

4. DISKUSSION

Die Gesamtneuronenzahlen im VG bleiben auch unter den pathologischen Bedingungen, wie sie in den untersuchten cerebellären und vestibulären Mutanten existieren, unverändert. Die Neurone des VG bleiben sowohl bei Wegfall ihrer Zielzellen im Kleinhirn als auch bei Schädigung der peripheren Sensorzellen im Gleichgewichtsorgan erhalten. Diese weitgehende Persistenz der Neurone des VG deutet auf eine sehr hohe Resistenz gegenüber pathologischen Veränderungen ihres sensorischen Zustroms und ihrer zentralen Projektionsziele hin.

Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der Ganglienvolumina, der Neuronendurchmesser und der Anzahl Calr-positiver Bipolarneurone im VG signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und vestibulären Mutanten sowie zwischen vestibulären und cerebellären Mutanten.

Sowohl die *jerker* als auch die *shaker-1* Mutanten zeigen beim Vergleich mehrerer Parameter signifikante Unterschiede. Die Relation Calr-positiver Neurone ist zwischen *jerker* und *shaker-1* Mutanten signifikant unterschiedlich.

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Präparation, Perfusion und Schneiden der Präparate

Im Zuge einer rein präparativen Gewinnung der vestibulären Ganglien ist ein Verlust oder eine Verletzung des VG aufgrund der geringen Größe und der schweren Zugänglichkeit mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit behaftet. Für die vorliegende Arbeit wurde daher das gesamte knöcherne Labyrinth inklusive Cochlea präpariert und in EDTA decalcifiziert. Damit war sichergestellt, dass sich das VG vollständig innerhalb des Präparats befand.

Dieses Vorgehen hatte zur Folge, dass eine zweifelsfreie Identifikation des VG und eine definitive Abgrenzung gegen das Ganglion spirale und das Ganglion geniculi nötig waren. Ausgiebige Voruntersuchungen zur dreidimensionalen Struktur und zu den räumlichen Beziehungen der einzelnen Komponenten des peripheren auditorischen und vestibulären Systems ergaben Kriterien zur Identifikation des VG in zweidimensionalen seriellen

Semidünnschnitten, die eine zweifelsfreie Erkennung ermöglichten. Zur Minimierung von Schnittverlusten während des Schneidens wurden ausschließlich qualitativ hochwertige Messer verwendet, so dass ein Messerwechsel, der fast immer einen Schnittverlust verursacht, je Ganglion nur ein- bis maximal dreimal nötig war. Da die Auswertung mit Hilfe stereologischer Methoden erfolgte, bei der nicht jeder Schnitt untersucht werden muss, relativiert sich diese Problematik im Gegensatz zur Serienrekonstruktion, doch sollte die Zahl verworfener Schnitte nicht zu groß ausfallen, da ansonsten keine repräsentativen Erhebungen durchgeführt werden können. Von besonderer Bedeutung war hier das Auffinden des ersten Schnittes, der Gewebe des VG enthielt, da eine Bestimmung der Zellzahl bei Unkenntnis der Anzahl der Schnitte und der Flächen des VG in diesen Schnitten sehr ungenau und daher für diese Art der Untersuchung untauglich gewesen wäre. Dieses Problem wurde dadurch gelöst, dass die schrittweise Annäherung an das Ganglion durch eine Azur-Methylenblau-Schnellfärbung jedes 10. Schnittes kontrolliert stattfand. Diese Maßnahmen gewährleisteten, dass der Schnittverlust bei allen analysierten Präparaten unter 1% lag.

4.1.2. Immunocytochemie, lichtmikroskopische Untersuchung und stereologische Auswertung

Bei nahezu allen quantitativen Verfahren, die auf immunocytochemisch behandeltes Gewebe angewandt werden, besteht eine mögliche Fehlerquelle darin, dass immunopositive von immunonegativen Strukturen abgegrenzt werden müssen. Variable Grenzziehungen oder ein kontinuierlicher Übergang der Färbeintensitäten können zu Fehlern führen, die die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich herabsetzen können.

