

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Labormäuse mit der homozygot autosomal rezessiv vererbten Mutation *purkinje cell degeneration (pcd/pcd)* und die Wildtypen des gleichen Stammes (*C57BL/6J*).

Die *pcd*-Mutation führt zwischen dem 15. und 30. postnatalen Tag (Mullen et al., 1976) neben Veränderungen in der Retina, dem Thalamus und dem Bulbus olfactorius zu einer De-generation von fast 99% aller PC im Kleinhirn nach vorausgegangener normaler Entwicklung (Mullen et al., 1976; Landis und Mullen, 1978; Roffler-Tarlov et al., 1979; Wassef et al., 1986). Im adulten Kleinhirn von *pcd*-Mutanten sind mithilfe von Calb-bindenden AK nur noch vereinzelt PC und ihre Fasern zu finden (vergleiche Abbildungen Nr. 2a+b).

Als zweite PC deprivierte Mutante nutzten wir die *Lurcher*-Mutante (*Lc/+*) mit dem Wildtyp-Stamm B6CBA und autosomal semi-dominantem Erbgang (Philips, 1960). Diese Mutation bewirkt eine ab dem 4. postnatalen Tag einsetzende Degeneration der PC (Caddy und Biscoe, 1976; Swisher und Wilson, 1977), die bis zum 90. Tag nach Geburt abgeschlossen ist (Bäurle und Grüsser-Cornehls, 1994; Bäurle et al., 1998a).

Die *Lurcher*-Mutante zeigt im Vergleich zur *pcd* eine ausgeprägtere Atrophie der cerebellären Körnerschicht (Swisher und Wilson, 1977; Wetts und Herrup, 1982) und des Kleinhirns insgesamt.

Abbildung 2:

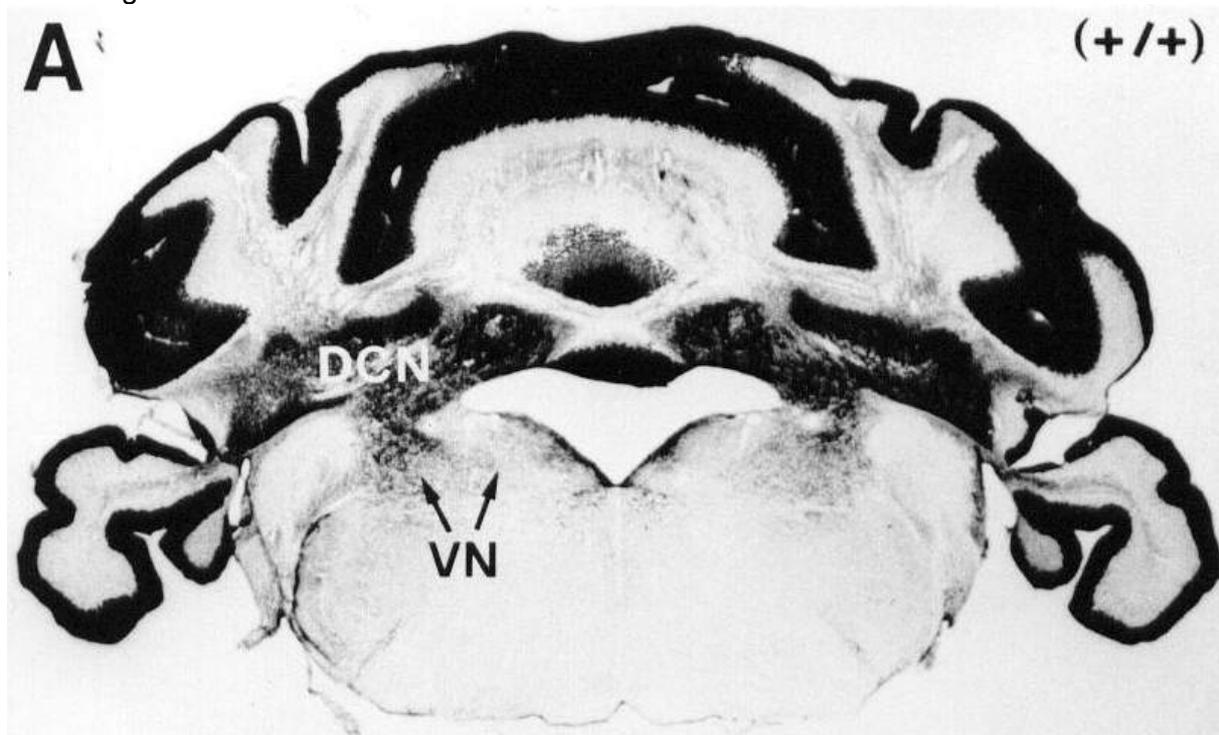


Abbildung Nr. 2a :
Calb-immunofärbte Schnitte (50 µm dick) einer adulten Wildtyp-Maus (A)

Abbildung 2:

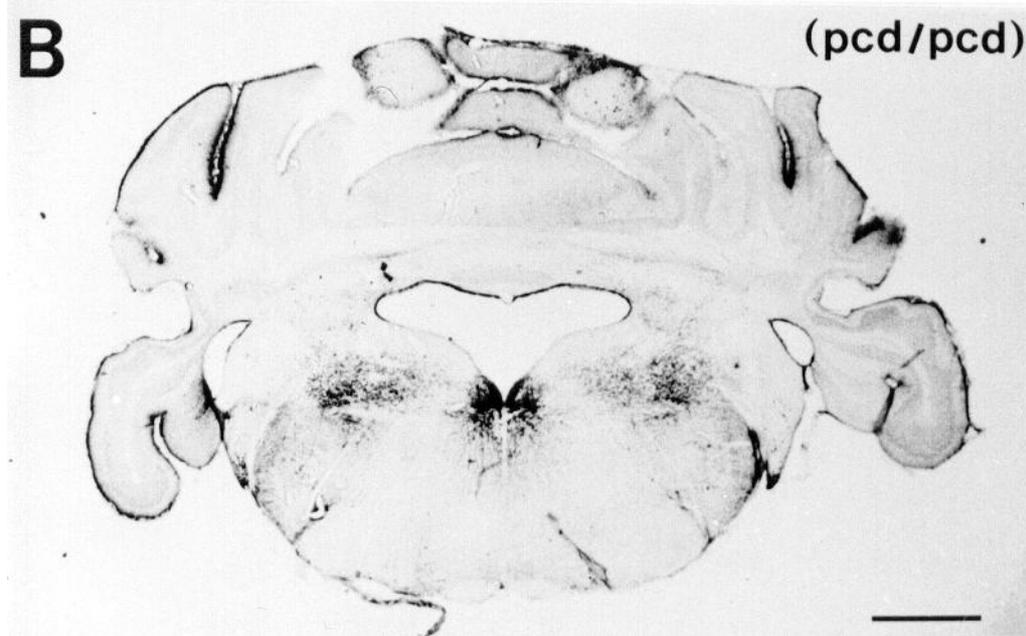


Abbildung Nr. 2b :

Calb-immungefärbte Schnitte (50 µm dick) einer adulten *pcd*-Mutante (B) im Vergleich zur vorhergehenden Abbildung Nr. 2a einer adulten Wildtyp-Maus (A).

