Calr markieren lassen (Anelli and Mugnaini, 2001; Diño et al., 2001).

Die Lugaro-Zellen liegen direkt unterhalb der PC-Schicht und besitzen einen fast ebenso großen Zellkörper wie PC (Lugaro, 1894). Ihre Dendriten gehen Kontakte mit Moosfaserrosetten, Golgi-Zellaxonen und Korbzellen ein (Palay and Chan-Palay, 1974). Aufgrund der zahlreichen Kontakte mit rekurrenten Kollateralen der PC und der starken

inhibitorischen Projektion in die Molekularschicht wird diesen Neuronen die Funktion eines „Feedback“ Interneurons zugeschrieben (Lainé and Axelrad, 1996).

1.3.2. Die Purkinje Zellschicht

Der Körnerschicht schließt sich die PC-Schicht an, die zwischen Körner- und Molekularschicht liegt. Sie besteht aus den großen PC, den größten Zellen des Kleinhirns.

Die PC verdankt ihren Namen dem Erstbeschreiber Jan Evangelista Purkinje (1837).

Die PC sind die einzigen efferenten Neurone der Kleinhirnrinde (Palay and Chan-Palay, 1974; Sotelo and Alvarado-Mallart, 1988, 1991). Alle intracorticalen Schleifen enden nach spätestens drei Synapsen auf einer PC. Die Morphologie dieser Zellen ist charakteristisch: Ihr großes Perikaryon entsendet ein langes Axon zu den Kleinhirn- und vestibulären Kernen. Apikal, zur Molekularschicht hin, erstreckt sich ein weit verzweigter Dendritenbaum, an dem sich bis zu 300 000 Synapsen je Zelle befinden. Die PC ist die zentrale Integrationseinheit der Kleinhirnrinde. Mit ihren inhibitorischen Efferenzen führt sie das Resultat der Verarbeitung tausender intracorticaler Verschaltungen, also ausschließlich in Form von hemmenden Impulsen, den Kleinhirn- und vestibulären Kernen zu (Ito and Yoshida, 1964, 1965; Ottersen and Storm-Mathisen, 1984; Gabbot et al., 1986).

Die inhibitorische Wirkung der PC auf ihre postsynaptischen Zielzellen wird durch den Transmitter GABA vermittelt (Ottersen and Storm-Mathisen, 1984; Seguela et al., 1984; Gabbot et al., 1986).

1.3.3. Die Molekularschicht

Die Dendritenbäume der PC bilden zusammen mit den Parallelfasern der Körnerzellen den größten Anteil an Strukturen in der äußersten, der Pia mater anliegenden Schicht der Rinde, der Molekularschicht (Stratum moleculare). Hier befinden sich auch die Somata und die markhaltigen Nervenfasern der Korb- und Sternzellen.

Die Korbzellen innervieren das initiale Axonsegment am Basalpol der Perikaryen der PC in Form eines dichten korbartigen Geflechts. Die Dendriten der Korbzellen stehen mit Parallelfasern und einigen Kletterfasern in Kontakt. Die Korbzellen inhibieren die PC durch GABA (Palay and Chan-Palay, 1974; Crepel and Audinat, 1991).

Die Sternzellen liegen in den äußeren 2/3 der Molekularschicht und bilden GABAerge Synapsen mit den PC (Scheibel and Scheibel, 1954; Vincent et al., 1992; Midtgaard, 1992; Andre et al., 1994).

1.3.4. Die Moosfaser

Das Kleinhirn empfängt Afferenzen aus extracerebellären Hirnarealen über drei verschiedene Faserarten, die Moosfasern, die Kletterfasern und die monoaminergen Afferenzen.

Die quantitativ dominierenden Afferenzen ziehen als Moosfasern in die Körnerschicht, wo sie in Form einer präsynaptischen Moosfaserrosette in Kontakt mit den Dendriten der Körnerzellen und den Somata der Golgi-Zellen treten (Palay and Chan-Palay, 1974).

Die exzitatorische Aktion der Moosfaser wird an den in der Körnerschicht gelegenen Glomeruli cerebellares der Körnerzelle durch den Transmitter Glutamat vermittelt (Garthwaite and Brodbelt, 1989; Makowiec et al., 1991). Die so erregten Körnerzellen verteilen mit ihren Parallelfasern diese Erregung auf ein großes Areal der Molekularschicht. Am Dendritenbaum jeder PC enden Zehntausende dieser Parallelfaserafferenzen. Die Summe dieser Erregungen und die gleichzeitige Hemmung durch die Korb- und Sternzellen, die ebenfalls durch Kollateralen der Parallelfasern erregt werden, sind für den Erregungszustand der PC verantwortlich.

1.3.5. Die Kletterfaser

Der Ursprung aller Kletterfasern liegt in der unteren Olive. Jede PC wird durch lediglich eine Kletterfaser innerviert (Palay and Chan-Palay, 1974; Ito, 1984), wobei jede Kletterfaser über Kollateralen durchschnittlich 10 bis 15 PC innerviert und aufgrund synchroner Erregung

mehrerer hundert Spines derselben PC eine massive exzitatorische Wirkung auf diese ausübt (Eccles et al., 1966; Ito 1984). Kletterfasern projizieren überwiegend über den Pedunculus cerebellaris inferior in die kontralaterale Kleinhirnhälfte (Gilman et al., 1981). Die topographisch organisierten Projektionen umfassen das gesamte Kleinhirn (Brodal, 1940, 1954).

Die Kletterfasern wirken über ihre Transmittersubstanzen Aspartat, Glutamat oder Aspartat-Glutamat exzitatorisch auf nachgeschaltete Neurone (Palay and Chan-Palay, 1974; Ito, 1984; Makowiec et al., 1991; Crepel and Audinat, 1991).

1.3.6. Die monoaminergen Afferenzen

Verglichen mit der Häufigkeit von Kletterfasern und Moosfasern spielen die monoaminergen Afferenzen quantitativ eine untergeordnete Rolle. Sie stellen die Projektionen aus Kernen der *Formatio reticularis* dar, und zwar aus den Raphé-Kernen mit Serotonin als Transmitter (Brodal et al., 1960) und aus dem *Locus coeruleus* mit Noradrenalin als Botensubstanz (Anden et al., 1967; Hökfelt and Fuxe, 1969). Deren Synapsen sind nicht wie Moos- und Kletterfasern unmittelbar in den Verschaltungsablauf integriert (Gilman et al., 1981; Ito, 1984). Der sympathische Einfluss ist diffus und die Rolle dieses Systems ist noch weitgehend unklar.

1.4. Funktionen des Kleinhirns

Das Kleinhirn erfüllt eine Vielzahl von Funktionen, die vor allem im Rahmen der Motorik wichtig sind. Dabei dient das Kleinhirn als wesentliches Zentrum bei der Steuerung, Feinabstimmung und Koordination von Stütz-, Ziel- und Blickmotorik. Die Stützmotorik wird dabei überwiegend im Vestibulo- und Spinocerebellum, die Zielmotorik vor allem im Pontocerebellum und die Blickmotorik im wesentlichen im Vestibulocerebellum gesteuert (Brodal, 1981). Neben motorischen kann das Kleinhirn aber auch vegetative Funktionen beeinflussen, was vermutlich durch die Projektion in die vegetativen Zentren der *Formatio*

reticularis und in den Hypothalamus zu erklären ist (Gilman et al., 1981; Ito, 1984; Voogd et al., 1985; Mehler and Rubertone, 1985). Daher sind bei Patienten mit Kleinhirnerkrankungen auch viszero-motorische Störungen beschrieben. Die Beeinflussung kognitiver Funktionen wird ebenfalls diskutiert (Keller et al., 1937; Ivry and Keele, 1989).

1.5. Vestibuläres System

Das vestibuläre System kann als Teil eines sehr komplexen, multisensorischen Bewegungssinnes aufgefasst werden. Es besteht anatomisch aus dem peripheren Gleichgewichtsorgan, dem vestibulären Anteil des VIII. Hirnnerven mit dem VG, den vestibulären Kernen im Hirnstamm, der thalamischen Verschaltung, den übergeordneten Arealen im cerebralen Cortex und den efferenten Anteilen des vestibulären Systems. Dieses System steuert eine Vielzahl motorischer Hirnstammreflexe, integriert im Zusammenspiel mit dem Kleinhirn die Halte- und Stützmotorik in Bewegungsabläufe und erzeugt bewusste Empfindungen über Beschleunigung, Bewegung und Gravitation (Mach, 1875; Henn, 1984, 1987).

