

Aus der Anatomischen Anstalt
Lehrstuhl Anatomie I – Vegetative Anatomie
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Molekulare Eigenschaften von twitch und non-twitch Motoneuronen im Nucleus oculomotorius des Rhesusaffen

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

vorgelegt von
Mirjam Susanna Seidler
aus
Dachau
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Adrian Danek

Mitbetreuung durch die
habilitierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Extraokuläre Muskeln	1
1.1.1 Makroskopische Anatomie der extraokulären Muskeln	1
1.1.2 Mikroskopische Anatomie der extraokulären Muskeln	2
1.1.3 Funktion der extraokulären Muskeln	3
1.1.4 Motorische Innervation der extraokulären Muskeln	5
1.1.4.1 Neuromuskuläre Verbindungen	5
1.1.4.2 Hirnnervenkerne der extraokulären Muskeln	5
1.1.4.2.1 Ncl. oculomotorius	6
1.1.4.2.2 Ncl. trochlearis	8
1.1.4.2.3 Ncl. abducens	8
1.1.4.3 Funktion der MIF- und SIF-Motoneurone	10
1.1.5 Sensorische Innervation der extraokulären Muskeln	10
1.2 Untersuchung der SIF- und MIF-Motoneurone	12
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Versuchstiere	15
2.1.1 Tracer	15
2.1.1.1 Tracerinjektion	16
2.1.2 Perfusion	16
2.1.3 Histologische Aufarbeitung	16
2.2 Immunhistochemische Färbung	17

2.2.1	Immunperoxidase-Färbungen	17
2.2.1.1	Vorbereitung der Paraffinschnitte	17
2.2.1.1.1	Entparaffinierung und Rehydrierung.....	17
2.2.1.1.2	Antigendemaskierung.....	17
2.2.1.2	Diaminobenzidin (DAB)-/ Diaminobenzidin-Nickel (DAB-	18
	Ni)-Färbung	18
2.2.1.2.1	Einzelfärbung.....	18
2.2.2	Fluoreszenz-Immunhistochemische Färbungen	20
2.2.3	Antikörper	21
2.2.3.1	ChAT.....	22
2.2.3.2	NeuN	22
2.2.3.3	Erry.....	23
2.2.3.4	CTB.....	23
2.2.3.5	Kaliumkanäle (Kv1.1; Kv3.1b)	24
2.2.3.6	Aggrecan (ACAN)	24
2.3	Auswertung	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Immunhistochemische Charakterisierung von MIF-Motoneuronen.....	26
3.1.1	Identifizierung von SIF- und MIF-Motoneuronen im Ncl. oculomotorius	26
3.1.2	Abgrenzung von SIF- und MIF-Motoneuronen durch Tracermarkierung	29
3.1.3	Tracerunabhängige Abgrenzung von MIF- und SIF-Motoneuronen	31
3.1.3.1	ChAT-Immunfärbung und perineuronale Netze	31
3.1.3.2	Kaliumkanäle in SIF- und MIF-Motoneuronen	33
3.1.4	Untersuchungen zur Identifikation von α - und γ -Motoneuronen	41
3.1.4.1	Rückenmark.....	41
3.1.4.2	Ncl. trochlearis.....	43
3.1.4.3	Ncl. oculomotorius.....	46
4	Diskussion	47
4.1	Charakterisierung der Neurone der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius.....	48
4.1.1	Perineuronale Netze	48

4.1.2	Kaliumkanäle.....	49
4.2	Sind die MIF-Motoneurone der extraokulären Muskeln mit γ -Motoneuronen des Rückenmarks vergleichbar?	52
4.3	Schlussfolgerung	54
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literatur.....	57
	Eidesstattliche Versicherung	65

Abkürzungsverzeichnis

ACAN	Aggrecan
CCN	Ncl. centralis caudalis
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CR	Calretinin
CSPG	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan
CTB	Choleratoxin-Untereinheit B
DAB	Diaminobenzidin
DAB-Ni	Diaminobenzidin-Nickel
ECM	Extrazelluläre Matrix
EOM	Extraokuläre Muskeln
ER	Östrogenrezeptor (Estrogen receptor)
Err	Östrogen-verwandter Rezeptor (Estrogen-related receptor)
EW	Ncl. Edinger-Westphal (Ncl. accessorius nervi oculomotorii)
EWpg	präganglionäre Neurone des Ncl. Edinger-Westphal
IO	M. obliquus inferior
IR	M. rectus inferior
LP	M. levator palpebrae
LR	M. rectus lateralis
MIF	multipel-innervierte Muskelfasern (multiply innervated fiber)
MLF	Medialer longitudinaler Fasziculus (medial longitudinal fasciculus)
MR	M. rectus medialis
nIII	Nucleus oculomotorius (III)
NeuN	Neuronal Nuclei

PBS	Phosphat-Puffer
PMT	Paramedian tract-Neurone
PN	Perineuronale Netze
SIF	einzeln-innervierte Muskelfasern (singly innervated fiber)
SO	M. obliquus superior
SR	M. rectus superior
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris Buffered Saline)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Lokalisation der Motoneurone des Ncl. oculomotorius
- Abb. 2 Lokalisation der Motoneurone des Ncl. trochlearis
- Abb. 3 Lokalisation der Motoneurone des Ncl. abducens
- Abb. 4 ChAT-Färbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 5 ACAN/CTB-Fluoreszenzfärbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 6 ChAT/ACAN-Färbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 7 ChAT/ACAN-Doppelfärbung der Neurone des rostralen Teils des Ncl. oculomotorius und des EWpg
- Abb. 8 Kv1.1-Färbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 9 Kv1.1/ChAT-Doppelfärbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 10 Kv3.1b-Färbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 11 CTB/Kv1.1-Färbung und CTB/Kv3.1b-Färbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 12 Detailaufnahme einer ACAN/CTB/Kv1.1-Färbung des Ncl. oculomotorius
- Abb. 13 ChAT/Erry-doppelt markierte Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks
- Abb. 14 ChAT/NeuN-doppelt markierte Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks
- Abb. 15 ChAT/NeuN-doppelt markierte Neurone im Ncl. trochlearis
- Abb. 16 ChAT/Erry-doppelmarkierte Neurone im Ncl. trochlearis
- Abb. 17 ChAT/Erry/CTB-dreifachmarkiertes Neuron in der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Die extraokulären Muskeln und ihre Funktionen bei der Augenbewegung
- Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Antikörper
- Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Färbemethoden und Marker

1 Einleitung

1.1 Extraokuläre Muskeln

1.1.1 Makroskopische Anatomie der extraokulären Muskeln

Als extraokuläre Muskeln (EOM) werden diejenigen Muskeln bezeichnet, die dafür zuständig sind, den Augapfel zu bewegen. Es handelt sich dabei um sechs Muskeln, die alle mit ihren Endsehnen in die Sclera des Bulbus oculi einstrahlen. Aufgrund ihres Verlaufs lassen sich die EOM in zwei Gruppen einteilen. Man unterscheidet vier gerade und zwei schräge Muskeln. Zu den geraden EOM gehören:

- M. rectus medialis (MR)
- M. rectus lateralis (LR)
- M. rectus inferior (IR)
- M. rectus superior (SR)

Die schrägen EOM sind:

- M. obliquus superior (SO)
- M. obliquus inferior (IO)

Alle vier geraden EOM entspringen am Anulus tendineus communis (ZINN-Sehnenring). Der SO hat seinen Ursprung medial des Anulus tendineus communis am Corpus ossis sphenoidalis sowie an der Durascheide des N. opticus. Der IO entspringt am vorderen medialen Bereich der Orbita, seitlich der Incisura lacrimalis an der Facies orbitalis der Maxilla. Ihren Ansatz haben alle sechs EOM am Bulbus oculi, was sie in die Lage versetzt diesen auch zu bewegen. Die Mm. recti verlaufen dabei vom ZINN-Sehnenring divergierend zum Bulbus. Sie bilden eine Art Muskeltrichter und setzen vor dem Äquator des Bulbus an. Der SO verläuft etwas oberhalb des MR parallel der medialen Orbitawand nach vorne. Er wird von der Trochlea, einem am Os frontale befestigten knorpelig-sehnigen Ring, umfasst und spitzwinklig (51°) nach posterior zum Bulbus umgelenkt. Seine Endsehne setzt hinter dem Äquator des Bulbus, im lateralen

hinteren Quadranten, an. Der IO befindet sich kaudal des Bulbus. Er verläuft nahezu parallel zur Endsehne des SO und setzt unten am lateralen hinteren Quadranten an (Sharpe and Wong, 2005; Thömke, 2008). Ein weiterer Muskel, der ebenso wie die geraden EOM seinen Ursprung am Anulus tendineus communis hat, ist der M. levator palpebrae (LP). Sein Ansatz befindet sich allerdings nicht am Bulbus oculi, sondern er strahlt stattdessen in das obere Augenlid ein. Der LP bewegt damit nicht den Bulbus, sondern wirkt als Lidheber (May et al., 2002; Sharpe and Wong, 2005).

1.1.2 Mikroskopische Anatomie der extraokulären Muskeln

Im Vergleich zur Skelettmuskulatur ist der Aufbau der EOM komplexer. In ihrer Funktion zeichnen sie sich nicht nur durch Schnelligkeit aus, sondern auch durch hohe Präzision. Bei den EOM können insgesamt sechs verschiedene Muskelfasertypen unterschieden werden (Spencer and Porter, 1988). Diese wiederum können in zwei Gruppen eingeteilt werden (Spencer and Porter, 1988; 2006): Die einfach-innervierten schnell kontrahierenden (twitch) Muskelfasern (SIFs) und die multipel-innervierten langsam kontrahierenden (non-twitch) Muskelfasern (MIFs). Vier der sechs Muskelfasertypen der EOM gehören der Gruppe der SIFs an. Die restlichen zwei Muskelfasertypen sind MIFs. Neben ihrer unterschiedlichen Lokalisation innerhalb des Muskels unterscheiden sich die verschiedenen Muskelfasertypen vor allem an ihrem Gehalt an Mitochondrien, was sich in ihrer unterschiedlichen Ermüdbarkeit und ihren unterschiedlichen funktionellen Schwerpunkten widerspiegelt. Die SIFs entsprechen den Muskelfasern anderer quergestreifter Muskeln. Die MIFs dagegen sind bei Säugetieren seltener anzutreffen. Sie sind neben den EOM nur noch in der Larynxmuskulatur und in der Muskulatur im Mittelohr, im Musculus tensor tympani, zu finden (Fernand and Hess, 1969; Périé et al., 1997; Schiaffino and Reggiani, 2011). Bei Amphibien allerdings gehören die MIFs zur typischen Skelettmuskulatur (Chiarandini and Stefani, 1979; Morgan and Proske, 1984; zur Übersicht: Spencer and Porter, 2006).

Bereits 1938 wurde beschrieben, dass bei den EOM eine innere von einer äußeren Schicht unterschieden werden kann (Kato, 1938). Die innere globale Schicht liegt dem Bulbus direkt an, während die äußere orbitale Schicht der Orbita zugewandt ist (Sharpe and Wong, 2005).

Die Muskelfasern der globalen Schicht enden in der Sclera des Bulbus und sind so für direkte Bewegungen des Bulbus zuständig. Die Muskelfasern der orbitalen Schicht dagegen inserieren zu einem großen Teil in der Periorbita in der Nähe des vorderen Rands der Orbita. Dadurch

wird der Muskel am vorderen Orbitarand verankert und die Bewegungsfreiheit der globalen Schicht gewährleistet (Drenckhahn et al., 2004; Spencer and Porter, 2006; Thömke, 2008).

Beide Schichten, die globale und die orbitale, bestehen sowohl aus MIFs als auch aus SIFs, unterscheiden sich aber in ihrer jeweiligen Zusammensetzung (Porter et al., 1995). In der globalen Schicht sind ca. 90% der Muskelfasern SIFs. Diese lassen sich in drei verschiedene Fasertypen unterscheiden: rote Fasern, intermediäre Fasern und weiße Fasern. Die roten Fasern besitzen viele Mitochondrien und sind wenig ermüdbar. Die weißen Fasern, die nur wenige Mitochondrien besitzen, sind dagegen leicht ermüdbar und die intermediären Fasern liegen in der Zahl der Mitochondrien und damit auch mit ihrer Ermüdbarkeit zwischen den roten und den weißen Fasern (Spencer and Porter, 1988; Porter et al., 1995).

Die restlichen 10% der Muskelfasern der globalen Schicht sind MIFs (Porter et al., 1995). Sie sind mit den langsamen, tonischen Muskelfasern bei Amphibien vergleichbar (Chiarandini and Stefani, 1979).

Auch in der orbitalen Schicht machen die SIFs den größten Teil (ca. 80%) der Muskelfasern aus (Porter et al., 1995). Allerdings findet man hier einen anderen Typ der schnellkontrahierenden Muskelfasern, nämlich sehr wenig ermüdbare SIFs, die sich durch einen sehr hohen Anteil an Mitochondrien auszeichnen (Spencer and Porter, 1988). Die MIFs der orbitalen Schicht sind komplexer als die MIFs der globalen Schicht. Sie zeigen in ihrem zentralen Anteil eine schnelle kontrahierende (twitch) Aktivität während sich ihr proximaler und distaler Anteil langsam kontrahiert (non-twitch) (Pachter, 1984; Jacoby et al., 1989; Porter et al., 1995; Davidowitz et al., 1996).

1.1.3 Funktion der extraokulären Muskeln

Der Bulbus oculi lässt sich um drei Hauptachsen bewegen. Bewegungen um die sagittale Achse, die der Sehachse entspricht, führen zu einer Innenrotation bzw. zu einer Außenrotation. Bei einer Bewegung um die longitudinale Achse wird das Auge abduziert oder adduziert und Bewegungen um die transversale Achse führen zu einer Elevation bzw. zu einer Depression.

Für die EOM, die symmetrisch um den Bulbus angeordnet sind, können aufgrund ihrer Lage zu den Hauptachsen Hauptfunktionen und Nebenfunktionen beschrieben werden (Tab. 1). Der MR ist der Hauptadduktor des Auges. Er steht dem LR, dem Hauptabduktor des Bulbus, gegenüber und wirkt als dessen Antagonist. Diese beiden horizontalen Muskeln sind die einzigen der

EOM, die keine Nebenfunktionen erfüllen. Die übrigen EOM (SR, IR, SO und IO) können abhängig von ihrer Ausgangsposition neben ihrer Hauptfunktion auch Nebenfunktionen erfüllen. So kann der SR, der hauptsächlich als Elevator wirkt, zusätzlich bei der Adduktion und Innenrotation mitwirken, während der IR bei Kontraktion, neben der Depression, auch Adduktion und Außenrotation bewirken kann. Der SO, der für die Innenrotation des Auges zuständig ist, kann zusätzlich als Depressor und leichter Abduktor wirken. Eine Kontraktion des IO dagegen kann neben der Außenrotation eine Elevation und eine leichte Abduktion bewirken. Die Bewegungen des Augapfels ergeben sich letztendlich aus einem Zusammenwirken aller EOM und einer Koordination der Bewegungen des rechten und des linken Auges. So ist für einen Blick zur rechten Seite eine konjugierte Augenbewegung mit Adduktion des linken und Abduktion des rechten Auges nötig. Eine gleichzeitige Abduktion beider Augen (Divergenz der Sehachsen) ist willkürlich so gut wie nicht möglich. Eine gleichzeitige Adduktion beider Augen (Konvergenz der Sehachsen) führt dazu, dass sich die Sehachsen im nasalen Gesichtsfeld überschneiden (Thömke, 2008; Eysel, 2018).

Extraoculärer Muskel	Hauptfunktion	Nebenfunktion
SR	Elevation	Adduktion, Innenrotation
IR	Depression	Adduktion, Außenrotation
MR	Adduktion	keine Nebenfunktion
LR	Abduktion	keine Nebenfunktion
SO	Innenrotation	Depression, leichte Abduktion
IO	Außenrotation	Elevation, leichte Abduktion

Tab. 1 Die extraoculären Muskeln und ihre Funktionen bei der Augenbewegung

1.1.4 Motorische Innervation der extraokulären Muskeln

Die motorische Innervation der EOM erfolgt durch drei verschiedene Hirnnerven. Der N. oculomotorius (III) innerviert über seinen Ramus superior den SR sowie den MR. Der IR und der IO werden über den Ramus inferior des N. oculomotorius innerviert. Der N. trochlearis (IV) innerviert den SO. Der N. abducens (VI) innerviert den LR (Büttner-Ennever, 2006; Thömke, 2008).

1.1.4.1 Neuromuskuläre Verbindungen

Bei der Betrachtung der verschiedenen Muskelfasertypen der EOM konnte gezeigt werden, dass die SIFs von relativ großen Nerven (\varnothing 7-11 μm) innerviert werden, die über *en plaque* Endplatten, im zentralen Drittel der Muskelfaser enden. Sie reagieren auf elektrische Erregung mit einer Alles-oder-Nichts-Reaktion, die sich über die gesamte Länge der Muskelfaser ausbreitet. Die MIFs dagegen werden von dünnen myelinisierten Nervenfasern mit einem Durchmesser von 3-5 μm innerviert. Ihre motorischen *en grappe* Endplatten befinden sich über die gesamte Muskelfaserlänge verteilt, weisen aber eine höhere Dichte in den distalen Bereichen des Muskels auf. Die MIFs reagieren auf elektrische Erregung mit einer langsamen tonischen Kontraktion, die sich lokal von den multiplen Endigungen über die gesamte Muskelfaserlänge ausbreitet. Im Gegensatz zu den SIFs sind die MIFs ermüdungsresistent (Büttner-Ennever et al., 2001).

1.1.4.2 Hirnnervenkerne der extraokulären Muskeln

Die Hirnnervenkerne der Hirnnerven, die die EOM innervieren, sind in drei voneinander getrennten Regionen im Hirnstamm zu finden. In bzw. um die Hirnnervenkerne befinden sich sowohl MIF- als auch SIF-Motoneurone. Die SIF-Motoneurone befinden sich dabei generell innerhalb der eigentlichen Kerngebiete der Hirnnervenkerne, während die MIF-Motoneurone in peripheren Gruppen, in denen ebenfalls die Zellkörper der Palisadenendigungen enthalten sind, zu finden sind (Büttner-Ennever et al., 2001; Lienbacher et al., 2011b; Zimmermann et al., 2011).

1.1.4.2.1 Ncl. oculomotorius

Im rostralen Mesencephalon befindet sich das paarige Kerngebiet des Ncl. oculomotorius (III) ventral des Aqueductus mesencephali beidseits neben der Mittellinie in der oberen Hälfte des Tegmentums. Dorsomedial grenzt an den Ncl. oculomotorius jeweils der ebenfalls paarige Ncl. accessorius n. oculomotorii (Edinger-Westphalkern (EW)) an. Dieser Kern enthält die präganglionären Neurone (EWpg), die zum Ganglion ciliare projizieren, das sich in der Orbita lateral des N. opticus befindet. Lateral des Ncl. oculomotorius verläuft der Fasciculus longitudinalis medialis (MLF). Nach kaudal reicht das Kerngebiet des Ncl. oculomotorius bis auf die Höhe der Colliculi inferiores (Büttner-Ennever, 2006; Thömke, 2008).

Der Oculomotoriuskern enthält die Motoneurone, die den kontralateralen SR sowie die ipsilateralen MR, IR und IO innervieren. Die Motoneurone des LP befinden sich bei Spezies mit frontal stehenden Augen, wie Primat oder Katze, im Nucleus centralis caudalis (CCN), einer etwas separat liegenden unpaaren Subgruppe, die sich dorsal des caudalen Pols des Ncl. oculomotorius befindet (Akagi, 1978; Sun and May, 1993). Bei Spezies mit seitlich stehenden Augen, wie Ratte oder Hase, dagegen befinden sich die Neurone des LP vor allem lateral des jeweils kontralateralen Oculomotoriuskerns (Akagi, 1978; Glicksman, 1980). Innerhalb des Oculomotoriuskerngebiets sind die Motoneurone topographisch organisiert. So befinden sich die Motoneurone des SR im kaudalen Teil des Kerngebiets. Nach rostral schließen sich zuerst die Motoneurone des MR und IO an. Den rostralsten Teil des Ncl. oculomotorius bilden Motoneurone des IR (dorsal) und MR (ventral). Hier ist eine Besonderheit der Lokalisation der Motoneurone des MR zu erkennen, die neben den Motoneuronen des LP die größte Variationsbreite in der Lokalisation zeigen. Innerhalb des Kerngebiets des Ncl. oculomotorius liegen sie nicht, wie die Motoneurone der anderen EOM, in nur einem Kerngebiet, sondern sind an separaten Lokalisationen als A- und B-Gruppe zu finden. Die A-Gruppe, die die meisten Motoneurone des MR enthält, bildet den ventralen Teil des Ncl. oculomotorius und reicht bis in den MLF. Die B-Gruppe bildet dagegen als kleinere Gruppe den dorsolateralen Teil des Ncl. oculomotorius. Eine dritte Gruppe von Neuronen, in der ebenfalls Motoneurone des MR enthalten sind, ist die C-Gruppe. Diese befindet sich dorsomedial außerhalb des eigentlichen Kerngebiets des Oculomotoriuskerns (Büttner-Ennever and Akert, 1981; Büttner-Ennever, 2006).

Zur weiteren Differenzierung der Motoneurone des Ncl. oculomotorius wurde die Verteilung der MIF- und SIF-Motoneurone im Oculomotoriuskern untersucht. Durch retrograde Tracer-Injektion in den distalen Muskelsehnübergang außerhalb der *en plaque* Endplattenzone

konnte gezeigt werden, dass sich die Motoneurone der MIFs räumlich getrennt von den Motoneuronen der SIFs befinden und sich von diesen auch in ihrer Größe unterscheiden. Die größeren SIF-Motoneurone liegen innerhalb der Grenze des eigentlichen Kerngebiets des Ncl. oculomotorius. Die kleineren MIF-Motoneurone befinden sich in der Peripherie des Kerns und zeigen dort ebenfalls eine topographische Organisation. So sind die MIF-Motoneurone des IO und des SR in der S-Gruppe zu finden, eine Gruppe von Neuronen, die sich an der Mittellinie zwischen dem rechten und dem linken Ncl. oculomotorius befindet. Die MIF-Motoneurone des MR und des IR dagegen befinden sich in der C-Gruppe des Oculomotoriuskerngebiets (Abb. 1) (Büttner-Ennever et al., 2001; Büttner-Ennever, 2006; Lienbacher et al., 2011a).