Die Degeneration der PC führt in der *pcd*-Maus zu einem massiven Verlust von Calb-Immunreaktivität im Kleinhirncortex und in den CN und VN. Calb-positive Fasern in diesen Arealen sind nur noch vereinzelt vorhanden und stammen von anderen Quellen als den PC.

Maßstab in A und B: 1000 µm.

Ursprünglich stammten die Zuchtpaare aus den Jackson Laboratories aus Bar Harbour, ME, USA. Die 7-11,5 Monate alten adulten Versuchstiere waren Eigenzüchtungen aus dem Versuchstierstall des Instituts für Physiologie der FU Berlin, sie wurden bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten täglich Frischwasser und Obst, Gemüse, Getreide und Babynahrung.

Zuerst wurden 6 Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57BL/6J im Alter von 8-8,5 Monaten in je 1,5-6 Stunden vestibulotomiert, wobei eine Maus starb. Nach 3-5 Wochen wurden 3 Mäuse perfundiert und die gewonnenen Schnitte immunocytochemisch aufgearbeitet.

Dann wurden in je 1-3,5 Stunden 33 ebenfalls mittelalte *pcd*-Mutanten (7-11,5 Monate) und 14 *Lurcher*-Mutanten vestibulotomiert, wobei 18 *pcd*- und 8 *Lurcher*-Mutanten intraoperativ und zum Teil bis 10 Tage postoperativ starben.

Bei den überlebenden Mäusen war in 4 Operationen die Cochlearrückwand verletzt worden, 7 mal kam es nach der Operation zu Wundinfektionen, die in Äther-Kurzarkose revidiert und saniert wurden. In den ersten 3 Wochen wurden 2-3 mal insgesamt 1 ml Ringer-Lösung pro Tag intraperitoneal (i.p.) gespritzt, in den ersten 2-10 Tagen zusätzlich mit Acetylsalicylsäure (Ratiopharm) (pH 6.9 – 7.3) und/oder Ibuprophen (Klinge).

2 Wildtypen, 5 *pcd*- und 2 *Lurcher*-Mäuse wurden im Rahmen der mikroskopischen Kontrollen als komplett lädiert befundet; alle vestibulären Fasern waren einseitig total eradiziert. Auch die immunocytochemischen Färbungen waren qualitativ hochwertig.

2.2 Operationen

Operiert wurde nach der im folgenden beschriebenen Methode. Zur Dokumentation wurde fo-tografiert mit Hilfe einer auf das Binokular-Mikroskop aufgesetzten Kamera und einer Spezialkamera für vergrößerte Nahaufnahmen einiger Gehirnpräparate (siehe Abbildung Nr. 8).

2.2.1 OP-Ziel und -Forderungen

Eine erfolgreiche Operation sollte an 6 Wildtypen, 6 *pcd*- und 3 *Lurcher*-Mutanten mittleren Alters durchgeführt werden. Nach einer selektiven Vestibulotomie proximal des VG sollten die Versuchstiere über ein 3- bis 4-wöchiges Intervall gepflegt werden, um genügend Zeit für eine anterograde Degeneration der Nervenfasern bis in die Kleinhirnterminalien zu gewährleisten (Mullen et al., 1976; Caddy und Biscoe, 1976).

Der ideale Zugangsweg sollte dabei folgenden Forderungen gerecht werden:

- kurze Operationsdauer mit geringstmöglicher vitaler Bedrohung
- geringe Blutverluste mit geringster Traumatisierung und geringe Operations-Tiefe
- ausreichend breiter Operations-Kanal für Instrumente, gute Sicht und eine zuverlässige Beurteilung der gesetzten Läsion.

2.2.2 Anatomie

Weil kaum geeignete veterinäranatomische Darstellungen von Maus oder Ratte verfügbar waren, wurden anatomische Skizzen angefertigt (siehe Abbildung Nr. 3). Dazu wurden drei Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J) nach Injektion einer lethalen Dosis von 0,3 ml (entsprechend 10 ml/kg) einer 17,5%-igen Chloralhydrat-Lösung und Perfusion mit PO_4 -Puffer-Waschlösung und Paraformaldehyd-Fixans so präpariert, dass anatomische Darstellungen über die Beziehungen der peripheren vestibulären Strukturen zueinander und zur Umgebung möglich wurden, besonders hinsichtlich der Größenverhältnisse und der Gefäßsituation beim intraoperativen Vorpräparieren auf die Zielstruktur.

Abbildung 3:

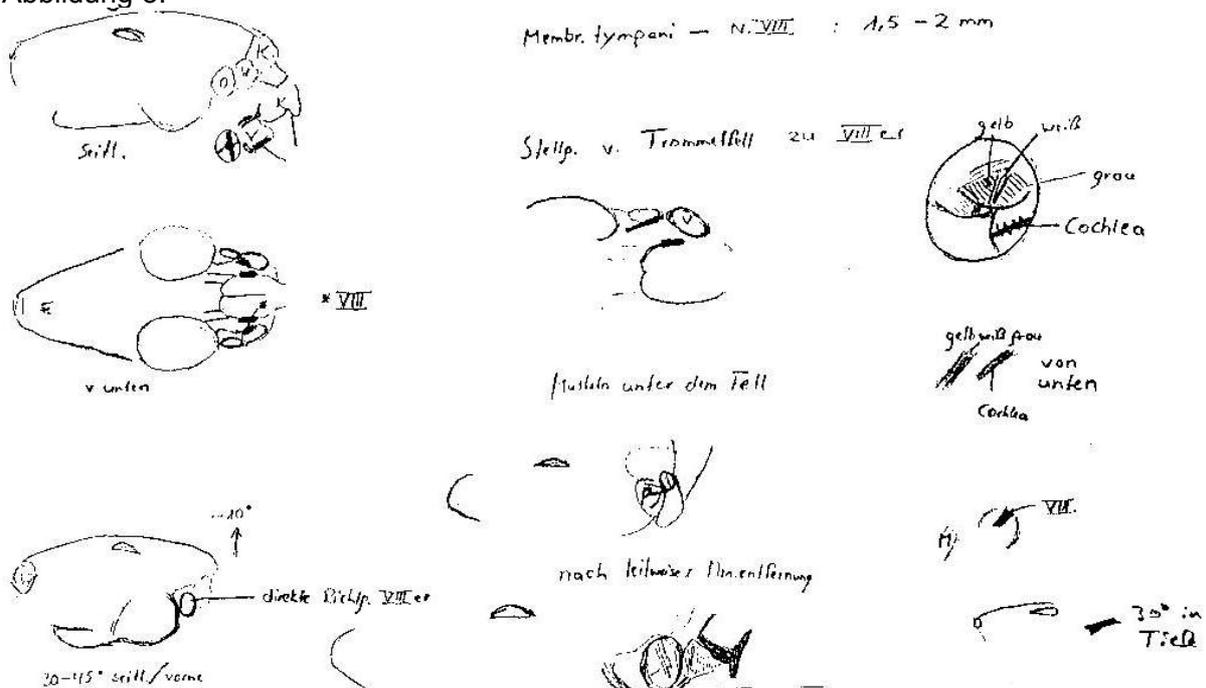


Abbildung Nr. 3 :
Anatomische Übersichts-Skizzen (ohne Legende)

2.2.3 Wahl des Zugangswegs

Mit Hilfe der anatomischen Skizzen und der ihnen zugrundeliegenden Präparate wurde als vielversprechendster Weg ein operativer Zugang über das Ohr bis zur Basis der Cochlea gewählt, also ein transauriculärer, schneller und relativ unblutiger Weg durch einen größtenteils pneumatisierten, relativ breiten Operationskanal mit einer Zielstruktur-Tiefe von ungefähr 4 mm. Eine Läsion des Gehörapparates war dabei unvermeidbar.

2.2.4 Intraoperative Hilfs-Modelle

Um die Operationssicherheit zu erhöhen und die Operationsdauer zu verkürzen, also die Gefährdung und Belastung für das Versuchstier zu verringern, wurden zwei fixierte Wildtyp-Mäuse bis zu genau dem Operations-Schritt vorpräpariert, der die erste größere Hürde darstellte, nämlich den Wechsel der Präparationsrichtung nach Exzision der Gehörknöchelchenkette. Die Modell-Präparate wurden dazu verwendet, sich die jeweilige Situation parallel zu vergegenwärtigen und auch, um zur Schonung des Versuchstieres die nachfolgenden Handgriffe und Operationsschritte am Modell ausprobieren zu können.

2.2.5 Anästhesie

Die Wahl des Operations-Anästhetikums gestaltete sich unerwartet schwierig, weil die Versuchstiere sehr dosissensibel reagierten und Nachdosierungen die benötigte Analgesiedauer bis zu sechs Stunden noch risikoreicher machten. Einige Äther-Narkosen waren erfolglos, weil die sehr kurzen Nachdosierungsintervalle und die Ätherdämpfe den Operateur behinderten und die wegen Nebenwirkungen adjuvant erforderlichen schwankenden Acetylcholin-Dosen nicht appliziert werden konnten. Obwohl in länger zurückliegenden Voruntersuchungen aus Dosierungsgründen eher für ungeeignet befunden, fiel die Wahl auf das auch bei anderen Nagern erfolgreich eingesetzte Na-Phenobarbital (Roche), weil dieses als Barbiturat die Stoffwechsel-Aktivität so stark reduzieren kann, dass mit einer initialen Volldosis eine Operationsdauer bis zu 6 Stunden ohne Nachdosierung möglich war. Initial bekam die Maus je nach Gewicht 0,2-0,4 ml Ringer-Lösung mit 50 mg/kg Na-Phenobarbital i.p. injiziert, nach 25 min je nach analgetischem Bedarf 0,05-0,1 ml in 10-minütigem Abstand zur Aufdosierung. In den meisten Fällen konnte die Operation nach 45-60 min beginnen.

Um durch einen Trainingseffekt die entscheidenden Operationen zu verkürzen, wurden die robusteren Wildtyp-Mäuse zuerst operiert.

Bei intraoperativer Absenkung der Atemfrequenz unter ca. 30 Züge/min wurden die Mäuse zur Kreislaufaktivierung auf einem bereitstehenden Heiztisch vorsichtig gewärmt, teilweise auch direkt auf dem Heiztisch operiert. Nur in kritischen Phasen, v.a. postoperativ wurde das in der Veterinärmedizin gebräuchliche zentrale Atemstimulans Respirot[®] (Schering) eingesetzt und atemstimulierende Streichbewegungen am Bauch durchgeführt. Bei drohendem Atemstillstand wurden schnelle Brustkorbkompressionen mit Daumen und Zeigefinger vorgenommen. Bei schwierigen Reanimationen konnten präfinal praktizierte rotierende Schleuderbewegungen die Kreislaufsituation nur in Ausnahmefällen längerfristig verbessern.

Durch Höherlagerung des Kopfes wurde die Blutungsneigung leicht gesenkt und ein Kontakt des Auges mit der Zellstoffunterlage vermieden.

Um ein Austrocknen der Corneae und eine Makulaverblutung zu vermeiden, wurde eine abgedunkelte Paraffin-Okklusionsfolie über das der Lichtquelle zugewandte Auge gelegt, während das abgewandte Auge mit einem ölgetränkten Pinsel benetzt wurde.

Zur Infektophylaxe wurden die Instrumente bei längeren Eingriffen intraoperativ mit 70%iger Ethanollösung desinfiziert.