Der sensorische Input des zentralen vestibulären Systems stammt nicht nur aus vestibulären, sondern auch aus visuellen und somatosensorischen/propriozeptiven Sinneskanälen.

1.5.1. Peripheres Gleichgewichtsorgan und periphere sensorische Afferenzen

Das Gleichgewichtsorgan ist ein Teil des Innenohres und besteht aus zwei morphologischen Untereinheiten, den beiden Macula- oder Statolithenorganen (Macula utriculi und Macula sacculi) und den drei Bogengangsorganen, die sich in den drei Bogengängen (horizontaler Bogengang, vertikaler vorderer und vertikaler hinterer Bogengang) befinden. Im Bereich der Maculae und in den Bogengängen im Bereich der Ampullen, in denen sich die Bogengangsorgane (Cristae ampullares) befinden, liegt das Sinnesepithel (Wersäll, 1956; Engström et al., 1962). Es existieren zwei Typen von Haarzellen, die sich morphologisch und

im Hinblick auf ihr Antwortverhalten gegenüber Beschleunigungsreizen unterscheiden: die Typ I- und die Typ II-Haarzellen. Im Bereich der Maculae ragen die Fortsätze der Haarzellen, die Stereozilien, in die Otolithenmembran, eine gallertartige Mukopolysaccharidschicht mit Kalzitkristallen, hinein. Im Gegensatz dazu ragen die Stereozilien im Bereich der Bogengangampullen in die Cupulae, die keine Otolithen enthalten. Den Reiz für die Erregung der Haarzellen bilden Verschiebungen der Gallerte mit konsekutiven Scherbewegungen der Haarzellfortsätze. Die Stereozilien einer Haarzelle sind unterschiedlich lang. Sie sind so angeordnet, dass an einem Pol der Haarzelle die kürzesten und am entgegengesetzten Pol die längsten Stereozilien inserieren.

Eine Scherung in Richtung des längsten Ziliums führt zum Einstrom von Kaliumionen und somit zur Depolarisation. Umgekehrt führt eine Auslenkung in Gegenrichtung zu einem verminderten Einstrom von Kaliumionen, was eine Hyperpolarisation zur Folge hat.

Innerhalb des auditorischen und vestibulären Systems nehmen die Haarzellen demnach die Funktion eines mechano-elektrischen Transducers ein, der die Bewegungen der umgebenden Medien in elektrische Signale umsetzt (Lim, 1986; Roberts et al., 1988; Pickles and Corey, 1992; Eatock et al., 1998). Jedes Stereozilium ist eine hochspezialisierte Projektion der apikalen Plasmamembran und enthält ein paralleles Bündel von Aktinfilamenten in seinem Kern (Tilney et al., 1992; Bartles, 2000). Die Stereozilien verjüngen sich zu ihrer Basis hin, so dass nur das zentrale Aktinfilament des Aktinbündels Fasern in das apikale Zytoplasma der Haarzelle ausstreckt, um das dichte Netzwerk von Aktinfilamenten des Plattensaums (Kutikularplatte) zu berühren. Das Aktinbündel im Kern stellt ein Stützgerüst dar, das dem Stereozilium eine Steifheit verleiht, die dazu führt, dass aus einer Krafteinwirkung von außen eine Drehung an der Basis resultiert (Tilney et al., 1992).

Die Maculaorgane werden aufgrund der unterschiedlichen Dichte von Endolymphe und Otolithenmembran durch Translationsbeschleunigungen, zu denen auch die Gravitation zählt, gereizt.

Für die Bogengangsorgane stellen Rotationsbeschleunigungen den natürlichen Reiz dar, da Endolymphe und Cupula die gleiche Dichte besitzen, so dass die Schwerkraft keine Scherung der Haarzellfortsätze bewirkt. Beim Drehen, Neigen und Nicken des Kopfes treten Drehbeschleunigungen auf, die die Sinneszellen der Cupulae reizen, da die Endolymphe

aufgrund ihrer Trägheit der Bewegung der Bogengangswände nicht sofort folgen kann, so dass es zu Abscherungen der Haarzellfortsätze kommt.

Die Haarzellen des Gleichgewichtsorgans sind sekundäre Sinneszellen ohne eigene Nervenfortsätze. Sie werden von afferenten Nervenfasern aus dem VG innerviert, die den Nervus vestibularis bilden. Daneben enden auch efferente Fasern an den Haarzellen, die möglicherweise die Empfindlichkeit der Sinneszellen modulieren.

Von den Bipolarneuronen des VG aus ziehen die PVA im VIII. Hirnnerven zu den vestibulären Kernen, der *Formatio reticularis* des Hirnstamms und zum Kleinhirn. Diese Terminationen wurden u.a. bei Ratten, Mäusen und Katzen untersucht (Ramón y Cajal, 1909; Dow, 1936; Mehler and Rubertone, 1985; Morris et al., 1988).

Die Neurektomie des zentralen Anteils des N. vestibulocochlearis und das Fehlen von BDNF (brain-derived neurotrophic factor) führen zu einem massiven Verlust von Bipolarneuronen im VG (Cass et al., 1989; Ernfors et al., 1994). Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Neurone des VG eine hohe Resistenz selbst gegenüber direkten Verletzungen des peripheren Axons des VIII. Hirnnerven und dem Verlust ihrer cerebellären Zielzellen aufweisen (Sirkin et al., 1984; Cass et al., 1989; Bährle and Guldin, 1998b).

1.5.2. Primäre vestibuläre Afferenzen (PVA)

Die PVA verbinden die peripheren vestibulären Sinneszellen mit dem ZNS. Ihre Zellkörper sind die bipolaren Neurone des VG.

Diese Bipolarzellen unterscheiden sich in Bezug auf Zellgröße, Faserdurchmesser, biochemisches Inventar, Morphologie der peripheren Synapsen und durch ihr physiologisches Antwortverhalten.

Die kleineren Bipolarzellen empfangen über die Bouton-Endigungen Erregungen von den Typ II-Haarzellen und besitzen dünne Fasern. Sie zeigen eine überwiegend regelmäßige Ruheaktivität und ein tonisches Entladungsmuster bei vestibulärer Stimulation (Goldberg and Fernández, 1971, 1977; Yagi et al., 1977; Baird et al., 1988).

Die großen Bipolarzellen innervieren mit dicken Fasern, vorwiegend über Calyx-Endigungen, Typ I-Haarzellen (Fernández et al., 1988, 1990, 1995; Goldberg et al., 1990; Brichta and

Peterson, 1994). Sie sind durch eine irreguläre Ruheaktivität und überwiegend phasische Entladungsmuster gekennzeichnet (Goldberg and Fernández, 1971, 1977; Yagi et al., 1977; Baird et al., 1988). Diese Unterschiede zeigen, dass sich innerhalb der PVA verschiedene Populationen differenzieren lassen (s. Abb. 1.1).

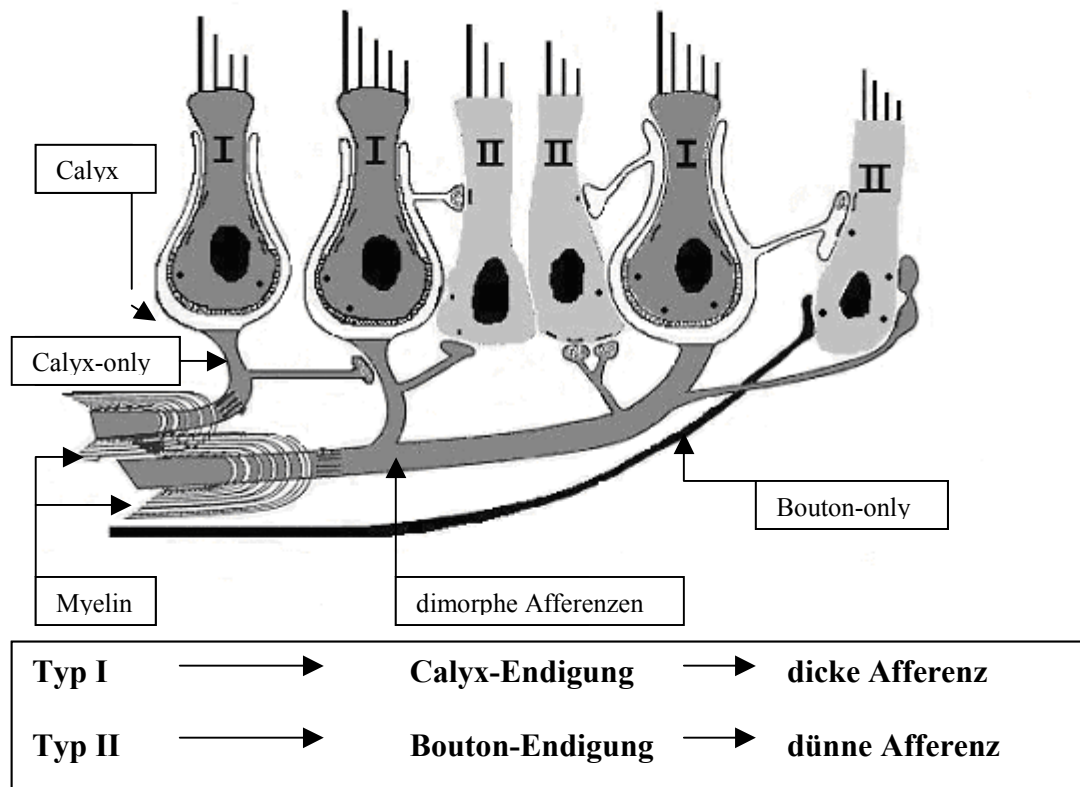
Die größte Population stellen sogenannte dimorphe Einheiten, eine Mischform dieser beiden Typen, mit einem Anteil von ca. 60% an der Gesamtpopulation, während die restlichen 40% der Neurone durch Calyx-only (ca. 20%, nachgewiesen durch Calbindin (Calb) und Calr) und Bouton-only Afferenzen (ca. 20%, nachgewiesen durch Peripherin) gebildet werden (Kevetter and Leonard, 2002).

