

# 1 Einleitung

Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen im Hirnstamm und Kleinhirn den kompletten Verlauf und alle zentralen Projektionen der Calb-positiven Subpopulation der primär vestibulären Afferenzen (PVA).

Zunächst werden die Organisation des vestibulären Systems, die direkten zentralen Projektionsziele aller PVA in Hirnstamm und Kleinhirn und die Eigenschaften der Calb-positiven Subpopulation charakterisiert.

Zur selektiven Darstellung dieser PVA-Population wurden cerebelläre Mäusemutanten, nämlich Purkinje cell degeneration (*pcd/pcd*) und Lurcher (*Lc/+*) verwendet. Ihre genetischen Defekte und deren Bedeutung für die vorliegende Arbeit werden ebenfalls kurz dargestellt.

Darüberhinaus sollte geprüft werden, ob mit den gewonnenen Ergebnissen mehr Klarheit in die Diskussion über den Verlauf und die Termination von PVA in anderen Spezies gebracht werden kann.

Zum allgemeinen Verständnis werden zunächst die Anatomie von Kleinhirn und vestibulärem System vergegenwärtigt und die bisher diskutierten Standpunkte und Ergebnisse vorgestellt.

## 1.1 Vestibuläres System

Man unterteilt das vestibuläre System in den Vestibularapparat, auch Vestibular-, statisches oder Gleichgewichtsorgan genannt, in den Nervus vestibularis mit seinem Ganglion vestibuli (VG) (scarpae) und in die zentralen vestibulären Projektionen.

Das Vestibularorgan liegt in der Pars petrosa des Os temporale und wird anatomisch zum Innenohr gerechnet. Es wird sowohl aus dem Bogengangsapparat gebildet, bestehend aus den drei Bogengängen als auch aus den Maculaorganen, nämlich Sacculus und Utriculus.

In den Makulaorganen wie auch in den Bogengängen liegen die von Wersäll (1956) und Engström (1962) elektronenmikroskopisch dargestellten Haarzellen. Bei diesen handelt es sich um sekundäre Sinneszellen, die sich nach ihrem Innervationsmuster in dickere Typ-I-Sensoren und schmalere Typ-II-Sensoren unterteilen lassen.

Die ciliären Fortsätze der Haarzellen ragen in eine Mucopolysaccharidschicht (Cupula) hinein und bilden das Sensorfeld (Crista) im ampullären Teil jeden Bogengangs.

Bei Drehbewegungen kommt es im Bogengang infolge der Trägheit der Endolymphe zur Abbiegung der Cupula und damit zu einer Scherung der Cilien-Fortsätze. Dies stellt den adäquaten Reiz der Haarzellen dar und führt zur Öffnung von  $K^+$ -Kanälen, wodurch das Sensorpotential entsteht, das nach Umschaltung auf die primären Afferenzen je nach Richtung der Scherung zu einer Zu- oder Abnahme der Aktionspotential-Frequenz in den PVA führt. Die Bogengänge dienen damit der Registrierung von Drehbeschleunigungen bei Kopf- und Körperbewegungen. Sie bilden auch die Grundlage für den vestibulo-oculären Reflex, der gewährleistet, dass sich die visuelle Welt nicht bei jeder Kopf- oder Körperbewegung mitbewegt.

Im anderen Teil des Vestibularorgans, den Makulaorganen Sacculus und Utriculus ragen die Cilien der Sensoren in die sogenannte Otholithenmembran hinein, eine Mucopolysaccharidschicht mit Calciumcarbonat-Kristallen.

Die natürlichen Reize für die Makulaorgane sind Gravitation und lineare Beschleunigungen, die zu Verschiebungen der Otholithenmembran gegenüber der umgebenden Endolymphe führen. Die Makulaorgane dienen damit in erster Linie der Registrierung der Lage und der linearen Bewegung des Kopfes im Verhältnis zur Schwerkraft.

Damit ist das vestibuläre System maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts, der Raumorientierung und der Okulomotorik beteiligt. Darüberhinaus werden auch vegetative Größen beeinflusst.

## 1.2 Primär vestibuläre Afferenzen (PVA)

Als PVA bezeichnet man jene Fasern, welche die peripher liegenden vestibulären Sensoren mit dem ZNS verbinden und deren Zellkörper als bipolare Neurone im VG liegen.

Diese Bipolarzellen bilden eine heterogene Zellgruppe bezüglich Zellgröße, Faserdurchmesser, biochemischer Ausstattung, Gestalt der peripheren Synapsen und hinsichtlich ihrem physiologischen Antwortverhalten.

Die kleineren Bipolarzellen leiten überwiegend mit Bouton-Endigungen von den Typ-II-Haarzellen ab, besitzen dünnere Fasern und zeigen meist eine reguläre Spontanaktivität sowie ein tonisches Entladungsmuster (Goldberg und Fernández, 1971,1977; Yagi et al., 1977; Baird et al., 1988).

Die großen Bipolarzellen dagegen besitzen überwiegend dicke Fasern und bilden größtenteils Calyx-Synapsen an Typ-I-Haarzellen (Fernández et al., 1988,1990,1995; Goldberg et al., 1990; Brichta und Peterson, 1994). Sie zeigen meist eine irreguläre Spontanaktivität und ein phasisches Antwortverhalten (Goldberg und Fernández, 1971,1977; Yagi et al., 1977; Baird et al., 1988). Daneben finden sich als Mischformen sogenannte dimorphe Einheiten.

