

## 4 Diskussion

Die in dieser Studie durchgeführten einseitigen Vestibulotomien in PC-defizitären Mutanten beweisen, dass die einzige Quelle Calb-positiver Axone und Terminalien in den VN und im Kleinhirn neben den PC durch eine Subpopulation von Bipolarneuronen des VG gebildet wird.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals den vollständigen Verlauf und die Terminationsziele dieser Untergruppe sensorischer Afferenzen in Hirnstamm und Kleinhirn. Die Calb-positiven PVA verteilen sich dabei durchgehend unilateral.

Sie ziehen im Hirnstamm durch die 4 VN mit Ausnahme des kleinzelligen Teils des MVN und erreichen auch die *Formatio reticularis*. Die Terminationen in den VN entsprechen der genannten Faserverteilung bis auf den dorsalen LVN und finden sich akzessorisch nur im *Nucleus interstitialis Cajal* und in der Zellgruppe Y.

Im Keinhirn zeigen sich Calb-positiv Fasern in allen CN, Terminalien hauptsächlich im LCN. Im Kleinhirncortex sind Projektionen ausschließlich auf die ventrale Uvula und den Nodus begrenzt.

Über die genaue Verteilung der Projektionsorte der Gesamtpopulation der PVA besteht aber noch weitgehend Unklarheit, wie aus dem Spezies-Vergleich in 1.2.2 zu ersehen ist.

### 4.1 Methodenkritik

#### 4.1.1 Einfluss überlebender PC auf die Identifikation Calb-positiver PVA

Bei den 50 benutzten Mutanten waren 3-46 PC nicht vollständig degeneriert. Sie zeigten sich überwiegend im Nodus, der nach Befunden von Angaut und Brodal (1967) zum MCN und LCN projiziert, so dass die Identifikation der PVA durch mögliche Projektionen von PC in den MCN und LCN erschwert sein könnte.

Das totale Fehlen von ipsilateralen Calb-positiven Fasern in den VN nach einseitiger Vestibulotomie impliziert, dass die nicht vollständig degenerierten PC höchstens cortikonukleäre Verbindungen innerhalb des Kleinhirns in der direkten Nachbarschaft von MCN und LCN aufweisen könnten, nicht aber zu den VN. Die morphologische Analyse der Fasern von PC und PVA ergab eine Liste mit Unterscheidungskriterien, die eine eindeutige Zuordnung der Fasern zu den beiden Calb-positiven Gruppen ermöglichen.

Eine kleine Calb-positiv neuronale Subpopulation des *Ganglion spirale* wurde 1988 von Dechesne und Thomasset beschrieben und 1995 von Spatz und Löhle und von Usami et al. bestätigt. Eine Läsion dieser primär auditorischen Bahn war in der vorliegenden Arbeit unvermeidbar, woraus sich die Frage ergibt, inwieweit die Befunde zur Verteilung der Calb-positiven PVA dadurch eventuell beeinflusst werden.

#### 4.1.1 Calb in auditorischen Fasern

Obwohl von den primär cochleären Fasern eine ausschließliche Projektion in die cochleären Kerne angenommen wird, konnten Carpenter und seine Mitarbeiter (1972) nach selektiven cochleären Läsionen im LCN eine teilweise Degeneration von Fasern und Terminalien nachweisen, auch wenn Carleton und Carpenter (1984) nach Injektion von markiertem Leucin in die Cochlea außer einer Färbung im gesamten *Ganglion spirale* weder Fasern im LCN noch im cerebellären Cortex nachweisen konnten. Cochleäre Fasern im Kleinhirn wurden nur außerhalb der Calb-positiven Projektionsgebiete gefunden, von Ito (1984) in *Declive*, *Tuber* und *Pyramis* und von Brodal und Høivik (1964) nur mit Vorbehalt im *Flocculus*. Rasmussen (1958) konnte zeigen, dass eine kleine Projektion von primär auditorischen Afferenzen zum *Flocculus* existiert, in dem wir aber keine Calb-positiven Fasern finden konnten.

Aus diesen Befunden wird deutlich, dass die Läsion Calb-positiver auditorischer Afferenzen keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit ermittelten Projektionsziele Calb-positiver PVA ausübt.

