

Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl I – Vegetative Anatomie  
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Waschke

# **Neuroanatomische Identifizierung funktioneller Neurone im Nucleus abducens des Menschen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Annie Horng  
aus  
München

Jahr  
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J.A. Büttner-Ennever Ph.D

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Straka  
Priv. Doz. Dr. Frank Padberg

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Priv. Doz. rer. nat. A. Horn-Bochtler

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09. 06. 2011

*to my parents and all my guardians*

*The Mad Hatter:  
Have I gone mad?*

*Alice:  
I'm afraid so. You are entirely bonkers.  
But I'll tell you a secret. All the best people are.*

*~ Lewis Carroll ~*

<b>1</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
4.1	DIE EXTRAOKULÄREN AUGENMUSKELN.....	10
4.1.1	<i>Die extraokulären Augenmuskeln.....</i>	<i>10</i>
4.1.2	<i>Funktion der extraokulären Augenmuskeln.....</i>	<i>11</i>
4.1.3	<i>Aufbau der extraokulären Augenmuskeln .....</i>	<i>12</i>
4.1.4	<i>Motorische Innervation der extraokulären Augenmuskeln .....</i>	<i>14</i>
4.2	HIRNNERVENKERNE DER EXTRAOKULÄREN AUGENMUSKELN .....	16
4.3	DER NUCLEUS ABDUCENS.....	17
4.3.1	<i>Lokalisation und Aufbau.....</i>	<i>17</i>
4.3.2	<i>Die Neuronengruppen des Nucleus abducens und ihre Funktionen .....</i>	<i>18</i>
4.4	ZIELSETZUNG DES PROJEKTES.....	21
4.5	FRAGESTELLUNG .....	21
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
5.1	RHESUSAFFE .....	22
5.2	MENSCH .....	22
5.3	PRÄPARATION .....	23
5.4	GEFRIERSCHNITTE .....	23
5.5	PARAFFINSCHNITTE.....	23
5.6	DIE FÄRBUNG - GRUNDSCHRITTE .....	24
5.6.1	<i>Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten .....</i>	<i>24</i>
5.6.2	<i>Antigen-Demaskierung.....</i>	<i>24</i>
5.7	DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG .....	26
5.7.1	<i>Antikörper.....</i>	<i>26</i>
5.7.2	<i>Einfache immunhistochemische Färbung.....</i>	<i>28</i>
5.7.3	<i>Doppelimmunperoxidase -Färbung .....</i>	<i>29</i>
5.7.4	<i>Entwässerung und Eindeckung.....</i>	<i>29</i>
5.8	AUSWERTUNG.....	29
5.8.1	<i>Quantitative Analyse der funktionellen Neuronengruppen im Nucleus abducens .....</i>	<i>30</i>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
6.1	AFFEN .....	32
6.2	MENSCHEN .....	42

6.3	ZUSAMMENFASSUNG ZELLPOPULATIONEN IN PROZENT (%)	54
6.4	ÜBERSICHT DER LOKALISATION DER NEURONENGRUPPEN DES NUCLEUS ABDUCENS IM RHESUSAFFEN UND IM MENSCHEN (ROSTRAL – CAUDAL)	55
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
7.1	HISTOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER EXTRAOKULÄREN MOTONEURONE	56
7.1.1	<i>Cholin Acetyltransferase</i>	56
7.1.2	<i>Perineuronale Netze</i>	56
7.1.3	<i>Nicht-phosphorylierte Neurofilamente</i>	58
7.2	QUANTITATIVE ANALYSE DER TWITCH UND NON-TWITCH MOTONEURON POPULATION	59
7.3	UNTERGRUPPEN NON-TWITCH MOTONEURONE	60
7.4	INTERNUKLEÄRE NEURONE UND PMT-NEURONE	61
7.5	ZUSAMMENFASSUNG DER HISTOCHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN DER NEURONENGRUPPEN	62
7.6	FUNKTIONEN DER EXTRAOKULÄREN AUGENMUSKELN	62
7.7	FUNKTION DER TWITCH UND NON-TWITCH MOTONEURONE	63
7.8	SENSORISCHE INNERVATION DER EXTRAOKULÄREN AUGENMUSKELN	63
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>84</b>
<b>12</b>	<b>LEBENSLAUF</b>	<b>85</b>

## 1 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1 – Schema über die extraokulären Augenmuskeln des Menschen

Abb. 2 – Orbitale und globale Schicht der extraokulären Augenmuskeln

Abb. 3 – Innervierungsmuster der Twitch und Non-Twitch Motoneurone

Abb. 4 – Sagittalschnitt durch den Hirnstamm des Menschen

Abb. 5 – Die vier Neuronengruppen des Nucleus abducens und ihre Zielstrukturen

Abb. 6 – Lage putativer Non-Twitch Motoneurone nach retrograden Traceruntersuchungen

Abb. 7 – Übersicht Doppelfärbung ChAT/CSPG des Nucleus abducens des Rhesusaffen

Abb. 8 – Detailaufnahme putativer Twitch und Non-Twitch Motoneurone des Rhesusaffen

Abb. 9 – Detailaufnahme putativer internukleärer Neurone des Rhesusaffen

Abb. 10 – Detailaufnahme internukleärer und putativer PMT-Neurone des Rhesusaffen

Abb. 11 – Plots der putativen Twitch und Non-Twitch Motoneurone des Rhesusaffen

Abb. 12 – Plots der putativen Moto- und internukleäre/PMT-Neurone des Rhesusaffen

Abb. 13 – Übersicht Doppelfärbung ChAT/CSPG des humanen Nucleus abducens (M1)

Abb. 14 – Detailaufnahme der Moto- und internukleäre Neurone des Menschen (M1)

Abb. 15 – Plots der putativen Twitch und Non-Twitch Motoneurone des Menschen (M1)

Abb. 16 – Plots der putativen Moto- und internukleäre/PMT-Neurone des Menschen (M1)

Abb. 17 – Detailaufnahme putativer PMT-Neurone des Menschen (M1)

Abb. 18 – Übersicht Nachbarfärbung ChAT/SMI-32 des humanen Nucleus abducens (M2)

Abb. 19 – Plots der putativen Twitch und Non-Twitch Motoneurone des Menschen (M2)

Abb. 20 – Plots der putativen Moto- und internukleäre/PMT-Neurone des Menschen (M2)

Abb. 21 – Übersicht Lokalisation der Neuronenpopulationen des Nucleus abducens im

Rhesusaffen und Menschen

## **2 Tabellenverzeichnis**

Tab. 1 – Übersicht Antikörper und ihre Hersteller

Tab. 2 – Neuronenpopulationen (%) des Nucleus abducens im Rhesusaffen (Z30) und im Menschen (M1).

Tab. 3 – Neuronenpopulationen (%) des Nucleus abducens im Menschen (M2).

### 3 Abkürzungsverzeichnis

aqua dest.	Lat.: „aqua destillata“, destilliertes Wasser
CB	Natrium-Citrat-Puffer
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CSPG	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane
CO	Cytochrome Oxidase
DAB	Diaminobenzidin
EOM	Extraokuläre Augenmuskel
FT	Fast-Twitch Muskelfasern
HCL	Salzsäure
INT	Abducens Internucleäre Motoneurone
IO	Musculus inferior obliquus
IR	Musculus rectus inferior
LP	Musculus levator palpebrae
LR	Musculus rectus lateralis
M	Mol
M1	Fall 1 Mensch - Paraffinfall
M2	Fall 2 Mensch - Paraffinfall
M3	Fall 3 Mensch - Gefrierfall
M4	Fall 4 Mensch - Gefrierfall
MIF	Multipel-innervierte Muskelfasern
MR	Musculus rectus medialis
nIII	Nucleus oculomotorius



NIII	Nervus oculomotorius
nIV	Nucleus trochlearis
NIV	Nervus trochlearis
nVI	Nucleus abducens
NVI	Nervus abducens
NP-NF	Nicht-phosphorylierte Neurofilamente
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (“phosphate buffered saline”)
PV	Parvalbumin
RT	Raumtemperatur
SIF	Einfach-innervierte Muskelfasern („singly-innervated muscle fibers“)
SO	Musculus superior obliquus
SR	Musculus rectus superior
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (“tris buffered saline”)

## 4 Einleitung

### 4.1 Die extraokulären Augenmuskeln

#### 4.1.1 Die extraokulären Augenmuskeln

Die Bewegung des menschlichen Auges erfolgt durch sechs extraokuläre Augenmuskeln, die in zwei Gruppen, die geraden und schrägen Augenmuskeln, unterteilt werden (Abbildung 1) (Benninghoff and Drenckhahn 2004; Putz and Pabst 2007)

- Musculus rectus superior (SR)
- Musculus rectus inferior (IR)
- Musculus rectus medialis (MR)
- Musculus rectus lateralis (LR)
- Musculus obliquus superior (SO)
- Musculus obliquus inferior (IO).

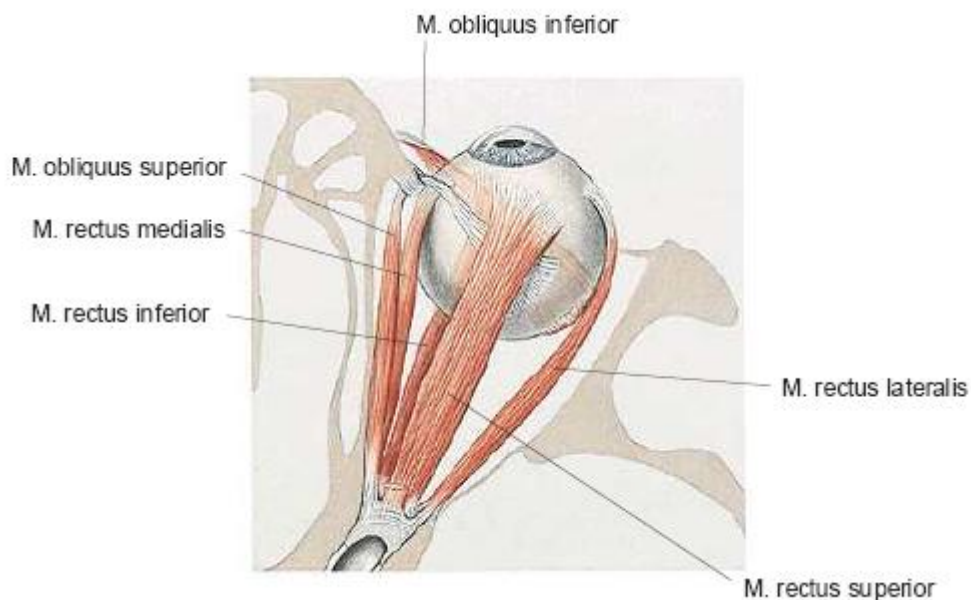


Abb. 1 – Die extraokulären Augenmuskeln des Menschen, Ansicht von kranial. Sobotta 2007

Säugetiere, somit auch der Mensch, besitzen weiterhin einen siebten extraokulären Muskel den *Musculus levator palpebrae* (LP), der das Oberlid hebt.

Die extraokulären Augenmuskeln sind in das Fettgewebe der Orbita eingebettet und umgeben den *Bulbus oculi*, sowie einen Teil des Sehnerven (*Nervus opticus*). Die vier *Musculi recti* entspringen einem fibrösen Ring (*Anulus tendineus communis*), der das *Foramen opticum* und den oberen Teil der *Fissura orbitalis superior* umrahmt (Sevel 1986). Der SO entspringt vom *Os sphenoidale*, der Periorbita und der Durascheide des *Nervus opticus*, der IO am *Os maxillaris* von der medialen Wand der Orbita und der LP vom *Os sphenoidale* unmittelbar über dem Ursprung des SR.

Die Ansätze der vier geraden äußeren Augenmuskeln befinden sich jeweils vor dem Äquator des *Bulbus oculi*, die Ansätze der zwei schrägen äußeren Augenmuskeln dorsal und lateral der Ab- und Adduktionsachse des *Bulbus oculi*. Der LP besitzt keinen direkten Kontakt zum *Bulbus oculi*, sondern sein Ansatz verläuft als breitgefächerte Aponeurose in die Haut des oberen Augenlides, sowie in die obere Tarsalplatte. Ein Teil der Levator Aponeurose ist in die Sehne des SR eingelassen, so dass er keine direkte Einwirkung auf die Bulbusbewegung besitzt, ihn jedoch indirekt über die Bewegung des SR beeinflussen kann (Miller et al. 2004).

Zusätzlich besitzen die extraokulären Augenmuskeln einen Halteapparat aus einer fibroelastischen Hülse, die dem aktuellen Stand der Literatur nach der Tenon-Kapsel zugeordnet wird (Demer et al. 2000; Oh et al. 2001; Demer 2002). Diese im angloamerikanischen Sprachgebrauch „extraoculomotor (EOM) pulleys“ genannten Strukturen befinden sich am Äquator des *Bulbus oculi* und sind an der knöchernen Orbita über kollagene, elastische oder glatte muskuläre Streben oder Sehnenansätze befestigt (Demer et al. 1995; Porter et al. 1996; Clark et al. 1997; Kono et al. 2002). Dieser Halteapparat dient den Augenmuskeln als Wendepunkt und somit als zusätzlicher funktioneller Ursprung.

#### 4.1.2 Funktion der extraokulären Augenmuskeln

Die horizontalen (MR, LR) und vertikalen (SR, IR) Augenmuskeln sind symmetrisch um den *Bulbus* angeordnet und fungieren als Antagonisten. Der MR dient primär als Adduktor, LR als Abduktor, SR als Elevator und IR als Senker des Auges. Da die vertikalen Augenmuskeln 23° lateral zur visuellen Achse ansetzen, können sie sekundär auch als Adduktoren fungieren, der

SR als Innen- und der IR als Aussenrotator. Die schrägen Augenmuskeln SO und IO sind primär für die Innen- und Aussenrotation, sekundär für die Senkung des Bulbus zuständig (Benninghoff and Drenckhahn 2004). Die zahlreichen Kontributoren ermöglichen ein vielseitiges Spektrum der Augenbewegungen, die neben den willkürlichen Augenbewegungen auch eine Reihe unwillkürlicher Bewegungsmuster umfassen.

#### 4.1.3 Aufbau der extraokulären Augenmuskeln

Die Augenmuskeln weisen im Gegensatz zum Skelettmuskel zwei longitudinal zur Längsachse angeordnete Schichten auf: eine äußere orbitale Schicht, die sich proximal des distalen muskulotendinösen Überganges absplattet und in die Pulleys fortsetzt (Demer et al. 2000; Miller et al. 2003), sowie eine innere globale Schicht, die sich über die gesamte Muskellänge vom Anulus tendineus communis bis zur Insertion am Bulbus erstreckt (Abb. 2). Beim Menschen besteht weiterhin die Annahme, dass eine zusätzliche dritte Schicht außerhalb der orbitalen Schicht existiert, die von Wasicky als marginale Schicht beschrieben wurde (Wasicky et al. 2000).

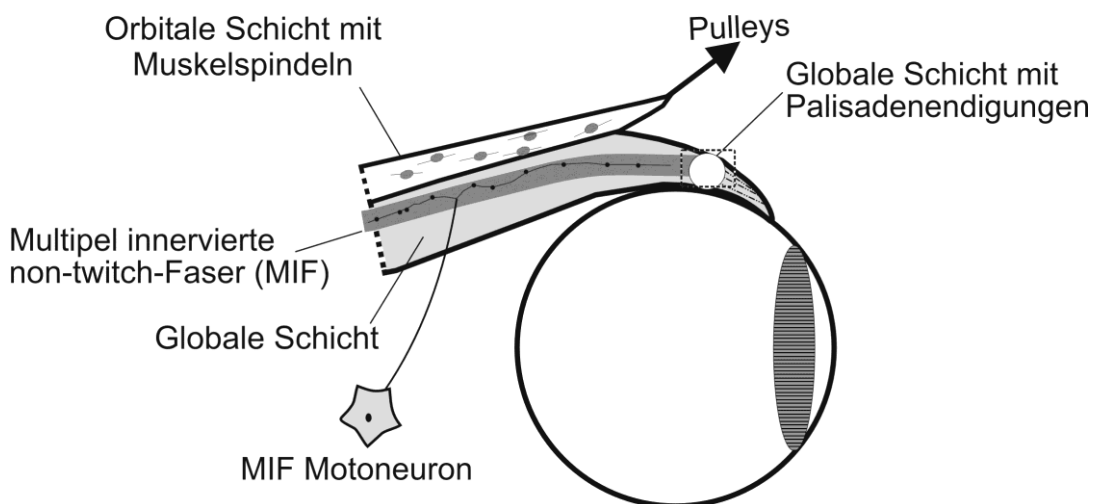


Abb. 2 – Schematische Darstellung der orbitalen und globalen Schicht der extraokulären Augenmuskeln. Adaptiert nach (Büttner-Ennever 2007).

Dieser spezielle anatomische Aufbau veranlasst zu der Hypothese, dass die orbitale Schicht nicht simultan mit der globalen Schicht an der Rotation des Bulbus beteiligt ist, sondern für

die Ausrichtung der Pulleys (“active pulley hypothesis”) verantwortlich sein könnte (Oh et al. 2001; Demer 2002). Neben der aktiven Pulley Hypothese existieren weiterhin Hinweise, dass die extraokulären Augenmuskeln kompartimentalisiert sein könnten. Das eindrucklichste Beispiel ist der Muskelus rectus lateralis, der im Gegensatz zu den anderen geraden Augenmuskeln zwei Ursprünge, am superioren und am inferioren Rand des Anulus tendineus communis besitzt (Spencer and Porter 2006). Neue Untersuchungen fanden in diesem Muskel eine relativ konsistente Spaltung des Nervus abducens, sowohl in Rhesusaffen als auch im Menschen, bevor er in die globale Schicht eintritt mit getrennter Innervierung eines superioren und inferioren Abschnittes (Peng et al. 2010). Diese Unterteilung des Muskels wie auch die Tatsache, dass er zwei Köpfe besitzt, könnte hinweisend darauf sein, dass sie funktionell unterschiedlich agieren könnten. Bis dato ist allerdings sowohl die Bedeutung der Pulleys für die Kontrolle der Augenbewegungen noch die Kompartimentalisierung des Musculus rectus lateralis nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (Dimitrova et al. 2003; Peng et al. 2010). Es besteht allerdings Übereinstimmung darüber, dass die Kenntnis über ihre Funktion ein fundamentaler Aspekt zum Verständnis der Augenbewegungen darstellt.

Der strukturelle Aufbau von Muskulatur ist üblicherweise ihrer jeweiligen Funktion angepasst und unterscheidet sich daher in ihrer prozentualen Zusammensetzung unterschiedlicher Muskelfasertypen (Ranvier 1874). Bisher sind in der Skelettmuskulatur vier Muskelfasertypen bekannt (Typ I (Slow Twitch, müdigkeitsresistent), IIA (Fast Twitch, müdigkeitsresistent), IIX (Fast Twitch, schnell ermüdend) und IIB (Fast Twitch, intermediär)), die sich biochemisch (Moore and Schachat 1985), histochemisch (Brooke and Kaiser 1970), immunozytochemisch (Bormioli et al. 1980; Pierobon-Bormioli et al. 1981), ultrastrukturell (Schiaffino et al. 1970) und physiologisch (Burke 1981) unterscheiden.

Bereits im Jahre 1949 wurden histologisch zwei grundlegende Faserarten im Skelettmuskel der Wirbeltiere unterschieden, die entweder eine „Fibrillenstruktur“ oder „Felderstruktur“ aufwiesen (Krüger 1949). Diese zwei Kategorien der Muskelfaserarten entsprechen den einzeln- und multipel-innervierten Muskelfasern (Lennerstrand and Nichols 1977; Bondi and Chiarandini 1983; Spencer and Porter 2006).

Normale Skelettmuskulatur besteht typischerweise aus einzeln-innervierten Muskelfasern (Twitch oder SIFs) (Brooke and Kaiser 1970; Burke et al. 1971; Peter et al. 1972; Schiaffino et al. 1989), während die extraokulären Augenmuskeln eine weitere Muskelfaserart, die multipel-innervierten Muskelfasern (Non-Twitch oder MIFs) enthalten. Diese Faserart ist in der

Muskulatur von Amphibien häufig zu finden, jedoch ungewöhnlich für Säugetiermuskulatur und kommt im Menschen außer in der Augenmuskulatur nur noch in der Larynxmuskulatur vor (Dietert 1965; Brandt and Leeson 1966; Han et al. 1999).

#### 4.1.4 Motorische Innervation der extraokulären Augenmuskeln

Die Twitch Fasern und die Non-Twitch Fasern unterscheiden sich anatomisch, physiologisch wie auch in der Art ihrer Innervation.

Die Twitch Fasern reagieren auf Stimulierung mit einer „Alles oder Nichts“ Kontraktion der gesamten Muskelfaser. Sie werden von Motoneuronen innerviert, die dicke Axone mit einem Durchmesser von 7-11  $\mu\text{m}$  besitzen und die über jeweils eine „en plaque“-Endplatte im mittleren Drittel der Muskelfaser ansetzen. Die Non-Twitch Fasern dagegen zeigen auf Stimulation eine langsame tonische lokale Kontraktion der Muskelfaser. Sie werden von Motoneuronen innerviert, die dünnere Axone mit einem Durchmesser von 3-5  $\mu\text{m}$  besitzen, deren Endplatten traubenartig „en grappe“ über die gesamte Muskelfaser mit Betonung des distalen Endes verteilt sind. Die Muskulatur der globalen und der orbitalen Schicht der extraokulären Augenmuskeln beinhalten beide Muskelfaserarten, wobei die multipel-innervierten Non-Twitch Fasern in der orbitalen Schicht zusätzlich „en-plaque“-Endigungen mit Twitch-Eigenschaften im Zentrum aufweisen (Spencer and Porter 2006).

##### 4.1.4.1 Twitch- und Non-Twitch Motoneurone

Anhand retrograder Traceruntersuchungen an Rhesusaffen und Ratten konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Twitch und Non-Twitch Motoneurone in den Kernen der äußeren Augenmuskeln getrennt voneinander lokalisiert sind und ein unterschiedliches histochemisches Profil besitzen (Büttner-Ennever et al. 2001; Eberhorn et al. 2005; Eberhorn et al. 2006).

Die Injektion eines retrograden Tracer, meist WGA-HRP („wheat germ agglutinin horseradish peroxidase“ – Weizenkeim Agglutinin konjugiert mit Meerrettich Peroxidase) oder CTb („non-toxic cholera toxin subunit B“ – Choleratoxin Untereinheit B), in den Muskelbauch oder in den muskulotendinösen Übergang ermöglicht die Rückverfolgung des Tracers nach Aufnahme durch die Nervenendigungen bis zu den zuführenden Neuronen. Injektionen des Tracers in den Muskelbauch markierten sowohl die Twitch als auch die Non-Twitch Motoneu-

rone, während die Injektion des Tracers in den distalen Abschnitt des Muskels, der nur die „en-grappe“-Endigungen enthält, zu einer retrograden Markierung einer Untergruppe führte, die als Non-Twitch Motoneurone interpretiert wurden (Abb. 3) (Büttner-Ennever et al. 2001; Eberhorn et al. 2006). Einschränkend muss hier allerdings erwähnt werden, dass durch eine solche Injektion in den muskulotendinösen Übergang vermutlich nur die Non-Twitch Motoneurone der globalen Schicht erfasst wird, da sich die orbitale Schicht bereits vorher abspaltet (Demer et al. 2000; Oh et al. 2001). Zusätzlich werden möglicherweise auch Zellkörper der Palisadenendigungen markiert, die ebenfalls in diesem Bereich terminieren (Zimmermann et al. 2010; Lienbacher et al. 2011). Die Palisadenendigungen sind mit den multipel-innervierten Muskelfasern assoziiert (Richmond et al. 1984), ihre genaue Funktion ist bisher aber noch unklar, da ihnen sowohl motorische (Lukas et al. 2000; Blumer et al. 2001) als auch sensorische Funktionen (Alvarado-Mallart and Pincon-Raymond 1979; Billig et al. 1997) zugeschrieben wurden.