Die Bipolarneurone bilden mit ihren Perikaria das VG, nahe am Kontaktpunkt zum Hörnerven am Fundus des Meatus acusticus internus. Ihre Fasern ziehen zum Kleinhirn-Brückenwinkel und trennen sich im Rautenhirn in einen absteigenden Ast zum medialen (MVN) und inferioren Nucleus vestibularis (IVN) und in einen aufsteigenden Ast, der den superioren Nucleus vestibularis (SVN) durchquert und zum medialen (MVN) und lateralen Nucleus vestibularis (LVN) zieht (Kölliker, 1891).

Der weitere Verlauf ins Kleinhirn und die Projektionsorte der vestibulären Afferenzen, auch der sekundären, also nach Umschaltung in den VN, werden je nach Autor und Spezies noch sehr kontrovers diskutiert, wie aus der Tabelle im Kapitel 1.2.2 hervorgeht.

Die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Calb markierte PVA-Subpopulation umfasst die Gruppe der großen Bipolarzellen mit ihrer irregulären Spontanaktivität und ihrem phasischen Entladungsmuster (Demêmes et al., 1992; Raymond et al., 1993).

### 1.2.1 Somatotopie und vestibulo-cerebelläre Projektionen

Luciani (1891) hatte entdeckt, dass einseitige Läsionen im Cerebellum hauptsächlich den ipsilateralen Bewegungsapparat betreffen. Bolk (1906), der als erster die cerebellären Untereinheiten identifizierte, entwarf einen somatotopischen Plan für die Kleinhirnoberfläche, der aber zu weitreichend war. Ingvar (1918) konnte eine grobe Somatotopie für die spinocerebellären Fasern bestätigen.

Ein von Brodal und Jansen (1954) entwickeltes Schema unterteilt das Kleinhirn von den kortikofugalen Efferenzen ausgehend in paramediane Zonen, die durch rein ipsilaterale Projektionsbahnen gebildet werden. Der Vermis projiziert demnach als medialer Teil jeweils zum MCN, die angrenzenden Hemisphärenstreifen projizieren jeweils als Pars intermedia zum gleichseitigen ICN und der laterale Streifen als Pars lateralis zum LCN, wobei der rostrale Teil jeder Pars mit dem rostralen Kernanteil korrespondiert und der caudale Pars-Abschnitt mit den caudalen Kernanteilen.

Frühe elektrophysiologische Ableitungen von Adrian (1943) und Snider und Stowell (1944) konnten neben einer Repräsentanz der Körperoberfläche im Lobus anterior auch eine Somatotopie im posterioren Lobus erkennen, obwohl Brodal und Høivik (1964) für die vestibulären Moosfasern eine eher diffuse Termination ohne funktionell ableitbare Projektionen annahmen. Shambes et al. (1978) postulierten später eine ungeordnete Somatotopie der Körperoberfläche. Während Oscarsson (1979) von gemeinsamen sagittalen Terminationsgebieten von Moos- und Kletterfasern sprach, konnte Ito (1984) anatomisch und elektrophysiologisch nur eine Projektion in kleine Längsstreifen für die Kletterfasern aus den einzelnen Abschnitten der unteren Olive nachweisen.

Matsushita und Wang (1987) sowie Yaginuma und Matsushita (1987) wiesen darauf hin, dass sich die Projektionen in der Tiefe der Fissuren von denen der übrigen Kleinhirnoberfläche unterscheiden.

Ferrier (1876, 1886) konnte bereits nachweisen, dass es lange vestibuläre Projektionen ins Kleinhirn gibt. Carpenter, Stein und Peter (1972) war es bei Affen sogar gelungen, eine Projektion der PVA mit einer relativ spezifischen Repräsentanz der vestibulären Organe darzustellen, im Sinne einer senso-topischen Projektion. Auch bei Nagern konnten Kevetter und Perachio (1983) eine relative Spezifität im Verlauf der PVA in die vestibulären Kerngebiete nachweisen, während Schwarz und Schwarz (1983) bei Vögeln keine Vestibularorgan-spezifische Termination bestätigen konnten.

### 1.2.2 Kurze historische Übersicht mit Spezies-Vergleich

Die zentrale Termination der PVA wird bereits seit mehr als 100 Jahren ausgiebig erforscht. Dennoch bestehen je nach Versuchstier und Methode beachtliche Unterschiede in den ermittelten Verteilungen der PVA (siehe folgende Tabelle 1).

Im Vordergrund der Diskussion standen die Fragen nach der Größe des Vestibulo-cerebellums; ob die VN insgesamt oder nur in begrenzten Arealen primär vestibulär angesteuert werden; ob die CN überhaupt und ob Flocculus, Paraflocculus und Lingula zu den Zielgebieten der vestibulären Afferenzen gehören. In den meisten Versuchen mit Säugetieren wurden zumindest Teilareale der vier großen VN als Zielorte der PVA identifiziert, zum Teil auch der MCN und im Kleinhirncortex fast immer der Nodus und die ventrale Uvula.

Kölliker (1891) beschrieb als erster die mit der Golgi-Färbung entdeckte Aufgabelung des N.VIII nach Eintritt in den Hirnstamm. Lewandowski (1904) verneinte noch die Existenz von PVA. Ramón y Cajal (1909) beschrieb aber ihren Verlauf zu den VN, ohne sie ausdrücklich als Primärfasern zu benennen. Er beobachtete auch im LVN, dass dieser im dorsalen Teil frei von Degenerationen war, wenn der Nervus vestibulocochlearis (N. VIII) durchtrennt wurde. Leidler (1916) fand mit der Marchi-Methode beim Kaninchen kontralaterale Fasern in den VN und nur ipsilaterale Fasern in den CN (siehe Tabelle). Während Ingvar (1918) bereits in der Katze den ipsilateralen Flocculus, den Nodus und die Uvula als Lokalisationen von PVA nachweisen konnte sowie den MCN bilateral, bestritt Lorente de Nó (1926) noch grundsätzlich die Existenz von vestibulo-cerebellären Fasern. Weston (1936) konnte eine Projektion in Nodus und Flocculus bei Reptilien bestätigen. Im gleichen Jahr postulierte Dow die Abwesenheit kontralateraler Fasern im Cerebellum nach Einsatz der Marchi-Methode bei Katzen und Ratten.