#### 4.1.2 Calb in der unteren Olive und im N. intermedius

Die vorliegende Arbeit konnte bestätigen, dass alle Kletterfasern im Kleinhirn Calb-negativ sind und dass schon auf Höhe des Corpus restiforme keine aus der unteren Olive stammende Immunoreaktivität in den Fasern mehr nachweisbar ist (Wassef et al., 1992). Direkte Konsequenzen einer möglichen Mitschädigung des N. intermedius des N. VII sind ebenfalls ausgeschlossen, da dieser keine Calb-positiven Fasern enthält.

#### 4.2 Methodenvergleich

Die klassischen Färbungen wie die Golgi- und Silber-, Gleys-, Nauta-, Fink-Heimer- und Marchi-Methoden sind bekanntermaßen relativ unspezifisch und nur eingeschränkt für die Darstellung aller Terminationsgebiete einer Neuronenpopulation geeignet.

Tracing-Studien, ob retrograd oder anterograd, mit Meerrettich-Peroxidase oder radioaktiven Aminosäuren sind in ihren Färbungen oft unterschiedlich intensiv und es besteht im Verlauf der dargestellten Fasern ein Ausdünnungseffekt der Färbung. Damit sind besonders lange Faserverläufe und Terminationsgebiete schlecht reproduzierbar und in vergleichbaren Studien entsprechend widersprüchlich (siehe Tabelle in 1.2.2).

Eine Gesamtpopulation von Neuronen oder eine spezifische Subpopulation in ihrem ganzen Verlauf isoliert mit Tracern zu erfassen ist nahezu unmöglich.

Um die Subpopulation der großen Bipolarzellen mit ihrem charakteristischen, irregulär phasischen Entladungsmuster und ihren dicken Fasern darzustellen sind die oben genannten Techniken daher unbrauchbar.

Wie Kvetter und Leonard (1997) mit Calr bei Wildtyp-Springmäusen gezeigt hatten ist im Hirnstamm die isolierte Darstellung von dicken PVA der großen Bipolarzellen einfacher als mit Calb, da die PC-Innervation der VN nicht eliminiert werden muss.

Eine Identifikation von Calr-positiven PVA im Kleinhirncortex ist aber wegen der störenden Mitanfärbung von Körnerzellen, Lugaro- und Golgi-Zellen (Rogers, 1989; Arai et al., 1991; Braak und Braak, 1993; Abbott und Jakobowitz, 1995) nicht möglich.

#### 4.3 Ergebnisvergleich

Wie bereits ausgeführt liegen bisher kaum andere Ergebnisse als Vergleichsmöglichkeit zur Verteilung der gezeigten Calb-positiven Subpopulation vor.

Da aber der Frage nach einer möglichen Deckungsgleichheit zwischen den Innervationsgebieten der beschriebenen PVA-Subpopulation und denen der Gesamtpopulation ein besonderes Interesse gilt, soll die Verteilung der untersuchten PVA in verschiedenen Säugetier-Spezies noch einmal vergegenwärtigt und mit den vorliegenden Ergebnissen in Beziehung gebracht werden.

#### 4.3.1 Bestätigung der Ergebnisse

Wie die vollständige Degeneration aller Calb-positiven Fasern und Terminalien in der *pcd-* und *Lurcher*-Maus nach einer Durchtrennung des N.VIII beweist, werden ausschließlich PC und eine Subpopulation von PVA in den VN und im Kleinhirn mit Calb markiert. In Normaltieren werden beide Zellarten überlappend markiert, dagegen werden in PC-defizitären Mutanten die Calb-positiven PVA selektiv gefärbt.

Daraus ergibt sich, dass eine komplette unilaterale Darstellung der Calb-positiven PVA ausschließlich in PC-defizitären Mutanten nach einer einseitigen Vestibulotomie möglich ist.

Die Innervation der VN und des Kleinhirns mit Calb-positiven PVA und der Verlauf dieser Fasern stehen in großer Übereinstimmung mit der Verteilung der Gesamtpopulation der PVA aus anderen Arbeiten über verschiedene Spezies (siehe Tabelle in 1.7.2);

Die Bifurkation der PVA in einen auf- und einen absteigenden Schenkel beschrieb zuerst Kölliker (1891), dann Held (1892) und Ramón y Cajal (1896). Lorente de Nó (1933) fand PVA in den VN der Maus, nicht aber im Kleinhirn. Bei anderen Nagetieren (siehe Tabelle in 1.2.2 ) wurden ebenfalls in allen vier VN PVA nachgewiesen. Dow (1936) fand bei Katzen ipsilaterale PVA auch im MCN, in der Uvula und im Nodus. Diese wurden dort von Brodal und Høivik (1964) im MCN und ICN beschrieben und von Carpenter und Mitarbeitern (1972) bei Affen bestätigt.