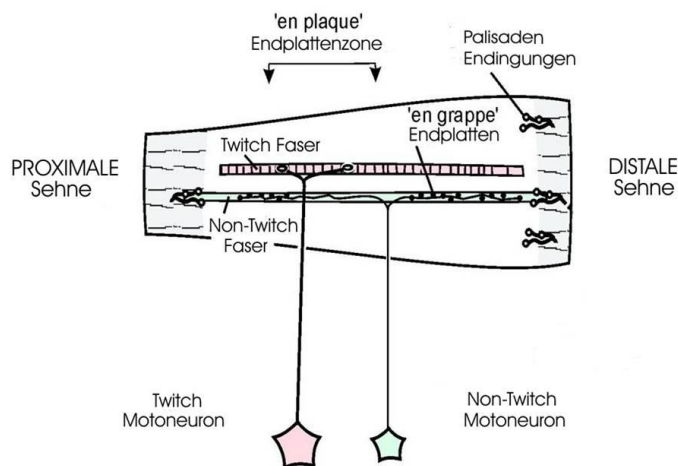


Abb. 3 – Schematische Darstellung der Synapsenverteilung der Twitch und Non-Twitch Motoneurone an den Muskelfasern der extraokulären Augenmuskeln. Eine distale Injektion eines retrograden Tracers führt zur Traceraufnahme von den Endigungen der Non-Twitch Motoneurone und der Palisadenendigungen. Modifiziert aus Büttner-Ennever et al. 2001.

Eine konsekutive histochemische Färbung der Tracer-markierten Schnitte erlaubt die eindeutige Zuordnung der histochemischen Eigenschaften zu einer dedizierten Neuronengruppe. Untersuchungen am Rhesusaffen zeigte, dass mit ChAT die gesamte Motoneuronpopulation, bestehend aus den Twitch und den Non-Twitch Motoneuronen, markiert werden kann (Büttner-Ennever et al. 2001; Eberhorn et al. 2005). Beide Motoneurongruppen können anhand zweier weiterer Marker, den perineuronalen Netzen identifiziert über Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane (CSPG) (Härtig et al. 1994) und die nicht-phosphorylierten Neurofilamenten (NP-NF) unterschieden werden, die von den Twitch Motoneuronen exprimiert werden, nicht aber von den Non-Twitch Motoneuronen (Eberhorn et al. 2005). Im Unterschied zu den Twitch-Motoneuronen, die immer innerhalb der Motokerne lokalisiert sind, liegen die eher kleinen bis mittelgroßen Non-Twitch Motoneurone außerhalb der Kerngrenzen der klassischen Motokerne (Büttner-Ennever et al. 2001; Eberhorn et al. 2005; Eberhorn et al. 2006).

#### **4.2 Hirnnervenkerne der extraokulären Augenmuskeln**

Die motorische Innervation der extraokulären Augenmuskeln erfolgt durch drei paarig angelegte Hirnnervenkerne und ihrer efferenten Nervenfasern.

Der Nucleus oculomotorius (nIII) liegt im Mittelhirn im Bereich des Tegmentums, unmittelbar vor dem Aquädukt und hinter den Fasern des medialen longitudinalen Faszikels (MLF) und innerviert durch den Nervus oculomotorius (NIII) den kontralateralen SR und die ipsilateralen IR, MR, IO und LP (Abb. 4). Der Nucleus trochlearis (nIV) liegt kaudolateral des nIII und innerviert über den Nervus trochlearis (NIV) den kontralateralen SO (Abb. 5). Der Nucleus abducens (nVI) liegt im Übergangsbereich der Pons zur Medulla oblongata und innerviert über den Nervus abducens (NVI) den ipsilateralen LR (Büttner-Ennever 2006) (Abb. 5).



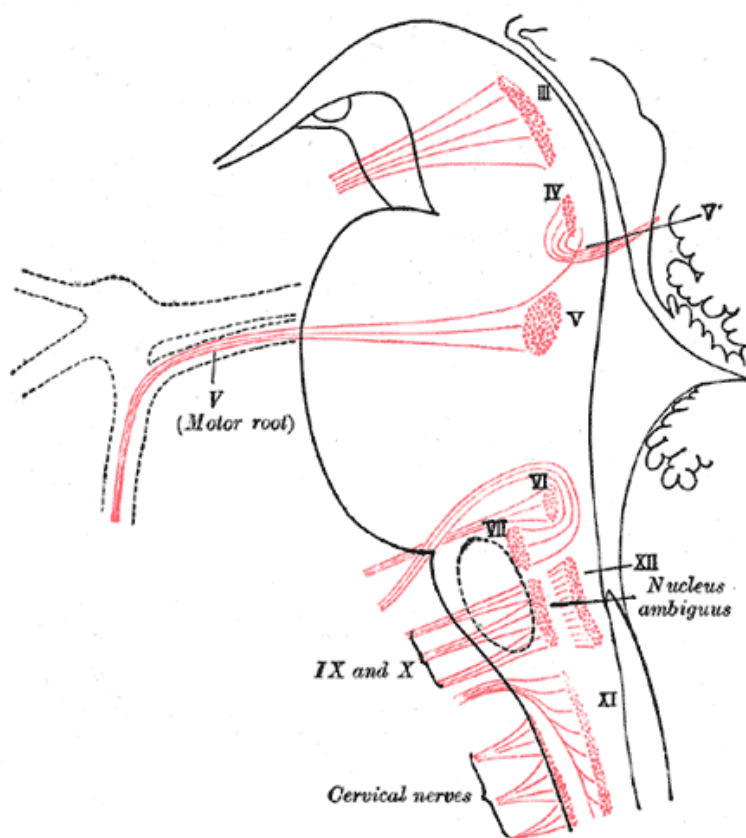


Abb. 4 – Sagittaler Schnitt durch den Hirnstamm des Menschen zur Visualisierung der Lage des Nucleus oculomotorius (III), Nucleus trochlearis (IV) und Nucleus abducens (VI) (aus der 20. U.S. Edition von “Gray's Anatomy of the Human Body”, ursprünglich 1918 publiziert).

### 4.3 Der Nucleus abducens

#### 4.3.1 Lokalisation und Aufbau

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung des Nucleus abducens, der deshalb hier ausführlicher beschrieben wird. Der Nucleus abducens ist der sechste Hirnnervenkern. Er besteht bei Vögeln und Säugetieren aus einem runden Zellcluster, der konsistent in der dorsalen Pons, unter dem Boden des vierten Ventrikels beidseits der Mittellinie unmittelbar unter dem Fazialisknie lokalisiert ist (Abb. 4). Der Durchmesser des Nucleus abducens beim Menschen beträgt je nach Alter 1,5 – 3 mm mit einer durchschnittlichen Neuronenzahl von  $6455 \pm 1481$  (Vijayashankar and Brody 1977). Die menschlichen Motoneurone besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  mit 12-20 primären Dendriten (Szabo et al. 1987).

#### 4.3.2 Die Neuronengruppen des Nucleus abducens und ihre Funktionen

Der Nucleus abducens der Säugetiere enthält mindestens vier funktionell unterschiedliche Neuronengruppen (Abb. 5) (Büttner-Ennever 2006). Die größte Gruppe bilden die Motoneurone, die den ipsilateralen LR innervieren. Eine zweite Neuronengruppe wird von den Internukleären Neuronen gebildet, deren Efferenzen rostral über den MLF zu MR-Motoneurone des kontralateralen Nucleus oculomotorius ziehen (Nakao and Sasaki 1980; Büttner-Ennever 2006) und damit die neuroanatomische Basis für horizontale konjugierte Augenbewegungen bilden (Büttner-Ennever 2005). Die Lokalisation der internukleären Neurone ist spezies-spezifisch. In Primaten sind die Motoneurone und die internukleären Neurone innerhalb des Kerngebietes des Nucleus Abducens nicht klar getrennt, während in der Katze eine gewisse Separation beider Gruppen gezeigt werden konnte (Steiger and Büttner-Ennever 1978). Eine weitere Neuronengruppe wird von einer der Paramedian-Trakt-(PMT)-Neuronen Gruppe gebildet. In den Gehirnen von Primaten inklusive des Menschen wurden mindestens 5 Gruppen von PMT-Neuronen beschrieben, die in den paramedianen Trakten beidseits der Mittellinie im Hirnstamm verteilt sind. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie von allen Hirnstammzentren, die auch zu den Augenmuskelkernen projizieren, Eingänge erhalten und Efferenzen zum Flocculus des Kleinhirns schicken (Langer et al. 1985; Büttner-Ennever and Büttner 1988; Büttner-Ennever et al. 1989). Eine dieser PMT-Gruppen liegt im Bereich des Nucleus abducens und bildet eine Art rostrale Kappe (Buresch 2005).

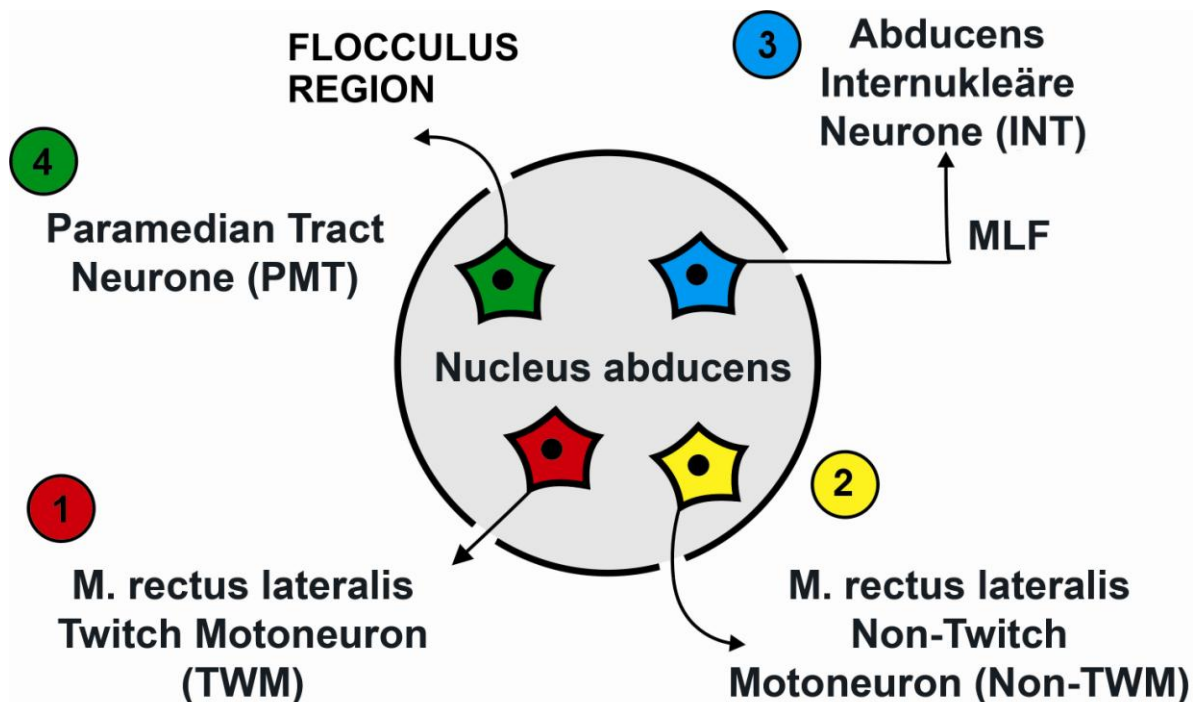


Abb. 5 – Diagramm zur Veranschaulichung der vier Neuronengruppen des Nucleus abducens und ihrer Zielstrukturen. Adaptiert nach (Büttner-Ennever 2006).

#### 4.3.2.1 Histochemische Eigenschaften der Nucleus abducens Neurone

Histochemische Studien und kombinierte Trakt-Tracer-Versuche am Rhesusaffen und Ratte zeigten, dass die Motoneurone (Twitch- und Non-Twitch) cholinerg sind, im Unterschied zu den internukleären Neuronen, die vermutlich Glutamat als Transmitter benutzen (Spencer and Baker 1986; Carpenter et al. 1992; Melendez-Ferro et al. 2000; Eberhorn et al. 2005; Eberhorn et al. 2006). Innerhalb der Motoneurone können die Twitch-Motoneurone an Hand der Expression von nicht-phosphorylierten Neurofilamenten (NP-NF) und der Assoziation mit CSPG-positiven perineuronalen Netzen von den Non-Twitch-Motoneuronen abgegrenzt werden, die für den LR in einer peripheren Gruppe um den medialen Teil des Nucleus abducens liegen (Abb. 6) (Eberhorn et al. 2005).

## Nucleus abducens

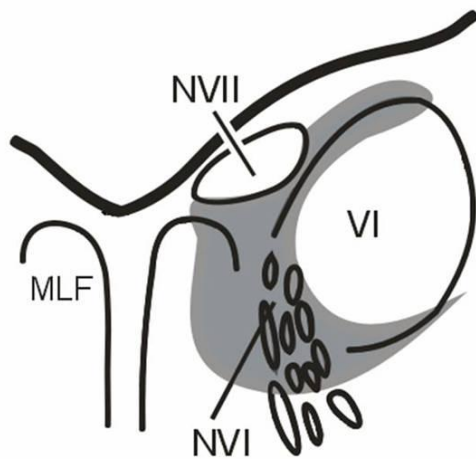


Abb. 6 – Darstellung des Areales, in dem bei retrograden Traceruntersuchungen die putativen Non-Twitch Motoneurone im Nucleus abducens gefunden wurden.

Wie die Twitch Motoneurone tragen auch die internukleären Neurone perineuronale Netze, unterscheiden sich aber im Transmitter. Die rostral im Nucleus abducens gelegenen nicht-cholinergen PMT-Neurone zeichnen sich durch eine starke Cytochromoxidase-Aktivität aus (Buresch 2005) und exprimieren vermutlich kein NP-NF. Zusammenfassend können die Neurone im Nucleus abducens anhand ihres immunhistochemischen Färbeverhaltens unterschieden werden. Die Motoneurone lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, die den Twitch und Non-Twitch Motoneuronen entsprechen. Die putativen Twitch Motoneurone sind immunreaktiv auf ChAT, CSPG und NP-NF, während die mutmaßlichen Non-Twitch Motoneurone nur immunreaktiv auf ChAT sind und keine Anfärbung auf CSPG und NP-NF zeigen (Eberhorn et al. 2005). Die internukleären Neurone und die PMT-Neurone lassen sich von den Motoneuronen unterscheiden, da sie beide ChAT-negativ sind (Eberhorn et al. 2005). Von den internukleären Neuronen ist außerdem bekannt, dass sie CSPG-positiv sind (Eberhorn et al. 2005) (Eberhorn et al., 2005).

#### **4.4 Zielsetzung des Projektes**

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel erstmalig funktionelle Neuronengruppen des humanen Nucleus abducens zu differenzieren und zu lokalisieren. Da Trakt-Tracer-Untersuchungen am Menschen aus offensichtlich ethischen Gründen nicht durchführbar sind, müssen die Untersuchungen auf immunhistochemischen Techniken basieren, die vorher an vergleichbarem Paraffinmaterial von Rhesusaffen etabliert wurden und zu ihnen in Vergleich gesetzt werden.

#### **4.5 Fragestellung**

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

1. Lassen sich im Nucleus abducens des Menschen analog zum Rhesusaffen cholinerge Motoneurone, nicht-cholinerge internukleäre Neurone und Paramedian-Trakt-Neurone identifizieren und voneinander abgrenzen? Weisen die drei Neuronengruppen eine bestimmte Anordnung zueinander auf?
2. Können im humanen Nucleus abducens wie beim Rhesusaffen mit Hilfe kombinierter Immunfärbungen auf cholinerge Marker und perineuronale Netze die Twitch- und Non-Twitch Motoneurone identifiziert werden? Wo liegen die Non-Twitch Motoneurone beim Menschen?

Folgende immunhistochemische Marker sollen zum Einsatz gebracht werden: Antikörper zur Detektion von Cholin-Acetyltransferase (ChAT), von Chondroitin Sulfat Proteoglykanen (CSPG) (Celio and Blümcke 1994) und von nicht-phosphorylierten Neurofilamenten (SMI-32) (Sternberger and Sternberger 1983; Sternberger 1986).

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Rhesusaffe**

Für den direkten Vergleich zu den Untersuchungen an menschlichem Gewebe wurden Paraffinschnitte von dem Hirnstamm eines Rhesusaffens (Z30) benutzt, die aus einem früheren anatomischen Projekt der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen. Der Rhesusaffe wurde nach intravenöser Applikation einer Überdosis Nembutal (96 mg/kg) eingeschläfert und transkardial mit physiologischer Kochsalzlösung und nachfolgend mit gepufferter 4%igen Paraformaldehydlösung perfundiert (PFA) (Horn et al. 1994). Der Hirnstamm wurde in zwei Blöcke zerlegt, die in Paraffin eingebettet wurden.

### **5.2 Mensch**

Es wurden vier menschliche Gehirne untersucht, die aus der Hirnbank (Brain-Bank) der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Einverständnis der dortigen Ethikkommission zur Verfügung gestellt wurden.

Es wurden vier Fälle ausgewählt, die keine neurologische Erkrankungen, insbesondere keine okulomotorische Erkrankungen zu Lebzeiten besaßen.

Fall M1 (Paraffinfall) war weiblichen Geschlechts, verstorben an einer Lungenembolie. Das Hirngewicht betrug 1220 g. Nach der Obduktion wurde das Gehirn in Fixativ mit 10% Formalin für 6 Tage eingelegt, dann in etwa 1cm dicke Blöcke in Transversalebene zerlegt und in Paraffin eingebettet. Für die Färbexperimente wurde ein Block (Block 2) benutzt, der die Medulla oblongata und den kaudalen Abschnitt der Pons mit dem Nucleus abducens enthielt.

Fall M2 (Paraffinfall) war männlichen Geschlechts, verstorben an Linksherzversagen. Das Hirngewicht betrug 1450 g. Nach der Obduktion wurde das Gehirn in Fixativ mit 10% Formalin für 6 Tage eingelegt, dann in etwa 1cm dicke Blöcke in Transversalebene zerlegt und in Paraffin eingebettet.

Fall M3 (Gefrierfall) war männlichen Geschlechts, verstorben an einer Überdosis Betäubungsmittel. Nach der Obduktion wurde das Gehirn ohne vorherige Fixierung direkt in der Transversalebene zerlegt, in Tissue Tech eingebettet, mit Isopentan bei -60°C eingefroren und

in der Tiefkühltruhe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für die Färbungen wurde ein Block (Block 2) benutzt, der die Medulla oblongata, sowie den kaudalen Abschnitt der Pons mit dem Nucleus abducens enthielt.

Fall M4 (Gefrierfall) war männlichen Geschlechts, verstorben an einem Herzstillstand. Nach der Obduktion wurde das Gehirn in Isopentan blockiert, bei  $-60^{\circ}\text{C}$  eingefroren und in einer Tiefkühltruhe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für die Experimente wurde ein Block (Block 3) benutzt, der den kaudalen Abschnitt der Pons mit dem Nucleus abducens enthielt.

### **5.3 Präparation**

Von den Obduktionsfällen wurde der Abschnitt vom Diencephalon bis zum Hirnstamm präpariert und von Hirnhautresten befreit. Die cerebralen Gefäße wurden von verbliebenen korpuskulären Blutbestandteilen gereinigt, die eine endogene Peroxidaseaktivität besitzen und dadurch in den durchzuführenden immunhistochemischen Untersuchungen unspezifische Färbeartefakte produzieren können (Bourne 1983). Die Präparate wurden danach für 1-2 Tage in 4% Paraformaldehyd (in 0,1M PBS mit einem pH-Wert von 7,4). Nach der Aushärtung wurden die Präparate in kleinere Blöcke zur Fixierung und weiteren Verarbeitung geschnitten. Gewebe für Gefrierschnitte wurde direkt am Kryostat geschnitten, die Gewebsblöcke von zwei Fällen wurden zur weiteren Bearbeitung in Paraffin eingebettet.

### **5.4 Gefrierschnitte**

Die Gefrierschnitte wurden ohne Fixierung im gefrorenen Zustand mit TissueTech auf einem Objektisch befestigt und mit einem Mikrotom-Kryostat (Cryo-Star HM 560MV, Microm)  $20\ \mu\text{m}$  dünn geschnitten. Die Schnitte wurden danach einzeln auf einen Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser) aufgefangen und danach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung aufbewahrt.

### **5.5 Paraffinschnitte**

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Hirnblöcke in einem Fixativ mit 10% Formalin für 6 Tage eingelegt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Blöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom der Firma R. Jung AG Heidel-

berg in einer Schnittdicke von 10 µm (M1) oder 5 µm (M2) geschnitten, in einem Wasserbad (Temperatur < 50°C) gestreckt und auf Superfrost - Objektträger aufgezogen.

## **5.6 Die Färbung - Grundschnitte**

### 5.6.1 Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte müssen vor der Durchführung einer immunhistochemischen Färbung eine Reihe von Prozeduren durchlaufen, um optimale Färbeergebnisse zu erzielen.

Der erste Schritt ist die vollständige Entfernung des Paraffins in einem Xylol-Bad, sowie die Rehydrierung des Schnittes mit einer absteigenden Alkoholreihe:

- 1h Xylol (oder über Nacht in Xylol)
- 10 min 100% Alkohol
- 10 min 96% Alkohol
- 10 min 90% Alkohol
- 10 min 70% Alkohol
- 10 min aqua dest.

### 5.6.2 Antigen-Demaskierung

Der zweite Schritt beinhaltet die Antigen-Demaskierung, die üblicherweise durch feuchte Hitze erreicht wird. Für dieses Projekt wurden drei unterschiedliche Arten der Demaskierung getestet, um die optimale Methode zu finden. Vor allem bei den humanen Schnitten war es schwierig mit den üblichen Demaskierungsmethoden des Wasserbades oder der Mikrowelle eine gute Antigen-Demaskierung zu erreichen. Die Konsequenz war eine schwache Färbung und somit eine schwierige oder unmögliche Interpretation der Ergebnisse.

Infolgedessen wurde eine neuere Methode der Antigen-Demaskierung eingeführt, die das Kochen der Schnitte mit Hilfe eines Dampfkochtopfes beinhaltet (Bankfalvi et al. 1994). In der Literatur wurde mit dieser Methode bessere Färbeergebnisse beschrieben, die auch für die Schnitte dieses Projektes zutrafen (Dianova).



#### 5.6.2.1 Wasserbadvorbehandlung

Die Schnitte wurden für die Antigen-Demaskierung mit dem Wasserbad in ein Färbegestell einsortiert und bei 80°C für 15 min in einem Natrium-Citrat-Puffer (pH-Wert 8,8) gekocht.

#### 5.6.2.2 Mikrowellenvorbehandlung

Für die Antigen-Demaskierung mit der Mikrowelle wurden die Schnitte in einem Färbegestell platziert, dann in ein Mikrowellen-geeignetem Gefäß, z.B. einem Plastik- oder Glasgefäß eingetaucht, das mit Natrium-Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0) gefüllt war und zweimal 5 min gekocht (Shi et al. 1991; Cattoretti et al. 1992; Cattoretti et al. 1993; Munakata and Hendricks 1993). Die mehrfache Kochung (z.B. à 5 min) wird empfohlen, um die beim Kochen verdunstete Flüssigkeit durch aqua dest. ersetzen zu können. So wird verhindert, dass die Schnitte während des Kochvorganges austrocknen.

#### 5.6.2.3 Dampfkochtopfvorbehandlung

Die Technik der Vorbehandlung mit einem Dampfkochtopf wird auch „feuchtes Autoklavieren“ genannt (Bankfalvi et al. 1994). Die Schnitte werden auch bei dieser Methode auf einem Färbegestell platziert. Der Dampfkochtopf wird zu einem Drittel mit 0,01M Natrium-Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0) gefüllt und auf einer Herdplatte zum Kochen gebracht. Die Paraffinschnitte werden in den kochenden Natrium-Citrat-Puffer gelegt und der Dampfkochtopf verschlossen. Wenn der Dampfdruck das Maximum erreicht hat, werden die Schnitte weitere 2 min bei maximalem Druck autoklaviert. Danach wird der Dampfkochtopf vom Herd entfernt und unter kaltem Wasser abgekühlt. Im Folgenden kann der Dampfkochtopf geöffnet und die Paraffinschnitte entnommen werden. Zum Abschluss werden die Paraffinschnitte zweimal mit Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen.