Die Frage nach der Existenz von kontralateralen Projektionen wird bis heute noch kontrovers diskutiert.

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der wichtigen Arbeiten zusammen, die über die vestibulären Afferenzen bei Säugetieren und Opossum publiziert wurden:

Tabelle 1: Zentrale Projektionen der PVA in Säugern.

Tierart	Autoren/Jahr	Methoden	zentrale Projektionen	Bemerkungen
Hund	Sachs, Alvis 1921	Silberfärbung	ausschließlich <b>indirekte</b> Fasern in allen VN und in den MCN	<b>keine</b> Kleinhirn- Termination
Katze	Ingvar 1918	Silberfärbung	MCN, LCN, No, Uv, <i>Fi, Li</i>	VN nicht untersucht, <b>bilateral</b> im MCN
	Dow 1936	Silberfärbung	MCN, No, vUv, <i>Fi</i>	VN nicht untersucht
	Walberg et al. 1958	N.VIII-Schnitt, Silberfärbung	zen.SVN, rost.vLVN, <i>lat.MVN</i> , med. <i>lat.</i> und rost.med. IVN, In 8	nur VN untersucht, ipsilaterale Proj.
	Carpenter 1960	VG-Läsion, Silberfärbung	SVN, vLVN, <i>lat.vMVN</i> , IVN, ret.form. .sol.fasc., <i>sol.nucl.</i> , <i>dors.mot.nucl.X</i> MCN, No, vUv, <i>Fi, Li</i> ,	<b>bilateral</b> in: MCN, No, Li, vUv
	Brodal,Høivik 1964	N.VIII-Schnitt, Silberfärbung	gr Y, LCN, No, vUv, <i>Fi, Li, dors. und vPfl</i>	VN nicht untersucht, <b>bilateral</b> im Pfl,
	Gacek 1969	N.VIII-Läsion, Silberfärbung	zen.SVN, vLVN, MVN, IVN, gr Y, In 8	nur VN untersucht
	Kotchabhakdi, Walberg,1978	HRP in VN	MCN, <i>Vermis in Lobuli I-VIII</i>	VN nicht untersucht, selektive cer. Proj.
	Korte, Korte Und Mugnaini 1979	VG-Läsion, Silberfärbung	<i>lat.SVN</i> , vLVN, MVN, IVN, gr Y, In 8, <i>N VI</i> , MCN, No, vUv, <i>Fi</i>	nur VN untersucht
Affe	Carpenter,Stein Peter 1972	VG-Läsion, Silberfärbung	med.vLCN, No, vUv, <i>Fi, Li, Fol. 3-10</i>	VN nicht untersucht, Sensotopie im <i>Fi</i>
	Carleton, Carpenter 1984	HRP+AS-Iso- tope,antero- grad Tracing	zen.SVN, vLVN, MVN, IVN, grY, ret.form., <i>acc.cun.nuc.</i> , <i>subtrig.</i> <i>lat.ret.nuc.</i> , LCN, No, vUv, <i>Fi, Li</i>	ipsilaterale Proj. der Bogengänge in SVN + MVN
	Langer et al. 1985	HRP,retrogra- des Tracing	keine PVA im <i>Fi</i>	nur Kleinhirncortex untersucht
Opossum	Henkel,Martin 1977b	VG-Läsion, HRP, Autora- diographie	zen.SVN, MVN, vLVN, IVN, gr Y, MCN, No, <i>Fi</i>	
	Pflieger, Cabana 1996	anterogrades Tracing	VN und CN	<b>bilateral</b> in VG bei jungen Tieren

## Nagetier-Vergleich

Chinchilla	Suárez et al. 1989	HRP, retro-Grades Tracing	caud.SVN, rost.vLVN, rost.MVN, rost.IVN	nur VN untersucht
Kaninchen	Leidler 1916	Marchi-Methode	SVN, vLVN, <i>lat.</i> MVN, med.vIVN, ipsilateral in allen CN	<b>keine</b> PVA im Kleinhirncortex
	Gerrits et al. 1989	HRP und Leucin in VG	VN <i>außer LNV</i> . gr Y, N VI, <b>bilateral</b> : No, vUv, <i>Li, Ce, Lob I-VI</i>	hinterfragen Trennung In sekundäre und PVA
	Barmack et al. 1993	HRP, retrograd Tracer in Labyr.	No, vUv, <i>Fi, dors. und vPfl, Sulcus cerebellaris major</i>	VN nicht untersucht, ipsilaterale Proj.
Ratte	Dow 1936	Marchi-Methode	MCN, No, vUv	VN nicht untersucht
	Mehler, Rubertone 1985	Läsionen, HRP, Nauta-Färbung	SVN, rost.vLVN, MVN, IVN, caud.MCN, <i>Fi, bilateral</i> : No, vUv, <i>Li</i>	
	Morris et al. 1988	Parvalbumin-Färbung	SVN, MVN, LVN, IVN, MCN, ICN No, Uv, <i>Fi, Pfl</i>	
Springmaus	Kevetter, Perachio 1983	HRP + Iontophorese in vest. Ampullae	sup.VG: rost. SVN, med. MVN, vLVN, IVN, <i>Vermis</i> . inf.VG: <i>lat.</i> SVN, MVN, med. IVN, gr Y, <i>Vermis</i>	sensotopische Proj. In VN
	Kevetter, Perachio 1986	HRP in Sacculus und dors. Bogengang	SVN, vLVN, MVN, IVN, gr Y, ICN, LCN, No, Uv, <i>Li, Cu, De</i>	
Maus	Ramón y Cajal 1909	Golgi-Färbung	MCN, No, <i>Fi</i>	VN nicht untersucht
	Lorente de Nó 1933	Golgi-Färbung	SVN, vMVN, IVN	Kleinhirn <b>ohne</b> PVA