Der erste Nachweis von PVA-Terminalien in den CN gelang im MCN der Maus durch Ramón y Cajal (1909), später durch Leidler (1916) bei Kaninchen, durch Sachs und Alvis (1921) bei Hunden, Henkel und Martin (1977) beim Opossum sowie Mehler und Rubertone (1985) bei der Ratte. Bei Katzen wurde der Nachweis von PVA-Terminalien im MCN zuerst von Dow (1936) erbracht, später von Carpenter (1960), von Kotchabhakdi und Walberg (1978) sowie von Korte und Mugnaini (1979).

PVA-Terminalien im LCN fand zuerst Ingvar (1918) bei Katzen, diese wurden dort von Brodal und Høivik (1964) bestätigt. Carpenter und seine Mitarbeiter (1972) fanden terminierende PVA im LCN von Affen und Kevetter und Perachio (1986) bei Springmäusen. Im Kleinhirncortex besteht Übereinstimmung mit fast allen bekannten Vergleichsstudien in Bezug auf die Termination in Nodus und Uvula.

Wie Carpenter (1960) bei Katze und Affe, Gerrits et al. (1989) beim Kaninchen und Kevetter und Perachio (1986) bei der Springmaus zeigen konnten, ziehen im tiefen Hirnstamm auch PVA zur *Formatio reticularis*.

Wir finden diese Fasern kontinuierlich in fast allen Schnitten vom dorsalen LVN in Richtung *Tractus solitarius* zur benachbarten *Formatio reticularis*.

Bezüglich der Frage nach der Kontralateralität der PVA konnten Kevetter und Leonard (1997) für Calb-positive PVA im Hirnstamm der Springmaus die uns für Calb vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die untersuchten PVA in ihrem gesamten Verlauf ausschließlich ipsilateral projizieren.

Die Frage nach der genauen Größe des gesamten Terminationsgebiet aller PVA bleibt unbeantwortet, weil mit dem von uns gewählten Calb-AK lediglich etwa 16% aller Bipolarzellen angefärbt werden (Bäurle et al., 1997b) und weil nicht sicher ist, ob sich dieser Anteil innerhalb der gesamten Terminationsgebiete durchgehend homogen verteilt.

Die Calb-positive Subpopulation der PVA innerviert im Hirnstamm und im Kleinhirn alle Gebiete, die für die Gesamtpopulation weitgehend unbestritten sind, während umstrittene Projektionen in Areale wie Lingula, Flocculus und Paraflocculus durch Calb-positive PVA nicht bestätigt werden können. Das Gleiche gilt auch für fragliche kontralaterale Projektionen.

Dies lässt vermuten, dass die Informationen dieser kleinen Gruppe von morphologisch, physiologisch und biochemisch charakteristischen PVA nicht nur an begrenzte Gebiete, sondern an alle bisher bekannten Projektionsorte der bekannten PVA-Gesamtpopulation übermittelt werden.

#### 4.3.2 Unterschiede zu anderen Ergebnissen

Die Tabelle in 1.2.2 zeigt die Unterschiede zu den Ergebnissen der Calb-positiven Subpopulation;

Die Aussage von Lorente de Nó (1933), dass im Kleinhirn der Maus keine PVA zu finden sind, gilt als widerlegt, obschon Leidler (1916) bei Kaninchen auch keine vestibulären Kleinhirn-Fasern finden konnte. Gerrits und seine Mitarbeiter (1989) konnten beim gleichen Tier im MCN keine PVA finden, auch Kevetter und Perachio (1986) war dies bei Springmäusen nicht gelungen.

Wenn auch die meisten der bekannten Autoren den Flocculus als vestibuläres Projektionsgebiet angeben, was wir für die Calb-positiven PVA nicht bestätigen können, so wird die Lingula schon seltener dazugerechnet, nämlich von Ingvar (1918), Brodal und Høivik (1964) bei Katzen, von Carpenter (1960) bei Affen und Katzen und von Kevetter und Perachio (1986) bei Springmäusen. Sogar als bilateraler Projektionsort wurde die Lingula von Mehler und Rubertone (1985) bei der Ratte und von Gerrits und Mitarbeitern (1986) bei Kaninchen angegeben.