## 5.7 Die immunhistochemische Färbung

### 5.7.1 Antikörper

#### 5.7.1.1 Cholin Acetyltransferase (ChAT)

Motoneurone gehören zu der Gruppe cholinergere Zellen im zentralen Nervensystem (Ichikawa and Shimizu 1998; Oda 1999), deren Neurotransmitter Acetylcholin ist. Zu dieser Gruppe gehören neben den Motoneuronen, auch präganglionische autonome Neuronen, postganglionische parasymphatische Neuronen, verschiedene Hirnregionen und einige neuron-ähnliche Stammzellen. ChAT ist das entsprechende Enzym, das für die Biosynthese von Acetylcholin benötigt wird. Es lässt sich daher nur in cholinergen Nervenzellen und Nervenfasern nachweisen. Für dieses Projekt wurde für die Detektion der cholinergen Zellen ein in der Ziege (AB144P, Chemicon), sowie ein in Kaninchen (AB143, Chemicon) hergestellter Antikörper gegen humanes ChAT benutzt (Tabelle 1). Das Kaninchen anti-ChAT Produkt erbrachte allerdings ein nur sehr schwaches Färbeergebnis, das nicht auswertbar war.

#### 5.7.1.2 Chondroitin Sulfat Proteoglykane (CSPG)

Perineuronale Netze sind Bestandteile der extrazellulären Matrix des Gehirns, die eine Art Calyx um die neuronalen Somata bilden (Brauer et al. 1982; Celio and Blümcke 1994; Celio et al. 1998). Die extrazelluläre Matrix ist bedeutsam für die Entwicklung und Erhaltung der neuronalen Aktivität, der Signalübertragung, Ernährung und vermutlich auch der Regeneration (Carlson and Hockfield 1996). Die perineuronalen Netze lassen sich mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Cat-301, einem großmolekularen Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSPG, 550 kDa), das sich auf der Oberfläche der Neurone befindet, markieren (MAB5284, Chemicon, Tabelle 1).

#### 5.7.1.3 Nicht-phosphorylierte Neurofilamente (NP-NF)

Das Auftreten von nicht-phosphorylierten Neurofilamenten wurde für cholinerge Neurone mit allen Hirnnervenkernen beschrieben (Tsang et al. 2000). Sie können mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen ein „Epitop des Neurofilamentes H“ (SMI-32) detektiert werden (Clone 02-135, Sternberger Monoclonals Inc., Tabelle 1) (Sternberger and Sternberger 1983; Sternberger 1986).

#### 5.7.1.4 Herstellerübersicht der Antikörper

Antikörper	Wirt	Antigen	Nummer	Hersteller	Verdünnung
ChAT	Kaninchen, polyklonal	Choline-Acetyltransferase	AB143	Chemicon, Temecula CA	1:250
ChAT	Ziege, polyklonal	Choline-Acetyltransferase	AB144P	Chemicon, Temecula CA	1:100
CSPG	Maus, monoklonal	Chondroitin Sulfat Proteoglykane	Clone Cat-301, MAB5284	Chemicon, Temecula CA	1:100
CSPG	Kaninchen	Chondroitin Sulfat Proteoglykane	2083-5005	Biogenesis, Poole, United Kingdom	1:1000
SMI-32	Maus	Nicht-phosphorylierte Neurofilamente	Clone 02-135	Sternberger Monoclonals Inc., Luthervill MD	1:5000

Tab. 1 – Übersicht der angewendeten Antikörpern

##### 5.7.1.1 Färbeverhalten der humanen Fälle

Humane Hirnschnitte sind erfahrungsgemäß nicht immer einfach zu färben. Ein Grund dafür ist, dass die Latenzzeit zur Fixierung nicht standardisiert durchgeführt werden kann, so dass das Hirngewebe meist einer unterschiedlich langen Zersetzungszeit ausgesetzt ist.

Die humanen Gefrierfälle und Paraffinfälle zeigten ein unterschiedliches Anfärbeverhalten für verschiedene Methoden. Die Gefrierschnitte zeigten zwar ein sehr gutes Färbeverhalten für den enzymatischen Nachweis von Cytochromoxidase, aber nur eine sehr schwache Immunfärbung auf die hier untersuchten Antigene (M3, M4). Deshalb erfolgte die Auswertung der hier erhobenen Immunzytochemie-Färbe-Daten an den Paraffinfällen (M1, M2).

##### 5.7.1.2 Verdünnungsreihen

Für die immunhistochemischen Färbungen existieren für die spezifischen Primärantikörper eine Empfehlung über die anzuwendende Verdünnung. Da das Färbeverhalten der humanen Fälle teilweise sehr unterschiedlich war, wurde vor jedem Versuch eine Färbereihe des entsprechenden Falles mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers getestet, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Die für die Fälle optimale Antikörperkonzentration ist in Tabelle 1 ersichtlich.

### 5.7.2 Einfache immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung erfolgte auf den flach liegenden entparaffinierten Schnitten über eine Immun-Peroxidase-Methode mit abschließendem Nachweis der eingebrachten Peroxidase mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid. Ihr ging jeweils eine Inhibition endogener Peroxidasen des untersuchten Schnittes voraus, die den Zweck hatte eine unspezifische Anfärbung zu verhindern (Bourne 1983). Hierfür wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (RT) in einer Lösung aus 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10% Methanol und 0,1M Phosphatpuffer (PB) inkubiert.

An eine einstündige Präinkubation mit 5% Esel-Normalserum (Verdünnung in 0,1M PB mit 0,3% Triton-X 100) für ChAT oder CSPG-Nachweis oder in 5% Pferde-Normalserum (in 0,1M PB mit 0,3% Triton-X 100) für NP-NF-Nachweis schloss sich die Inkubation im spezifischen Primärantikörper an. Dazu wurden die Objektträger entweder mit Ziege anti-Cholin Acetyltransferase (1:100) oder Kaninchen anti-CSPG (1:1000) oder Maus anti-NP-NF (1:5000) überschichtet und über Nacht bei RT belassen. Nach drei Waschgängen in Puffer folgte die Inkubation in biotinylierten Esel anti-Ziege (1:500) (für ChAT) oder in biotinylierten Esel anti-Kaninchen (1:50) (für CSPG) oder in biotinylierten Pferde anti-Maus (1:200) (für NP-NF) für 1 Stunde bei RT. Auf drei Pufferwaschgänge folgte eine einstündige Inkubation in einem Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (ABC Kit; 1 Tropfen A und 1 Tropfen B in 5 ml 0,1M PBS) oder Extraavidin Peroxidase (E-2886, Sigma, Aldrich, St. Louis, MO; 1:1000). Nach gründlicher Waschung wird die eingebrachte Peroxidase in einer Reaktion mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid im Schnitt sichtbar gemacht. Das oxidierte Chromogen setzt sich als feiner Niederschlag am Ort der Antikörperbindung ab. Die Reaktion wird nach mikroskopischer Kontrolle etwa nach 10 Minuten mit einer Pufferwaschung beendet.

Danach wurden die Schnitte mit 0,1M PBS gespült, in einer Alkoholreihe entwässert und eingedeckt. Die genauen Arbeitsanweisungen sind im Anhang aufgeführt.

### 5.7.3 Doppelimmunperoxidase -Färbung

#### 5.7.3.1 ChAT und CSPG

Immunhistochemische Färbungen können auch mit zwei Primärantikörpern gegen zwei unterschiedliche Antigene – hier ChAT und CSPG – durchgeführt werden. Die Immunfärbungen erfolgen hierfür hintereinander, wobei die Visualisierung des ersten Antikörpers mit Hilfe von DAB, die des zweiten Antikörpers mit einer mit Nickel-Ionen intensivierten DAB-Reaktion durchgeführt wird. Die einfache DAB-Reaktion produziert eine braune Färbung, die DAB-Nickel-Reaktion eine schwarze Färbung (genaue Färbeprotokolle siehe Anhang). Es ist wichtig dabei, darauf zu achten, dass die Primärantikörper nicht aus derselben Spezies stammen, damit ungewünschte Kreuzreaktionen vermieden werden.

#### 5.7.3.1 Nissl

Nach der initialen immunhistochemischen Färbung mit einem spezifischen Antikörper, ist es möglich die Gehirnschnitte zusätzlich mit einer Nissl-Färbung gegenzufärben. Dadurch werden Zellen visualisiert, die nicht positiv auf den Antikörper der gewünschten Immunfärbung reagiert haben und man erhält die Möglichkeit die Morphologie und Lage der unterschiedlich gefärbten Zellgruppen zu untersuchen und zu vergleichen. Sie erfolgte nach einer gängigen Labormethode mit 0,5% Kresylviolett nach Nissl (siehe Anhang).

### 5.7.4 Entwässerung und Eindeckung

Die fertig gefärbten Gehirnschnitte wurden luftgetrocknet, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und danach für 30 min in einem Xylol-Bad eingelegt. Danach wurden sie mit „DPX Mountant for Histology“ (Fluka 44581) eingedeckt.

## 5.8 Auswertung

Die gefärbten histologischen Präparate wurden mit MIRAX SCAN (Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Deutschland) eingescannt und digitalisiert. Der Scanner ist eigens für die Digitalisierung von histologischen Schnitten entwickelt worden und ermöglicht eine bis zu 40-fache Vergrößerung der Scans.

Mit einer korrespondierenden Software (Mirax Viewer, Carl Zeiss, MiroImaging GmbH, Deutschland) wurden die einzelnen digitalisierten Schnitte betrachtet. Zuerst wurde der Nucleus abducens identifiziert und dann seitengetreunt (rechte und linke Seite separat) in einer Übersicht photographiert (integrierte Softwarefunktion des Mirax Viewers) und ausgedruckt.

Der nächste Schritt bestand aus der genauen Analyse der immunhistochemischen Färbung der einzelnen Zellkörper des Nucleus abducens. Die Zellen wurden entsprechend ihrer histologischen Färbung/-en auf den Übersichtsaufnahmen markiert und diese nach Beendigung des Prozesses eingescannt und digitalisiert. Mit Corel Draw X4 (Corel Cooperation, Ottawa, Kanada) wurde eine Maske auf den digitalisierten Schnitt gelegt und die unterschiedlich markierten Zellen manuell mit unterschiedlichen Farbkreisen geplottet, um eine schematisierte Übersicht über die Zellanordnung zu erhalten. Nur die Neurone mit einem sichtbaren Zellkern wurden gewertet. Coexpression von ChAT und NP-NF in benachbarten 5µm Paraffinschnitten vom Menschen (M2) wurde durch Übereinanderlagern der digitalen Schnitte (Adobe Photoshop CS4, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA) untersucht und ebenfalls ausgeplottet (Corel Draw X4, Corel Cooperation, Ottawa, Kanada).

Die mikroskopischen Übersichtsaufnahmen wurden anhand der digitalisierten Histologieschnitte angefertigt und mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop CS4, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA) entsprechend der Helligkeit und dem Kontrast unter dem Lichtmikroskop gefenstert. Die Detailaufnahmen wurden mit einer über einem Lichtmikroskop (Leica DMRB, Bensheim) aufmontierten Digital-Kamera (Pixera Pro 600ES; Klughammer) photographiert, Helligkeit und Kontrast im Nachhinein mit Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS4, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA) an Hand des mikroskopischen Bilds optimiert.

#### 5.8.1 Quantitative Analyse der funktionellen Neuronengruppen im Nucleus abducens

Für eine angenäherte quantitative Einschätzung der unterschiedlichen Zellpopulationen wurden die immunzytochemisch gefärbten Zellen der vier analysierten Schichten im rostrocaudalen Verlauf des Nucleus abducens entsprechend ihrer histochemischen Eigenschaften gezählt und zu der Gesamtzahl aller markierten Zellen in Relation gesetzt. Zur Bestimmung der Anzahl der Twitch Motoneurone wurden die Zellen, die ChAT-positiv und gleichzeitig CSPG- oder SMI-32 positiv waren gezählt, zur Bestimmung der Anzahl der Non-Twitch Mo-

toneurone die ChAT-positiven und gleichzeitig CSPG- oder SMI-32-negativen. Die Anzahl der internukleären Neurone ergab sich aus Zählung der ChAT-negativen, aber CSPG-positiven Zellen. Der prozentuale Anteil wurde aus dem Verhältnis der einzelnen Neuronengruppen zur Gesamtzahl aller markierten Neuronen ermittelt.

## **6 Ergebnisse**

### **6.1 Affen**

#### **6.1.1.1 ChAT/CSPG Doppelfärbung im Nucleus abducens**

Der Nucleus abducens hebt sich in der ChAT-CSPG Doppelfärbung durch die Neuropilfärbung der CSPG Komponente deutlich von seiner Umgebung ab (Abb. 7). Die ChAT-Immunreaktivität erscheint in schwarz, die CSPG-Färbung in braun. Exemplarisch wurden vier Schnittebenen von rostral nach kaudal analysiert.

In der rostralen Ebene erscheint der Nucleus abducens mediodorsal aufgelockert durch die wegführenden Fasern des Nervus abducens (Abb. 7, A, B). In den mittleren Ebenen zeigt er die größte Ausdehnung (Abb. 7, C – F) mit disseminierter Verteilung der markierten Neurone und auf der kaudalen Ebene erscheint er besonders klein, nur mit vereinzelt Neuronen und in seiner Integrität durchbrochen durch die Fasern des Nervus facialis und des Fazialis-Knie (Abb. 7, G, H).



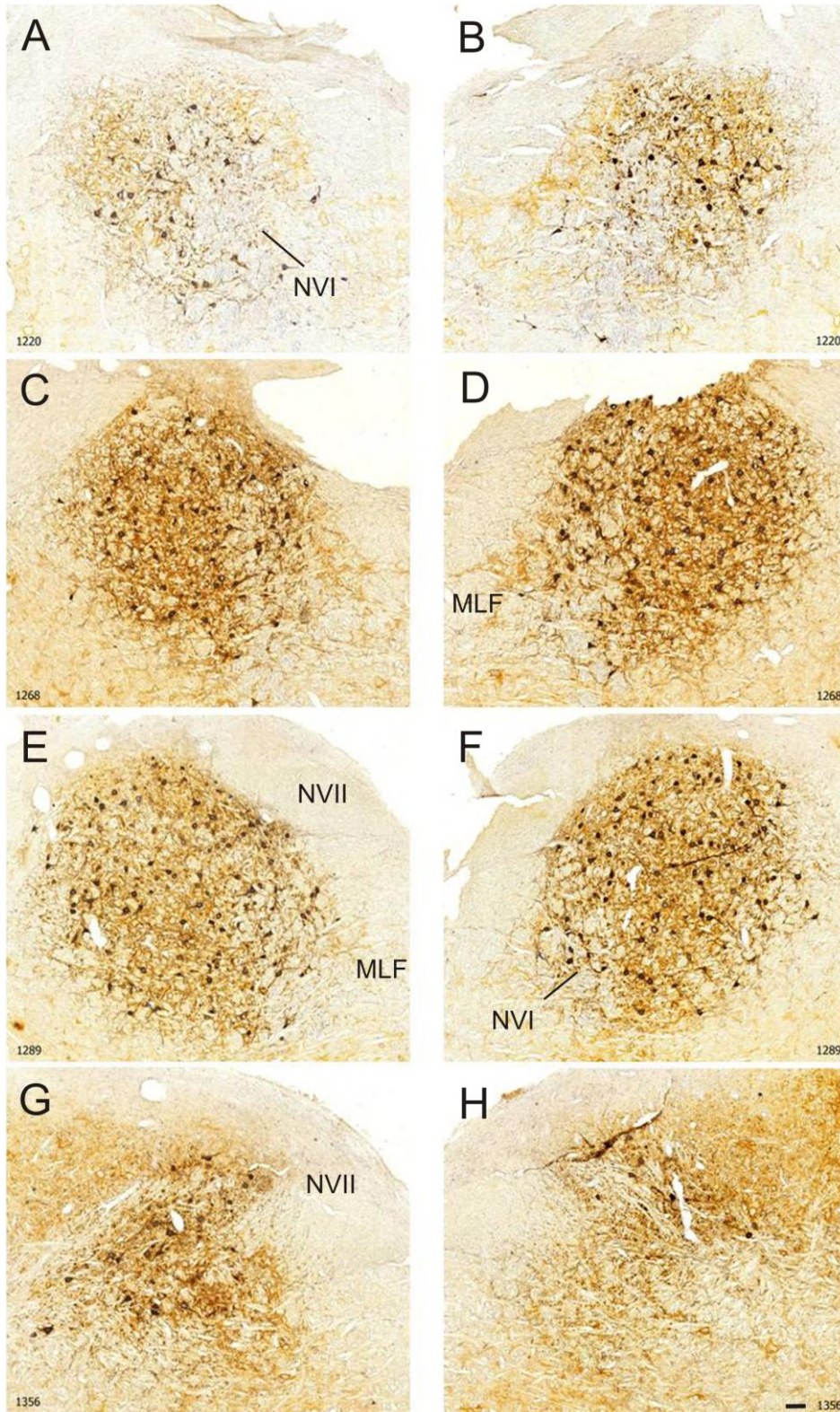


Abb. 7 – Beidseitige Übersichtsaufnahmen des Nucleus Abducens beim Affen auf verschiedenen transversalen Schnittebenen in rostro-caudaler Anordnung. Die Schnitte zeigen Doppelfärbungen auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun). Maßstab 100  $\mu$ m (H).

Die ChAT Färbung erfasst alle cholinergen Neurone, also die gesamte Population der Motoneurone. Die Färbung zeigt zwei morphologisch etwas unterschiedliche Neuronengruppen innerhalb des Nucleus abducens. Eine Gruppe besteht aus zahlreichen großen Neuronen mit polygonalen Somata, die sich innerhalb der Begrenzung des Nucleus abducens befinden. Die zweite Gruppe besteht aus einer geringeren Zahl Neuronen, die kleiner erscheinen mit eher rundlich-ovalen Somata, die partiell in der medialen Peripherie und partiell innerhalb des Nucleus abducens verteilt liegen.

Die CSPG Färbung markiert ebenfalls zahlreiche große Neurone mit polygonalen Somata innerhalb der Begrenzung des Nucleus abducens.

Die kombinierte Doppelfärbung mit ChAT und CSPG ist in der Lage, die Neurone noch genauer zu klassifizieren. Die ChAT-positiven Neurone, die der Population mit großen Somata angehören, tragen alle perineuronale Netze und können aufgrund früherer Arbeiten als Twitch Motoneurone interpretiert werden (Eberhorn et al. 2005) (Abb. 8). Die ChAT-positiv Population mit den kleineren Zellsomata trägt hingegen keine perineuronalen Netze und kann daher als Non-Twitch Motoneurone angesprochen werden (Abb. 8).

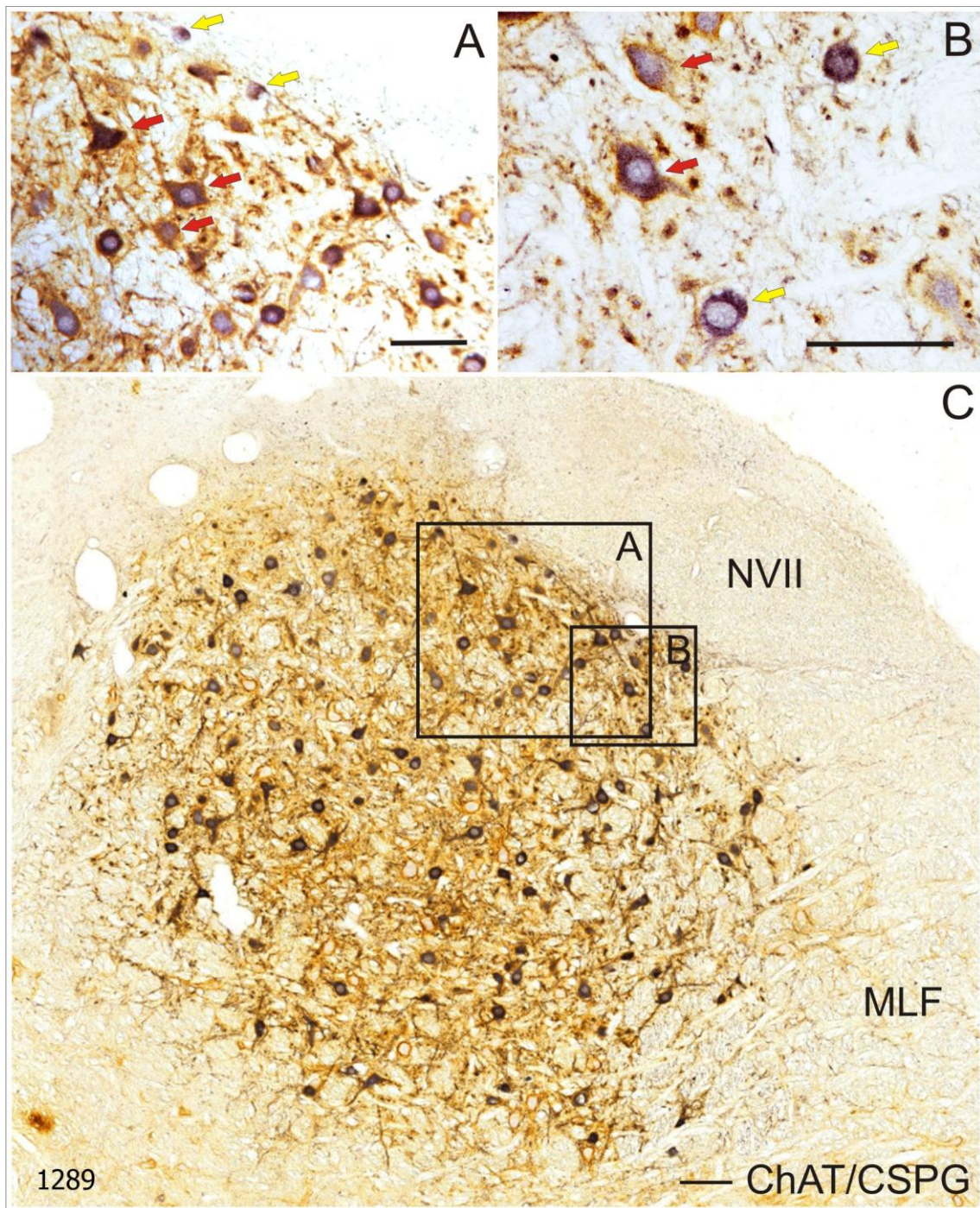


Abb. 8 – Detailaufnahmen (A, B) von den ChAT/CSPG-positiven Neuronen im Nucleus abducens beim Rhesusaffen (C). ChAT-positive Neurone mit CSPG-positiven perineuronalen Netzen repräsentieren putative Twitch-Motoneurone (rote Pfeile) und ChAT-positive, aber CSPG-negative Neurone, entsprechen den putativen Non-Twitch Motoneuronen (gelbe Pfeile). ChAT – schwarz, CSPG – braun. Maßstab 100  $\mu$ m.

In der Doppelfärbung demarkiert sich noch eine weitere Gruppe von Neuronen mit großen Zellsomata, die perineuronale Netze tragen, allerdings nicht cholinerg sind (Abb. 9). Diese Population repräsentiert vermutlich die nicht-cholinergen internukleären Neurone, die bekannterweise Netze tragen (Eberhorn et al. 2005). In der rostralen Ebene findet sich eine weitere Neuronengruppe mit den gleichen histochemischen Eigenschaften, die etwas peripher des eigentlichen Kerngebietes liegt und den PMT-Neuronen entsprechen könnten (Abb. 10).