Aus diesem Grund kamen für die vorliegende Arbeit ausschließlich Präparate zur Auswertung, die auf der Basis der „Kontrollschnitte“ durch eine hohe Qualität der immunocytochemischen Markierung ausgezeichnet waren.

Hauptqualitätskriterium war dabei das völlige Ausbleiben einer Markierung in den Kontrollschnitten. Diese Grundvoraussetzung ermöglichte es, alle Neurone, die eine erkennbare Färbung aufwiesen, als immunopositiv zu werten.

Weitere mögliche Fehler, die durch zu geringe oder variable Farbreaktionen zustande kommen können, wurden minimiert bzw. ausgeschlossen, indem die Reaktionszeit die Sättigungszeit erheblich überschritt und bei allen untersuchten Gruppen identisch war.

Interindividuelle Unterschiede bei der Grenzziehung der gezeichneten Flächen und somit der Volumenbestimmung des VG wurden relativiert, indem die Grenzziehung aller untersuchten Flächen des VG von einem Untersucher durchgeführt wurde. Die Ausdehnungsgrenze wurde als kürzeste Distanz zwischen benachbarten, randständigen Zellen definiert.

4.1.3. Methodenvergleich

Die stereologische Untersuchung stellt eine effiziente und valide Methode zur Bestimmung von Zellzahlen in einem Präparat dar, ohne dass systematische Fehler auftreten (siehe Kapitel 2.5.2).

Die serielle Rekonstruktion ist bei ebenso validen Ergebnissen weitaus arbeitsintensiver und sollte speziellen Untersuchungsanforderungen vorbehalten bleiben (Coggeshall and Lekan, 1996).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Beim Vergleich der Gesamtneuronenzahlen in Wildtypen, bestimmt von Bäurle and Guldin (1998a), zeigen sich in der vorliegenden Studie bestätigende Ergebnisse.

Auch die Wüstenspringmaus (*Iaculus orientalis*) weist mit $3962 \pm 357,9$ Neuronen eine ähnlich große Neuronenpopulation im VG auf (Kevetter et al., 1998; Kevetter and Leonard 2002). Die festgestellten Werte der Neuronendurchmesser der untersuchten Mäuse bestätigen Ergebnisse von Bäurle und Guldin (1998a, b) und von Demêmes et al. (1992) bei Wildtypen und cerebellären Mutanten.

Eine von Deol (1954) beschriebene Reduktion der Neuronendurchmesser in *Varitint-waddler* konnte durch die vorliegende Studie nicht bestätigt werden. Deol (1954) hatte die Neuronendurchmesser allerdings nicht quantitativ untersucht.

Calr ist ein selektiver Marker der Population großer bipolarer Neurone mit Calyx-Endigungen, die in der Ratte einen Anteil von etwa 15 % (Demêmes et al., 1992) und in der Wüstenspringmaus einen Anteil von ca. 20% besitzt (Kevetter et al., 1998; Kevetter and Leonard, 2002). Alle Untersuchungen wurden mit stereologischen Methoden oder Serienrekonstruktionen zur Bestimmung der Zellzahl durchgeführt, so dass Speziesdifferenzen als wahrscheinlichste Ursache für diese Diskrepanz anzunehmen sind.

In der vorliegenden Arbeit beträgt der Anteil der Calr-positiven Zellen an der Gesamtneuronenzahl des VG bei Wildtypen 14,85%, bei cerebellären Mutanten 13,9% und bei vestibulären Mutanten 10,9% (allerdings mit signifikanten Unterschieden innerhalb dieser Gruppe). Dies entspricht einer signifikanten Reduktion in den vestibulären Mutanten.