Abkürzungen sind am Anfang aufgelistet, hier zusätzlich:

caud.	caudal	med.	medial
cer.	cerebellär	Proj.	Projektion
dors.	dorsal	rost.	rostral
inf.	inferior	v	ventral
Labyr.	Labyrinth	zen.	zentral
lat.	lateral		

Bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts fand Alexander beim Vergleich verschiedener Säugetierspezies eine weitgehende Übereinstimmung in der Zell- und Fasermorphologie bezüglich Größe, Gestalt und Nachbarschaftsbeziehungen zentralnervöser Neurone.

Für die Neurone des VG gelang Goldberg und Fernández (1971,1977), Yagi et al. (1977) und Baird et al. (1988) der elektrophysiologische Nachweis, dass die großen Neurone bei natürlicher Stimulation ein charakteristisches phasisch-dynamisches und eher irreguläres Entladungsmuster zeigen und dass dagegen die Entladungen in den kleineren Neuronen eher regulär und überwiegend tonisch sind.

Diese großen Neurone kontaktieren überwiegend die vestibulären Typ-I-Haarzellen an der Spitze der Cristae und an den Striolae der Makula-Organen über ihre typischen Calyx-Synapsen (Fernández et al. 1988,1990,1995; Goldberg et al. ,1990; Brichta and Peterson, 1994).

Für viele der großen Neurone des VG konnte eine Immunreaktivität für Calb nachgewiesen werden (Demêmes et al., 1992; Raymond et al., 1993). Auch das ebenfalls Calcium-bindende Protein Calretinin (Calr) (Desmadryl und Dechesne, 1992) wird in vielen der großen Bipolarzellen des VG exprimiert.

### 1.3 Vestibuläre Kerne (VN)

Das vestibuläre Kerngebiet im Hirnstamm wird bei Mensch und Säugetier hauptsächlich in vier Teile untergliedert:

Neben dem oben erwähnten SVN (Bechterew), dem LVN (Deiters), dem MVN (Schwalbe) sowie dem IVN (Roller) können noch einige akzessorische Kerne und Zellgruppen differenziert werden, wie der Nucleus interstitialis Cajal (In 8) und die Zellgruppen E,F,G, SV,X,Y und Z.

In den VN wird der größte Teil der PVA auf die folgenden sekundären vestibulären Verbindungen umgeschaltet.

Den Tractus vestibulospinalis zur Innervation der Motoneurone der Extensoren und einer entsprechenden Verbindung zum Halsmark, der sich aufteilt in den Tractus vestibulospinalis medialis aus dem MVN (Mehler und Rubertone, 1972) und den Tractus vestibulospinalis lateralis aus dem LVN (Brodal, 1981). Weiter finden sich gemeinsame motorische Fasern aller vier VN über den Fasciculus longitudinalis medialis zum Kern des Nervus oculomotorius für vestibulär auslösbare Augenbewegungen (Mehler und Rubertone, 1972).

Weiter existieren Verbindungen zu den anderen Kernen der Augenmuskelnerven, commissurale Fasern korrespondierender und nicht korrespondierender VN und innerhalb des Kernkomplexes einer Seite (Ladpli und Brodal, 1968; Mehler und Rubertone, 1972), ferner der erstmals von Ramón y Cajal (1911) und später von Brodal (1981), Mehler und Rubertone (1972) beschriebene Tractus vestibulocerebellaris, der wie Morris et al. (1988) zeigen konnten, eine der ontogenetisch ältesten cerebellären Afferenzen repräsentiert.

Des Weiteren zu nennen sind vestibulooliväre Fasern (Barmack et al., 1993), Verbindungen zur Formatio reticularis und zum Hypothalamus (Mehler und Rubertone, 1972; Precht et al., 1977), daneben vestibulothalamische Projektionen (Kevetter et al., 1982) und Verbindungen zur hinteren Zentralwindung des Cortex für eine bewusste Raumorientierung (Guldin und Grüsser, 1998).

In die VN projizieren Fasern aus der Formatio reticularis und unteren Olive (Precht et al., 1977; Mehler und Rubertone, 1972), spinovestibuläre und cerebellovestibuläre Zuflüsse, die von PC aus dem Vermis, aber auch aus dem Vestibulocerebellum und Lobus anterior stammen (Brodal, 1969; Mehler und Rubertone, 1972). Der dorsale Teil des LVN erhält neben direkten cerebellovestibulären Projektionen auch indirekte cerebellovestibuläre Zuflüsse vom gleichseitigen rostralen Nucleus cerebellaris medialis (MCN), während das sogenannte Hook'sche Bündel aus dem kontralateralen caudalen MCN zum ventralen LVN zieht (Brodal, 1969; Mehler und Rubertone, 1985).