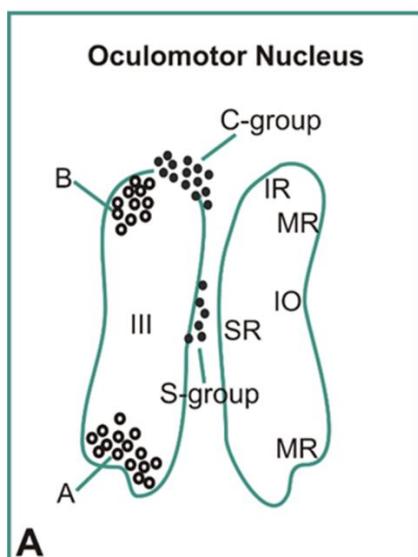


Abb. 1 Lokalisation der Motoneurone des Ncl. oculomotorius (III)

Die Abbildung zeigt einen mittigen Schnitt durch den Ncl. oculomotorius. Die SIF-Motoneurone des Ncl. oculomotorius befinden sich innerhalb des eigentlichen Kerngebiets. Zu ihnen gehören die Motoneurone des MR (A- und B-Gruppe), des IR, des IO und des SR. In der Peripherie des Kerns liegen die MIF-Motoneurone des IR und MR (C-Gruppe) sowie des SR und IO (S-Gruppe). Aus: Lienbacher K, Mustari M, Hess B, Büttner-Ennever J, Horn AKE. 2011a. Is there any sense in the Palisade endings of eye muscles? Annals of the New York Academy of Sciences 1233:1–7. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

1.1.4.2.2 *Ncl. trochlearis*

Die Motoneurone des Ncl. trochlearis (IV) innervieren den jeweils kontralateralen SO. Nur wenige Motoneurone des Ncl. trochlearis innervieren den ipsilateralen SO (Evinger et al., 1987; Lienbacher, 2012). Das Kerngebiet des vierten Hirnnerven ist im Tegmentum des Mesencephalons zu finden. Hier befindet es sich ventral des Aquädukts und kaudal des Ncl. oculomotorius. Die SIF-Motoneurone befinden sich innerhalb der Kerngrenzen, während die MIF-Motoneurone des SO als dichte Gruppe an der Grenze des Trochleariskerns liegen. Sie bilden eine dorsale Kappe am Ncl. trochlearis (Abb. 2) (Büttner-Ennever et al., 2001; Büttner-Ennever, 2006; Lienbacher et al., 2011a).

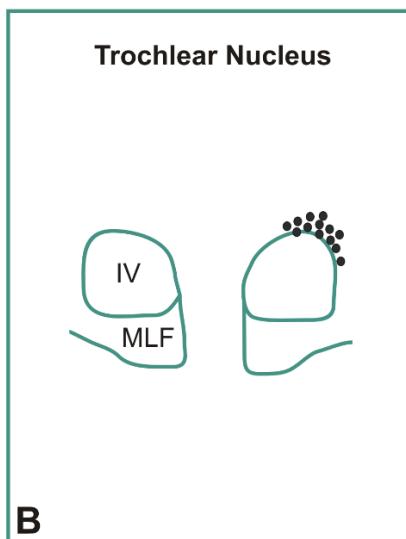


Abb. 2 Lokalisation der Motoneurone des Ncl. trochlearis (IV)

Die MIF-Motoneurone des SO (schwarze Punkte) liegen in der Peripherie des Kerns und bilden eine Kappe dorsal des Ncl. trochlearis. Die SIF-Motoneurone des SO befinden sich innerhalb des Ncl. trochlearis.

Aus: Lienbacher K, Mustari M, Hess B, Büttner-Ennever J, Horn AKE. 2011a. Is there any sense in the Palisade endings of eye muscles? Annals of the New York Academy of Sciences 1233:1–7. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

1.1.4.2.3 *Ncl. abducens*

Der Ncl. abducens (VI) ist unterhalb des inneren Knies des N. facialis zu finden. Der Kern liegt nahe der Mittellinie im Tegmentum am Übergang zwischen Pons und Medulla oblongata (Büttner-Ennever, 2006). Beim Primaten beinhaltet er mindestens vier verschiedene

funktionelle Zellgruppen. Die erste Zellgruppe beinhaltet die Motoneurone, welche die SIFs des ipsilateralen LR innervieren. Eine zweite Zellgruppe sind die Motoneurone, die die MIFs des ipsilateralen LR innervieren. Als dritte Zellgruppe konnten im Ncl. abducens internukleäre Neurone identifiziert werden, die über den MLF zu den MR Motoneuronen des kontralateralen Ncl. oculomotorius ziehen und so die neuroanatomische Basis für eine konjugierte Augenbewegung bilden (Baker and Highstein, 1975; Horn et al., 2018). Eine vierte Zellgruppe schließlich bilden die sog. Paramedian-Tract-Neurone, die in die Flocculus-Region des Kleinhirns projizieren (Horn et al., 2018). MIF-Motoneurone befinden sich auch beim Ncl. abducens in der Peripherie des eigentlichen Kerngebiets (Büttner-Ennever et al., 2001; Horn et al., 2018). Die MIF-Motoneurone des LR liegen an der medialen Grenze des Ncl. abducens, zwischen den Stellen der Nervenaustritte und um das innere Facialisknie (Abb. 3) (Büttner-Ennever, 2006; Lienbacher et al., 2011a; Horn et al., 2018).

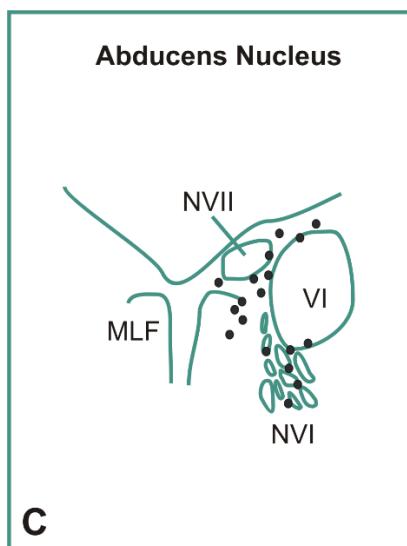


Abb. 3 Lokalisation der Motoneurone des Ncl. abducens (VI)

Die MIF-Motoneurone des LR (schwarze Punkte) befinden sich an der medialen Grenze des Ncl. abducens zwischen den Nervenaustrittsstellen und um das innere Facialisknie. Die SIF-Motoneurone des LR liegen zusammen mit den internukleären Neuronen und den Paramedian-Tract-Neuronen innerhalb des Abducenskerns.

Aus: Lienbacher K, Mustari M, Hess B, Büttner-Ennever J, Horn AKE. 2011a. Is there any sense in the Palisade endings of eye muscles? Annals of the New York Academy of Sciences 1233:1–7. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

1.1.4.3 Funktion der MIF- und SIF-Motoneurone

Die unterschiedliche Morphologie und histochemischen Eigenschaften der SIF- und MIF-Motoneurone (Eberhorn et al., 2005a) legen die Vermutung nahe, dass sie sich auch in ihrer Funktion unterscheiden.

Es wird davon ausgegangen, dass die SIF-Motoneurone und die von ihnen innervierten Muskelfasern für die schnellen Bewegung des Bulbus, wie z. B. Sakkaden, zuständig sind. Für die MIF-Motoneurone wird dagegen angenommen, dass sie vor allem für die Feinjustierung und für langsame Augenbewegungen bzw. für die Blickhaltung verantwortlich sind (Büttner-Ennever and Horn, 2002).

1.1.5 Sensorische Innervation der extraokulären Muskeln

Motorische Funktionen sind, um einen gut koordinierten und effektiven Bewegungsablauf zu gewährleisten, auf sensorisches Feedback angewiesen. Die entsprechenden Informationen hierfür werden von spezialisierten sensorischen Rezeptoren, den Propriozeptoren, geliefert. Sie gelangen entweder als bewusste Propriozeption über die Hinterstrangbahnen und den Lemniscus medialis zum Thalamus und von dort aus zum somatosensorischen Cortex oder sie werden als unbewusste Propriozeption über den Tractus spinocerebellaris zum Kleinhirn geleitet (Sengul and Watson, 2012b; 2012a). Als propriozeptive Rezeptoren dienen im Skelettmuskel Golgi-Sehnenorgane und Muskelspindeln. Muskelspindeln sind Dehnungsrezeptororgane, welche die Länge eines Muskels messen und kontrollieren. Sie befinden sich im Muskelzellverband des Skelettmuskels integriert, verlaufen parallel zu den Muskelfasern und bestehen aus speziellen dünnen Muskelzellen, den sogenannten intrafusalen Muskelfasern. Nach ihrer Morphologie werden zwei Typen von intrafusalen Muskelfasern unterschieden. Kernkettenfasern, bei denen die Zellkerne in einer Reihe liegend mittig in der Faser angeordnet sind und Kernsackfasern, bei denen sich die Zellkerne als ein Haufen in der Mitte der Faser befinden (Barker, 1974; Boyd, 1980). Die sensorische Innervation erfolgt über zwei Typen von Neuronen, deren pseudounipolaren Zellkörper sich im Spinalganglion befinden. Die Typ Ia-Fasern enden als primäre Endigungen (anulospiralige Endigungen) an den Kernketten- und Kernsackfasern indem sie den kernhaltigen mittleren Bereich der intrafusalen Fasern spiraling umwickeln. Typ II-Fasern enden als sekundäre Endigungen distal der primären Endigungen (Boyd, 1980). Typ Ia-Fasern messen vor allem die Längenänderung eines Muskels,

während Typ II-Fasern vor allem die statische Länge eines Muskels registrieren (Taylor et al., 2000). Das Besondere an den Muskelpindeln ist, dass sie nicht nur sensorisch, sondern auch motorisch innerviert sind. Die motorische Innervation der intrafusalen Muskelfasern der Muskelpindeln erfolgt nicht wie die Innervation der extrafusalen Fasern über α -Motoneurone, sondern über γ -Motoneurone, deren Zellkörper sich im Vorderhorn des Rückenmarks befinden (Sengul and Watson, 2012b). Man unterscheidet statische und dynamische γ -Motoneurone. Sie sind in der Lage die dynamische und statische Empfindlichkeit der Muskelpindeln auf Dehnungsreize zu regulieren (zur Übersicht: Boyd, 1980; Ellaway et al., 2015).

Bei den Golgi-Sehenorganen handelt es sich um Mechanorezeptoren, die sich in einer Bindegewebskapsel am Muskel-Sehnen-Übergang befinden. Die sensorische Innervation erfolgt über Typ Ib-Fasern. Golgi-Sehnenorgane registrieren Veränderung des Spannungszustands eines Muskels und dessen Sehne. Kommt es zu einer Kontraktion der Muskulatur, bewirken die Golgi-Sehnenorgane eine Hemmung der Motoneurone der homonymen und synergistischen Muskulatur sowie eine Aktivierung der antagonistischen Muskulatur (Jami, 1992).

Welche Strukturen die propriozeptiven Informationen aus den Augenmuskeln übermitteln und wie diese Informationen weitergeleitet werden ist, im Gegensatz zur Skelettmuskulatur, noch nicht vollständig geklärt. Muskelpindeln in den EOM wurden nicht bei allen Spezies nachgewiesen und variieren, wenn sie vorhanden sind, stark in ihrer Anzahl. Auch zeigen die in den EOM gefundenen Muskelpindeln einen deutlich einfacheren Aufbau als die „klassischen“ Muskelpindeln der Skelettmuskulatur. Sie besitzen weniger intrafusale Muskelfasern und beschränken sich auf den Typ der Kernkettenfasern. Gut ausgebildete Muskelpindeln, die mit denen der Skelettmuskulatur vergleichbar sind, wurden bislang nur bei den EOM von Huftieren (Kuh, Schaf und Schwein) nachgewiesen (Maier et al., 1974; Lienbacher and Horn, 2012).

Golgi-Sehnenorgane konnten in den EOM ebenfalls nicht in allen Spezies nachgewiesen werden. Wie die Muskelpindeln sind auch die Golgi-Sehnenorgane der EOM am besten bei Huftieren ausgebildet (Lienbacher and Horn, 2012; Blumer et al., 2016).

Als ein weiterer möglicher Propriozeptor in den EOM werden die sogenannten Palisadenendigungen diskutiert. Diese Nervenendigungen stellen eine Besonderheit bei den EOM dar und konnten bislang in allen Spezies mit frontal stehenden Augen nachgewiesen werden (Blumer et al., 2016). Die Palisadenendigungen befinden sich an den distalen Enden der MIFs am Muskel-Sehnen-Übergang, wo sie eine Art Kappe formen. Sie innervieren exklusiv nur die multipel innervierten Fasern der globalen Muskelschicht der EOM (Eberhorn

et al., 2005b; Lienbacher, 2012). Die Zellkörper der Palisadenendigungen konnten in den peripheren Gruppen der Hirnnervenkerne der EOM lokalisiert werden (Lienbacher et al., 2011b; Zimmermann et al., 2011).

1.2 Untersuchung der SIF- und MIF-Motoneurone

Der genaue Zusammenhang zwischen den MIFs und den Palisadenendigungen ist noch unklar, doch ihre enge räumliche Nähe legt eine funktionelle Verbindung nahe. Es wurden Hypothesen formuliert, nach denen die Palisadenendigungen zusammen mit den MIFs als große, umgekehrte Muskelpindeln gesehen werden können (Lienbacher and Horn, 2012). Bei den MIF-Motoneuronen könnte es sich in diesem Fall um Neurone handeln, die mit den γ -Motoneuronen des Rückenmarks zu vergleichen sind, während es sich bei den SIF-Motoneuronen um Neurone handeln könnte, die den α -Motoneuronen des Rückenmarks entsprechen (Buttner-Ennever et al., 2002; Lienbacher and Horn, 2012).

Die Motoneurone des Rückenmarks konnten aufgrund der Durchmesser ihrer Somata schon früh in die größeren α -Motoneurone und die kleineren γ -Motoneurone getrennt werden (Burke et al., 1977). Im Rückenmark wurden die beiden Neuronenpopulationen auch mit unterschiedlichen Markern voneinander unterschieden. Friese et al. untersuchten Motoneurone im Rückenmark der Maus und stellten fest, dass sich die α -Motoneurone dadurch auszeichnen, dass sie den Östrogen-verwandten Rezeptor γ (Erry) gering bis gar nicht exprimieren, während die γ -Motoneurone Erry in hohem Maß exprimieren. Mit dem DNA-bindenden Protein Neuronal Nuclei (NeuN) verhielt es sich im Gegensatz dazu genau umgekehrt. NeuN war in α -Motoneuronen vorhanden, in γ -Motoneuronen aber nicht zu finden (Friese et al., 2009). Auf dieselbe Weise konnten auch Neurone eines Hirnnervenkerns unterschieden werden. So wurden 2017 von Morita-Isogai et al. Erry und NeuN als Marker verwendet um α -und γ -Motoneurone des Ncl. motorius n. trigeminus der Ratte zu unterscheiden. Auch hier wurden die Erry-positiven/NeuN-negativen Neurone als γ -Motoneurone und die Erry-negativen/NeuN-positiven Neurone als α -Motoneurone identifiziert (Morita-Isogai et al., 2017).

Eine Schwierigkeit die Funktion der MIF-Motoneurone zu bestimmen besteht darin, dass bislang nur wenig über ihre Physiologie bekannt ist (Hernández et al., 2019).

Die cholinergen SIF- und MIF-Motoneurone unterscheiden sich in ihren histochemischen Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass sich SIF-Motoneurone von MIF-Motoneuronen dadurch unterscheiden lassen, dass SIF-Motoneurone von perineuronalen Netzen umgeben sind

und das Calcium-bindende Protein Parvalbumin besitzen, während die MIF-Motoneurone Parvalbumin nicht enthalten und auch nicht von perineuronalen Netzen umgeben sind (Eberhorn et al., 2005a; Eberhorn et al., 2006; Horn et al., 2008). Die unterschiedlichen histochemischen Eigenschaften der SIF- und MIF-Motoneurone deuten darauf hin, dass SIF- und MIF-Motoneurone unterschiedliches Feuerungsverhalten aufweisen, das unter anderem durch spannungsabhängige Kalium-Kanäle, vor allem der Kv-Familie, gesteuert wird (Bean, 2007). Die Expression von Kaliumkanälen in den beiden Motoneuronengruppen ist bislang noch unbekannt.

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Zur weiteren Aufklärung der Eigenschaften und der Funktion der peripheren Neuronengruppen der Augenmuskelkerne, welche die MIF-Motoneurone und die Zellkörper der Palisadenendigungen enthalten, sollen diese mit Hilfe histochemischer Marker charakterisiert werden.

Die Expression des Calcium-bindenden Proteins Parvalbumin und die Assoziation mit perineuronalen Netzen nur an SIF-Motoneuronen legt ein unterschiedliches Feuerungsverhalten von MIF- und SIF-Motoneuronen nahe, das sich in einer unterschiedlichen Expression von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen zeigen könnte. Dazu soll in der vorliegenden Arbeit folgende Frage gestellt werden:

1. Enthalten MIF- und SIF-Motoneurone gleichermaßen die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle Kv1.1. und Kv3.1b?

Zu diesem Zweck sollten an frei schwimmenden Gefrierschnitten von Rhesusaffen, die eine Tracerinjektion in den MR erhalten hatten, retrograd markierte MIF- und SIF-Motoneurone im Oculomotoriuskern auf die Anwesenheit von Kv1.1 und Kv3.1b untersucht werden. Die Schnitte wurden dazu nach Mehrfachimmunfluoreszenzfärbungen auf den Tracer, perineuronale Netze und Kv1.1 oder Kv3.1b analysiert. Zusätzlich wurden Immunperoxidase-Färbungen an Paraffinschnitten auf Cholin-Acetyltransferase (ChAT), Kv1.1, Kv3.1b und Aggrecan (ACAN) durchgeführt.

In einem zweiten Teil soll eine Hypothese überprüft werden, nach der die MIF- Motoneurone den γ -Motoneuronen des Rückenmarks entsprechen. Dazu soll folgende Frage bearbeitet werden:

2. Zeigen die SIF- und MIF-Motoneurone der EOM beim Rhesusaffen eine unterschiedliche Expression von Erry und NeuN, die eine Entsprechung von α - und γ -Motoneuronen nahelegen würde?

Hierfür sollten zunächst die Befunde, die von Friese et al. an der Maus gemacht wurden (Friese et al., 2009), an Rückenmarkschnitten beim Rhesusaffen reproduziert werden, indem Doppelimmunfluoreszenzfärbungen auf cholinerge Marker (ChAT) kombiniert mit Erry oder NeuN durchgeführt werden. Nach Etablierung der Methode sollten dann entsprechende Immunfluoreszenzfärbungen an Mittelhirnschnitten mit dem Ncl. trochlearis und Ncl. oculomotorius durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

In diesem Projekt wurden Gewebeschnitte von Affen der Rasse Macaca Mulatta (Rhesus Affe) (Fall 1 und 2) sowie Macaca Nemestrina (Südlicher Schweinsaffe) (Fall 3 und 4) verwendet.

Alle operativen Eingriffe erfolgten durch die Kollaborationspartner Prof. M. Mustari und Dr. J. Fleuriet am Primatenzentrum in Seattle (USA) nach Beantragung und Einhaltung der entsprechenden Genehmigungen, die den Tierschutzgesetzen im Bundesstaat Washington unterliegen. Nach Einschläfern der Tiere erfolgte die Zusendung der Gehirne und Orbitae in das Münchner Labor unter Einhaltung der Einfuhrbedingungen von tierischem Gewebe zu Forschungszwecken.

2.1.1 Tracer

Tracer werden verwendet, um die Afferenzen oder Efferenzen von Hirnregionen durch den retrograden bzw. anterograden axonalen Transport zu ermitteln. Durch anterograden axonalen Transport können efferente Nervenfasern verfolgt werden und durch retrograden axonalen Transport ist es möglich die afferente Nervenfaser zu seinem Neuron zu verfolgen. Bei einem retrograden Transport wird der Tracer in periphere Nerven oder das entsprechende Innervationsgebiet eines Nervens injiziert, wo er nach der Injektion von freien Nervenendigungen aufgenommen wird. Innerhalb des Axons wird die Tracersubstanz anschließend zentralwärts zu dem Zellkörper der Nervenzelle transportiert. Hier kann sie mittels Antigen-Antikörperreaktionen nachgewiesen werden (Köbbert et al., 2000; Brookes, 2001; Büttner-Ennever et al., 2001).

In diesem Projekt wurden Schnitte von Fällen (Fall 3 und 4) verwendet, die zuvor Tracerinjektionen in einen EOM erhielten, um durch dessen retrograden axonalen Transport auf die entsprechenden Neurone rückschließen zu können. Als Tracer wurde dabei die ungiftige Untereinheit B des Choleratoxins (CTB) injiziert.

2.1.1.1 Tracerinjektion

Tracerinjektionen wurden an den Fällen 3 und 4 vorgenommen.

Alle Affen wurden mit Isofluran (1,25 – 2,5%) anästhesiert und über den gesamten operativen Verlauf überwacht (SurgiVet Monitor; Smiths Medical, Dublin, OH, USA). Die Augenmuskeln wurden mit einem Bindehautschnitt freigelegt und lokale, kleine Tracerinjektionen, mit bis zu 10 µl, wurden mit einer dünnen Kanüle (Hamilton Spritze) injiziert. Den Versuchstieren wurde Choleratoxin-Untereinheit B (CTB, 1% in aqua bidestilled; List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) in den Muskelsehnenübergang des jeweiligen Augenmuskels eingespritzt. Bei Fall 3 wurde CTB in den Muskelsehnenübergang des rechten MR injiziert. Bei Fall 4 wurde der Tracer in den linken MR injiziert.