Die Unterschiede im Antwortverhalten und Innervationsmuster korrelieren mit der Größe der Perikarya im VG (Fernández et al., 1988, 1990, 1995; Goldberg et al., 1990; Brichta and Peterson, 1994).

Große Neurone besitzen dicke, myelinisierte phasische Fasern mit Calyx-Endigungen, kleine Neurone dünne, nicht-myelinisierte tonische Fasern mit Bouton-Endigungen.

Dechesne et al. (1988) diskutieren anhand einer Gegenüberstellung der Anzahl Calb-positiver Neurone im VG, dass entwicklungsgeschichtlich möglicherweise nicht primär zwei Typen von Haarzellen entstanden sind, die in den Afferenzen unterschiedliche Antwortmuster hervorrufen, sondern gerade umgekehrt, dass sich ein Teil der Afferenzen auf schnelle Änderungen im Sensorpotential spezialisiert hat. Die morphologischen und biochemischen Veränderungen in Form von dicken Fasern, großen Zellkörpern, CaBP und Calyces sind damit als Folgen dieser Spezialisierungen zu interpretieren.

Die Perikarya der bipolaren Neurone bilden das VG, das sich nahe des Fundus des Meatus acusticus internus befindet. Die Fasern ziehen zum Kleinhirnbrückenwinkel und teilen sich im Verlauf in einen aufsteigenden Ast, der durch den Nucleus vestibularis lateralis zum Nucleus vestibularis medialis und zum Nucleus vestibularis superior zieht, und einen absteigenden Ast, der über den Nucleus vestibularis lateralis in den medialen und den inferioren Nucleus vestibularis projiziert (Kölliker, 1891; Bärle et al., 1998b).

Abbildung 1.1: Typ I und Typ II Haarzellen (adaptiert nach Chimento and Ross, 1996)

1.5.3. Zentrale vestibuläre Projektionsgebiete

Die vestibulären Kerne bilden neben Teilen der Formatio reticularis und dem Nucleus ruber eines der drei motorischen Zentren des Hirnstammes. Sie werden in die vier Hauptkerne Nucleus vestibularis superior (SVN, Bechterew), Nucleus vestibularis medialis (MVN, Schwalbe), Nucleus vestibularis lateralis (LVN, Deiters) und Nucleus vestibularis inferior (IVN, Roller) sowie einige kleinere akzessorische Zellgruppen (x, y, z, l, f, Sv, g, Nucleus interstitialis Cajal) unterteilt (Brodal and Pompeiano, 1957; Hauglie-Hanssen, 1968; Brodal, 1974). Die sekundären vestibulären Neurone der vestibulären Kerne weisen Verbindungen zum Kleinhirn, Thalamus und cerebralen Cortex, zu oculomotorischen Zentren der Formatio reticularis und zum Rückenmark auf (Kotchabhakdi and Walberg, 1978; Brodal, 1984; Mehler and Rubertone, 1985; Carpenter, 1988; Highstein and McCrea, 1988; Gerrits, 1990;

Büttner-Ennever, 1992; Guldin and Grüsser, 1998). Diese Verbindungen sind für den sicheren Stand und eine koordinierte Bewegung notwendig, da das zentrale vestibuläre System durch zusätzliche visuelle, somatosensorische und propriozeptive Zuflüsse nicht nur Informationen über die Lage des Kopfes im Raum, sondern auch über Kopf- und Körperbewegungen vermittelt, wodurch Korrekturbewegungen zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts und Maßnahmen zur Blickstabilisierung auch während einer Bewegung durchgeführt werden können. Die vestibulocerebellären Projektionen vermitteln dabei präzise Informationen während der Kopfbewegung in allen Ebenen (Schwarz and Schwarz, 1983; Voogd et al., 1996). Die direkten Projektionen der vestibulären Kerne zu den Augenmuskelnkernen und über die Tractus vestibulospinales in das Rückenmark gewährleisten die Funktion der vestibulookulären (Wilson et al., 1979; Cohen, 1981; Henn, 1982; Büttner-Ennever, 1992, 1999) bzw. vestibulospinalen Reflexe (Brodal and Pompeiano, 1957; Mannen, 1965; Hauglie-Hanssen, 1968; Peterson and Coulter, 1977; Akaike, 1983).

Die vestibulo-thalamo-corticalen Verbindungen vermitteln das Bewusstsein der Kopf- und Körperlage bzw. -bewegung (Büttner et al., 1977; Büttner and Büttner, 1978; Magnin and Putkonen, 1978; Guldin and Grüsser, 1998).

Eine wesentliche Aufgabe der vestibulären Kerne ist es demnach, die Informationen aus den sensorischen Einzelsystemen in ein gemeinsames Raum-Zeit-Referenzsystem umzuwandeln und eine kontextspezifische motorische Reaktion zu erzeugen.

1.6. Symptome cerebellärer Erkrankung

Als Oberbegriff für Störungen der Bewegungsausführung wird der Begriff Ataxie verwendet (Flourens, 1824). Dabei können Beginn und Ende, Geschwindigkeit, Position, Kraft, Zusammenspiel von Gelenken und Muskeln, Bewegungssequenzen und Muskeltonus beeinträchtigt sein (Holmes, 1939). Symptome dieser gestörten Koordination sind Dysmetrie, Dysdiadochokinese, Dysrhythmokinese und Verlangsamung der Reaktionszeit sowie Rumpf-, Stand- und Gangataxie (Flourens, 1824; Luciani, 1891; Babinski, 1902; Holmes, 1939; Dow and Moruzzi, 1958), zudem können Aktionstremor, Nystagmus und Dysarthrie auftreten (Holmes, 1917, 1922a, b, c, d, 1939; Dow and Moruzzi, 1958; Gilman et al., 1981; Stein et

al., 1981; Brooks and Thach, 1981; Harding, 1981). Die Gangstörung ist unabhängig von der Spezies oder der Lokalisation der Schädigung als allgemeines Symptom cerebellärer Schädigung fast immer vorhanden (Thach, 1987).

1.7. Symptome vestibulärer Erkrankung

Die Ähnlichkeit cerebellärer und sensorischer, v.a. vestibulärer Ataxien, ist sehr groß, und selbst für den erfahrenen Neurologen ist allein anhand des klinischen Bildes schwer zwischen cerebellärer, somatosensorischer und vestibulärer Ataxie zu differenzieren (Thach, 1987).

Heftiger Drehschwindel, Fallneigung und Übelkeit, oft mit einseitiger kalorischer Labyrinthuntererregbarkeit, sind häufig auf eine peripher-vestibuläre Funktionsstörung (z.B. Neuronitis vestibularis) zurückzuführen. Die Symptomatik peripherer Funktionsstörungen ist durch einen kopflageabhängigen Dreh- und Schwankschwindel mit (Spontan-) Nystagmus und Übelkeit, wie sie auch beim benignen paroxysmalen Lagerungsschwindel vorkommt, gekennzeichnet. Bei zentraler Affektion zeigt sich ebenfalls eine Abhängigkeit von der Kopflage; Nystagmus und Schwindel treten aber eher selten auf, wie z.B. bei akuter Läsion vestibulariskernnaher periventrikulärer (IV. Ventrikel) Strukturen und bei Beteiligung mittelliniennaher vestibulo-cerebellärer Verbindungen. Gerichtete Fallneigung besteht auch beim Wallenberg-Syndrom mit Hirnstammaffektion und bei akuter Thalamusschädigung (thalamische Astasie), allerdings meist ohne begleitenden Schwindel und Nystagmus.