2.2.6 Chirurgie

Nach Erreichen der Analgesie wurden mit einer Spitzpinzette fast alle retroaurikulären Haare auf der routinereichernd stets linken Seite in Büscheln ausgezupft. Dann wurde nach Desinfektion mit Betaisodona® und 70%iger Ethanollösung ein Hautschnitt mit einer geraden Augenschere von der hinteren Tasthaarregion senkrecht über den proximalen knorpeligen äußeren Gehörgang bis in die laterale Nackenregion geführt. Mit einer stumpfen Spitzpinzette wurden in den nächsten 20-30 min die oberflächigen Hals- und Nackenmuskeln präpariert und durch Elektrokautern wenige lokale Gefäße koagulierte, bis der Übergang vom knorpeligen zum knöchernen äußeren Gehörgang freipräpariert war. Dieser wurde mit einem kleinen Scheren-Schnitt nahe der Knochenkante eröffnet und ein tief geschnittener Knorpelkeil derart entfernt, daß eine direkte Sicht auf das Trommelfell gegeben war. Das Tympanon wurde entfernt und das Mittelohr bis auf den Steigbügel ausgeräumt, denn die relativ großkalibrige Arteria labyrinthi (siehe folgende Abbildung Nr. 4) zieht direkt durch den Steigbügel und lässt sich fast nicht von der Cochlea-Wand lösen.

Abbildung 4:



Abbildung Nr. 4 :
Aufsicht auf das Innenohr und die Arteria labyrinthi

Um den neurochirurgischen Eingriff möglichst nahe am Eintritt des Nerven in die Medulla oblongata und auch unter Sichtkontrolle zu gewährleisten, musste die Arteria labyrinthi entfernt werden, ohne das Versuchstier zu gefährden.

Aus diesem Grund wurde das Gefäß durch Elektrokoagulation vorsichtig auf der Cochleabasis denaturiert und verschlossen.

Da das Gefäß noch bis zu 1 mm entfernt vom Kontaktpunkt fortleitend koagulierte wurde, ließen sich größere Blutverluste bei Eröffnung der Cochlea vermeiden. Zur Sicherheit wurden zwei weitere Gefäßpunkte koaguliert, einer im Stapes, in dessen Fußpunkt die Cochlea danach über eine gebogene Punktionsnadel oder Spitzpinzette aufgehebelt werden konnte.

Die äußere Cochleawand wurde dann in größeren Knochenlamellen abgetragen, so dass der Modiolus (Schneckenspirale) als Leitstruktur für den N.VIII in ganzer Länge sichtbar wurde (siehe folgende Abbildung Nr. 5). Die umgebende niedriger visköse Endolymphe wurde mit einem Aquarellpinsel aufgenommen, um adhäsions- und lichtbrechungsbedingte Artefakte zu verringern.

Abbildung 5:

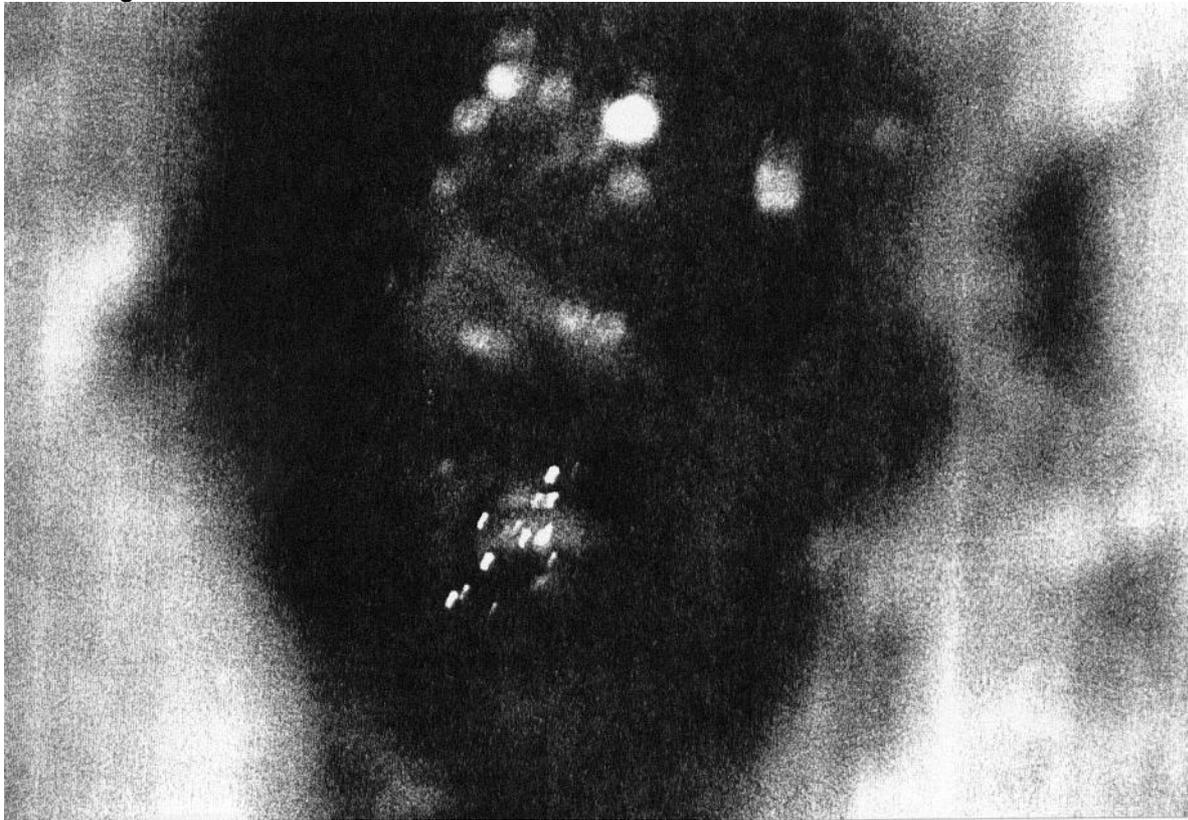


Abbildung Nr. 5 :
Ansicht des Modiolus in der lateral aufgebrochenen Cochlea

Die knöcherne Spirale wurde dann bis zur Schneckenbasis abgebröckelt, so dass noch ein kleiner Knochenkranz den Nerven in der Schneckenbasis fixierte und vom Hirnstamm abstehen ließ. Auf der Höhe dieses cochleären Knochenkranzes wurde der N.VIII mit seinem cochleären und VG abgetrennt, wodurch sich ein weiteres Problem ergab.

Die erforderliche Läsion aller VG-Zellsomata war nach Auswertung der ersten Operationen bei den mutanten Mäusen im Hinblick auf ein totales Fehlen jeglicher in den Hirnstamm eintretende Calb-positiven PVA nicht komplett, so dass der Nerv noch dichter am Hirnstamm durchtrennt werden musste, ohne letzteren direkt oder indirekt zu schädigen, also auch ohne die dünne, mediale Cochleawand zu zerstören.