Es existieren auch zentrifugale Fasern, die vom Hirnstamm in den Nervus vestibularis einmünden (Blanks und Palay, 1978) und als vestibuläre Efferenzen bezeichnet werden. Klinke und Galley (1974) konnten direkt an den Haarzellen vestibulär efferente Fasern nachweisen, welche die Empfindlichkeit der Rezeptoren verminderten. Die Bedeutung der vestibulären Efferenzen ist aber noch weitgehend unklar.

In der jüngeren neuroanatomischen Forschung konnten Chimento, Doshay und Ross (1994) außerdem bei Ratten zeigen, dass PVA mit Calyx-Endigungen an den Haarzellen in ihrem Anfangsverlauf retrograde Kollateralfasern abgeben, die zu den Haarzell-Synapsen zurückziehen und damit definitionsgemäß Efferenzen darstellen.

In Abgrenzung zu den oben beschriebenen vestibulären Efferenzen wurden diese Kollateralen als „efferent-type“ bezeichnet. Auch die Funktion dieser Fasern ist noch unklar.

#### 1.4 Cerebellum

Das Kleinhirn mit seiner regelmäßigen Struktur und seiner nicht unbedingt existentiellen Erforderlichkeit ist der bisher am gründlichsten erforschte Teil des zentralen Nervensystems. Trotzdem sind viele Abläufe im Kleinhirn sowie ein Reihe von Interaktionen mit dem übrigen zentralen Nervensystem noch nicht verstanden.

Anatomisch liegt das Kleinhirn in der hinteren Schädelgrube über dem vierten Ventrikel. Es ist mit dem Hirnstamm über die drei paarigen Kleinhirnstiele verbunden: der untere (Pedunculus cerebellaris inferior) mit dem verlängerten Mark, der mittlere (Pedunculus cerebellaris medius) mit der Brücke und der obere (Pedunculus cerebellaris superior) mit dem Mittelhirn. Zwischen den paarigen Hemisphären liegt der sie verbindende Vermis. Die Kleinhirn-Lappen (Lobus anterior, posterior und flocculonodularis) (siehe Abbildung Nr. 1) werden durch die Querfurchen Fissura prima und posterolateralis begrenzt, die Lobuli werden durch Gyri unterteilt. Die paarigen Kleinhirnerne (CN) liegen über dem Dach des vierten Ventrikels im Marklager des Kleinhirns. Am weitesten medial liegt jeweils der Nucleus cerebellaris medialis (MCN) (bei Primaten Nucleus fastigii) im zentralen Marklager des Vermis, nach lateral schließen sich bei Primaten die Nuclei globosi und emboliformes an, zusammenfassbar jeweils als Nucleus cerebellaris interpositus (ICN). Am weitesten lateral liegt jeweils ein Nucleus cerebellaris lateralis (LCN), bei Primaten Nucleus dentatus genannt.

Abbildung 1:

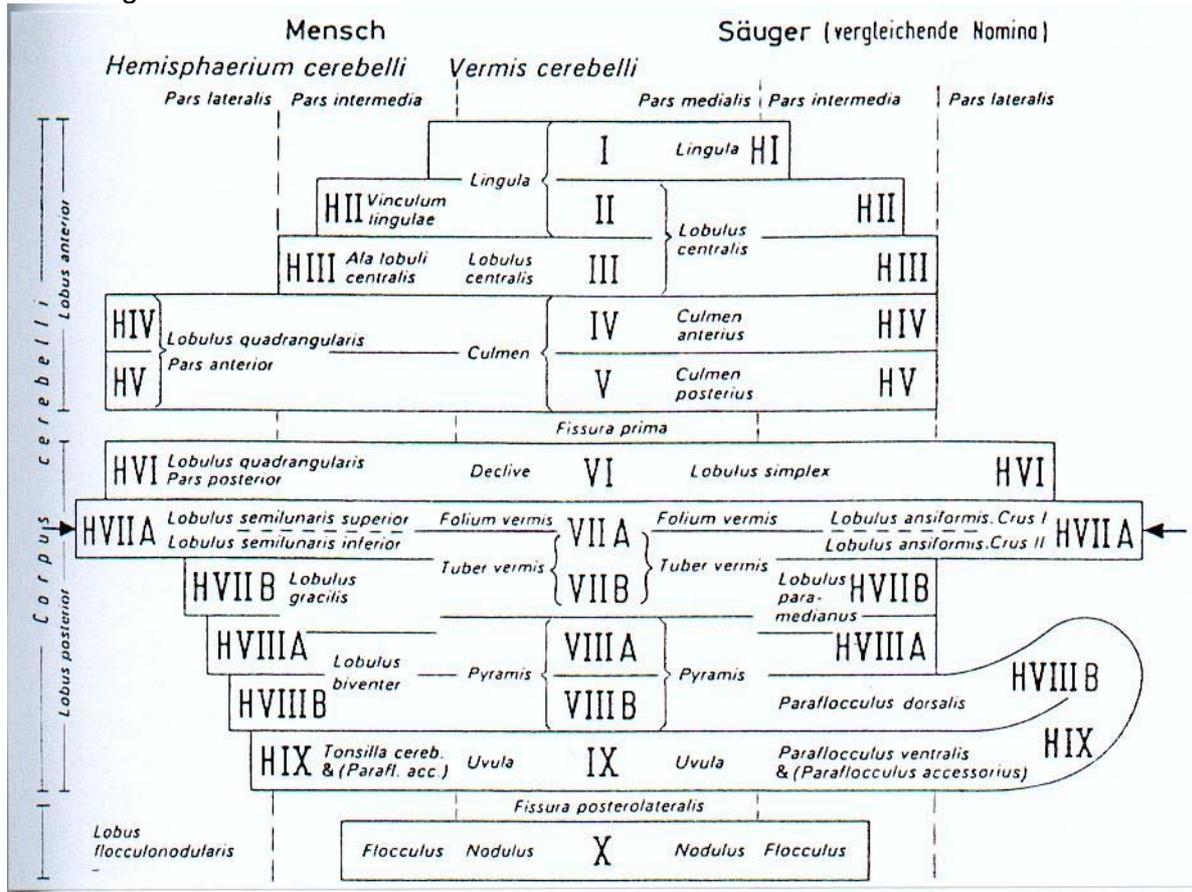


Abbildung Nr.1 :