Beim Vorliegen eines Upbeat- und Downbeat-Nystagmus mit den typischen oculomotorischen Befunden lassen sich als Ursache häufig zentrale Hirnstammläsionen und cerebelläre Funktionsstörungen ausmachen (Hopf et al., 1999).

Schädigungen des N. vestibulocochlearis können eine Symptomatik, die mehr auf eine peripher-vestibuläre Ursache des Schwindels hinweist, aber auch Symptome wie bei zentralem Schwindel, z.B. bei Raumforderungen im Kleinhirnbrückenwinkel, hervorrufen. Besteht Schwindel mehr als drei Wochen (Dauerschwindel), und tritt er ohne begleitenden Nystagmus oder gar in Verbindung mit Bewusstlosigkeit in der Anamnese auf, so sind häufig zentrale Ursachen für die Beschwerden verantwortlich (Berghaus et al., 1996).

Bei einseitigen Labyrinthkrankungen besteht eine Richtungstendenz des Schwindels und des Nystagmus, und typisch ist ein horizontaler richtungsbestimmender, auch mit geschlossenen Augen bestehender Drehschwindel. Besonders bei akutem Geschehen ist diese Symptomatik von einem deutlichen richtungsbestimmten Nystagmus und richtungskonstanten Abweichreaktionen gekennzeichnet. Häufige, aber nicht obligate Begleitsymptome sind Erbrechen, Übelkeit und Schweissausbrüche sowie Tinnitus und Hörstörungen als Ausdruck der Beteiligung des vegetativen Nervensystems bzw. des benachbarten Hörorgans.

Bei Störungen des Otolithenapparats oder des posterioren vertikalen Bogengangs treten die selteneren vertikal gerichteten Schwindelempfindungen auf, wie z.B. Liftgefühl, Gefühl des Sturzes in die Tiefe oder Auf- und Absteigen des Bodens.

Bei beidseitigen Labyrinthbeschädigungen lassen sich die o.g., für vestibuläre Schädigungen typischen Symptome meist nicht eindeutig beobachten. Das Beschwerdebild ähnelt dann eher zentral-vestibulären Symptomen: Weil der vestibulo-okuläre Reflex, der den Fixationspunkt stabilisiert, beidseits entfällt, kommt es zu einem auf- und abschwankenden, sich hebenden und senkenden Gesichtsfeld beim Gehen (Berghaus et al., 1996).

Bei der Differentialdiagnose des akuten Drehschwindels sollten Begleitsymptome sorgfältig beachtet werden, um das Krankheitsbild topisch zuordnen zu können. Ist der akute Drehschwindel einziges Phänomen, so ist primär an eine Läsion des peripheren Vestibularapparats (z.B. Neuronitis vestibularis, benigner paroxysmaler Lagerungsschwindel, infektiöse und toxische Schädigungen des Mittel- und Innenohrs) zu denken. Wird der Drehschwindel von anderen Symptomen begleitet, so ist bei Gehörstörungen an den M. Menière, aber auch an eine hirnstammahe Kompression des N. vestibulocochlearis, bei anderen neurologischen Ausfällen auch an Hirnstammsyndrome wie das Wallenberg-Syndrom zu denken. Anfallsartiger Schwindel tritt auch bei Störungen des kardiovaskulären Systems (Orthostase, Herzrhythmusstörungen) auf und kann durch Abhängigkeit der Kopflage wie bei der transienten Kompression der A. vertebralis neurologische Krankheitsbilder vortäuschen. Beobachtet man Drehschwindel in Verbindung mit Störungen der visuellen Kontrolle, so kann auch eine Migraine ophtalmique Ursache der Beschwerden sein. Im Halbdunkeln und bei Unebenheiten des Bodens kann der Drehschwindel durch Ausfall beider Vestibularapparate oder bei Hinterstrangläsionen hervorgerufen werden (Mumenthaler, 1997). Im Zusammenhang mit persistierenden Schwindelsensationen sollte

man bei bewegungsabhängigen Krankheitsbildern an Hypokinesen (z.B. M. Parkinson), motorische Paresen (z.B. Paraspastik) und Koordinationsstörungen (z.B. Kleinhirntaxie, Hinterstrangläsion, Polyneuropathie), bei in Ruhe auftretenden Symptomen aber auch an Intoxikationen und psychogene Ursachen denken (Mumenthaler, 1997).

Visuelle, vestibuläre und somatosensorische/propriozeptive Afferenzen bilden die drei Säulen des Lage-, Bewegungs- und Gleichgewichtssinns. Eine Instabilität jeder einzelnen Säule, aber auch eine Störung eines integrativen Zentrums, z.B. des Kleinhirns oder höhergelegener Strukturen, kann die o.g. Symptome hervorrufen, so dass eine Vielzahl von Möglichkeiten das Beschwerdebild verursachen können, und eine differentialdiagnostische Abgrenzung oft schwer fällt.

Durch die Redundanz im vestibulären System besteht die Möglichkeit, Ausfälle und Dysfunktionen einer dieser drei Säulen durch die stärkere Aktivierung und Nutzung der anderen Säulen sowie durch Ausbildung alternativer Pathways zu kompensieren (Bäurle, 2001).

1.8. Calretinin im Ganglion vestibulare

Calr ist ein 29 kD Neuroprotein und gehört zur Calmodulin Superfamilie (Rogers, 1987). Calr wurde von Rogers (1987) in der Retina des Huhns als ein cDNA Klon isoliert. Es wird in der Retina und vielen Hirnregionen exprimiert, findet sich aber im Gegensatz zum Calb nicht im Darm oder in anderen nicht-neuralen Geweben (Rogers, 1987, 1989).

CaBP wie Calr, Calb und Parvalbumin (PV) werden in verschiedenen Bereichen des Nervensystems exprimiert, u.a. auch in den Neuronen des VG (Celio, 1990; Dechesne et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die beiden CaBP Calb und Calr innerhalb des VG nicht in allen, sondern nur in den großen Bipolarneuronen vorhanden sind (Desmadryl and Dechesne, 1992; Dememes et al., 1992; Kvetter and Leonard, 1996, 2002). Mit Hilfe dieser Marker ist es daher möglich, selektiv die Gruppe der großen Bipolarneurone und ihrer Projektionen darzustellen (Kvetter and Leonard, 1996; Bäurle and Guldin, 1998b).

Die Population Calr- und Calb-positiver Neurone des VG innerviert Typ I-Haarzellen an der Spitze der Cristae und an den Striolae der Maculae ausschließlich über Calyx-Endigungen

(Desmadryl and Dechesne, 1992; Kvetter and Leonard, 1996). Wie in 1.5.2 erwähnt, ist ein spontan unregelmäßiges und vorwiegend phasisches Entladungsmuster als Reaktion auf natürliche vestibuläre Stimulation für diese Afferenzen charakteristisch (Baird et al., 1988). Der Anteil Calb-positiver Neurone im VG beträgt etwa 15 - 16% (Demêmes et al., 1992; Desmadryl and Dechesne, 1992; Raymond et al., 1993; Bäurle et al., 1997). Nahezu alle Calb-positiven Neurone sind auch für Calr positiv (Demêmes et al., 1992; Kvetter and Leonard, 1996). Demêmes et al. (1992) identifizierten drei Subpopulationen im VG der Ratte: 1) Calb- und Calr-positive Neurone, die 15,4% der Gesamtpopulation ausmachen und durch die größten Zelldurchmesser gekennzeichnet sind und außerdem eine hohe Immunreaktivität für neurofilamentäre Proteine (NF) aufweisen, 2) Neurone, die ausschließlich NF-positiv sind, mit einem Anteil von 32% und 3) Neurone, die keine dieser drei Proteine enthalten und 52,6% der Gesamtneuronenpopulation darstellen. Kvetter et al. (1998) beschreiben im VG der Wüstenspringmaus (*Iaculus orientalis*) einen Anteil von 19,5% Calr-positiver und 28% Calb-positiver Zellen. Da man im Gegensatz zu Calb Calr nur in Afferenzen mit Calyx-Endigungen findet, wird angenommen, dass Calb auch andere vestibuläre Afferenzen markiert. Die Inkongruenz von 4,1% Calr-positiver Zellen bei Ratten und Wüstenspringmäusen wird auf Speziesdifferenzen zurückgeführt.