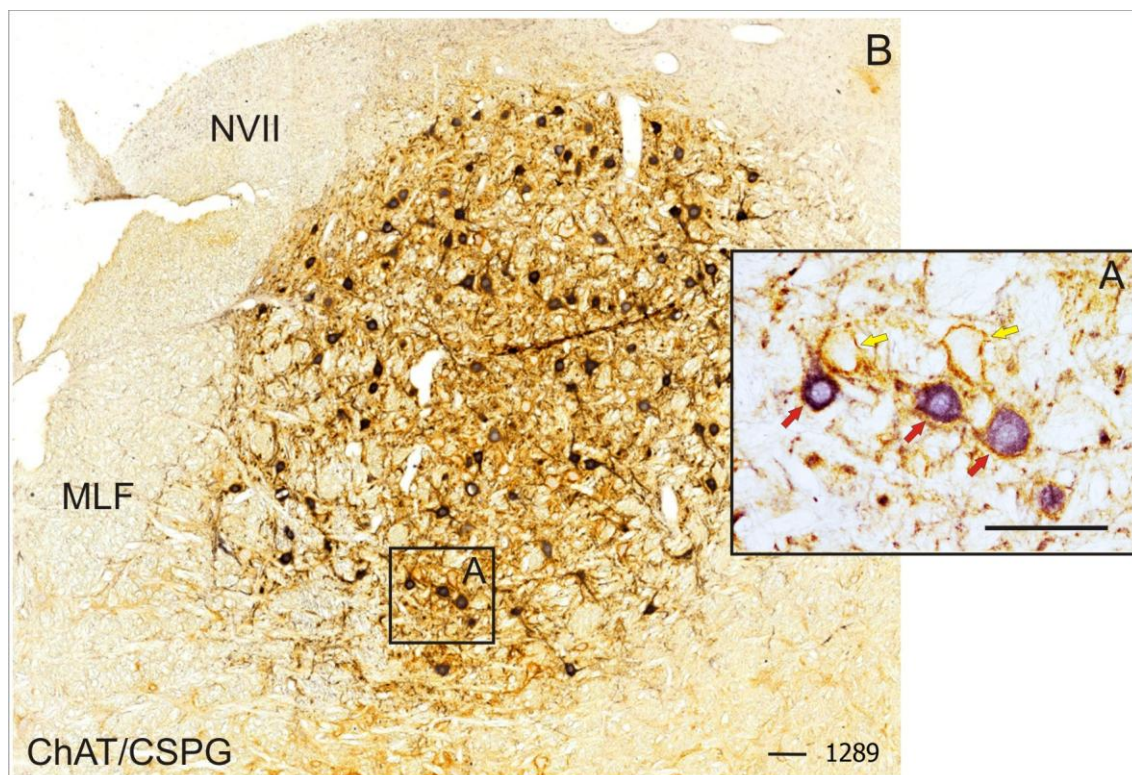


Abb. 9 – Zentrale Detailaufnahmen (A, B) von ChAT/CSPG-positiven Neuron im Nucleus abducens beim Rhesusaffen. Putative Twitch-Motoneuronen sind ChAT und CSPG-positiv (rote Pfeile) und ChAT-negativ, aber CSPG-positiv. Neurone, die ChAT-negativ, aber CSPG-positiv sind, repräsentieren putative internukleäre Neurone (gelbe Pfeile). ChAT- schwarz, CSPG – braun. Maßstab 100  $\mu$ m.

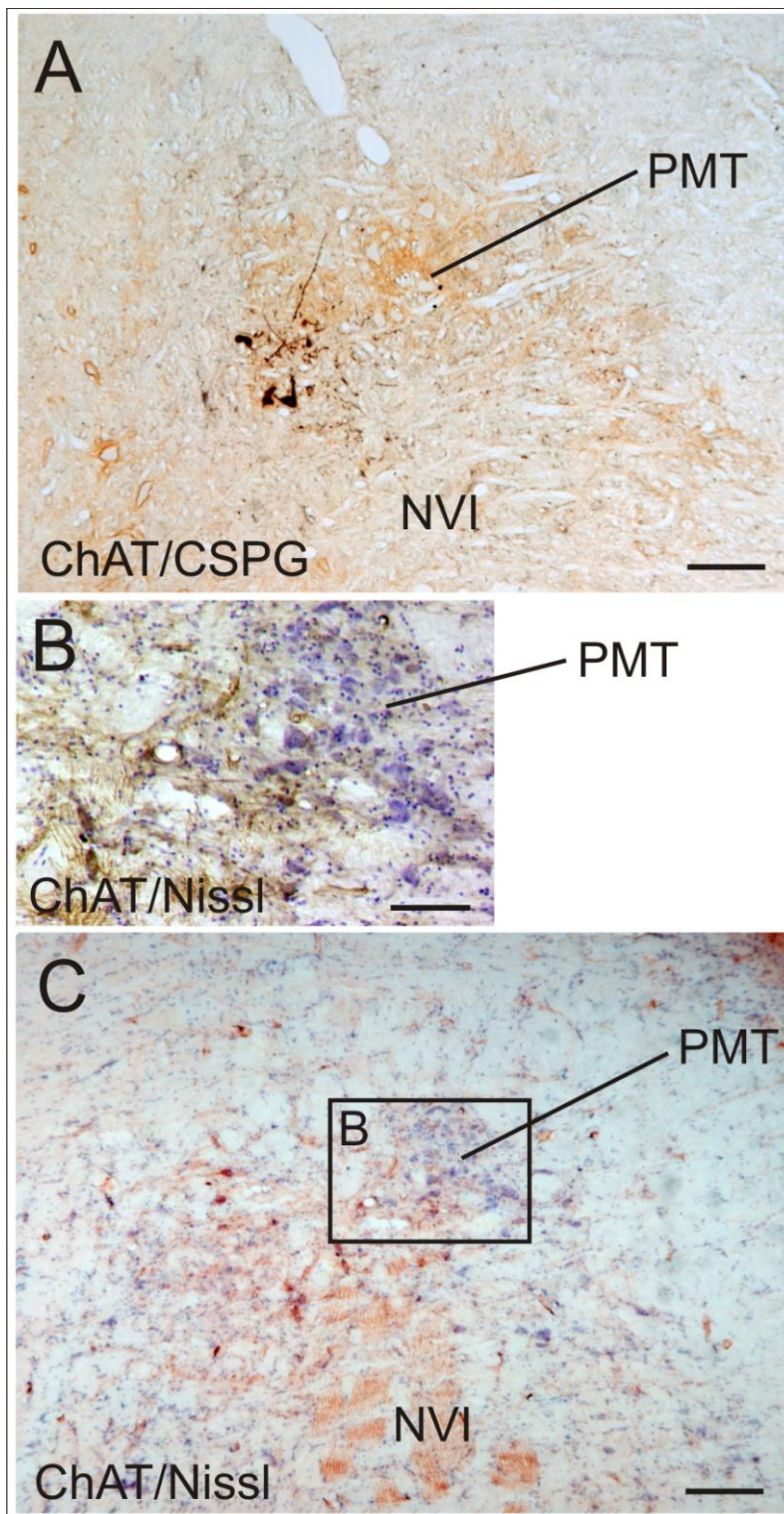


Abb. 10 – Detailaufnahme der putativen PMT-Neurone in der rostralen Ebene des Rhesusaffen anhand einer ChAT/CSPG Doppelfärbung (A). Bild C zeigt einen Nachbarschnitt, mit einer ChAT/Nissl Doppelfärbung. Die Vergrößerung B zeigt Zellkörper, die peripher des eigentlichen Kerngebietes liegen und ChAT-negativ sind, aber perineuronale Netze (vgl. Gebiet in A) tragen. ChAT – schwarz, CSPG – braun. Maßstab A,C 100  $\mu\text{m}$ ; B 200  $\mu\text{m}$ .

### 6.1.1.2 Twitch- und Non-Twitch Motoneuronen im Nucleus abducens des Rhesusaffen

In den rostralen Schnitten liegen ChAT-positive Neurone ohne Netze, die den putativen Non-Twitch Motoneurone entsprechen, interponiert zwischen den proximalen Nervenwurzeln des Nervus abducens, sowie vereinzelt disseminiert zwischen den ChAT-positiven Neuronen mit Netzen, die den putativen Twitch Motoneuronen innerhalb des Kerngebietes entsprechen (Abb. 11, A, B). Auf den mittleren Ebenen liegen die putativen Non-Twitch Motoneurone ebenfalls verstreut zwischen den putativen Twitch Motoneuronen im Hauptkerngebiet mit einer Tendenz zur Lage in der medialen Hälfte, allerdings ohne eindeutige fokale Kumulation (Abb. 11, C – F). Auf den kaudalen Ebenen liegen linksseitig die putativen Non-Twitch Motoneurone tendenziell in der lateralen Peripherie des Kerngebietes (Abb. 11, G). Auf der korrespondierenden rechten Seite waren in unserem Fall keine putativen Non-Twitch Motoneurone mehr abgrenzbar (Abb. 11, H). Diese asymmetrische Verteilung ist vermutlich bedingt durch die etwas unterschiedliche Schnittebene, die rechts im Vergleich zur linken Seite weiter kaudal liegt und geringere Anteile des Nucleus abducens erfasst.

Die Gesamtzahl der analysierten ChAT-positiven Motoneurone im Nucleus abducens beträgt linksseitig  $n = 326$  und rechtsseitig  $n = 275$ . Von diesen lassen sich 89% links und 92% rechts den putativen Twitch und 11% links und 8% rechts den putativen Non-Twitch Motoneuronen zuordnen.

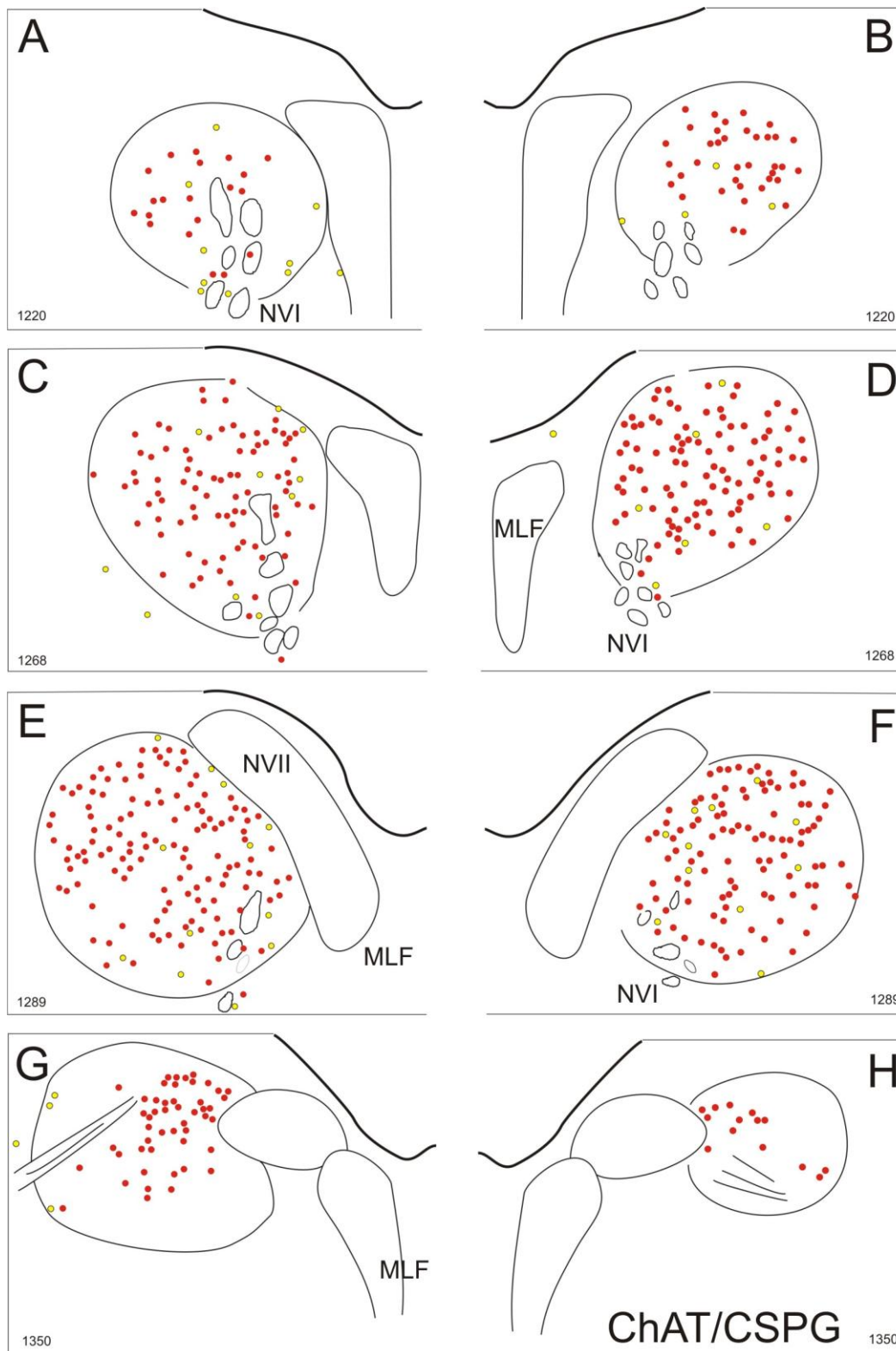


Abb. 11 – Plots der ChAT/CSPG Doppelfärbung auf rekonstruierten Transversalschnitten durch den Nucleus abducens des Rhesusaffen (Z30) in rostro-caudaler Anordnung: rote Punkten repräsentieren putative Twitch-Motoneurone (ChAT- und CSPG-positiv), gelbe Punkte putative Non-Twitch Motoneurone (ChAT-positiv, CSPG-negativ).

### 6.1.1.3 Motoneuronen und internukleäre Neuronen im Nucleus abducens des Rhesusaffen

Im Gegensatz zur disseminierten Lage der putativen Motoneurone (Twitch- und Non-Twitch Motoneurone) innerhalb des gesamten Kerngebiet des Nucleus abducens, fand sich eine tendenziell bandförmige Anordnung der putativen internukleären Neurone von dorso-lateral nach ventro-medial im mittleren und vorderen Drittel des Nucleus abducens (Abb. 12). In der rostralen Ebene demarkiert sich weiterhin eine kleine Gruppe von Neuronen mit den gleichen immunhistochemischen Eigenschaften wie die putativen internukleären Neurone (nicht-cholinerg, CSPG-positiv), die medial des eigentlichen Nucleus abducens im Bereich des MLF liegen (Abb. 10; Abb. 12, A, B). Aufgrund ihrer Lage, könnte diese Gruppe den PMT-Neuronen entsprechen (Buresch 2005).

Insgesamt können auf den ausgewerteten Schnittebenen 515 Neurone links und 401 Neurone rechts im Nucleus abducens identifiziert werden. Von diesen lassen sich 63% links und 69% rechts den ChAT-positiven Motoneuronen und 37% links und 31% rechts den ChAT-negativen putativen internukleären Neuronenzuordnen, wobei ein kleiner Anteil davon den PMT-Neuronen entspricht. Weitere Kriterien sind notwendig, um diese beiden Gruppen sicher voneinander abzugrenzen.



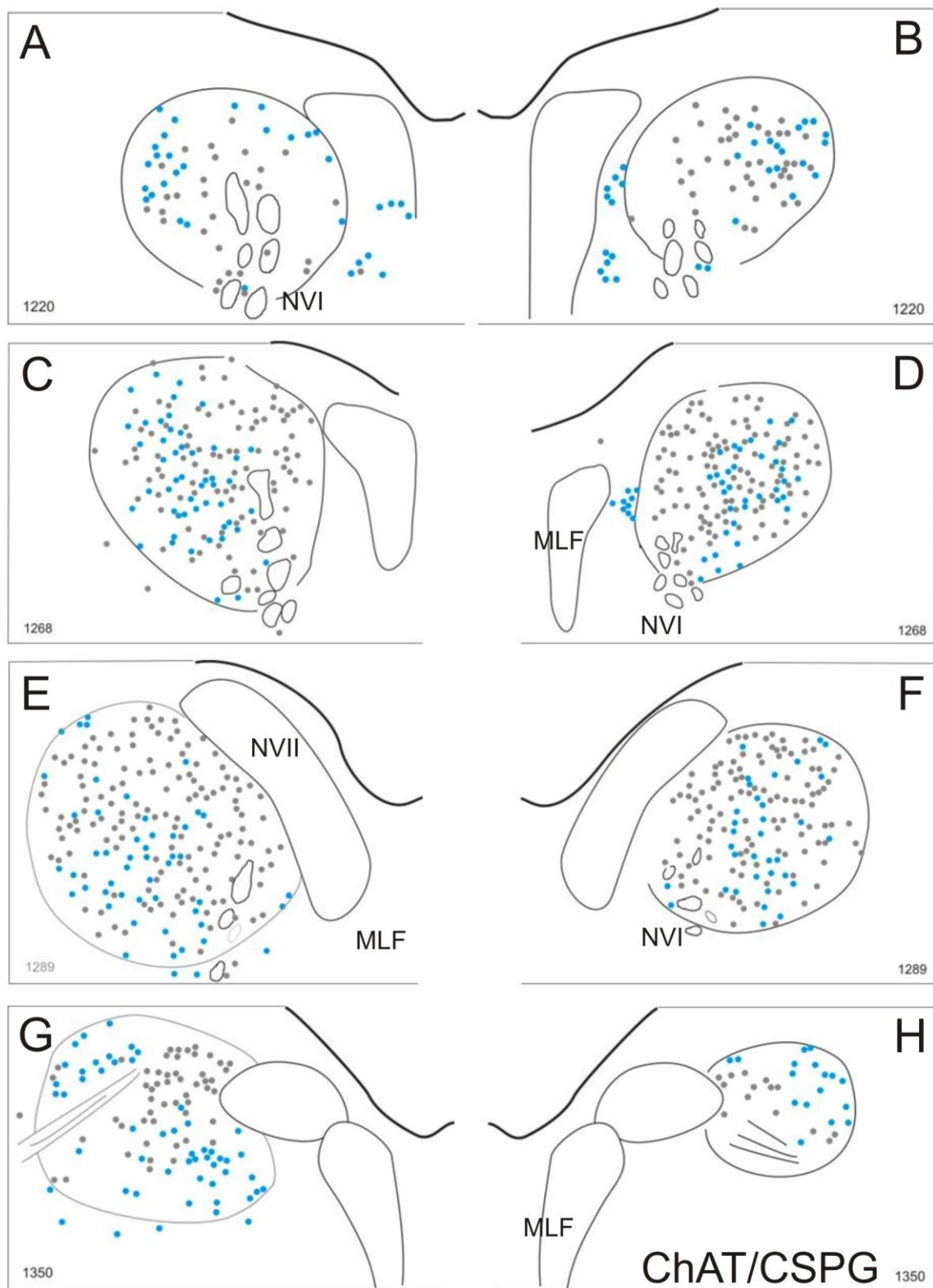


Abb. 12 – Plots der ChAT/CSPG Doppelfärbung auf rekonstruierten Transversalschnitten durch den Nucleus abducens am Rhesusaffen (Z30): graue Punkte markieren ChAT-positive putative Motoneurone, blaue Punkte ChAT-negative, aber Netz-tragende putative internukleäre Neurone.

## 6.2 Menschen

### 6.2.1.1 ChAT/CSPG Doppelfärbung im Nucleus abducens

In der ChAT/CSPG-Doppelfärbungen demarkiert sich beim Menschen der Nucleus abducens ähnlich dem Rhesusaffen ebenfalls durch die, wenn auch etwas schwächere Neuropilfärbung der CSPG Komponente von seiner Umgebung (Abb. 13). Im Gegensatz zum Rhesusaffen besitzt der Nucleus abducens beim Menschen eine eher querovale als rundliche Form. Exemplarisch wurden auch hier wieder vier transversale Schnittebenen von rostral nach kaudal analysiert.

Die ChAT-Färbung markiert analog zum Rhesusaffen zwei Neuronengruppen mit unterschiedlicher Morphologie, die der Gesamtpopulation der Motoneuronen entsprechen (Abb. 13). Die größere Gruppe umfasst Neurone mit großen Somata, die innerhalb der Begrenzung des Nucleus abducens liegen und möglicherweise vereinbar sind mit den putativen Twitch-Motoneuronen (Abb. 14, B). Die kleinere Gruppe hingegen umfasst Neurone mit kleinen rundlich bis ovalär imponierende Somata, die vereinzelt verteilt innerhalb des Nucleus abducens liegen mit Betonung der medialen Hälfte und den putativen Non-Twitch Motoneuronen entsprechen könnten (Abb. 14, C). Eine genaue Quantifizierung der Zellgröße wurde nicht explizit durchgeführt.

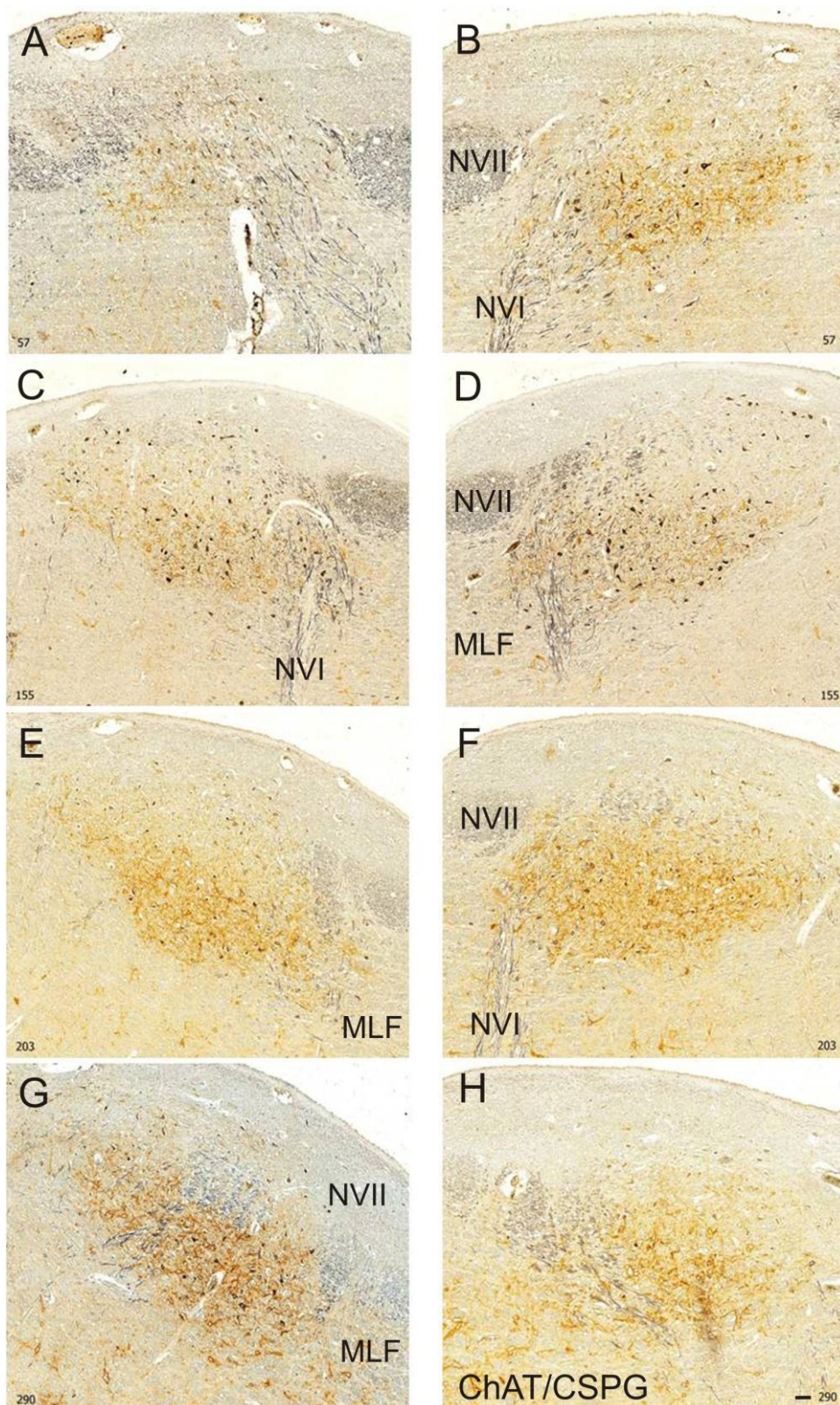


Abb. 13 – Beidseitige Übersichtsaufnahmen von Transversalschnitten durch den Nucleus Abducens des Menschen (M1) in rostro-caudaler Anordnung (rostral A, B – kaudal G, H). Die Schnitte zeigen Doppelfärbungen auf ChAT (schwarz) und CSPG (braun). Maßstab 100 μm.