Schematisiertes Diagramm zur Gegenüberstellung der für Mensch und Säugetier üblichen Kleinhirn-Terminologie mit der von Larsell und Jansen (1967) vorgeschlagenen Einteilung in transversale Zonen von I bis X. (Der caudale Hemivermis, also Uvula und Nodus entspricht den Zonen IX und der medialen Zone X.)

Histologisch zeigt die Kleinhirnrinde, anders als beim Großhirn, eine regelmäßige dreischichtige Zytoarchitektur:

- 1.: Die innerste, dem Marklager aufliegende Schicht ist das Stratum granulosum mit seinen Körnerzellen, Golgi- und einigen Gliazellen, auf- und absteigenden Bahnen, sowie synaptischen Kontakten von Körnerzell-Dendriten und vielen Moosfasern.
- 2.: Im Stratum gangliosum liegt eine Zell-Lage mit Zellkörpern von PC, welche den einzigen, hemmenden Ausgangskanal des Kleinhirncortex darstellen und auf die CN und VN einwirken. Zudem findet man auf- und absteigende Bahnen.
- 3.: Das äußere Stratum moleculare enthält neben den interneuronalen Korb- und Sternzellen die senkrecht zur Oberfläche liegenden Dendritenbäume der PC und Golgi-Zellen. Neben Zellkörpern und Dendriten finden sich viele Synapsen, denn jeder PC-Baum wird orthogonal von vielen Parallelfasern durchstoßen, die aus aufgezweigten Axonen der Körnerzellen bestehen und Synapsen mit den PC-Dendriten bilden.

Die PC und interneuronalen Golgi-, Korb- und Sternzellen wirken inhibitorisch mit dem Transmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Die Aktivität der Körnerzellen, Kletterfasern und Moosfasern wird dagegen exzitatorisch über Aspartat und Glutamat vermittelt.

Das Kleinhirn erhält 3 Typen von Afferenzen: Kletterfasern aus der unteren Olive, Moosfasern als autonome, spinale, pontine, retikuläre, auditorische, vestibuläre und nucleocorticale Moosfaserafferenzen, sowie noradrenerge Fasern aus dem Locus coeruleus und serotoninerge aus den Raphe-Kernen.

Die funktionelle Bedeutung des Kleinhirns war für lange Zeit unklar. Noch anfangs des 19. Jahrhunderts postulierten Gall und Sprunzheimer (1810-1819) sexuelle Funktionen aufgrund der Größe des Kleinhirns bei Bullen, gleichzeitig fanden Rolando (1809) und Flourens (1824) in cerebellär lädierten Tieren motorisch-koordinative Defizite. Sherrington benannte (1906) das Kleinhirn als Kopfganglion des propriozeptiven Systems. Um die Jahrhundertwende kam es vor allem durch Ramón y Cajal zum Beginn der systematischen neuroanatomischen Erforschung des Cerebellum. Es folgten die ersten genaueren klinisch-neurologischen Untersuchungen von Weltkriegsverwundeten mit Kleinhirnverletzungen. Mit weiteren tierexperimentellen Arbeiten bis in die Gegenwart gelang es, die Stellung und Funktionen des Kleinhirns, seine Mikroerschaltungen und Projektionen weitgehend aufzuklären und Regenerationsmöglichkeiten und neuronale Plastizität zu erforschen.

Als Hauptfunktionen des Kleinhirns gelten allgemein die Aufrechterhaltung der Körperstatik durch Gewährleistung des Gleichgewichts und des Skelettmuskeltonus, sowie die Feinmotorik durch Abstimmung der Innervation von Einzelbewegungen und Koordination zu geordneten Bewegungsabläufen.

Verschiedene Funktionsbereiche können zum Teil verschiedenen anatomischen Strukturen zugeordnet werden. So sind bei medial liegenden Läsionen besonders die Halte- und Stützmotorik gestört. Der Vermis dient dabei vorwiegend der Kontrolle von Muskeltonus und Körperhaltung, die Pars intermedia eher der Koordination von Bewegungsabläufen mit der Stützmotorik und der langsamen Zielmotorik, während der intermediär gelegene Flocculus überwiegend für den optokinetischen Nystagmus und die Koordination mit den Augenbewegungen verantwortlich ist. Bei lateralen Läsionen sind vor allem Sprache und Zielmotorik gestört, welche entwicklungsgeschichtlich jüngere Hirnfunktionen sind und im phylogenetisch jüngeren Neocerebellum der Kleinhirn-Hemisphären lokalisiert sind. Dies steht mit dem Großhirn in Verbindung und ist für die Verarbeitung und Programmierung von Bewegungen verantwortlich, in Ergänzung zu den unwillkürlichen Kontroll- und Korrekturfunktionen des medial gelegenen älteren Archi- und Paleocerebellum.