4.2.1 Resistenz vestibulärer Bipolarneurone bei zentraler Zielzell- und peripherer Sensorzelldeprivation

Die Frage, welches kritische Ausmaß an peripherer Degeneration einen Neuronenuntergang im VG induziert, kann durch die aktuell vorhandene Literatur nicht beantwortet werden, da es diesbezüglich keine quantitativen Untersuchungen gibt. Eine Durchtrennung des peripheren Anteils des N. vestibulocochlearis, die die Verbindung des VG zu den peripheren Organen unterbricht, scheint jedenfalls keine Auswirkungen auf die Neuronengesamtpopulation auszuüben. Es ist aber bekannt, dass das Fehlen von BDNF (brain-derived neurotrophic factor), einem für die Synaptogenese in den vestibulären peripheren Organen wichtigen Faktor, sowie eine zentrale Denervierung in den vestibulären Kernen zu einem massiven Neuronenverlust führt (Cass et al., 1989; Ernfors et al., 1994) während eine zentrale Denervierung im Cerebellum ohne Einfluss auf die Zellzahl im VG bleibt. Die von Bäurle und Guldin (1998b) nachgewiesene Persistenz vestibulärer Bipolarneurone bei Verlust ihrer cerebellären Zielzellen wird durch die vorliegende Studie bestätigt.

Die vorliegenden Ergebnisse erhärten frühere Befunde, die zur Annahme führten, dass die Degeneration und/oder Fehlfunktion peripherer Sensorzellen nicht zur umfangreichen anterograden Degeneration der Bipolarneurone des VG führt. Dies bestätigt die Ergebnisse

von Sirkin et al. (1984) und Cass et al. (1989), die eine hohe Resistenz der Bipolarneurone des VG nach Durchtrennung des peripheren Anteils des VIII. Hirnnerven zeigen konnten.

4.2.2 Selektiver Untergang großer Bipolarneurone im Ganglion vestibulare der *jerker* und *shaker-1* Mutanten

Trotz konstanter Gesamtneuronenzahl im VG der cerebellären und vestibulären Mutanten ist die Subpopulation der großen Calyx-only Bipolarneurone in *jerker* und *shaker-1* selektiv reduziert. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der Anzahl Calr-positiver Neurone bei konstanter Gesamtpopulation wäre, dass die Fraktion Calr-positiver Neurone nur ca. 15% der Grundgesamtheit aller Neurone des VG ausmacht und damit eine Reduktion dieser Subpopulation um 30% am Signifikanzlimit von 5% der Gesamtpopulation liegt. Als Folge kann innerhalb dieser Fraktion eine Degeneration vorliegen, ohne dass in der Grundgesamtheit signifikante Unterschiede erscheinen. Die Reduktion des Ganglienvolumens in *jerker* und die signifikante Reduktion der Zelldurchmesser in *shaker-1* bzw. dem Trend zur Reduktion der Zelldurchmesser in *jerker* stützt die Annahme einer Reduktion großer Bipolarneurone.

Eine alternative Erklärung für die reduzierte Anzahl Calr-positiver Neurone könnte in einer verminderten Calr-Expression im Zuge einer Down-Regulation bestehen. Fehlfunktion oder Degeneration der Haarzellen in der Peripherie reduzieren den sensorischen Input auf die Afferenzen und damit auch den Bedarf für eine hohe Ca^{2+} -Pufferkapazität, die durch die Expression von CaBP wie Calr zum Ausdruck kommt. Eine stark reduzierte Calr-Expression könnte dadurch zu intrazellulären Konzentrationen führen, die jenseits der immunocytochemischen Detektionsgrenze liegen. Für diese Annahme sprechen auch die qualitativen Beobachtungen der Reduktion Calr-positiver PVA und Calyces in den peripheren vestibulären Organen der vestibulären Mutanten *jerker* und *shaker-1*. Die reduzierte Neuronengröße könnte hier eine verringerte metabolische Aktivität reflektieren.

Die Reduktion der Calr-positiven Subpopulation des VG ist signifikant in *shaker-1* und *jerker*, während die Zahl Calr-positiver Neurone von cerebellärer Zielzelleprivation und dem Mcoln3-Kanaldefekt der Stereozilien (*Varitint-waddler*) unberührt bleibt.