Hierzu waren die verwendeten ophthalmologischen Scheren, Spitz-Pinzetten und Punktionsnadeln ungeeignet.

Deshalb wurde die folgende Methode zum Absaugen von Gehirngewebe entwickelt.

Mit einer modifizierten Saugvorrichtung aus einem Gummischlauch mit Zellulosefilter und einer Glaspipette (siehe folgende Abbildung Nr. 6), die vorher über einer Bunsenbrennerflamme zu einer Kapillare spitz ausgezogen wurde, konnte der Nervenstumpf gewissermaßen zerpfückt werden.

Abbildung 6:

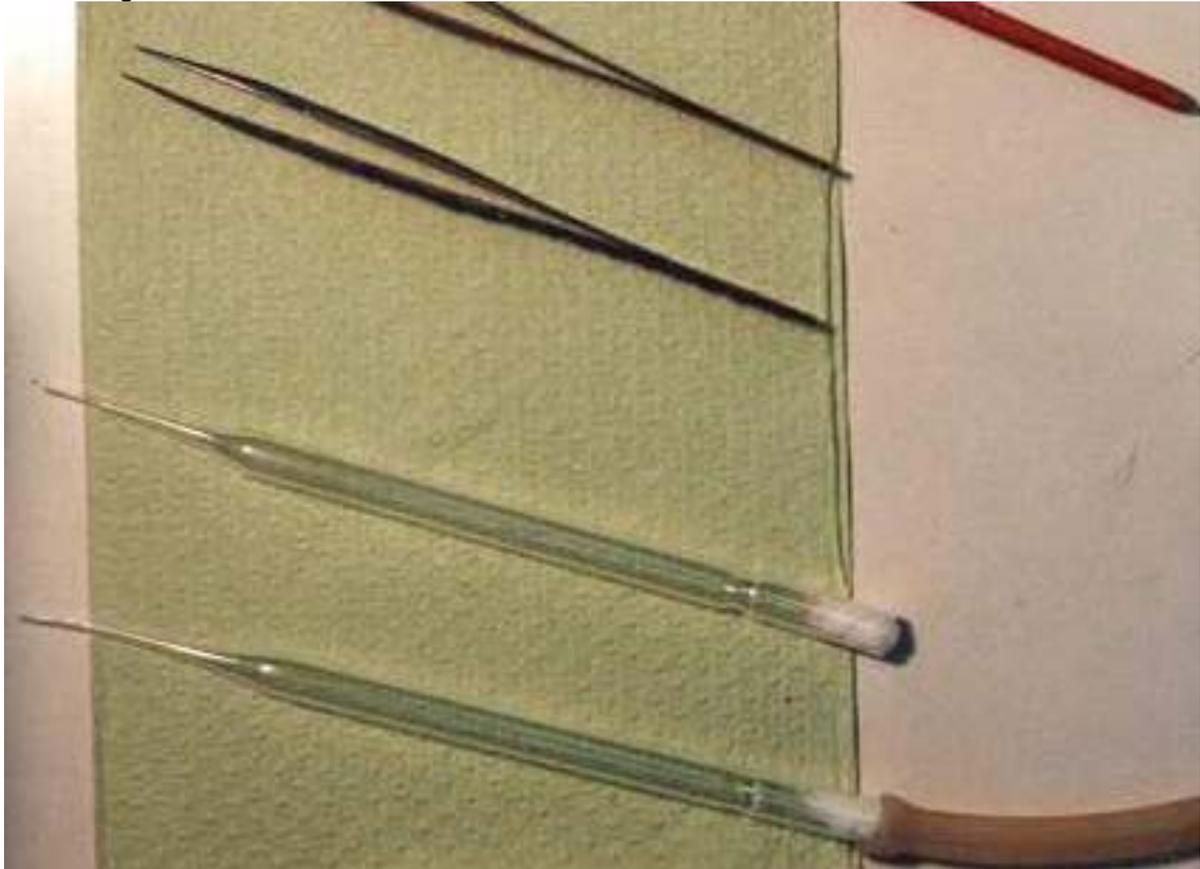


Abbildung Nr. 6 :
Ausgezogene Glaspipetten zum Absaugen von Nervengewebe

Es gelang auch mehrmals, den Nervenstumpf in die Kapillare hineinzusaugen, den proximalen Teil unter Zug über 1-2 min auszutrocknen und dann an der Kante der Glaskapillare unter stärkerem Zug abzureißen (siehe folgende Abbildung Nr. 7).

Abbildung 7:

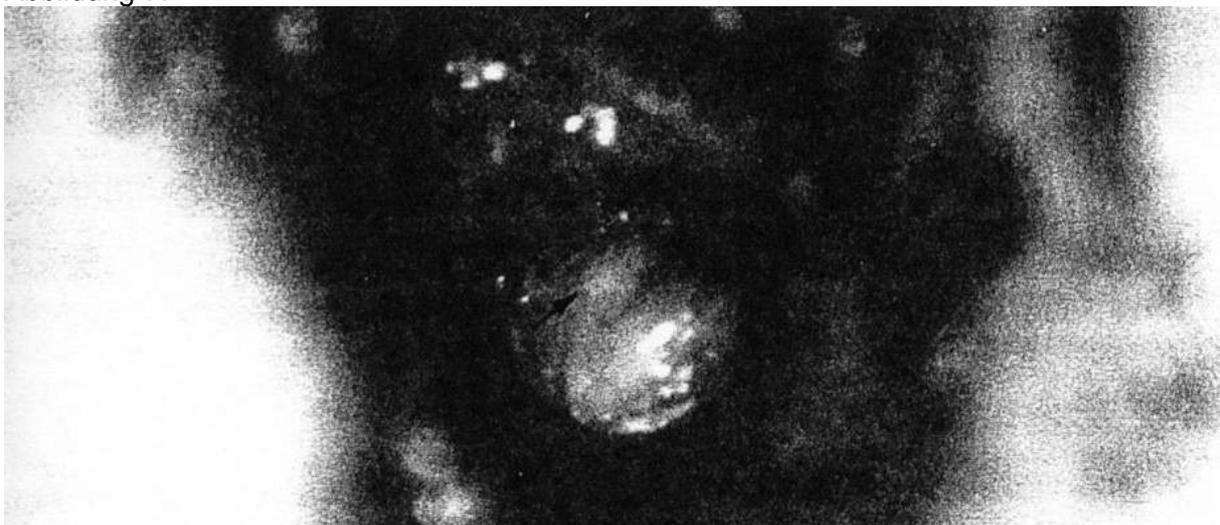


Abbildung Nr. 7 :
Abgetrennte Nervenstumpf-Basis, im OP-Kanal oben (Pfeil)

Am Ende wurde Betaisodona[®] oder ein Aminoglykosid-Antibiotikum-Puder in die Wundhöhle gebracht und abschließend die muskulären und kutanen Wundränder mit dem Fibrinkleber Histoacryl[®] (Braun) adaptiert.