2.1.2 Perfusion

Die Affen wurden nach drei Tagen mit Ketamin sediert und durch die intravenöse Verabreichung einer Überdosis Pentobarbital (> 90 mg/kg) eingeschläfert. Direkt nach dem Atemstillstand erfolgte die Spülung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Anschließend wurden die Affen mit ca. 2-3 l gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung (4% PFA in 0,1M Phosphat-Puffer (PBS) pH 7,4) fixiert.

2.1.3 Histologische Aufarbeitung

Das Gehirn der Affen wurde in Blöcke geschnitten.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten (Fall 3 und Fall 4) wurden die Blöcke zunächst in Sucrose-Lösung mit aufsteigenden Konzentrationen (10%, 20%, 30% Sucrose in 0,1M PBS, pH 7,4) gebracht, um Gefrierartefakten vorzubeugen. Nachdem sie mit Hilfe von Trockeneis in TissueTec eingebettet und eingefroren waren, wurden aus den Blöcken für die immunhistochemischen Färbungen 40 µm dicke Transversalschnitte gefertigt, die anschließend in Phosphatpuffer (0,1M PBS, pH 7,4) aufbewahrt wurden.

Die Blöcke, aus denen Paraffinschnitte gefertigt werden sollten (Fall 1 und 2), wurden unter fließendem Leitungswasser für circa 24 Stunden ausgewaschen. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol inkubiert und schließlich in Paraffin

eingebettet. Die Blöcke wurden geschnitten (Dicke 7 µm (Fall 2) bzw. 5 µm (Fall 1)) und auf Objektträger aufgezogen.

2.2 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten als Immunperoxidase-Färbungen oder als Immunfluoreszenz-Färbungen.

2.2.1 Immunperoxidase-Färbungen

2.2.1.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte

2.2.1.1.1 *Entparaffinierung und Rehydrierung*

Vor der Durchführung der immunhistochemischen Färbung der Paraffinschnitte müssen diese zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Die Entparaffinierung der Schnitte geschah, indem sie ein zweimaliges Xylol-Bad (je 15 Minuten) durchliefen. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte anschließend in eine absteigende Alkoholreihe getaucht (100% Alkohol, 96% Alkohol, 90% Alkohol, 70% Alkohol für je 5 Minuten) und abschließend mit destilliertem Wasser gespült.

2.2.1.1.2 *Antigendemaskierung*

Durch die Fixierung und Einbettung von Geweben in Paraffin können verschiedene Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur bei den Epitopen der Antigene auftreten. Man spricht dabei von einer sogenannten "Maskierung" des Antigens bzw. des Epitops, die einen teilweisen oder vollständigen Verlust der Immunreaktion bedeuten kann (Boenisch, 2006). Als nächster Schritt folgte daher, zur Vorbereitung der Paraffinschnitte für die immunhistochemische Färbung, die Antigendemaskierung, die durch eine Behandlung mit feuchter Hitze erreicht wird. Hierfür wurden die Schnitte auf einem Färbegestell in einen

Mikrowellen-geeigneten Behälter gelegt. Dieser wurde mit Natrium-Citrat-Puffer (pH 6,0) aufgefüllt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt. Um zu verhindern, dass die Flüssigkeit verdunstet, in der sich die Schnitte befinden, erfolgte die Erhitzung dreimal für je 3 Minuten. So konnte, wenn nötig, verdunstete Flüssigkeit ersetzt werden, um die Austrocknung der Schnitte zu verhindern.

2.2.1.2 Diaminobenzidin (DAB)-/ Diaminobenzidin-Nickel (DAB-Ni)-Färbung

2.2.1.2.1 Einzelfärbung

Die immunhistochemische Färbung der entparaffinierten Schnitte wurde mit einer Immunperoxidase-Methode durchgeführt. Hier wird das auf die Schnitte aufgebrachte DAB/Wasserstoffperoxid durch Peroxidase oxidiert und dadurch sichtbar gemacht.

Nachdem die Schnitte für 10 Minuten mit 0,1M Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) (pH 7,4) gespült wurden, musste in einem ersten Schritt zunächst einer Beeinflussung der Färbung durch endogene Peroxidasen entgegengewirkt werden. Hierfür wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einer Lösung aus 1% H₂O₂ in 0,1M TBS (pH 7,4) vorbehandelt und anschließend in einem Zwischenschritt dreimal für je 10 Minuten mit 0,1M TBS (pH 7,4) gewaschen. Zur Präinkubation wurden die Schnitte mit 5% Normalserum (Pferd) + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4 für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Die Schnitte, bei denen der Primärantikörper Ziege anti-ChAT (1:50), verwendet werden sollte, wurden nicht in Normalserum (Pferd) sondern mit 5% Normalserum (Kaninchen) + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4 präinkubiert. Die Präinkubationszeit betrug hier ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur. In einem nächsten Schritt folgte nun die Inkubation mit den Primärantikörpern. Dafür wurden die Schnitte mit Kaninchen anti-Kv1.1 (1:750) oder Kaninchen anti-Kv3.1b (1:6000) oder Maus anti-ACAN (1:75) oder Ziege anti-ChAT (1:50) in 5% Normalserum (Pferd bzw. Kaninchen) + 0,3% Triton in 0,1M TBS (pH 7,4) für eine Woche bei 4°C in Dunkelheit inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit 0,1M TBS (pH 7,4) für je 10 Minuten folgte dann die Inkubation mit einem zweiten biotinylierten Antikörper in einer Lösung aus 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der biotinylierte zweite Antikörper fungiert dabei als eine Art Brücke zwischen dem 1. Antikörper und der folgenden

Peroxidase Reaktion. Folgende biotinylierte Sekundärantikörper wurden hierfür verwendet: Kaninchen anti-Ziege (1:200) (für ChAT), Pferd anti-Maus (1:200) (für ACAN) und Pferd anti-Kaninchen (1:200) (für Kv1.1 und Kv3.1b). An die Inkubation mit dem Sekundärantikörper schloss sich wieder eine dreimalige Spülung mit 0,1M TBS (pH 7,4) für je 10 Minuten an. Danach wurden die Schnitte mit Extravidin-Peroxidase (Verdünnung 1:1000 in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend nochmals dreimalig mit 0,1M TBS (pH 7,4) für je 10 Minuten gespült. Nach der Waschung folgte die Sichtbarmachung der eingebrachten Peroxidase in einer Reaktion mit DAB-Ni und Wasserstoffperoxid (0,025% DAB (= 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 40 mg Ammonium Nickel in 20 ml 0,05M TBS pH 7,6) + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS (pH 7,6)). Der Erfolg der Reaktion, eine Schwarzfärbung der entsprechenden Strukturen bei einer Reaktion mit DAB-Ni, wurde durch eine mikroskopische Kontrolle überprüft. Die Schnitte wurden danach weitere dreimal für je 10 Minuten mit 0,1M TBS (pH 7,4) und einmal für etwa 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Nach dem Trocken wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Alkohol, 90% Alkohol, 96% Alkohol, 100% Alkohol je 5 Minuten) entwässert, mit Xylol (2x 15 Minuten) entfettet und anschließend mit Depex eingedeckelt.

2.2.1.2.1.1 Doppelfärbung

Immunhistochemische Färbungen können auch mit zwei verschiedenen Primärantikörpern, die gegen unterschiedliche Antigene gerichtet sind, durchgeführt werden. Die Immunhistochemischen Hellfeldfärbungen laufen nach dem gleichen Prinzip ab und werden hintereinander ausgeführt. Um Kreuzreaktionen zu vermeiden muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Primärantikörper nicht aus derselben Spezies stammen.

Die Schnitte, die bereits mit dem Primärantikörper gegen Maus anti-ACAN gefärbt wurden und einige der Schnitte, bei denen der Primärantikörper gegen Kaninchen anti-Kv1.1 verwendet wurde, wurden so in einer weiteren Färbung zusätzlich mit einem Primärantikörper Ziege anti-ChAT (1:50) behandelt. Die Sichtbarmachung erfolgte bei dieser zweiten immunhistochemischen Färbung statt mit DAB-Ni mit DAB. Im Gegensatz zu einer Reaktion mit DAB-Ni, die zu einer Schwarzfärbung führt, resultiert die Reaktion mit DAB in einer Braunfärbung der entsprechenden Strukturen.

2.2.2 Fluoreszenz-Immunhistochemische Färbungen

Die Fluoreszenz-Immunhistochemischen Färbungen wurden als Doppel- bzw. Dreifachfärbungen durchgeführt. Als Primärantikörper wurden Antikörper verwendet, die entweder in der Maus, in der Ziege oder im Kaninchen hergestellt wurden. Die verwendeten Sekundärantikörper waren dementsprechend gegen Maus, Ziege oder Kaninchen gerichtet. Im Folgenden wird beispielhaft die Fluoreszenz-Immunhistochemische Dreifachfärbung mit CTB, Kv3.1b und ACAN näher erläutert.

Die frei flottierenden Schnitte, die in Phosphatpuffer (0,1M PBS, pH 7,4) aufbewahrt wurden, wurden zuerst in einem einmaligen Waschgang für 10 Minuten mit 0,1M TBS (pH 7,4) gespült. Nach der darauffolgenden Präinkubation mit 5% Normalserum (Esel) + 0,3% Triton in 0,1M TBS (pH 7,4) für eine Stunde bei Raumtemperatur folgte eine fünftägige Inkubation mit einem Cocktail aus den drei Primärantikörpern in einer Lösung aus 5% Normalserum (Esel) + 0,3% Triton in 0,1M TBS (pH 7,4) bei 4°C. Als Primärantikörper wurden Ziege anti-CTB (1:5000), Kaninchen anti-Kv3.1b (1:2000) und Maus anti-ACAN (1:25) verwendet. Nach einer anschließenden dreimaligen Spülung für je 10 Minuten mit 0,1M TBS (pH 7,4) schloss sich die Inkubation der Schnitte mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin an. Als Sekundärantikörper wurden ein Alexa-488 (grün) konjugierter Esel anti-Ziege-Antikörper (1:200) zur Sichtbarmachung der mit dem Tracer CTB markierten Neurone verwendet. Zum Nachweis von Kv3.1b markierten Neuronen wurde ein Cy³ (rot) konjugierter Esel anti-Kaninchen-Antikörper (1:200) verwendet und zur Anfärbung der ACAN-positiven perineuronalen Netze wurde ein DyLight (blau) konjugierter Esel anti-Maus Antikörper in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubation mit dem Cocktail, der die Sekundärantikörper enthielt, geschah in Dunkelheit und dauerte zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem sich daran anschließenden dreimaligen Waschgang mit 0,1M TBS (pH 7,4) für je 10 Minuten wurden die Schnitte in eine Lösung gebracht, die aus zwei Teilen destilliertem Wasser und einem Teil 0,1M TBS (pH 7,4) bestand, um sie auf Objektträger aufziehen zu können. Die Objektträger wurden über Nacht zum Trocknen in Dunkelheit bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend nochmals mit destilliertem Wasser gespült. Nachdem die Schnitte in Dunkelheit vollständig getrocknet waren, wurden sie eingedeckt und bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt.

2.2.3 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden die Antikörper ChAT, Kv3.1b, Kv1.1, ACAN, NeuN, Erry und CTB von unterschiedlichen Herstellern in verschiedenen Verdünnungen verwendet (Tab. 2).

Antikörper	Wirt	Hersteller	Nummer	Verdünnung (Fluoreszenz- Immunhistochemische Färbungen)	Verdünnung (Immunperoxidase- Färbungen)
ChAT	Ziege, polyklonal	Chemicon, Temecula CA	AB144P	1:50	1:50
Kv3.1b	Kaninchen, polyklonal	Alomone Labs; Jerusalem Israel	APC-014	1:2000	1:6000
Kv1.1	Kaninchen, polyklonal	Alomone Labs; Jerusalem Israel	APC-009	1:250	1:750
ACAN	Maus, monoklonal	Acris Antibodies, Herford Germany	SM1353	1:25	1:75
NeuN	Maus, monoklonal	Millipore, Burlington MA	MAB377	1:200	-
Erry	Maus, monoklonal	Perseus Proteomics, Tokyo Japan	Cat: PP- H6812-00	1:50	-
CTB	Ziege	List Biological Laboratories, Campbell CA	703	1:5000	-

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Antikörper

2.2.3.1 ChAT

Motoneurone enthalten Acetylcholin als Neurotransmitter. Der Nachweis von cholinergen Neuronen kann durch das Enzym ChAT, das für die Synthese von Acetylcholin benötigt wird, erfolgen (Ichikawa and Shimizu, 1998).

Um ChAT nachzuweisen wurde in diesem Projekt ein in der Ziege produzierter Antikörper gegen humanes ChAT (AB144P, Chemicon) in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

2.2.3.2 NeuN

Bei NeuN handelt es sich um ein neuronenspezifisches nukleäres Protein, das erstmals von Mullen et al. 1992 durch den mononukleären Antikörper mAB A60 nachgewiesen wurde. Um Verwechslungen mit dem Protein A60 des neuronalen Zytoskeletts zu vermeiden, wurde das Protein "NeuN" (Neuronal Nuclei) genannt. NeuN konnte früh in der neuronalen Entwicklung nachgewiesen werden und selbst in frühem Stadium der embryonalen Entwicklung zeigte sich das Vorkommen von NeuN auf das Nervensystem begrenzt. Dabei war NeuN in der Studie von Mullen et al. im Rückenmark deutlicher in den mehr ventralen Regionen als in den dorsal gelegenen Regionen zu finden (Mullen et al., 1992). Obwohl seine Funktion noch unklar ist, wird vermutet, dass NeuN in der neuronalen Entwicklung und Funktion eine wichtige Rolle spielt (Mullen et al., 1992; Kim et al., 2009).

2009 zeigten Friese et al., dass sich die Motoneurone des Rückenmarks der Maus durch unterschiedliche Expression von NeuN und Erry differenzieren lassen. γ -Motoneurone besitzen den das nukleäre Protein NeuN nicht, exprimieren aber den Rezeptor Erry. Bei den α -Motoneuronen verhält es sich umgekehrt. Bei ihnen ist NeuN vorhanden, nicht aber der Rezeptor Erry (Friese et al., 2009).

Um der Fragestellung nachzugehen, ob sich SIF- und MIF- Motoneurone in Bezug auf NeuN entsprechend der α - und γ -Motoneurone des Rückenmarks verhalten, wurde in diesem Projekt zum Nachweis von NeuN ein in der Maus produzierter monoklonaler Antikörper gegen humanes NeuN (anti-NeuN) (MAB377, Millipore) verwendet. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, um die optimale Konzentration des Antikörpers zu ermitteln. Der Antikörper wurde im Folgenden in einer Konzentration von 1:200 verwendet.

2.2.3.3 Erry

Das Steroidhormon 17 β -Estradiol bindet an die Östrogenrezeptoren (ER) ER α und ER β und hat damit mindestens zwei verschiedene nukleäre Rezeptoren. Neben den Rezeptoren ER α und ER β konnten drei weitere, zu diesen Rezeptoren nahe verwandten, Rezeptoren (Östrogenverwandter Rezeptor (Err)) Err α , Err β und Erry am Nucleus identifiziert werden, was die Mannigfaltigkeit der Östrogenwirkung unterstreicht. Err α , Err β und Erry werden zwar nicht direkt von Estradiol aktiviert, scheinen aber an identische *response elements* zu binden und darüber hinaus besteht die Vermutung, dass es auch direkte Interaktionen zwischen ERs und Errs gibt. Der Rezeptor Erry ist im Gehirn weit verbreitet zu finden. Er konnte zum Beispiel in großer Zahl am Isocortex nachgewiesen werden, ebenso im olfaktorischen System und in Hirnnervenkernen, wie dem Ncl. oculomotorius und dem Ncl. trochlearis (Lorke et al., 2000). Um der Fragestellung nachzugehen, ob sich SIF- und MIF- Motoneurone in Bezug auf Erry entsprechend der α - und γ -Motoneurone des Rückenmarks verhalten, wurde in diesem Projekt zum Nachweis von Erry ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Erry (PP-H6812-00, Perseus Proteomics) verwendet.

2.2.3.4 CTB

Die ungiftige Untereinheit B des Choleratoxins (CTB) wurde in diesem Projekt als Tracer verwendet. Das Choleratoxin besteht aus zwei Untereinheiten, der Untereinheit A und der Untereinheit B. Die Untereinheit A des Toxins ist enzymatisch aktiv. Bei der membranbindenden Untereinheit B handelt es sich um die nicht giftige Komponente des Choleratoxins. CTB bindet mit hoher Affinität an GM₁ Gangliosid der neuronalen Zellmembran. In der Folge wird das Toxin in die Zelle aufgenommen und retrograd über das Axon des Neurons zurück zu dessen Zellkörper transportiert (Baldauf et al., 2015; Day and Kenworthy, 2015). In dem Zellkörper der Nervenzelle kann dann der dorthin transportierte Tracer CTB durch einen gegen CTB gerichteten Antikörper mit einer Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden. In diesem Projekt wurde hierfür der monoklonale Antikörper Kaninchen anti-Choleratoxin (C3062, Sigma) verwendet. Die Tracer-positiven Neurone können durch Doppelfärbungen noch näher untersucht werden, indem neben dem Tracer ein weiteres Antigen in den Nervenzellen nachgewiesen wird. Die Neurone können so detektiert und auf weitere Eigenschaften hin untersucht werden.

2.2.3.5 Kaliumkanäle (Kv1.1; Kv3.1b)

Kaliumkanäle sind Bestandteil fast aller Zellen des Körpers und erfüllen vielfältige Funktionen. Sie stellen eine große Familie von Ionenkanälen dar, die vor allem aufgrund der Anzahl ihrer Transmembransegmente in drei große Gruppen unterteilt werden können, die wiederum eine Vielzahl von Untergruppen besitzen: die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (voltage-gated K^+ channels), die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (inward rectifier K^+ channels) und die sog. „Tandemporen-Kanäle“ (two-pore-domain K^+ channels) (Buckingham et al., 2005). Spannungsabhängige Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle für den Ablauf, die Dauer, die Frequenz und die Form eines Aktionspotentials. Zu ihnen zählen die Kaliumkanäle vom Typ „delayed rectifier“. Diese reagieren, wie ihr Name sagt, nach der Depolarisation der Zellmembran zeitlich verzögert und lassen nur einen gleichgerichteten Strom von Kaliumionen zu (zur Übersicht: Hille, 2001; Bocksteins et al., 2012).

Zur Detektion des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv3.1b wurde in diesem Projekt der Antikörper Kaninchen anti-Kv3.1b (alomone labs, APC-014) verwendet. Der Nachweis des Kanals Kv1.1 erfolgte mit dem Antikörper Kaninchen anti-Kv1.1 (alomone labs, APC-009).

2.2.3.6 Aggrecan (ACAN)

Perineuronale Netze (PN) umgeben als eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix (ECM) netzartig die Somata sowie Teile der Dendriten und des Axons von Neuronen (Brückner et al., 1993; Härtig et al., 1994; Brückner et al., 2006). Die Funktion der PN ist noch nicht vollständig geklärt und wird viel diskutiert. Eine mögliche Rolle könnten sie zum Beispiel für den Ionenhaushalt von Neuronen spielen (Brückner et al., 1993).

PN zeigen in hohem Grad molekulare Heterogenität. Einige Komponenten wie Fibronectin, Kollagen und Laminin, die zahlreich in der ECM vorkommen, sind in PN nur in geringem Maß zu finden, wodurch sie sich von der klassischen ECM abgrenzen. PN sind dagegen reich an Hyaluron und Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen (CSPG). Zu letzteren gehören die Lecticane Vesican, Neurocan, Bervican und ACAN (zur Übersicht: Bandtlow and Zimmermann, 2000; Giamanco and Matthews, 2012). Für den Nachweis von PN können Antikörper verwendet werden, die gegen ACAN gerichtet sind (Horn et al., 2018). In diesem Projekt wurde hierfür ein monoklonaler Maus-Antikörper (Supernatant. Acris Antibodies; Catalog Nr. SM1353 (ACAN)) verwendet.

2.3 Auswertung

Die Analyse der Schnitte, an denen Fluoreszenzfärbungen durchgeführt wurden, erfolgte mit einem Lichtmikroskop Leica DMRB (Bensheim, Deutschland). Das Mikroskop verfügt über Filter für rot fluoreszierendes Cy3 (N2.1, Filter BP 515-560 nm) und grün fluoreszierendes Alexa Fluor 488 (I3, Filter BP 450-490 nm) sowie blaues DyLight (A, BP 340-380 nm).

Für die Dokumentation wurde eine Videokamera verwendet, die auf dem Lichtmikroskop montiert ist (Pixera Pro 600 ES; Klughammer, Markt Indersdorf, Deutschland). Die digitalisierten Bilder wurden in einen Computer mit Pixera Viewfinder Software (Klughammer) übertragen. Einige Fluoreszenzfärbungen wurden an einem Leica SP5 Konfokalmikroskop mit der Software LAS AF 3.3. (Leica; Wetzlar, Deutschland) analysiert und digitalisiert. Helligkeit und Kontrast der Bilder wurde so nachbearbeitet, dass sie dem jeweiligen mikroskopischen Bild entsprachen. Dafür wurde die Software ImageJ (2.0.0-rc-69/1.52p; Java 1.8.0_172) verwendet, mit der auch die Überlagerungsbilder gemacht wurden. Die Schnitte, die mit DAB/DAB-Ni gefärbt wurden, wurden mit einem Slide-Scanner (Carl Zeiss, Mirax Midi) eingescannt. Die so digitalisierten Bilder wurden anschließend an einen Computer mit der Software Panoramic Viewer (Version 1.15.2) übertragen und analysiert. Die Zusammenstellung und Beschriftung der Bilder erfolgte mit der Software Microsoft PowerPoint 2019 MSO (16.0.11901.20170).