Beim Vergleich von Vertebraten (Säuger, Vögel, Amphibien, Fische) wurde festgestellt, dass die Calb-Expression im VG, die eng mit der Calr-Expression korreliert, mit der Entwicklungsstufe der Vertebraten-Klasse zunimmt (Dechesne et al., 1988).

Die genaue Funktion von Calr und Calb ist noch nicht sicher geklärt, sie scheinen jedoch eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+} -Pufferung, beim Ca^{2+} -Transport und bei der Modulation der Aktivität Ca^{2+} -abhängiger Proteine zu spielen. CaBP sind in der Lage, erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen effektiv zu senken und dadurch einen exzitatorischen Ca^{2+} -Overload zu verhindern. Darüber hinaus schreibt man den CaBP eine Funktion bei der embryonalen Entwicklungssteuerung und Ausdifferenzierung der Nervenbahnen zu. So soll PV eine Differenzierung embryonaler Stammzellen in Richtung bipolarer, Calr und Calb eher in Richtung multipolarer Neurone induzieren (Arnhold et al., 2000).

Es gibt Hinweise dafür, dass die Neurone, die CaBP enthalten, eine geringere Vulnerabilität gegenüber degenerativen Veränderungen, wie sie z.B. beim Morbus Parkinson auftreten, zeigen und damit einen gewissen neuroprotektiven Effekt ausüben (German et al., 1992;

Tsuboi et al., 2000). So sind Neurone, die Ca^{2+} -Spikes generieren, wie z.B. cerebelläre PC, gegenüber unkontrollierten Exzitationen, wie sie bei der Epilepsie auftreten, weniger anfällig (Celio, 1990; Sloviter et al., 1991). Klinisch wird die Erkenntnis, dass Ca^{2+} -Pufferung protektiv auf Zellen wirken kann, durch die Anwendung von Ca^{2+} -Kanalblockern wie Nimodipin in der Alzheimer-Therapie umgesetzt (Kanowski et al., 1988), der Nutzen dieser Therapie wird aber gegenwärtig noch untersucht (Qizilbash et al., 1999). Calr scheint ein wesentliches Element des cerebellären Stoffwechsels darzustellen und an der Regulation der synaptischen Aktivität beteiligt zu sein. Abwesenheit von Calr kann zu gestörter motorischer Koordination und veränderter Entladungsrate der PC im Kleinhirn und Interneurone im Gyrus dentatus des Hippocampus führen (Schurmans et al., 1997; Schiffmann et al., 1999). Calr und Calb könnten durch Konformationsänderungen als intrazelluläre Signalproteine auch an biochemischen Prozessen der Zelle beteiligt sein (Hubbard and McHugh, 1995; Kuźnicki et al., 1995a, b). Calr kann u.a. Ca^{2+} -Signaleigenschaften in sacculären Haarzellen beim Frosch regulieren und ist an zahlreichen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Bewegungen beteiligt (Desmadryl et al., 1997; Edmonds et al., 2000).

Die neuroprotektive Rolle des Calr wird dennoch kontrovers diskutiert. Auch wenn seine Aktivität eng mit dem Ca^{2+} -Spiegel verbunden ist (Kuźnicki et al., 1995a, b), bietet Calr keinen sicheren Schutz gegenüber Ca^{2+} -Overloads und neurodegenerativen Veränderungen (Kuźnicki et al., 1996; Bouillere et al., 2000). Ob Calr ein Ca^{2+} -Puffer oder ein Ca^{2+} -Sensor ist, der bisher unbekannte intrazelluläre Mechanismen der Ca^{2+} -Pufferung moduliert, ist weiterhin Gegenstand zahlreicher Studien (Hubbard and McHugh, 1995; Billing-Marczak and Kuźnicki, 1999).

1.9. Cerebelläre Mutationen

Von den über 2200 bekannten spontan aufgetretenen Mutationen der Maus betreffen mehr als 140 das zentrale Nervensystem (Sidman et al., 1965; Green, 1981; Peters, 1990). Etwa ein Zehntel der neurologisch betroffenen Mutanten weisen Defekte innerhalb des Kleinhirns auf. Im Folgenden werden die Mutanten *weaver*, *purkinje cell degeneration* und *Lurcher* genauer vorgestellt, die in der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind. Diese Mutanten wurden

aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte und Zelltypen der cerebellären Degeneration ausgewählt. Außerdem konnten frühere Arbeiten zeigen, dass die vestibulären Ganglienzellen dieser Mutanten den Verlust ihrer cerebellären Zielzellen überleben (Bäurle and Guldin, 1998b).

1.9.1. Die *weaver* Mutante

Die *weaver* Mutante (*wv/wv*) wurde erstmals 1965 von Lane beschrieben. Sie ist durch einen autosomal rezessiven Erbgang gekennzeichnet (Sidman et al., 1965). Untersuchungen, vor allem an interspezifischen Chimären, wiesen einen direkten Angriffspunkt des mutierten Gens auf die Körnerzellen nach (Goldowitz and Mullen, 1982; Goldowitz, 1986; Hatten et al., 1986). Die Körnerzelldegeneration setzt bereits am Tag der Geburt ein (Smeyne and Goldowitz, 1989, 1990). Der fortschreitende Zelltod erstreckt sich über die ersten zwei postnatalen Wochen und umfasst nahezu die gesamte Population der Körnerzellen (Rakic and Sidman, 1973a). Lediglich in den lateralen Hemisphären überleben einige wenige Zellen, während vermale und paramediane Areale des Kleinhirns völlig agranulär zurückbleiben (Rakic and Sidman, 1973b; Sotelo and Changeaux, 1974). Die ebenfalls vorliegenden Defekte der Bergmann Glia werden als Folge gestörter trophischer Interaktion mit den Körnerzellen interpretiert (Smeyne and Goldowitz, 1989). Neben dem Körnerzellverlust und der Veränderung der Bergmann Glia existiert in dieser Mutante auch eine ausgeprägte Reduktion der PC. Diese Reduktion ist im Vermis besonders stark ausgeprägt, wo ein Verlust von 50% aller PC feststellbar ist. In den lateralen Rindenabschnitten degenerieren weniger PC, so dass der durchschnittliche Verlust an PC der gesamten Rinde bei 28% liegt (Rezai and Yoon, 1972; Blatt and Eisenmann, 1985; Herrup and Trenkner, 1987). Die Degeneration der PC erfolgt vor der Körnerzelldegeneration, so dass hier ebenfalls eine direkte Aktion des defekten Gens angenommen werden kann. Da vermale PC im Vergleich zu paramedianen und lateralen PC etwas früher entstehen, könnte dies der Grund für die unterschiedliche Ausprägung der PC-Degeneration im Kleinhirncortex sein (Blatt and Eisenmann, 1985).

Da aufgrund des Mangels an Körnerzellen die Bildung von Parallelfasern weitgehend unterbleibt (Rakic and Sidman, 1973a, b; Sotelo, 1980, 1982), und damit 95% des

synaptischen PC-Inputs des normalen Kleinhirns fehlt (Sotelo, 1982), finden das dendritische Wachstum und die intracorticale Positionierung der PC in einem abnormalen Milieu statt.

Dies führt zu einer Dislokation der PC über den gesamten Cortex und damit zu einer anormalen Cytoarchitektonik des Kleinhirns (Llinás et al., 1973; Caviness and Rakic, 1978; Sotelo, 1982). Makroskopisch lässt sich eine Atrophie des Kleinhirns um nahezu 75% erkennen (Sidman et al., 1965).