Sowohl *jerker* als auch *shaker-1* weisen Mutationen Aktin-bündelnder Proteine auf (Gibson et al., 1995; Steel, 1995; Zheng et al., 2000), auf die Calr in seiner potentiellen Funktion als intrazellulärer Ca^{2+} -Puffer und -Modulator Einfluss nehmen könnte (Hubbard and McHugh, 1995; Kuźnicki et al., 1995a, b; Desmadryl et al., 1997; Edmonds et al., 2000). Die Mutation des Myosins VIIA (*shaker-1*) wirkt sich dabei stärker auf die Anzahl Calr-positiver Neurone aus als die Störung der Espine (*jerker*). Myosin VIIA ist ein Calmodulin-abhängiges Protein, das dadurch in enger funktioneller Verbindung mit Ca^{2+} steht (Todorov et al., 2001; Udovichenko et al., 2002). Aufgrund der hohen Kollokalisierung von Calr mit neurofilamentären Proteinen (Demêmes et al., 1992), könnte sich ein gestörter Metabolismus dieser intrazellulären Proteine auch auf die Calr-Expression im VG auswirken. Espine hingegen werden in ihrer Aktivität als Aktin-bündelnde Proteine nicht durch Ca^{2+} inhibiert, sondern scheinen eine stabilisierende Wirkung gegenüber lokalen Ca^{2+} -Erhöhungen auszuüben (Bartles et al., 1996, 1998; Chen et al., 1999; Bartles, 2000; Zheng et al., 2000; Sekerková et al., 2003).

4.2.3 Korrelation zwischen Symptomatik und selektiver Reduktion der Subpopulation großer Bipolarneurone vom Calyx-Typ

Eine Abnahme Calr-positiver Bipolarneurone zeigt sich nur in den vestibulären Mutanten *jerker* und *shaker-1*, die eine schwerwiegendere Symptomatik als die untersuchten cerebellären Mutanten aufweisen (s. Tabellen 1.9.4. und 1.10.4.).

Allerdings ist die Symptomatik von *jerker* und *shaker-1* Mutanten der in *Varitint-waddler* sehr ähnlich. Die ausgeprägten motorischen Störungen der *Varitint-waddler* Mutante, die in homozygoten Tieren noch schwerwiegender sind, können nicht mit einer Reduktion Calr-positiver Neurone des VG in Verbindung gebracht werden.

In Anbetracht der morphologischen und degenerativen Veränderungen innerhalb der peripheren vestibulären Organe in allen untersuchten vestibulären Mutanten liegt der Schluss nahe, dass die hier beschriebenen Veränderungen innerhalb der Neurone des VG eine sekundäre Folgereaktion auf den veränderten sensorischen Input darstellen. Die Neurone des VG, die das Bindeglied zwischen vestibulärer Peripherie und ZNS darstellen, sind dieser

Annahme zufolge in der Lage, ihr biochemisches Inventar den Anforderungen, die ein veränderter sensorischer Input erzeugt, anzupassen. Diese Ansicht wird auch dadurch gestützt, dass in cerebellären Mutanten ohne Schädigungen der vestibulären Peripherie diese „Anpassungen“ nicht beobachtet werden können. Entscheidend für die Symptomatik der vestibulären Mutanten scheint daher überwiegend die gestörte sensorische Transduktion und weniger die Veränderungen innerhalb der Neurone des VG zu sein.