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Charakterisierung von MIF-Motoneuronen

Um MIF-Motoneurone genauer charakterisieren zu können, wurden Mittelhirnschnitte des Okulomotoriuskerngebiets von vier verschiedenen Fällen in unterschiedlichen Kombinationen auf ChAT, Kv1.1, Kv3.1b und ACAN gefärbt. Darüber hinaus wurden an Schnitten des Rückenmarks und des Ncl. trochlearis Färbungen in verschiedenen Kombinationen mit den Markern ChAT, Erry und NeuN durchgeführt und Schnitte des Ncl. oculomotorius in unterschiedlichen Kombinationen mit den Markern Erry, ChAT und CTB gefärbt. Dazu wurden entweder Doppel- und Dreifachfärbungen an dicken Schnitten durchgeführt oder eine Analyse an benachbarten dünnen Paraffinschnitten vorgenommen. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Färbemethoden und Marker.

Färbung	Immunperoxidase-Färbungen	Fluoreszenz-Immunhistochemische Färbungen
Verwendete Marker	ChAT, Kv1.1, Kv3.1b, ACAN	ChAT, Kv1.1, Kv3.1b, ACAN, CTB, Erry, NeuN

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Färbemethoden und Marker

3.1.1 Identifizierung von SIF- und MIF-Motoneuronen im Ncl. oculomotorius

Zur Detektion der Motoneurone des Ncl. oculomotorius wurde eine Färbung auf ChAT durchgeführt (Abb. 4). Der Ncl. oculomotorius war durch die Färbung deutlich gegenüber seiner Umgebung abgrenzbar. Wie erwartet wurde ChAT im gesamten Oculomotoriusgebiet inklusive des Edinger-Westphalkerns gefunden und es wurden morphologisch unterschiedliche Neurone markiert (Abb. 4 A-C, schwarz; D, grün). Eine Unterscheidung zwischen den

verschiedenen Gruppen von Motoneuronen des Ncl. oculomotorius konnte alleine aufgrund des Färbeverhaltens bei einer ChAT-Färbung nicht unternommen werden. Die cholinergen Neurone der C-Gruppe, die MIF-Motoneurone, liegen dorsomedial des eigentlichen Kerngebiets und unterscheiden sich von den SIF-Motoneuronen des Ncl. oculomotorius neben ihrer Lokalisation auch dadurch, dass ihre Perikarya deutlich kleiner sind (Abb. 4 B, D). Die ebenfalls kleineren MIF-Motoneurone der S-Gruppe liegen zwischen den Oculomotoriuskernen (Abb. 4 A, C) (Büttner-Ennever, 2006; Eberhorn et al., 2006).

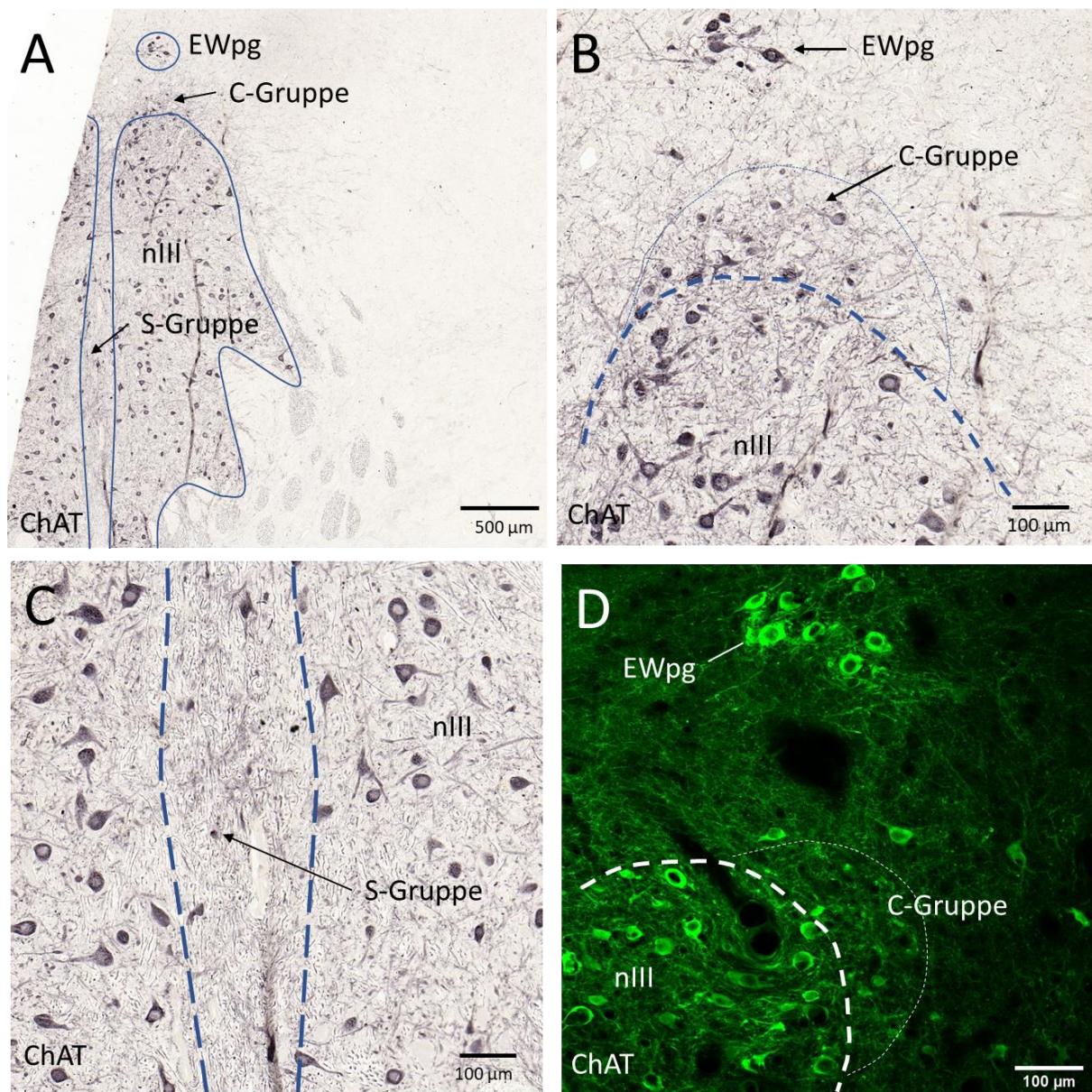


Abb. 4 ChAT-Färbung des Ncl. oculomotorius

Transversalschnitte durch den Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen, gefärbt auf Cholinacetyltransferase (ChAT) mit Immunperoxidase-Methoden (A-C, schwarz) und mit Immunfluoreszenz (D, grün). A: Die Übersicht zeigt die ChAT-positiven Neurone im nIII und die dorsal gelegenen präganglionären Neurone im Edinger-Westphalkern (EWpg). Kleinere ChAT-positive Neurone bilden dorsomedial zum nIII die C-Gruppe und medial zwischen beiden nIII die S-Gruppe (Pfeile in A und C). B, C, D: Detailaufnahmen von der C- und S-Gruppe. Beachte die vergleichsweise kleinen ChAT-positiven MIF-Neurone in der C- und S-Gruppe und die großen SIF-Motoneurone innerhalb des nIII.

3.1.2 Abgrenzung von SIF- und MIF-Motoneuronen durch Tracermarkierung

Entsprechend früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden nach Tracer-Injektion in den Muskelsehnenübergang des MR Neurone ausschließlich in der dorsomedial zum Ncl. oculomotorius gelegenen C-Gruppe markiert (Büttner-Ennever et al., 2001; Tang et al., 2015). Um die Neurone der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius genauer eingrenzen zu können, wurden Schnitte, die retrograd Tracer-markierte Neurone enthielten, über Doppel- und Tripelimmunfluoreszenz auf weitere Proteine angefärbt. Dazu zeigt Abb. 5 ein Beispiel einer Doppelfärbung des Ncl. oculomotorius auf den Tracer CTB (grün) und ACAN (rot), welches Bestandteil von perineuronalen Netzen ist.

In der Färbung wurde deutlich, dass die mit CTB markierten MIF-Motoneurone nicht von ACAN-positiven perineuronalen Netzen umgeben sind (Abb. 5 A-F, weiße Pfeile). Im Vergleich dazu waren die Tracer-negativen SIF-Motoneurone im eigentlichen Kerngebiet des Ncl. oculomotorius von deutlichen perineuronalen Netzen umhüllt (Abb. 5 A-C G-I, gelbe Pfeile).

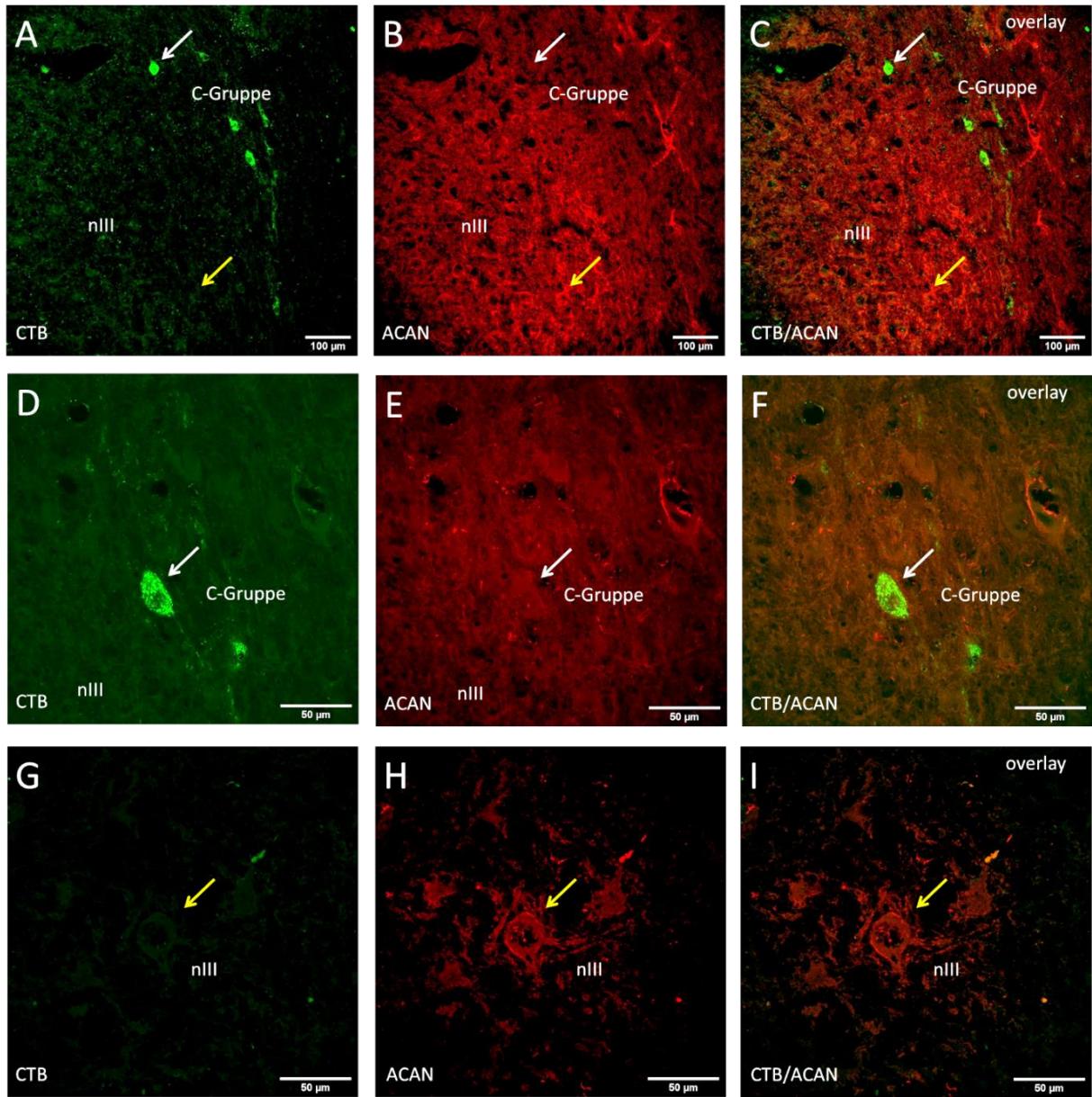


Abb. 5 ACAN/CTB-Fluoreszenzfärbung des Ncl. oculomotorius

Transversalschnitte durch den Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen gefärbt auf den Tracer Choleratoxin-Untereinheit B (CTB, grün) und Aggrecan (ACAN, rot) mit Immunfluoreszenz in unterschiedlicher Fluoreszenzbeleuchtung (A-I). A-C: Die Übersichtsbilder zeigen die durch den Tracer CTB retrograd markierten MIF-Neurone der C-Gruppe. Diese sind ACAN-negativ (weiße Pfeile). Die SIF-Neurone innerhalb des nIII wurden nicht durch den Tracer CTB markiert. Sie sind ACAN-positiv (gelbe Pfeile). D-F: Detailaufnahme eines CTB-positiven/ACAN-negativen Neurons der C-Gruppe (weiße Pfeile). G-I: Detailaufnahme eines CTB-negativen/ACAN-positiven Neurons des nIII (gelbe Pfeile).

3.1.3 Tracerunabhängige Abgrenzung von MIF- und SIF-Motoneuronen

3.1.3.1 ChAT-Immunfärbung und perineuronale Netze

Die SIF-Motoneurone können anhand ihrer Assoziation mit perineuronalen Netzen von den netzlosen MIF-Neuronen unterschieden werden (Eberhorn et al., 2006). Dementsprechend zeigt die Doppelfärbung des Ncl. oculomotorius auf ACAN und ChAT, dass die größeren cholinergen SIF-Motoneurone (Abb. 6, braun; Abb. 7, grün) des Ncl. oculomotorius von ACAN-positiven perineuronalen Netzen (Abb. 6, schwarz; Abb. 7, rot) umgeben sind (Abb. 6 A-C; Abb. 7 A-C, blauer Pfeil). Die kleineren MIF-Motoneurone, die sich in der C-Gruppe dorsomedial des eigentlichen Oculomotoriuskerngebiets befinden, waren dagegen nicht von ACAN-positiven perineuronalen Netzen umgeben, sondern nur mit einer amorphen ACAN-positiven ECM assoziiert (Abb. 6 A-C; Abb. 7 A-C, gelber Pfeil). Die gleiche Beobachtung wurde für die MIF-Motoneurone in der S-Gruppe gemacht, die sich in der Mittellinie zwischen dem rechten und dem linken Oculomotoriuskern befindet (Abb. 6 A, C).

Dorsomedial des Ncl. oculomotorius mit C-Gruppe liegt der Edinger-Westphalkern. Dieser enthält die parasympathischen präganglionären Neurone, die zum Ciliarganglion projizieren (Gamlin and Reiner, 1991; Horn et al., 2008). Wie die MIF-Motoneurone sind auch diese Neurone nicht von prominenten ACAN-positiven perineuronalen Netzen umgeben (Abb. 6 A, B; Abb. 7 A-C, oranger Pfeil).

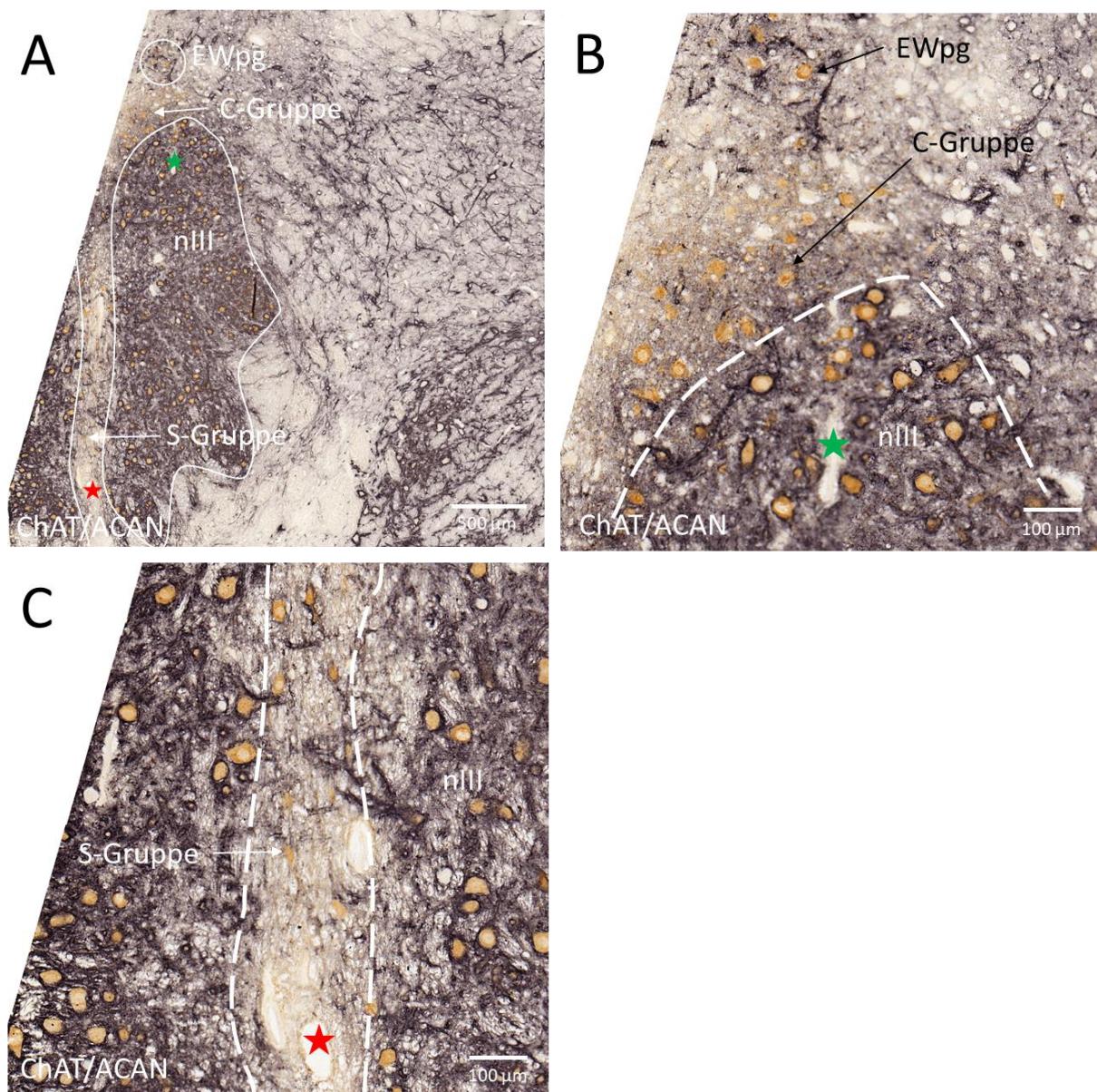


Abb. 6 ChAT/ACAN-Färbung des Ncl. oculomotorius

Transversalschnitte durch den Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen gefärbt auf Cholinacetyltransferase (ChAT, braun) und Aggrecan (ACAN, schwarz) mit Immunperoxidase-Methoden (A-C). Zur einfacheren Orientierung markieren die roten und grünen Sterne korrespondierende Blutgefäße. A: Die Übersicht zeigt die ChAT-positiven Neurone (braun) des nIII, der dorsomedial gelegenen C-Gruppe, der zwischen beiden nIII gelegenen S-Gruppe sowie der dorsal gelegenen präganglionären Neurone des Edinger-Westphalkerns (EWpg). Innerhalb des nIII ist eine deutliche Färbung der ACAN-positiven Netze (schwarz) zu erkennen. B, C: Detailaufnahmen der C- und S-Gruppe. Beachte das fehlende dichte, schwarze Anfär bemuster in der direkten Umgebung der braunen ChAT-positiven Neurone der C- und S-Gruppe, das bei den Neuronen innerhalb des nIII vorhanden ist.

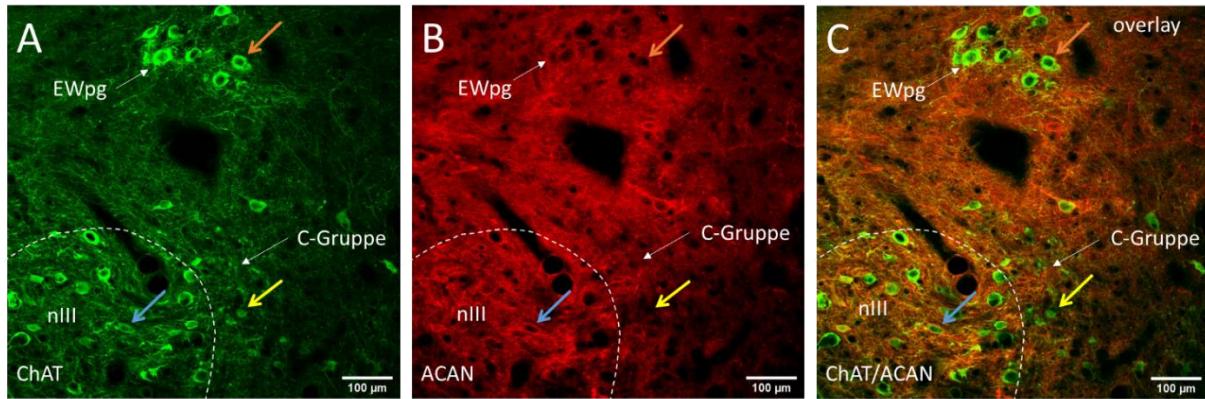


Abb. 7 ChAT/ACAN-Doppelfärbung der Neurone des rostralen Teils des Ncl. oculomotorius
 Immunfluoreszenzfärbung des Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen gefärbt auf ChAT (grün) und ACAN (rot) (A-C). Die cholinergen Neurone innerhalb des nIII sind von ACAN-positiven PN umgeben (blaue Pfeile). Die kleineren ChAT-positiven Neurone der dorsomedial zum nIII gelegenen C-Gruppe (gelbe Pfeile) und die präganglionären Neurone des Edinger-Westphalkerns (EWpg) (orange Pfeile) sind dagegen nicht von ACAN-positiven PN umgeben.