Patil et al. (1995) konnten das mutierte Gen identifizieren, dessen Produkt, ein verändertes G-Protein-abhängiges Kaliumkanalprotein (GIRK2), zu einem weitgehenden Verlust cerebellärer Körnerzellen führt. Außer im Cerebellum finden sich auch im Hippocampus (Sekiguchi et al., 1995; Liao et al., 1996; Lüscher et al., 1997; Jarolimek et al., 1998) und in der Substantia nigra pars compacta (Schmidt et al., 1982; Roffler-Tarlov und Graybiel, 1986; Triarhou and Ghetti, 1989) funktionelle und morphologische Defekte, die in Regionen mit Expression von ω GIRK2 auftreten (Kobayashi et al., 1995; Karschin et al., 1996; Liao et al., 1996; Murer et al., 1997; Wei et al., 1997; Inanobe et al., 1999). Die Mutation führt nicht zu einem Funktionsverlust des ω GIRK2-Kanals, sondern zu veränderten Kanaleigenschaften mit abweichender Durchlässigkeit von Kationen (Liss et al., 1999). Da alle ω GIRK2-exprimierenden Neurone im Hippocampus, einige dopaminerge Neurone der Substantia nigra pars compacta sowie Körnerzellen in der lateralen Kleinhirnrinde überleben, müssen zusätzliche Faktoren einen Einfluss auf die Induktion des Zelltods in den *weaver* Mutanten besitzen (Jensen et al., 1999). So ist die Unterdrückung hippocampaler epileptiformer Aktivität durch den GABA-Agonisten Baclofen im Vergleich zur Wirkung bei Wildtypen durch die Mutation der K^+ -Kanal Untereinheit (Kir3.2) bei *weaver* vermindert, darüber hinaus scheinen auch die GABA-B-Rezeptoren bei *weaver* Mutanten verändert zu sein, so dass die Wirkung von Baclofen reduziert ist (Jarolimek et al., 1998, 2000).

Klinisch ist die *weaver* Mutante durch eine Instabilität der Haltung und des Ganges gekennzeichnet, die auf eine gestörte Koordination von Halte-, Stütz- und Zielmotorik hinweisen. Die Symptome äußern sich in Form von Schwanken und häufigem zur Seite fallen der Tiere sowie seitlicher Verlagerung des Körperschwerpunkts in Ruhe und bei Fortbewegung, die von ständigen Korrekturbewegungen begleitet wird (Sidman et al., 1965).

1.9.2. Die *purkinje cell degeneration* Mutante

Mullen et al. (1976) beschrieben erstmals eine Mutation im C57BR/cdJ-Stamm, bei der es im autosomal rezessiven Erbgang zwischen P15 und P45 (P = postnataler Tag) zur nahezu vollständigen Degeneration (> 99%) von PC kommt (Mullen et al., 1976; Landis and Mullen, 1978). Die wenigen überlebenden PC befinden sich nahezu ausnahmslos im Nodus (Mullen et al., 1976; Landis and Mullen, 1978; Wassef et al., 1986). Auch in anderen Arealen des ZNS, wie im Thalamus und Bulbus olfactorius sowie in der Retina (Mullen et al., 1976; LaVail et al., 1982; O’Gorman and Sidman, 1985), sind degenerative Veränderungen zu beobachten, doch scheint die PC das primäre Ziel des mutierten Gens zu sein (Mullen, 1977; Landis and Mullen, 1978). Zum Zeitpunkt der Degeneration der PC ist die Synaptogenese weitgehend abgeschlossen, so dass ausschließlich ausgereifte Neurone betroffen sind, die ihre endgültige Position erreicht haben (Landis and Mullen, 1978). Da sämtliche Efferenzen der Kleinhirnrinde von diesen Zellen gebildet werden, bleibt ihr massiver Verlust nicht ohne Folgen für anterograd und retrograd verknüpfte Zellen im Cortex und in den Kleinhirnkernen (Palay and Chan-Palay; 1974; Chan-Palay, 1977; Ito, 1984; Mehler and Rubertone, 1985). Es kommt zu einem sekundären Zelluntergang einer großen Zahl von Körnerzellen (Ghetti et al., 1977, 1978, 1981, 1987; Triarhou et al., 1985). Von dieser Degeneration sind 30% bis 50% der Neurone der unteren Olive (Ghetti et al., 1987; Shojaeian et al., 1988; Triarhou and Ghetti, 1991) und 21% der Neurone der Kleinhirnkern betroffen, deren Volumen um nahezu 50% abnimmt (Wassef et al., 1986; Ghetti et al., 1987; Triarhou et al., 1987; Bäurle and Grüsser-Cornehls, 1997; Bäurle et al., 1998a). Die primären und sekundären degenerativen Veränderungen im cerebellären Cortex und den Kleinhirnkernen verringern das Gesamtvolumen und das Gewicht des Kleinhirns der *pcd* Mutante um die Hälfte (Triarhou et al., 1987; Bäurle and Grüsser-Cornehls, 1997).

Der massiven Degeneration liegt ein Defekt des *Nna1*-Gens zugrunde, das ein nukleäres Protein mit einer Zink-Carboxypeptidase-Domäne codiert, welches bei axonaler Regeneration spinaler Motoneurone verstärkt exprimiert wird (Fernandez-Gonzalez et al., 2002).

Diese massiven makro- und mikroskopischen Befunde im Kleinhirn korrelieren aber erstaunlicherweise nicht mit der vergleichsweise milden cerebellären Symptomatik dieser Mutante (Mullen et al., 1976), so dass angenommen wird, dass hier Mechanismen wie das

„Sprouting“ oder Nutzung alternativer „Pathways“ greifen (Roffler-Tarlov et al., 1979; Grüsser-Cornehls, 1988), die den PC-Verlust kompensieren (Mullen et al., 1976; Grüsser-Cornehls, 1988; Bäurle et al. 1997; Bäurle and Grüsser-Cornehls, 1997; Grüsser-Cornehls and Bäurle, 2001).

1.9.3. Die *Lurcher* Mutante

Die *Lurcher* Mutante (*Lc/+*) wurde erstmals von Phillips (1960) beschrieben. Dieser Mutation liegt ein semi-dominanter Defekt zugrunde. Nur heterozygote Tiere (*Lc/+*) sind lebensfähig und zeigen cerebelläre Veränderungen mit Symptomen der Ataxie, schwankenden Hinterbeinen und ruckartigen Auf- und Abbewegungen ab P12 (Phillips; 1960; Caddy and Biscoe, 1975; Swisher and Wilson, 1977; Green, 1981). Untersuchungen von Wetts und Herrup (1982) an Chimären aus Wildtypen und heterozygoten Mutantenembryos zeigten, dass die Mutation in den PC zellautonom stattfindet. Die PC-Degeneration beginnt postnatal zwischen P4 und P8, schreitet kontinuierlich fort und mündet etwa im 4. Lebensmonat in den kompletten Verlust der PC-Population (Swisher and Wilson, 1977; Caddy and Biscoe, 1979; Bäurle and Guldin, 1998a). Der völlige Verlust der PC hat eine sekundäre retrograde Degeneration von Körnerzellen zur Folge, der gegenüber der *pcd* Mutante ausgeprägter ist; auch in der unteren Olive kommt es zum Neuronenverlust (Caddy and Biscoe, 1975; De Jager and Heintz, 1998). Die Volumenreduktion des Kleinhirns durch Atrophie beträgt etwa 50% (Green, 1981). Das mutierte Gen codiert für den ionotropen Glutamatrezeptor δ -2 (Grid2). Der *Lc/+*-Phänotyp entwickelt sich als Folge dieser Missense-Mutation (Zuo et al., 1997). Die Schwere der Symptome kann, vergleichbar mit den Störungen bei *pcd* Mutanten, als relativ mild eingestuft werden (Bäurle and Guldin, 1998a).

1.9.4. Tabellarische Zusammenfassung der cerebellären Mutanten

Name, Gensymbol	Phänotyp, Gendefekt
<i>weaver (wv/wv)</i>	Tremor, Gliedmaßeninkoordination, instabile Haltung, schwankender Gang mit rhythmisch alternierenden Seitwärtsbewegungen des Oberkörpers auch in Ruhe, unbeholfene Korrekturbewegungen, bei starker Agitation „in die Höhe springen“; progressiver Zelltod nahezu der gesamten Körnerzellpopulation, primäre Reduktion der PC auf 28%; Mutation der K ⁺ -Kanal Untereinheit (Kir3.2 oder GIRK2), Störungen in der Durchlässigkeit von Kationen im GIRK2-Kanal.
<i>Purkinje cell degeneration (pcd/pcd)</i>	Angesichts der „genetischen Cerebellectomie“ bei Verlust nahezu aller PC vergleichsweise moderate Ataxie; Volumenreduktion des Cerebellums auf etwa 50%, sekundäre unvollständige Degeneration von Körnerzellen, Neuronen der unteren Olive und Neuronen der Kleinhirnerne; Defekt des Nna1-Gens.
<i>Lurcher (Lc/+)</i>	Homozygote sterben perinatal, heterozygote sind ataktisch mit taumelndem Gang, laufen zeitweilig rückwärts; Krämpfe bei Erschrecken; Cerebellum halb so groß wie normal; PC völlig abwesend; starke Degeneration von Zellen der unteren Olive; sekundär reduzierte Körnerzellzahl; Angriffspunkt des mutierten Gens ist der ionotrope Glutamatrezeptor δ -2 (Grid2).