Der Paraflocculus wurde nur von Brodal und Høivik (1964) bei der Katze und von Barmack und seinen Mitarbeitern (1993) beim Kaninchen als Projektionsort angegeben, Kevetter und Perachio (1986) rechneten nach ihren Springmaus-Experimenten auch noch Culmen und Declive zu den Projektionsgebieten der PVA.

#### 4.4 Bedeutung der Ergebnisse

Die Verteilung der beschriebenen PVA-Subpopulation zeigt, welche Gebiete obligatorisch in den Verlauf und die Terminationsziele der Gesamtpopulation der PVA eingeschlossen werden müssen. Zusätzliche Verlaufs- und Projektionsgebiete der Gesamt-PVA sind nur dann möglich, wenn sich beide Verteilungen nicht vollständig überlappen.

##### 4.4.1 Die *pcd*-Maus als Modelltier für eine Subpopulation der PVA

Da der Calb-AK neben einer Subpopulation von PVA auch die zahlreichen PC anfärbt, ist durch seinen Einsatz normalerweise keine differenzierte Darstellung der Calb-positiven PVA in VN und Kleinhirn möglich.

In der *pcd*-Maus sind Störeffekte durch überlebende PC weitgehend minimiert, somit kann die Calb-Immuncytochemie bei der adulten *pcd*-Maus mit ihren wenigen PC einen wertvollen Beitrag zum Studium dieser Gruppe von PVA leisten.

Der mit ungefähr 16% geringe Anteil der Calb-positiven Fasern an der Gesamtpopulation der PVA erlaubt keine sichere Aussage über ausgeschlossene Projektionen der PVA-Gesamt-population, auch wenn eine große Übereinstimmung mit den unstrittigen Projektionsgebieten der PVA besteht. Damit kann die Frage, ob die Calb-positiven PVA tatsächlich in die gesamten Areale aller PVA projizieren solange nicht beantwortet werden, bis die Verteilung der PVA-Gesamtpopulation besser aufgeklärt ist.

Die *pcd*-Mutante bestätigt in jedem Fall die unbedingt einzuschließenden Projektionsorte der PVA im Kleinhirn und den CN.

#### 4.4.2 Validität der PC-deprivierten Mutanten für die selektive Darstellung der Calb-positiven PVA

Da sich die *pcd*- und *Lurcher*-Mutanten hinsichtlich ihrer Anzahl an Bipolarzellen im VG nicht von den Wildtyp-Mäusen unterscheiden (Bäurle und Guldin, 1998a, 1998b) ist eine Beeinflussung des vestibulären Systems durch die PC-dezimierenden Mutationen der *pcd*- und *Lurcher*-Maus quantitativ ausgeschlossen.

Die bekannte sekundäre Degeneration von vielen Körnerzellen, wie sie von Ghetti und seinen Mitarbeitern (1978) sowie Triarhou und seinen Mitarbeitern (1985) für die *pcd*-Mutante beschrieben wurde und von Caddy und Biscoe (1975) für die *Lurcher*-Mutante mit einer noch ausgedehnteren Atrophie als bei der *pcd*-Maus (Swisher und Wilson, 1977; Wetts und Herrup, 1982), könnte trotzdem zu einer retrograden Degeneration führen, im Sinne einer späten sekundären Antwort auf den primären PC-Verlust. Es konnte aber auch dargelegt werden, dass die Reduktion der Zielneurone auf das Überleben der PVA keinen Einfluss hat und dass die Verteilung der Calb-positiven Fasern bei den benutzten Mutanten im Vergleich zu anderen Säugern sehr ähnlich ist.

Die *pcd*- und *Lurcher*-Mäuse bieten daher eine elegante Alternative zur ersten teilweisen Darstellung der PVA-Subpopulation durch Kevetter und Leonard (1997), weil die färbetechnisch störenden Zellen durch eine Mutation eliminiert werden ohne den Aufwand einer Cerebellektomie mit Zerstörung von PVA-Projektionen und Kollateralen mit dem Risiko retrograder PVA-Degeneration.

In adulten *pcd*- und *Lurcher*-Mäusen eröffnet sich damit von Anfang an die Möglichkeit zum Studium des kompletten Verlaufs der untersuchten Subpopulation.

Beide Mutanten sind damit die idealen Modelltiere zum Studium der selektiv dargestellten Calb-positiven PVA.