3.1.3.2 Kaliumkanäle in SIF- und MIF-Motoneuronen

Bei der Untersuchung der cholinergen MIF- und SIF-Motoneurone in Bezug auf die Verteilung des Kaliumkanals Kv1.1 wurden Unterschiede gefunden. Bei der Mehrzahl der ChAT-positiven SIF-Motoneurone fand sich, vornehmlich im Zytoplasma, eine deutliche Immunreakтивität für Kv1.1. Die peripher liegenden MIF-Motoneurone in der C- und S-Gruppe exprimierten den Kaliumkanal Kv1.1 in geringerem Ausmaß (Abb. 8; Abb. 9).

Bei den präganglionären Neuronen des Edinger-Westphalkerns konnte ebenfalls eine Immunreakтивität für Kv1.1 festgestellt werden (Abb. 8 A, B)

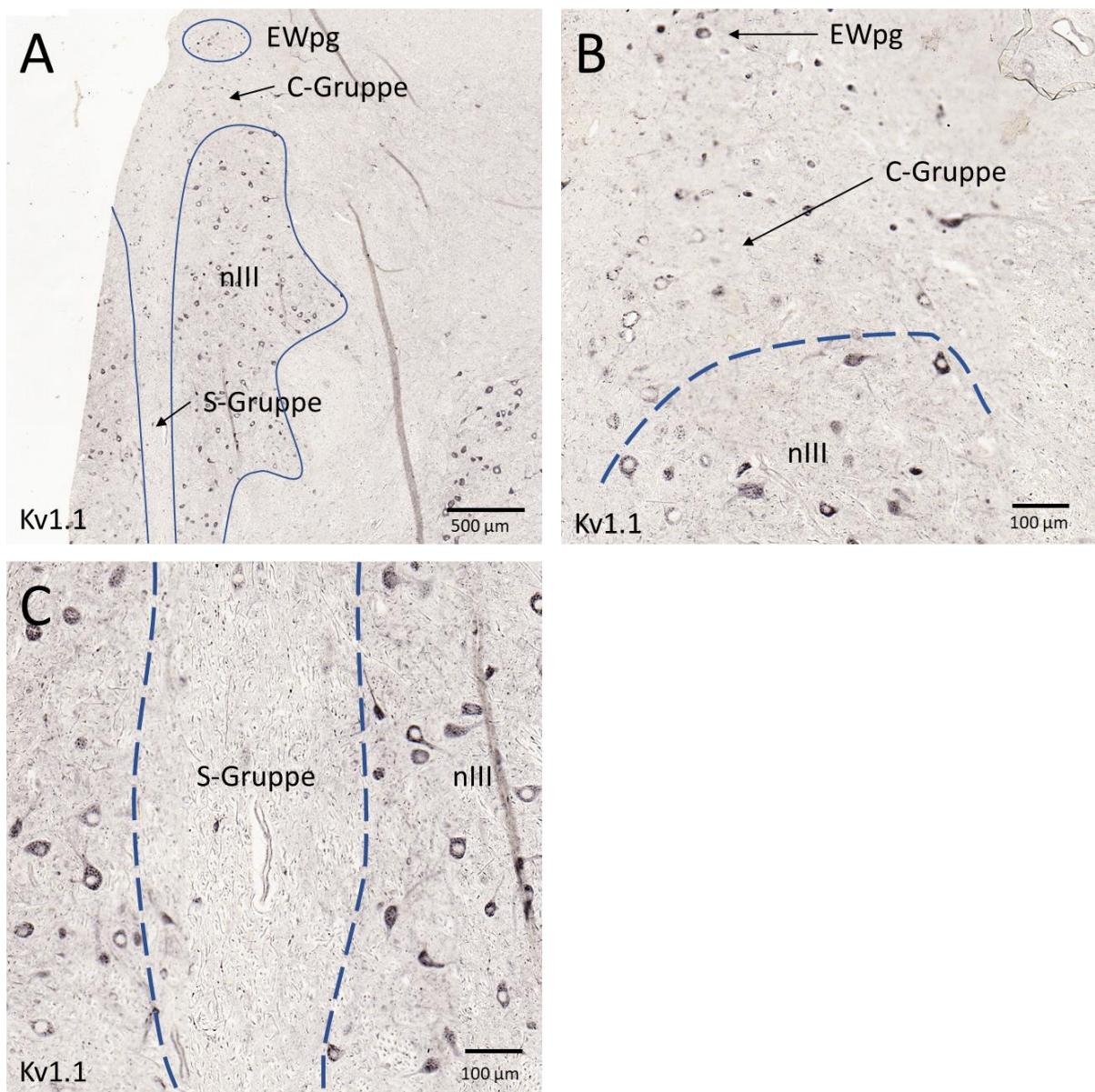


Abb. 8 Kv1.1-Färbung des Ncl. oculomotorius

Transversalschnitte durch den Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen gefärbt auf den Kaliumkanal Kv1.1 (schwarz) mit Immunperoxidase-Methoden (A-C). A: Die Übersicht zeigt die Kv1.1 positiven Neurone im nIII, in der C- und S-Gruppe sowie bei den präganglionären Neuronen des Edinger-Westphalkerns (EWpg). Innerhalb des nIII ist eine deutliche Immunreakтивität auf Kv1.1 erkennbar, während Kv1.1 in der dorsomedial gelegenen C-Gruppe und in der, zwischen den beiden nIII gelegenen, S-Gruppe in erkennbar geringerem Ausmaß vorhanden ist. Im EWpg ist ebenfalls eine Immunreakтивität auf Kv1.1 erkennbar. B, C: Detailaufnahme der C- und S-Gruppe. Beachte die geringere Immunreakтивität auf Kv1.1 bei den MIF-Motoneuronen im Vergleich zu den SIF-Motoneuronen innerhalb des nIII.

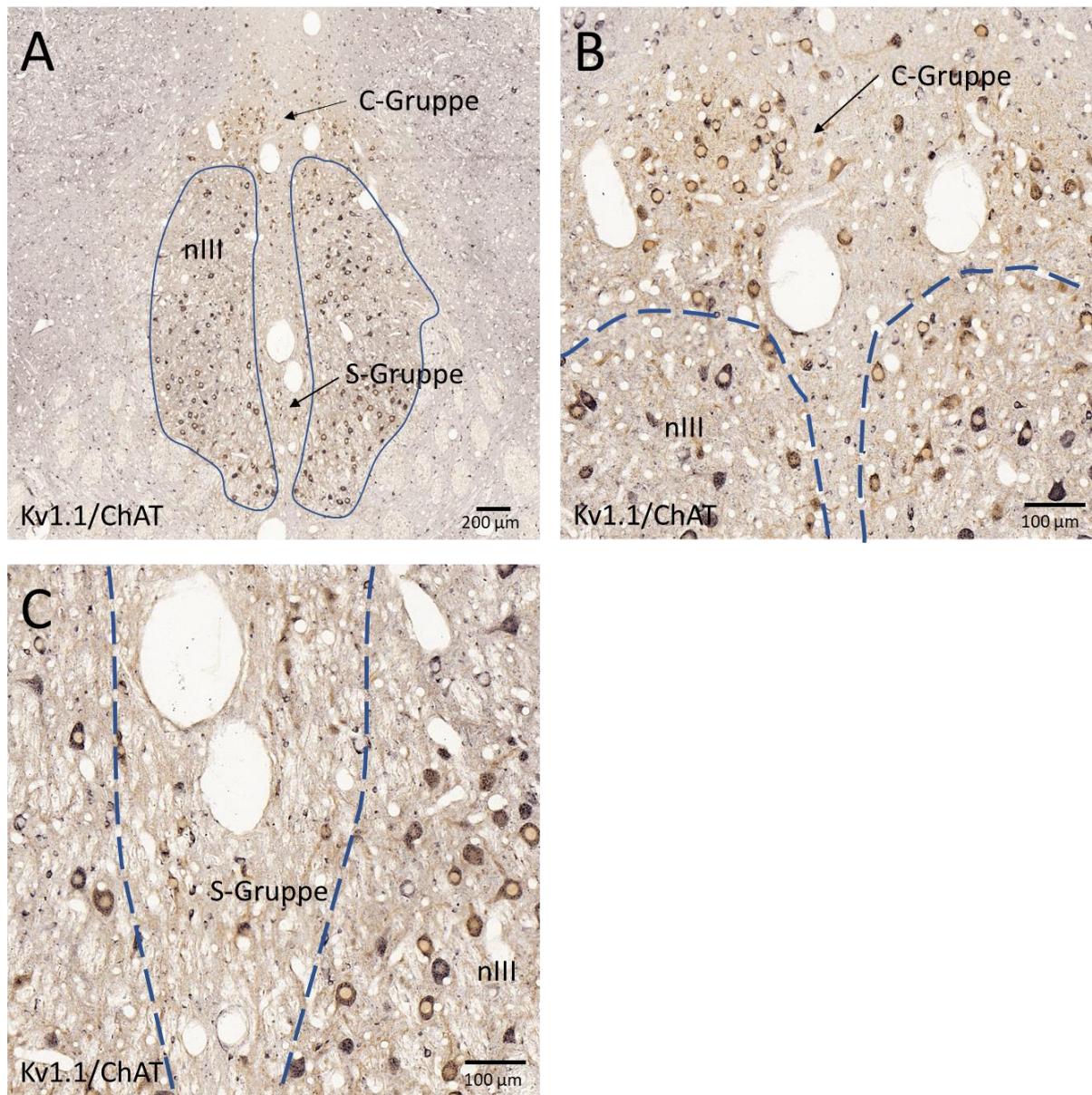


Abb. 9 Kv1.1/ChAT-Doppelfärbung des Ncl. oculomotorius

Transversalschnitte durch den Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen gefärbt auf ChAT (braun) und den Kaliumkanal Kv1.1 (schwarz) mit Immunperoxidase-Methoden (A-C). A: Die Übersicht zeigt die cholinergen Neurone (braun) des nIII, der dorsomedial gelegenen C-Gruppe und der zwischen beiden nIII gelegenen S-Gruppe. Die cholinergen SIF-Neurone des nIII zeigen eine deutliche Immunreakтивität auf Kv1.1 (schwarz). B, C: Detailaufnahmen der C- und S-Gruppe. Beachte, dass die cholinergen MIF-Motoneurone der C- und S-Gruppe eine geringere Reaktion auf Kv1.1 (schwarz) zeigen als die SIF-Motoneurone innerhalb des nIII.

Bei dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv3.1b zeigten sich klare Unterschiede zwischen den SIF- und den MIF- Motoneuronen. Eine Immunreaktivität für Kv3.1b war in den Somata der SIF-Motoneurone als fein granuläre Färbung innerhalb des Somas und Anfärbung der Membran zu erkennen (Abb. 10 B, C, roter Pfeil). Die Neurone der C- und S-Gruppe zeigten im Gegensatz dazu keine Immunreaktivität auf Kv3.1b, die sich vom Hintergrund abgehoben hätte (Abb. 10).

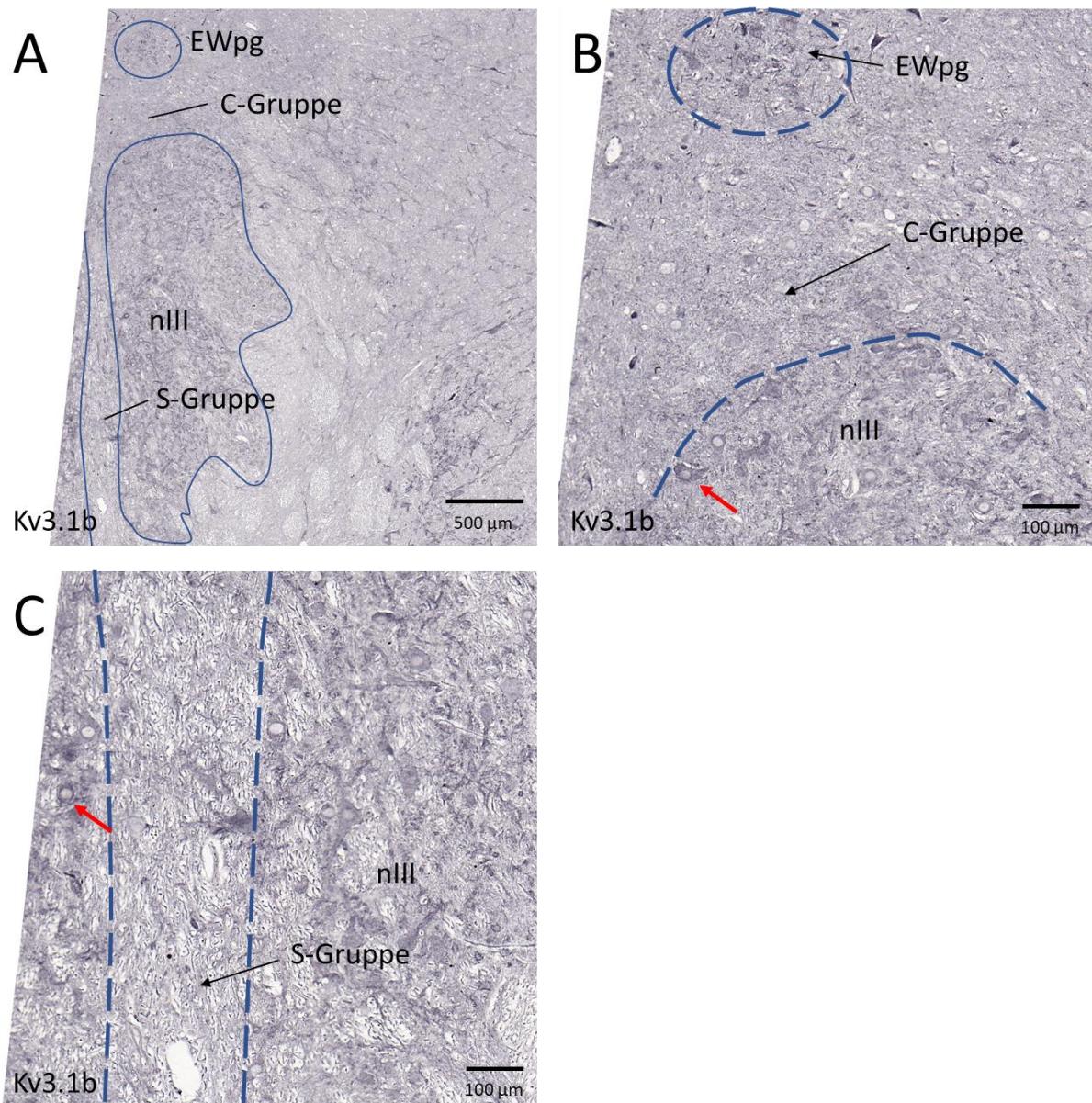


Abb. 10 Kv3.1b-Färbung des Ncl. oculomotorius

Transversalschnitte durch den Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen gefärbt auf den Kaliumkanal Kv3.1b (schwarz) mit Immunperoxidase-Methoden (A-C). A: Die Übersicht zeigt Neurone im nIII sowie in der C- und S-Gruppe. Innerhalb des nIII ist eine deutliche Immunreakтивität auf Kv3.1b erkennbar, während diese in der dorsomedial gelegenen C-Gruppe und in der zwischen den beiden nIII gelegenen S-Gruppe fehlt. B, C: Detailaufnahme der C- und S-Gruppe. Die MIF-Motoneurone zeigen keine erkennbare Reaktion auf Kv3.1b, während bei den SIF-Motoneuronen innerhalb des nIII eine positive Reaktion auf Kv3.1b erkennbar ist (roter Pfeil). EWpg - präganglionäre Neurone des Ncl. Edinger-Westphal.

Zur Verifikation der Befunde zu den Kaliumkanälen wurden zusätzlich Schnitte von einem Fall analysiert, bei dem nur die MIF-Motoneurone durch den Tracer CTB retrograd markiert waren. Bei der Fluoreszenzfärbung auf den Tracer CTB und die Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv3.1b, zeigte sich, wie bei den Immunperoxidase-Färbungen (Abb. 8-10), dass die Neurone des eigentlichen Oculomotoriuskerngebiets, die überwiegend SIF-Motoneurone repräsentieren (beachte die fehlende Immunreaktion auf CTB (Abb. 11 A-F, gelber Pfeil)), sowohl den Kaliumkanal Kv1.1 (Abb. 11 A-C, gelber Pfeil) als auch den Kaliumkanal Kv3.1b (Abb. 11 D-F, gelber Pfeil) exprimierten. Bei den MIF-Motoneuronen der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius, die durch den Tracer CTB markierten wurden (Abb. 11 A-F, weißer Pfeil), war, wie in der Immunperoxidase-Färbung (Abb. 10), der Kaliumkanal Kv3.1b nicht zu finden. Der Kaliumkanal Kv1.1 war in der Fluoreszenzfärbung bei den MIF-Motoneuronen im Gegensatz zu den Immunperoxidase-Färbungen (Abb. 8; Abb. 9) nicht nachweisbar, was der Nachweismethode geschuldet sein dürfte (siehe dazu Abschnitt 4.1.2).

Die Fluoreszenzfärbung auf ACAN, Kv1.1 und CTB (Abb. 12) bestätigte, dass die MIF-Motoneurone der C-Gruppe, die durch den Tracer CTB retrograd markiert wurden, keine ACAN-positiven perineuronalen Netze besitzen. Auch hier war der Kaliumkanal Kv1.1 nicht nachweisbar (Abb. 12 A-F, weißer Pfeil). Die Betrachtung der Neurone im eigentlichen Kerngebiet des Ncl. oculomotorius ließ dagegen Neurone erkennen, die nicht durch den Tracer CTB markiert waren, aber sowohl von ACAN-positiven perineuronalen Netzen umgeben waren als auch den Kaliumkanal Kv1.1 exprimierten (Abb. 12 G-L, gelber Pfeil).

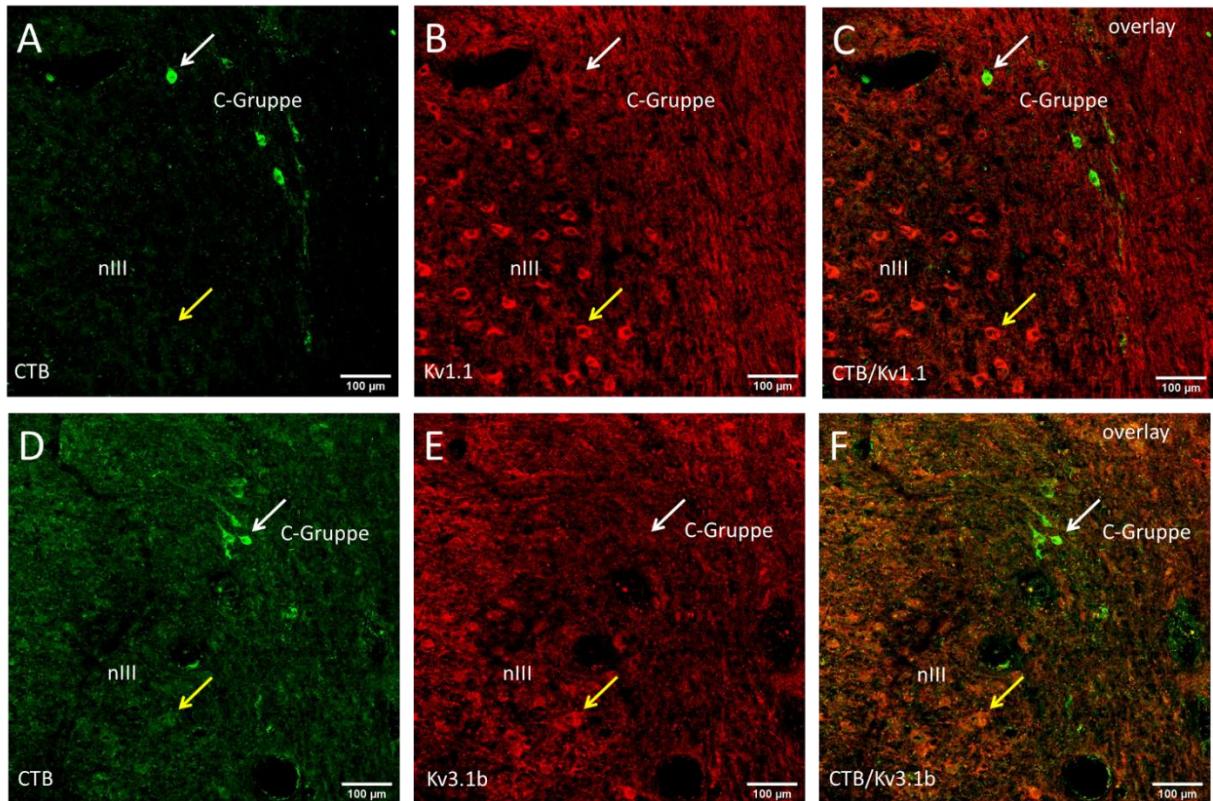


Abb. 11 CTB/Kv1.1-Färbung und CTB/Kv3.1b-Färbung des Ncl. oculomotorius

Transversalschnitte durch den Ncl. oculomotorius (nIII) eines Rhesusaffen gefärbt auf den Tracer CTB (grün) in Kombination mit den Kaliumkanälen Kv1.1 (A-C, rot) und Kv3.1b (D-F, rot) mit Immunfluoreszenz in unterschiedlicher Fluoreszenzbeleuchtung. Die CTB-positiven MIF-Motoneurone (grün) befinden sich in der C-Gruppe. Bei ihnen ist eine Immunreaktion auf Kv1.1 (A-C, rot) und Kv3.1b (D-F, rot) nicht erkennbar (weiße Pfeile). Die SIF-Motoneurone des nIII wurden nicht durch CTB markiert. Diese sind Kv1.1- und Kv3.1b-positiv (gelbe Pfeile).