1.10. Vestibuläre Mutationen

Von den ca. 140 Mäusen mit neurologisch wirksamen Mutationen sind rund 40 Mäuse von genetischen Defekten innerhalb des vestibulären Systems betroffen (Green, 1981). Das jeweils affizierte Gen beeinflusst je nach Mutante häufig sowohl den auditorischen als auch den vestibulären Anteil des Innenohrs. Im Folgenden werden die *jerker*, *shaker-1* und *Varitint-waddler* Mutanten genauer dargestellt, da diese Mäuse in der vorliegenden Arbeit aufgrund histomorphologisch gesicherter Affektion der peripheren vestibulären Organe und des VG untersucht worden sind. Bei keiner dieser drei Mutanten wurde bisher eine Quantifizierung der Neurone des VG und der Calr-positiven Population großer Bipolarzellen durchgeführt.

1.10.1. Die *jerker* Mutante

Die *jerker* Mutante (*je/je*) wurde von einem „Tierliebhaber“ als „tanzende Maus“ entdeckt und von Grüneberg et al. (1941) mit Symptomen, ähnlich denen der *shaker-waltzer mouse*, wie Hyperaktivität, Drehbewegungen und Hin- und Herschleudern des Kopfes wissenschaftlich beschrieben. Die Symptomatik weist auf Defekte im vestibulären System hin (Anniko et al., 1989; Sjöström and Anniko, 1990a, b). Die Entwicklung der Cochlea erscheint bis zur frühen Postnatalperiode normal, doch bald danach tritt eine progressive Degeneration der Haarzellen auf, während das VG von diesen Veränderungen unberührt bleibt (Deol, 1954; Steel and Bock, 1983; Sjöström and Anniko, 1990a, b, 1992a, b). Nach etwa 3 Monaten bleibt nur noch eine dünne Lage undifferenzierter Zellen, die zwischen kollabierten Haarzellen liegen, vom Corti-Organ übrig. Messungen auditorischer Hirnstammpotentiale weisen auf eine völlige Taubheit von *jerker* Mäusen ab P12 hin (Steel and Bock, 1983; Sjöström and Anniko, 1990b). Im vestibulären Labyrinth zeigen die Typ I-Haarzellen eine Unordnung der Stereozilien und eine Verschmelzung von Haarzellen bei normalem Zytoskelett. Die degenerativen Veränderungen erfolgen bis zum 3. postnatalen Monat und zeigen in Macula utriculi und Macula sacculi ähnliche, wenn auch langsamer voranschreitende Degenerationen und Zellverluste wie im cochleären Teil der Mutante. Die Haarzellen der drei Cristae

ampullares sind davon aber morphologisch weniger betroffen (Sjöström and Anniko, 1990a). Auf dem Chromosom 4 wurde bei der *jerker* Mutante eine Mutation des Gens entdeckt, das für Proteine aus der Gruppe der Espine kodiert (Zheng et al., 2000), die für die Aktinbündelung in vitro notwendig sind. Die Mutation betrifft das C-terminale Aktinbündelnde Modul der Espine. Espine werden im Gegensatz zu den Fimbrinen, einer weiteren Art von Aktin-bündelnden Proteinen, in ihrer Aktivität nicht durch Ca^{2+} inhibiert (Bartles et al., 1996, 1998; Chen et al., 1999; Bartles, 2000). Es wird angenommen, dass cross-links der Espine die Aktinbündel gegenüber lokalen Ca^{2+} -Erhöhungen stabilisieren, die mit elektromechanischen Signaltransduktionen in Stereozilien der Haarzellen einhergehen (Zheng et al., 2000; Sekerková et al., 2003). Bei der *jerker* Mutante finden sich geringe bis keine Spuren von Espinen in Hoden, Nieren und den Organen des Innenohrs. Ab P15 oder P16 können *jerker* Mutanten durch die typischen Drehbewegungen identifiziert werden. Zu diesem Zeitpunkt sind aber morphologisch noch keine Haarzellverluste zu sehen. In den vestibulären Haarzellen ist die Konzentration von Espinen aber schon ab P15 reduziert, also ab einem Zeitpunkt, an dem *jerker* Mutanten bisher nur klinisch durch ihre Drehbewegungen nicht aber morphologisch identifiziert werden können. Es wird angenommen, dass die Espine die bisher unidentifizierten Aktin-bündelnden Proteine sind, die zusammen mit den Fimbrinen für die Quervernetzung von Aktinfilamenten im Kern der Stereozilien verantwortlich sind (Tilney et al., 1989; Zheng et al., 2000). Aufgrund des geringen Nachweises von Espinen in den Stereozilien der Haarzellen wird die Symptomatik des *jerker* Phänotyps diesem Defekt zugeschrieben. Dabei scheint die Abwesenheit der Espine mehr die Stabilität als den Zusammenhalt der Stereozilien zu beeinflussen (Zheng et al., 2000).

1.10.2. Die *shaker-1* Mutante

Die *shaker-1* Mutante (*sh/sh*) wurde von Lord und Gates (1929) entdeckt und erstmals beschrieben. Sie hat eine normale Lebenserwartung und eine für sog. „circling“ Mutanten recht hohe Fertilität. Homozygote Mäuse zeigen die Symptome von Drehbewegungen („circling“), Hin- und Herschleudern des Kopfes, Taubheit und Hyperaktivität. Bis zur vierten Lebenswoche können Fähigkeiten wie Hören und Schwimmen noch erhalten sein, verlieren

sich dann aber. Die degenerativen Veränderungen betreffen das Corti-Organ, das Ganglion spirale, die Stria vascularis der Cochlea, die Macula sacculi und das VG sowie die Stereozilien der Haarzellen (Deol, 1956; Mikaelian et al., 1965; Kikuchi and Hilding, 1965; Shneron et al., 1983; Self et al., 1998).

Die Potentiale des N. vestibulocochlearis und der Cochlea sind zu Beginn noch nachweisbar und entwickeln sich, allerdings erreichen sie nie ein normales Niveau und verschwinden bis P22 (Mikaelian and Ruben, 1964). Die Mutation, welche für die Symptomatik der *shaker-1* Mutante verantwortlich gemacht wird, befindet sich auf dem Chromosom 7 und betrifft das Gen, das für das Aktin-bündelnde Motorprotein Myosin VIIA kodiert (Gibson et al., 1995; Steel, 1995), einem Protein aus der Familie der sog. unkonventionellen Myosine. Es wird neben Cochlea und Augen auch in Nieren, Hoden und Lunge exprimiert, in denen aber keine Mutationen bekannt sind (Smith et al., 1994; Gibson et al., 1995; Weil et al., 1995). Die Funktion von Myosin VIIA ist noch unklar, es steht aber als Calmodulin-bindendes Protein in enger funktioneller Verbindung mit Ca^{2+} (Todorov et al., 2001; Udovichenko et al., 2002). Myosin VIIA scheint für die Morphogenese, Cytokinese, den synaptischen Vesikeltransport und die Phagozytose sowie die Organisation der Stereozilienbündelung in der Spitze der Haarzellen verantwortlich zu sein (Hammer, 1994; Hasson and Mooseker, 1995; Sahly et al., 1997; Self et al., 1998). Ein Defekt im Myosin VIIA wird auch für die Symptomatik des Usher-Syndroms Typ IB verantwortlich gemacht (Weil et al., 1995), eine autosomal rezessive Erkrankung, die durch Retinopathia pigmentosa, progrediente Schwerhörigkeit und vestibuläre Dysfunktion gekennzeichnet ist (Usher, 1913/14; Hallgren, 1959). Bei *shaker-1* Mutanten ist die Retinopathia pigmentosa nicht vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass im Menschen ein primärer Defekt der Stäbchen und des Konus für die Retinopathie verantwortlich ist (El-Amaouri et al., 1996). Die Identifikation des Defekts im Myosin VIIA als Ursache der vestibulären Symptomatik zeigt, dass die Ursache der vestibulären Dysfunktion nicht zentral, sondern vorwiegend peripher lokalisiert ist, da im Kleinhirn der Maus kein Myosin VIIA exprimiert wird, und das Kleinhirn sowie die vestibulären Kerne bei Usher IB Patienten und *shaker-1* Mutanten funktionell intakt sind. Histologisch zeigen sich lediglich ultrastrukturelle Anomalien in den vestibulären Haarzellen der *shaker-1*, während die PVA und die vestibulären Hirnstammbahnen unbeeinträchtigt sind (Sun et al., 2001).