Ein vollständiges angeborenes Fehlen des Kleinhirns zeigt dennoch nur eine geringe Symptomatik, wenn die CN nicht betroffen sind (Dow und Moruzzi, 1958). Dagegen zeigen Teildefekte des Kleinhirns die typischen cerebellären Symptome wie Ataxie, Asynergie, A- und Dysdiadochokinese, Hyper- und Dysmetrie, Aktionstremor, Rebound-Phänomene, Gewichtsfehleinschätzungen, muskuläre Hypo- und Hypertonie sowie Sprechstörungen (Brodal, 1981).

Das cerebelläre Terminationsgebiet der vestibulären Afferenzen wird häufig auch als Vestibulocerebellum bezeichnet (Brodal et al., 1962; Angaut und Brodal, 1967) und spielt für die Aufrechterhaltung des Körpergleichgewichts eine große Rolle. Die Ausdehnung dieser Projektion ist umstritten, wie die Tabelle im Kapitel 1.2.2 zeigt.

## 1.5 Calbindin D-28k im Gehirn

Calb ist ein 28 kDa schweres Vitamin D<sub>3</sub>-abhängiges Calcium-bindendes Protein, das von Wassermann und Taylor (1966) in der Darmmukosa des Huhns als transepithelialer Calcium-Transporter entdeckt wurde. Neben der Schilddrüse und den Nieren findet sich Calb auch im Gehirn. Die Expression von Calb wird laut Pappas und Parnavelas (1997) durch den Einfluss von Neurotrophin-3 und Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung von GABA-ergen Neuronen gesteuert. Cerebelläre PC exprimieren Calb bereits ab dem Zeitpunkt ihrer Migration (Legrand et al., 1983; Parkes et al., 1985), also noch vor dem Auftreten ihrer physiologischen Aktivität.

Die Verteilung von Calb im Gehirn wurde von Celio (1990) folgendermaßen beschrieben. Antikörper (AK) gegen Calb binden sich an PC und große Spinal-, Retinal-, Cochleär- und Vestibulär-Ganglienzellen, an alle größeren Bahnen des limbischen Systems mit Ausnahme der Fornix und an diffus projizierende dünne unmyelinisierte Axone im Thalamus, im Nigrostriatum und im Nucleus Basalis Meynert. Calb wurde auch in Interneuronen des Rückenmarks und der Großhirnrinden-Schicht II gefunden, sowie in Ependymzellen und hypothalamischen Zentren. Die Verteilung ähnelt der des sogenannten Dihydroperidin-Subtyps der cerebralen Calcium-Kanäle, mit Ausnahme der plexiformen Außenschicht des Bulbus olfactorius.

Mit Calb läßt sich zudem ein bisher unbeschriebenes Kerngebiet im Fasciculus longitudinalis medialis der Medulla oblongata aufdecken.

Das Calretinin (Calr), ein anderes Calcium-bindendes Protein, zeigt im Vergleich mit Calb nach unseren Beobachtungen und laut persönlichen Aussagen von Kvetter (New Orleans, 1997) einen ungefähr 90%igen Überlappungsgrad in den vestibulären Zellpopulationen, obwohl in älteren Arbeiten noch von 100% ausgegangen wurde (Desmadryl und Dechesne, 1992; Raymond et al., 1993).

Der Calr-AK färbt außerdem Körnerzellen, Golgizellen, Lugaro- und unipolare Bürstenzellen (Rogers, 1989; Arai et al., 1991; Braak und Braak, 1993; Abbott und Jakobowitz, 1995). Auch Moosfasern nicht vestibulären Ursprungs und Kletterfasern scheinen Calr-positiv zu sein (Arai et al., 1991; Yan und Garey, 1996; Résibois und Rogers, 1992).

Die Funktion der Calcium-bindenden Proteine ist zur Zeit noch nicht sicher geklärt.

Es konnte gezeigt werden, dass einige Calcium bindende Proteine in vivo und in vitro eine durch Aktivität oder experimentell erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration effektiv senken können. Dadurch üben diese Proteine einen Einfluss auf die Entladungsraten der entsprechenden Neurone aus und können einen exzitotoxischen Calcium-Overload verhindern. Viele neurodegenerative Prozesse wie beispielsweise die präsenile Alzheimer-Demenz (Nucleus basalis Meynert, dorsale Raphé-Kerne und Pyramidenzellen vor allem der temporalen Großhirnrinde und des Hippocampus), die Epilepsie oder der Morbus Parkinson (Substantia nigra) und die Chorea Huntington major (Substantia nigra und Nigrostriatum) sind durch exzitotoxische Zelluntergänge gekennzeichnet, die aber in einigen Fällen Neurone mit hohem Gehalt an Calcium-bindenden Proteinen ausnehmen. Ihnen wird aus diesem Grund ein gewisser neuroprotektiver Effekt zugeschrieben.

So konnten Mattson et al. (1995) nachweisen, dass Calb in den Astrocyten des Corpus callosum und in der Weißen Substanz exprimiert wird, wenn die Zytokine Tumornekrosefaktor alpha und beta freigesetzt werden, wie dies bei einigen Hirnerkrankungen oder typischerweise bei Hirntraumata der Fall ist. Die Calb-reichen Astrocyten zeigten danach eine erhöhte Resistenz gegen Azidose und toxischen Calcium-Overload.

Celio (1990) und Sloviter et al. (1991) konnten zeigen, dass Calcium-Spikes generierende Neurone, wie cerebelläre PC, weniger anfällig sind für unkontrollierte Exzitationen, wie sie beispielsweise bei der Epilepsie auftreten.