2.2.7 Postoperative Pflege

Um die Wundheilung nicht zu erschweren, wurden unmittelbar postoperativ an den Klauen der operierten Seite die Krallen geschnitten.

Die Tiere wurden in einem ausgepolsterten Glasgefäß unter einer Lampe mit ca. 37°C erwärmt und nach den ersten Bewegungen mit 0,3 ml (entsprechend 10 ml/kg) einer pH-neutralisierten Acetylsalicyl-Lösung i.p. analgesiert, mit weiteren 0,2 ml (entsprechend 6,7 ml/kg) nach 2 Stunden.

Durch die Konzeption eines „Sozialkäfigs“ ließ sich besonders bei den Mutantenmäusen die kritische Phase der Intensivpflege verkürzen, nämlich dadurch, dass fremde, noch relativ unbeholfene, aber neugierige Jungmäuse die Atemaktivität der frisch operierten Versuchstiere auffallend steigerten, wenn diese im Anschluss an die Operation wieder in ihren somit erweiterten Stammkäfig zurückgesetzt wurden.

In den ersten Tagen betrug die intraperitoneal injizierte Flüssigkeitsmenge 1-1,5 ml NaCl pro Tag und wurde mit zunehmender Eigenständigkeit der Tiere verringert. Gefüttert wurde zur Prävention des postoperativen Disstress-Syndroms erst ab dem zweiten postoperativen Tag mit flüssigem Babybrei und Banane.

Anfangs wurde bei einigen Mäusen das anabole Steroid Primobolan[®] (Schering) hochdosiert zugefüttert, was aber keinen positiven Effekt zeigte und dann abgesetzt wurde.

2.3 Materialgewinnung

2.3.1 Narkose

Nach 1-3 Wochen Überlebenszeit wurde den Versuchstieren eine lethale Dosis von 0,3 ml (entsprechend 10 ml/kg) 17,5% Chloralhydrat (Merck, Darmstadt) i.p. injiziert, so dass nach 3-5 min in fortgeschrittener Analgesie mit der Präparation und intravitalem Perfusion begonnen werden konnte, um noch vor einer Thrombenbildung durch Herzstillstand eine homogene Fixation des Gehirns zu erreichen.

2.3.2 Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden mit 4 eigens dazu angefertigten Metallbügeln auf einer Wachsplatte in Rückenlage festgesteckt. Vom Bauchfell aus wurde ein langer Medianschnitt bis zum Hals geführt und das Fell stumpf zur Seite gedrängt. Der Thorax wurde durch zwei V-förmige, weite Rippenserienschnitte eröffnet, aufgeklappt und die Vorderwand abgetrennt. Unter einem Binokular-Mikroskop (Zeiss; Objektive 1,6-fach, Okulare 12,5-fach) wurden danach 0,1 ml (entsprechend 3,3 ml/kg) Heparin-Natrium (Braun) (500 IE) und 0,3 ml (entsprechend 10 ml/kg) Na-Nitrit (Merck) (1%ig) langsam in den linken Ventrikel injiziert. Durch die Einstichstelle wurde dann die Perfusionskanüle mit der Spitze in den linken Ventrikel gelegt.

2.3.3 Perfusion

Nachdem das rechte Herzohr abgeschnitten wurde, konnten mittels Perfusor (B. Braun, Melsungen; Typ 871162) etwa 20-30 ml einer ca. 35°C warmen 0,9%igen NaCl-Lösung in 0,067 M Phosphatpuffer bei pH 7,4 auf Stufe 9 (50 ml/min bei mittlerem Perfusionsdruck von 25 mmHg) perfundiert werden, so dass fast die gesamte Blutmenge von 2-3 ml über den

rechten Vorhof ausgewaschen wurde. Bei schleppender Auswaschung wurde die Perfusionskanüle bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Dann wurde das Versuchstier mittels 150 ml der gekühlten Fixierlösung aus 3% Saccharose und 4% Paraformaldehyd in PO_4 -Pufferlösung bei einem mittleren Perfusionsdruck von 30-35 mmHg innerhalb von 15 min transkardial perfundiert. Um die Perfusion der Karotisarterien zu verbessern, wurde die Aorta descendens distal vom Isthmus aortae abgeklemmt, was im fixierten Gewebe zu einer erhöhten Festigkeit und damit besseren Schneidbarkeit führte.

2.3.4 Präparation und Entnahme von Gehirn und Ganglion vestibuli (VG)

Nach Dekapitation des Versuchstiers wurde die Schädelkalotte in Knochenfragmenten entfernt. Die Entnahme des Gehirns erfolgte dann nach Abtragung des Felsenbeins unter vorsichtiger Mitnahme der 1 mm großen Paraflocculi, sowie des viel kleineren und äußerst fragilen VG auf der nicht operierten Seite (siehe folgende Abbildung Nr. 8). Danach wurden die gekühlt aufbewahrten Gehirnpräparate koronal durchgeschnitten, mit der rostralen Schnittfläche auf einen Metallblock geklebt und in circa 45°C warmes Gelee aus Agar agar (Fluka) eingebettet.