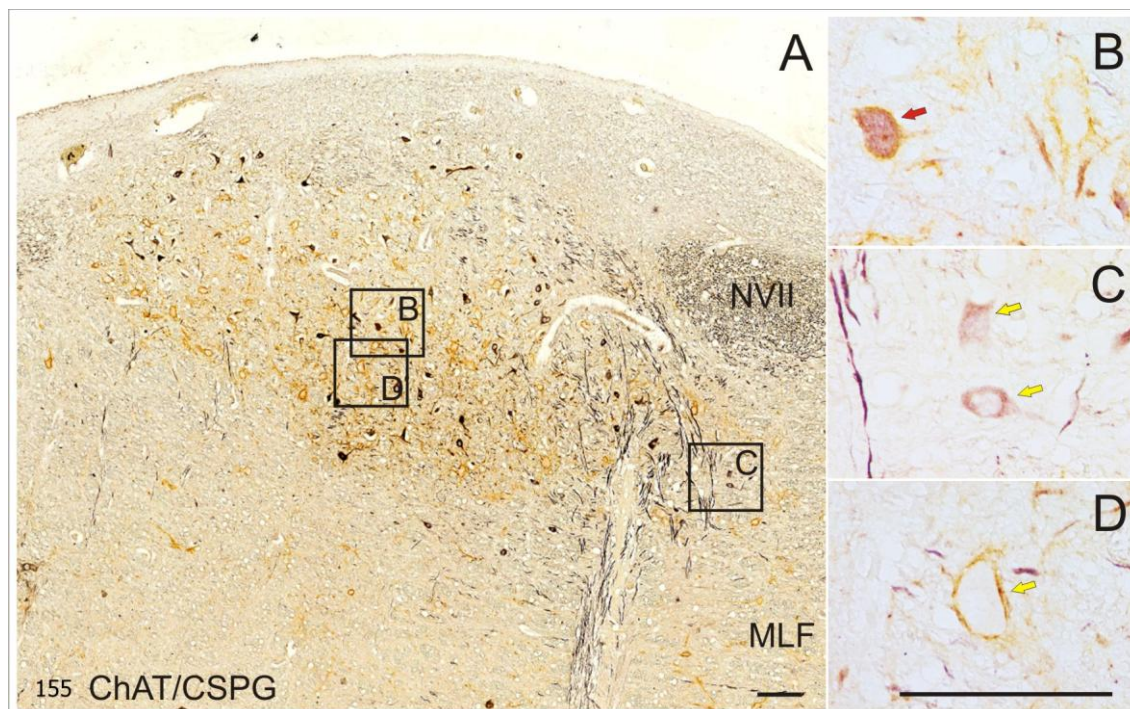


Abb. 14 – Detailaufnahmen im Menschen (M1) von einem ChAT/CSPG-positive Neuron, das den putativen Twitch-Motoneuronen entspricht (B, roter Pfeil) und ChAT-positiver, aber CSPG-negativer Neurone (C, gelbe Pfeile), die den putativen Non-Twitch Motoneuronen entsprechen, sowie einer weiteren Neuronengruppe, die ChAT-negativ, aber CSPG-positiv sind (D, gelber Pfeil) und zu der Gruppe der internukleären Neurone/PMT-Neurone gehören könnte. ChAT (schwarz), CSPG (braun). Maßstab 50  $\mu$ m.

Perineuronale Netze lassen sich auch am Menschen in einer Doppelfärbung um die cholinergen Neurone der Zellpopulation mit den großen Somata nachweisen (Abb. 14, B), während sie um die cholinergen kleinen Neurone fehlen (Abb. 14, C). Identisch zum Rhesusaffen demarkiert sich auch hier eine weitere Gruppe von nicht-cholinergen Neuronen mit großen Somata innerhalb des Nucleus abducens, die intensiv gefärbte perineuronale Netze aufweisen. Diese Neurone könnten internukleäre Neurone repräsentieren und partiell im rostralen Abschnitt auch PMT-Neurone, die jedoch im Rahmen dieses Projektes nicht weiter untersucht wurden (Abb. 14, D).

### 6.2.1.2 Twitch- und Non-Twitch Motoneuronen im Nucleus abducens des Menschen

Die putativen Motoneurone (Twitch- und Non-Twitch Motoneurone) liegen disseminiert innerhalb des Kerngebietes des Nucleus abducens. Die potenziellen Non-Twitch Motoneurone liegen in den zwei rostralen Schnitten zwischen den proximalen Nervenwurzeln des Nervus abducens, sowie zwischen den putativen Twitch Motoneuronen in der medialen Hälfte des Kerngebietes (Abb. 15, A – D). In den beiden gezeigten kaudalen Schnittebenen liegen sie in der medialen und dorsalen Peripherie (Abb. 15, E – H). Die symmetrische Verteilung weist darauf hin, dass der Hirnstamm hier besser seitengleich geschnitten wurde als beim Rhesusaffen.

Die Gesamtzahl der analysierten putativen Motoneurone im Nucleus abducens des Menschen beträgt linksseitig  $n = 268$  und rechtsseitig  $n = 302$ . Anhand der Marker ChAT und CSPG lassen sich 79% links und 77% rechts den putativen Twitch und 21% links und 23% rechts den putativen Non-Twitch Motoneuronen zuordnen (Tab. 2). Damit erscheint die Population der putativen Non-Twitch Motoneurone im Menschen größer als im Rhesusaffen (links 11%, rechts 8%) zu sein.

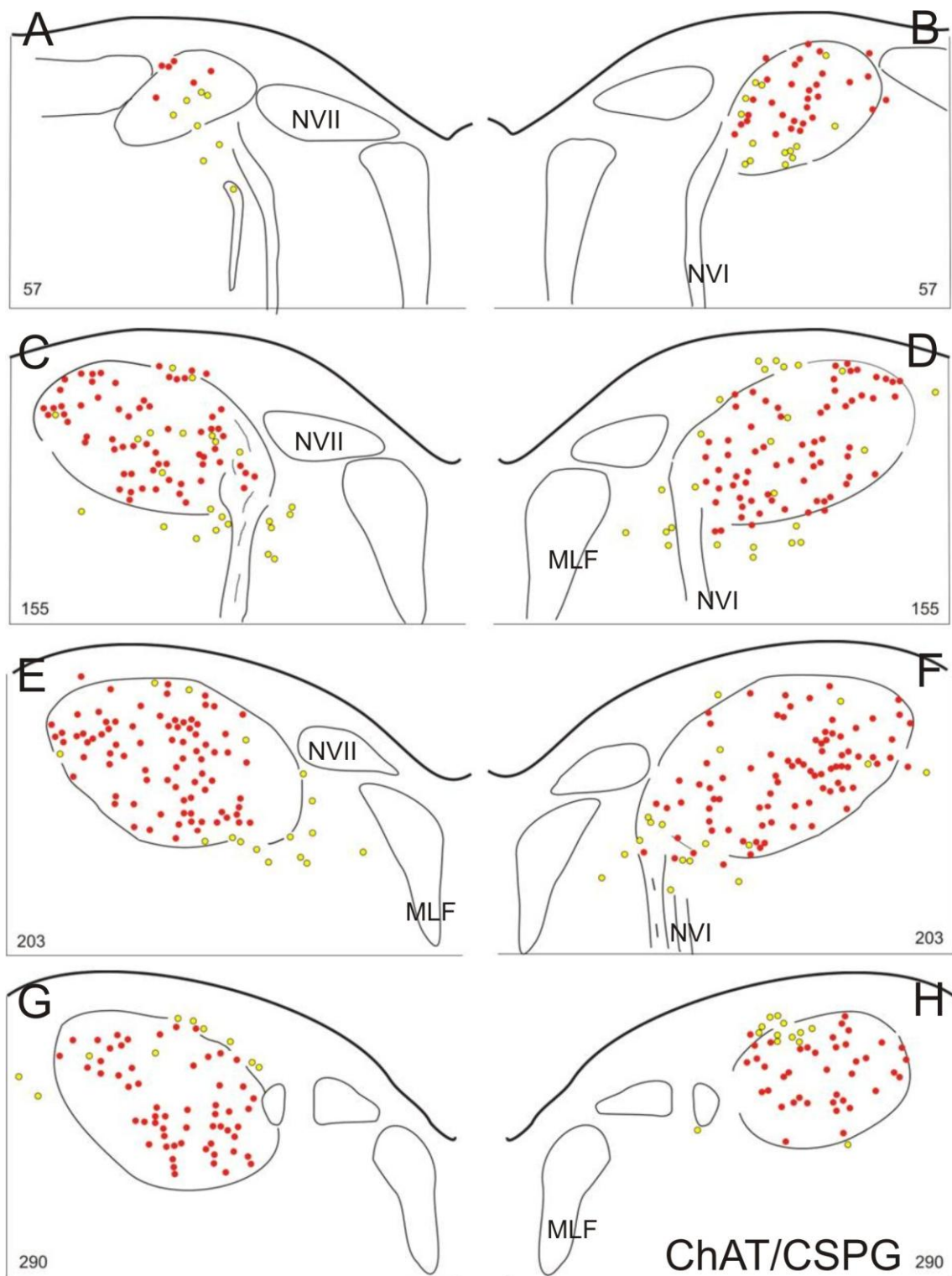


Abb. 15 – Plots der ChAT/CSPG Doppelfärbung auf rekonstruierten Schnitten durch den Nucleus abducens des Menschen (M1): Rote Punkte repräsentieren putative ChAT/CSPG-positive Twitch-Motoneuronen, gelbe Punkte markieren nur ChAT-positive Non-Twitch Motoneurone.

### 6.2.1.3 Motoneurone und internukleäre Neurone im Nucleus abducens im Menschen

Die putativen Motoneurone (Twitch- und Non-Twitch Motoneurone) verteilen sich gleichmäßig im gesamten Kerngebiet des Nucleus abducens. Die putativen ChAT-negativen internukleären Neurone sind ebenfalls gleichmäßig im Kern zwischen den putativen Motoneuronen verteilt, somit anders als im Rhesusaffen (bandförmige Anordnung von dorso-lateral nach ventro-medial im mittleren und vorderen Drittel). Man kann dennoch eine diskrete Betonung der Zelldichte in den ventralen zwei Drittel des Kerngebietes beobachten (Abb. 16). In den rostralen drei Ebenen demarkiert sich ähnlich dem Rhesusaffen eine weitere kleine Gruppe von nicht-cholinergen Netz-tragenden Neuronen, die in der medialen Peripherie des Nucleus abducens innerhalb der proximalen Nervenwurzelaustrittes des Nervus abducens liegen (Abb. 16, A - F). Diese Gruppe gehört aufgrund ihrer Lage möglicherweise nicht mehr zu der Population der potenziellen internukleären Neurone, sondern könnte von der Lage her den putativen PMT-Neuronen entsprechen, die mit Cytochromoxidase-Färbungen in einer anderen Studie beschrieben wurden (Abb. 17) (Buresch 2005).

Insgesamt können auf den analysierten Schnitten des Nucleus abducens 442 Neurone links und 413 Neurone rechts identifiziert werden. Anhand der Marker ChAT und CSPG lassen sich 61% links und 73% rechts den putativen Motoneuronen und 39% links und 27% rechts den ChAT-negativen putativen internukleären Neuronen und PMT-Neuronen zuordnen (Tab. 2). Damit entspricht der prozentuale Anteil beider Neuronengruppen denen des Rhesusaffen.

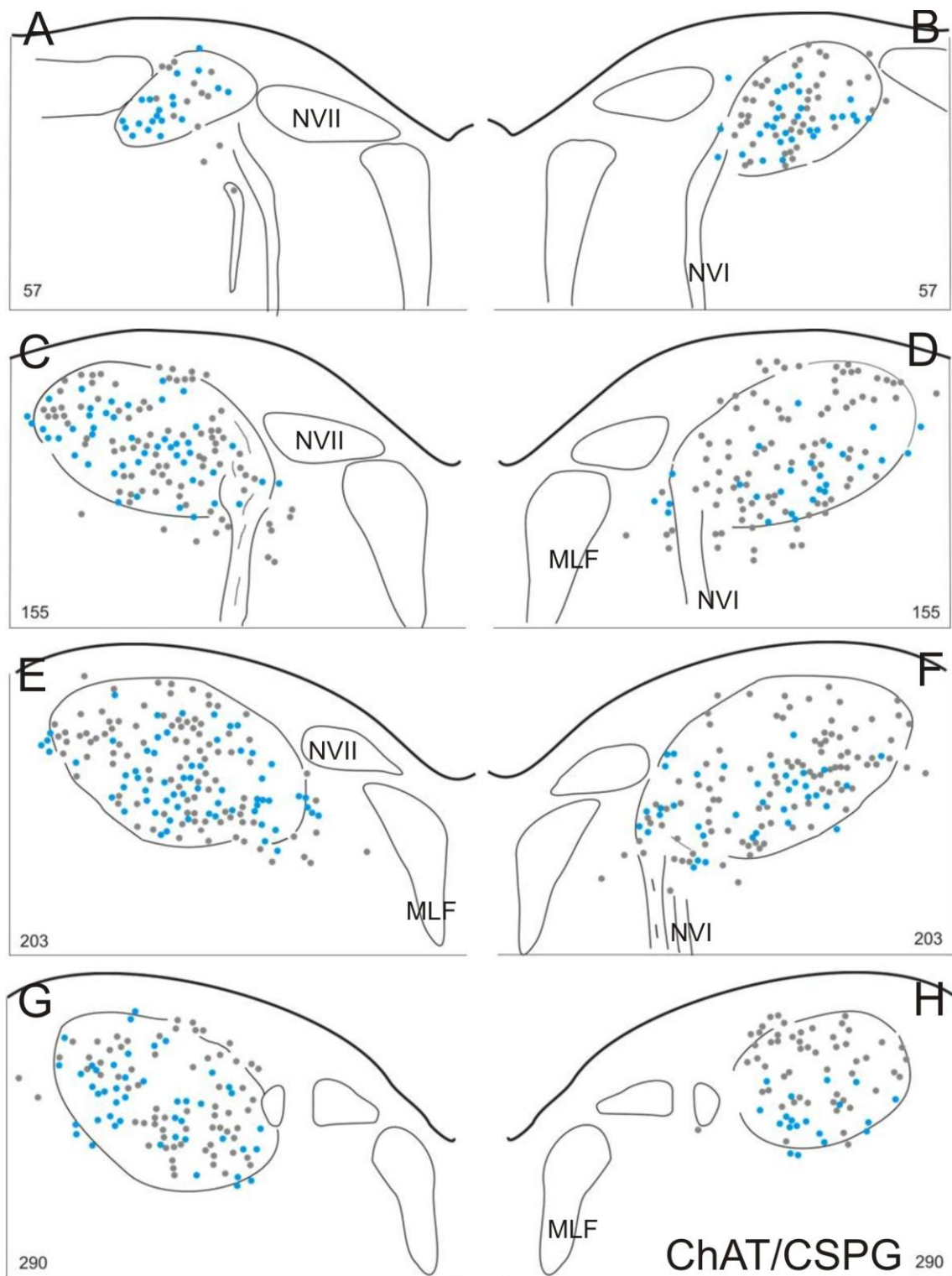


Abb. 16 – Plots der ChAT/CSPG Doppelfärbung auf rekonstruierten Schnitten durch den Nucleus abducens des Menschen (M1): Graue Punkte markieren ChAT-positive Motoneurone, blaue Punkte entsprechen ChAT-negativen, aber Netz-tragenden putativen internukleären Neuronen.



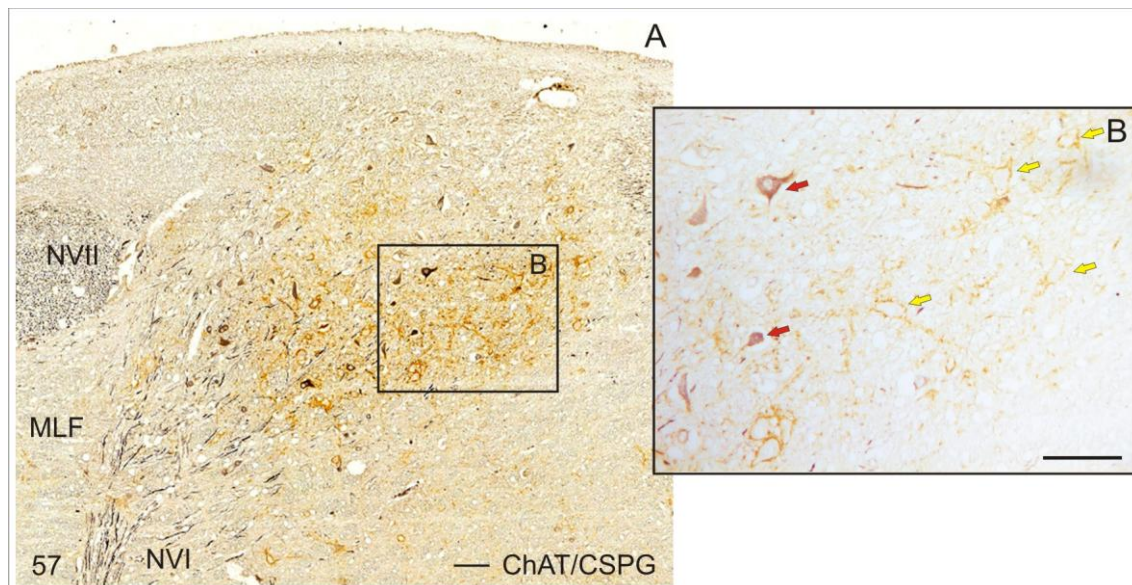


Abb. 17 – Detailaufnahme putativer PMT-Neurone in der rostralen Ebene des Menschen (M1, Übersicht A). Die Vergrößerung B zeigt Zellkörper, die peripher des eigentlichen Kerngebietes liegen und ChAT-negativ sind, aber perineuronale Netze (gelbe Pfeile) tragen. Die angrenzenden ChAT- und CSPG-positiven Zellen (rote Pfeile) entsprechen ihren histochemischen Eigenschaften am ehesten Twitch Motoneuronen. ChAT – schwarz, CSPG – braun. Maßstab 100  $\mu$ m.

#### 6.2.1.4 ChAT und nicht-phosphorylierte Neurofilamente (NP-NF) im Nucleus abducens des Menschen

Beim Menschen wurde an einem Fall (M2) eine zusätzlich Immunfärbung auf nicht-phosphorylierte Neurofilamente (NP-NF) durchgeführt, die in allen cholinergen Neuronen des Hirnstammes nachweisbar sind (Tsang et al. 2000). Somit sollte es möglich sein NP-NF alternativ als Marker für Motoneurone einzusetzen. Für diese Untersuchung wurden jeweils zwei benachbarte 5  $\mu$ m dicke Schnitte aus dem Nucleus abducens entweder mit einer immunhistochemischen Färbung auf ChAT oder NP-NF behandelt und dann mit Nissl gegengefärbt (Abb. 18).

Die Verteilung der cholinergen Motoneurone (ChAT-positiv) ist ähnlich zu dem ersten Fall M1 mit disseminierter Verteilung über das gesamte Kerngebiet des Nucleus abducens.

Nach Ausplotten der auf ChAT und NP-NF gefärbten Nachbarschnitte lassen sich drei Neuronenpopulationen unterscheiden. Eine ist cholinerg und zeigt zusätzlich eine deutliche

Färbung mit NP-NF-Antikörpern. Sie entspricht den putativen Twitch Motoneurone, die verteilt im gesamten Kerngebiet des Nucleus abducens liegen. Eine zweite Population ist ebenfalls cholinerg ohne Anfärbung von NP-NF und entspricht den putativen Non-Twitch Motoneuronen. Diese liegen ähnlich dem Fall M1 vereinzelt verteilt im Kerngebiet und im Ursprungsbereich des Nervus abducens (Abb. 19). Es findet sich eine dritte Neuronenpopulation, die nicht-cholinerg ist, aber deutlich NP-NF immunreaktiv ist. Diese rein NP-NF positiven Neurone sind diffus über das Kerngebiet verteilt ohne eindeutige Bevorzugung einer Lokalisation mit einigen Neuronen im Nervenwurzelbereich des Nervus abducens (Abb. 20).

Die Gesamtanzahl der Neurone der hier analysierten Schnitte beträgt links 302, rechts 328. Davon können 59% links und 54% rechts den Motoneuronen und 41% links und 46% rechts den nur NP-NF positiven Neuronen zugeordnet werden. Von den ChAT-positiven Motoneuronen entsprechen 77% links und 76% rechts den putativen Twitch Motoneuronen und 23% links und 24% rechts den putativen Non-Twitch Motoneuronen (Tab. 2).

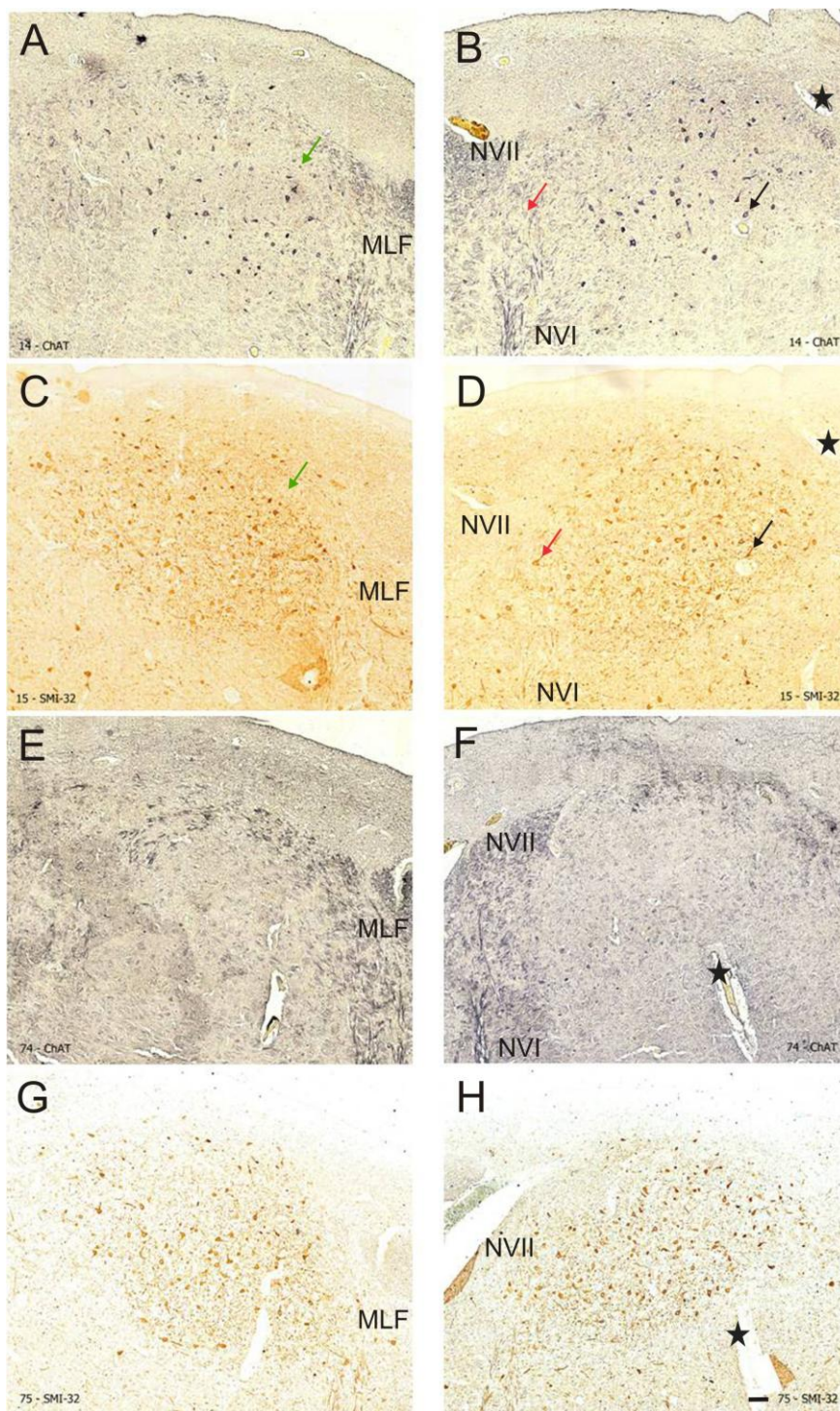


Abb. 18 – Übersicht von jeweils benachbarten Transversalschnitten durch den Nucleus abducens gefärbt auf ChAT mit DAB-Nickel (A,B,E,F) und auf NP-NF mit DAB (C,D,G,H) gefärbt wurden. Die Sterne markieren die korrespondierenden Blutgefäßen in benachbarten Schnitten, der schwarze Pfeil ein ChAT- und SMI-32 positives Neuron, der rote Pfeil ein nur SMI-32 positives Neuron und der grüne Pfeil ein nur ChAT positives Neuron. ChAT – schwarz, SMI-32 – braun.

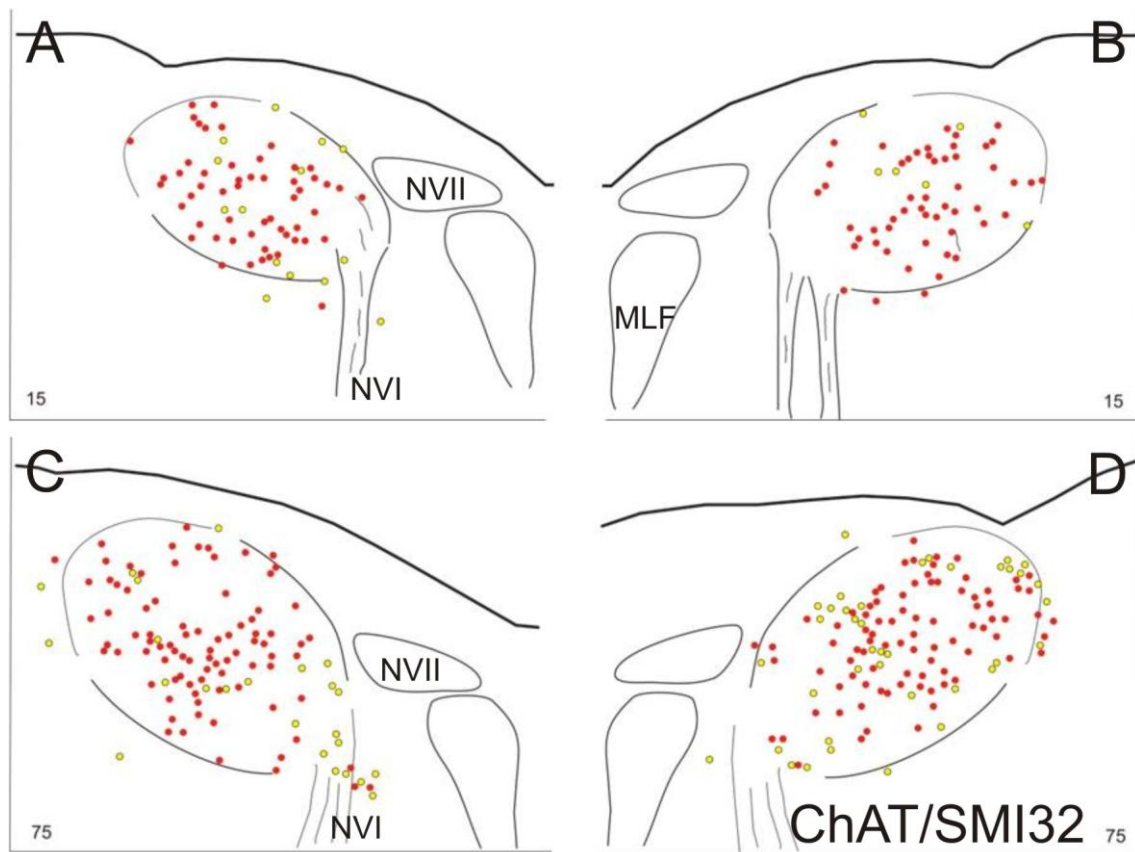


Abb. 19 – Plots der Immunfärbungen auf ChAT oder NP-NF in jeweils zwei benachbarten 5µm Paraffinschnitten im Nucleus abducens des Menschen (M2): Rote Punkte repräsentieren ChAT-/NP-NF-positive Neurone, die den putativen Twitch-Motoneuronen entsprechen, gelbe Punkte markieren ChAT-positive, aber NP-NF-negative Neurone, die den putativen Non-Twitch Motoneuronen entsprechen.

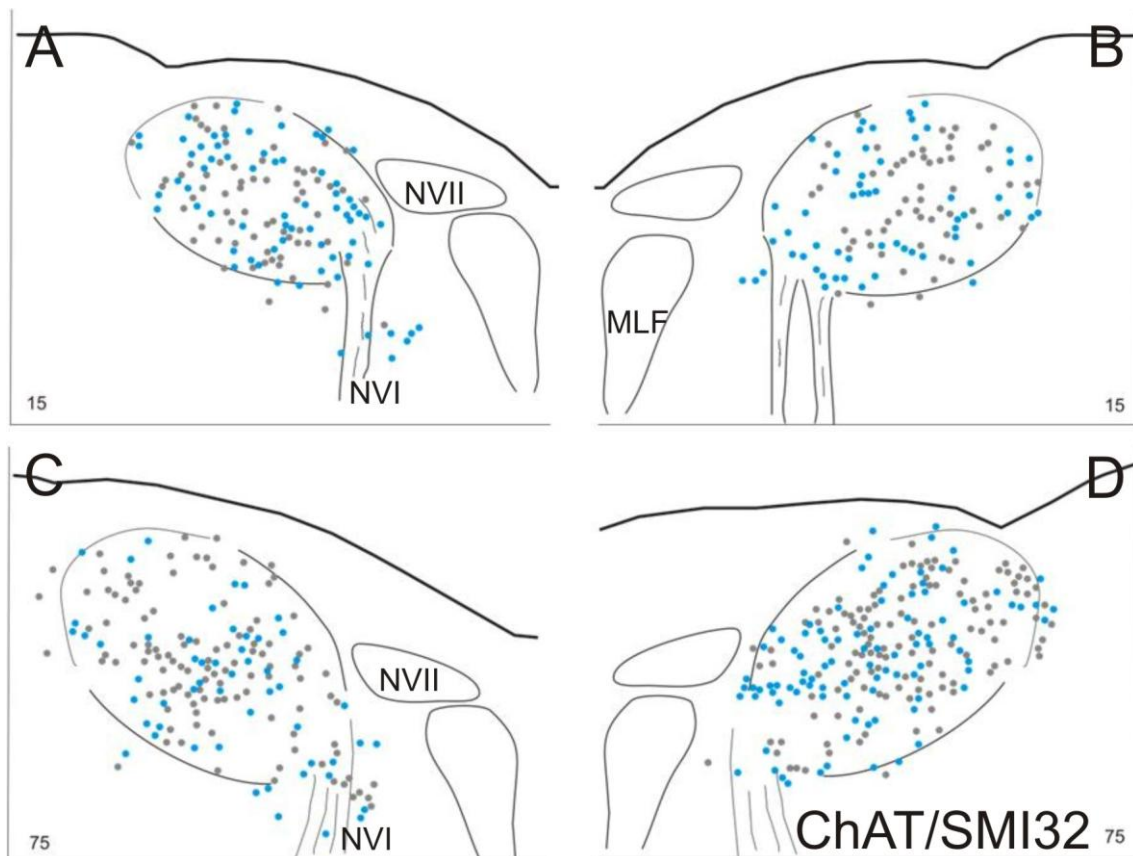


Abb. 20 – Plots der Immunfärbungen auf ChAT und NP-NF in zwei benachbarten 5µm dicken Paraffinschnitten durch den Nucleus abducens Menschen (M2): graue Punkte markieren ChAT-positive Motoneurone, blaue Punkte markieren ChAT-negative, aber NP-NF-positive Neurone.

### 6.3 Zusammenfassung Zellpopulationen in Prozent (%)

Neuronenpopulationen I					
	Twitch Motoneurone (%)	Non-Twitch Motoneurone (%)	Motoneurone gesamt (%)	Internukleäre/PMT Neurone (%)	Neuronenanzahl gesamt
Immunhistologie	ChAT+ CSPG+	ChAT+ CSPG-	ChAT+	ChAT- CSPG+	
Rhesusaffe Z30 links	290 (89%)	36 (11%)	326 (63,3%)	189 (36,7%)	515
Rhesusaffe Z30 rechts	253 (92%)	22 (8%)	275 (68,6%)	126 (31,4%)	401
Mensch M1 links	211 (78,7%)	57 (21,3%)	268 (60,6%)	174 (39,4%)	442
Mensch M1 rechts	233 (77,2%)	69 (22,8%)	302 (73,1%)	111 (26,9%)	413

Tabelle 2 – Neuronenpopulationen des Nucleus abducens im Rhesusaffen (Z30) und im Menschen (M1) mit ihren immunhistochemischen Charakteristika.

Neuronenpopulationen II					
	Twitch Motoneurone (%)	Non-Twitch Motoneurone (%)	Motoneurone gesamt (%)	Internukleäre/PMT Neurone (%)	Neuronenanzahl gesamt
Immunhistologie	ChAT+ SMI32+	ChAT+ SMI32-	ChAT+	ChAT- SMI32+	
Mensch M2 links	128 (77,1%)	38 (22,9%)	179 (59,3%)	123 (40,7%)	302
Mensch M2 rechts	139 (75,5%)	45 (24,5%)	176 (53,7%)	152 (46,3%)	328

Tabelle 3 – Neuronenpopulationen des Nucleus abducens im Menschen (M2) mit ihren immunhistochemischen Charakteristika.

#### 6.4 Übersicht der Lokalisation der Neuronengruppen des Nucleus abducens im Rhesusaffen und im Menschen (rostral – caudal)

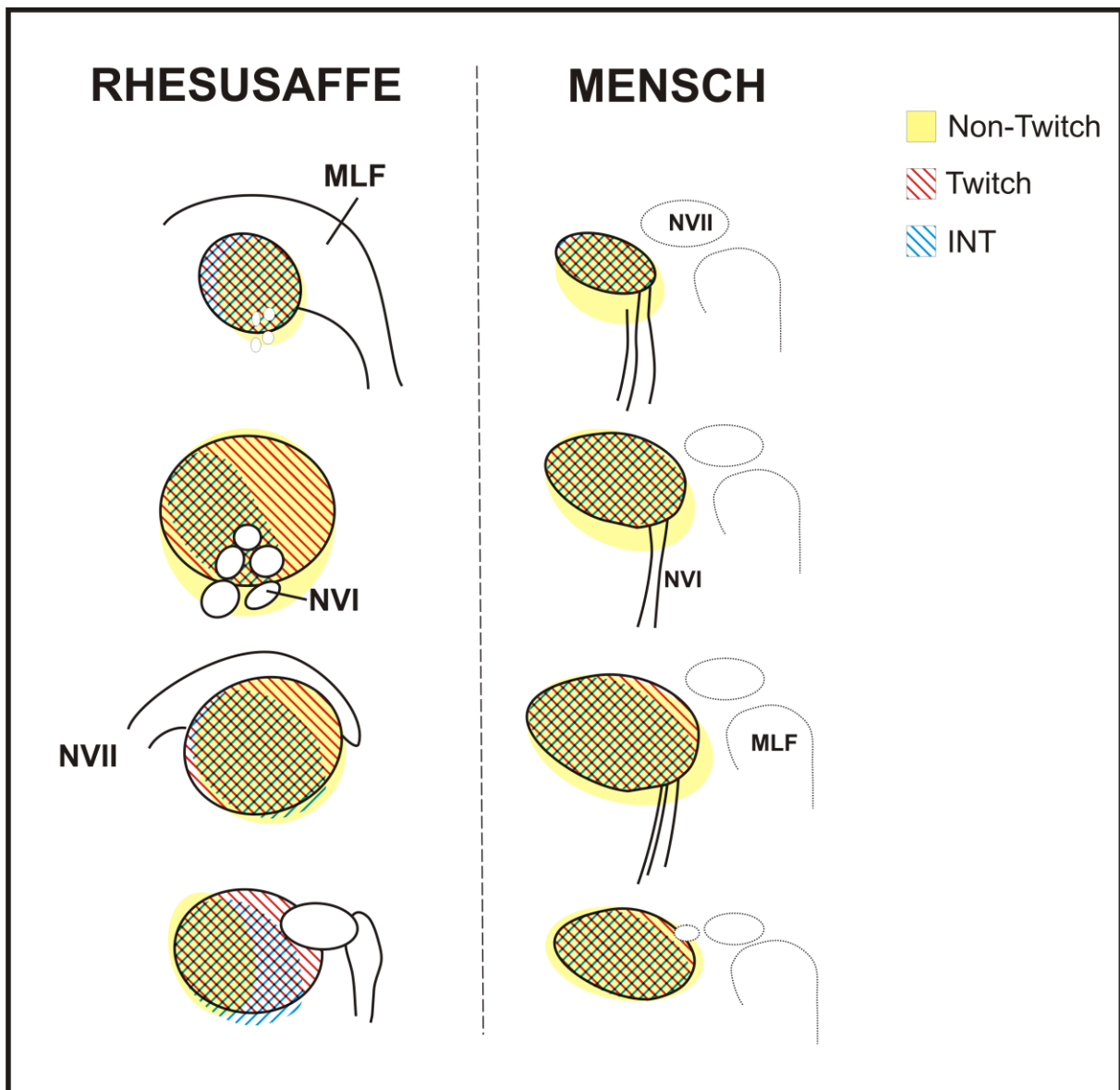


Abb. 21 – Übersicht über die Lokalisation der in dieser Arbeit immunhistochemisch charakterisierbaren Neuronenpopulationen des Nucleus abducens. MLF – medialer longitudinaler Faszikel, NVII – Nervus facialis, NVI – Nervus abducens, INT – Internukleäre Neurone

## 7 Diskussion

Dieses Projekt zeigt erstmals, dass auch die Motoneurone im Nucleus abducens des Menschen aus zwei Populationen bestehen, die sich anhand ihrer unterschiedlichen histochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden lassen. Korrespondierend zu vorangegangenen Untersuchungen am Rhesusaffen und an Ratten, lassen sie sich in Twitch- und putative Non-Twitch Motoneuronen unterteilen.

Die Gesamtpopulation der zwei Motoneurongruppen kann mit immunhistochemischen Färbungen gegen Cholin Acetyltransferase identifiziert werden, da beide Motoneurongruppen cholinerg sind. Trennen kann man sie daraufhin mit kombinierten Doppelfärbungen gegen Cholin Acetyltransferase (ChAT) und perineuronale Netze (CSPG) oder nicht-phosphorylierten Neurofilamenten (NP-NF), da Twitch Motoneurone perineuronale Netze und nicht-phosphorylierte Neurofilamente tragen, die den putativen Non-Twitch Motoneuronen fehlen. Im Folgenden werden die histochemischen Unterschiede der Twitch und Non-Twitch Motoneurone analysiert und mit Untersuchungen in anderen Säugetierarten verglichen. Weiterhin soll diskutiert werden, ob mit diesen Methoden eine Abgrenzung der Motoneurone zu anderen Neuronengruppen des Nucleus abducens möglich ist und inwiefern sie Hinweise auf unterschiedliche funktionelle Eigenschaften liefern können.

### 7.1 Histochemische Eigenschaften der extraokulären Motoneurone

#### 7.1.1 Cholin Acetyltransferase

Motoneurone gehören zu der Gruppe cholinergischer Neurone, die als neurogenen Transmitter Acetylcholin nutzen (Ichikawa and Shimizu 1998; Oda 1999). Mit einer immunhistochemischen Färbung auf Cholin Acetyltransferase (ChAT) lässt sich dieses Enzym, das notwendig ist für die Synthese des Neurotransmitters und somit die Gesamtpopulation der Motoneurone erfassen, die im Nucleus abducens die putativen Twitch und die Non-Twitch Motoneurone umfasst.

#### 7.1.2 Perineuronale Netze

Kombinierte Trakt-Tracer-Versuche am Affen und in der Ratte hatten gezeigt, dass perineuronale Netze nur Twitch, nicht aber mit Non-Twitch Motoneuronen assoziiert sind



(Eberhorn et al. 2005; Eberhorn et al. 2006). Chemisch bestehen perineuronale Netze aus Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen, die gitterähnliche Netze um die Zellkörper und proximale Dendriten bilden (Brauer et al. 1982; Celio and Blümcke 1994; Celio et al. 1998). Sie sind ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, umschließen allerdings nur bestimmte Neuronengruppen. Während die extrazelluläre Matrix bedeutsam ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität, der Signaltransduktion und vermutlich auch der Regeneration von Neuronen (Carlson and Hockfield 1996; Matsui et al. 1999; Yamaguchi 2000; Morawski et al. 2004; Sayed et al. 2005), ist die genaue Aufgabe der perineuronalen Netze bisher noch unklar (Hockfield et al. 1990; Brückner et al. 1999; Morris and Henderson 2000; Adams et al. 2001). Bekannt ist aber, dass Parvalbumin positive Neurone häufig mit perineuronalen Netzen assoziiert sind (Härtig et al. 1994; Horn et al. 2003). Parvalbumin (PV) Positivität wiederum findet sich gehäuft bei hoher Cytochrom Oxidase Aktivität (CO), die vor allem in Neuronen mit hoher metabolischer Aktivität nachzuweisen ist (Baimbridge et al. 1992; Blümcke and Celio 1992). Daraus erschließt sich die Hypothese, dass perineuronale Netze vor allem an Neuronen zu finden sind, die eine hohe Aktivität aufweisen (Brückner et al. 1993), wie in Studien im medialen Septum der Ratte oder an exzitatorischen und inhibitorischen Burst Neuronen des sakkadischen Systemes von Primaten nachgewiesen werden konnte (Morris and Henderson 2000; Horn et al. 2003). Im Gegensatz dazu besitzen langsame modulierende Neurone keine perineuronalen Netze (Brückner et al. 1994; Hobohm et al. 1998).

In der Vergangenheit haben einige Arbeiten gezeigt, dass funktionelle Neuronengruppen des okulomotorischen Systems bei Rhesusaffen und Menschen die gleichen histochemischen Eigenschaften aufweisen (Horn et al. 1995; Horn and Büttner-Ennever 1998). Erst kürzlich wurde beim Menschen mit kombinierten Immunfärbungen auf ChAT und CSPG eine Gruppe kleiner netzloser ChAT-positiver Neurone an den medialen Rändern des Nucleus oculomotorius identifiziert, die entsprechend der Lage als putative Non-Twitch-Motoneurone betrachtet werden (Horn et al. 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen daher ebenfalls nahe, dass die Twitch und die Non-Twitch Motoneurone im Nucleus abducens des Menschen anhand ihrer histochemischen Eigenschaften unterschieden werden können.

Die putativen humanen Non-Twitch Motoneurone tragen im Gegensatz zu den Twitch Motoneuronen keine perineuronale Netze als möglicher Hinweis auf ein unterschiedliches Feuerungsverhalten beider Populationen. Es besteht generell die Annahme, dass Twitch Motoneurone die Twitch / SIF-Muskelfasern und die Non-Twitch Motoneurone die Non-Twitch / MIF-

Muskelfasern innervieren (Lennerstrand 1975; Nelson et al. 1986; Peng et al. 2010). In Primaten wurde das Feuerungsverhalten der Non-Twitch Motoneurone bisher nicht untersucht, aber in Fröschen und Katzen (Goldberg et al. 1981; Dieringer and Precht 1986; Nelson et al. 1986; Shall and Goldberg 1992). In Fröschen besaßen die Non-Twitch Einheiten eine tonische Feuerungsrate von etwa 50 Hz (Dieringer and Precht 1986). Übertragen auf die histochemischen Eigenschaften korreliert das Fehlen der perineuronalen Netze in den Non-Twitch Motoneuronen gut mit der angenommenen langsamen Feuerungsrate.

Twitch Einheiten wurden nicht direkt separat untersucht, aber Ableitungen der Motoneurone des LR im Affen zeigen Feuerungsraten, die 300 bis 400 Hz erreichten, in Einzelfällen sogar bis zu 800 Hz (Fuchs and Luschei 1971; Fuchs et al. 1988). Um eine derart hohe Feuerungsrate zu erreichen, bedarf es einer hohen metabolischen Aktivität, was gut mit der Anwesenheit der perineuronalen Netze um die Twitch Motoneurone und mit ihrer in der Literatur beschriebenen PV- und CO-Immunreaktivität korreliert (Eberhorn et al. 2005).

### 7.1.3 Nicht-phosphorylierte Neurofilamente

Die Detektion der nicht-phosphorylierten Neurofilamente mit dem Antikörper SMI-32 ist im Bereich der okulären Hirnnervenkerne relativ spezifisch für Twitch Motoneurone und spart die Non-Twitch Motoneurone aus (Eberhorn et al. 2005). Sie ist daher also nicht geeignet, um die Gesamtpopulation der Motoneurone darzustellen, aber um die Twitch von den Non-Twitch Motoneuronen zu unterscheiden.

Dies trifft auch für den humanen Nucleus abducens zu, wie sich anhand von Doppelfärbungen mit ChAT und SMI-32 feststellen ließ, die eine Population cholinerg großer Neurone mit positiver NP-NF Immunität demarkiert, die den Twitch Motoneuronen entsprechen dürften. Eine kleinere Gruppe cholinerg kleiner Neurone zeigte hingegen keine NP-NF Immunität vereinbar mit den Non-Twitch Motoneuronen. Interessanterweise fand sich neben diesen beiden Zelltypen eine weitere Gruppe großer ChAT-negativer Neurone, die eine deutliche NP-NF Immunität aufwiesen. In der bisherigen Literatur wurden die NP-NF als relativ spezifischer Marker für Twitch-Motoneurone beschrieben (Eberhorn et al. 2005). Diese Zellpopulation kann jedoch nicht den Motoneuronen zugehörig sein, da sie ChAT-negativ und somit nicht cholinerg sind. Solch eine Gruppe wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Da es sich hier um eine prozentual relativ große Neuronengruppe handelt, die in dem untersuchten Fall bis zu 40-45% der Nucleus abducens Neurone repräsentieren, kämen prinzipiell die

internukleären Neurone als potentiell Substrat infrage. Diese wurden allerdings in den bisherigen Untersuchungen, die am Rhesusaffen durchgeführt wurden als NP-NF negativ beschrieben (Eberhorn et al. 2005). Dies schließt theoretisch aber nicht aus, dass die internukleären Neurone im Menschen nicht NP-NF reaktiv sein können, da Unterschiede in der SMI-32 Immunreaktivität zwischen Rhesusaffen und Menschen beschrieben wurden (Campbell and Morrison 1989) und sie in diesem Projekt eine ähnlich große Population zu den mit Hilfe perineuronaler Netze identifizierten putativen internukleären Neuronen bilden.

Es gab bereits Vermutungen, dass die NP-NF Immunreaktivität mit der Aktivität und der Größe der Neurone korrelieren könnte (Campbell and Morrison 1989). Aufgrund der ähnlichen Größe und Feuerungsrate der internukleären Neurone mit den Motoneuronen (Delgado-Garcia et al. 1986; McCrea et al. 1986; Fuchs et al. 1988) wäre eine NP-NF Immunreaktivität nicht verwunderlich, kann in dieser Arbeit aber nicht bewiesen werden. Die Diskrepanz der Ergebnisse bezüglich dieser NP-NF positiven nicht-cholinergen Neurone erfordert daher weitere Untersuchungen um sie endgültig zu klassifizieren.

## **7.2 Quantitative Analyse der Twitch und Non-Twitch Motoneuron Population**

Der Großteil der Neuronen im Nucleus abducens (53-73%) reagiert positiv auf ChAT Färbungen und ist somit als cholinerg zu klassifizieren. Sie umfasst die gesamte Gruppe der Motoneurone (Twitch und Non-Twitch Motoneurone). Die übrigen 27-47% sind nicht cholinerg und entsprechen am ehesten den internukleären Neuronen und den PMT-Neuronen.

Im Gegensatz zum Nucleus oculomotorius und dem Nucleus trochlearis bilden die Non-Twitch Motoneurone im Nucleus abducens kein Zellcluster, sondern liegen eher diffus verstreut im Kerngebiet mit Betonung der medialen Peripherie (Büttner-Ennever et al. 2001; Eberhorn et al. 2005). Diese Verteilung trifft auch für den Nucleus abducens des Menschen zu.

In diesem Projekt scheint im Vergleich zum Rhesusaffen die Population der Non-Twitch Motoneurone beim Menschen in etwa doppelt so groß zu sein (Rhesusaffe ca. 10%, Mensch ca. 22%). In der Literatur wurden allerdings auch im Rhesusaffen ein prozentualer Anteil bis zu 20% berichtet (Eberhorn et al. 2005), der für alle drei okulären Hirnnervenkerne ähnlich zu sein scheint. So findet man auch im Menschen das bereits für andere Säuger festgestellte

quantitativ ähnliche Verhältnis von Twitch und Non-Twitch Motoneuronen zu den Twitch und Non-Twitch Fasern innerhalb der Augenmuskeln zu (80% zu 20%) (Porter et al. 1995). Die genaue Korrelation der Motoneurone zu den Muskelfasern ist allerdings aufgrund der Komplexität der motorischen Einheiten (Shall and Goldberg 1992) und einer möglichen polyneuronalen Innervation der Non-Twitch / MIF-Fasern (Jacoby et al. 1989) noch unklar.

### **7.3 Untergruppen Non-Twitch Motoneurone**

Retrograde Tracer-Versuche im Rhesusaffen weisen darauf hin, dass zwei Populationen von Non-Twitch Motoneuronen existieren (Eberhorn et al. 2005). Der Grund hierfür ist, dass die distale Tracerinjektion in den muskulotendinösen Übergang der extraokulären Augenmuskeln nur zur Traceraufnahme durch die distal gelegenen multiplen „en-grappe“-Endigungen führt und dadurch vor allem Non-Twitch Motoneurone markiert, die in der Peripherie der klassischen Kerngrenzen liegen. Das trifft für alle drei okuläre Hirnnervenkerne zu; so werden Neurone markiert, die im Nucleus oculomotorius in der C- und S-Gruppe, im Nucleus trochlearis in einer dorsalen Kappe und im Nucleus abducens in der medialen Peripherie liegen (Büttner-Ennever et al. 2001; Eberhorn et al. 2005). In den begleitenden immunhistochemischen Färbungen der tracer-markierten Schnitte, fanden sich jedoch neben den in der Peripherie lokalisierten Non-Twitch Motoneuronen, weitere Motoneurone innerhalb des Kerngebietes des Nucleus abducens, die die gleichen histochemischen Eigenschaften wie die tracer-markierten Non-Twitch Motoneuronen besitzen.

Als Ursache für die selektive Demarkierung der peripher gelegenen Non-Twitch Motoneurone wird angenommen, dass die distale Injektion bei den Trakt-Tracer-Versuchen nur die Non-Twitch Motoneurone der globalen Muskelschicht erfasst, da die orbitale Muskelschicht proximal der globalen Schicht endet und in die Pulleys ausläuft (Demer et al. 2000; Oh et al. 2001; Ruskell et al. 2005). Die innerhalb des Kerngebietes lokalisierten Neurone mit denselben histochemischen Eigenschaften wie die tracer-markierten Non-Twitch Motoneurone könnten den zum ersten Mal demarkierten putativen Non-Twitch Motoneuronen der orbitalen Schicht entsprechen (Eberhorn et al. 2005).

Im Unterschied zum Affen zeigten die putativen Non-Twitch Motoneurone im Nucleus abducens beim Menschen eine diffusere Verteilung auch vermischt mit den Twitch-Motoneuronen innerhalb des Nucleus abducens. Beim Rhesusaffen bilden die Non-Twitch-Motoneurone eine „Schale“ um den medialen Teil des Nucleus abducens, während beim Men

schen allenfalls eine leichte Konzentration in der medialen Hälfte zu sehen ist (Büttner-Ennever et al. 2001). In ähnlicher Weise war nur eine kleine Gruppe netzloser putativer Non-Twitch Motoneurone an der Mittellinie, außerhalb der Kerngrenzen des Nucleus oculomotorius, identifiziert worden (Horn et al. 2008).

#### **7.4 Internukleäre Neurone und PMT-Neurone**

Die internukleären Neurone des Nucleus abducens sind im Unterschied zu den Motoneuronen nicht cholinerg, sondern nutzen den Transmitter Glutamat (Spencer and Baker 1986; Carpenter et al. 1992). Ableitungsexperimente am Rhesusaffen haben gezeigt, dass die internukleären Neurone nahezu dieselben elektrophysiologischen Eigenschaften haben, wie die Motoneurone (Fuchs et al. 1988; Sylvestre and Cullen 2002). Damit verwundert es nicht, dass die internukleären Neurone ebenfalls perineuronale Netze aufweisen wie die Motoneurone. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Motoneurone und die internukleären Neurone in Primaten innerhalb des Kerngebietes des Nucleus Abducens nicht klar voneinander getrennt liegen. Allerdings stimmt das von dorsolateral nach ventromedial laufende Band von ChAT-negativen Neuronen mit perineuronalen Netzen gut mit den Beobachtungen der Verteilung retrograd markierter internukleärer Neurone nach Tracerinjektion in den kontralateralen Nucleus oculomotorius von Affen überein (Büttner-Ennever et al. 1989). Beim Menschen findet sich hingegen eine Konzentration der putativen internukleären Neurone in den ventralen zwei Drittel des Kerngebietes (Abb. 16). Rostral liegt ähnlich wie im Rhesusaffen eine weitere kleine Gruppe nicht-cholinergischer Netz-tragender Neuronen, die sich in der medialen Peripherie des Nucleus abducens zwischen den proximalen Nervenwurzeln und lateral des Nervus abducens befindet (Abb. 17). Diese Gruppe gehört aufgrund ihrer peripheren Lage möglicherweise nicht mehr zu der Population der Interneurone, sondern könnte zu einer der PMT-Neuronen Gruppen gehören (Buresch 2005). Die histochemischen Unterschiede der Interneurone und der PMT-Neuronen wurden in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht, da sie nicht Gegenstand der Arbeit war, so dass diese beiden Populationen nicht unterschieden werden können.

## 7.5 Zusammenfassung der histochemischen Eigenschaften der Neuronengruppen

Histochemische Eigenschaften			
	ChAT	CSPG	SMI-32
Twitch Motoneurone	++	++	++
Non-Twitch Motoneurone	++	--	--
Internukleäre Neurone	--	++	Möglw. ++
PMT-Neurone	--	++	Möglw. ++

Tab. 3 – Übersicht über die histochemischen Eigenschaften der vier Neuronenpopulationen des Nucleus abducens

## 7.6 Funktionen der extraokulären Augenmuskeln

Die Okulomotorik ist einer der kompliziertesten, allerdings auch eines der besterforschten muskuloskeletalen Kontrollsysteme. Jedes der extraokulären Augenmuskeln besitzt ein individuelles komplexes Bewegungsrepertoire, das permanent mit hoher Präzision während der Wachheitsphase eines Individuums ausgeführt werden kann. Dabei ist der Toleranzbereich für die Augenbewegung schmal, da bereits leichte Unstimmigkeiten zur Unschärfe des Visus oder Doppelbildersehen führen.

Derzeit sind fünf verschiedene motorische Kontrollsysteme für die extraokulären Augenmuskeln bekannt. Die phylogenetisch ältesten sind die vestibulookulären (VOR) und optokinetischen (OKN) Reflexbewegungen zur Stabilisierung der wahrgenommenen Bilder auf der Retina, die bereits in allen Wirbeltieren vorhanden sind und auf denen die anderen motorischen Kontrollsysteme aufbauen. Die optischen Augenzielbewegungen wie Sakkaden und Folgebewegungen („smooth pursuit“) erscheinen erst später in der phylogenetischen Entwicklung, die Vergenzbewegung erst mit der Frontalverlagerung beider Augen und Spezialisierung der Retina auf hohe Sehschärfe durch die Fovea centralis (Leigh und Zee, 1999).

Für die Ausführung dieser dezidierten Bewegungen sind sowohl sensorische Einflüsse als auch motorische Eingänge notwendig. Die einzelnen charakteristischen Muskeleigenschaften

sind dabei direkt von dem Aktivitätsmuster der innervierten Motoneurone abhängig (Pette, 2002). Robinson (1970) beschreibt ebenfalls, dass die Motoneurone das Zielorgan der verschiedenen motorischen Kontrollsysteme darstellen und jeweils ein individuelles Entladungsmuster aufweisen. Diese Entladungsmuster beinhalten unter anderem eine enge Assoziation zwischen Aktivitätswahrscheinlichkeit der Motoneurone und der Augenposition.

### **7.7 Funktion der Twitch und Non-Twitch Motoneurone**

Analog zu den Rhesusaffen kann angenommen werden, dass die Twitch Motoneurone die Twitch / SIF-Muskelfasern und die Non-Twitch Motoneurone die Non-Twitch / MIF-Muskelfasern innervieren (Büttner-Ennever et al. 2001). Die unterschiedliche molekulare Zusammensetzung und Morphologie der beiden Motoneurongruppen, sowie der unterschiedliche Aufbau ihrer innervierten Muskelfasern suggerieren eine unterschiedliche Funktion beider Einheiten bezüglich der Augenbewegungen.

Diese Theorie wird unterstützt durch die unterschiedlichen prämotorischen Eingänge der Twitch und Non-Twitch Motoneurone. Die Twitch Motoneurone erhalten vornehmlich Afferenzen von prämotorischen Neuronen, die der Generierung von Augenbewegungen dienen, e.g. paramediane pontine Formatio reticularis, inhibitorische Burst-Neurone, während die Non-Twitch-Motoneurone keine Eingänge von diesen Arealen erhalten, sondern von Zentren zur Blickstabilisierung, e.g. Nucleus prepositus hypoglossi (Büttner-Ennever et al. 2003; Wasicky et al. 2004; Ugolini et al. 2006).

Momentan wird angenommen, dass die Twitch Motoneurone und Fasern mit ihrer „Alles-oder-Nichts“ Reaktion für die Bewegung der Augen zuständig ist, während die Non-Twitch Motoneurone und Fasern eher eine Rolle in der Blickstabilisierung, also in der propriozeptiven Kontrolle spielt.

### **7.8 Sensorische Innervation der extraokulären Augenmuskeln**

Die propriozeptive Kontrolle erfordert wiederum ein anatomisches Substrat. Die humanen extraokulären Augenmuskeln besitzen zwei Arten von Propriozeptoren. Einmal die Muskelspindeln, die als klassische Propriozeptoren auch in der Skelettmuskulatur zu finden sind und die Informationen über den Muskeldehnungszustand und –dehnungsgeschwindigkeit übermitteln, die für die motorische Kontrolle benötigt werden (Maier et al. 1974; Donaldson 2000;

Büttner-Ennever et al. 2003). Allerdings sind die Muskelspindeln im Augenmuskel beim Menschen nicht sehr gut entwickelt. Zum zweiten gibt es die Palisadenendigungen, die exklusiv nur in den extraokulären Augenmuskeln existieren und sich am distalen Ende im Bereich des muskulotendinösen Überganges der Non-Twitch Fasern der globalen Muskelschicht befinden (Eberhorn et al. 2005; Eberhorn et al. 2005; Büttner-Ennever et al. 2006). Bisher ist nicht klar ist, ob die Palisadenendigungen rein sensorische Organe darstellen oder auch motorische Eigenschaften haben (Sas and Schab 1952; Shall et al. 1995; Lukas et al. 2000; Blumer et al. 2001; Konakci et al. 2005). Die Somata der Palisadenendigungen scheinen zwischen den Non-Twitch Motoneuronen lokalisiert zu sein (Lienbacher et al. 2011). Dennoch liess sich in der Studie bisher nicht beweisen, ob eine gemischte Population von sensorischen und motorischen Neuronen innerhalb der Non-Twitch Motoneurone vorliegt.

In diesem Kontext unterstützt die Identifizierung der Twitch und Non-Twitch Motoneurone auch im Menschen die Theorie der dualen motorischen Innervation entgegen der Theorie der gemeinsamen Endstrecke der Steuerung der Augenbewegungen (Büttner-Ennever 2006).



## 8 Zusammenfassung

Der Nucleus abducens des Menschen besteht analog zum Rhesusaffen aus mindestens vier Neuronenpopulationen, den cholinergen Motoneuronen und den nicht cholinergen internukleären Neuronen und Paramediantrakt-Neurone. Da die Neuronengruppen unterschiedliche histochemische Eigenschaften besitzen, lassen sie sich auf Basis immunhistochemischer Färbungen differenzieren.

Die Gesamtpopulation der Motoneurone lässt sich durch die immunhistochemische Markierung der Cholin Acetyltransferase, einem Enzym, das nur in cholinergen Zellen vorkommt, visualisieren. Eine zusätzliche Doppelfärbung für perineuronale Netze demarkiert die Population der internukleären Neurone und PMT-Neurone, die nicht cholinerg sind und etwa 30-40% der Neurone repräsentieren. Motoneurone und internukleäre Neurone liegen innerhalb des Kerngebietes des Nucleus abducens vermengt, mit einer tendenziellen Lage der internukleären Neurone in den ventralen zwei Dritteln. Da die PMT-Neurone ähnliche histochemische Eigenschaften aufweisen, wie die internukleären Neurone, konnten sie in dieser Arbeit nicht weiter abgegrenzt werden und ihre genaue Lokalisation nicht bestimmt werden.

Die Motoneurone des Menschen können in zwei molekular und morphologisch unterschiedliche Populationen unterteilt werden, die Twitch und Non-Twitch Motoneurone. Sie lassen sich analog zum Rhesusaffen anhand kombinierter Immunfärbungen auf cholinerge Marker, die beide Populationen markieren und perineuronale Netze oder nicht phosphorylierte Neurofilamente, differenzieren. Die Größe der Motoneuronpopulationen korreliert mit dem der Rhesusaffen und liegt in dem Verhältnis von 20% putative Non-Twitch zu 80% Twitch Motoneurone, quantitativ im ähnlichen Verhältnis von SIF- zu MIF-Muskelfasern. Im Menschen liegen die putativen Non-Twitch Motoneurone deutlicher als im Rhesusaffen diffus im Kerngebiet des Nucleus abducens verteilt, allerdings auch mit Betonung des medialen Abschnittes. Die Immunhistochemie markiert hierbei eine deutlich höhere Anzahl putativer Non-Twitch Motoneurone innerhalb des Kerngebietes, als Trakt-Tracer Versuche am Rhesusaffen gezeigt haben. Dies könnte eine Konsequenz dessen sein, dass bei den distalen Tracer-Injektionen vor allem Non-Twitch Motoneurone der globalen Schicht markiert werden, durch die Färbung aber die gesamte Population der putativen Non-Twitch Motoneurone der globalen und der orbitalen Muskelschicht erfasst wird.

Die Verschiedenheit der Twitch und der putativen Non-Twitch Motoneurone weisen auch im Menschen auf potentiell unterschiedliche Eigenschaften hin. In Zusammenschau mit dem Substrat ihrer Innervation, Twitch Motoneurone die SIF-Fasern und die Non-Twitch Motoneurone die MIF-Fasern, liegt die Schlußfolgerung nahe, dass sie darüber unterschiedliche Einflüsse auf die Augenbewegungen haben könnten. Mit dem Nachweis beider Motoneuronenpopulationen im Menschen im Kontext neuerer Studien über die unmittelbare Nähe der Nervenendigungen der Non-Twitch Motoneurone zu den Palisadenendigungen, die als putative sensorische Organe gelten, wird das Konzept einer speziesübergreifenden dualen motorischen Innervation bekräftigt.

## 9 Anhang

### LÖSUNGEN

#### 4% Paraformaldehyd in 0,1M PBS pH 7,4 für 3L

Lösung A:

- \* 1500 ml aqua dest. auf 60°C erwärmen
- \* 120 g Paraformaldehyd langsam untermischen
- \* 5 Tropfen 40% NaOH
- \* Anschließend filtrieren

Lösung B:

- \* 1500 ml 0,2M PBS, pH 7,4

Lösung A und Lösung B kurz vor Gebrauch zusammengeben und pH-Wert auf 7,4 einstellen.

Gesamtlösung im Kühlschrank aufbewahren.

#### 0,9% NaCl-Lösung für 1L

- \* 9 g NaCl in 1000 ml aqua dest. lösen

Aufbewahrung im Kühlschrank

#### Stammlösung Phosphatpuffer (PB) 0,2M pH 7,4 für 5L

Lösung A: 26,22 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  in 950 ml aqua dest. lösen

Lösung B: 114,17 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 36 g NaCl in 4050 ml aqua dest. lösen

Lösung A und Lösung B kurz vor Gebrauch zusammengeben und pH-Wert auf 7,4 einstellen

**Phosphat-Puffer Saline (PBS) 0,1M pH 7,4 für 5L (für Immunhistochemie)**

\* 72,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

\* 13,1 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

\* 40 g NaCl

\* 1g KCl

Alle Bestandteile in 5L aqua dest. lösen und pH-Wert auf 7,4 einstellen

**Stammlösung Tris-Puffer (TBS) 0,5M pH 7,6**

\* 60,57 g Trizma Base in 800 ml aqua dest. lösen

\* mit 37% HCl auf pH-Wert 7,6 einstellen

\* mit aqua dest. auf 1L auffüllen

**Citrate Puffer 0,01M pH 8,5-9,0 für Wasserbad (80°C) Paraffinschnitte**

\* 2,94 g Sodium Citrate

\* 1000 ml aqua dest.

\* mit 0,1M NaOH auf pH-Wert 8,5-9,0 einstellen

**Citrate Puffer 0,01M pH 6,0 für Mikrowellenbad Paraffinschnitte**

\* 2,1 g Zitronensäuremonohydrat

\* 900 ml aqua dest.

\* mit 2M NaOH auf pH-Wert 6,0 einstellen

\* mit aqua dest. bis 1000 ml auffüllen

(2M NaOH = 8 g NaOH in 200 ml aqua dest. lösen)

## PROTOKOLLE IMMUNHISTOCHEMIE

### DAB-Reaktion

10 min

0,05 DAB + 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05M TBS pH 8

- 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 34 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 ml TBS pH 8

- 0,05% DAB = 1 ml von 1% DAB-Stocklösung in 19 ml TBS pH 8 + 200 µl 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Intensivierte DAB-Nickel-Reaktion (Hancock 1984)

10 min

0,05 DAB + 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05M TBS pH 8

- 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 34 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 ml TBS pH 8

- 0,05% DAB = 1 ml von 1% DAB-Stocklösung in 19 ml 0,05M TBS pH 8,9 + 100 ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 40 mg Ammonium-Nickel

### Immunhistochemie, Beispiel für Kaninchen anti-ChAT (Chemicon, AB143)

Fixierung: 4% Paraformaldehyd in 0,1M PBS pH 7,4

Demaskierung von Antigenen in den formalin-fixierten Paraffinschnitten

1. Tag

\* Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

- 1h Xylol (oder über Nacht in Xylol)
- 10 min 100% Alkohol
- 10 min 96% Alkohol
- 10 min 90% Alkohol
- 10 min 70% Alkohol
- 10 min aqua dest.

- \* 0,01 Sodium Citrate Puffer 15 min in Wasserbad bei +80°C  
oder 2 x 5 min in MW
- \* in Citrate Puffer abkühlen lassen 15 min bei RT
- \* Kurz in aqua dest. spülen
- \* 0,05M TBS pH 8,0 2 x 10 min
- \* Schnitte kurz in 0,1M PBS pH 7,4 waschen
- \* Blockierung endogener Oxidasen 15 min  
3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 10% Methanol in 0,1M PBS pH 7,4  
(1ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 ml Methanol + 8 ml PBS pH 7,4)
- \* 3 x 0,1M PBS pH 7,4 je 10 min
- \* Präinkubation 1h bei RT  
5% Normal Ziege Serum (NGS) + 0,3% Triton in 0,1M PBS pH 7,4  
(500 µl NGS + 10 ml (0,3% Triton in PBS))
- \* 1. Antikörper übernacht bei RT auf Schüttler  
Kaninchen anti-ChAT 1:2000  
(5 µl AK in 10 ml PBS pH 7,4)
- 2. Tag
- \* 3 x 0,1M PBS pH 7,4 je 10 min
- \* 2. Antikörper 1h bei RT  
Biotiniliertes Ziege anti-Kaninchen 1:200  
(50 µl in 10 ml PBS pH 7,4)
- \* 3 x 0,1M PBS pH 7,4 je 10 min

- \* EAP (30 min vorher ansetzen) 1h bei RT
- EAP: Extravidin-Peroxidase 1:1000
- (10 µl EAP in 10 ml PBS pH 7,4)
- \* 2 x 0,1M PBS pH 7,4 je 10 min
- \* 0,05M TBS pH 8,0 10 min
- \* DAB-Reaktion 10 min
- 0,05 DAB + 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05M TBS pH 8
- 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 34 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 ml TBS pH 8
- 0,05% DAB = 1 ml von 1% DAB-Stocklösung in 19 ml TBS pH 8 + 200 µl 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- \* 3 x 0,1M PBS pH 7,4 je 10 min
- \* Trocknen lassen
- \* Alkoholreihe
- \* Xylol

### **Immunhistochemie – Dedizierte Arbeitsschritte für die einzelnen Antikörper**

#### *Polyklonales Ziege anti-ChAT*

##### Tag 1

- \* 1h Präinkubation bei RT in 5% Esel-Normalserum (Verdünnung in 0,1M PB mit 0,3% Triton-X 100)
- \* Inkubation über Nacht bei RT in Ziege anti-Cholin Acetyltransferase (1/100)

##### Tag 2

- \* 1h Inkubation bei RT in biotinyliertem Esel anti-Ziege (1/500)

*Polyklonales Kaninchen anti-ChAT*

## Tag 1

\* 1h Präinkubation bei RT in 2% Ziege-Normalserum (Verdünnung in 0,1M PB mit 0,3% Triton-X 100)

\* Inkubation über 3 Nächte bei RT in Kaninchen anti-Cholin Acetyltransferase (1/250)

## Tag 2

\* 1h Inkubation bei RT in biotinylierter Ziege anti-Kaninchen (1/200)

*Kaninchen anti-CSPG*

## Tag 1

\* 1h Präinkubation bei RT in 5% Esel-Normalserum (Verdünnung in 0,1M PB mit 0,3% Triton-X 100)

\* Inkubation über Nacht bei RT in Kaninchen anti-CSPG (1/1000)

## Tag 2

\* 1h Inkubation bei RT in biotinyliertem Esel anti-Kaninchen (1/50)

*Monoklonales Maus anti-CSPG*

## Tag 1

\* 1h Präinkubation bei RT in 2% Ziege-Normalserum (Verdünnung in 0,1M PB mit 0,3% Triton-X 100)

\* Inkubation über 3 Nächte bei RT in Maus anti-CSPG (1/100)

## Tag 2

\* 1h Inkubation bei RT in biotinylierter Ziege anti-Maus (1/200)



*Monoklonales Maus anti-SMI-32*

## Tag 1

- 1h Präinkubation bei RT in 2% Normal Pferdeserum (Verdünnung in 0,1M PB mit 0,3% Triton-X 100)
- Inkubation über Nacht bei RT in Maus anti-SMI-32 (1/5000)

## Tag 2

- 2h Inkubation bei RT mit biotinyliertem Pferd anti-Maus (1/200)

**Immunhistochemie für Doppelfärbung: Ziege anti-ChAT (Chemicon, AB144P) und Kaninchen anti-CSPG (2083-5005, Biogenesis)**

Fixierung: 4% Paraformaldehyd in 0,1M PBS pH 7,4

Demaskierung von Antigenen in den formalin-fixierten Paraffinschnitten

## 1. Tag

\* Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

- 1h Xylol (oder über Nacht in Xylol)
- 10 min 100% Alkohol
- 10 min 96% Alkohol
- 10 min 90% Alkohol
- 10 min 70% Alkohol
- 10 min aqua dest.