Darüberhinaus wird den Calcium-bindenden Proteinen eine Funktion bei der embryonalen Entwicklungssteuerung und Ausdifferenzierung der Nervenbahnen zugeschrieben. So soll das Calcium-bindende Protein Parvalbumin eine Differenzierung von embryonalen Stammzellen in Richtung bipolarer Neurone bewirken, während Calb und Calr eher eine Differenzierung zu multipolaren Neuronen induzieren (Arnhold et al. 2000).

## 1.6 Problembeschreibung, Fragestellung und Zielsetzung

Wie unter 1.2.2 gezeigt wurde, gibt es zum Teil auch innerhalb einer Spezies widersprüchliche Aussagen über den Verlauf und die Termination der PVA.

Fernández et al. (1988,1990,1995), Goldberg et al. (1990) und Brichta und Peterson (1994) hatten entdeckt, dass die vestibulären Ganglienzellen in solche mit einem relativ regelmäßigen und tonischen und andererseits mit einem unregelmäßigen und phasischen Entladungsmuster differenzierbar sind und dass eine Korrelation zur Größe der Perikarya im VG und zum peripheren Innervationstyp der Haarzellen besteht.

Die großen Bipolar-Neurone des VG innervieren Haarzellen an den Spitzen der Cristae und an den Striolae der Maculae ausschließlich über Calyx-Endigungen. Charakteristisch für diese Afferenzen großen Durchmessers ist ein spontan unregelmäßiges und hauptsächlich phasisches Entladungsmuster als Antwort auf natürliche vestibuläre Stimulation, also Kopf- oder Körperbewegungen.

Desmadryl und Dechesne (1992), Demêmes et al. (1992), Raymond et al. (1993) und Bäurle et al. (1997b) konnten zeigen, dass circa 16% aller Bipolar-Neurone der VG-Zellen immuno-reaktiv für Calb sind.

Da fast ausschließlich große Bipolarzellen Calb-positiv sind, lässt sich mit Hilfe der Calb-Immuncytochemie die Gruppe der irregulär phasischen PVA relativ selektiv darstellen.

Diese können auch mit einem AK gegen das Calcium-bindende Protein Calr selektiv dargestellt werden, weil beide Populationen nahezu identisch sind. Da allerdings auch andere Kleinhirn-Zellen Calr-positiv sind (Rogers 1989), eignet sich Calb bedeutend besser, um ausschließlich PVA zu exponieren.

Für die Identifizierung des vollständigen Verlaufs und der Termination Calb-positiver PVA in den VN und CN sowie im Kleinhirncortex sind aber die ebenfalls Calb-positiven cerebellären PC zusammen mit ihren überlappenden Projektionsfeldern in Hirnstamm und Kleinhirn als großer Störfaktor anzusehen, so dass die PVA weder mit Hilfe der Calb- noch mittels Calr-Immuncytochemie selektiv dargestellt werden können.

Für die Calr-Färbung hatten Kevetter und Leonard (1997) zahlreiche störende, ebenfalls Calr-positiven Kleinhirn-Zellen (siehe 1.5) durch initiale Cerebellectomie ausgeschaltet, aber dadurch auch die cerebellären Projektionsorte der PVA mitentfernt. Außerdem wurde durch diesen Eingriff eine Kollaterale der PVA zu den VN durchtrennt, mit Inkaufnahme einer retrograden Degeneration von PVA.

Der experimentelle Ansatz dieser Arbeit löst das Problem, indem eine Calb-Immuncytochemie an den PC defizitären mutanten Mäusen *pcd* und *Lc* durchgeführt wurde.

Bei diesen Mutanten sollten die gesamten Calb-positiven PVA einer Seite durch eine isolierte Läsion aller unilateralen PVA mit nachfolgender anterograder Degeneration auf der geschädigten Seite vollständig eliminiert werden, um zu beweisen, dass die verbleibenden immuncytochemisch gefärbten Zellen und Fasern der nicht lädierten Seite ausschließlich PVA sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck eine transauriculäre einseitige Durchtrennung des N. VIII vorgenommen, um nach einseitigem PVA-Verlust die eventuelle Präsenz weiterer ipsilateral verbliebener Calb-positiver Fasern ausschließen zu können.

Im Falle eines einseitigen Verlusts aller Calb-positiven Fasern und PVA zeigt der Links-Rechts-Vergleich dann auf der intakten Gegenseite die isolierte Darstellung des kompletten Verlaufs der Calb-positiven PVA einer Seite (Bäurle et al., 1998b,1998c). Der Vergleich bietet darüberhinaus die Möglichkeit, alle kontralateralen Fasern und Terminalien der Calb-positiven PVA sicher aufdecken zu können.

Versuchsziel war also die vollständige Darstellung einer immuncytochemisch, morphologisch-anatomisch und physiologisch charakteristischen PVA-Subpopulation mit möglicherweise eigener Funktion.

## 1.7 Auswahl der Versuchstiere

Zur Darstellung wurden mutante Mäuse ausgewählt, bei denen der Gendefekt die sonst vorliegende Anfärbung der ebenfalls Calb-positiven PC und deren Fasern ausschaltet, so dass alle verbleibenden Calb-positiven Zellen und Fasern isoliert betrachtet werden können.

Weitere Voraussetzung war ein ausreichendes Alter, in welchem die Mutation ihre volle Auswirkung zeigt und andererseits die nötige Anästhesie und Operation leichter verkraftet werden.

Ausschlusskriterien waren ein zu fortgeschrittenes Alter, ein reduzierter Allgemein- oder Ernährungszustand, Hypodynamie oder andere Symptome offensichtlicher Erkrankungen wie Tumoren, starke Verlausung oder Erkrankungen des Ohres, wie ein verlegter Gehörgang, eine Trommelfellperforation oder eine Sklerosierung der Mittelohrknochen.