Abbildung 8:

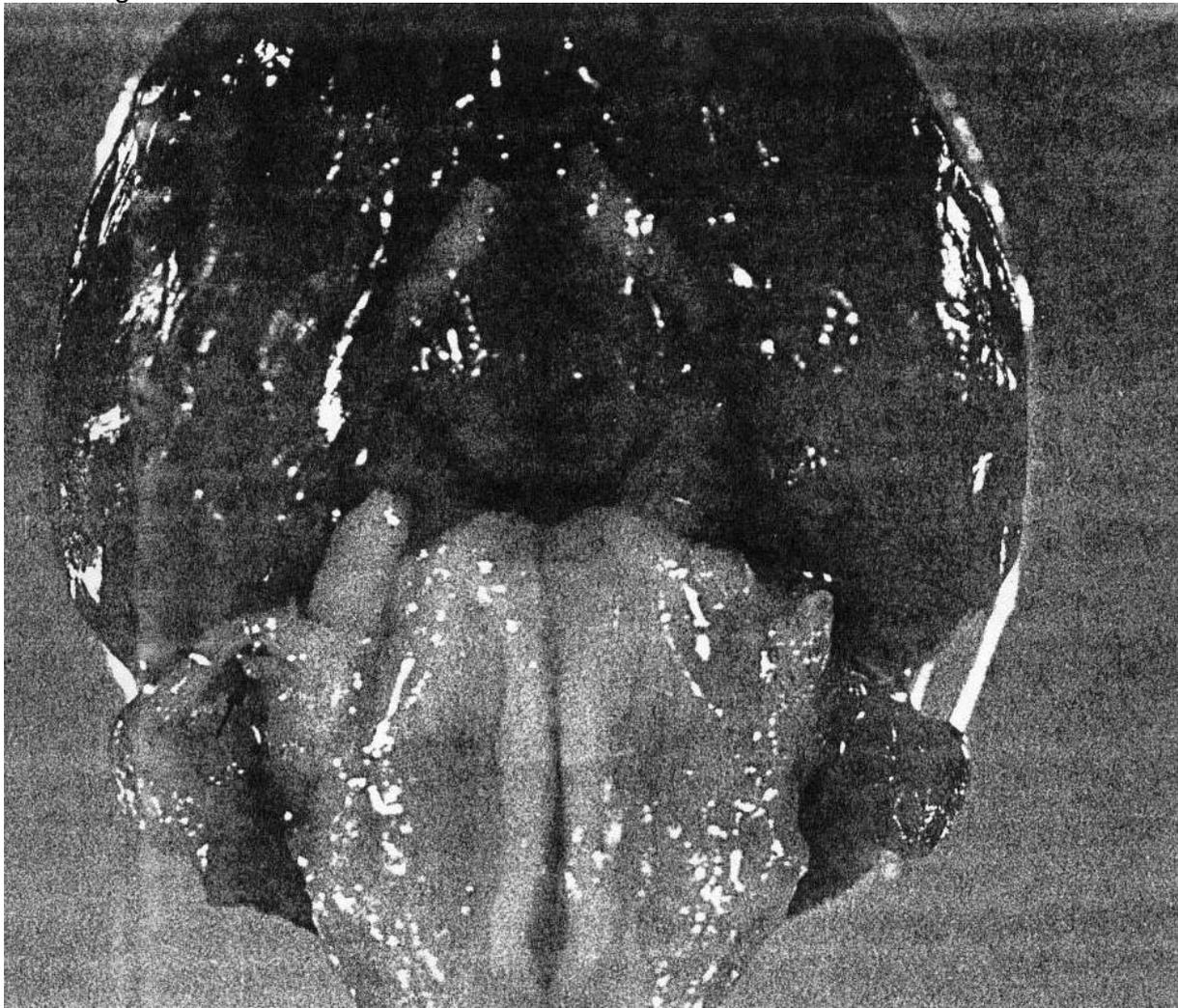


Abbildung Nr. 8 :
Präparatansicht von ventrocaudal mit den zerrissenen Tractus optici oben im Bild und dem abstehenden VG (Pfeil) unter dem nach unten abgebogenen Nervus facialis (N.VII).

2.4 Schneiden

Der gesamte Block wurde, von eisgekühltem PBS-Puffer (0,01 M) umgeben, in die Arretiervorrichtung des Vibratoms (Serie 1000, Technical Products International Inc., St. Louis, MO, USA) eingespannt, mit 10-15° Verkipfung nach dorsal, und von caudal nach rostral mit 50 µm Dicke coronar geschnitten bei einer Vibrationsfrequenz von 60 Hz, Schnittgeschwindigkeit von 3,7 und Vibrationsamplitude von 3. Jeder Schnitt wurde dann in eine Trägerschale mit 0,1 M PBS-Puffer mit pH 7.4 übertragen und der Immunfärbung zugeführt.

2.5 Immuncytochemie

Die immuncytochemischen Färbungen wurden mit AK gegen Calb (clone 300, Swiss antibodies, Bellinzona, CH) durchgeführt. Dabei wird das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) an einen gegen die F_{ab}-Region des Calb-AK's gerichteten 2. AK direkt oder über einen weiteren AK gekoppelt. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und Di-amino-benzidintetra-hydrochlorid (DAB) (Sigma) entstehen braungefärbte Phenazinpolymere, die in Wasser und Alkohol nicht mehr löslich sind. Aus dem Wasserstoffperoxid entsteht dabei Wasser, die unveränderte Peroxidase kann erneute Reaktionen eingehen.

Zur Koppelung der Peroxidase an die primären AK benutzten wir die Peroxidase-Anti-Peroxidase-(PAP) Methode und die Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

Die Fixation der Peroxidase an den Calb-AK wurde mit der von Hsu und Ree (1980) entwickelten indirekten Avidin-Biotin-Komplex-Methode erreicht, nämlich mittels Vectastain Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA). Bei dieser Methode werden der zweite AK (Calb-Färbung: Biotinylierter Anti-Maus-AK vom Kaninchen, (Dako, Hamburg) Verdünnung: 1:200) und Peroxidasemoleküle kovalent an das Vitamin Biotin gekoppelt und dann über das aus Eiklar extrahierte Glykoproteinmolekül Avidin nichtkovalent fest miteinander verbunden. Da sich ein biotinylierter AK über ein Avidin-Molekül mit 3 Biotin-Peroxidase-Komplexen verbinden kann, ist die Farbintensität bei dieser Methode sehr hoch.

Eine bessere Farbkontrastierung und auch höhere Spezifität lässt sich noch mit der PAP-Methode (siehe Kapitel 2.5.7) erreichen, aber nur bei vergleichsweise geringer Eindringtiefe in das zu färbende Gewebe.

2.5.1 Blockierung der endogenen Peroxidasen und Präinkubation

Auf die bei der Avidin-Biotin-Komplex-Methode empfohlene Blockierung von endogenem Biotin (Wood und Warnke, 1981) wurde wegen der im Gehirn zu geringen Biotin-Konzentrationen verzichtet.

Um zu verhindern, dass auch die Gewebseroxidasen die gleichen Reaktionen mit H₂O₂ und DAB eingehen wie die an die AK konjugierte Peroxidase, wurden die frischen Schnitte zuerst 20 min mit 3%iger H₂O₂-, 10%iger Methanol- und 0,01 molarer PBS-Puffer-Lösung inkubiert und die endogenen Peroxidasen somit irreversibel blockiert.