1.10.3. Die *Varitint-waddler* Mutante

Die *Varitint-waddler* Mutante (*Va/+*) wurde von Cloudman und Bunker (1945) in einer Population von schwarzen und braunen Stämmen von C57 Mäusen erstmals beschrieben. Das Fell heterozygoter Tiere ist bunt gescheckt mit einigen weißen Arealen, während das Fell homozygoter Mäuse mit Ausnahme weniger Areale im Bereich der Ohren und der Schwanzbasis vollständig weiß ist (Cloudman and Bunker, 1945). Die Hautpigmentierung scheint im Zusammenhang mit einem Migrationsdefekt neuraler Zellen zu stehen, so dass man bei einer Reihe weißer Tiere, insbesondere bei Tieren mit weißen Köpfen, eine ausbleibende Reaktion auf auditorische Reize beobachten kann (Cowling et al., 1994). Die Lebenserwartung heterozygoter Mutanten ist annähernd normal, allerdings ist die Fertilität reduziert. Die Mortalität bei homozygoten Tieren ist sehr hoch und nur wenige sind reproduktionsfähig. Heterozygote Tiere sind taub und zeigen Symptome wie Hyperaktivität, Drehbewegungen („circling behaviour“) und Hin- und Herschleudern des Kopfes (Cools, 1972a, b). Bei homozygoten Tieren sind diese Krankheitszeichen noch stärker ausgeprägt. Die Symptomatik ist auf degenerative Veränderungen im Corti-Organ, im Ganglion spirale, in der Stria vascularis, der Macula sacculi, in den Cristae ampullares und im VG zurückzuführen (Deol, 1954), die schon ab P4 beginnen. Die cochleären Haarzellen sind ab P14 degeneriert, die Stereozilien zeigen eine progrediente Unordnung, Verschmelzung und Verklumpung zwischen P5 und P11 (Cable and Steel, 1998). Deol (1954) berichtete von einer reduzierten durchschnittlichen Größe der Neurone des VG dieser Mutante, wobei nicht alle Zellen betroffen sind, sondern die größten und die kleinsten Zellen jeweils annähernd normale Größe aufweisen. Die Zellzahl scheint nach Deol nicht reduziert zu sein.

Eine Mutation des *Mcoln3*-Gens konnte als Ursache der Symptomatik der *Varitint-waddler* Mutante identifiziert werden. *Mcoln3* gehört zur Gruppe der transienten Rezeptor Potential (TRP)-Kanäle und wird im Zytoplasma von Haarzellen und in der Plasmamembran von Stereozilien exprimiert. Der Kanaldefekt stört die Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase und beeinträchtigt damit die Funktion und Entwicklung der Haarzellen und Stereozilien (Di Palma et al., 2002; Steel, 2002).

1.10.4. Tabellarische Zusammenfassung der vestibulären Mutanten

Name, Gensymbol	Phänotyp, Gendefekt
<i>jerker</i> (<i>je/je</i>)	Hyperaktivität, Drehbewegungen, Hin- und Herschleudern des Kopfes, Taubheit bis P12; progressive Degeneration der cochleären Haarzellen, im vestibulären Labyrinth Unordnung der Stereozilien der Typ I Neurone, moderate Degeneration der Maculaorgane, VG nicht betroffen; Mutation des C-terminalen Aktin-bündelnden Moduls der Espine.
<i>shaker-1</i> (<i>sh/sh</i>)	Hyperaktivität, Drehbewegungen, Hin- und Herschleudern des Kopfes, progrediente Taubheit bis zur 4. Lebenswoche, vergleichsweise hohe Fertilität; progressive Unordnung der Stereozilien, Degeneration des Corti-Organ, des Ganglion spirale, der Stria vascularis, der Macula sacculi und des VG; Mutation des Aktin-bündelnden Myosin VIIA, dessen Defekt auch mit dem Usher-Syndrom Typ B assoziiert wird.
<i>Varitint-waddler</i> (<i>Va/+</i>)	Pigmentstörungen, Hyperaktivität, Drehbewegungen, Hin- und Herschleudern des Kopfes, frühe Taubheit, reduzierte Fertilität, hohe perinatale Letalität, homozygote Tiere zeigen eine ausgeprägtere Symptomatik; Unordnung der Stereozilien und Degeneration der Haarzellen, degenerative Veränderungen im Corti-Organ, im Ganglion spirale, in der Stria vascularis, in den Cristae ampullares und im VG mit reduzierter Neuronengröße; Mutation des Mcoln3-Kanal-Gens.

1.11. Fragestellungen

Die Gruppe der großen Bipolarzellen des VG sind durch ihr Antwortverhalten auf vestibuläre Stimulation und die Topographie ihrer peripheren Innervation prädestiniert, auf schnelle Änderungen des sensorischen Inputs zu reagieren. Sie sind in der Lage, hohe Ca^{2+} -Spiegel als Ausdruck einer starken Neuronenaktivität durch ihr Inventar an CaBP effektiv zu senken.

Die Anzahl dieser Bipolarneurone liegt bei der Maus im Bereich von nur wenigen Hundert, weshalb ein Verlust einer relativ geringen Anzahl dieser Neurone bereits kritische funktionelle Konsequenzen verursachen kann. Diese Gruppe lässt sich mit Calr selektiv markieren (Desmadryl and Dechesne, 1992; Kevetter and Leonard, 1996).

Die hier untersuchten vestibulären und cerebellären Mutanten weisen einen differenzierten degenerativen Verlust peripherer Anteile und zentraler Projektionsziele des vestibulären Systems auf.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden durchgeführt, um Anhaltspunkte zur Klärung der nachfolgenden Fragen zu erhalten:

- Führt die Degeneration peripherer Sensorzellen im Vestibularorgan zur anterograden Degeneration der Bipolarneurone des VG ?
- Ist ein kritisches Ausmaß an peripherer Degeneration notwendig ?
- Sind die unterschiedlichen Subpopulationen des VG differenziert von diesen Veränderungen betroffen ?
- Lassen sich Korrelationen zwischen Natur, Ort und Ausmaß der Degeneration und Inzidenz spezifischer Symptome erkennen ?
- Kommt es durch die Veränderungen des peripheren Inputs auf die PVA zu Veränderungen in der Expression des CaBP Calr ?
- Führt cerebelläre Zielzelleprivation zu Veränderungen der Calr-Expression im VG ?
- Zeigen Bipolarneurone mit unterschiedlichem Inventar an CaBP unterschiedliche Resistenzen gegen Zielzelleprivation ?
- Lassen sich aus den Ergebnissen der Arbeit Anhaltspunkte zur Funktion der CaBP im vestibulären System ableiten ?
- Lassen sich auf der Basis dieser Ergebnisse zentrale und periphere vestibuläre Störungen besser differenzieren ?
- Ist der Wegfall der Verbindungen vorteilhafter als die Persistenz gestörter Funktion ?

Untersucht wurden drei vestibuläre Mutanten mit ausgeprägter Symptomatik, aber unterschiedlichem Muster an Degeneration: Eine Mutante ohne bekannte degenerative Veränderungen im VG (*jerker*), eine Mutante mit weitgehendem Funktionsverlust der PVA und degenerativen Veränderungen im VG (*shaker-1*) und eine Mutante mit Zellatrophie im VG (*Varitint-waddler*). Allen drei Mutanten ist eine Unordnung der Stereozilien gemeinsam (Deol, 1954, 1956; Mikaelian et al., 1965; Kikuchi and Hilding, 1965; Cools 1972a, b; Steel and Bock, 1983; Shneron et al., 1983; Sjöström and Anniko 1990a, b, 1992a, b).

Außerdem wurden drei cerebelläre Mutanten mit unterschiedlichen degenerativen Veränderungen ausgewählt, deren Körnerzellen vor (*weaver*), während (*Lurcher*) und nach (*purkinje cell degeneration*) der Synaptogenese mit den Moosfasern degenerieren (Rakic and Sidman, 1973a, b; Swisher and Wilson, 1977; Landis and Mullen, 1978). Die Zahl vestibulärer Ganglienneurone bleibt in diesen cerebellären Mutanten konstant (Bäurle and Guldin, 1998a, b).

Mit Hilfe der Calr-Immunocytochemie und stereologischer Methoden wurden die großen Bipolarneurone dieser Gruppen selektiv markiert, um Ort und Ausmaß degenerativer Veränderungen innerhalb dieser Subpopulation quantitativ zu erfassen.