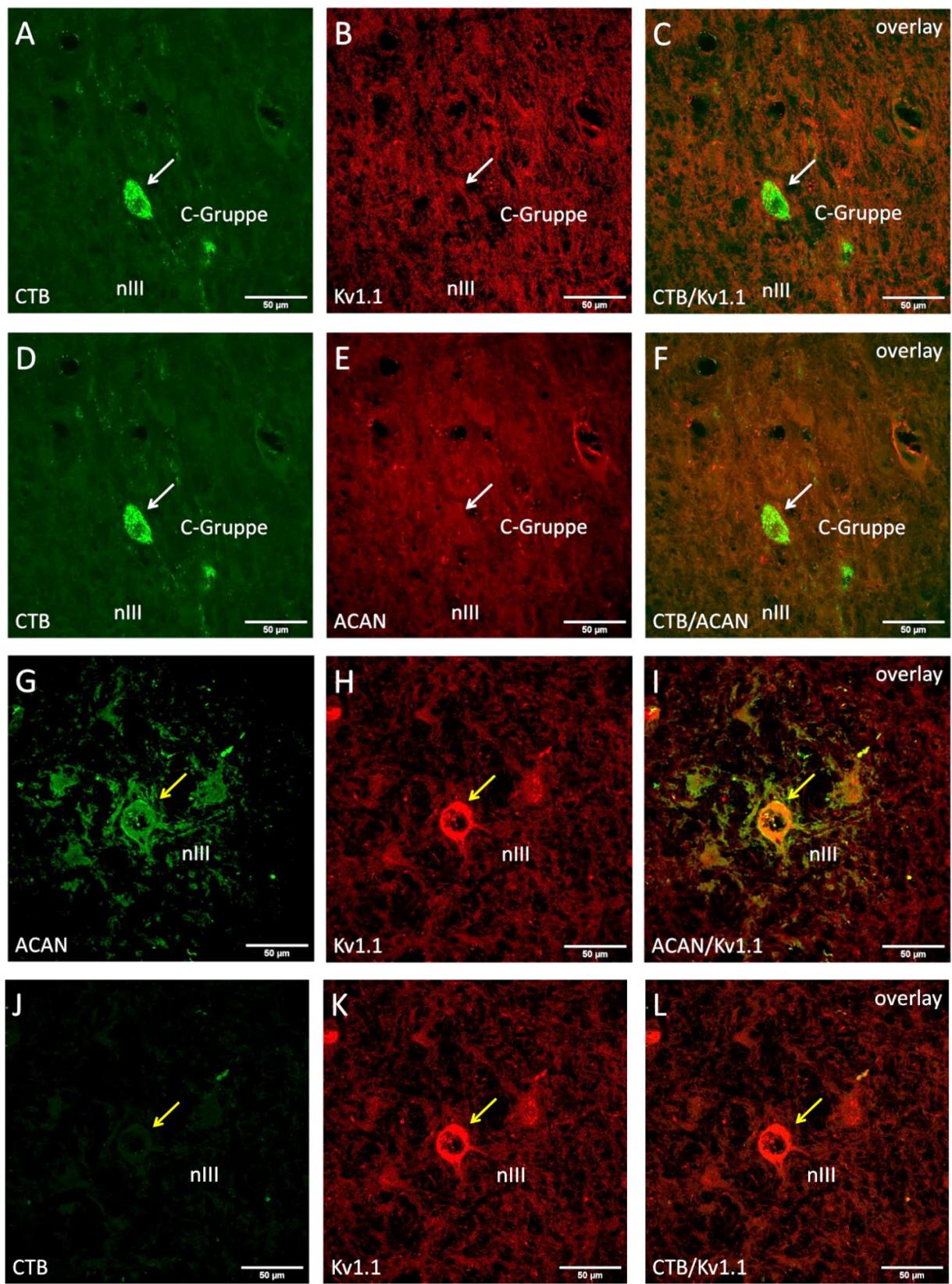


Abb. 12 Detailaufnahme einer ACAN/CTB/Kv1.1-Färbung des Ncl. oculomotorius

Detailaufnahmen eines Neurons der C-Gruppe (A-F, weißer Pfeil) und des Ncl. oculomotorius (nIII) (G-L, gelber Pfeil) gefärbt auf den Tracer CTB (grün), den Kaliumkanal Kv1.1 (rot) und

ACAN (rot) mit Immunfluoreszenz in unterschiedlicher Fluoreszenzbeleuchtung und verschiedenen Kombinationen von zwei der drei Marker. A-F: Das durch den Tracer CTB markierte MIF-Motoneuron (A-F, grün) in der C-Gruppe zeigt keine Immunreaktivität auf den Kaliumkanal Kv1.1 (A-C, weißer Pfeil) und ist auch nicht von einem ACAN-positiven perineuronalem Netz umgeben (D-F, weißer Pfeil). G-L: Das SIF-Motoneuron des nIII wurde nicht von dem Tracer CTB markiert (J-L, grün). Im Unterschied zu dem MIF-Motoneuron der C-Gruppe ist das SIF-Motoneuron des nIII immunaktiv auf Kv1.1 (G-L, rot) und von ACAN-positiven perineuronalen Netzen umgeben (G-I, grün).

3.1.4 Untersuchungen zur Identifikation von α - und γ -Motoneuronen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit SIF- und MIF-Motoneurone Eigenschaften von α - bzw. γ -Motoneuronen aufweisen. Dazu wurden zunächst die Färbungen im Rückenmark von Rhesusaffen etabliert und dann an Mittelhirnschnitten angewandt.

3.1.4.1 Rückenmark

Mit ChAT-Antikörpern wurden alle Motoneurone im Rückenmark angefärbt und mit einer kombinierten Immunfluoreszenzfärbung wurde der nukleäre Rezeptor Erry nachgewiesen. In der ChAT- Färbung ließen sich die Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks detektieren, die aufgrund der Größe der Perikarya morphologisch in die größeren putativen α -Motoneuronen (Abb. 13, gelbe Pfeile) und die kleineren putativen γ -Motoneuronen eingeteilt werden konnten (Abb. 13, weiße Pfeile). Bei einigen kleineren ChAT-positiven Neuronen war nach Behandlung mit dem Antikörper gegen Erry eine Färbung des Kerns erkennbar (Abb. 13 A-C, weiße Pfeile). Die größeren ChAT-positiven Neurone dagegen zeigten sich Erry-negativ (Abb. 13 A-C, gelbe Pfeile).

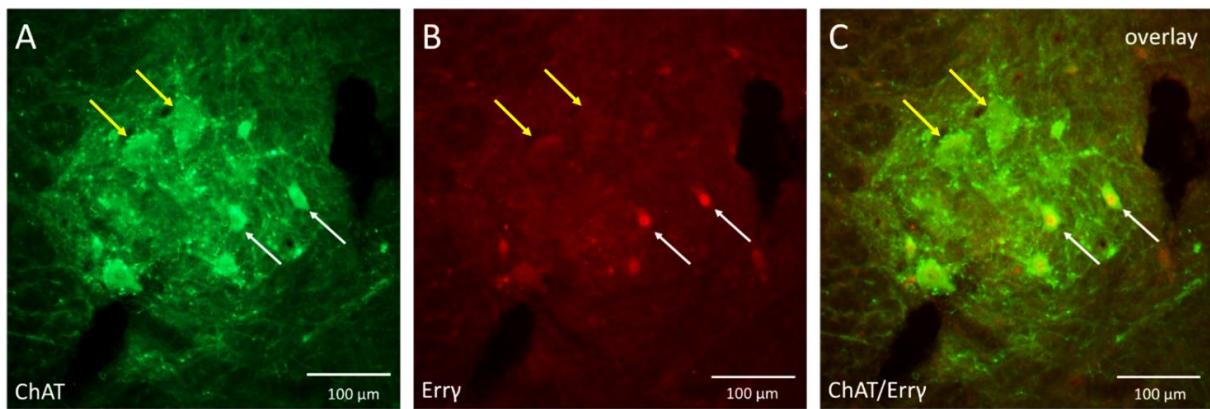


Abb. 13 ChAT/Erry-doppelt markierte Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks

Transversalschnitt durch das Vorderhorn des Rückenmarks eines Rhesusaffen gefärbt auf ChAT (grün) und den nukleären Rezeptor Erry (rot). Die kleineren ChAT-positiven Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks (A, C, weiße Pfeile) sind Erry-positiv (B, C, weiße Pfeile). Die größeren ChAT-positiven Neurone sind Erry-negativ (A-C, gelbe Pfeile).

Die Verwendung eines Antikörpers gegen NeuN zeigte, dass das nukleäre Protein NeuN in den größeren Motoneuronen des Vorderhorns zu finden ist (Abb. 14 A-C, weißer Pfeil). In den kleineren putativen γ -Motoneuronen dagegen ließ sich NeuN nicht nachweisen (Abb. 14 A-C, blauer Pfeil). Damit waren die Befunde, die von Friese et al. an Rückenmarkschnitten von Mäusen durchgeführt wurden, hier an Rhesusaffen mit gleichen Methoden bestätigt worden (Friese et al., 2009).

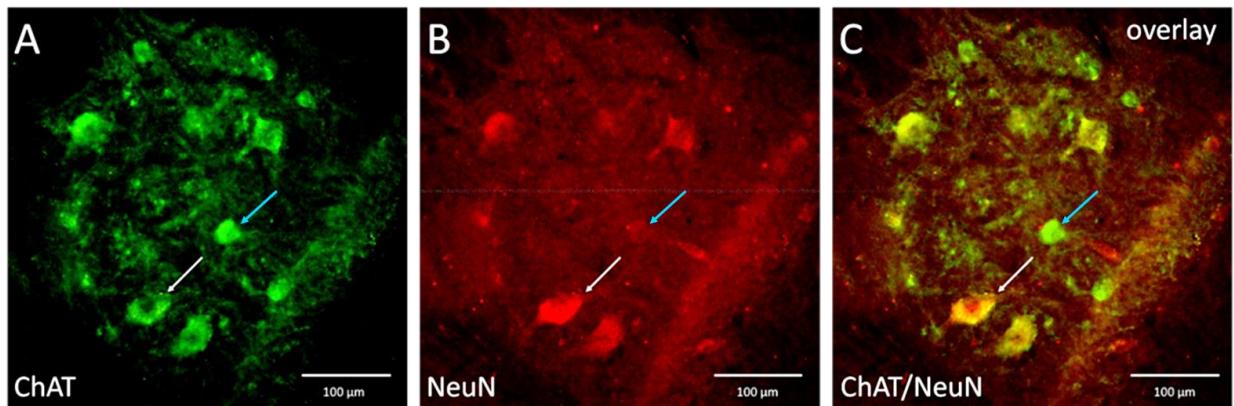


Abb. 14 ChAT/NeuN-doppelmarkierte Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks

Transversalschnitt durch das Vorderhorn des Rückenmarks eines Rhesusaffen gefärbt auf ChAT (grün) und das nukleäre Protein NeuN (rot) mit Immunfluoreszenz in unterschiedlicher Fluoreszezbeleuchtung. Die größeren ChAT-positiven Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks (A, C, weißer Pfeil) sind NeuN-positiv (B, C, weißer Pfeil). Die kleineren cholinergen Neurone zeigen keine Immunreaktion auf NeuN (A-C, blauer Pfeil).

3.1.4.2 Ncl. trochlearis

Mit der immunhistochemischen Färbung auf ChAT wurden alle cholinergen Neurone des Ncl. trochlearis markiert. Der Kern war so deutlich von seiner Umgebung abgrenzbar (Abb. 15 A). Die Doppelfärbung auf ChAT und NeuN zeigte, dass nur Neurone innerhalb des eigentlichen Kerngebiets des Ncl. trochlearis, das die SIF-Motoneurone enthält, NeuN exprimieren (Abb. 15 B, C, weiße Pfeile). Die MIF-Motoneurone, die sich in der dorsalen Kappe des Trochleariskerns befinden, zeigten dagegen keine Immunreakтивität für das nukleäre Protein NeuN (Abb. 15 B, C, gelber Stern).

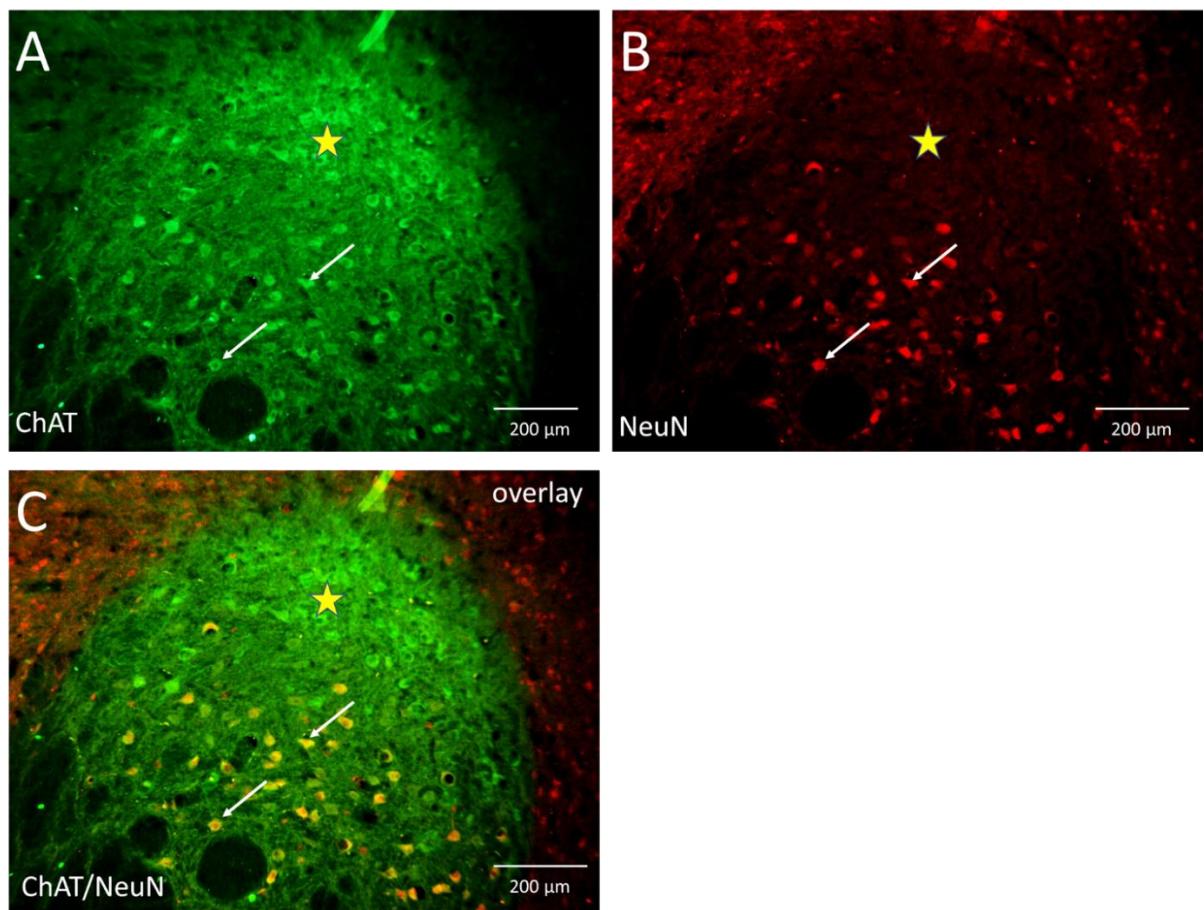


Abb. 15 ChAT/NeuN-doppelmarkierte Neurone im Ncl. trochlearis

Transversalschnitt durch den Ncl. trochlearis eines Rhesusaffen gefärbt auf ChAT (grün) und das nukleäre Protein NeuN (rot) mit Immunfluoreszenz. Die cholinergen Neurone, die sich in der dorsalen Kappe des Ncl. trochlearis befinden, zeigen keine Immunreaktion auf NeuN (A-C, gelber Stern). Die cholinergen Neurone, die NeuN-positiv sind, befinden sich im eigentlichen Kerngebiet des Ncl. trochlearis (A-C, weiße Pfeile).

Bei einer Doppelfärbung des Ncl. trochlearis auf Erry und ChAT ließen sich beide Marker gleichzeitig nur bei Neuronen in der dorsalen Kappe des Kerns nachweisen, welche die MIF-Motoneurone enthält. Generell kann der Marker für den nukleären Rezeptor Erry nur in Neuronen gesehen werden, deren Kern auf den Schnitten angeschnitten ist. Von den Neuronen der dorsalen Kappe des Trochleariskerns, deren Kern in dem Schnitt angeschnitten war, wurden in der durchgeführten Färbung allerdings nur einige durch den Marker Erry markiert (Abb. 16 A-C, weiße Pfeile).

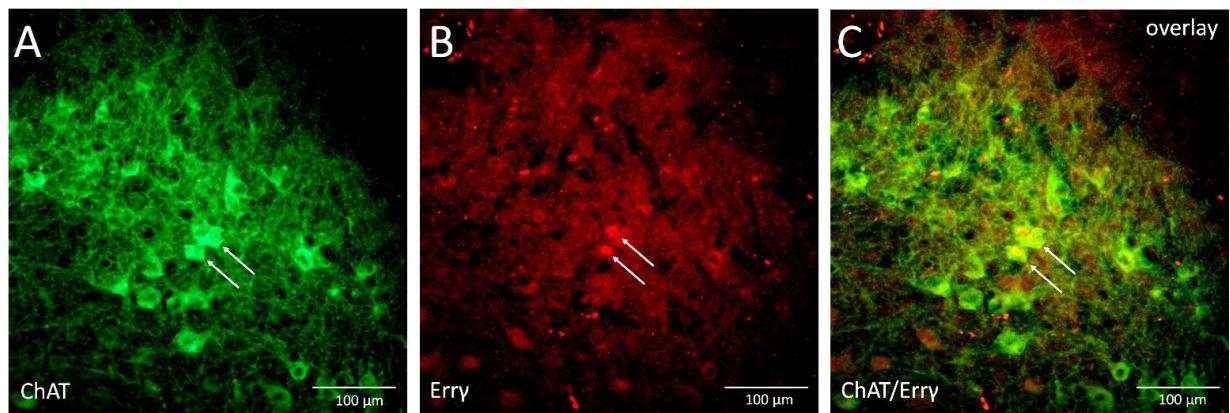


Abb. 16 ChAT/Erry-doppelt markierte Neurone im Ncl. trochlearis

Transversalschnitt durch die dorsale Kappe des Ncl. trochlearis eines Rhesusaffen gefärbt auf ChAT (grün) und Erry (rot) mit Immunfluoreszenz. Die weißen Pfeile zeigen auf cholinerge MIF-Motoneurone in der dorsalen Kappe des Ncl. trochlearis, die gleichzeitig Erry-positiv sind (A-C, weiße Pfeile).

3.1.4.3 Ncl. oculomotorius

Auch die Neurone des Ncl. oculomotorius wurden erstmals mit einem Marker auf Erry untersucht (Abb. 17). An Schnitten mit retrograd-markierten MIF-Motoneuronen in der C-Gruppe wurden mit einer Dreifachimmunfluorezenz-Färbung der Tracer CTB, ChAT und Erry nachgewiesen. Es zeigte sich kein konsistentes Ergebnis. In der C-Gruppe wurden vereinzelte Tracer-markierte ChAT-positive MIF-Motoneurone gefunden, die Erry exprimierten (Abb. 17 A-D, weißer Pfeil), neben solchen, die Erry-negativ waren.

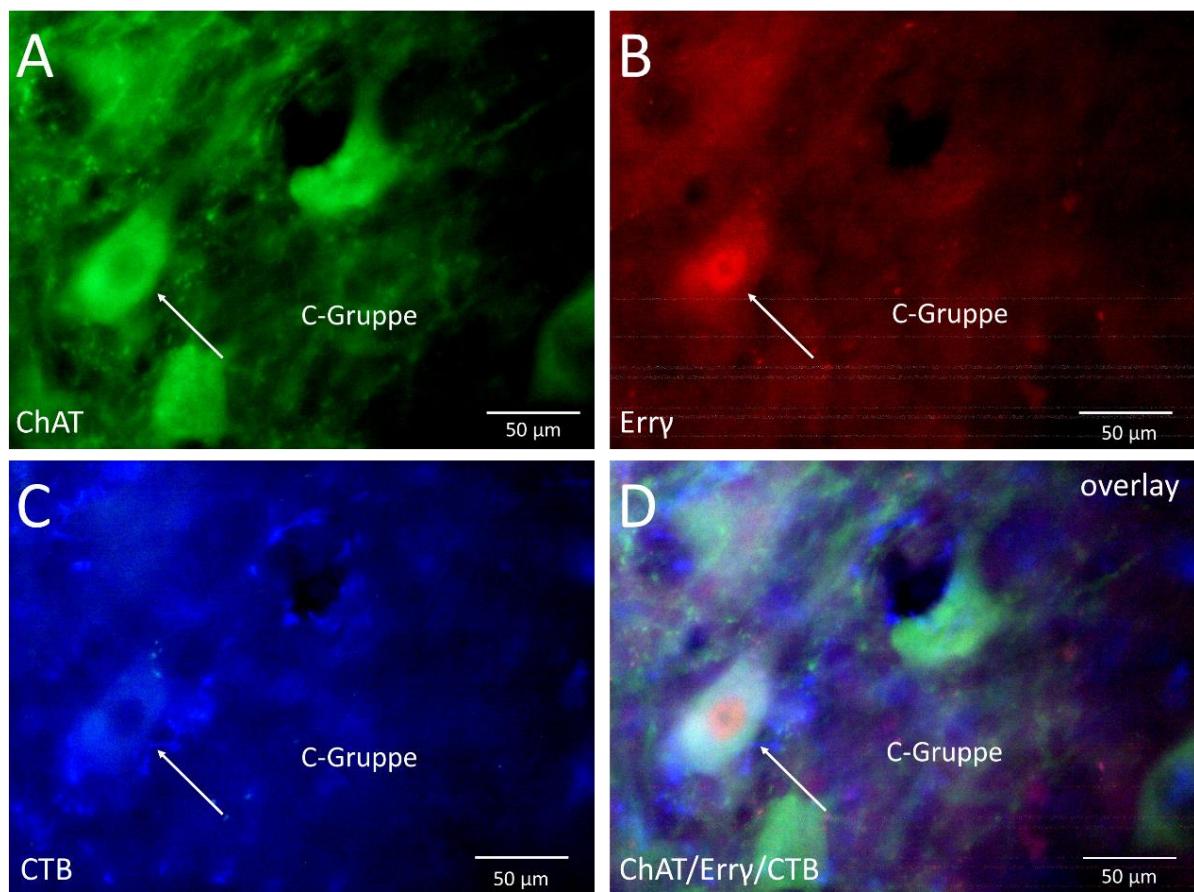


Abb. 17 ChAT/Erry/CTB-dreifachmarkiertes Neuron in der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius
Detailaufnahme eines Neurons der C-Gruppe gefärbt auf den Tracer CTB (blau), Erry (rot) und ChAT (grün) mit Immunfluoreszenz. Das cholinerge MIF-Motoneuron in der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius (A, D, weißer Pfeil) wurde durch den Tracer CTB markiert (C, D, weißer Pfeil) und ist Erry-positiv (B, D, weißer Pfeil).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Motoneurone des Ncl. oculomotorius, die unterschiedliche Typen von Muskelfasern in den äußeren Augenmuskeln innervieren, Unterschiede im Profil der spannungsgesteuerten schnell feuern Kalium-Kanäle Kv1.1 und Kv3.1b zeigen. Damit konnten mit immunhistochemischen Methoden Unterschiede in der Physiologie der Motoneurone abgebildet werden. In einer 2020 durchgeführten Studie wurde bei fast spiking MVN-Neuronen eine starke Korrelation der Ionenkanalexpression einschließlich der Kaliumkanäle Kv1.1, Kv3.1 festgestellt (Kodama et al., 2020). Am Ncl. abducens und Ncl. trochlearis wurde diese Korrelation auch bei SIF-Motoneuronen gefunden, nicht aber bei den MIF-Motoneuronen (Mayadali et al., 2021).