Zusätzlich werden bei der PAP-Methode und bei der Avidin-Biotin-Komplex-Methode die endogenen Peroxidasen vereinzelter Erythrozyten und Granulozyten durch massiven Substratüberschuss irreversibel gehemmt und damit Farbartefakte vermindert.

Um eine weitere Ursache für unerwünschte Hintergrundfärbungen auszuschalten, nämlich die unspezifische Bindung von AK an freie Ladungen von Kollagen- und anderen Bindegewebskomponenten, wurden die Schnitte für 30 min in 20%iger Serumlösung der Spezies, aus dem der 2. AK stammt, inkubiert. Dadurch wurden die freien Ladungen mit artgleichen Serumproteinen neutralisiert. Die Präinkubationslösungen enthielten 1%iges Triton-X-100 (Sigma, St.Louis, MO, USA), 100 mg Rinder-Serum-Albumin (BSA) und TBS-Puffer-Lösung.

2.5.2 Kontrollen

Die Inkubation mit dem Primär-AK wurde bei jedem 1. Schnitt einer Serie, bestehend aus 28 Schnitten weggelassen, während alle anderen Schritte identisch waren. Diese Kontroll-schnitte zeigten nach DAB-Entwicklung fast keine Färbung, nur der teilweise umgebende Agar agar (Fluka) färbte sich leicht, wurde aber vor dem Aufziehen der Schnitte entfernt.

2.5.3 Antiserenlösung

Erster und zweiter AK wurden mit einer Lösung verdünnt, die im TBS-Puffer außer 0,05 M Tris-HCl mit pH 7.6 und 0,9% NaCl auch 0,3% Triton-X-100 und 10% normales Kaninchen-serum (GIBCO BRL, Paisley, Schottland) und 0,1% Rinder-Serumalbumin (Sigma, St. Louis, MO, USA) enthielt, wie schon zuvor bei der Präinkubation, aber geringer konzentriert.

2.5.4 Erster Antikörper (AK)

Calb-Färbung: Monoclonaler Anti-Calb aus der Maus (clone 300, Swiss antibodies, CH) Verdünnung: 1:6000, Inkubationszeit über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C auf einem Rüttler.

2.5.5 Zweiter AK

Calb-Färbung: Biotinylierter Anti-Maus-AK vom Kaninchen, (Dako, Hamburg) Verdünnung: 1:200, Inkubationszeit 1 Stunde. Danach wurde 3 mal 5 min in TBS-Puffer gewaschen.

2.5.6 Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Calb-Färbung: Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO, Hamburg), Verdünnung: 1:60, Inkubationszeit 30 min. Streptavidin ist aufgrund seiner großen Ähnlichkeit mit Avidin ebenfalls in der Lage, Biotin zu binden. Streptavidin und die Biotin-Peroxidase-Verbindung wurden bereits eine halbe Stunde vor der Inkubation zusammengegeben, damit sich ausreichend viele Komplexe bilden konnten, um dann an die biotinylierten zweiten AK gebunden zu werden. Danach wurden die Schnitte wie zuvor in TBS-Puffer gewaschen.

2.5.7 Peroxidase-Anti-Peroxidase-(PAP) Methode

Zunächst wird zur Senkung der Hintergrundaktivität erneut die bereits erwähnte Präinkubation von 30 min durchgeführt. Dann wird der PAP-Komplex mit Hilfe eines unkonjugierten rabbit-anti-mouse-AK (ram-AK) (2. AK) an den anti-Calb-AK gekoppelt. Verdünnung: 1:300, Inkubationszeit 60 min. Anschließend wurde 3 mal in TBS-Puffer gewaschen.

2.5.8 Diaminobenzidin-(DAB) Reaktion

2-5 min lang wurde in 200 ml TBS-Puffer mit 100 mg DAB und 1% H₂O₂ inkubiert, danach für je 5 min in TBS-Puffer und entionisiertem Aqua dest. gewaschen.

2.5.9 Aufziehen und Eindeckeln der Schnitte

Am Ende wurden die Schnitte der Reihe nach auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, in aufsteigender Alkoholreihe von 70-100% und Xylol (Merck) entwässert und unverzüglich in Eukitt (Okindler-GmbH) eingebettet.

2.6 Auswertung

2.6.1 Camera-lucida-Zeichnungen

Die Auswertung der Schnitte wurde mit einem Zeiss-Mikroskop Typ Axiophot durchgeführt. Verwendet wurden Zeiss-Objektive und ein achromatischer und aplanarer Phasenkontrastkondensator mit einer numerischen Apertur von 1,4.

Gezeichnet wurde mit Hilfe einer Camera-lucida.

Vergrößerung:

Okular	10-fach
Objektive	5-40-fach
Camera lucida	1,2-fach

2.6.2 Bestimmung der Kerngebiete

Zur Identifikation der Grenzen der vestibulären Kerngebiete und der CN wurde, der Nomenklatur von Larsell und Jansen (1967) folgend, der Hirnatlas der Maus von Sidman et al. (1971) und ein Hirnatlas der Ratte von Pellegrino et al. (1979) benutzt, des weiteren eine cytoarchitektonische Studie über die VN beim Meerschweinchen von Gstoettner und Burian (1987), sowie Auswertungen aus unserer Arbeitsgruppe aus mehr als 50 nicht operierten *pcd*- und *Lurcher*-Mutanten. Zum Teil wurden auch größenadaptierte Schemazeichnungen und Folien zu Hilfe genommen.

Es wurden insgesamt 63 Schnitte gezeichnet (siehe Abbildungen Nr. 9, 1-16).

2.6.3 Fotografieren

Fotos wurden mit folgenden Zielsetzungen aufgenommen:

- Zur Darlegung der Operationsmaterialien und -Methode, zum Teil mit aufgesetzter Kamera,
- zur Darstellung der anatomischen Lagebeziehungen des VG mit einer stark vergrößernden Kamera für kurze Objektentfernungen und
- zur Befund-Dokumentation der mikroskopischen Schnitte mit einer Mikroskop-Kamera.

Da die Fasern und Terminalien in verschiedenen Schnitt-Schichten liegen, mussten zahlreiche Fotos mit unterschiedlichen Fokussierungen angefertigt werden, um möglichst viele Einzelheiten darstellen zu können. Es wurden auch sich zum Teil überlappende Fotos zusammengestellt, um die räumliche Ausdehnung der Befunde besser zu veranschaulichen.