\* 0,01 Sodium Citrate Puffer

2 min in Dampfkochtopf

\* in Citrate Puffer abkühlen lassen

15 min bei RT

\* Kurz in aqua dest. spülen

- \* 0,05M TBS pH 8,0 2 x 10 min
- \* Schnitte kurz in 0,1M TBS pH 7,4 waschen
- \* Blockierung endogener Oxidasen 30 min
- 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1M TBS pH 7,4
- \* 3 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* Präinkubation 1h bei RT
- 5% Esel Normalserum (Dianova), 0,3% Triton X-100 enthaltend in 0,1M TBS pH 7,4  
(ENS-TBS-T)
- \* 1. Antikörper ca. 16-18h bei RT
- Ziege anti-ChAT 1:100, Kaninchen anti-CSPG 1:1000 in ENT-TBS-T
- \* 3 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* 2. Antikörper 1h bei RT
- Biotinylierts Esel anti-Ziege IgG 1:500 (Dianova), Esel anti-Kaninchen 1:100 (Dianova) in  
0,1M TBS pH 7,4 mit 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)
- \* 3 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* Inkubation mit präformiertem ABC-Komplex: 1h bei RT
- 12,5 µg/ml Streptavidin (Molecular Probes Europe, Leiden, NL)  
und 2,5 µg/ml biotinylierte Peroxidase (Peroxidase I, Boehringer  
Mannheim selbst biotinyliert mit Biotinylamido-caproyl-N-  
Hydroxysuccinimidester, September 2002) in TBS-RSA
- \* 2 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* 0,05M TBS pH 8,0 10 min

- \* DAB-Färbung 10 min  
 mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol, Merck (30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1:2000 verdünnt → 0,015%)  
 in Cosubstrat-Lösung:  
 10 ml TBS, pH 8 + 2 mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid  
 (DAB, Sigma) + 40 mg Nickelammoniumsulfat-Hexahydrat,  
 Riedel de Haen)
- \* 3 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* 0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1M TBS pH 7,4 30 min  
 Beseitigung möglicher Restaktivität der Immunperoxidase
- \* 3 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-  
 Komplex 1:500 (Dianova) in TBS-RSA 1h
- \* 2 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* 0,05M Tris-Puffer pH 7,6 mind. 10 min
- \* Färbung mit DAB (0,5 mg/ml) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,015%) in 0,05M Tris-Puffer pH 7,6; Färbezeit  
 mikroskopisch kontrolliert: 10-40 min → braune CSPG-Immunreaktivität
- \* 2 x 0,1M TBS pH 7,4 je 10 min
- \* Aqua dest. je 5 min
- \* Lufttrocknen lassen
- \* Eindeckelung mit Entellan in Toluol (Merck)

## 10 Literatur

- Adams, I., Brauer, K., et al. (2001). "Perineuronal nets in the rhesus monkey and human basal forebrain including basal ganglia." *Neuroscience* 108(2): 285-98.
- Alvarado-Mallart, R. M. and Pincon-Raymond, M. (1979). "The palisade endings of cat extraocular muscles: a light and electron microscope study." *Tissue Cell* 11(3): 567-84.
- Baimbridge, K. G., Celio, M. R., et al. (1992). "Calcium-binding proteins in the nervous system." *Trends Neurosci* 15(8): 303-8.
- Bankfalvi, A., Riehemann, K., et al. (1994). "[Moist autoclaving. A simplified method for antigen unmasking]." *Pathologe* 15(6): 345-9.
- Benninghoff, A. and Drenckhahn, D., Eds. (2004). *Anatomie - Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*, Elsevier.
- Billig, I., Buisseret Delmas, C., et al. (1997). "Identification of nerve endings in cat extraocular muscles." *Anat Rec* 248(4): 566-75.
- Blümcke, I. and Celio, M. R. (1992). "Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities coexist within cytochrome oxidase-rich compartments of squirrel monkey area 18." *Exp Brain Res* 92(1): 39-45.
- Blumer, R., Wasicky, R., et al. (2001). "Presence and structure of innervated myotendinous cylinders in rabbit extraocular muscle." *Exp Eye Res* 73(6): 787-96.
- Bondi, A. Y. and Chiarandini, D. J. (1983). "Morphologic and electrophysiologic identification of multiply innervated fibers in rat extraocular muscles." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(4): 516-9.
- Bormioli, S. P., Sartore, S., et al. (1980). "'Slow' myosins in vertebrae skeletal muscle. An immunofluorescence study." *J Cell Biol* 85(3): 672-81.
- Bourne, J. A. (1983). *Handbuch I der Immunperoxidasefärbemethoden*. Hamburg, Dako Corporation.
- Brandt, D. E. and Leeson, C. R. (1966). "Structural differences of fast and slow fibers in human extraocular muscle." *Am J Ophthalmol* 62(3): 478-87.
- Brauer, K., Werner, L., et al. (1982). "Perineuronal nets of glia." *J Hirnforsch* 23(6): 701-8.
- Brooke, M. H. and Kaiser, K. K. (1970). "Muscle fiber types: how many and what kind?" *Arch Neurol* 23(4): 369-79.
- Brückner, G., Brauer, K., et al. (1993). "Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain." *Glia* 8(3): 183-200.

- Brückner, G., Hausen, D., et al. (1999). "Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease." *Neuroscience* 92(3): 791-805.
- Brückner, G., Schutz, A., et al. (1994). "Projection of non-cholinergic basal forebrain neurons ensheathed with perineuronal nets to rat mesocortex." *J Chem Neuroanat* 8(1): 11-8.
- Büttner-Ennever, J. A., Ed. (2005). *Neuroanatomy of the Oculomotor System. Progress in Brain Research*, Elsevier.
- Büttner-Ennever, J. A. (2006). "The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy." *Prog Brain Res* 151: 95-125.
- Büttner-Ennever, J. A. (2007). "Anatomy of the oculomotor system." *Dev Ophthalmol* 40: 1-14.
- Büttner-Ennever, J. A. and Büttner, U. (1988). "Neuroanatomy of the oculomotor system. The reticular formation." *Rev Oculomot Res* 2: 119-76.
- Büttner-Ennever, J. A., Eberhorn, A., et al. (2003). "Motor and sensory innervation of extraocular eye muscles." *Ann N Y Acad Sci* 1004: 40-9.
- Büttner-Ennever, J. A., Horn, A. K., et al. (2001). "Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys." *J Comp Neurol* 438(3): 318-35.
- Büttner-Ennever, J. A., Horn, A. K., et al. (1989). "Cell groups of the medial longitudinal fasciculus and paramedian tracts." *Rev Neurol (Paris)* 145(8-9): 533-9.
- Büttner-Ennever, J. A., Konakci, K. Z., et al. (2006). "Sensory control of extraocular muscles." *Prog Brain Res* 151: 81-93.
- Buresch, N. (2005). *Neuroanatomische Charakterisierung blickstabilisierender Neurone an der Hirnstammmitellinie der Primaten, einschließlich des Menschen*. Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München. München, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Burke, R. E. (1981). *Motor units: anatomy, physiology, and functional organization*. *Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System* American Physiological Society, Bethesda, VB Brooks (Ed.). Volume II. *Motor Control*: 345-422.
- Burke, R. E., Levine, D. N., et al. (1971). "Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius." *Science* 174(10): 709-12.
- Buttner-Ennever, J. A., Eberhorn, A., et al. (2003). "Motor and sensory innervation of extraocular eye muscles." *Ann N Y Acad Sci* 1004: 40-9.

- Campbell, M. J. and Morrison, J. H. (1989). "Monoclonal antibody to neurofilament protein (SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the human and monkey neocortex." *J Comp Neurol* 282(2): 191-205.
- Carlson, S. S. and Hockfield, S., Eds. (1996). *Tissue function. Extracellular matrix.* Amsterdam, Harword Academic Publishers.
- Carpenter, M. B., Periera, A. B., et al. (1992). "Immunocytochemistry of oculomotor afferents in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*)." *J Hirnforsch* 33(2): 151-67.
- Cattoretti, G., Becker, M. H., et al. (1992). "Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections." *J Pathol* 168(4): 357-63.
- Cattoretti, G., Pileri, S., et al. (1993). "Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections." *J Pathol* 171(2): 83-98.
- Celio, M. R. and Blümcke, I. (1994). "Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system." *Brain Res Brain Res Rev* 19(1): 128-45.
- Celio, M. R., Spreafico, R., et al. (1998). "Perineuronal nets: past and present." *Trends Neurosci* 21(12): 510-5.
- Clark, R. A., Miller, J. M., et al. (1997). "Location and stability of rectus muscle pulleys. Muscle paths as a function of gaze." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(1): 227-40.
- Delgado-Garcia, J. M., del Pozo, F., et al. (1986). "Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat--I. Motoneurons." *Neuroscience* 17(4): 929-52.
- Demer, J. L. (2002). "The orbital pulley system: a revolution in concepts of orbital anatomy." *Ann N Y Acad Sci* 956: 17-32.
- Demer, J. L., Miller, J. M., et al. (1995). "Evidence for fibromuscular pulleys of the recti extraocular muscles." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(6): 1125-36.
- Demer, J. L., Oh, S. Y., et al. (2000). "Evidence for active control of rectus extraocular muscle pulleys." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6): 1280-90.
- Dianova Paraffin Topics - Ein Handbuch für die Immunhistopathologie, Dianova GmbH.
- Dieringer, N. and Precht, W. (1986). "Functional organization of eye velocity and eye position signals in abducens motoneurons of the frog." *J Comp Physiol*: 158:179-194.
- Dietert, S. E. (1965). "The Demonstration of Different Types of Muscle Fibers in Human Extraocular Muscle Fibers in Human Extraocular Muscle by Electron Microscopy and Cholinesterase Staining." *Invest Ophthalmol* 4: 51-63.
- Dimitrova, D. M., Shall, M. S., et al. (2003). "Stimulation-evoked eye movements with and without the lateral rectus muscle pulley." *J Neurophysiol* 90(6): 3809-15.

- Donaldson, I. M. (2000). "The functions of the proprioceptors of the eye muscles." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1404): 1685-754.
- Eberhorn, A. C., Ardeleanu, P., et al. (2005). "Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers." *J Comp Neurol* 491(4): 352-66.
- Eberhorn, A. C., Buttner-Ennever, J. A., et al. (2006). "Identification of motoneurons supplying multiply- or singly-innervated extraocular muscle fibers in the rat." *Neuroscience* 137(3): 891-903.
- Eberhorn, A. C., Horn, A. K., et al. (2005). "Palisade endings in extraocular eye muscles revealed by SNAP-25 immunoreactivity." *J Anat* 206(3): 307-15.
- Eberhorn, A. C., Horn, A. K., et al. (2005). "Proprioception and palisade endings in extraocular eye muscles." *Ann N Y Acad Sci* 1039: 1-8.
- Fuchs, A. F. and Luschei, E. S. (1971). "The activity of single trochlear nerve fibers during eye movements in the alert monkey." *Exp Brain Res* 13(1): 78-89.
- Fuchs, A. F., Scudder, C. A., et al. (1988). "Discharge patterns and recruitment order of identified motoneurons and internuclear neurons in the monkey abducens nucleus." *J Neurophysiol* 60(6): 1874-95.
- Goldberg, S. J., Clamann, H. P., et al. (1981). "Relation between motoneuron position and lateral rectus motor unit contraction speed: an intracellular study in the cat nucleus abducens nucleus." *Neurosci Lett*(23): 49-54.
- Han, Y., Wang, J., et al. (1999). "Slow tonic muscle fibers in the thyroarytenoid muscles of human vocal folds; a possible specialization for speech." *Anat Rec* 256(2): 146-57.
- Hancock, M. (1984). "Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining." *J Histochem Cytochem* 32(3): 311-4.
- Härtig, W., Brauer, K., et al. (1994). "Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons." *Brain Res* 635(1-2): 307-11.
- Hobohm, C., Hartig, W., et al. (1998). "Low expression of extracellular matrix components in rat brain stem regions containing modulatory aminergic neurons." *J Chem Neuroanat* 15(3): 135-42.
- Hockfield, S., Kalb, R. G., et al. (1990). "Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55: 505-14.

- Horn, A. K., Bruckner, G., et al. (2003). "Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins." *J Comp Neurol* 455(3): 341-52.
- Horn, A. K. and Büttner-Ennever, J. A. (1998). "Premotor neurons for vertical eye movements in the rostral mesencephalon of monkey and human: histologic identification by parvalbumin immunostaining." *J Comp Neurol* 392(4): 413-27.
- Horn, A. K., Büttner-Ennever, J. A., et al. (1995). "Histological identification of premotor neurons for horizontal saccades in monkey and man by parvalbumin immunostaining." *J Comp Neurol* 359(2): 350-63.
- Horn, A. K., Büttner-Ennever, J. A., et al. (1994). "Neurotransmitter profile of saccadic omnipause neurons in nucleus raphe interpositus." *J Neurosci* 14(4): 2032-46.
- Horn, A. K., Eberhorn, A., et al. (2008). "Periocolomotor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus." *J Comp Neurol* 507(3): 1317-35.
- Ichikawa, T. and Shimizu, T. (1998). "Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey." *Brain Res* 779(1-2): 96-103.
- Jacoby, J., Chiarandini, D. J., et al. (1989). "Electrical properties and innervation of fibers in the orbital layer of rat extraocular muscles." *J Neurophysiol* 61(1): 116-25.
- Konakci, K. Z., Streicher, J., et al. (2005). "Molecular characteristics suggest an effector function of palisade endings in extraocular muscles." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1): 155-65.
- Kono, R., Poukens, V., et al. (2002). "Quantitative analysis of the structure of the human extraocular muscle pulley system." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(9): 2923-32.
- Krüger, P. (1949). "Die Innervation der tetanischen und tonischen Fasern der quergestreiften Skelettmuskulatur der Wirbeltiere." *Anat Anz*(97): 169.
- Langer, T., Fuchs, A. F., et al. (1985). "Afferents to the flocculus of the cerebellum in the rhesus macaque as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase." *J Comp Neurol* 235(1): 1-25.
- Lennerstrand, G., Ed. (1975). *Motor units in eye muscles. Basic mechanisms of ocular motility and their clinical implications.* New York, Pergamon Press.
- Lennerstrand, G. and Nichols, K. C. (1977). "Morphology of motor units in cat extraocular nodule." *Acta Ophthalmol (Copenh)* 55(6): 913-8.
- Lienbacher, K., Mustari, M., et al. (2011). "Do Palisade Endings in Extraocular Muscles Arise from Neurons in the Motor Nuclei?" *Invest Ophthalmol Vis Sci*.



- Lukas, J. R., Blumer, R., et al. (2000). "Innervated myotendinous cylinders in human extraocular muscles." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(9): 2422-31.
- Maier, A., DeSantis, M., et al. (1974). "The occurrence of muscle spindles in extraocular muscles of various vertebrates." *J Morphol* 143(4): 397-408.
- Matsui, F., Nishizuka, M., et al. (1999). "Proteoglykans in perineuronal nets." *Acta Histochem Cytochem*(43): 141-147.
- McCrea, R. A., Strassman, A., et al. (1986). "Morphology and physiology of abducens motoneurons and internuclear neurons intracellularly injected with horseradish peroxidase in alert squirrel monkeys." *J Comp Neurol* 243(3): 291-308.
- Melendez-Ferro, M., Perez-Costas, E., et al. (2000). "GABA-immunoreactive internuclear neurons in the ocular motor system of lampreys." *Brain Res* 855(1): 150-7.
- Miller, J. M., Demer, J. L., et al. (2003). "Extraocular connective tissue architecture." *J Vis* 3(3): 240-51.
- Miller, N. R., Newman, N. J., et al., Eds. (2004). *Walsh & Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology*, Lippincott Raven.
- Moore, G. E. and Schachat, F. H. (1985). "Molecular heterogeneity of histochemical fibre types: a comparison of fast fibres." *J Muscle Res Cell Motil* 6(4): 513-24.
- Morawski, M., Bruckner, M. K., et al. (2004). "Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress." *Exp Neurol* 188(2): 309-15.
- Morris, N. P. and Henderson, Z. (2000). "Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex." *Eur J Neurosci* 12(3): 828-38.
- Munakata, S. and Hendricks, J. B. (1993). "Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue." *J Histochem Cytochem* 41(8): 1241-6.
- Nakao, S. and Sasaki, S. (1980). "Excitatory input from interneurons in the abducens nucleus to medial rectus motoneurons mediating conjugate horizontal nystagmus in the cat." *Exp Brain Res* 39(1): 23-32.
- Nelson, J. S., Goldberg, S. J., et al. (1986). "Motoneuron electrophysiological and muscle contractile properties of superior oblique motor units in cat." *J Neurophysiol* 55(4): 715-26.
- Oda, Y. (1999). "Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system." *Pathol Int* 49(11): 921-37.
- Oh, S. Y., Poukens, V., et al. (2001). "Quantitative analysis of rectus extraocular muscle layers in monkey and humans." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(1): 10-6.

- Peng, M., Poukens, V., et al. (2010). "Compartmentalized innervation of primate lateral rectus muscle." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(9): 4612-7.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., et al. (1972). "Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits." *Biochemistry* 11(14): 2627-33.
- Pierobon-Bormioli, S., Sartore, S., et al. (1981). "'Fast' isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle." *J Histochem Cytochem* 29(10): 1179-88.
- Porter, J. D., Baker, R. S., et al. (1995). "Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function." *Surv Ophthalmol* 39(6): 451-84.
- Porter, J. D., Poukens, V., et al. (1996). "Structure-function correlations in the human medial rectus extraocular muscle pulleys." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(2): 468-72.
- Putz, R. and Pabst, R., Eds. (2007). *Sobotta - Anatomie des Menschen*.
- Ranvier, L. (1874). "De queleues faits relatifs a l'histologie et a la physiologie des muscles stries." *Arch. Physiol. Norm. Pathol.*
- Richmond, F. J., Johnston, W. S., et al. (1984). "Palisade endings in human extraocular muscles." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(4): 471-6.
- Ruskell, G. L., Kjellevoid Haugen, I. B., et al. (2005). "Double insertions of extraocular rectus muscles in humans and the pulley theory." *J Anat* 206(3): 295-306.
- Sas, J. and Schab, R. (1952). "Die sogenannten "Palisaden-Endigungen" der Augenmuskeln." *Acta Morph Acad Sci (Hungary)*(2): 259-266.
- Sayed, R., Mubarak, W., et al. (2005). "Perineuronal Nets in the Central Nervous System." *Anat Histol Embryol*(34): 45.
- Schiaffino, S., Gorza, L., et al. (1989). "Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres." *J Muscle Res Cell Motil* 10(3): 197-205.
- Schiaffino, S., Hanzlikova, V., et al. (1970). "Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers." *J Cell Biol* 47(1): 107-19.
- Sevel, D. (1986). "The origins and insertions of the extraocular muscles: development, histologic features, and clinical significance." *Trans Am Ophthalmol Soc* 84: 488-526.
- Shall, M. S. and Goldberg, S. J. (1992). "Extraocular motor units: type classification and motoneuron stimulation frequency-muscle unit force relationships." *Brain Res* 587(2): 291-300.
- Shall, M. S., Sorg, P. J., et al. (1995). "Relationship of the mechanical properties of the cat inferior oblique muscle to the anatomy of its motoneurons and nerve branches." *Acta Anat (Basel)* 153(2): 151-60.

- Shi, S. R., Key, M. E., et al. (1991). "Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections." *J Histochem Cytochem* 39(6): 741-8.
- Spencer, P. D. and Porter, J. D. (2006). "Biological organization of the extraocular muscles." *Prog Brain Res*: 151:43-80.
- Spencer, R. F. and Baker, R. (1986). "Histochemical localization of acetylcholinesterase in relation to motor neurons and internuclear neurons of the cat abducens nucleus." *J Neurocytol* 15(2): 137-54.
- Steiger, H. J. and Buttner-Ennever, J. (1978). "Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus: a double retrograde tracer study in the cat." *Brain Res* 148(1): 181-8.
- Sternberger, L. A. (1986). *Immunocytochemistry*. New York, Wiley.
- Sternberger, L. A. and Sternberger, N. H. (1983). "Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(19): 6126-30.
- Sylvestre, P. A. and Cullen, K. E. (2002). "Dynamics of abducens nucleus neuron discharges during disjunctive saccades." *J Neurophysiol* 88(6): 3452-68.
- Tsang, Y. M., Chiong, F., et al. (2000). "Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS." *Brain Res* 861(1): 45-58.
- Ugolini, G., Klam, F., et al. (2006). "Horizontal eye movement networks in primates as revealed by retrograde transneuronal transfer of rabies virus: differences in monosynaptic input to "slow" and "fast" abducens motoneurons." *J Comp Neurol* 498(6): 762-85.
- Vijayashankar, N. and Brody, H. (1977). "A study of aging in the human abducens nucleus." *J Comp Neurol* 173(3): 433-8.
- Wasicky, R., Horn, A. K., et al. (2004). "Twitch and nontwitch motoneuron subgroups in the oculomotor nucleus of monkeys receive different afferent projections." *J Comp Neurol* 479(2): 117-29.
- Wasicky, R., Ziya-Ghazvini, F., et al. (2000). "Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(5): 980-90.
- Yamaguchi, Y. (2000). "Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix." *Cell Mol Life Sci* 57(2): 276-89.
- Zimmermann, L., May, P. J., et al. (2010). "Evidence that the extraocular motor nuclei innervate monkey palisade endings." *Neurosci Lett* 489(2): 89-93.

## 11 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Jean Büttner-Ennever für ihre herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und ihre uneingeschränkte Förderung und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt unserer Zusammenarbeit.

In gleichem Maße möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin PD Dr. Anja Horn-Bochtler für ihre zahlreichen Anregungen, hervorragende fachliche Betreuung und menschliche Unterstützung bedanken, die einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

Dank gebührt auch Ahmet Messoudi und Dr. Andreas Eberhorn für ihre Freundschaft und Unterstützung im Labor.

Ich möchte meinen Eltern danken für ihre uneingeschränkte Unterstützung, die sie mir in meinem Leben gegeben haben und ihren Glauben an mich. Meinen Brüdern danke ich für ihren moralischen Support.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden Mike, Niko, Lim Che, Lisa und Anja, die mich auf ihre Art und Weise ebenfalls immer sehr unterstützt haben.

## 12 Lebenslauf

### ANNIE HORNG

---

Geburtsdatum: 30. Dezember 1978  
 Geburtsort: München, Deutschland  
 Email: annie.horng@med.uni-muenchen.de

### SCHULISCHER WERDEGANG

---

1985- 1989 Grundschole Wiesenhof, Wilhelmshaven  
 1989- 1991 Orientierungsstufe Altengroden, Wilhelmshaven  
 1991- 1998 Cäciliensohule Wilhelmshaven, staatlich anerkanntes Gymnasium in kirchlicher Trägerschaft  
 06/1998 Allgemeine Hochschulreife

### STUDIUM / AUSBILDUNG

---

11/1998-04/2005 Studiums der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität  
 11/2002-04/2004 Doktorandenstipendium des DFG Graduiertenkollegs 688 „Neurotraumatologie und neuropsychologische Rehabilitation“  
 30.03.-08.08.2004 1. PJ Tertial am Beth Israel Deaconess Medical Center und Mount Auburn, Boston, USA, Innere Medizin, Stipendium Munich-Harvard Alliance für die Harvard Medical School  
 09.08.-26.11.2004 2. PJ Tertial an der Chirurgischen Klinik, Klinikum Innenstadt München  
 27.11.-24.02.2005 3. PJ Tertial am Institut für klinische Radiologie, Klinikum Innenstadt München  
 04/2005 3. Staatsexamen

---

Seit 07/2005                      Assistenzärztin der Radiologie, Institut für Klinische Radiologie der  
LMU München – Campus Großhadern

---

FORT-UND WEITERBILDUNG / LEHRTÄTIGKEITEN

---

WS 2001/02                      Co-Assistent des Präparierkurses der Anatomischen Anstalt

WS 2002/03                      Co-Assistent des Präparierkurses der Anatomischen Anstalt

10/2004                          Tutor für Crashkurs Anamnese/Untersuchung MeCum Modul I

04/2005                          Tutor für Crashkurs Anamnese/Untersuchung MeCum Modul I

11/2006                          Dozentin Dubai Ultrasound Academy, Dubai, UAE

Seit 2007                          Dozentin RTA Schule des Instituts für Klinische Radiologie, LMU  
München, Schwerpunkt Skelettradiologie

Stipendien:

11/2002-04/2004                Doktorandenstipendium des DFG Graduiertenkollegs 688 „Neurotraumatologie und neuropsychologische Rehabilitation“

04-08/2004                      Stipendium der Harvard-Munich Alliance für das PJ-Programm an der  
Harvard Medical School in Boston, Massachusetts

Mitgliedschaften:

Seit 2004                          Harvard Club München e.V.

Seit 2006                          Radiological Society of North America (RSNA)

Seit 2008                          Deutsche Röntgengesellschaft e.V.

Seit 2008                          International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)

Seit 2008                          European Society of Radiology (ESR)

---

**Ehrenwörtliche Versicherung:**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass meine Dissertation mit dem Titel

„Neuroanatomische Identifizierung funktioneller Neurone im Nucleus abducens des Menschen“

von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist. Wörtliche oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

München, den 01.02.2011

Annie Horng