In einem zweiten Teil der Arbeit ließen sich mit der Anfärbung auf den Transkriptionsfaktor Erry keine eindeutigen Hinweise dafür finden, dass die Motoneurone der non-twitch Muskelfasern γ -Motoneuronen im Rückenmark entsprechen.

Die EOM werden von mindestens zwei verschiedenen Motoneuronentypen innerviert, die sich aufgrund ihrer Morphologie, ihrer anatomischen Lage und ihrer histochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden (Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2005a). Die SIF-Motoneurone innervieren die schnell kontrahierenden twitch-Muskelfasern der EOM über einfache *en plaque* motorische Endplatten, die sich vor allem im zentralen Drittel der Muskelfasern befinden (Büttner-Ennever, 2006; Spencer and Porter, 2006). Die MIF-Motoneurone dagegen innervieren die langsam kontrahierenden non-twitch-Muskelfasern der EOM über multiple *en grappe* Endplatten, die man über die gesamte Muskelfaserlänge verbreitet findet und die in besonders hoher Dichte an den distalen Enden vorhanden sind (Spencer and Porter, 1988; Porter et al., 1995; Büttner-Ennever, 2006).

In den Hirnnervenkernen sind die Motoneurone topographisch organisiert. Da sowohl die SIF- als auch die MIF-Motoneurone - wie alle Motoneurone - cholinerg sind, kann die Gesamtpopulation dieser Neurone durch eine Färbung gegen das Enzym Cholin-Acetyltransferase identifiziert werden (Eberhorn et al., 2005a). Im Ncl. oculomotorius lassen sich so die morphologisch größeren SIF-Motoneurone innerhalb der eigentlichen Grenze des Hirnnervenkerns lokalisieren. Die kleineren MIF-Motoneurone sind dagegen außerhalb der

Grenzen des eigentlichen Kerns zu finden. Die C-Gruppe befindet sich dorsomedial der Grenze des Oculomotoriuskerns. Sie enthält die MIF-Motoneurone des MR und des IR (Büttner-Ennever et al., 2001; Tang et al., 2015). Ebenfalls in den peripheren Gruppen zu finden sind die Zellkörper der Palisadenendigungen (Lienbacher et al., 2011b; Zimmermann et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden nach einer distalen Injektion in den MR ausschließlich MIF-Motoneurone in der C-Gruppe gefunden. Das bestätigt die Befunde der Studie von Büttner-Ennever et al. (2001), die zeigte, dass durch Tracerinjektionen in den Muskelsehnenübergang dieses Muskels fast ausschließlich die Neurone der C-Gruppe retrograd markiert werden (Büttner-Ennever et al., 2001). Die cholinergen Motoneurone der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius wurden in diesem Projekt neben ihrer anatomischen Lage und Morphologie mit Hilfe des Tracers CTB identifiziert, der in den Muskel-Sehnen-Übergang des MR injiziert wurde.

4.1 Charakterisierung der Neurone der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius

4.1.1 Perineuronale Netze

Perineurale Netze gehören zur ECM von Neuronen. Dieser werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Sie spielt zum Beispiel während der Entwicklung eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung und der Migration von Neuronen und auch nach der Entwicklung unterstützt die ECM vielfache physiologische Prozesse (zur Übersicht: Carlson and Hockfield, 1996). PN sind spezialisierte Substrukturen der ECM, die die Somata und die proximalen Dendriten und einen Teil des Axons von bestimmten Neuronen umgeben (Brückner et al., 1993; Härtig et al., 1994; Brückner et al., 2006). Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Ihre hohe Ionenpufferungskapazität lässt zum Beispiel vermuten, dass sich die PN an Neuronen mit hoher Aktivität befinden (Brückner et al., 1993). Auch die Beobachtung, dass sie oft um Neurone gefunden werden, die das Calcium-bindende Protein Parvalbumin enthalten (Härtig et al., 1994), legt die Vermutung nahe, dass PN hauptsächlich mit Neuronen hoher Aktivität assoziiert sind (Horn et al., 2003).

Entsprechend früherer Studien, die zur Darstellung der PN einen gegen CSPG gerichteten Antikörper (clone Cat-301; MAB5284, Chemicon) verwendeten (Eberhorn et al., 2005a; Eberhorn et al., 2006), konnte in vorliegender Arbeit mit einem Antikörper gegen ACAN, das

ebenfalls Bestandteil der PN ist (Giamanco et al., 2010), gezeigt werden, dass bei den SIF-Motoneuronen der EOM perineuronale Netze in großer Zahl vorhanden sind. Bei den kleineren MIF-Motoneuronen dagegen waren die perineuronalen Netze nicht nachweisbar. Das Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei den SIF-Motoneurone der EOM um Neurone mit hoher Aktivität handelt. Die MIF-Motoneurone scheinen dagegen im Vergleich zu den SIF-Motoneuronen, Neurone mit geringerer Aktivität zu sein.

4.1.2 Kaliumkanäle

Zur weiteren Differenzierung von MIF- und SIF-Motoneuronen wurde im vorliegenden Projekt das Vorkommen der Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv3.1b im Ncl. oculomotorius untersucht. Die bei Säugetieren dominierenden Kaliumkänele vom Typ delayed rectifier gehören zu den Familien Kv1-Kv4 der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Trotz der Heterogenität innerhalb jeder Familie der Kaliumkanäle, sind gemeinsame Eigenschaften erkennbar, die vermuten lassen, dass jede Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle auf bestimmte Funktionen spezialisiert ist (Johnston et al., 2010). Kaliumkanäle der Familie Kv1 und Kv4 gehören zu den low-voltage-activated Kanälen, die sich bei geringer Depolarisation öffnen. Sie spielen damit zu Anfang eines Aktionspotentials eine Rolle und sind bei der Regulation der Anzahl der Aktionspotentiale von Bedeutung (Coetzee et al., 1999; Johnston et al., 2010). Die Kv1-Kanäle fungieren dabei als sogenannte high-pass filter, die es nur großen, schnellen Spannungsänderungen erlauben ein Aktionspotential zu triggern (Johnston et al., 2010). Die Kaliumkanäle Kv2 und Kv3 gehören zu den high-voltage activated Kanälen und öffnen bei Spannungen, die nur während eines ablaufenden Aktionspotentials erreicht werden. Sie sind inmitten eines Aktionspotentials aktiv. Besonders die Kaliumkanalfamilie Kv3 zeichnet sich durch eine schnelle Kinetik aus. Die Kaliumkanäle dieser Familie wirken bei der Dauer eines Aktionspotentials mit und ermöglichen hohe Feuerungsraten (Espinosa et al., 2008; Johnston et al., 2010).

Die Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv3.1b wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem an Neuronen gefunden, die gleichzeitig von PN umgeben sind und sich innerhalb des eigentlichen Oculomotoriuskerns befinden. Das lässt darauf schließen, dass es sich bei diesen Neuronen, um Neurone mit hoher Feuerungsrate handelt, deren Aktionspotentiale schnell depolarisieren und auch schnell repolarisieren. Diese Vermutung passt zu Beobachtungen einer Studie von Härtig et al. (1999), in der die Arbeitsgruppe das gleichzeitige Vorhandensein von PN, dem Calcium-bindenden Protein Parvalbumin und dem Kaliumkanal Kv3.1b bei Neuronen im Neocortex und

im Hippocampus an Affen und Ratten zeigte und vermutete, dass die PN als schnelle, lokale Puffer für Kationen bei diesen schnell feuерnden Neuronen dienen (Härtig et al., 1999).

In den Immunfluoreszenzfärbungen der vorliegenden Studie zeigten die MIF-Motoneurone keine Immunreaktivität auf Kv1.1 und Kv3.1b, während bei den SIF-Motoneuronen eine Immunreaktivität auf beide Kaliumkanäle festgestellt werden konnte.

In den Immunperoxidasefärbungen konnten bei den SIF-Motoneuronen sowohl der Kaliumkanal Kv1.1 als auch der Kaliumkanal Kv3.1b gefunden werden. Die MIF-Motoneuronen zeigten in den Immunperoxidasefärbungen, wie in den Immunfluoreszenzfärbungen, keine Immunreaktivität auf Kv3.1b, allerdings konnte bei den MIF-Motoneuronen in den Immunperoxidasefärbungen eine schwache Immunreaktivität auf Kv1.1 festgestellt werden. In einer erst kürzlich publizierten Studie zu Ionenkanälen an MIF- und SIF-Motoneuronen im Ncl. abducens und Ncl. trochlearis wurden ähnliche Ergebnisse gezeigt (Mayadali et al., 2021). Auch hier war das Signal für die Kv1.1-Immunreaktivität in der Immunperoxidase-Färbung stärker als in der Immunfluoreszenz. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden Methoden könnten damit erklärt werden, dass die Immunperoxidase-Färbung im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Färbung eine sensitivere Methode ist, da durch die Kombination Primärantikörper, biotinylierter Sekundärantikörper und Extravidin-Peroxidase mehr Peroxidase-Moleküle pro Antigen zur Nachweisreaktion zur Verfügung stehen als Nachweismoleküle pro Antigen bei der Immunfluoreszenz-Methode und das Signal im Hellfeld somit verstärkt ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Methoden könnten darüber hinaus auch damit erklärt werden, dass die Fluoreszenzfärbungen an Schnitten einer Dicke von 40 µm durchgeführt wurden, während die Paraffinschnitte für die Immunperoxidase-Färbungen mit einer Dicke von 5 µm bzw. 7 µm wesentlich dünner waren. Der relativ starke Hintergrund bei den dickeren Schnitten mit Fluoreszenzfärbung erschwert eine klare Abgrenzung zu schwächeren Signalen und gibt so ein ungenaueres Bild als es die Immunperoxidase-Färbungen zeigten.

Die Befunde zu der unterschiedlichen Ausstattung der MIF- und SIF- Motoneurone mit PN und Kalium-Kanälen, wie sie auch für Ncl. trochlearis und Ncl. abducens vorliegen (Mayadali et al., 2021), legen unterschiedliche Feuerungseigenschaften nahe. Bisher gibt es nur eine Arbeit, die gezielt die Aktivität von MIF- und SIF-Motoneuronen untersucht hat (Hernández et al., 2019). Die Arbeitsgruppe untersuchte den Nucleus abducens der Katze und zeigte, dass sowohl MIF- als auch SIF-Motoneurone bei allen Arten von Augenbewegungen beteiligt sind. MIF- und SIF-Motoneurone konnten damit nicht dadurch unterschieden werden, dass sie prinzipiell

unterschiedlichen Augenbewegungen zugeteilt werden und die Daten der Arbeitsgruppe sprechen nicht dafür SIF- und MIF- Motoneurone nach den Kriterien „schnell“ oder „langsam“ bzw. „tonisch“ oder „phasisch“ zu trennen. Beide Motoneuronentypen zeigten ein grundsätzlich ähnliches Feuerungsmuster, das sowohl eine statische als auch eine dynamische Komponente enthält. Dennoch konnten signifikante physiologische Unterschiede zwischen SIF- und MIF-Motoneuronen festgestellt werden, die darauf schließen lassen, dass MIF- und SIF-Motoneurone unterschiedliche Funktionen erfüllen. Im Unterschied zu SIF-Motoneuronen konnte bei MIF-Motoneuronen eine insgesamt reduzierte Feuerungsrate festgestellt werden. MIF-Motoneurone zeigten auch eine deutlich niedrigere Rekrutierungsschwelle und wiesen in Bezug auf die Augenstellung und die Geschwindigkeit der Augenbewegung eine geringere Empfindlichkeit auf als die SIF-Motoneurone (Hernández et al., 2019). Diese Ergebnisse passen zu den Beobachtungen, die in diesem Projekt gemacht wurden, und sie scheinen gleichermaßen auf die MIF- und SIF-Motoneurone in allen Augenmuskelkernen zuzutreffen (Mayadali et al., 2021). Dass sowohl SIF- als auch MIF-Motoneurone die Kaliumkanäle Kv1.1 besitzen, deutet darauf hin, dass beide Neuronentypen ähnliche Feuerungseigenschaften haben und die Kanäle Kv1.1 prinzipiell für die relativ hohe Aktivität bei beiden Neuronentypen wichtig sind. Die besonders hohe Feuerungsrate bei den SIF-Motoneuronen spiegelt sich vermutlich in der Anwesenheit der Kaliumkanäle Kv3.1b wider, die bei den MIF-Motoneuronen nicht gefunden wurden. Die unterschiedliche Expression der Kaliumkanäle in MIF- und SIF-Motoneuronen und die Unterschiede in Ausstattung mit PN implizieren, dass die SIF- und die MIF-Motoneurone an den verschiedenen Augenbewegungen in unterschiedlichem Maß beteiligt sind. Dazu konnten kürzlich weitere Unterschiede zwischen MIF- und SIF-Motoneuronen des Ncl. trochlearis und Ncl. abducens gezeigt werden (Mayadali et al., 2021). So exprimierten die SIF-Motoneurone die Natrium-Kanal Untereinheit Nav 1.6, die in schnell feuерnden Neuronen immer zusammen mit Kv3.1b auftritt (Kodama et al., 2020), nicht aber die MIF-Motoneurone (Mayadali et al. 2021). Umgekehrt zeigten nur die MIF-Motoneurone im Ncl. trochlearis und Ncl. abducens Immunreakтивität für den bei niedrigen Spannungen aktivierten Calcium-Kanal Cav3.1, was bei den SIF-Motoneuronen nicht festgestellt wurde (Mayadali et al., 2021).

4.2 Sind die MIF-Motoneurone der extraokulären Muskeln mit γ -Motoneuronen des Rückenmarks vergleichbar?

Wie propriozeptive Informationen aus den EOM übermittelt werden ist bislang noch ungeklärt und ein viel diskutiertes Thema (Donaldson, 2000; Büttner-Ennever and Horn, 2002; Lienbacher and Horn, 2012). Als wahrscheinlicher propriozeptiver Rezeptor der Augenmuskeln werden die Palisadenendigungen betrachtet. Diese exklusiv in den EOM vorhandenen Nervenendigungen sind eng mit den multipel innervierten Fasern der globalen Schicht assoziiert. Mittels Tracerinjektionen konnte in früheren Studien nachgewiesen werden, dass sich die Zellkörper der Palisadenendigungen im Falle des MR mit großer Wahrscheinlichkeit in der Peripherie des eigentlichen Kerngebiets des Ncl. oculomotorius befinden. So haben sowohl die Palisadenendigungen als auch die *en grappe* Endigungen, die die multipel innervierten Fasern des MR innervieren, ihren Ursprung in der C-Gruppe des Oculomotoriuskerns (Lienbacher et al., 2011b; Lienbacher and Horn, 2012). Palisadenendigungen und die MIFs wurden schon von David A. Robinson als „umgekehrte Muskelspindel“ bezeichnet (Robinson, 1991). Die intrafusalen Muskelfasern der Muskelspindeln der Skelettmuskulatur werden von γ -Motoneuronen innerviert, die sich im Vorderhorn des Rückenmarks befinden (Sengul and Watson, 2012b). Fungieren die Palisadenendigungen in den EOM zusammen mit den MIFs der globalen Schicht als propriozeptiver Rezeptor, der mit den Muskelspindeln der Skelettmuskulatur vergleichbar ist, so legt das die Vermutung nahe, dass es sich bei den MIF-Motoneuronen der C-Gruppe um Neurone handelt, die den γ -Motoneuronen der Skelettmuskulatur entsprechen. Diese Hypothese wurde schon vor einiger Zeit aufgestellt (Labandeira Garcia et al., 1983). Einen Hinweis darauf, dass die MIF-Motoneurone den γ -Motoneuronen des Rückenmarks entsprechen könnten und die Palisadenendigungen zusammen mit dem MIFs als Muskelspindel funktionieren könnten, liefert auch eine Arbeit von Erichsen et al. (2014). Die Arbeitsgruppe zeigte am Affen, dass sich SIF- und MIF-Motoneurone des Ncl. oculomotorius in der Quantität ihrer synaptischen Kontakte (SIF-Motoneurone: ca. 23%; MIF-Motoneurone: ca. 11%) ebenso unterscheiden wie es schon in der Arbeit von Johnson (1986) für die α - Motoneurone (ca. 34%) und γ -Motoneurone (ca. 16%) im Rückenmark der Katze festgestellt wurde (Johnson, 1986; Erichsen et al., 2014).

Friese et al. (2009) zeigten, dass sich die Motoneurone des Rückenmarks der Maus durch ihre unterschiedliche Expression von Erry und NeuN differenzieren lassen. γ -Motoneurone sind Erry^{ON}/NeuN^{OFF}-Motoneurone. Sie besitzen den Rezeptor Erry, nicht aber das nukleäre Protein NeuN. α -Motoneurone dagegen sind Erry^{OFF}/NeuN^{ON}-Motoneurone (Friese et al., 2009). Darüber hinaus wurden von Friese et al. (2009) die α - und γ -Motoneurone des Rückenmarks auch über ihre vGlut1-Eingänge verglichen, unter der Annahme, dass nur die α -Motoneurone vGlut1-Eingänge von Ia-Afferenzen erhalten, nicht aber die γ -Motoneurone. Bezuglich der vGlut1-Eingänge findet sich keine Entsprechung für die MIF- und SIF-Motoneurone. Eine Studie von 2015 zeigte, dass MIF-Motoneurone einige vGlut1-Eingänge besitzen, SIF-Motoneurone dagegen keine (Zeeh et al., 2015). Ein ähnliches Ergebnis ergab eine Untersuchung der Motoneurone des Ncl. abducens und des Ncl. trochlearis (Mayadali et al., 2021).

Die Unterscheidung zwischen α - und γ -Motoneuronen des Rückenmarks mittels der Marker Erry und NeuN ließ sich in diesem Projekt auch erstmals beim Affen bestätigen. Die morphologisch kleineren cholinergen Neurone des Vorderhorns konnten nicht nur aufgrund ihrer Größe als potentielle γ -Motoneurone von den α -Motoneuronen unterschieden werden, sondern auch aufgrund ihres Färbeverhalten auf Erry und NeuN. Die Verwendung der Marker Erry oder NeuN erwiesen sich im Rückenmark als zuverlässige Marker für die Unterscheidung von α -Motoneuronen und γ -Motoneuronen. Auch im Ncl. trochlearis ließen sich SIF- und MIF-Motoneurone durch die Marker NeuN und Erry differenzieren. Bei den NeuN-negativen Neuronen handelte es sich um die MIF-Motoneurone, die sich in der dorsalen Kappe des Kerns befinden. Unter diesen cholinergen NeuN-negativen Motoneuronen konnten einige Erry-positive Neurone gefunden werden. Da Erry ein nuklearer Rezeptor ist, kann er nur an Neuronen gefunden werden, deren Kern im Gewebe angeschnitten ist. Der Umstand, dass nur einige MIF-Motoneurone Erry-positiv waren, könnte daran liegen, dass nur bei diesen Neuronen der Zellkern auf dem Schnitt zu sehen war. Für eine quantitativ genauere Überprüfung dieser Annahme müsste eine zusätzliche Färbung der Zellkerne gemacht werden. Diejenigen MIF-Motoneurone des Trochleariskerns, die Erry-positiv sind, sind mit den γ -Motoneuronen des Rückenmarks vergleichbar. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Erry-positiven/NeuN-negativen Neurone des Rückenmarks und die Erry-positiven/NeuN-negativen Neurone im Ncl. trochlearis ähnliche Funktionen erfüllen. Die MIF-Motoneurone könnten so, wie die γ -Motoneurone des Rückenmarks für die Erhöhung der Empfindlichkeit für dynamische Prozesse bei der EOM zuständig sein bzw. statische Messfunktionen erfüllen. Dieser Befund war im Ncl.

oculomotorius nicht so deutlich erkennbar, wo nur sehr wenige Erry-positive Neurone in der C-Gruppe gefunden werden konnten. Die Gesamtpopulation der Neurone der C-Gruppe ist allerdings eine insgesamt inhomogene Gruppe. Neben den Zellkörpern für Palisadenendigungen (Lienbacher et al., 2011b), lassen sich auch noch zwei unterschiedliche Populationen voneinander unterscheiden: eine Calretinin-positive und eine Calretinin-negative (Lienbacher et al., 2018). Möglicherweise handelt es sich bei den Erry-negativen cholinergen Neuronen ausschließlich um die Zellkörper der Palisadenendigungen, die prinzipiell auch in der dorsalen Kappe des Ncl. trochlearis vorhanden sein sollten (Lienbacher et al., 2011b; Zimmermann et al., 2011). Insgesamt liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise dafür, dass die MIF-Motoneurone molekulare Eigenschaften von γ -Motoneuronen der Skelettmuskulatur aufweisen, was besonders deutlich beim Ncl. trochlearis zu sehen war.