In diesem Kontext stellt sich auch die Frage, inwieweit die o.a. Persistenz der Neurone des VG an der Aufrechterhaltung der vestibulären Symptomatik beteiligt sind bzw. eine zentrale Kompensation beeinträchtigt oder verhindert. Es ist bekannt, dass durch zentrale vestibuläre Kompensation die motorischen Defizite nach partieller und vollständiger Durchtrennung des N. vestibulocochlearis weitreichend kompensiert werden und sehr umfangreiche funktionelle Restitutionen erfolgen (Sirkin et al., 1984; Cass et al., 1989). Insbesondere das für die vestibulären Mutanten charakteristische „circling“ findet sich bei zentralen vestibulären Schädigungen nach erfolgter Kompensation nicht mehr. Ebenso führt die Kompensation bei zentralen Schädigungen oder nach akuten einseitigen Störungen innerhalb der vestibulären Peripherie zur progressiven Milderung der Symptome (Sirkin et al., 1984; Cass et al., 1989), ein Verlauf, der in den vestibulären Mutanten nicht beobachtet werden kann. Es scheint daher, dass die fortwährende Aufrechterhaltung der Verbindung zwischen dysfunktionellen Haarzellen und ZNS und die Symmetrie der peripheren Schädigungen vestibuläre Kompensationsmechanismen beeinträchtigen oder sogar verhindern.

4.2.4 Calretinin als Markerprotein großer Bipolarneurone und als intrazellulärer Ca^{2+} -Modulator

Die Rolle des Calr ist noch weitgehend unklar, es scheint Ca^{2+} -Konzentrationen zu beeinflussen und damit intrazelluläre Prozesse zu modulieren. Ob es als Ca^{2+} -Puffer oder als Ca^{2+} -Modulator fungiert, wird derzeit noch untersucht (Billing-Marczak and Kuźnicki, 1999). Es stellt aber weit mehr als ein Markerprotein für Bipolarneurone vom Typ I dar. Schließlich findet man auch im VG von Fischen, die ausschließlich Typ II-Haarzellen besitzen, einen Anteil von etwa 20% an Calb-positiven Neuronen (Dechesne et al., 1988), so dass Calb und

Calr eine von Typ I-Haarzellen unabhängige Funktion, etwa die eines Ca^{2+} -Puffers oder Ca^{2+} -Modulators, besitzen müssen, wie es in vorangegangenen Arbeiten postuliert wird (Hubbard and McHugh, 1995; Kuźnicki et al., 1995a, b; Desmadryl et al., 1997; Edmonds et al., 2000; Kevetter and Leonard, 2002). Diese Forderung wird durch die vorliegende Studie unterstützt, da die Population Calr-positiver Neurone in den vestibulären Mutanten entsprechend einer angenommenen Reduktion des Inputs sensorischer Afferenzen vermindert ist. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Expression von Calr eng mit der Aktivität der Typ-I Haarzellen zusammenhängt.

Da die Neurone vom Calyx-Typ zwei CaBP mehr besitzen als die restlichen Neurone des VG, könnte dies neben dem Entladungsmuster ein weiteres Indiz für eine höhere Aktivität dieses Zelltyps sein. Ein reduzierter Input hätte demnach auch eine Reduktion der Aktivität und Größe der Typ-I Zellen, verbunden mit einer Verminderung des Inventars an CaBP, zur Folge.

Gleichzeitig könnte daraus aber auch der Schluss gezogen werden, dass eine Abnahme der CaBP bei gleicher Aktivität schädigend für diese Zellen wäre (Heizmann, 1993). Ein Anhalt dafür wäre die vakuoläre Zeichnung der Calyces bei *jerker*, wobei nicht differenziert werden kann, ob dies Ausdruck einer primären, d.h. durch den Gendefekt hervorgerufenen, oder sekundären Schädigung ist.

Eine Aussage zur neuroprotektiven Potenz des Calr kann aufgrund der angenommenen Untererregung bei reduziertem Input auf die Afferenzen aufgrund gestörter Haarzellfunktion nicht gemacht werden. Die Funktion der großen Bipolarneurone als Zellen hoher Aktivität mit der Fähigkeit, hohe Ca^{2+} -Spiegel durch ihr größeres Inventar an CaBP (Calr und Calb) effektiv zu senken, wird durch ihre selektive Reduktion bei verringertem sensorischen Input und gleichbleibender Zahl der übrigen Subpopulationen bestätigt.