4.3 Schlussfolgerung

Vorliegende Arbeit weist Unterschiede zwischen MIF- und SIF-Motoneuronen bezüglich der spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv3.1b auf. Die unterschiedliche Expression der Kaliumkanäle in den Motoneuronen spiegelt Unterschiede in Feuerungseigenschaften bzw. in den Erregungsschwellen wider, wie sie 2019 von Hernández et al. gemacht wurden (Hernández et al., 2019). Kaliumkanäle sind neben der Erzeugung von Aktionspotentialen auch für die Dynamik, Persistenz und Anpassung der Feuerraten wichtig (Horn and Straka, 2021; Mayadali et al., 2021). Damit konnte gezeigt werden, dass sich unterschiedliche physiologische Eigenschaften der MIF- und SIF-Motoneurone im Profil der Ionen-Kanäle niederschlägt, das sich mit immunhistochemischen Methoden nachweisen lässt.

Obwohl MIF- und SIF-Motoneurone vermutlich an allen Augenbewegungen beteiligt sind, deuteten die Unterschiede in ihrer Lage, ihrer Morphologie und in ihren histochemischen Eigenschaften darauf hin, dass die verschiedenen Motoneurone in unterschiedlichem Ausmaß an den verschiedenen Augenbewegungen mitwirken. Aufgrund der physiologischen Daten muss man wohl aber die Motoneuronklassen als ein größeres Spektrum von Neuronen mit unterschiedlichen Erregungsschwellen auffassen, die während der Augenbewegungen unterschiedlich rekrutiert werden, wobei die MIF-Motoneurone nur ein Ende des Spektrums markieren.

5 Zusammenfassung

Die EOM zeichnen sich durch Schnelligkeit und hohe Präzision aus. Ihre motorische Innervation erfolgt über SIF-Motoneurone, die über *en plaque* Endigungen die einfach-innervierten schnell kontrahierenden (twitch) Muskelfasern (SIFs) innervieren und über MIF-Motoneurone, die über *en grappe* Endigungen die multipel-innervierten langsam kontrahierenden (non-twitch) Muskelfasern (MIFs) innervieren. SIF- und MIF-Motoneurone unterscheiden sich sowohl in ihrer Lokalisation innerhalb der Hirnnervenkerne als auch in ihrer Morphologie (Büttner-Ennever, 2006) und in ihren histochemischen Eigenschaften (Eberhorn et al., 2005a). Man ging bisher davon aus, dass SIFs eher für die Generation von schnellen Bulbusbewegungen zuständig sind, und damit den α -Motoneuronen des Rückenmarks entsprechen. Für MIF-Motoneurone wurde unter anderem angenommen, dass sie vor allem für die Blickhaltung und für die Feinjustierung zuständig sind (Büttner-Ennever and Horn, 2002).

Zur weiteren Aufklärung der Eigenschaften und der Funktion der MIF-Motoneurone im Vergleich zu den SIF-Motoneuronen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die MIF- und SIF-Motoneurone gleichermaßen die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle Kv1.1 und Kv3.1b enthalten, was unterschiedliches Feuerungsverhalten von MIF- und SIF-Neuronen nahelegen würde. Zu diesem Zweck wurden an frei schwimmenden Gefrierschnitten von Rhesusaffen retrograd markierte MIF- und SIF-Motoneurone auf die Anwesenheit von Kv1.1 und Kv3.1b untersucht. Die Schnitte wurden dazu nach Mehrfachimmunfluoreszenzfärbungen auf CTB, ChAT, ACAN und Kv1.1 oder Kv3.1b analysiert. Außerdem wurden an Paraffinschnitten Immunperoxidasefärbungen auf die Marker ChAT, Kv1.1, Kv3.1b und ACAN durchgeführt.

Da es sich bei Motoneuronen um cholinerge Neurone handelt, lässt sich die Gesamtpopulation der Motoneurone mit einer Färbung auf das Enzym ChAT sichtbar machen. Färbungen auf ACAN-positive perineuronale Netze und die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv3.1b zeigten, dass die SIF-Motoneurone des Oculomotoriuskerns sowohl von ACAN-positiven perineuronalen Netzen umgeben sind als auch die Kaliumkanäle Kv1.1 und Kv3.1b besitzen. Die MIF-Motoneurone dagegen sind nicht von PN umgeben und besitzen die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv1.1 in deutlich geringerer Zahl. Der Kaliumkanal Kv3.1b war bei den MIF-Motoneuronen nicht nachweisbar. Dies unterstützt die neuesten Untersuchungen (Hernández et al., 2019), die mit der Annahme einhergehen, dass MIF- und SIF-Motoneurone zwar grundsätzlich an allen Augenbewegungen beteiligt sind und ein

ähnliches Feuerverhalten aufweisen, die SIF-Motoneurone aber mit höheren Frequenzen feuern, was durch ihre selektive Kv3.1b-Immunreaktivität unterstützt wird. Vermutlich beteiligen sich MIF- und SIF-Motoneurone mit den von ihnen innervierten Muskelfasern in unterschiedlichem Maß an den unterschiedlichen Augenbewegungen.

Die enge Verbindung der MIF-Motoneurone zu den Palisadenendigungen der EOM (Eberhorn et al., 2005b; Lienbacher, 2012) führte zu der Annahme, dass diese zusammen als propriozeptiver Rezeptor, der den Muskelspindeln der Skelettmuskulatur entspricht, fungieren könnten (Lienbacher and Horn, 2012). Die MIF-Motoneurone wären dann mit den γ -Motoneuronen, die die intrafusalen Muskelfasern der Muskelspindeln der Skelettmuskulatur innervieren, zu vergleichen, während die SIF-Motoneurone den α -Motoneuronen entsprächen. Um der Hypothese nachzugehen, dass die SIF- und MIF-Motoneurone mit α - und γ -Motoneuronen zu vergleichen sind, wurden in der vorliegenden Arbeit beim Rhesusaffen zunächst an Rückenmarksschnitten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen auf cholinerge Marker (ChAT) kombiniert mit Färbungen auf den Rezeptor Erry oder das neuronenspezifische nukleäre Protein NeuN durchgeführt und mit den Ergebnissen, die von Friese et al. an Rückenmarksschnitten der Maus gemacht wurden (Friese et al., 2009), verglichen. Die Färbungen auf NeuN und Erry ermöglichten eine Unterscheidung von α - und γ -Motoneuronen in Rückenmark. α -Motoneurone sind NeuN-positiv/Erry-negativ während γ -Motoneurone NeuN-negativ/Erry-positiv sind. Nach Etablierung der Methode wurden dann entsprechende Immunfluoreszenzfärbungen am Ncl. trochlearis und am Ncl. oculomotorius bei Rhesusaffen durchgeführt. Die Färbungen des Ncl. trochlearis zeigten, dass die SIF-Motoneurone NeuN-positiv waren, während die MIF-Motoneurone keine Immunreaktion auf NeuN zeigten. Bei den MIF-Motoneuronen, die sich in der dorsalen Kappe des Kerns befinden, konnte dagegen eine Immunreaktion auf Erry festgestellt werden. Bei der Färbung der Motoneurone der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius auf Erry zeigten sich keine so klaren Ergebnisse. Anhand der erzielten Befunde, die zumindest im Ncl. trochlearis ähnliche Unterschiede zwischen MIF- und SIF-Motoneuronen aufwiesen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass MIF-Motoneurone ähnliche Eigenschaften wie γ -Motoneurone aufweisen.

6 Literatur

- Akagi Y. 1978. The localization of the motor neurons innervating the extraocular muscles in the oculomotor nuclei of the cat and rabbit, using horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181:745–761.
- Baker R, Highstein SM. 1975. Physiological identification of interneurons and motoneurons in the abducens nucleus. *Brain Res* 91:292–298.
- Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N. 2015. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins (Basel)* 7:974–996.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR. 2000. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80:1267–1290.
- Barker D. 1974. The morphology of muscle receptors. In: Barker D, Hunt CC, McIntyre AK, (Editors). *Muscle Receptors. Handbook of Sensory Physiology*. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 1–190.
- Bean BP. 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8:451–465.
- Blumer R, Maurer-Gesek B, Gesslbauer B, Blumer M, Pechriggl E, Davis-López de Carrizosa MA, Horn AK, May PJ, Streicher J, La Cruz RR de, Pastor ÁM. 2016. Palisade endings are a constant feature in the extraocular muscles of frontal-eyed, but not lateral-eyed, animals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:320–331.
- Bocksteins E, van de Vijver G, van Bogaert P-P, Snyders DJ. 2012. Kv3 channels contribute to the delayed rectifier current in small cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 303:C406-415.
- Boenisch T, (Editor). 2006. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. 3rd Edition. Carpinteria, CA, Hamburg: Dako.
- Boyd IA. 1980. The isolated mammalian muscle spindle. *Trends Neurosci* 3:258–265.
- Brookes SJH. 2001. Retrograde tracing of enteric neuronal pathways. *Neurogastroenterol Motil* 13:1–18.

- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A. 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8:183–200.
- Brückner G, Szeöke S, Pavlica S, Grosche J, Kacza J. 2006. Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience* 138:365–375.
- Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ, Sattelle DB. 2005. Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci* 26:361–367.
- Burke RE, Strick PL, Kanda K, Kim CC, Walmsley B. 1977. Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J Neurophysiol* 40:667–680.
- Buttner-Ennever JA, Horn AKE, Graf W, Ugolini G. 2002. Modern concepts of brainstem anatomy: from extraocular motoneurons to proprioceptive pathways. *Ann N Y Acad Sci* 956:75–84.
- Büttner-Ennever JA. 2006. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. *Prog Brain Res* 151:95–125.
- Büttner-Ennever JA, Akert K. 1981. Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. *J Comp Neurol* 197:17–27.
- Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2002. The neuroanatomical basis of oculomotor disorders: the dual motor control of extraocular muscles and its possible role in proprioception. *Curr Opin Neurol* 15:35–43.
- Büttner-Ennever JA, Horn AKE, Scherberger H, D'Ascanio P. 2001. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. *J Comp Neurol* 438:318–335.
- Carlson SS, Hockfield S. 1996. Central nervous system. In: Comper WD, (Editor). *Extracellular matrix: Tissue function*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 1–23.
- Chiarandini DJ, Stefani E. 1979. Electrophysiological identification of two types of fibres in rat extraocular muscles. *J Physiol* 290:453–465.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Miera EV-S de, Rudy B. 1999. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:233–285.

- Davidowitz J, Rubinson K, Jacoby J, Philips G. 1996. Myofibril size variation along the length of extraocular muscle in rabbit and rat. I: orbital layer. *Tissue Cell* 28:63–76.
- Day CA, Kenworthy AK. 2015. Functions of cholera toxin B-subunit as a raft cross-linker. *Essays Biochem* 57:135–145.
- Donaldson IM. 2000. The functions of the proprioceptors of the eye muscles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:1685–1754.
- Drenckhahn D, Rager G, Funk R. 2004. Visuelles System. In: Drenckhahn D, (Editor). Benninghoff. Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 16., völlig neu bearbeitete Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer, p. 650–705.
- Eberhorn AC, Ardeleanu P, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2005a. Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *J Comp Neurol* 491:352–366.
- Eberhorn AC, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2006. Identification of motoneurons supplying multiply- or singly-innervated extraocular muscle fibers in the rat. *Neuroscience* 137:891–903.
- Eberhorn AC, Horn AKE, Eberhorn N, Fischer P, Boergen K-P, Büttner-Ennever JA. 2005b. Palisade endings in extraocular eye muscles revealed by SNAP-25 immunoreactivity. *J Anat* 206:307–315.
- Ellaway PH, Taylor A, Durbaba R. 2015. Muscle spindle and fusimotor activity in locomotion. *J Anat* 227:157–166.
- Erichsen JT, Wright NF, May PJ. 2014. Morphology and ultrastructure of medial rectus subgroup motoneurons in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 522:626–641.
- Espinosa F, Torres-Vega MA, Marks GA, Joho RH. 2008. Ablation of Kv3.1 and Kv3.3 potassium channels disrupts thalamocortical oscillations in vitro and in vivo. *J Neurosci* 28:5570–5581.
- Evinger C, Graf WM, Baker R. 1987. Extra- and intracellular HRP analysis of the organization of extraocular motoneurons and internuclear neurons in the guinea pig and rabbit. *J Comp Neurol* 262:429–445.

- Eysel U. 2018. Sehsystem und Augenbewegungen. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, (Editors). Physiologie. 8th Edition. Stuttgart: Thieme, p. 770–803.
- Favuzzi E, Marques-Smith A, Deogracias R, Winterflood CM, Sánchez-Aguilera A, Mantoan L, Maeso P, Fernandes C, Ewers H, Rico B. 2017. Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95:639–655.e10.
- Fernand VS, Hess A. 1969. The occurrence, structure and innervation of slow and twitch muscle fibres in the tensor tympani and stapedius of the cat. *J Physiol* 200:547–554.
- Friese A, Kaltschmidt JA, Ladle DR, Sigrist M, Jessell TM, Arber S. 2009. Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor Err3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13588–13593.
- Gamlin PD, Reiner A. 1991. The Edinger-Westphal nucleus: sources of input influencing accommodation, pupilloconstriction, and choroidal blood flow. *J Comp Neurol* 306:425–438.
- Giamanco KA, Matthews RT. 2012. Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. *Neuroscience* 218:367–384.
- Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. 2010. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* 170:1314–1327.
- Glicksman MA. 1980. Localization of motoneurons controlling the extraocular muscles of the rat. *Brain Res* 188:53–62.
- Härtig W, Brauer K, Bigl V, Brückner G. 1994. Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Res* 635:307–311.
- Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mäder M, Reichenbach A, Brückner G. 1999. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res* 842:15–29.
- Hernández R, Calvo PM, Blumer R, La Cruz RR de, Pastor AM. 2019. Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:3837–3846.

Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Horn AK, Eberhorn A, Härtig W, Ardeleanu P, Messoudi A, Büttner-Ennever JA. 2008. Periocolomotor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol* 507:1317–1335.

Horn AKE, Brückner G, Härtig W, Messoudi A. 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* 455:341–352.

Horn AKE, Horng A, Buresch N, Messoudi A, Härtig W. 2018. Identification of functional cell groups in the abducens nucleus of monkey and human by perineuronal nets and choline acetyltransferase immunolabeling. *Front Neuroanat* 12:45.

Horn AKE, Straka H. 2021. Functional Organization of Extraocular Motoneurons and Eye Muscles. *Annual review of vision science* 7:793–825.

Ichikawa T, Shimizu T. 1998. Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey. *Brain Res* 779:96–103.

Jacoby J, Chiarandini DJ, Stefani E. 1989. Electrical properties and innervation of fibers in the orbital layer of rat extraocular muscles. *J Neurophysiol* 61:116–125.

Jami L. 1992. Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol Rev* 72:623–666.

Johnson IP. 1986. A quantitative ultrastructural comparison of alpha and gamma motoneurons in the thoracic region of the spinal cord of the adult cat. *J Anat* 147:55–72.

Johnston J, Forsythe ID, Kopp-Scheinplug C. 2010. Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J Physiol* 588:3187–3200.

Kato T. 1938. Über histologische Untersuchungen der Augenmuskeln von Menschen und Säugetieren. *Okajimas Folia Anat Jpn* 16:131–145.

Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. 2009. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* 284:31052–31061.

Köbbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. 2000. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327–351.

- Kodama T, Gittis AH, Shin M, Kelleher K, Kolkman KE, McElvain L, Lam M, Du Lac S. 2020. Graded Coexpression of Ion Channel, Neurofilament, and Synaptic Genes in Fast-Spiking Vestibular Nucleus Neurons. *J Neurosci* 40:496–508.
- Labandeira Garcia JL, Gomez Segade LA, Suarez Nuñez JM. 1983. Localisation of motoneurons supplying the extra-ocular muscles of the rat using horseradish peroxidase and fluorescent double labelling. *J Anat* 137:247–261.
- Lienbacher K. 2012. The source of innervation and function of palisade endings in the extraocular muscles of *Macaca mulatta*. Dissertation. München.
- Lienbacher K, Horn AKE. 2012. Palisade endings and proprioception in extraocular muscles: a comparison with skeletal muscles. *Biol Cybern* 106:643–655.
- Lienbacher K, Mustari M, Hess B, Büttner-Ennever J, Horn AKE. 2011a. Is there any sense in the Palisade endings of eye muscles? *Ann N Y Acad Sci* 1233:1–7.
- Lienbacher K, Mustari M, Ying HS, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2011b. Do palisade endings in extraocular muscles arise from neurons in the motor nuclei? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:2510–2519.
- Lienbacher K, Ono S, Fleuriet J, Mustari M, Horn AKE. 2018. A subset of palisade endings only in the medial and inferior rectus muscle in monkey contain calretinin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:2944–2954.
- Lorke DE, Süsens U, Borgmeyer U, Hermans-Borgmeyer I. 2000. Differential expression of the estrogen receptor-related receptor γ in the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 77:277–280.
- Maier A, DeSantis M, Eldred E. 1974. The occurrence of muscle spindles in extraocular muscles of various vertebrates. *J Morphol* 143:397–408.
- May PJ, Baker RG, Chen B. 2002. The eyelid levator muscle: servant of two masters. *Mov Disord* 17:S4–S7.
- Mayadali ÜS, Fleuriet J, Mustari M, Straka H, Horn AKE. 2021. Transmitter and ion channel profiles of neurons in the primate abducens and trochlear nuclei. *Brain structure & function* 226:2125–2151.
- Morgan DL, Proske U. 1984. Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties. *Physiol Rev* 64:103–169.

- Morita-Isogai Y, Sato H, Saito M, Kuramoto E, Yin DX, Kaneko T, Yamashiro T, Takada K, Oh SB, Toyoda H, Kang Y. 2017. A distinct functional distribution of α and γ motoneurons in the rat trigeminal motor nucleus. *Brain Struct Funct* 222:3231–3239.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201–211.
- Pachter BR. 1984. Rat extraocular muscle. 3. Histochemical variability along the length of multiply-innervated fibers of the orbital surface layer. *Histochemistry* 80:535–538.
- Périé S, St Guily JL, Callard P, Sebille A. 1997. Innervation of adult human laryngeal muscle fibers. *J Neurol Sci* 149:81–86.
- Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. 1995. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. *Surv Ophthalmol* 39:451–484.
- Robinson DA. 1991. Overview. In: Carpenter RHS, (Editor). *Eye movements*: Vol. XIII. London: Macmillan, p. 320–331.
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91:1447–1531.
- Sengul G, Watson C. 2012a. Spinal Cord: Connections. In: Paxinos G, Mai JK, (Editors). *The Human Nervous System*. 3rd Edition. Amsterdam [u. a.]: Elsevier Academic Press, p. 233–258.
- Sengul G, Watson C. 2012b. Spinal Cord: Regional Anatomy, Cytoarchitecture and Chemoarchitecture. In: Paxinos G, Mai JK, (Editors). *The Human Nervous System*. 3rd Edition. Amsterdam [u. a.]: Elsevier Academic Press, p. 186–232.
- Sharpe J, Wong AM. 2005. Anatomy and Physiology of Ocular Motor Systems. In: Miller NR, Newman NJ, Bioussse V, Kerrison JB, (Editors). *Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology*. Volume One. 6th Edition. Philadelphia u.a.: Lippincott Williams & Wilkins, p. 809–885.
- Spencer RF, Porter JD. 1988. Structural organization of the extraocular muscles. *Rev Oculomot Res* 2:33–79.
- Spencer RF, Porter JD. 2006. Biological organization of the extraocular muscles. *Prog Brain Res* 151:43–80.
- Sun W, May PJ. 1993. Organization of the extraocular and preganglionic motoneurons supplying the orbit in the lesser Galago. *Anat Rec* 237:89–103.

- Tang X, Büttner-Ennever JA, Mustari MJ, Horn AKE. 2015. Internal organization of medial rectus and inferior rectus muscle neurons in the C group of the oculomotor nucleus in monkey. *J Comp Neurol* 523:1809–1823.
- Taylor A, Durbaba R, Ellaway PH, Rawlinson S. 2000. Patterns of fusimotor activity during locomotion in the decerebrate cat deduced from recordings from hindlimb muscle spindles [published correction appears in *J. Physiol.* 2000 Mar 15;523 Pt 3:829]. *J Physiol* 522:515–532.
- Thömke F. 2008. Augenbewegungsstörungen: Ein klinischer Leitfaden für Neurologen. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme. 358 p.
- Zeeh C, Mustari MJ, Hess BJ, Horn AKE. 2015. Transmitter inputs to different motoneuron subgroups in the oculomotor and trochlear nucleus in monkey. *Front Neuroanat* 9:95.
- Zimmermann L, May PJ, Pastor AM, Streicher J, Blumer R. 2011. Evidence that the extraocular motor nuclei innervate monkey palisade endings. *Neurosci Lett* 489:89–93.

Eidesstattliche Versicherung

Seidler, Mirjam Susanna

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Molekulare Eigenschaften von twitch und non-twitch Motoneuronen im Nucleus oculomotorius des Rhesusaffen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Erdweg, 26.04.2022

Mirjam Seidler

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin