

Aus dem
Lehrstuhl für Vegetative Anatomie, Anatomische Anstalt
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Jens Waschke

Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Menschen und deren Tau-Pathologie in unterschiedlichen Stadien bei Fällen mit progressiver supranukleärer Parese (PSP)

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

vorgelegt von
Anja Maria McMillan

aus
Dachau

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jochen Herms
Prof. Dr. Stylianos Michalakis

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 1 -
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	- 3 -
Abkürzungsverzeichnis	- 5 -
1 Einleitung	- 7 -
1.1 Die progressive supranukleäre Parese „PSP“	- 7 -
1.1.1 Prävalenz und Erscheinungsformen	- 7 -
1.1.2 PSP – eine neurodegenerative Erkrankung aus der Gruppe der Tauopathien	- 9 -
1.2 Okulomotorische und neuroanatomische Grundlagen	- 11 -
1.2.1 Augenmuskeln	- 11 -
1.2.2 Augenbewegungstypen	- 12 -
1.2.3 Der vestibulo-okuläre Reflex VOR	- 15 -
1.2.4 Der Vestibulariskern-Komplex	- 18 -
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	- 20 -
2 Material und Methoden	- 22 -
2.1 Gewebe	- 22 -
2.1.1 Hirngewebe von Rhesusaffen mit Tracer-Injektionen	- 22 -
2.1.2 Hirngewebe von humanen Kontrollen und PSP-Fällen	- 23 -
2.2 Färbungen	- 26 -
2.2.1 Übersichtsfärbung Luxol-Fast-Blue	- 26 -
2.2.2 Immunhistochemie	- 27 -
2.2.3 Immunperoxidase-Färbung zum Nachweis von nicht-phosphoryliertem Neurofilament (NP-NF)	- 28 -
2.2.4 Färbung (AT-8) zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau-Protein	- 29 -
2.3 Auswertung	- 30 -
3 Ergebnisse	- 33 -
3.1 Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Affengewebe	- 33 -
3.1.1 Topographie und Histologie der Vestibulariskerne beim Affen	- 33 -
3.1.2 Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Affen: retrograde Markierung im Vestibulariskomplex	- 36 -

3.1.3	Histologische Charakterisierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Affen	- 40 -
3.2	Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Vestibulariskerngebiet des Menschen.....	- 42 -
3.2.1	Topographie und Histologie der Vestibulariskerne beim Menschen	- 42 -
3.2.2	Histologische Charakterisierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Menschen	- 46 -
3.3	Klinische Übertragung: Anteil degenerierter sekundärer vestibulo-okulärer Neurone im Vestibulariskerngebiet in unterschiedlichen Erkrankungsstadien der progressiven supranukleären Parese (PSP)	- 50 -
3.3.1	Anteil AT-8-positiver sekundärer vestibulo-okulärer Neurone gesamt.....	- 51 -
3.3.2	Anteil AT-8-positiver sekundärer vestibulo-okulärer Neurone in den einzelnen vestibulären Kerngebieten des vertikalen VOR	- 55 -
4	Diskussion	- 62 -
4.1	Identifizierung sekundärer vestibulo-okulärer Neurone im Affen ..	- 62 -
4.1.1	Tract-tracing	- 62 -
4.1.2	Färbung gegen NP-NF als Marker für sekundäre vestibulo-okuläre Neurone im Affengewebe.....	- 66 -
4.2	Identifizierung sekundärer vestibulo-okulärer Neurone in humanem Gewebe	- 66 -
4.2.1	Zytoarchitektur der Vestibulariskerne beim Menschen	- 66 -
4.2.2	NP-NF als Identifizierungshilfe für sekundäre vestibulo-okuläre Neurone in humanem Gewebe	- 66 -
4.3	Klinische Übertragung.....	- 68 -
4.3.1	Humanes Gewebe: PSP-Fälle	- 69 -
4.3.2	Färbung auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) in PSP-Gewebe	- 70 -
4.3.3	Färbung auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8).....	- 72 -
4.4	Ausbreitungswege der Tau-Pathologie	- 77 -
5	Zusammenfassung.....	- 81 -
	Literaturverzeichnis	- 83 -
	Anhang.....	- 97 -
	Affidavit.....	- 106 -
	Danksagung.....	- 107 -

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Neuropathologische Kriterien der PSP (Richardson-Syndrom).....	10 -
Abb. 2: Augenbewegungstypen, prämotorische Bahnen	14 -
Abb. 3: Okulomotorischer Befund bei PSP-RS.....	15 -
Abb. 4: Vestibulo-okulomotorische Projektionen.....	17 -
Abb. 5: Arbeitsbildschirm mit dem Mirax-Viewer.....	32 -
Abb. 6: Übersichtsschnitte durch das VN-Gebiet, Makake.....	35 -
Abb. 7: Injektionsstelle des Tracers in NIII sowie TMB-Färbung	36 -
Abb. 8: Injektionsstelle des Tracers in NVI sowie DAB-Färbung.....	38 -
Abb. 9: Tracer-markierte Neurone im VN-Gebiet des Makaken.....	39 -
Abb.10: Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf Tracer und NP-NF.....	41 -
Abb. 11: Transversalschnitte (NP-NF) durch das VN-Gebiet von Affe und Mensch	42 -
Abb. 12: Übersichtsschnitte (LFB) durch das VN-Gebiet des Menschen.....	45 -
Abb. 13: NP-NF-positive Neurone im menschlichen VN-Gebiet.....	47 -
Abb. 14: Transversalschnitt durch das SV-Gebiet (Mensch, NP-NF).....	48 -
Abb. 15: Transversalschnitt durch das MV-Gebiet (Mensch, NP-NF).....	49 -
Abb. 16: Transversalschnitt auf Höhe der Oliva superior (Mensch, AT-8)....	52 -
Abb. 17: Tau-Pathologie im untersuchten Vestibulariskerngebiet.....	54 -
Abb. 18: Detailausschnitte des SV- und MVm-Gebiets (AT-8 und NP-NF)..	56 -
Abb. 19: Anteil AT-8 positiver sekundärer vestibulo-okulärer Neurone im SV und MV-Gebiet (Einzelschnitte).....	58 -
Abb. 20: Anteil AT-8-positiver sekundärer vestibulo-okulärer Neurone im SV- und MV-Gebiet (gemittelt).....	59 -
Abb. 21: Verteilung des Tau-Anteils in unterschiedlichen Erkrankungsstadien.....	61 -

Abb. 22a: Verbindungsschema der sekundären Vestibularisneurone bei Aktivierung des hinteren Bogengangs.....	- 74 -
Abb. 22b: Verbindungsschema der sekundären Vestibularisneurone bei Aktivierung des vorderen Bogengangs.....	- 75 -
Tab. 1: Funktion und Innervation der extraokulären Muskeln.....	- 12 -
Tab. 2: Auflistung der Pathologien der eingeschlossenen PSP-Fälle.....	- 24 -
Tab. 3: Übersicht über den Schweregrad der PSP-assoziierten Symptome der eingeschlossenen PSP-Fälle.....	- 25 -
Tab. 4: Stadienzuteilung der eingeschlossenen PSP-Fälle.....	- 26 -

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AT-8	Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau-Protein
ATD	aufsteigender Deiters-Trakt
AVOR	angulärer Vestibulo-okulärer-Reflex
CT	Choleratoxin
CTB	Choleratoxin, Untereinheit B
CVTT	zentraler ventraler tegmentaler Trakt
DPGi	Nucleus dorsalis paragigantocellularis
DV	Deszendierender Vestibulariskern
INT8	interstitieller Nucleus des 8. Hirnnerven
LFB	Luxol-Fast-Blue
LV	Lateraler Vestibulariskern
MCP	Medialer Kleinhirnstiel
MLF	Fasciculus longitudinalis medialis
Mot5	motorischer Trigeminskern
MV	Medialer Vestibulariskern
MVc	Medialer Vestibulariskern, caudaler Anteil
MVm	Medialer Vestibulariskern, magnozellularer Anteil
MVp	Medialer Vestibulariskern, parvozellulärer Anteil
NP-NF	nicht-phosphoryliertes Neurofilament
n5	Nervus trigeminus
n7	Nervus facialis
n8	Nervus vestibulocochlearis
NIII	Nucleus oculomotorius

NIV	Nucleus trochlearis
NVI	Nucleus abducens
OKN	optokinetischer Reflex
PrH	Nucleus präpositus hypoglossi
PSP	progressive supranukleäre Parese
SCP	Oberer Kleinhirnstiel
SV	Superiorer Vestibulariskern
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TVOR	translationaler vestibulo-okulärer-Reflex
vLV	Lateraler Vestibulariskern, ventraler Anteil
VN	Vestibuläre Nuclei
VOC	vestibulo-okulo-kollische Neurone
VOR	vestibulo-okulärer Reflex
WGA	Weizenkeimagglutinin
WGA-HRP	Weizenkeimagglutinin gekoppelt an Meerrettichperoxidase

1 Einleitung

1.1 Die progressive supranukleäre Parese „PSP“

1.1.1 Prävalenz und Erscheinungsformen

Die bereits 1964 beschriebene neurodegenerative Erkrankung progressive supranukleäre Parese (PSP) wird dem Formenkreis der atypischen Parkinsonsyndrome zugerechnet und tritt mit einer Prävalenz von bis zu 10/100000 in Erscheinung (Steele et al., 1964; Coyle-Gilchrist et al., 2016; Levin et al., 2016; Schrag et al., 1999). Die Klinik der PSP zeichnet sich durch sehr heterogene Symptomenmuster aus (Respondek et al., 2014; Respondek und Höglinger 2016; Höglinger et al., 2017). Für die ursprünglich von Steele, Richardson und Olszewski als PSP beschriebene Symptomenkonstellation wird inzwischen meist die Bezeichnung „PSP-RS“, beziehungsweise „Richardson-Syndrom“ verwendet (Williams et al., 2005). Gemäß der Benennung „progressive supranukleäre Parese“ ist diese klassische Form der PSP klinisch durch eine fortschreitende Bewegungsstörung der Augen sowie von posturaler Instabilität, axialer Rigidität, Frontalhirn-betonten Verhaltensänderungen sowie Dysphagie und Dysarthrie gekennzeichnet (Litvan, 96; Dickson, 2010; Höglinger et al., 2017). Bei anderen Formen der PSP prägen oftmals weniger die Augenmotilitätsstörungen als zum Beispiel ein hypokinetisch-rigides Syndrom („PSP-P“) beziehungsweise ein Freezing beim Gehen („PSP-PGF“) oder auch eine Sprachstörung („PSP-SL“) das klinische Erscheinungsbild (Williams et al., 2007; Respondek et al., 2014; Levin et al., 2016).

Die okulomotorischen Symptome des Richardson-Syndroms umfassen zunächst verlangsamte vertikale Sakkaden, die sich im Verlauf der Erkrankung zu einer vertikalen Blickparese entwickeln. Während sich die willkürlichen Augenbewegungen nach oben und unten zunehmend verschlechtern, scheinen reflexhafte Augenbewegungen, wie zum Beispiel der vestibulo-okuläre Reflex (VOR), in dieselbe Richtung lange verschont zu bleiben (Das und Leigh, 2000). In der Endphase der Erkrankung liegt häufig eine komplette Ophthalmoplegie vor.

Die vor allem anfänglich dezente okulomotorische Störung ist meist nicht das Symptom, welches den Patienten einen Arzt aufsuchen lässt. Für den Patienten und seine Umgebung sind es vielmehr die unerklärlichen, gehäuften Stürze, die oft als „baumartiges“ nach hinten fallen beschrieben werden, die letztlich zur Vorstellung in einer neurologischen Ambulanz führen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es im Regelfall zu einer zunehmenden Einschränkung der Augenmotorik, des Weiteren zu einem stammnahen, meist symmetrisch hypokinetisch-rigidem Syndrom, psychischen Veränderungen wie z.B. der Reduktion des abstrakten Denkens, Apathie und Depression sowie zu Dysarthrie und Dysphagie. Die Dysphagie, die zu Aspirationspneumonien führen kann, ist im Wesentlichen für die eingeschränkte Lebenserwartung der PSP-Patienten verantwortlich. Die mediane Überlebenszeit bei PSP beträgt zwischen sechs und neun Jahre (Coyle-Gilchrist et al., 2016; Respondek et al., 2014). Bis heute steht weder eine kausale noch eine befriedigende symptomatische Therapie zur Verfügung (Lamb et al., 2016; Bluett et al., 2021).

Die Diagnose einer PSP gestaltet sich oftmals, gerade zu Beginn der Erkrankung und im Hinblick auf die atypischen PSP-Formen, schwierig (Höglinger et al., 2017). Gemäß den Kriterien des National Institute for Neurological Disorders and Stroke und der Society for PSP (NINDS-SPSP) kann man im klinischen Kontext bei Vorliegen einer supranukleären Blickparese oder der Kombination von Haltungsinstabilität, gehäuften Stürzen und verlangsamten vertikalen Sakkaden von „möglicher-“, bei Vorliegen von posturaler Instabilität mit gehäuften Stürzen in Zusammenhang mit einer supranukleären vertikalen Blickparese von einer „wahrscheinlichen PSP“ sprechen (Litvan et al., 1996). Um eine frühzeitigere Erstdiagnose zu ermöglichen und um dem großen klinischen Spektrum der PSP-Formen gerecht zu werden, wurde dieses diagnostische Werkzeug kürzlich um die Kriterien der „International Parkinson Disease and Movement Disorder Society PSP study group“ erweitert, woraus sich u.a. eine Einteilung in neuropathologisch *gesicherte PSP*, *wahrscheinliche PSP*, *mögliche PSP* sowie eine vierte Einteilungsstufe „*suggestive of PSP*“ ergibt, unter der subtilere Ausprägungen bez. Symptomenkonstellationen, die in Richtung PSP verweisen, enthalten sind (Höglinger et al., 2017). Die zunächst klinische Verdachtsdiagnose PSP

kann letztlich aber nur neuropathologisch gesichert und gegenüber sich manchmal ähnlich präsentierenden Krankheitsbildern, wie z.B. dem idiopathischen Parkinson oder der Cortikobasalen Demenz (CBD), abgegrenzt werden (Dickson, 1999).

1.1.2 PSP – eine neurodegenerative Erkrankung aus der Gruppe der Tauopathien

Bei der progressiven supranukleären Blickparese (PSP) handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung aus dem Formenkreis der Tau-Pathologien, deren gemeinsames neuropathologisches Merkmal die Ablagerung eines pathologischen Tau-Proteins im Gehirngewebe ist. Zur Gruppe der Tauopathien zählen unter anderem auch die Corticobasale Demenz (CBD), die Silberkornkrankheit (AGD) und der Morbus Alzheimer (AD).

Die Verteilung des pathologischen Proteins bezüglich der nervalen Strukturen – Neuronen und/oder Glia – und auch der Manifestationsort der Proteinablagerungen in unterschiedlichen Gehirnarealen ist dabei krankheitsspezifisch (Armstrong und Cairns, 2013; Kovacs, 2016). Hierbei unterscheidet sich neben dem Verteilungsmuster der „befallenen“ Zonen und Zelltypen auch das Aussehen der zellulären Tau-Ablagerungen sowie der ultrastrukturelle Aufbau des pathologischen Tau-Proteins (Armstrong und Cairns, 2013; Kovacs, 2016). Eine gebräuchliche Grobeinteilung der Tauopathien richtet sich nach der Anzahl der Repeat-Sequenzen für Mikrotubulus-Bindungsstellen der jeweilig vorkommenden Tau-Isoform (Kovacs, 2016; Spillantini und Goedert, 2013). Die PSP wird zur Gruppe der vornehmlich 4R-Taupathien – entsprechend Vierer Tandem-Repeats an der Mikrotubulus-Bindungsstelle – gerechnet. Um als „typische PSP“ klassifiziert zu werden ist der neuropathologische Nachweis glialer und neuronaler Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Abb. 1A) in spezifischen Basalgangliengebieten, in Zwischenhirn, Kleinhirn und Hirnstamm sowie eine eingeschränkte Beteiligung des Neocortex notwendig (Litvan et al., 1996; Dickson et al., 2010).

Die Ablagerungen des pathologischen Tau-Proteins finden sich dabei meist in Form neurofibrillärer Bündel, „neurofibrillary tangles“, die bei PSP kompakt wirkende, dichte tau-Filament-Aggregate, die „globose neurofibrillary tangles“ ausbilden (Abb. 1B). In der Glia dominieren sogenannte „tufted astrocytes“ sowie oligodendrozytäre „coiled bodies“ (Abb. 1C und D) (Mudher et al., 2017; Dickson, 1999; Yoshida, 2014).

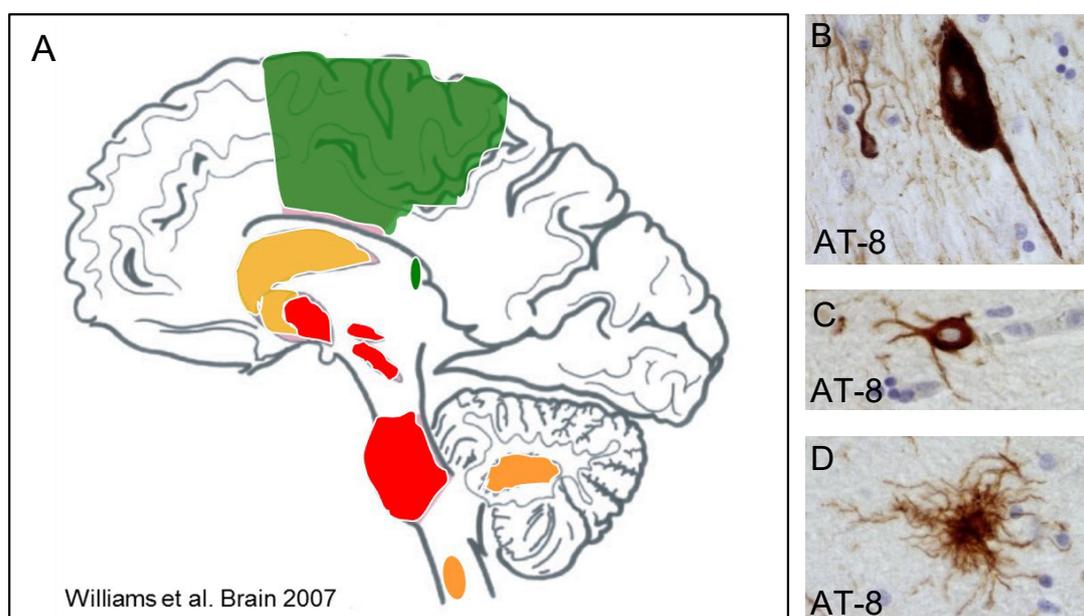


Abb. 1, A (modifiziert nach Williams, et al., Brain 2007, mit Abdruckgenehmigung des Oxford Verlags): Neuropathologische Kriterien einer „typischen PSP“ erfordern den Nachweis von Tau-positiven Läsionen in den roten Arealen (Globus pallidus, Nucleus subthalamicus, Substantia nigra und Pons) sowie in einem geringeren Ausmaß in den orangenen Gebieten (Striatum, Nucleus dentatus und Oliva inferior), in Kombination mit einer PSP-kompatiblen Klinik. Die grünen Zonen sind ebenfalls betroffen, sind aber nicht Teil der Diagnosekriterien.

B-D: Neuronale Ablagerungen „neurofibrillary tangles“ (NFT) (B) sowie gliale Ablagerungen „coiled body“ (C) und „tufted astrocyte“ (D) von hyperphosphoryliertem Tau-Protein (AT-8).

Interessanterweise zeigen viele neurodegenerative Erkrankungen ein örtlich und zeitlich stereotypes Auftreten der pathologischen Proteinablagerungen, welches man sich beim Morbus Alzheimer für eine Stadieneinteilung zunutze machen konnte (Guo und Lee, 2014; Braak und Braak, 1991). Eine Stadieneinteilung basierend auf der Abfolge betroffener Hirnareale wird auch für die PSP diskutiert

(Williams et al., 2007; Kovacs et al., 2020). Inwieweit diese Proteinaggregate selbst allerdings krankheitsverursachend oder toxisch sind bzw. was initial die Bildung dieser pathologischen Proteine auslöst, herrscht große Unklarheit (Mudher et al., 2017). Möglicherweise spiegelt das zu beobachtende stereotype Ausbreitungsmuster vieler neurodegenerativer Erkrankungen eine an funktionelle Systeme gebundene Ausbreitung pathologischer Proteine wider, die in mancher Hinsicht an Prion-artige Ausbreitung denken lassen (Brettschneider et al. 2015; Guo und Lee, 2014; Mudher et al., 2017).

In dieser Arbeit soll im Zuge eines Pilotprojekts zur Beteiligung der Sakkadengenerierenden Gehirnareale am Krankheitsgeschehen der typischen PSP auch das Ursprungsgebiet der, für die reflexhaften Augenbewegungen des vestibulookulären Reflexes (VOR) verantwortlichen, Neurone des Vestibulariskerngebiets auf einen Befall mit pathologischem Tau-Protein untersucht werden.

1.2 Okulomotorische und neuroanatomische Grundlagen

1.2.1 Augenmuskeln

Die Bewegungen des Augapfels werden durch je sechs extraokuläre Muskeln bewirkt. Diese setzen sich aus vier geraden – Musculus rectus superior (SR), M. rectus inferior (IR), M. rectus medialis (MR) und M. rectus lateralis (LR) – sowie zwei schrägen äußeren Augenmuskeln – Musculus obliquus superior (SO) und M. obliquus inferior (IO) – zusammen.

Die beiden seitlichen Augenmuskeln M. rectus medialis (Adduktion) und M. rectus lateralis (Abduktion) besitzen jeweils nur eine Hauptfunktion. Die Funktionen der übrigen äußeren Augenmuskeln ergeben sich aus der Beziehung ihrer Verlaufsrichtung bezüglich der Sehachse. Die Hauptfunktion der Mm. recti superior und inferior liegen in der Elevation (SR) und Depression (IR), doch üben sie zusätzlich eine Adduktionswirkung aus, da sie, ausgehend von ihrem Ursprung am Anulus tendineus, um ca. 23 Grad nach außen abweichen. Des Weiteren ist diesen beiden Muskeln eine innenrotierende (SR) beziehungsweise außenrotierende (IR) Wirkung zuzuschreiben. In der Adduktionsstellung des Auges büßen

die letztgenannten Muskeln ihre Wirksamkeit um die transversale Achse mehr und mehr ein. Die Hebe- und Senkfunktion wird nun von den beiden schrägen Augenmuskeln M. obliquus superior (Depression) und M. obliquus inferior (Elevation) übernommen. Zudem wirken die schrägen Augenmuskeln noch als Innen- (SO) beziehungsweise Außen-Rotatoren (IO) und wirken geringfügig an der Abduktionsbewegung des Auges mit.

Ihre Innervation erhalten die äußeren Augenmuskeln von den drei Hirnnerven N. oculomotorius (SR, IR, MR und IO), N. trochlearis (SO) und N. abducens (MR).

Eine zusammenfassende Übersicht über die Muskelfunktionen der äußeren Augenmuskeln liefert Tabelle 1.

Muskel	Hauptfunktion	Nebenfunktion	Innervation
SR	Elevation	Innenrotation und Adduktion	n. III
IR	Depression	Außenrotation und Adduktion	n. III
MR	Adduktion	-	n. III
LR	Abduktion	-	n. VI
SO	Innenrotation	Depression und Abduktion	n. IV
IO	Außenrotation	Elevation und Abduktion	n. III

Tab. 1: Haupt- und Nebenfunktionen der extraokulären Muskeln mit Innervation

1.2.2 Augenbewegungstypen

Von den fünf klassisch unterschiedenen Augenbewegungstypen werden die Sakkaden, die langsamen Folgebewegungen und die Vergenz-Bewegungen willkürlich initiiert. Sie dienen unter anderem dazu, unsere Umgebung optisch „abzutasten“ (Sakkaden) und kleine, sich bewegende Ziele zu verfolgen, sodass sich ihr

Abbild stets auf der Fovea – dem Ort des schärfsten Sehens – befindet (langsame Folgebewegungen). Vergenz-Bewegungen stehen im Dienst des binokularen Sehens, indem sie die Einstellung beider Augen auf nahe oder weit entfernte Zielpunkte bewirken. Von den willkürlichen Augenbewegungstypen kann man die reflexartigen Augenbewegungstypen unterscheiden, die unter anderem dazu dienen – trotz ständig vorkommender kleiner oder größerer Bewegungen des Kopfes – Abbildungen auf der Retina stabil zu halten. Dies ermöglicht, visuelle Objekte trotz der Eigenbewegung des Körpers auf der Retina fixieren zu können. Der optokinetische Reflex (OKR) und der vestibulo-okuläre Reflex (VOR) ergänzen sich dabei, indem der OKR vor allem durch den visuellen Reiz eines bei Kopfbewegungen „verrutschenden“ visuellen Bildes auf der Retina ausgelöst wird und insbesondere bei niedrig-frequenten Kopfbewegungen auftritt, während der Impuls für den VOR von den Bogengängen und Otolithenorganen ausgeht und vor allem bei höher-frequenten Kopfbewegungen in Erscheinung tritt (McCrea et al., 1987b; Goldberg et al., 2012).

Alle fünf Augenbewegungstypen – manche Autoren bevorzugen eine Einteilung der Augenbewegungstypen in sechs Gruppen und zählen dabei die Blickhaltung als eigene Bewegungsart (Büttner-Ennever und Horn, 2004) – werden in unterschiedlichen Gebieten des Gehirns erzeugt, teilen sich aber, ausgehend von den Motoneuronen der Hirnnervenkerne des dritten, vierten und sechsten Hirnnerven, die gemeinsame Endstrecke zu den sechs äußeren Augenmuskeln (Büttner-Ennever und Horn, 2004; Leigh und Zee, 2014; Horn und Straka, 2021). Die untenstehende Abbildung soll diese Konvergenz der unterschiedlichen prämotorischen Bahnen auf der Ebene der Motoneurone verdeutlichen.

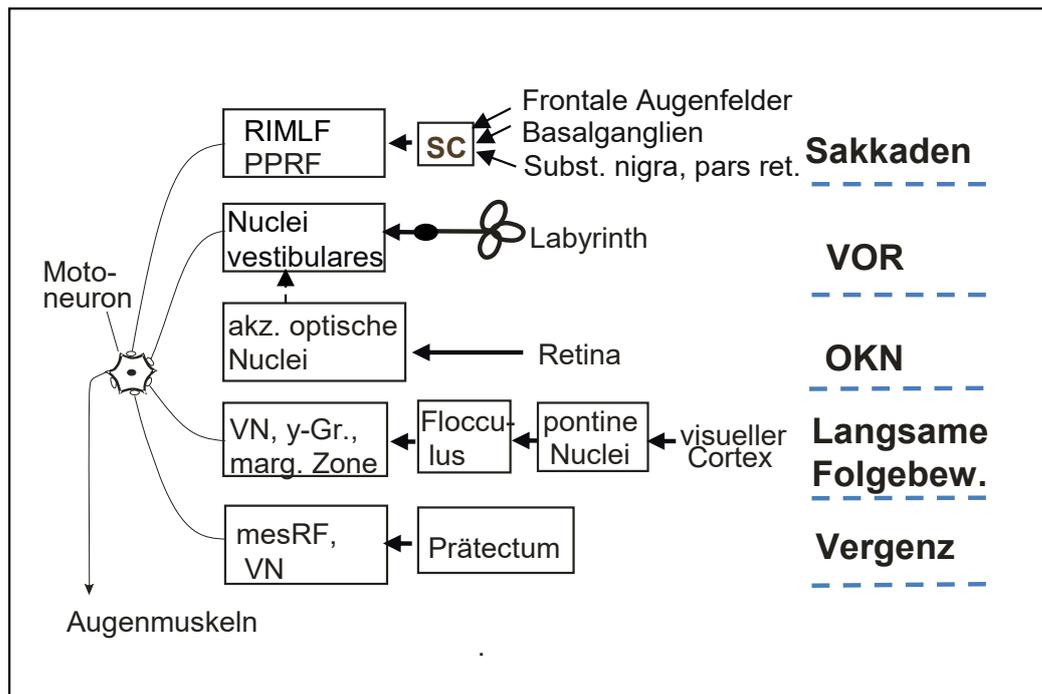


Abb. 2: Die prämotorischen Bahnen der 5 Augenbewegungstypen konvergieren auf Ebene der Motoneurone. (vereinfachte Darstellung nach Büttner-Ennever und Horn: Reticular Formation: Eye Movements, Gaze, and Blinks, in: The Human Nervous System, 2004)

mesRF – mesencephale formation reticularis, OKN – optokinetischer Nystagmus, PPRF – paramediane pontine formatio reticularis, RIMLF – rostraler interstitieller Nucleus des medialen longitudinalen Faszikels, SC – Colliculus superior, VN – Nuclei vestibulares, VOR – vestibulo-okulärer Reflex

Bei der PSP kommt es bereits in frühen Erkrankungsstadien (vgl. Abb. 3) zu einer Verlangsamung bis hin zu einem Ausfall vertikaler Sakkaden bei zunächst erhaltenem vertikalem VOR in dieselbe Richtung (Das und Leigh, 2000). Eine frühe Beteiligung im Sinne einer Degeneration in den prämotorischen Bahnen des Sakkadensystems konnte bereits gezeigt werden (Horn et al., 2013; Feige et al., 2013). Im weiteren Krankheitsverlauf der PSP ist oftmals auch ein Ausfall des vertikalen VOR zu beobachten. In dieser Arbeit soll das Ausmaß der neuronalen Degeneration im prämotorischen Ursprungsgebiet des VOR untersucht werden, weshalb im Folgenden vornehmlich der prämotorische Anteil des VOR näher beschrieben werden soll.

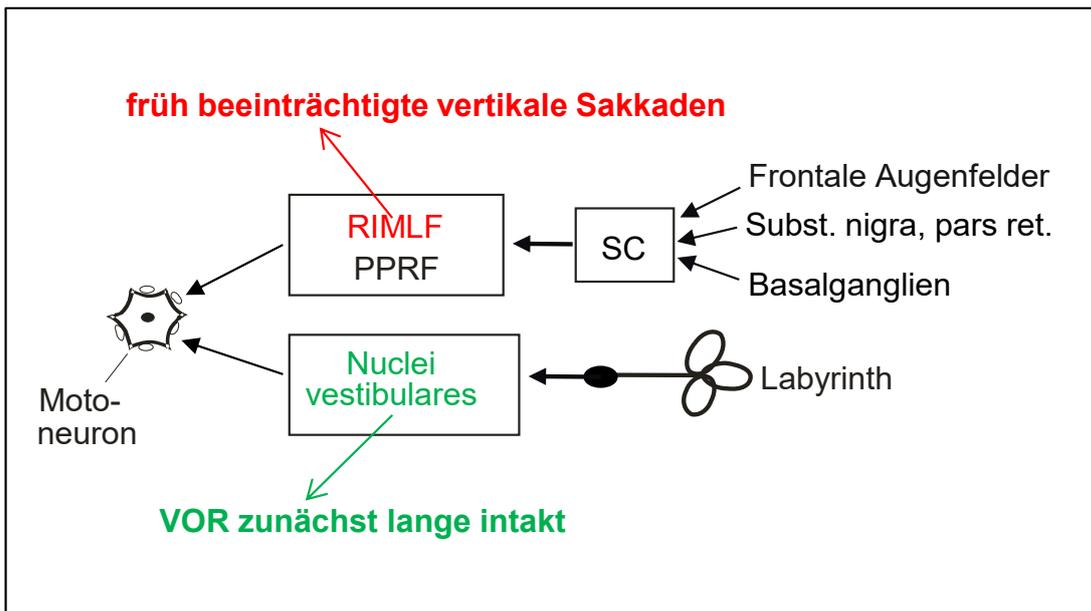


Abb. 3: Überblick über den okulomotorischen Befund der frühen und mittleren Erkrankungsphase bei PSP-RS.

PPRF – paramediane pontine formatio reticularis, RIMLF – rostraler interstitieller Nucleus des medialen longitudinalen Faszikels, SC – Colliculus superior, VOR – vestibulo-okulärer Reflex

1.2.3 Der vestibulo-okuläre Reflex VOR

Der vestibulo-okuläre-Reflex (VOR) und der optokinetische Reflex (OKN) ermöglichen es, ein scharfes und unbewegtes Abbild der Umgebung auf der Retina zu halten, selbst wenn sich der abgebildete Gegenstand oder auch der Kopf bewegt. Der VOR kann dabei die Augen, entgegengesetzt einer jeden Kopfbewegung, im dreidimensionalen Raum rotieren und wird von den Sinneszellen der Bogengänge (angulärer VOR = AVOR) und Otolithenorgane (translationaler VOR = TVOR) ausgelöst. Beobachten lässt sich bei Auslösung des AVOR dabei ein vestibulärer Nystagmus, der aus einer langsamen kompensatorischen Augenbewegung entgegengesetzt der Kopfbewegung und einer darauffolgenden schnellen Rückstellkomponente („Rückstellsakkade“) besteht, die auftritt, sobald der Bewegungsumfang des Augapfels vollständig ausgeschöpft, die Bewegung des Kopfes aber noch nicht beendet ist und ein neuer Startpunkt für eine erneute kompensatorische Bewegung benötigt wird. Die schnelle Rückstellkomponente be-

dient sich dabei der neuronalen Maschinerie des Sakkadensystems. Die kompensatorische Komponente des VOR wird von einem drei-neuronalen Bogen vermittelt, der bei Bewegungen des Kopfes äußerst effektiv die Blickachse stabilisieren kann (Goldberg et al., 2012).

Beim VOR handelt es sich um einen phylogenetisch sehr alten, äußerst schnellen Reflex (5-7 ms) auf der Grundlage eines sehr direkten Drei-Neuronen-Bogens (vgl. Abb. 4), der das vestibuläre System mit den Augenmuskelkernen verbindet (Goldberg et al., 2012; McCrea et al., 1987b). Als erstes Neuron dieses Bogens fungieren die bipolaren Neurone des Scarpa'schen Ganglions, deren Axone die Informationen der Bogengänge unter anderem an sekundäre Neurone in den Vestibulariskernen weiterleiten. Diese sekundären Neurone aktivieren wiederum die Motoneurone der entsprechenden Augenmuskeln innerhalb der Kerngebiete des dritten (Nucleus oculomotorius, NIII), vierten (Nucleus trochlearis, NIV) und sechsten Hirnnervens (Nucleus aducens, NVI), welche sie hauptsächlich über den Fasciculus longitudinalis medialis (MLF), aber auch über kreuzende Fasern des ventralen tegmentalen Trakts (CVTT) beziehungsweise den oberen Kleinhirnstiel (SCP) erreichen (Büttner-Ennever, 1992; Zwergal et al., 2009). Bei den vestibulo-okulären Projektionen der sekundären Vestibularisneurone lassen sich ipsilateral verlaufende inhibitorische Verbindungen von exzitatorischen Verbindungen zu den Motoneuronen der Gegenseite unterscheiden.

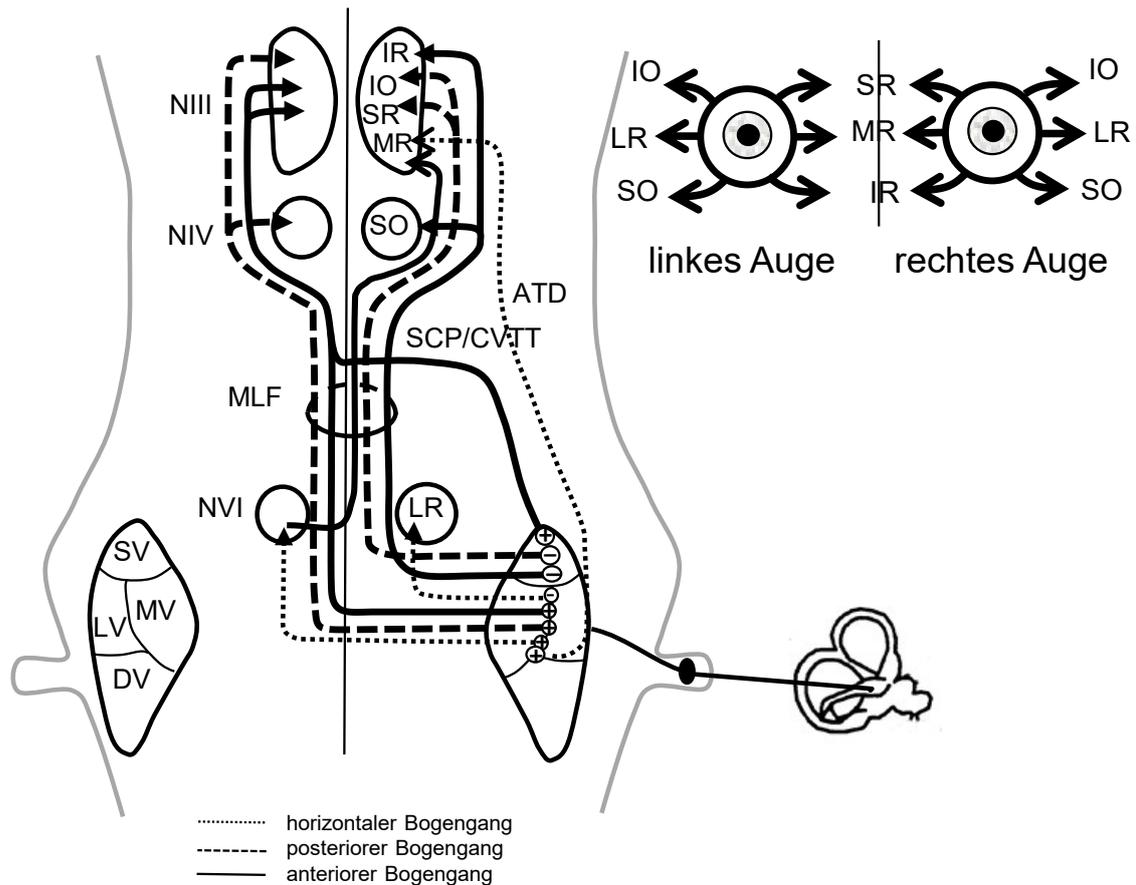


Abb. 4: Schema der Verbindungen bogengangassoziierter sekundärer Vestibularisneurone zu verschiedenen Bereichen des dritten, vierten und sechsten Hirnnervenkernegebiets. (vereinfachte Darstellung nach Büttner-Ennever und Gerrits: Vestibular System, in: The Human Nervous System, 2004)

ATD – aufsteigender Deiters-Trakt, CVTT – zentraler ventraler tegmentaler Trakt, DV – Deszendierender Vestibulariskern, IO – Musculus obliquus inferior, IR– Musculus rectus inferior, LR – Musculus rectus lateralis, LV – Lateraler Vestibulariskern, MLF – Fasciculus longitudinalis medialis, MR – Musculus rectus medialis, MV – Medialer Vestibulariskern, SCP – oberer Kleinhirnstiel, SR – Musculus rectus superior, SO – Musculus obliquus superior, SV– Superiorer Vestibulariskern, NIII - Nucl. oculomotorius, NIV – Nucl. trochlearis, NVI - Nucl. abducens

1.2.4 Der Vestibulariskern-Komplex

Bei Bewegungen im Raum sind Signale des Vestibularorganes zusammen mit propriozeptiven und visuellen Informationen wesentlich, um eine Stabilisierung des Körpers und der Augen zu gewährleisten (Pompeiano, 1972; Büttner-Ennever, 1999; Gdowski und McCrea, 2000). Die bipolaren Zellen des Scarpa-Ganglions geben die Information über Drehbeschleunigung aus den Bogengängen sowie Information über Linearbeschleunigung von den Otolithenorganen des Sacculus und Utriculus über den Nervus vestibularis (nVIII) an die Vestibulariskerne weiter. Diese primären Afferenzen aus dem Labyrinth des Innenohres erreichen zusammen mit einer Vielzahl zusätzlicher Afferenzen unter anderem aus der Formatio reticularis, dem Rückenmark, der inferioren Olive, dem Kleinhirn und unterschiedlichen Arealen des Großhirncortex das am Boden des Vierten Ventrikels gelegene Vestibulariskerngebiet (Holstein, 2012). Nach Verarbeitung dieser verschiedenen Eingänge erreichen die Efferenzen des Vestibulariskernkomplexes unterschiedlichste Gebiete des Zentralen Nervensystems, wie zum Beispiel über den Thalamus, verschiedene Areale der Großhirnrinde, das okulomotorische System, das Cerebellum und das Rückenmark (Horn, 2020). Der Vestibulariskernkomplex beeinflusst dadurch, neben der Wahrnehmung der Eigenbewegung im dreidimensionalen Raum, auch die kompensatorischen Bewegungen des Kopf- und Halsbereichs sowie die zur Stabilisierung des Körpers nötigen Anpassungen der gesamten Körperhaltung (Holstein, 2012). Von großer Bedeutung für Haltung und Gleichgewicht sind dabei diejenigen Efferenzen der Vestibulariskerne, die bei Bewegungen des Kopfes über kompensatorische Augenbewegungen (VOR und OKN) helfen, Bilder auf der Retina stabil zu halten (Büttner und Büttner-Ennever, 2006; Shinoda et al., 2006).

Der Vestibulariskernkomplex, dessen Aufbau bei allen Wirbeltieren erstaunliche Ähnlichkeit zu besitzen scheint (Straka und Dieringer 2004; Brodal, 1984), besteht aus einer Ansammlung von Hirnstammkernen am Übergang der Medulla oblongata zur Pons und wird historisch und nach zytoarchitektonischen Gesichtspunkten in vier Hauptkerne – den Superioren (SV), den Medialen (MV), den Lateralen (LV) und den Deszendierenden Vestibulariskern (DV) unterteilt. Des Weiteren werden manchmal kleinere Subgruppen wie z.B. die y-Gruppe, der interstitielle Kern des achten Hirnnerven (INT8) und der Nucleus präpositus hypoglossi

(PrH) aufgrund ihres N. vestibularis-Eingangs bzw. ihrer starken reziproken Verbindungen zu den Vestibulariskernen, ebenfalls dem Vestibulariskomplex zugeordnet (Goldberg et al., 2012).

Da die unterschiedlichen Funktionen des Vestibulariskerngebiets nicht streng mit den einzelnen Kerngebieten korrelieren (Büttner-Ennever, 1992), erlauben die Kerngrenzen bei der Suche nach den sekundären vestibulo-okulären Neuronen des Vestibulariskernkomplexes nur eine erste Orientierung. Anhand ausführlicher bestehender Übersichtsarbeiten lässt sich vereinfacht jedoch feststellen, dass die Ursprünge der okulomotorischen Projektionen vornehmlich in den rostraleren Regionen des Vestibulariskern-Komplexes liegen müssen (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004; Graf et al., 2002; Highstein und Holstein, 2006; Holstein, 2012; Horn, 2020).

Innerhalb dieser Zone konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede in der Konnektivität einer zentralen Zellsäule und der sie umhüllenden kleineren Neurone in den peripheren Kernanteilen bestehen (Epema et al., 1988). So bekommt zum Beispiel die zentrale Säule größerer Neurone des SV- und MV-Gebiets eine Vielzahl intrinsischer Eingänge aus der benachbarten Peripherie, welche sie aber nicht erwidert (Holstein, 2012; Epema et al., 1988). Diese Zone ist außerdem nur minimal an der Ausbildung kommissuraler Verbindungen beteiligt (Gacek, 1978; Epema et al., 1988; Büttner-Ennever, 1992). Aus den zentralen Regionen des SV, MV, ventralen LV und rostralen DV entspringen stattdessen die langen auf- und absteigenden Bahnen des Vestibulariskernkomplexes (Büttner-Ennever, 1992). Für die sekundären vestibulo-okulären Verbindungen scheint in diesen Bereichen vornehmlich die rostrale, zentrale Kernsäule des SV und MV von Interesse zu sein (Büttner-Ennever, 2000).

Über die Beteiligung des ventralen Anteils des Lateralen Vestibulariskerns (vLV) am Ursprungsgebiet der sekundären vestibulo-okulären Projektionen herrschen unterschiedliche Meinungen, was oftmals dazu führt, dass das Grenzgebiet zwischen MV und LV – also die MVm und die vLV-Region – methodisch zusammengefasst wird. Das LV-Gebiet scheint in mehrfacher Hinsicht aus dem allgemeinen Muster der VN-Konnektivität auszureißen. Der LV erhält vergleichsweise wenige Bogengangafferenzen; stattdessen lassen sich viele Sacculusafferenzen nachweisen (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004; Newlands and Perachio, 2003). Des

Weiteren unterhält der LV reziproke Verbindungen zum Kleinhirn und ist der Ursprungsort des lateralen vestibulospinalen Traktes (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004). Der LV fällt zusätzlich durch die Besonderheit auf, dass er keine kommissuralen Verbindungen unterhält (Holstein, 2012; Büttner-Ennever, 1992).

In den caudalen Bereichen des VN-Komplexes, dem Deszendierenden Vestibulariskern (DV) und dem caudalen Medialen Vestibulariskern (MVc) scheinen vornehmlich die an deszendierenden Projektionen zum Rückenmark und an autonomen Funktionen beteiligten Neurone lokalisiert zu sein (Goldstein et al., 2002; Balaban und Yates, 2004). Im rostralen DV-Gebiet konnten allerdings auch Neurone nachgewiesen werden, deren Axone – zusätzlich zu einem absteigenden Ast zu den Halsmuskeln – über einen aufsteigenden Ast zu den Motoneuronen der extraokulären Muskeln verfügen. Diese so genannten vestibulo-okulo-kolli-schen (VOC) Neurone sind neben dem rostralen DV auch im Gebiet des MVm und ventralen LV enthalten (Holstein, 2012; Peterson und Boyle, 2004).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Vor dem Hintergrund, dass bei den Augenbewegungsstörungen bei PSP der VOR vergleichsweise lange erhalten bleibt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit die Pathologie mit den klinischen Beobachtungen korreliert. Gezielt sollen dazu die sekundären vestibulo-okulären Neurone von PSP-Fällen mit unterschiedlich ausgeprägten Augenbewegungsstörungen auf Tau-pathologie untersucht werden. Hierzu müssen zunächst die sekundären vestibulo-okulären Neurone im menschlichen Hirnstamm identifiziert werden.

Mit Hilfe von Doppelimmunfärbungen an Hirnstammschnitten von Rhesusaffen, die einen Tract-Tracer in den Nucleus oculomotorius erhalten hatten, soll zunächst überprüft werden, inwieweit ein Antikörper gegen nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) als Marker für die sekundären VOR-Neurone dienen kann. In einem zweiten Schritt sollen durch vergleichende Untersuchungen an Gehirnschnitten von Rhesusaffen und Menschen, gestützt auf die Zellmorphologie und Histochemie, die sekundären VOR-Neurone im menschlichen Gewebe identifiziert werden. Daraufhin sollen in post-mortem Gewebe von PSP-Fällen

unterschiedlicher klinischer Stadien gezielt die sekundären vestibulo-okulären Neurone durch die Verwendung einer immunhistochemischen Färbung gegen hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8) auf Anzeichen neuronaler Degeneration untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebe

2.1.1 Hirngewebe von Rhesusaffen mit Tracer-Injektionen

Für die vorliegende Arbeit wurden bereits gefärbte Transversalhirnstammschnitte von drei Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), die zuvor eine Tracerinjektion in den Nucleus oculomotorius (NIII), Fall A20 und Fall RRY10 oder Nucleus abducens, Fall Z-8, erhalten hatten (vgl. Abb. 7 und 8), auf die Lokalisation und Morphologie der sekundären vestibulo-okulären Neurone reanalysiert. Die Tiere waren alle mit einer Überdosis Pentobarbital (Nembutal: 80mg/kg Körpergewicht) eingeschläfert worden und nach Vorspülung mit warmer 0,9% Kochsalz-Lösung transcardial mit zwei bis drei Litern 4% Paraformaldehyd oder einer Mischung aus 2% Paraformaldehyd und 1% Glutaraldehyd in 0,1M Phosphat-Puffer perfundiert worden (vgl. Horn, Dissertation LMU, 1990; Lienbacher et al., 2011; Wasicky et al., 2004).

Als Tracersubstanz war bei Fall A20 Weizenkeimagglutinin, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (WGA-HRP) verwendet worden, das spezifisch an endständige N-Acetylglucosaminreste bindet und über Endozytose von neuronalen Terminalel aufgenommen wird. Auf diese Weise aufgenommenes WGA-HRP kann über das Axon retrograd in Richtung des neuronalen Zellkörpers transportiert und dort durch Nachweis der Peroxidase sichtbar gemacht werden und somit die Somata markieren (Horn und Büttner-Ennever, 1998). Zum Nachweis des Tracers war eine Peroxidase-Reaktion mit Tetramethylbenzidin als Chromogen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durchgeführt worden, was zu einem blau-schwarzen Niederschlag in den markierten Neuronen führte (Abb. 7). Im Fall Z-8 war als Tracersubstanz die ungiftige Untereinheit B des Cholera-toxins (CT) verwendet worden, das an GM1 Ganglioside auf neuronalen Oberflächen bindet, von synaptischen Endigungen in das Neuron aufgenommen und wiederum über retrograden axonalen Transport zum zugehörigen Zellkörper transportiert wird. Dort war der Tracer mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen die Untereinheit B von CT mit Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht worden, was zu einem bräunlichen Niederschlag in den markierten Neuronen führte (Abb. 8),

(Wasicky et al., 2004). Beim Fall RRY10 war im Rahmen eines früheren Projektes als Tracer unkonjugiertes Weizenkeimagglutinin (WGA) in den Nucleus oculomotorius injiziert worden. Die 40µm dicken Transversalschnitte aus dem Bereich der Vestibulariskerne waren dann mit Doppelimmunfluoreszenz zum Nachweis des Tracers auf die Anwesenheit von nicht-phosphorylierten Neurofilamenten gefärbt worden (Ahlfeld et al., 2011).

2.1.2 Hirngewebe von humanen Kontrollen und PSP-Fällen

Für die Untersuchung des Degenerationsgrads menschlicher sekundärer vestibulo-okulärer Neurone wurden insgesamt acht Hirnstammblocke mit histopathologisch gesicherter typischer PSP („Fall I – VIII“, Alter: 62-81 Jahre) sowie zwei altersentsprechende Kontrollen („Kontrolle 1 und 2“, Alter: 62 und 71 Jahre) ohne Hinweis auf PSP-typische Veränderungen verwendet. Die Gewebe wurden durch die Neurobiobank über das Referenzzentrum für neurodegenerative Erkrankungen der Ludwig-Maximilians-Universität zur Verfügung gestellt und unter Beachtung der ethischen Kriterien, die in der Deklaration von Helsinki 1964 zur medizinischen Forschung am Menschen festgelegt wurden, gewonnen. Ein positives Votum der Ethikkommission der LMU liegt vor.

Die histopathologische Untersuchung der für diese Arbeit verwendeten Human- gewebe ergab im Detail die folgenden Befunde:

Fall	Histopathologische Diagnosen
Kontrolle 1 71, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. geringe, altersentsprechende Taupathologie im Hippocampus 2. geringgradige Silberkornekrankung
Kontrolle 2 62, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. Arteriosklerose in Neocortex und Rückenmark 2. kleine, ältere Blutungen der Adenohypophyse 3. Alzheimer-assoz. Veränderungen im Frühstadium: CERAD 0, Braak & Braak I, Phase 0 nach Thal, NIH Score A0B1C0
Fall I 81, f	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP 2. alte Infarkte (parieto-occipital und Kleinhirn) 2. AD-assoz. Veränderungen: CERAD A, Braak & Braak III
Fall II 80, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP 2. CERAD 0, Braak & Braak III 3. Silberkornkrankheit, Stadium III 4. kleiner kortikaler Infarkt
Fall III 75, f	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP 2. Leukencephalopathie bei Mikroangiopathie 3. CERAD A, Braak & Braak III
Fall IV 69, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP
Fall V 64, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP 2. Silberkornkrankheit, Stadium II
Fall VI 77, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP 2. Silberkornkrankheit
Fall VII 66, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP
Fall VIII 70, m	<ol style="list-style-type: none"> 1. PSP 2. CERAD 0, Braak & Braak III, Thal 2 3. beginnende Silberkornekrankung 4. Arteriosklerose 5. Kontusionsherd fronto-temporo-basal links

Tab. 2: Überblick über die Pathologien und Co-Pathologien der eingeschlossenen PSP-Fälle und Kontrollen

In fünf von acht als PSP-Fällen ausgesuchten Patientengeweben (Fall I, Fall II, Fall III, Fall VII, Fall VIII) und in Kontrolle 2 lassen sich neuropathologische, Alzheimer-assoziierte Veränderungen eines meist noch präsymptomatischen Stadiums entsprechend CERAD 0 bis A beziehungsweise Stadium Braak und Braak bis Stadium I – III nachweisen (Bouras et al., 1994; Braak et al., 2006). Zusätzlich finden sich in den Fällen VI und VIII sowie der Kontrolle 1 neuropathologische Hinweise auf eine Silberkornkrankheit.

Die PSP-Fälle wurden entsprechend der dokumentierten klinischen Symptome in unterschiedliche Schweregrade unterteilt. Einen Überblick über die im Hinblick auf die Augenmotilitätsstörungen relevanten, dokumentierten klinischen Symptome und die grobe Stadieneinteilung der einzelnen PSP-Fälle geben die Tabellen 3 und 4.

Fall, Alter, Geschlecht	Non-oculomoto- rische PSP-assoz. Symptome	Vertikale Blickparese	Horizontale Blickparese	VOR
I 81a, f	+	-	-	ja
II 80a, m	+	(+)	-	k. A.
III 75a, f	++	+(+)	-	k. A.
IV 69a, m	+	++	(+)	k. A.
V 64a, m	++	+++	++	ja
VI 77a, m	+	+++	++	ja
VII 66a, m	+	+++	+++	k. A.
VIII 70a, m	+++	+++	+++	nein

Tab. 3: Überblick über den Schweregrad der PSP-assoziierten Symptome aller eingeschlossenen Fälle

Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
keine/geringe Augenmotorikstörung	vertikale Blickparese	vertikale und horizontale Blickparese	komplette Blickparese und VOR-Ausfall
Fall I	Fall II		
	Fall III		
		Fall IV	
		Fall V	
		Fall VI	
		Fall VII	
			Fall VIII

Tab. 4: Stadienzuteilung der PSP-Fälle gemäß des dokumentierten Schweregrads der Augenmotilitätsstörungen

Die von der Neurobiobank der LMU München stammenden immersionsfixierten (10% Formalin), in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke wurden mit einem Paraffinschneidegerät in 5, 7 und 10 µm dicke Transversalschnitte geschnitten. Anschließend wurden Schnitte aus dem Vestibulariskerngebiet jeweils auf nicht-phosphorylierte Neurofilamente (NP-NF, 5-7 µm), hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8, 5-7 µm) oder mit Luxol-Fast-Blue (LFB, 10 µm) angefärbt.

2.2 Färbungen

2.2.1 Übersichtsfärbung Luxol-Fast-Blue

Um die Zytoarchitektur des Vestibulariskernkomplexes studieren zu können, wurde bei allen Humanfällen, etwa alle 250-400 µm eine Übersichtsfärbung mit Luxol-Fast-Blue (LFB) durchgeführt. Der in Alkohol lösliche Kupferphthalocyanin-Farbstoff der LFB-Färbung bindet an Basen der Lipoproteine der Myelinscheiden des ZNS und wird daher zur Darstellung von Faserverläufen gebraucht. Myelinfasern färben sich hierbei blau, wovon sich das rosa gefärbte Neuropil sowie die lila gefärbten Neurone gut abheben.

Etwa zwölf Hirnstammschnitte je Fall wurden hierfür zunächst in Xylol (2x je 15 min) entparaffiniert und für je 10 min in 100% und 96% Alkohol eingestellt. Daraufhin erfolgte über zwei Stunden eine erste Färbung mit Luxolblau (0,1g Luxol-Fast-Blue + 100ml 95% Alkohol + 0,5ml 10% Essigsäure) bei 60°C. Anschließend wurden die Schnitte in 95% Alkohol und destilliertem Wasser gespült und 10 sek mit 0,05% Lithiumcarbonatlösung behandelt, um einer Überfärbung entgegenzuwirken. Nach einer Differenzierung in 70% (30 sek) Alkohol und einer Spülung mit Aqua dest. wurden die Schnitte solange erneut mit 0,05% Lithiumcarbonatlösung und 70% Alkohol behandelt, bis sich keine blauen Schlieren mehr zeigten. Daraufhin wurde eine Kernfärbung mit Karbolfuchsin durchgeführt (1g basisches Fuchsin + 10ml 100% Alkohol + 100ml 5% Karbol-Wasser/Phenol, 3min). Nach zweimaligem Fixieren (10ml Essigsäure + 10ml konzentriertes Formalin + 1000ml Aqua dest.), Spülen in Aqua dest. und zweimaligem Bad in 100% Alkohol wurden die Schnitte getrocknet und nach zweimaligem Baden in Xylol (je 15 min), mit Einschlussmedium (DePeX) eingedeckt (vollständiges Protokoll siehe Anhang).

2.2.2 Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbetechniken verwendet, um die sekundären vestibulo-okulären Neurone des Menschen zu lokalisieren, zu identifizieren und im Hinblick auf Neurodegeneration zu untersuchen. Immunhistochemische Färbungen beruhen auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. In dieser Arbeit wurden indirekte Nachweismethoden eingesetzt, deren großer Vorteil in einer Signalverstärkung liegt.

Bei den indirekten Methoden unterscheidet man eine Zwei- und eine Drei-Schritt-Methode: Bei der Zwei-Schritt-Methode bindet ein zweiter Antikörper (=Sekundärantikörper) an den Primärantikörper. Der Sekundär-AK ist direkt entweder mit einem Enzym, das ein zugegebenes Substrat umsetzen und dadurch sichtbar machen kann oder, wie bei den reanalysierten Hirnschnitten von Rhesusaffen in dieser Arbeit (Ahlfeld et al., 2011), zum Beispiel mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Bei der ebenfalls in dieser Arbeit eingesetzten Drei-Schritt-Methode ist der Sekundär-Antikörper mit Biotin gekoppelt, das in einem dritten

Schritt mit hoher Affinität an einen eingebrachten Komplex aus Avidin-Peroxidase (Extravidin) bindet. Bei der nun folgenden Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) und dem Substrat Wasserstoffperoxid bewirkt die Peroxidase eine Oxidation des DAB, welches daraufhin als brauner Niederschlag sichtbar wird.

2.2.3 Immunperoxidase-Färbung zum Nachweis von nicht-phosphoryliertem Neurofilament (NP-NF)

Entsprechend früherer Anfärbungen auf NP-NF in den hier reanalysierten Affenfällen und in Paraffin eingebetteten Humangeweben (Che Ngwa et al., 2014) wurde die Immunperoxidase-Färbung an den Paraffinschnitten der Humanfälle durchgeführt. Laut Herstellerangaben (Sternberger) richtet sich der verwendete monoklonale Maus-Antikörper (Sternberger Monoclonals Inc., Cat.Nr. SMI 32) gegen ein nicht-phosphoryliertes Epitop des Neurofilaments H und macht dadurch Perikaryen, Dendriten und dicke Axone sichtbar, während andere Gewebe und Zelltypen nicht mit dem Antikörper reagieren.

Für die immunhistochemische Färbung mit SMI 32 wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Hierzu durchliefen die Schnitte nach einem zweimaligen Bad in Xylol (2x 15 min) eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 70%) bis zum destillierten Wasser. Zur Demaskierung der Antigene des in Formalin fixierten Materials wurden die Schnitte vor der eigentlichen immunhistochemischen Färbung mit einem 0,01M Natrium Citrat Puffer (pH 6,0) drei Mal für je drei Minuten bei 720 Watt in der Mikrowelle behandelt. Nachdem die Schnitte im Citratpuffer abgekühlt waren, wurden sie mit 0,1M TBS gespült und in einer Lösung von 1% H₂O₂ in 0,1M TBS inkubiert, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) in 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte eine Stunde mit 5% normalem Pferdeserum in 0,3% Triton-X in 0,1M TBS (pH 7,4) präinkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte 48 Stunden mit dem ersten Antikörper, Maus anti-SMI-32 (1:5000, verdünnt in 5% Pferdeserum in 0,3% Triton-X in 0,1M TBS, pH 7,4), bei 4°C inkubiert. Einem gründlichen Waschvorgang in 0,1M TBS (3x je 10 min, pH 7,4) folgte die einstündige Inkubation (Raumtemperatur) mit dem biotinylierten Zweitantikörper, Pferd anti-Maus IgG (1:200, verdünnt in 2% Rinderserumalbumin in 0,1M TBS). Nach

dreimaligem Waschen (je 10 min) in 0,1M TBS (pH 7,4) wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur in Extravidin-Peroxidase (1:1000, verdünnt in 2% Rinderserumalbumin in 0,1M TBS) inkubiert. Einem erneuten Spülvorgang folgend (3x je 10 min in 0,1M TBS, pH 7,4), wurden die Extravidin-Peroxidase-Komplexe durch eine Reaktion (10 min) mit 0,025% Diaminobenzidin und 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS (pH 8) sichtbar gemacht. Nach Ablauf der DAB-Reaktion wurden die Schnitte gründlich mit TBS sowie mit destilliertem Wasser gereinigt (0,1M TBS (3x je 10 min), Aqua dest. 5 min) und über Nacht zum Trocknen ausgelegt. Nach einer Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 96%, 100%) und zweimaligem Xylobad (1x 5 min, 1x 15 min) wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckt (vollständiges Protokoll siehe Anhang).

2.2.4 Färbung (AT-8) zum Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau-Protein

Um eine Aussage zum Anteil der pathologisch veränderten sekundären vestibulo-okulären Neurone bei den PSP-Fällen treffen zu können, wurden jeweils Nachbarschnitte der bereits auf NP-NF gefärbten Schnitte auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein angefärbt. Für diesen Nachweis hat sich der AT-8-Antikörper sehr bewährt, da er auch noch in lang fixiertem Material anfärbt (Braak et al., 2006).

Um falsch positive Ergebnisse bei der AT-8-Färbung auszuschließen wurden zwei weitere menschliche Gewebeproben ohne neuronale Pathologien mit Hilfe desselben Protokolls behandelt.

Für die immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen Maus anti-AT-8-Kit (mouse anti-Human PHF-Tau Monoclonal Antibody AT8; Thermo Scientific – MN1020) wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert, rehydratisiert und in der Mikrowelle in Natrium Citrat Puffer zur Demaskierung der Antigene des in Formalin fixierten Materials vorbehandelt (Details siehe Beschreibung der Immunperoxidase-Färbung). Anschließend wurden die Schnitte mit 0,1M PBS gewaschen und die endogene Peroxidase mit 1% H₂O₂ in 0,1M PBS blockiert. Nach Spülung mit Leitungswasser (5 min), und Aqua dest., folgten 5 min in 0,1M PBS (pH 7,3) sowie 5 min in einer Blocking-Lösung (1% Rinderserumalbumin (BSA)

verdünnt in 0,1M PBS, pH 7,3). Die auf diese Weise vorbereiteten Schnitte wurden anschließend 24 Stunden bei 4°C mit dem Primärantikörper, Maus anti-AT-8 (1:500, verdünnt in 1% FBS in 0,1M PBS, pH 7,3) inkubiert. Nach zweimaliger Spülung mit 0,1M PBS (pH 7,3) wurde das 1:2 mit PBS (pH 7,3) verdünnte DCS-Polymer-Enhancer-Reagenz aufgetropft. Nach 20-minütiger Einwirkzeit und zweimaligem Spülen in 0,1M PBS (pH 7,3) wurde ein 1:2 mit PBS (pH 7,3) verdünntes, mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Polymer-Reagenz für 30 min aufgetragen. Nach erneuter Spülung in 0,1 PBS (pH 7,3) wurde die Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion gestartet. Nach Abbruch der DAB-Reaktion wurden die Schnitte abschließend mit 0,1M PBS (pH 7,3) und destilliertem Wasser je 5 min gewaschen. Nach der Trocknung und einem kurzen Waschvorgang in Aqua dest. wurden die Schnitte mit Hämalaun-Lösung 5-10 min gegengefärbt und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest., der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 96%, 100% je 5 min) sowie einem zweimaligen Bad in Xylol (2x15 min) wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckt.

2.3 Auswertung

Zur Auswertung wurde das Gewebe mit Hilfe eines Leica Forschungsmikroskops DMRB (Leica, Bensheim, Deutschland) in Hellfeld- oder in Fluoreszenzbeleuchtung analysiert. Die Analyse der doppelt gefärbten Fluoreszenzschnitte erfolgte jeweils mit einem Filter für das Emissionsspektrum der grünen Fluoreszenz Alexa 488 (DMRB: I3; Anregungsfilter, BP 450-490 nm; dichromatischer Spiegel, 510 nm; Suppressionsfilter, LP 515 nm) und der roten Fluoreszenz Cy3 (DMRB: N2.1; Anregungsfilter, BP 515-560 nm; dichromatischer Spiegel, 580 nm; Suppressionsfilter, LP 590 nm). Die Dokumentation erfolgte mit einer auf das Mikroskop angebrachten Digitalkamera (Pixera Pro 600 ES; Klughammer, Markt Indersdorf, Deutschland). Die Bilder wurden mit dem Computerprogramm Pixera Viewfinder (Klughammer) aufgenommen. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Programm Photoshop 7.0 (Adobe), bis das Bild dem Eindruck durch das Mikro-

skop entsprach. Arrangiert und markiert wurden die Bilder im Programm Powerpoint (Microsoft). Einzelbilder wurden mit dem Programm KL PV Stitch (Klughammer) zusammengefügt.

Um den Anteil der neuronalen Degeneration innerhalb der Gruppe der sekundären vestibulo-okulären Neurone der PSP-Fälle zu untersuchen, wurden jeweils immunhistochemisch auf NP-NF und AT-8 gefärbte Nachbarschnitte mit einem Slidescanner (MIRAX SCAN, Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Deutschland) digitalisiert. Dann wurde jeweils ein auf NP-NF gefärbter Schnitt mit seinem auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein angefärbten Nachbarschnitt gleichzeitig am PC aufgerufen und in gleicher Ausrichtung und Vergrößerung aneinandergekoppelt ausgewertet (Abb. 5). Durch diese Darstellungsweise konnte in den korrespondierenden Arealen beider Schnitte dasselbe Neuron identifiziert auf die Expression von nicht-phosphoryliertem Neurofilament (NP-NF/SMI32) und hyperphosphoryliertem Tau-Protein (AT-8) analysiert werden. Unter Zuhilfenahme von Landmarken, wie zum Beispiel Blutgefäßen, war es somit einfach möglich dasselbe Neuron in den Nachbarschnitten zu identifizieren. Auf diese Weise ließ sich beurteilen, ob das an Hand der SMI 32-Färbung sowie topographischer und zellmorphologischer Kriterien identifizierte sekundäre vestibulo-okuläre Neuron zusätzlich neurodegenerative Veränderungen aufwies.

Die quantitative Auswertung erfolgte durch Ausplotten der SMI 32-positiven und AT-8-positiven Neurone. Aus dem Verhältnis SMI 32-positiver Neurone zu sowohl SMI 32- als auch AT-8-positiver Neurone ergab sich eine Aussage über das Ausmaß der Neurodegeneration in unterschiedlichen Schweregraden der PSP-Erkrankung. Die Dokumentation erfolgte dabei durch die Mirax-Software, durch die die Anzahl der jeweils geplotteten Neurone kontinuierlich erfasst und gespeichert wurde. Bei allen auf diese Weise ermittelten Werten handelt es sich vermutlich um Mindestwerte, da beispielsweise aufgrund des Lipofuszingehalts schwer beurteilbare Neurone, nur randständig getroffene Neurone bzw. nur in einem der beiden Schnitte eindeutig erkennbare Neurone nicht gezählt wurden. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe von Excel-Tabellen festgehalten, geordnet und in eine graphische Darstellung gebracht.

Abbildung 5 zeigt Bildschirmfotos von digitalisierten Transversalschnitten auf Höhe der Vestibulariskerne im Programm Panoramic Viewer (3DHitech).

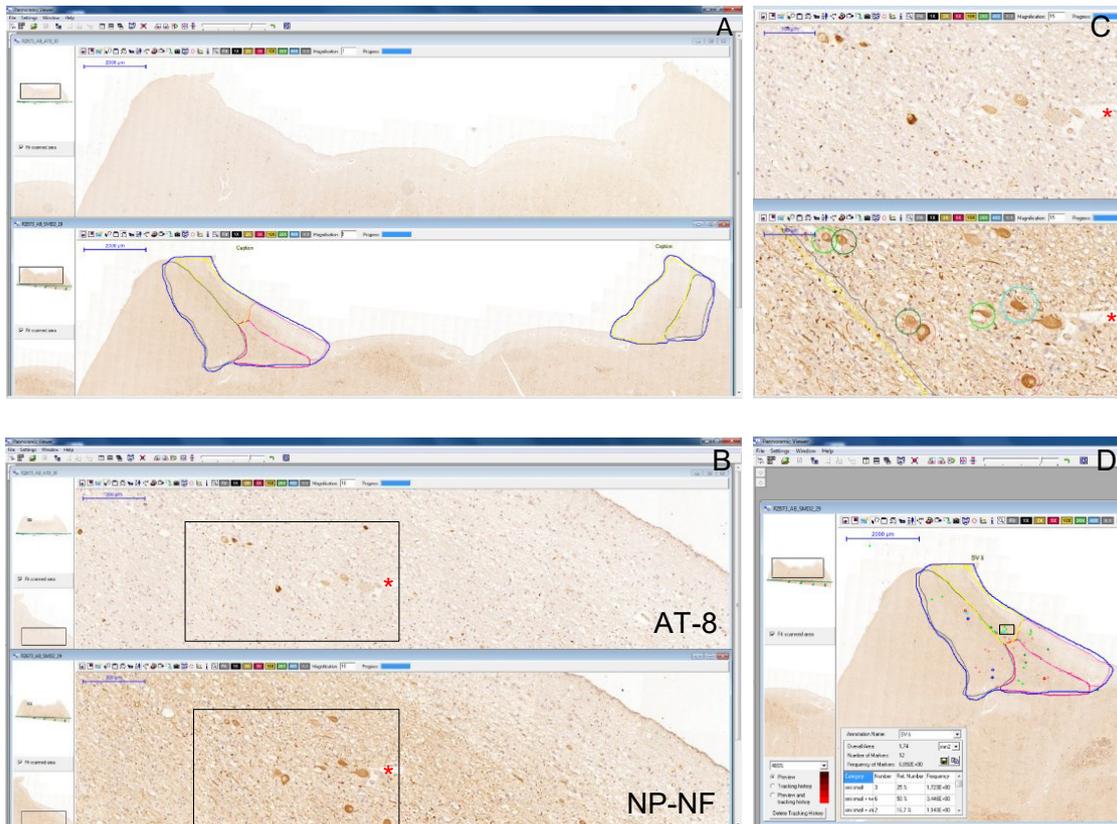


Abb. 5: PC-Arbeitsfenster; auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) und hyperphosphoryliertes Tau-protein (AT-8) angefärbte Nachbarschnitte (7 μ m) wurden digitalisiert und mit dem Panoramic Viewer unter Zuhilfenahme geeigneter Landmarken (z.B. Blutgefäße *) miteinander verknüpft (A, B). Anschließend konnten die putativen sekundären vestibulo-okulären Neurone (NP-NF-pos) auf ihre AT-8-Expression untersucht (C), markiert (C) und gespeichert (D) werden.

3 Ergebnisse

Zunächst wurden in dieser Arbeit die Zytoarchitektur der Vestibulariskerne beim Rhesusaffen einschließlich der genauen Lokalisation und Morphologie der sekundären vestibulo-okulären Neurone anhand von reanalysierten Tracerfällen studiert.

3.1 Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Affengewebe

Im Folgenden sollen genaue Lokalisation und histologische Charakterisierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beschrieben werden, die für die Augenbewegungen des vestibulo-okulären Reflexes (VOR) verantwortlich sind.

3.1.1 Topographie und Histologie der Vestibulariskerne beim Affen

Beim Affen lässt sich anhand der Zytoarchitektur die Einteilung der Vestibulariskerne an Schnittserien in Kresylviolett-Färbung (nach Nissl, Abb.6) nachvollziehen.

Auf caudalen Schnittebenen, knapp oberhalb des rostralen Endes der Hinterstrangkernkerne, sind die beiden untersten Vestibulariskerne bereits gut sichtbar (Abb. 6 A). Dem unteren Kleinhirnstiel (ICP) direkt anliegend sieht man den Descendierenden Vestibulariskern (DV), der durch longitudinal durch ihn hindurchziehende Fasern retikulär erscheint (Abb. 6 A).

Dem DV schließt sich medial der Mediale Vestibulariskern (MV) an. Dieser größte Kern der Vestibulariskerngruppe dehnt sich bis zum vierten Ventrikel aus, unter dessen lateralen Boden er in seiner gesamten rostro-caudalen Ausdehnung zu finden ist (Abb. 6 A-D). In den caudalen Schnitten sieht man medial des MV, ebenfalls unter dem Boden des vierten Ventrikels gelegen, den Nucleus präpositus hypoglossi (PrH) (Abb. 6 A, B). Der MV zeigt die höchste Neuronenzahl und die größten Formunterschiede innerhalb seiner Neuronenpopulation und lässt

sich nach funktionellen und morphologischen Gesichtspunkten in vier Zonen untergliedern (Abb. 6 A-D): die Marginalzone (MZ), die bereits caudal sichtbare, homogen wirkende caudale Zone (MVc) mit kleinen bis mittelgroßen Zellen (Abb. 6 A), der sich weiter rostral eine parvozelluläre Zone (MVp) anschließt (Abb. 6 B-D), die sich wiederum von einem ventro-lateral liegenden, magnozellularen Anteil des Medialen Vestibulariskerns (MVm) unterscheiden lässt (Abb. 6 B-D). Dieser magnozellularer Anteil grenzt seinerseits medial an den Lateralen Vestibulariskern (LV) an. Nur in den caudalen Schnittebenen findet sich die zwischen dem unteren Kleinhirnstiel und dem Nucleus dentatus des Kleinhirns gelegene zweigeteilte y-Gruppe (Abb. 6 A, B). Etwas rostral tritt ventro-medial der Y-Gruppe, lateral flankiert vom unteren Kleinhirnstiel, der LV in Erscheinung (Abb. 6 B). Auf mittleren Schnitthöhen (Abb. 6 B, C) liegt der LV lateral des MV und dorsal des DV. Kennzeichnend für den LV ist das Vorkommen besonders großer Neurone mit häufig exzentrisch gelegenen Kernen, den sogenannten Deiters-Zellen, die in eine Vielzahl kleiner bis mittelgroßer Zellen eingebettet sind (Abb. 6 C, graue Pfeile: Deiters-Neurone).

Der Superiore Vestibulariskern (SV), grenzt dorsal dem LV an und wird ab den mittleren Schnitthöhen sichtbar (Abb. 6 B-D). In seinem caudalen Bereich liegt der SV lateral zum MVp (Abb. 6 C), weiter rostral liegt er direkt in der laterodorsalen Wand des vierten Ventrikels (Abb. 6 D). Der SV wird lateral vom unteren Kleinhirnstiel (ICP) flankiert und dorsal vom oberen Kleinhirnstiel (SCP) begrenzt (Abb. 6 C, D). Die Zellen des SV sind mittelgroß und rund bis oval wobei sich eine Größenzunahme der Neurone in caudo-rostraler Richtung beobachten lässt. Zusätzlich lässt sich oft eine von kleinzelligen Neuronen umgebene zentrale Zellsäule größerer Neurone abgrenzen, die sich nach medial-caudal in die großzellige, an den LV angrenzende Zone des MV fortsetzt. Diese zentrale rostrocaudale Säule mittelgroßer bis großer Neurone des SV und MVm bildet den hauptsächlichen Ausgangsort der Efferenzen des Vestibulariskernkomplexes (Büttner-Ennever, 1992).

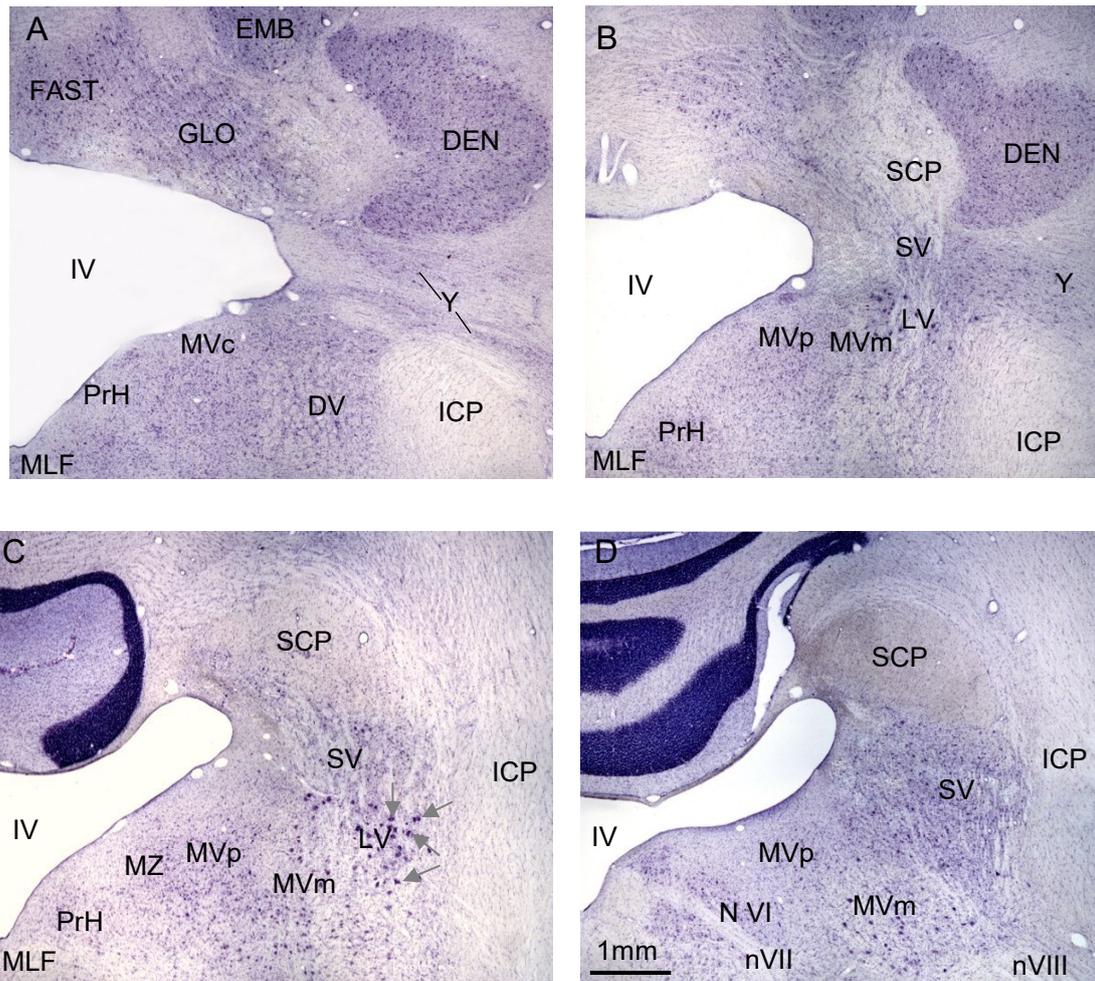


Abb. 6: Transversalschnitte von caudal nach rostral (A-D) durch den Hirnstamm eines Makaken zur Darstellung der Zytoarchitektur des vestibulären Kerngebietes. Deutlich zeigen sich die großen Deiters-Neurone des LV (graue Pfeile). Kresylviolett-Färbung. Der Maßstab in D gilt für alle Teilabbildungen. DEN – Nucl. dentatus, EMB – Nucl. emboliformis, FAST – Nucl. fastigii, GLO – Nucl. globosus, ICP – unterer Kleinhirnstiel, LV – Lateraler Vestibulariskern, MLF – Fasciculus longitudinalis medialis, MV – Medialer Vestibulariskern, MVc – caudaler Teil des MV, MVm – magnozellularer Teil des MV, MVp – parvozellulärer Teil des MV, MZ – Marginalzone des MV, nVII – Nervus facialis, nVIII – Nervus vestibulocochlearis, N VI – Nucl. abducens, PrH – Nucl. prepositus hypoglossi, SCP – Nucl. praesepatus, SV – Superiorer Vestibulariskern, IV – Vierter Ventrikel, Y – Y-Gruppe

3.1.2 Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Affen: retrograde Markierung im Vestibulariskernkomplex

Zur Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im vestibulären Kernkomplex wurden Schnitte von Fällen analysiert, die einen retrograden Tracer in den Nucleus oculomotorius (NIII), (Fall A20, Abb. 7) oder Nucleus abducens (NVI), (Fall Z-8, Abb. 8) erhalten hatten.

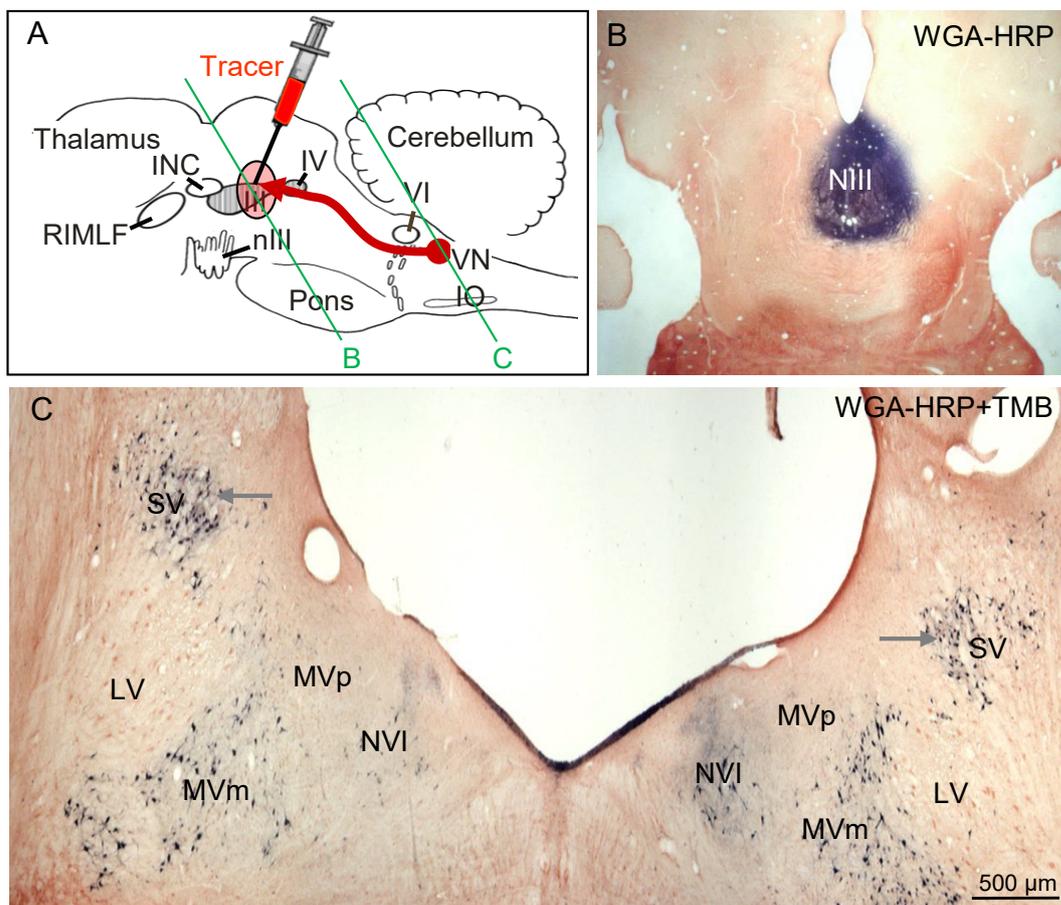


Abb. 7, A: Schema der Tracer-Injektion in den Makaken-Hirnstamm mit Schnittebenen der Abbildungen B und C, Fall A20.

B: Transversalschnitt durch das Mesencephalon eines Rhesusaffen mit Tracer-Injektion von WGA-HRP in den Nucleus oculomotorius (NIII).

C: Transversalschnitt durch das Vestibulariskerngebiet desselben Falls mit Tetramethylbenzidin zum Nachweis von WGA-HRP in den retrograd markierten Neuronen nach Tracer-Injektion in NIII. Retrograd markierte Neurone liegen zahlreich in SV und MVm (graue Pfeile), etwas weniger in MVp, nicht aber im dorsalen LV.

Die Tracer-Injektion in den Okulomotoriuskern (NIII) war relativ groß und umfasste die Kerne beider Seiten, weshalb auch beidseitige Markierungen in den entsprechenden Vestibulariskernen auftraten (Abb. 7).

Die Tracer-positiven Neurone zeigten eine Verteilung, die den weitgehend bekannten Verbindungen (Büttner-Ennever, 1992; Highstein und Holstein, 2006; McMillan et al., 2017) zwischen den Vestibulariskernen und den okulomotorischen Kerngebieten entsprechen (vgl. Abb. 4). Im Bereich des zentralen SV, dessen mittelgroße bis große Neurone zusammen mit dem großzelligen Gebiet des MV (MVm) die Hauptaushangszone der vestibulo-okulomotorischen Projektionen darstellt (Büttner-Ennever, 1992), sind erwartungsgemäß die größte Anzahl der zu den Augenmuskelkernen projizierenden, Tracer-positiven Neurone zu finden (siehe graue Pfeile, Abb. 7 C). Die retrograd markierten Zellen des SV sind klein bis mehrheitlich mittelgroß und vornehmlich oval bis dreieckig geformt. (Abb. 9 A, B). Etwas größer und unregelmäßig geformt sind die retrograd markierten Zellen des MV, die an der Grenze zum LV besonders groß und multipolar erscheinen (Abb. 9 C, D).

Auch im parvozellulären Anteil des MV (MVp) finden sich, vor allem im ventralen Teil, Tracer-positive Zellen, mehrheitlich klein und oval, manchmal auch dreieckig erscheinend (Abb. 9 E, F), die zu den Augenmuskelkernen projizieren (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004). Im Unterschied zu den großen Deiters-Zellen (Abb. 7 C) im dorsalen LV finden sich im kleiner-zelligen ventralen LV zahlreiche Tracer-markierte Neurone, die vermutlich den Ursprung des aufsteigenden Trakts von Deiters (ATD) zum M. rectus medialis-Gebiet im ipsilateralen Nucleus oculomotorius darstellen (McCrea et al., 1987a). Zusätzlich zu Tracer-positiven Neuronen innerhalb der Vestibulariskerne sind auch die internukleären Neurone im Nucleus abducens beidseitig retrograd markiert (Abb. 7 C). Sie projizieren zu den Motoneuronen des M. rectus medialis des kontralateralen Auges und bilden die neuroanatomische Basis von horizontalen konjugierten Augenbewegungen (Steiger und Büttner-Ennever, 1978).

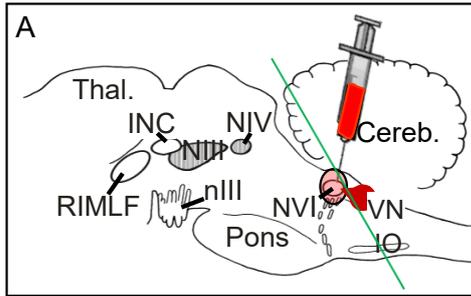


Abb. 8, A: Schema der Tracer-Injektion in den Nucleus abducens (NVI) eines Makaken mit der Schnittebene der Abb. B, Fall Z-8.

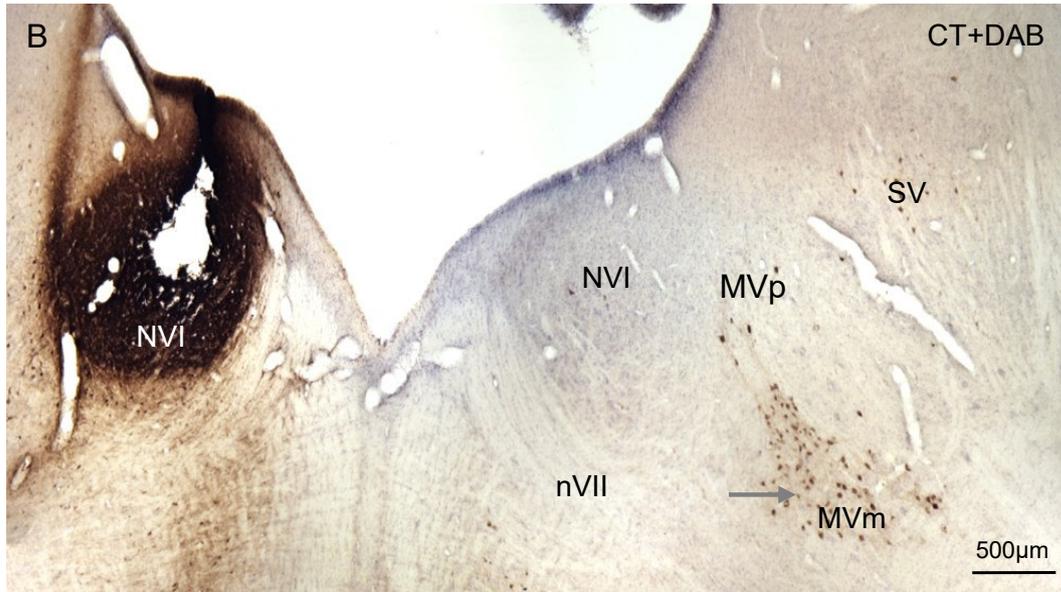


Abb. 8, B: Transversalschnitt mit Tracer-Injektion von Cholera-Toxin (CT) in den Nucleus abducens (NVI) eines Rhesusaffen mit Immunperoxidase-Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) zum Nachweis von CT in den zugehörigen retrograd markierten Neuronen.

Retrograd markierte Neurone finden sich zahlreich im MVp- und MVm-Gebiet (grauer Pfeil), vereinzelt in SV; der LV bleibt ausgespart.

Im zweiten Fall (Z-8) erfasste die Tracer-Injektionsstelle einseitig die Mitte des Abducenskernes mit wenig Kontamination benachbarter Areale (Abb. 8 B). Es fanden sich kontralateral zur Injektionsstelle stark retrograd markierte Neurone vornehmlich im Bereich des magnozellularen MVm an der Grenze zum LV (Abb. 8 B, grauer Pfeil), ähnlich wie nach einer Tracer-Injektion in NIII (vgl. Abb.7). Weiterhin fanden sich kontralateral medio-ventral markierte Neurone, bei denen es sich um zum Abducenskern ziehende inhibitorische Burstneurone des Nucleus dorsalis paragigantocellularis (DPGi) handelt (nicht gezeigt; Spencer et al., 1989).

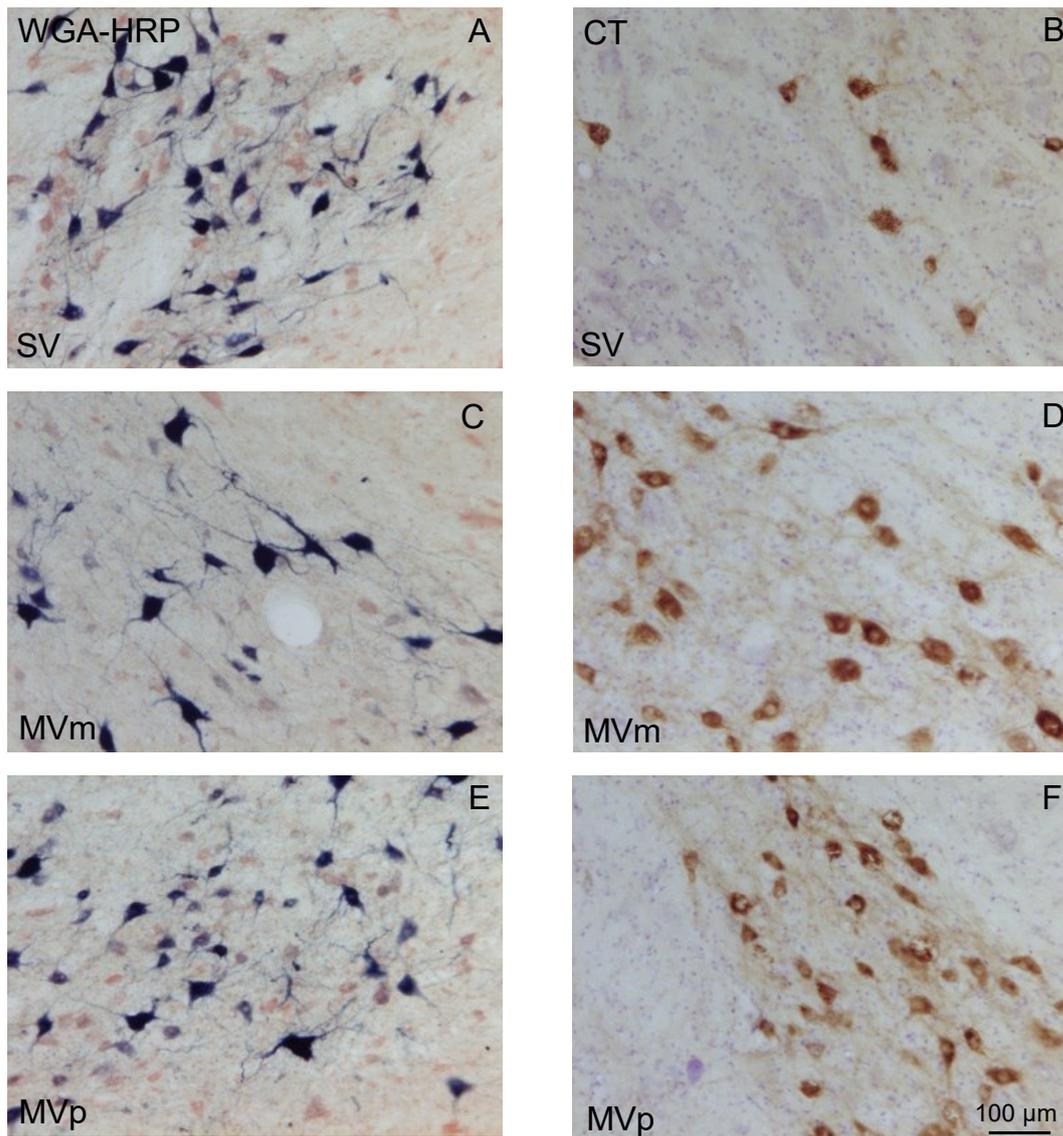


Abb. 9: Detailaufnahmen aus dem Vestibulariskerngebiet zweier Rhesusaffen nach erfolgter Tracer-Injektion von Weizenkeimagglutinin (WGA-HRP) in den Nucleus oculomotorius (A,C,E) beziehungsweise Cholera toxin Untereinheit B (CT) in den Nucleus abducens (B,D,F). Als Tracer-positiv erweisen sich im SV eine Population eher kleinerer, dreieckig bis oval erscheinender Neurone (A,B). Im MVm dominieren größere, multiforme Tracer-positive Neurone (C,D). Tracer-positive Neurone des MVp sind meist klein und dreieckig bis spindelförmig (E,F). Der Maßstab in F gilt für alle Teilabbildungen.

In beiden Fällen (A20 und Z-8) wurden nach Tracer-Injektion in einen Augenmuskelnkern ähnliche Populationen von Neuronen in den Vestibulariskernen MVm und

SV retrograd markiert (Abb. 7,8,9). Diese repräsentieren großteils die sekundären vestibulo-okulären Neurone und sind hier Hauptgegenstand der Untersuchung.

3.1.3 Histologische Charakterisierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Affen

Immunhistochemische Färbung auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) markiert ähnliche Populationen an Neuronen in den Vestibulariskernen des Affen wie nach einer Tracer-Injektion in die Augenmuskelkerne (Abb. 10 A, B). Um früher gemachte Beobachtungen zu überprüfen, ob NP-NF in der Tat in den sekundären vestibulo-okulären Neuronen exprimiert wird, wurden Schnitte aus dieser Studie daraufhin reanalysiert (Ahlfeld et al., 2011). In diesem Fall war WGA in den Nucleus oculomotorius injiziert worden und die retrograd markierten Neurone wurden mit Doppelimmunfluoreszenzfärbungen auf WGA und NP-NF auf die Anwesenheit des Filaments überprüft (Abb. 10 C, D).

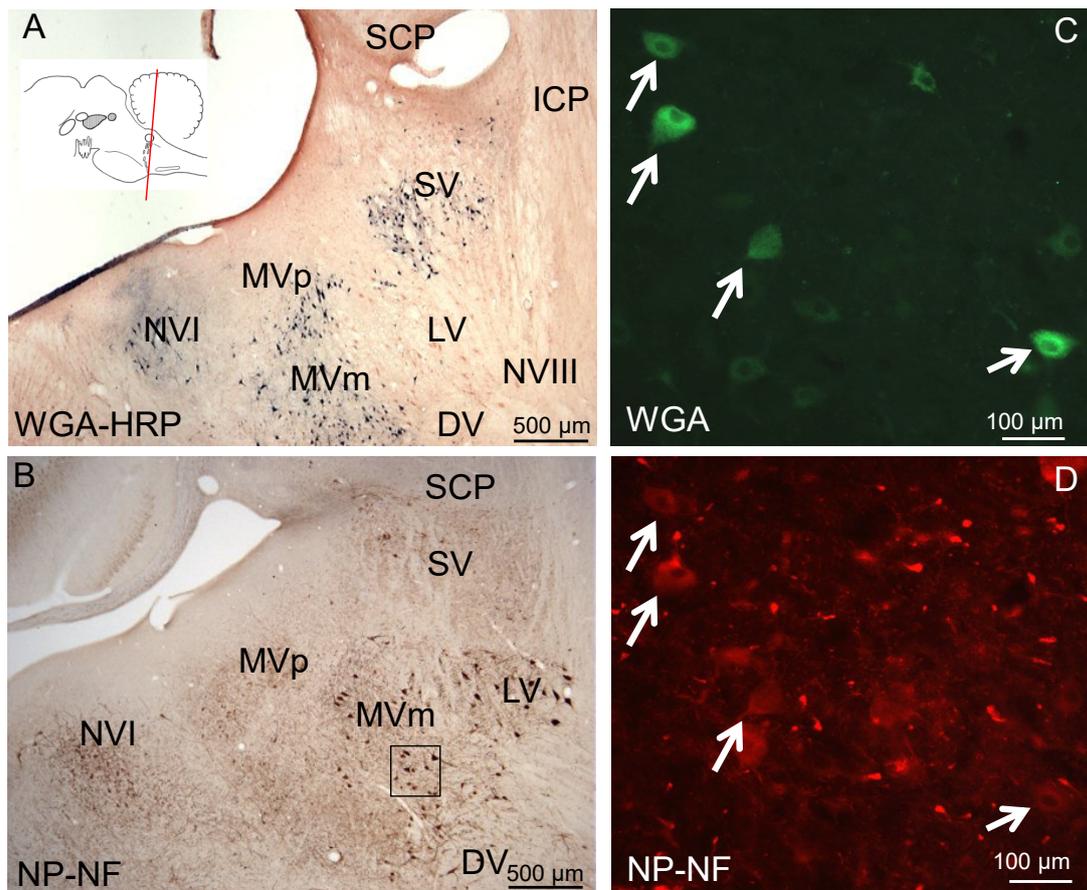


Abb.10: (A und B modifiziert mit Abdruckgenehmigung von McMillan et al., 2017) Transversalschnitte in Höhe des Vestibulariskernkomplexes eines Rhesusaffen zeigen das Verteilungsmuster retrograd markierter vestibulo- okulärer Neurone nach Tracer-Injektion in den Nucleus oculomotorius (A), mit deutlichen Markierungen in SV und MVm sowie einigen Markierungen in MVp und NVI. Ein Vergleichsbild (B) mit immunhistochemischer Färbung auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) zeigt in SV, MVm, MVp und NVI ähnliche Neuronengruppen wie nach erfolgter Tracer-Injektion. In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf Weizenkeimmagglutinin (WGA) in grün (C) und NP-NF in rot (D) zeigt sich, dass die Tracer-positiven Neurone des MVm (weiße Pfeile, C) NP-NF enthalten (weiße Pfeile, D).

Hierbei zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit der Tracer-positiven Neurone auch nicht-phosphoryliertes Neurofilament exprimieren (Abb. 10 C, D). Die Analyse der Tracer-markierten Neurone auf NP-NF-Expression zeigte, dass innerhalb der NP-NF-positiven Zellen des MV-Gebiets eher die größeren, multiformen Neurone doppelt gefärbt waren (Ahlfeld et al., 2011; McMillan et al., 2017). Damit kann NP-NF als ein histochemischer Marker für die vestibulo-okulären

Neurone dienen, der in Zusammenschau mit topographischen und morphologischen Kriterien die Identifikation der Gruppe der sekundären vestibulo-okulären Neurone auch beim Menschen ermöglichen könnte.

3.2 Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Vestibulariskerngebiet des Menschen

Durch die Ähnlichkeit der Vestibulariskernkomplexe zwischen Affen und Menschen lassen sich die vier Vestibulariskerne ohne größere Schwierigkeiten auch beim Menschen auffinden und voneinander abgrenzen (vgl. Abb. 11).

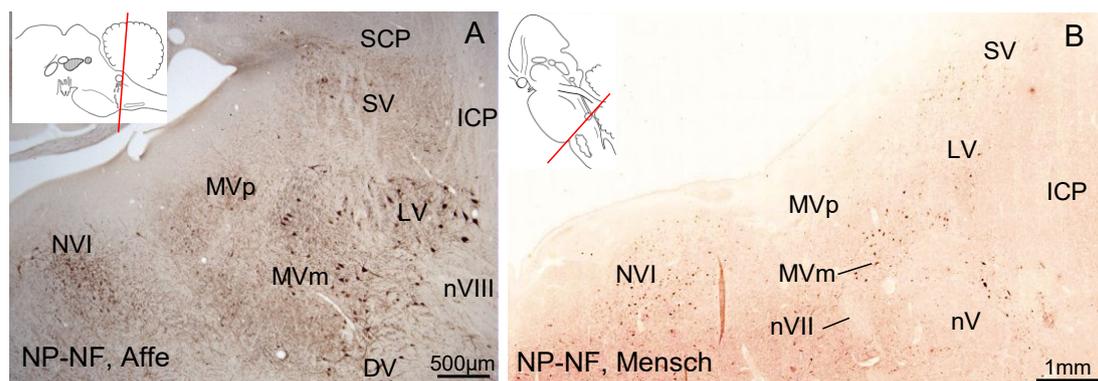


Abb. 11: (A und B modifiziert mit Abdruckgenehmigung von McMillan et al., 2017) Auf NP-NF angefärbte Transversalschnitte durch das Vestibularis-kerngebiet des Rhesusaffen (A) und des Menschen (B) zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster NP-NF-exprimierender Zellen.

ICP – unterer Kleinhirnstiel, LV – Lateraler Vestibulariskern, MV – Medialer Vestibulariskern, MVc – caudaler Teil des MV, MVm – magnozellularer Teil des MV, MVp – parvozellulärer Teil des MV, nV – Nervus trigeminalis, nVII – Nervus facialis, nVIII – Nervus vestibulocochlearis, NVI – Nucl. abducens, SCP – oberer Kleinhirnstiel, SV – Superiorer Vestibulariskern

3.2.1 Topographie und Histologie der Vestibulariskerne beim Menschen

Um die Anteile des Vestibulariskern-Komplexes genauer identifizieren zu können und mehr Sicherheit bei der späteren Interpretation der auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) gefärbten Schnitte zu erhalten wurde in regelmäßigen

Abständen eine Übersichtsfärbung mit Luxol-Fast-Blue (LFB) angefertigt und gesichtet (Abb. 12). Für die Analyse der Schnitte wurde der Atlas von Olszewski und Baxter und eine Übersichtsarbeit von Büttner-Ennever und Gerrits (Büttner-Ennever und Horn, 2014; Büttner-Ennever und Gerrits, 2004) herangezogen.

Als rostrale Grenze des auf sekundäre vestibulo-okuläre Neurone zu untersuchenden Suchfensters wurde der Bereich des motorischen Trigeminskerns (MoV) definiert, da sich auf dieser Höhe, ventral des superioren Kleinhirnstiels (SCP) in der lateralen Wand des vierten Ventrikels, das rostralste Ende des Superioren Vestibulariskerns (SV) befindet (Abb. 12 A). In der nach caudal folgenden Schnittebene ist bereits der Laterale Vestibulariskern (LV) neben dem SV erkennbar, der seinerseits lateral vom inferioren Kleinhirnstiel (ICP) flankiert wird (Abb. 12 B). Das LV-Gebiet wird von teilweise auffälligen dorsoventral verlaufenden Fasern des juxtarestiformen Körpers durchzogen (Abb. 12 C, D). Ebenfalls in der Schnittebene des Bildes B sind der beginnende Abducenskern (N VI) und der noch recht horizontal verlaufende Nervus facialis (n7) erkennbar, der hier die ventromediale Grenze des SV bildet (Abb. 12 B).

Auf Höhe des caudalen Abducenskerns übernimmt der Mittlere Vestibulariskern (MV) mit seinem parvozellulären Anteil (MVp) den Platz an der ventrolateralen Ventrikelwand lateral des Abducenskerns (Abb. 12 D). Der magnozellanuläre Anteil (MVm) des MV findet sich in einem annähernd dreieckigen Gebiet medioventral des LV im Mündungsgebiet des N. vestibulocochlearis (n8) (Abb. 12 E). Der MV, der den größten der Vestibulariskerne darstellt, erstreckt sich mit seinem parvo- und magnozellanulärem Anteil - lateral nach wie vor vom LVN flankiert - bis in die Region des Nucleus präpositus hypoglossi (PrH), der medial an Stelle des Nucleus abducens sichtbar wird (Abb. 12 F).

Ab dieser Schnitthöhe sind die Anfänge des Deszendierenden Vestibulariskerns (DV) zu erkennen, der im weiteren Verlauf den Platz des LV am Rand des Inferioren Kleinhirnstiels (ICP) übernimmt und seinerseits von starken – diesmal aber in longitudinaler Richtung verlaufenden – Faserbündeln gekennzeichnet ist (Abb. 12 G, H). Medial des aufgrund dieses Faserverlaufs „scheckig“ wirkenden DV ist unterhalb der Einmündung des Nervus glossopharyngeus (n9) der caudale dritte Anteil des Medialen Vestibulariskerns (MVc) zu finden (Abb. 12 G, H). Nachdem

davon auszugehen ist, dass sich die sekundären vestibulo-okulären Neurone vornehmlich im Bereich des SV und MV-Gebiet befinden (siehe Einleitung), wurde die cranio-caudale Ausdehnung des Suchfensters auf den Bereich zwischen dem motorischen Trigeminskern (Mot5) (Abb. 12 A) bis zum Ende der magno- und parvozellulären Zone des Medialen Vestibulariskerns (Abb. 12 F) eingegrenzt.

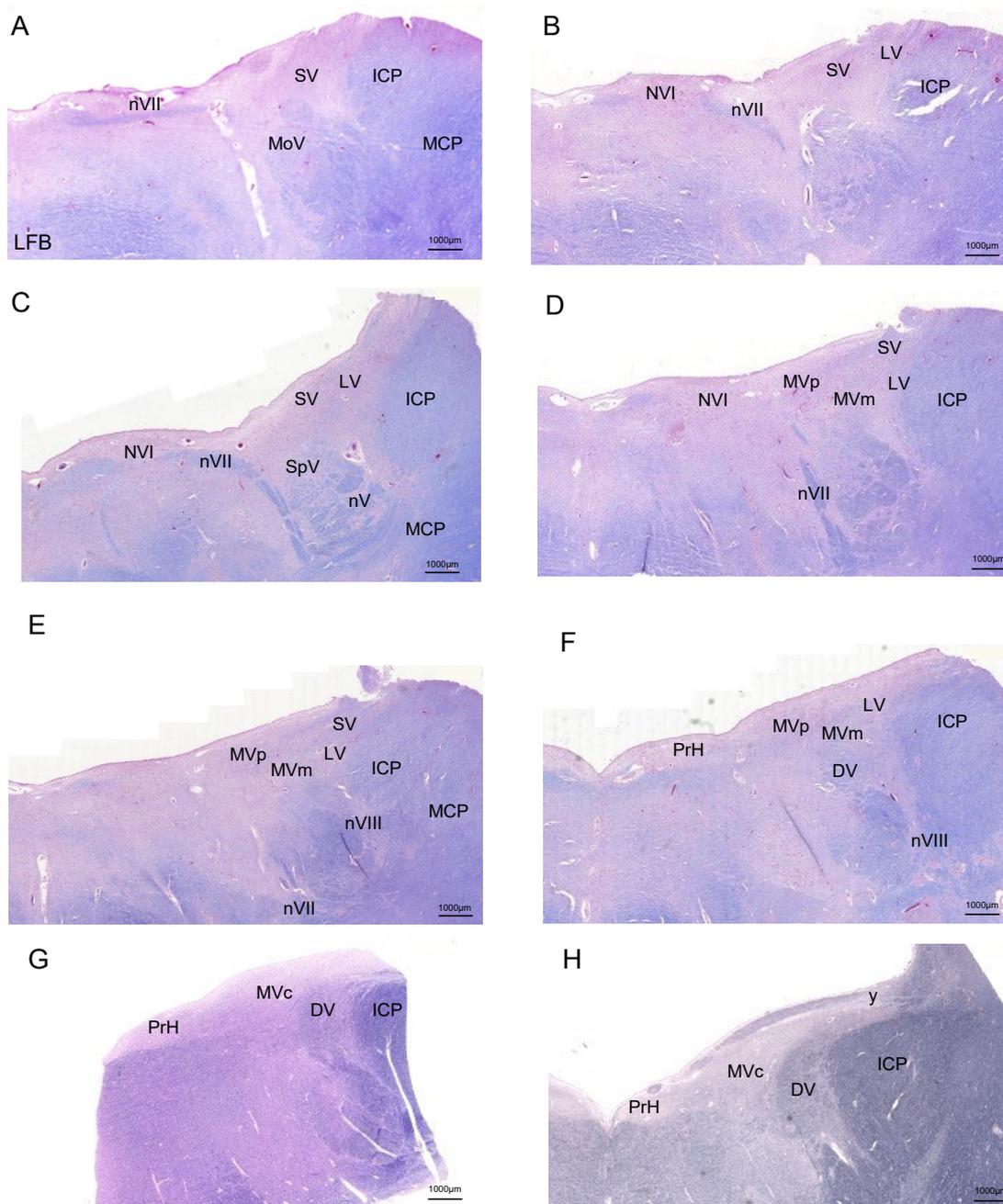


Abb. 12: Transversalschnitte durch das Vestibulariskerngebiet des Menschen mit Luxol-Fast-Blue-Färbung (LFB) zur Demonstration der Lage und Zytoarchitektur der Einzelkerne. Das Suchfenster für sekundäre vestibulo-okuläre Neurone wurde auf das Gebiet zwischen dem motorischen Trigeminskern (MoV) (A) bis zum caudalen Ende des MVm und MVp eingegrenzt (F).

DV – Deszendierender Vestibulariskern, ICP – unterer Kleinhirnstiel, LV – Lateraler Vestibulariskern, MCP – mittlerer Kleinhirnstiel, MV – Medialer Vestibulariskern, MVc – caudaler Teil des MV, MVm – magnocellulärer Teil des MV, MVp – parvozellulärer Teil des MV, nV – Nervus trigeminalis, nVII – Nervus facialis, nVIII – Nervus vestibulocochlearis, NVI – Nucl. abducens, PrH – Nucl. praepositus hypoglossi, SV – Superiorer Vestibulariskern, Y – Y-Gruppe

3.2.2 Histologische Charakterisierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Menschen

NP-NF-exprimierende Neurone fanden sich beim Menschen, genau wie beim Affen, im gesamten Vestibulariskerngebiet (Abb. 11). In den auf NP-NF-gefärbten Schnitten zeigte sich eine starke Immunoreaktivität innerhalb der Hirnnervenkerne VI und VII sowie dem interstitiellen Nucleus des VIII. Hirnnerven (18). Innerhalb der Vestibulariskerne zeigte sich im Vergleich zu den Hirnnervenkernen eine insgesamt etwas schwächere Markierung.

Die stärkste Markierung in den mit Abstand größten Zellen, ließen sich dem LV zuordnen (Abb. 13 C, E). Diese auffallend großen, Lipofuszin-reichen NP-NF-positiven Neurone, die verstreut in und teilweise auch als loses Zellband am Rand der dorsoventral verlaufenden juxtarestiformen Fasern liegen, entsprechen den Deiters-Zellen (Abb.13 C). Diese Neurone wurden beim Affen nicht retrograd markiert und sind somit keine vestibulo-okulären Neurone, sondern projizieren in das Rückenmark (Shinoda et al., 2006; Highstein und Holstein, 2006; Akaike, 1983; Holstein, 2012; Büttner-Ennever und Horn, 2014). Die neben den riesigen LV-Neuronen im Mündungsgebiet des Achten Hirnnerven (n8) anzutreffenden, unregelmäßig geformten NP-NF-positiven Neurone des MVm sind vornehmlich mittelgroß bis groß, jedoch deutlich kleiner und rundlicher als die Deiters-Neurone im LV (Abb. 13 D). Diese mittelgroßen Zellen des MVm findet man vor allem auf Höhe des unteren N VI, wo sie verstreut zwischen etwas kleineren NP-NF-negativen Neuronen liegen (Abb. 13, 15). Nach medial gehen sie in die kleinzelligere Zone des MVp über, die ebenfalls zahlreiche NP-NF-positive Zellen enthält (Abb. 13 B, E). Auch im caudalen Anteil (MVc) des MV finden sich kleinere NP-NF-positive Neurone. Innerhalb des SV befindet sich die NP-NF-positive Zellpopulation in zentraler Lage, vornehmlich in mittleren Schnitthöhen des Kerns (Abb. 14). Gegenüber den MVm-Neuronen erscheinen diese Neurone etwas kleiner und rundlicher geformt und entsprechen damit näherungsweise den Beobachtungen aus Tracer-positiven entsprechenden Regionen des Affengewebes (siehe Abb. 9, 11, 13).

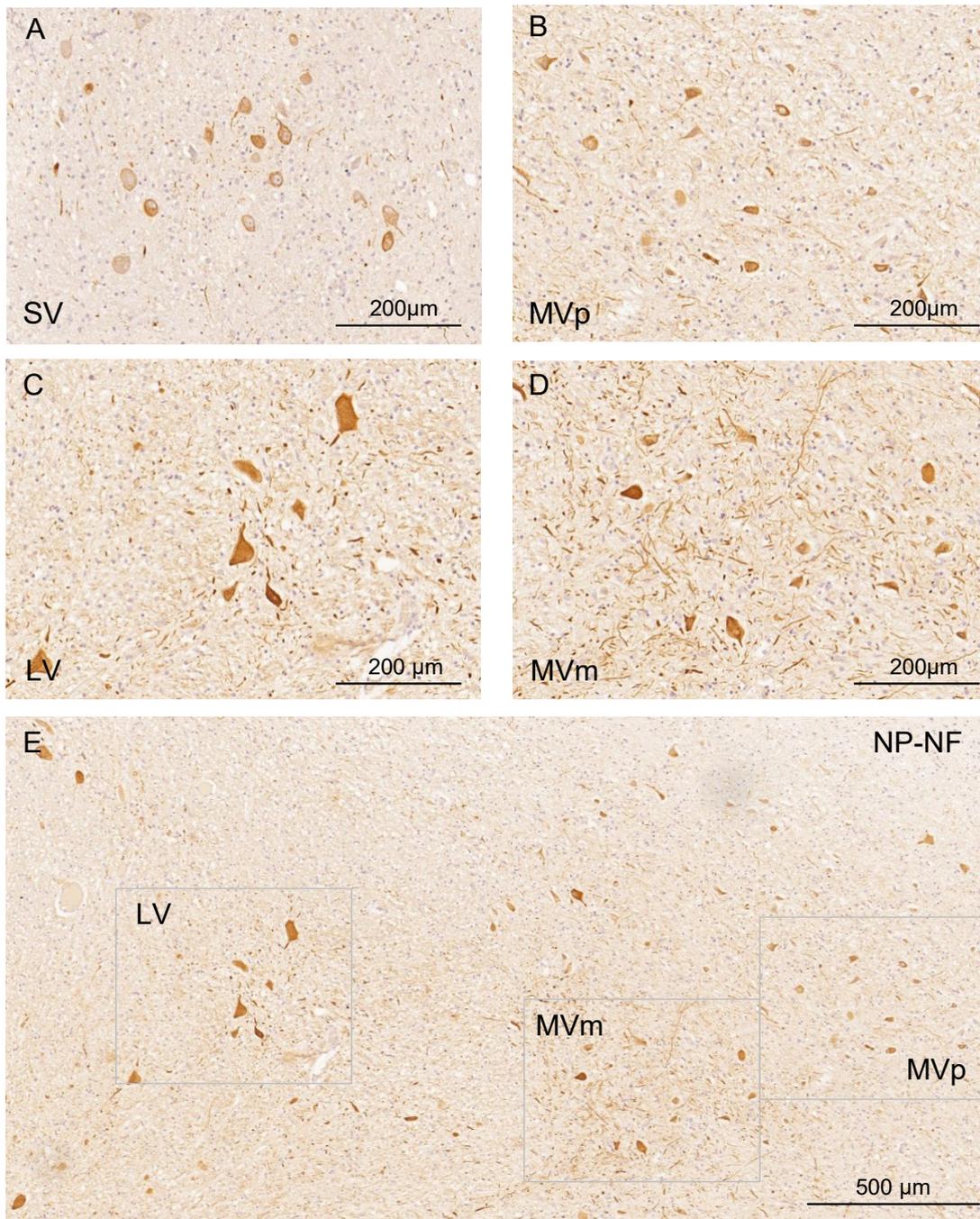


Abb. 13: auf NP-NF gefärbte Transversalschnitte durch das Vestibulariskerngebiet des Menschen auf Höhe des Nucleus präpositus hypoglossi mit Neuronen des MV und LV in der Übersicht (E) und im Detail (B,C,D). Im SV dominieren regelmäßig geformte, rundliche, mittelgroße Neurone (A). Die etwas größeren, multiformen Neurone des MVm (D) heben sich gut von den vielen, kleineren Neuronen des MVp (B) sowie den sehr großen Deiters-Neuronen des LV (C) ab.

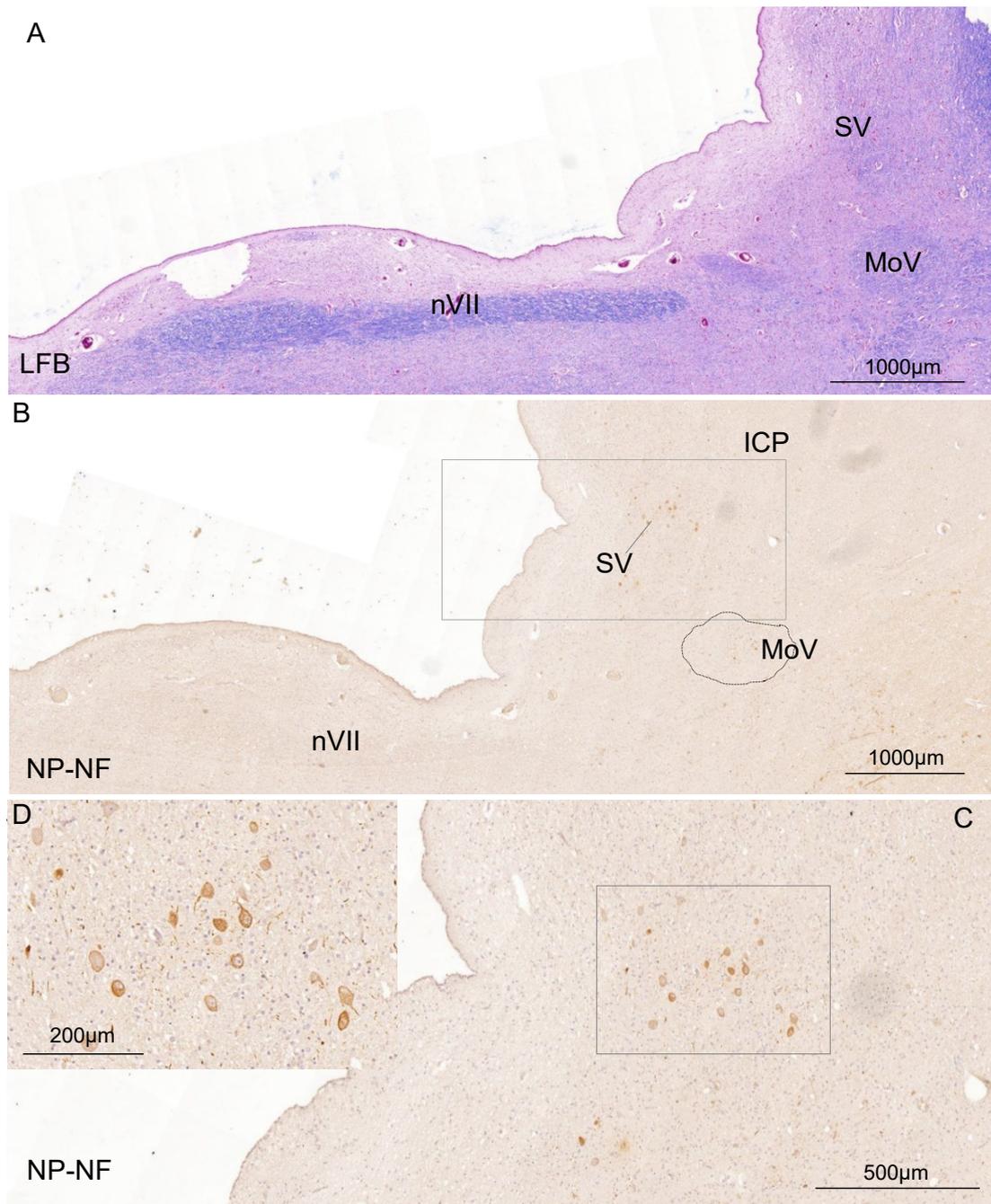


Abb. 14: Der auf NP-NF gefärbte Transversalschnitt durch das Vestibulariskerngebiet des Menschen in Höhe des motorischen Trigemuskerns (MoV), zeigt in der Übersicht (B) und im Detail (C,D) die regelmäßig geformten, rundlichen, mittelgroßen Neurone des SV-Gebiets. Bild A dient mit einem Luxol-Fast-Blue gefärbten Schnitt der gleichen Region der besseren Orientierung.

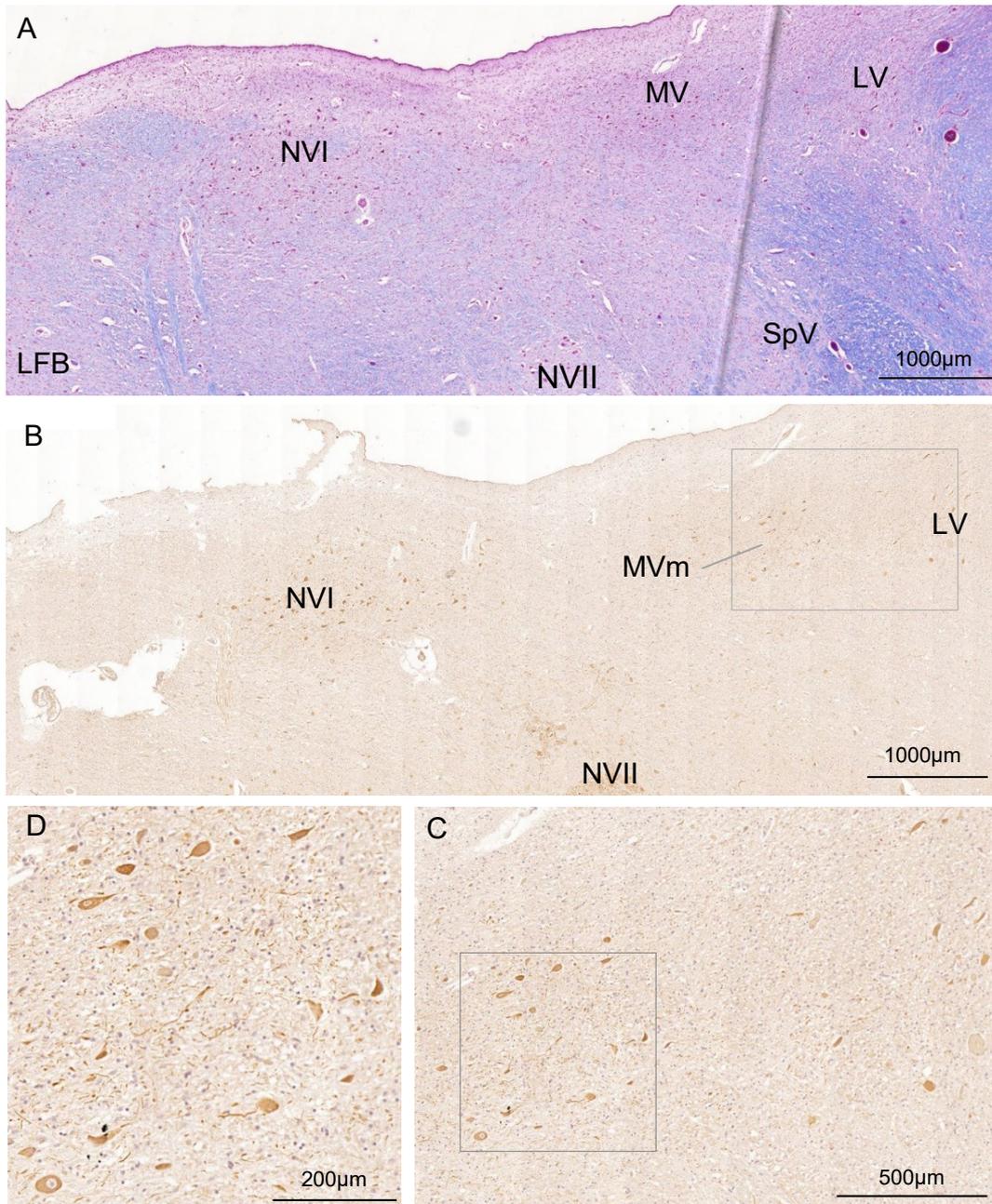


Abb. 15: Der auf NP-NF gefärbte Transversalschnitt durch das Vestibulariskerngebiet des Menschen auf Höhe des Nucleus abducens (NVI) zeigt in der Übersicht (B) und im Detail (C,D) die mittelgroß bis großen, etwas unregelmäßig geformten Neurone des MV-Gebiets. Bild A dient mit einem Luxol-Fast-Blue gefärbten Schnitt der gleichen Region der besseren Orientierung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Zone der mittelgroßen bis großen NP-NF-exprimierenden Neurone von den mittleren Schnitthöhen des SV bis in das obere Drittel des MV im Grenzgebiet zum LV reicht und somit hinsichtlich

der Verteilung sowie auch der Zytoarchitektur den großen, Tracer-markierten sekundären vestibulo-okulären Neuronen im Affengewebe entspricht (vgl. Abb. 11 A, B). Deshalb werden diese Neurone in der weiteren Arbeit als putative sekundäre vestibulo-okuläre Neurone im Menschen angenommen (McMillan et al., 2017). Aufgrund ihrer Größe, Morphologie und Lage können sie leicht von den Deiters-Zellen im LV abgegrenzt werden, die keine vestibulo-okulären Neuronen sind.

3.3 Klinische Übertragung: Anteil degenerierter sekundärer vestibulo-okulärer Neurone im Vestibulariskerngebiet in unterschiedlichen Erkrankungsstadien der Progressiven supranukleären Parese (PSP)

Um im Rahmen eines Pilotprojekts zu klären, inwieweit sekundäre vestibulo-okuläre Neurone in PSP-Fällen unterschiedlich schwerer okulomotorischer Symptomatik von Neurodegeneration betroffen sind, wurden Nachbarschnitte jeweils auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) und hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8) – als Marker für Neurodegeneration – angefärbt. Die gefärbten Präparate wurden eingescannt und die digitalisierten Bilder am Bildschirm miteinander verknüpft angezeigt und ausgewertet. Durch die simultane Aufrufbarkeit und Verknüpfung korrespondierender Zonen auf zwei unterschiedlich angefärbten Nachbarschnitten konnte bei hoher Vergrößerung dasselbe Neuron auf beiden benachbarten Schnitten identifiziert und analysiert werden. Auf diese Weise konnten die durch die Färbung auf NP-NF sowie durch topographisch-morphologische Gesichtspunkte eingegrenzten, putativen sekundären vestibulo-okulären Neurone auf Ebene der Einzelzelle mit einem Marker für Neurodegeneration (AT-8) untersucht werden.

Aus dem Verhältnis ausschließlich NP-NF-exprimierender Neurone zu gleichzeitig NP-NF- als auch AT-8-positiver Neurone konnte daraufhin eine Tendenz über das Ausmaß der Neurodegeneration in unterschiedlichen Erkrankungsstadien der PSP ermittelt werden.

Innerhalb der in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden acht PSP-Gewebeproben zeigten sich teilweise recht große Dichteunterschiede der NP-NF-positiven Neurone in entsprechenden Vestibulariskern-Arealen. Ein Zusammenhang zwischen der NP-NF-markierten Neuronenzahl und dem jeweiligen Patientenalter konnte allerdings in den verwendeten Fällen nicht festgestellt werden. In den beiden näherungsweise altersentsprechenden Kontrollen (62a und 71a) war insgesamt eine geringgradig höhere Zahl NP-NF-positiver Neurone erkennbar. Tendenziell zeigte sich bei den verwendeten Proben höheren Lebensalters ein verstärkter Lipofuszin-Gehalt der Neurone.

3.3.1 Anteil AT-8-positiver sekundärer vestibulo-okulärer Neurone gesamt

Um einen Überblick über das generelle Ausmaß der Degeneration im Vestibulariskerngebiet zu erhalten, wurden zunächst die NP-NF-positiven Vestibularisneurone aller Vestibulariskerne ausgewählter Schnitthöhen – beginnend im Bereich des SV bis zu caudalen Ebenen des MV – auf ihren AT-8-Gehalt hin untersucht. Dabei zeigten sich auch in anderen in diesem Hirnstammgebiet angetroffenen Strukturen teilweise deutliche AT-8-Markierungen. Neben Markierungen im Vestibulariskerngebiet fanden sich auch regelhaft hyperphosphoryliertes Tau-Protein im Nucleus abducens (NVI) und facialis (NVII), im Fall VII auch im Nucleus præpositus hypoglossi (PrH). Gänzlich frei von AT-8-Markierung zeigten sich dagegen die Fasern der Hirnnerven nVI, nVII und nVIII sowie regelhaft die obere Olive (Abb. 16).

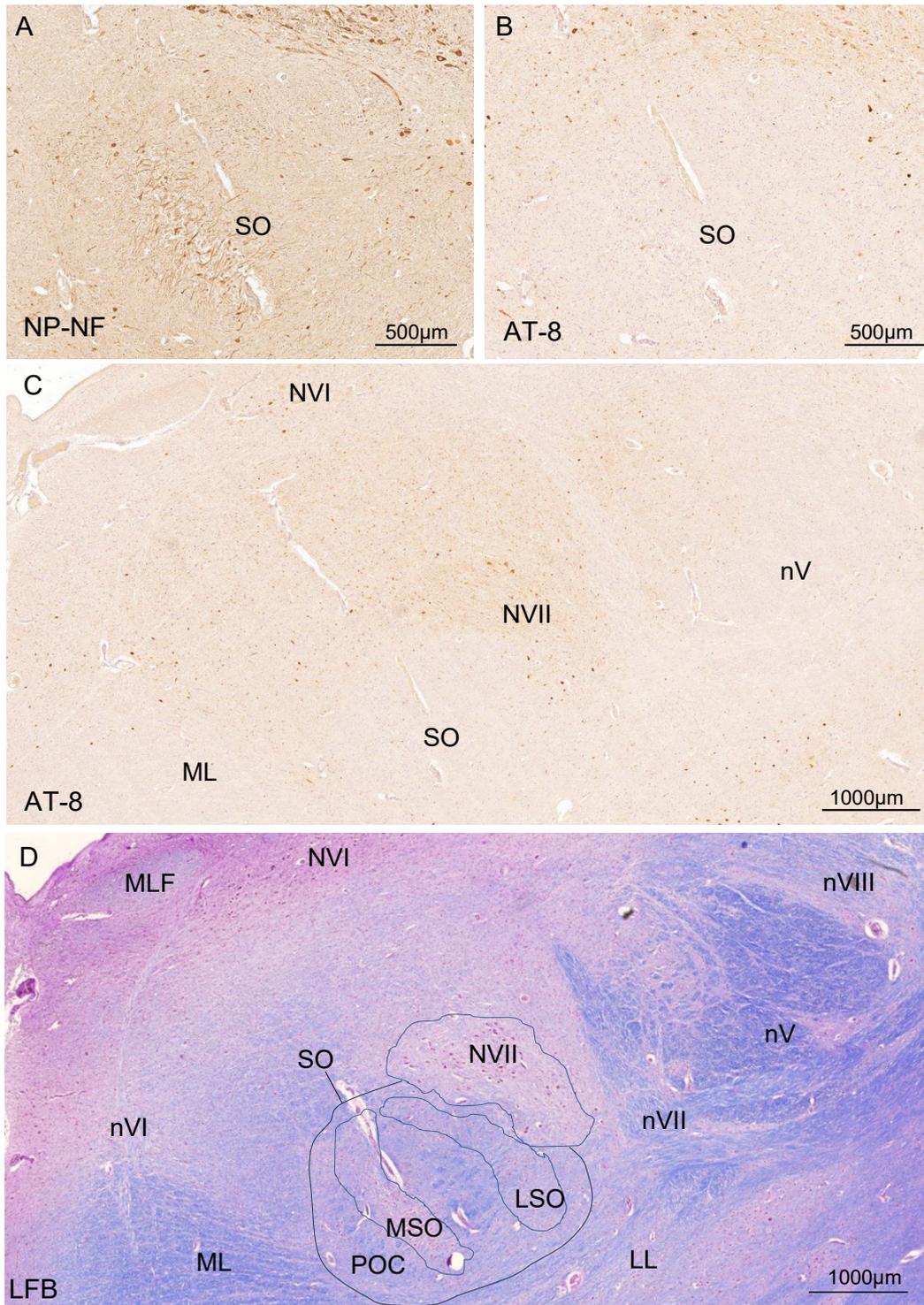


Abb.16: Transversalschnitt auf Höhe des Nucleus facialis (NVII), mit Färbung auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8) in der Übersicht (C) und im Detail (B) mit selektiver Aussparung der Oliva superior (SO). Detailbild A zeigt dieselbe Region auf einem NP-NF-gefärbten Nachbarschnitt. Der mit Luxol-Fast-Blue (LFB) gefärbte Schnitt der gleichen Region dient ebenfalls der Orientierung (D).

LL – Lemniscus lateralis, LSO – Oliva superior lateralis, ML - Lemniscus medialis, MSO – Oliva superior medialis, POC – periolivarer Complex, SO – Oliva superior

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt in der vergleichenden Analyse der Vestibulariskerne hinsichtlich des Degenerationsgrads der sekundären vestibulookulären Neurone. Eine Aussage über das grobe Ausmaß der Degeneration in unterschiedlichen Erkrankungsstadien ist in der Abb. 17 ersichtlich.

Auffällig ist hierbei, dass Fall I (Abb. 17, I), mit der geringsten dokumentierten Augenbewegungsstörung, einen äußerst niedrigen Anteil hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8)-exprimierender Neurone (1 % aller NP-NF-positiven Neurone) aufweist und Fall VIII (Abb. 17, VIII) mit der ausgeprägtesten Symptomatik über den mit Abstand höchsten Anteil (65 %) AT-8-positiver Neurone verfügt. Zwischen den beiden Extrempunkten der Skala, die der geringsten (Fall I) beziehungsweise der ausgeprägtesten okulären Symptomatik (Fall VIII) entsprechen, reihen sich (bis auf Fall III) die übrigen Erkrankungsstadien ein. Fall II – ein recht frühes Erkrankungsstadium – besetzt mit einem Anteil von ca. 10 % AT-8 positiver Neuronen den zweiten Platz. Mit mittleren Werten zwischen 37 % und 48 % AT-8-positiver Neurone folgen daraufhin die Fälle IV, V, VII und VI, die allesamt mittlere bis mittelschwere Symptome aufwiesen. Der Fall III hingegen, der in dieser Arbeit aufgrund – allerdings recht lückenhafter – Dokumentation einem Stadium II zugeordnet wurde, reißt aus diesem Schema deutlich aus.

Hervorzuheben bleibt außerdem, dass es keine allein AT-8-positiven Neurone innerhalb der Vestibulariskerne gab, sich die Neurodegeneration also auf die Gruppe der NP-NF-positiven Neurone beschränkte.

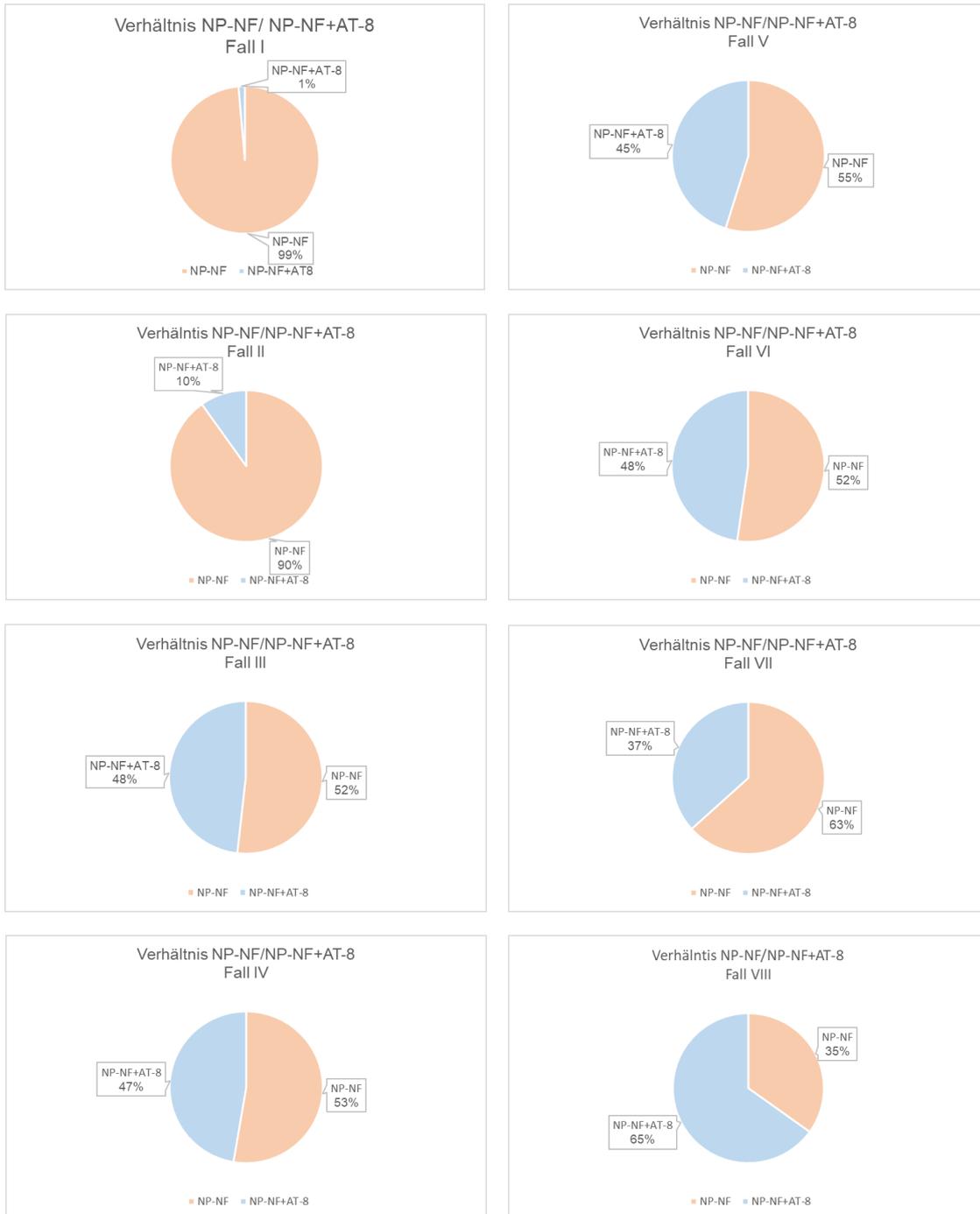


Abb. 17: grobes Ausmaß der Tau-Pathologie im untersuchten Vestibulariskerngebiet. Aufsteigend sortiert nach Schweregrad der okulomotorischen Symptomatik (I-VIII). Orange: Anteil der nur NP-NF-positiven Neurone in %; Blau: Anteil der gleichzeitig NP-NF- und AT-8-positiven Neurone in %.

3.3.2 Anteil AT-8-positiver sekundärer vestibulo-okulärer Neurone in den einzelnen vestibulären Kerngebieten des vertikalen VOR

Für die Fragestellung der Beteiligung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Krankheitsgeschehen der PSP sind vor allem die Ursprungsgebiete der sekundären Neurone des vertikalen VOR von Interesse, weshalb der Fokus der zu untersuchenden Zellen auf den größeren Neuronen des SV- und MVm-Gebietes lag.

Abbildung 18 zeigt exemplarisch Detailaufnahmen aus den Schnitten der SV- und MVm-Gebiete in Fällen unterschiedlich starker okulärer Beteiligung bei PSP.

Deutlich erkennbar sind Unterschiede im Anteil AT-8-positiver Neurone zwischen Stadium I und IV. Stadien II und III weisen dagegen keine so deutlichen Unterschiede auf.

Stadium I und II,
keine bis schwache
Augenmotorik-
störungen

Stadium III,
vertikale und
horizontale
Blickparese

Stadium IV,
komplette
Blickparese
und VOR-Ausfall

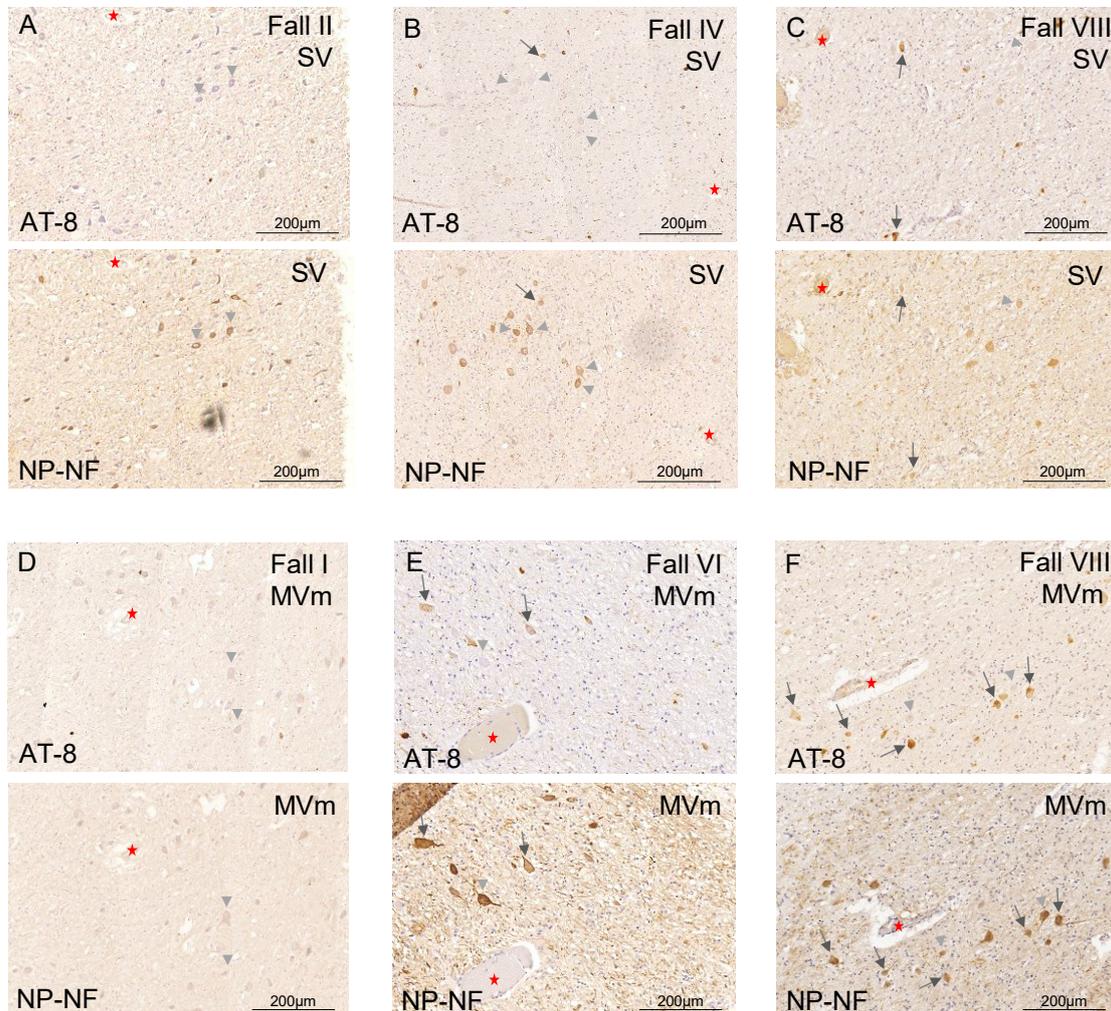


Abb. 18: Detailausschnitte aus Nachbarschnitten des SV- und MVm-Gebiets mit Färbung gegen hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8, obere Reihe) und nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF, untere Reihe). Eine kontinuierliche Zunahme der Neurodegeneration von Stadien mit geringen okulomotorischen Einschränkungen (Bild A+D), in denen kaum neuronale Beteiligung sichtbar ist, über mittlere Stadien (Bild B+E), mit bereits deutlicheren Anzeichen der Degeneration, bis zu Stadien mit ausgeprägter okulomotorischer Symptomatik (Bild C+F) und ausgeprägter Neurodegeneration ist erkennbar.

Pfeile kennzeichnen Beispiele AT-8-positiver, NP-NF-markierter Neurone.
Pfeilspitzen kennzeichnen AT-8-negative, NP-NF-markierte Neurone.

Die Auswertung der Einzelkerne SV und MVm ist detailliert mit den Werten der jeweiligen Einzelschnitte in Abb. 19 ersichtlich. Aufgrund der unterschiedlichen Konnektivität der verschiedenen MV-Gebiete wurden MVP und MVc nicht mehr in die nähere Betrachtung miteinbezogen.

Leider war das zur Verfügung stehende Material nicht in allen Fällen ausreichend, um eine annähernd repräsentative Schnitt- bzw. Neuronenzahl zu ermitteln, weshalb für die Fälle I und V der Superiore Vestibulariskern (SV) und für die Fälle II und IV der Mediale Vestibulariskern (MV) nicht gewertet wurden.

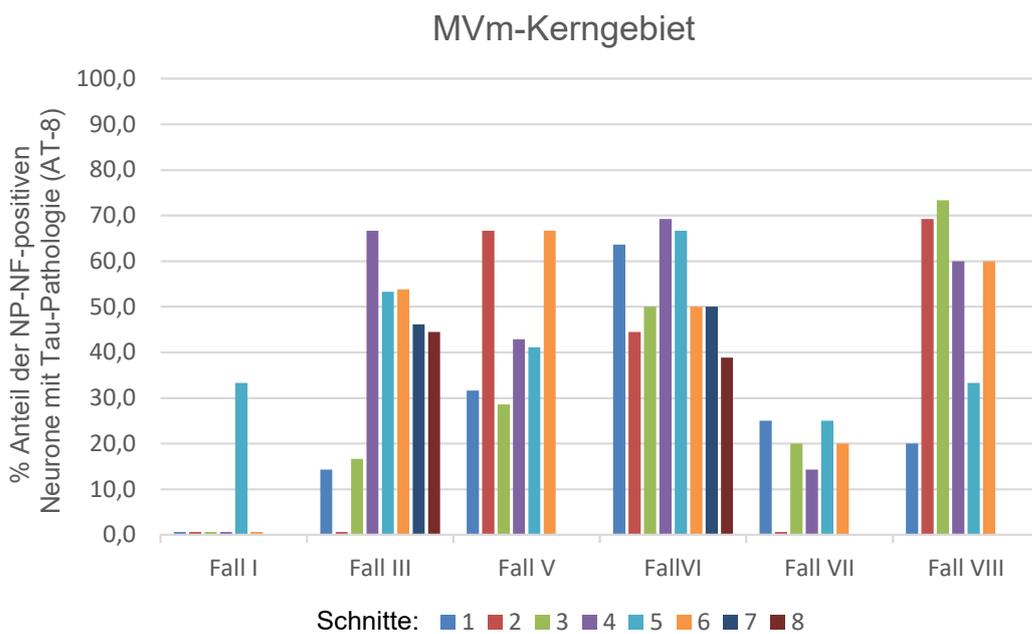
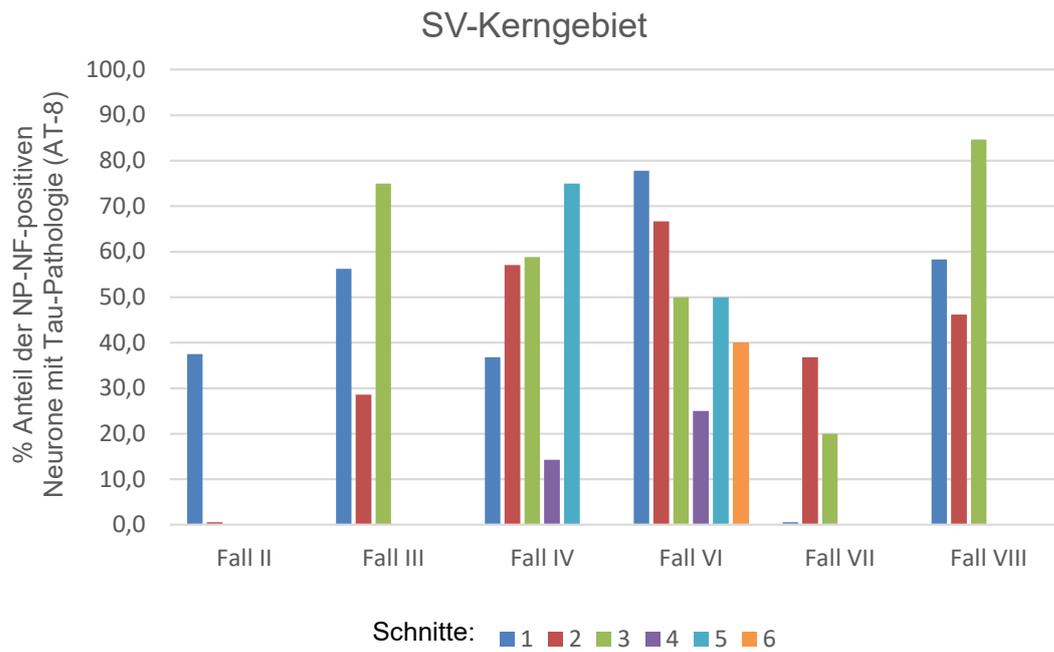


Abb. 19: Auswertung der Einzelschnitte des SV- und MVm- Gebiets aller PSP-Fälle, sortiert nach Stadienzuteilung. Die Balken zeigen den Anteil der AT-8-positiven sekundären vestibulo-okulären Neurone (NP-NF) bezüglich der Gesamtzahl aller jeweils im Schnitt getroffenen NP-NF-positiven Neurone des SV bzw. MVm.

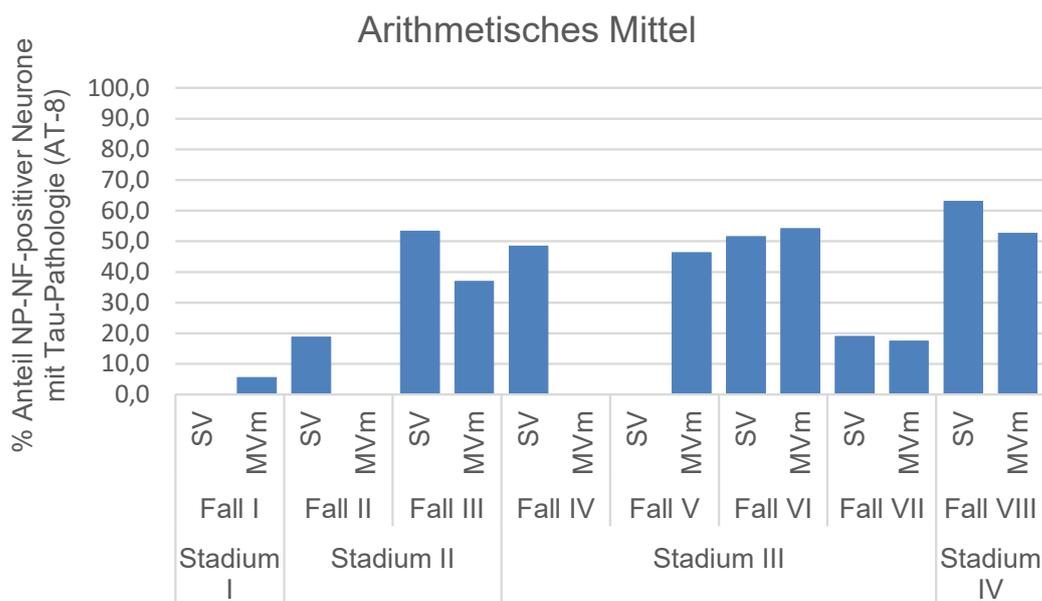


Abb. 20: gemittelte Werte des AT-8-Anteils aller sekundären vestibulo-okulären Neurone aller Einzelschnitte jeweils des SV und MVm-Gebiets; aufsteigend sortiert nach Stadienzuteilung.

Abb. 20 zeigt einen Überblick über die gemittelten Werte des Verhältnisses aller NP-NF zu AT-8 positiven Neurone aller Einzelschnitte, jeweils bezüglich des Superioren (SV) und magnozellulären Medialen Vestibulariskerns (MVm).

In dieser Analyse zeigt sich für den SV erneut die Tendenz vermehrter Expression hyperphosphorylierten Tau-Proteins in Fällen ausgeprägter okulomotorischer Symptomatik. Einen „Ausreißer“ bildet dabei wieder der Fall III. Für den MVm bestätigt sich diese Tendenz für das Anfangsstadium der Erkrankung; der Zusammenhang zwischen der progressiven Zunahme der Augenbewegungsstörung und steigenden Anteilen AT-8-positiver Neurone wiederholt sich dabei allerdings nicht so deutlich wie im SV-Gebiet.

Bezüglich der dokumentierten Auslösbarkeit des vertikalen VOR, zeigt der Fall VIII, mit kompletter Blickparese und Ausfall des VOR (=Stadium IV), für das SV-Gebiet den höchsten Anteil AT-8-positiver Neurone. Etwas geringfügiger betroffen folgt der Fall VI, dem aufgrund der kompletten Blickparese bei erhaltenem VOR das Stadium III zugeordnet worden war (vgl. Tab. 4). Im MV-Gebiet übertrifft der AT-8-Anteil des Falles VI den (hinsichtlich der Augenmotilität am schwersten

betroffenen) Fall VIII sogar geringfügig. Der Anteil des AT-8-Gehalts an der Population sekundärer vestibulo-okulärer Neurone der Fälle I und V, für die ebenfalls ein erhaltener VOR dokumentiert ist, passt gut zum Schweregrad der jeweilig dokumentierten anderweitigen Augenmotorikstörungen (vgl. Tab. 4). Für die Fälle II, III, IV und VII ist leider die Auslösbarkeit des VOR nicht dokumentiert (vgl. Tab. 3).

Die Werteverteilung hinsichtlich des Anteils AT-8 positiver Neurone und das Verhältnis der Neurodegeneration zum unterschiedlichen Ausmaß der okulären Beteiligung lässt sich aus dem Boxplot in Abb. 21 gewinnen.

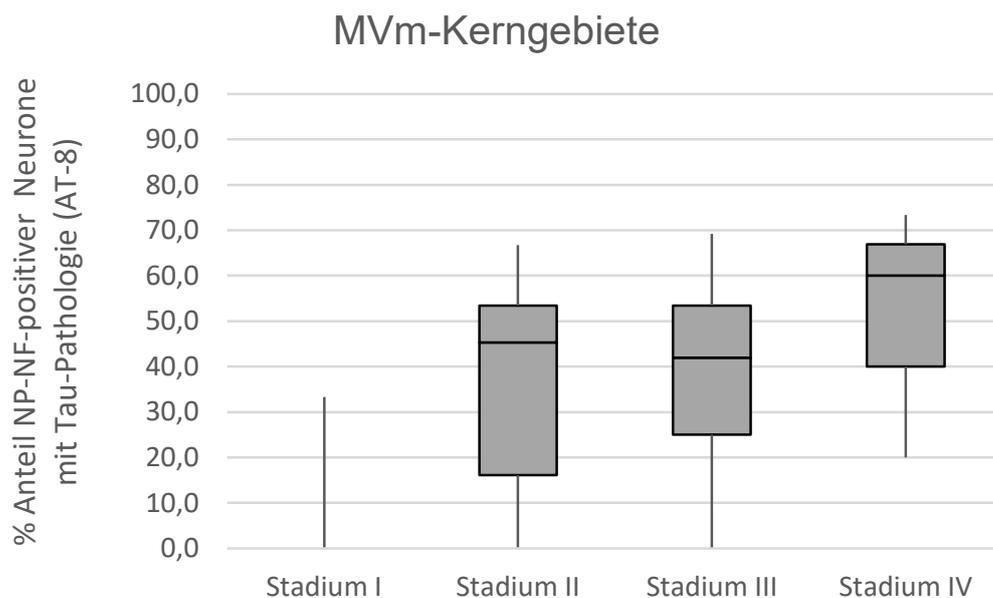
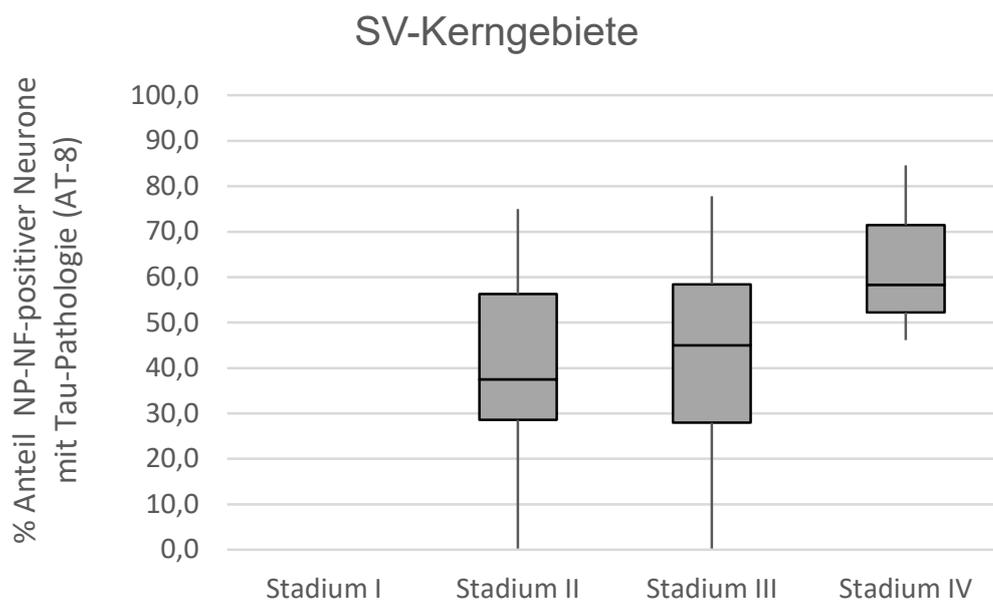


Abb. 21 Überblick über die Verteilung der Werte des Tau-Anteils der sekundären vestibulo-okulären Neurone in unterschiedlichen Erkrankungsstadien jeweils für das SV- und MVm-Gebiet.

4 Diskussion

Mit kombinierten Tract-Tracing- und Immunfärbungen konnte am Affen gezeigt werden, dass vornehmlich mittelgroße Neurone des SV- und MV-Gebiets die vestibulo-okulären Neurone repräsentieren. Da diese vestibulo-okulären Neurone nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) enthalten, wurden mit Immunperoxidasefärbungen auf NP-NF die homologen Neurone im menschlichen Hirnstamm identifiziert. Anschließend wurden unter Verwendung von NP-NF als Marker die sekundären vestibulo-okulären Neurone in PSP-Fällen mit unterschiedlich ausgeprägten Augenbewegungsstörungen auf Taupathologie (AT-8) untersucht. Hierbei zeigte sich eine sowohl für die sekundären vestibulo-okulären Neurone des SV als auch des MV eine tendenziell zum Schweregrad der Augenbewegungsstörung passende Taupathologie.

4.1 Identifizierung sekundärer vestibulo-okulärer Neurone im Affen

4.1.1 Tract-Tracing

In dieser Arbeit fanden sich nach Tracer-Injektionen in den Nucleus oculomotorius oder Nucleus abducens retrograd markierte Tracer-positive Neurone innerhalb des SV- und MV-Gebiets, während das LV-Gebiet teilweise ausgespart blieb und die caudalen Anteile des VN-Komplexes – der MVc und DV – nicht genauer untersucht wurden, da man aufgrund bisheriger Arbeiten davon ausgehen kann, dass diese Bereiche vornehmlich an deszendierenden Projektionen zum Rückenmark sowie autonomen Funktionen beteiligt sind (Goldstein et al., 2002; Balaban und Yates, 2004). Vereinzelt im rostralen DV-Gebiet vorkommende Tracer-positive Neurone sind vermutlich den VOC-Neuronen zuzuschreiben, die neben ihrem absteigenden Ast zu den Halsmuskeln auch über eine direkte Verbindung zu den Augenmuskelkernen III, IV und VI verfügen (Holstein, 2012; Peterson und Boyle, 2004). Wie bereits in früheren Arbeiten am Affen (Büttner-Ennever, 1992; McCrea et al., 1987a, b) fanden sich in dieser Arbeit im MVm-Gebiet, eingebettet

in multiforme, kleinere Neurone, eine auffällige Population mittelgroßer, dreieckig-multipolarer Neurone sowie eine Zone etwas kleinerer, rundlicher geformter Neurone im zentralen SV-Gebiet, die in ihrer Lage und Morphologie der magnozellulären Säule des rostralen VN-Komplexes gleicht, für die direkte N. vestibularis-Eingänge beschrieben sind (Newlands und Perachio, 2003; McCrea et al., 1987a). Die Tracer-positiven größeren, multipolaren Neurone MVm-Gebiets sowie die etwas kleineren, rundlicheren Neurone des zentralen SV können damit als das zweite Neuron im drei-neuronalen Reflexbogen des VOR angenommen werden und entsprechen den sekundären vestibulo-okulären Neuronen.

Die retrograd markierten Neurone im Bereich des MVp repräsentieren ebenfalls vestibulo-okuläre Neurone, die aber vermutlich keine Eingänge vom N. vestibularis enthalten, sondern primär im Dienst der commissuralen Verschaltung stehen (Epema et al., 1988; Gacek, 1978; Holstein, 2012).

In der Literatur gibt es bezüglich der unterschiedlich großen Neurone ventro-medial der Fasern des juxtarestiformen Anteils des unteren Kleinhirnstiels (ICP), im Bereich der eingehenden N. vestibularis-Fasern (n8), erhebliche Unterschiede in der Zuordnung zu den einzelnen Kerngebieten und damit einhergehend ganz unterschiedliche Funktionszuschreibungen (Übersichtsarbeit: Büttner-Ennever, 1992; Highstein und Holstein, 2006; Goldberg et al., 2012). Kaum Deutungsunterschiede gibt es hinsichtlich der Zone der größten im Vestibulariskernkomplex anzutreffenden Neurone, der so genannten Deiters-Neurone, die dem Bereich der deutlichen Aussparung des LV-Gebiets nach Tracer-Injektion in den N.III entspricht (Abb. 7). Die Deiters-Neurone liegen verstreut zwischen den Fasern des juxtarestiformen Anteils des ICP und weisen oftmals einen exzentrischen Kern auf (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004). Dieses Gebiet wurde von Brodal und Pompeiano (1957; Brodal, 1984) als dorsocaudale Zone des Lateralen Vestibulariskerns (LVNdc) beschrieben. Das sich ventromedial daran anschließende Gebiet, das retrograd markierte Neurone enthält, die vermutlich die Ursprungsneurone des aufsteigenden Trakts von Deiters (ATD) darstellen und eine Rolle bei distanzabhängigen Anpassungen des vestibulo-okulären Reflexes spielen (McCrea et al., 1987a,b; Chen-Huang und McCrea, 1998), wird seit der Einteilung von Brodal und Pompeiano oft als rostroventrale Zone des Lateralen Vestibula-

riskerns (LVNrv) bezeichnet und wird als Continuum der magnozellulären Neurone des MV betrachtet (siehe auch Horn, 2020), welches einen großen Anteil der in dieser Arbeit beschriebenen sekundären vestibulo-okulären Neurone enthält. Viele Autoren rechnen diese Zone im Grenzgebiet zwischen MV und LV, stützend auf die von Epema et al. (1988) vorgeschlagene und auf den Menschen übertragene Dreiteilung des MV in MVm, MVp und MVc (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004) dem magnozellulären Anteil des Medialen Vestibulariskerns (MVm) zu (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004; Epema et al. 1988; Highstein and Holstein, 2006; Nieuwenhuys et al., 2008; Newlands und Perachio, 2003).

Zusammenfassend scheinen sich im Grenzgebiet des lateralen MV und dem ventralen Anteil des LV die Ursprungszonen unterschiedlicher funktioneller Gruppen zu überlappen. Aufgrund ihres Verknüpfungsverhaltens wurden die dorso-caudalen Anteile des LV in dieser Arbeit als mögliche Ursprungszone der sekundären vestibulo-okulären Neurone nicht weiter berücksichtigt, während das Grenzgebiet im Bereich des ventralen LV und des lateralen MV als Gebiet der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Fokus stand.

Es stand für diese Arbeit kein Material mit Tracer-Applikation in den Nucleus trochlearis (N. IV) zur Verfügung. Stützend auf die vielfältig untersuchten Verknüpfungen der VOR-Bahnen (vgl. Abb. 4 bzw. Büttner-Ennever und Gerrits, 2004; McCrea et al. 1987b) sollte sich hieraus für diese Arbeit kein großer Informationsverlust ergeben. Die Rekonstruktion intrazellulär gefärbter identifizierter Vestibularisneurone zeigte, dass vestibuläre Neurone, die über den hinteren Bogen gang aktiviert werden, die synergistisch wirkenden Muskeln M. obliquus superior (N. IV-Versorgung) und M. rectus inferior (N. III-Versorgung) gleichermaßen innervieren (McCrea et al., 1987b).

4.1.2 Färbung gegen NP-NF als Marker für sekundäre vestibulo-okuläre Neurone im Affengewebe

Die Reanalyse von Schnitten eines Affenfalles aus einer früheren Studie mit Tracer-Injektion in den Nucleus oculomotorius und nachfolgenden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen auf den Tracer und nicht-phosphoryliertes Neurofilament

(NP-NF) zeigte, dass die überwiegende Mehrheit der Tracer-positiven Neurone im Vestibulariskernkomplex auch NP-NF-positiv waren, womit eine früher eher anekdotische Beobachtung bestätigt wurde (Ahlfeld et al., 2011). Möglicherweise sind einige der größeren nur NP-NF-markierten Neurone innerhalb des SV und MVm-Gebiets ebenfalls sekundäre vestibulo-okuläre Neurone, die zum Ncl. abducens oder Ncl. trochlearis projizieren, die hier nicht mit Tracer injiziert worden waren (McCrea et al., 1987a,b).

Der NP-NF-Antikörper ist gegen ein nicht-phosphoryliertes Epitop der 168 und der 200 kDa Neurofilament-Untereinheit gerichtet und markiert auf diese Weise neuronale Zellkörper, Dendriten sowie dicke Axone – andere Zellen und Gewebe werden nicht markiert. Es ist nicht ganz klar, warum bestimmte Neurone mit dem Antikörper reagieren. Einige Studien legen nahe, dass es sich bei den NP-NF-positiven Neuronen vornehmlich um schnell leitende, dick myelinisierte Projektionsneurone handelt, was dem Profil der sekundären vestibulo-okulären Neurone entspräche (Tsang et al., 2000; Kirkcaldie et al., 2002). Im okulomotorischen System konnten bisher zwei Gruppen von Motoneuronen mit der Anfärbung auf NP-NF unterschieden werden: Motoneurone innerhalb der Augenmuskelkerne, welche die einzeln-innervierten Twitch-Muskelfasern in den äußeren Augenmuskeln ansteuern, sind NP-NF-positiv; Motoneurone in der Peripherie der Augenmuskelkerne, die multipel-innervierte non-twitch-Muskelfasern in den Augenmuskeln ansteuern, sind dagegen NP-NF-negativ (Eberhorn et al., 2005). Diese Beobachtungen legen nahe, dass auch das Feuerungsverhalten der Neurone bei der Expression von NP-NF eine Rolle spielen könnte und vornehmlich in sehr aktiven, schnell feuernenden Neuronen wie den Motoneuronen auftritt. Einige Studien legen nahe, dass NP-NF-exprimierende Neurone hauptsächlich glutamaterge, weitreichende Projektionsneurone repräsentieren (Baizer et al., 2009; Campbell und Morrison, 1989; Lee und Winer, 2008; Tsang et al., 2000; Bickford et al., 1998). Glutamat wird neben Aspartat als Transmitter excitatorisch wirkender sekundärer vestibulo-okulärer Neurone des horizontalen und vertikalen VOR benutzt (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004). Die Annahme, dass es sich bei den großen NP-NF-positiven Neuronen im SV und MV um Projektionsneurone handelt, die zu

den Augenmuskelkernen projizieren (Baizer, 2009), konnte durch die Doppelimmunfluoreszenz auf Tracer und NP-NF beim Affen eindeutig gezeigt werden (siehe auch Ahlfeld et al., 2011).

4.2 Identifizierung sekundärer vestibulo-okulärer Neurone in humanem Gewebe

4.2.1 Zytoarchitektur der Vestibulariskerne beim Menschen

Bei aller Ähnlichkeit der Vestibulariskernkomplexe zwischen Affe und Mensch, gibt es dennoch kleinere Unterschiede, die hinsichtlich des topographischen Vergleichs von Affe und menschlichem Gewebe nicht außer Acht gelassen werden sollten und die bereits beim Vergleich der Verteilung der NP-NF-positiven Neurone in Bild a und b der Abb. 11 ersichtlich werden. Die Unterschiede betreffen hierbei vor allem die relative Größe der einzelnen Vestibulariskerne untereinander (Baizer, 2013). Die gesamte Architektur des menschlichen Vestibulariskerngebietes scheint in rostro-caudaler Ausdehnung gestreckter, wodurch die Kerne etwas weniger nebeneinander als vielmehr übereinander zu liegen kommen. Des Weiteren führt die im Vergleich zu anderen Säugetieren starke Volumenzunahme des oberen und unteren Kleinhirnstiels (Büttner-Ennever und Gerrits, 2004) zu einigen Verschiebungen innerhalb der einzelnen Kerne sowie der topographischen Beziehungen der Kerne zueinander. Während der MV des Menschen wie beim Affen den größten der Vestibulariskerne darstellt, erscheinen der LV und SV in ihrer rostro-caudalen Ausdehnung reduziert (Baizer, 2013). Unklar ist, ob diese relative Schrumpfung des SV und LV darauf zurückzuführen ist, dass ihre Funktionen für den Menschen von geringerer Bedeutung sind oder ob eine gewisse Umverteilung der Funktionen auf andere Kerngebiete stattgefunden hat (Baizer, 2013; Büttner-Ennever und Gerrits, 2004).

4.2.2 NP-NF als Identifizierungshilfe für sekundäre vestibulo-okuläre Neurone in humanem Gewebe

Bei der Untersuchung einzelner funktioneller Zellgruppen ist man bei menschlichem post-mortem Gewebe auf (immun)-histochemische Methoden angewiesen. Durch kombinierte Trakt-Tracing-Versuche mit Immunhistochemie konnten in der

Vergangenheit histochemische Marker für verschiedene funktionelle Neurone des Sakkadensystems beim Rhesusaffen identifiziert und anhand der Lokalisation und Morphologie der markierten Neurone homologe Neuronengruppen beim Menschen identifiziert werden (z.B. Horn et al., 1995; Horn und Büttner-Ennever, 1998; Horn und Adamczyk, 2012). Bisher stand für die Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Menschen kein histochemischer Marker zur Verfügung. Basierend auf den Befunden am Affen konnte in der vorliegenden Arbeit die Färbung auf NP-NF als Marker für vestibulo-okuläre Neurone beim Menschen etabliert werden, wodurch eine Untersuchung der für die Vermittlung des VOR verantwortlichen vestibulären Neurone hinsichtlich einer Tau-Pathologie auf Ebene der Einzelzelle möglich wird (McMillan et al., 2017).

Der Antikörper gegen NP-NF hat sich bereits als hilfreicher funktioneller und struktureller Marker im Bereich des menschlichen Cortex (Hof und Morrison, 1990) sowie im Hirnstamm erwiesen (Baizer et al., 2011, 2014). Das ähnliche Verteilungsmuster der NP-NF-positiven Neurone innerhalb des Vestibulariskerngebiets des Affen und des Menschen (vgl. Abb. 11) legt eine Übertragung dieses Markers in Hinblick auf die Eingrenzung der funktionellen Gruppe der sekundären vestibulo-okulären Neurone in humanem Gewebe nahe.

Dabei ermöglicht der topographische und morphologische Vergleich des retrograd Tracer-markierten Gewebes des Affen mit dem humanen Gewebe größere Sicherheit als die alleinige Betrachtung des humanen Gewebes.

Aufgrund der teilweise widersprüchlichen Beschreibungen in der Literatur wurde in dieser Arbeit ein Vorgehen gewählt, das die etablierten Kerngrenzen des VN-Komplexes zur groben Orientierung nutzte, aber bei der Eingrenzung der sekundären vestibulo-okulären Neurone innerhalb der Gruppe der NP-NF-positiven Neurone vornehmlich auf die spezifische Zellmorphologie, die sich aus dem Vergleich mit der Tracer-markierten funktionellen Gruppe des Affengewebes ergeben hatte, fokussierte.

Dies führte dazu, dass die besonders großen, in die juxtarestiformen Fasern eingebetteten NP-NF-positiven Neurone den Deiters-Neuronen zugerechnet wurden, während die im Mündungsgebiet des achten Hirnnerven ventro-medial im

LV/MV-Grenzgebiet liegenden größeren Neurone aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit den Tracer-positiven Neuronen als putative sekundäre vestibulo-okuläre Neurone des MVm interpretiert wurden.

Im Detail zeigte sich in Einklang mit anderen Studien (Baizer 2011, 2014) innerhalb des gesamten Vestibulariskerngebiets der menschlichen Proben NP-NF-Reaktivität. Deutlich abgrenzbare Kompartimente innerhalb der einzelnen Vestibulariskerne, wie es zum Beispiel für Calretinin- und Calbindin-positive Neurone im MV gezeigt werden konnten (Ahlfeld, 2011; Baizer und Broussard, 2010; Baizer, 2014), ließen sich hierbei nicht beobachten. Dies scheint die These zu stützen, dass innerhalb des Vestibulariskerngebiets einzelne Funktionen häufig nicht isolierten Bereichen zuordenbar sind, sondern die Funktionen und damit auch die neuronalen Untergruppen vermischt aufzufinden sind.

Die Verteilung und Morphologie der NP-NF-positiven Neurone beim Menschen entspricht weitgehend der Verteilung der NP-NF-positiven Neurone im Affengewebe. Die großen, NP-NF-positiven Neurone im zentralen SV-Gebiet und im Bereich des magnozellularen Gebiets des MV, die im Affengewebe durch eine Doppelimmunfluoreszenz als Gruppe der sekundären vestibulo-okulären Neurone bestätigt werden konnten, finden sich in ähnlicher Weise auch in den entsprechenden menschlichen Vestibulariskerngebieten. Dabei sind nicht nur die Lage bezüglich des Kerngebiets, sondern auch die Zellmorphologie sehr ähnlich. Durch die topographische und morphologische Ähnlichkeit sowie dem gemeinsamen Kriterium der NP-NF-Positivität ist es möglich, davon auszugehen, dass es sich bei den markierten großen Neuronen des MVm sowie den etwas kleineren, eher ovalen Neuronen im SV-Gebiet des Menschen um die gesuchten sekundären vestibulo-okulären Neurone des menschlichen Vestibulariskernkomplexes handelt.

4.3 Klinische Übertragung

Mit Hilfe der Färbung auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) ist es in Zusammenschau mit topographischen und morphologischen Kriterien möglich, die Gruppe der sekundären vestibulo-okulären Neurone in menschlichem post-

mortem Gewebe gut einzugrenzen. Diese Neurone wurden im Rahmen einer größeren Studie zur Beteiligung aller Sakkaden-generierenden Zentren im Krankheitsverlauf der PSP in der vorliegenden Arbeit in acht Patientenfällen untersucht, woraufhin sich ein tendenzieller Zusammenhang des Anteils degenerierter, AT-8-positiver, sekundärer vestibulo-okulärer Neurone mit dem Ausmaß der okulomotorischen Symptomatik zeigte.

4.3.1 Humanes Gewebe: PSP-Fälle

In dieser Studie wurde auf bereits vorhandenes Gehirngewebe von acht neuropathologisch gesicherten und über einen längeren Zeitraum gesammelten PSP-Fällen zurückgegriffen, was einige praktische Limitierungen mit sich brachte. Unterschiede im Färbeverhalten sind schon durch unterschiedlich lange post-mortem-Intervalle vor der Fixierung und Fixierdauer des Gewebes bedingt. Des Weiteren ist es bei der Untersuchung von Erkrankungen, die vornehmlich eine Bevölkerungsschicht höheren Alters betrifft, schwierig, Untersuchungsmaterial zu bekommen, das keinerlei altersbedingte Veränderungen oder weitere, zumindest subklinische Pathologien aufweist (Kovacs et al., 2013; Grinberg und Heinsen, 2009; Rodriguez und Grinberg, 2015; Jecmenica et al., 2020). In den meisten Patientenfällen sowie in den Kontrollgeweben, von denen das Material dieser Arbeit stammt, sind das Gehirn betreffende Co-Pathologien feststellbar (vgl. Tab. 2). Im Rahmen der Möglichkeiten wurde bei der Auswahl der acht Gewebeproben aber darauf geachtet, keinerlei ausgeprägte Co-Pathologien bzw. keinerlei Fälle mit Pathologien, die sich vornehmlich im Bereich der Vestibulariskerne oder der okulomotorischen Kerngebiete manifestieren, aufzunehmen.

„Alterstypische“ Veränderungen, wie zum Beispiel ein hoher Anteil Lipofuszinhaltiger Neurone, erwiesen sich bei der Auswertung in dieser Arbeit als unproblematisch, da eine Maskierung der immunhistochemischen Markierungen durch den Lipofuszingehalt der Neurone nicht wahrscheinlich ist. Akkumuliertes Lipofuszin lässt sich an Hand seines deutlich gelblicheren, grobscholligeren Aussehens sowie seiner typischen ungleichmäßigen, „klumpenförmigen“ Ablagerungsart deutlich von den immunhistochemischen Markierungen unterscheiden (Termann und Brunk, 1998).

Hinsichtlich des optimalen Suchfensters für die sekundären vestibulo-okulären Neurone mussten ebenfalls Abstriche hingenommen werden, da durch das Schneideprotokoll der Neuropathologie ein Teil des SV-Gebietes, vornehmlich die craniale und dorsale Hälfte, abgeschnitten bzw. durch das Fehlen des SCP schwieriger zu identifizieren war. Um große Einbußen in der Aussagekraft der Werte bezüglich des SV-Gebiets zu vermeiden, wurde darauf geachtet, nur Schnitte aus einer repräsentativen Region des SV bzw. mit einer ausreichenden Neuronendichte in die Auswertung mit einzubeziehen. Dies wirkte sich allerdings negativ auf die Gesamtzahl der Fälle mit bewertbarem SV-Gebiet aus, da daraufhin (wie in der Abbildung 19 ersichtlich) für die Fälle I und V nicht mehr genug auswertbares SV-Gewebe vorhanden war. Des Weiteren konnte bei den Fällen II und IV nicht auf genügend MV-Gewebe zurückgegriffen werden, um zu einer repräsentativen Aussage zu gelangen, weshalb auch hier das jeweilige Kerngebiet nicht berücksichtigt wurde.

Für weiterführende Untersuchungen wird vollständigeres Gewebe zur Verfügung stehen, da das Schneideprotokoll der Neuropathologie inzwischen auf PSP-bezogene Fragestellungen angepasst wurde. Für weitere Studien werden zudem hoffentlich mehr Fälle mit gut dokumentierten Augenbewegungsstörungen in Zusammenarbeit mit dem Schwindelzentrum in Großhadern zur Verfügung stehen. Die Stadienzuteilung der acht Patientenfälle dieser Pilotstudie erfolgte nach bestem Wissen, anhand der zur Verfügung stehenden, manchmal allerdings gerade im Hinblick auf die PSP-relevante okuläre Symptomatik etwas lückenhaften Information.

4.3.2 Färbung auf nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) in PSP-Gewebe

Ein Einfluss des Patientenalters der zur Verfügung stehenden pathologischen Gewebeproben auf die mit dem Antikörper gegen nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) markierte Neuronengruppe muss diskutiert werden, da die Gruppe der NP-NF-positiven Neurone des Vestibulariskernkomplexes möglicherweise eine Zellpopulation darstellt, die sich bezüglich altersassoziierter und pathologischer degenerativer Veränderungen als besonders vulnerabel erweist. Die

im Alter gehäuft zu beobachtenden Gangunsicherheiten und das erhöhte Sturzrisiko (Bloem et al., 2003; McGibbon et al., 2003) werden unter anderem auf eine Abnahme der Haarzell- und Neuronenzahl im Gleichgewichtsorgan (Baloh et al., 2001) sowie eine damit einhergehende Abnahme des sensorischen Eingangs in das Vestibulariskerngebiet zurückgeführt (Merchant et al., 2000; Park et al., 2001; Anson und Jeka, 2016). Eine grundsätzliche Abnahme der Neuronenzahl der Vestibulariskerne des Menschen (Alvarez et al., 2000) wurde beginnend bereits ab dem 40. Lebensjahr mit bis zu 3 % pro Dekade postuliert (Lopez et al., 1997, Tang et al., 2001). Möglicherweise kommt es durch den Verlust der vestibulären Afferenzen im VN-Komplex zu einer Abnahme insbesondere der Zellzahl der NP-NF-positiven VN-Neurone, ähnlich wie es zum Beispiel bereits für NP-NF-positive Zellen des visuellen Systems (Bickford et al., 1998; Duffy und Lingstone, 2005; Baloh et al., 1993) oder das auditorische System bei Ratten (Burianova et al., 2015) gezeigt werden konnte. Burianovas Ergebnisse legen dabei allerdings nicht unbedingt einen tatsächlichen Rückgang der Neuronenzahl NP-NF-positiver Neurone nahe, sondern weisen auf die Möglichkeit hin, dass die verringerten Zahlen auch auf einen erhöhten Maskierungsanteil der Neurone gegenüber dem Antikörper auf NP-NF zurückzuführen sein könnte, der auf einer altersbezogenen progressiven Phosphorylierung des Epitops beruht. Veränderungen der Klasse der Neurofilament-Proteine selbst sind sowohl als Teil des normalen Alterungsprozesses (Zhang et al., 2000) als auch in Hinsicht auf neuropathologische Veränderungen, wie zum Beispiel der Amyotrophen Lateralsklerose (Xiao et al., 2006), oder auch bei Morbus Alzheimer beschrieben. Bei Morbus Alzheimer kommt es unter anderem zu einem Verlust NP-NF-positiver Neurone im Cortex (Bussiere et al., 2003).

Eine Schwierigkeit bei der Verwendung von NP-NF als funktionellem Marker besteht also in der Möglichkeit der Neurofilament-assoziierten Veränderungen in Hinblick des normalen Alterungsprozesses und unterschiedlicher neuropathologischer Erkrankungen und ein Einfluss des Patientenalters (64 bis 81 Jahre) auf die Ergebnisse dieser Arbeit kann nicht ausgeschlossen werden. Auch die Assoziation der NP-NF-exprimierenden Neurone als von verschiedenen neuropathologischen Erkrankungen besonders betroffene Neuronenpopulation erweist sich als problematisch, kann aber für das verwendete Gewebe insoweit entkräftet

werden, als sich die Co-Pathologien in den Erkrankungsstadien der in dieser Arbeit verwendeten Proben vornehmlich in anderen Gehirnregionen als in den vestibulären Kernen manifestieren.

Bereits in frühen Stadien des Morbus Alzheimer ist eine Degeneration einiger, vor allem mit dem Allocortex verbundener, Hirnstammkerne nachweisbar. So berichten einige Studien von einer regelhaften Tau-Pathologie in Bereichen des Locus coeruleus, den Dorsalen Raphekernen sowie einigen anderen weniger betroffenen Kernen (Braak et al., 2011; Stratmann et al., 2016; Kovacs et al., 2020). Für Alzheimer-typische Veränderungen innerhalb der Gruppe der Vestibulariskerne findet sich bisher, bis auf eine Studie, die in vier Fällen NFTs im LV-Gebiet nachweisen konnte (Ransmayr et al., 1994) keine Erwähnung. Auch die in höherem Lebensalter häufig neuropathologisch nachweisbaren Ablagerungen der Silberkornkrankheit manifestieren sich bevorzugt in anderen Gehirngebieten als den Vestibulariskernen so z.B. in der Amygdala und dem Gyrus ambiens (Braak und Braak, 1989; Saito et al., 2004; Ferrer et al., 2008; Tolnay et al., 2004).

4.3.3 Färbung auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8)

Obwohl die Ablagerung und Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein das gemeinsame Schlüsselkennzeichen einiger neurodegenerativer Erkrankungen ist und ein großes Forschungsinteresse an diesem Protein besteht, herrscht bereits über die Funktionen des physiologischen Tau-Proteins große Unklarheit (Morris et al., 2011).

Auch die genauen Mechanismen, durch welche das „pathologische Tau-Protein“ z.B. als Tau-Bruchstücke, in Tau-Oligomeren spezieller Konformation oder auch durch sich Prion-artig ausbreitende Tau-Aggregate, zu neuronaler Dysfunktion und Neurodegeneration beitragen kann, sind noch unklar (Mudher et al. 2017).

Die Tau-phosphorylierung ist eine äußerst häufige post-translationale Veränderung des Tau-Proteins, die sowohl physiologisch als auch pathologisch vorkommt. Im physiologischen Kontext konnte eine verstärkte Phosphorylierung zum Beispiel bei fötalem Tau-Protein, nach Hypothermie und während Hibernation beobachtet werden (Übersicht: Mudher et al., 2017; Planel et al., 2007;

Arendt et al., 2016). Die Hyper-Phosphorylierung scheint dabei die Bindung zu den Mikrotubuli zu schwächen und oftmals eine Loslösung zu bewirken (Übersicht: Morris et al., 2011; Jho et al., 2010; Fischer et al., 2009). Ob und inwieweit dies für eine Zelle schädlich sein könnte und ob dies einen Anteil an der Pathophysiologie der Proteinopathien haben könnte, ist umstritten.

Die Tau-Ablagerungen, die das neuropathologische Kennzeichen der Tauopathien bilden, bestehen zwar aus unterschiedlichen Tau-Isoformen, doch ein diesen Tau-Aggregaten gemeinsames Merkmal ist, dass sie in unlöslicher, hyperphosphorylierter Form vorliegen (Mudher et al., 2017). Antikörper, die gegen diese Form des Tau-Proteins gerichtet sind und "pathologisches Tau" in unterschiedlichen Gehirnregionen nachweisen können, bilden neben der anatomischen Verteilung des neuronalen Verlusts und weiteren histologischen Merkmalen den Grundpfeiler der neuropathologischen Diagnostik dieser neurodegenerativen Erkrankungsformen (Braak et al., 2006; Schraen-Maschke et al., 2008).

Die in dieser Arbeit verwendete AT-8-Färbung markiert hyperphosphoryliertes Tau-Protein, wie es typischer Weise in den unlöslichen Tau-Akkumulationen in Gliagewebe und Neuronen zu finden ist, und wird häufig als Marker für Neurodegeneration innerhalb der Tauopathien verwendet (Braak et al., 2006). Neuropathologisch typisches Kennzeichen der PSP sind neben neuronalen Einschlüssen dabei Ablagerungen in Form von sogenannten „tufted astrocytes“ – Tau-filamente finden sich hierbei im Cytoplasma und in den proximalen Anteilen astrocytärer Fortsätze – und in Form oligodendrocytärer „coiled bodies“, welche durch filamentäre Tau-Inklusionen innerhalb des Zellkörpers auffallen (siehe neuropathologische Kriterien der PSP-Erkrankung in der Einleitung). Neben dem spezifischen Verteilungsmuster der Tau-Ablagerungen sind es gerade diese spezifischen Ablagerungsformen innerhalb der einzelnen Zellen, die die PSP von anderen 4-R-Taupathien wie z. B. der Silberkornkrankheit mit granulären, neuronalen Tauerinschlüssen und der Corticobasalen Demenz abgrenzbar macht (Mudher et al., 2017). Die Corticobasale Demenz kann vor allem durch das Auftreten astrocytärer plaques – Tau-Einschlüssen in den distalen Anteilen der Astrozytenfortsätze in kranzartiger Verteilung – von der PSP differenziert werden (Kovacs, 2016).

In dieser Arbeit wurde zur Verfügung stehendes Material aus dem Vestibulariskerngebiet von acht PSP-Fällen in einem Pilotprojekt auf den Anteil neurodegenerativ (AT-8) veränderter, putativ sekundärer vestibulo-okulärer Neurone (NP-NF) untersucht. Für die Fragestellung der Beteiligung der sekundären vestibulo-okulären Neurone im Krankheitsgeschehen der PSP sind dabei vor allem die bei einer Vor- oder Rückneigung des Kopfes involvierten VOR-Neurone von Interesse (Abb. 22a und b).

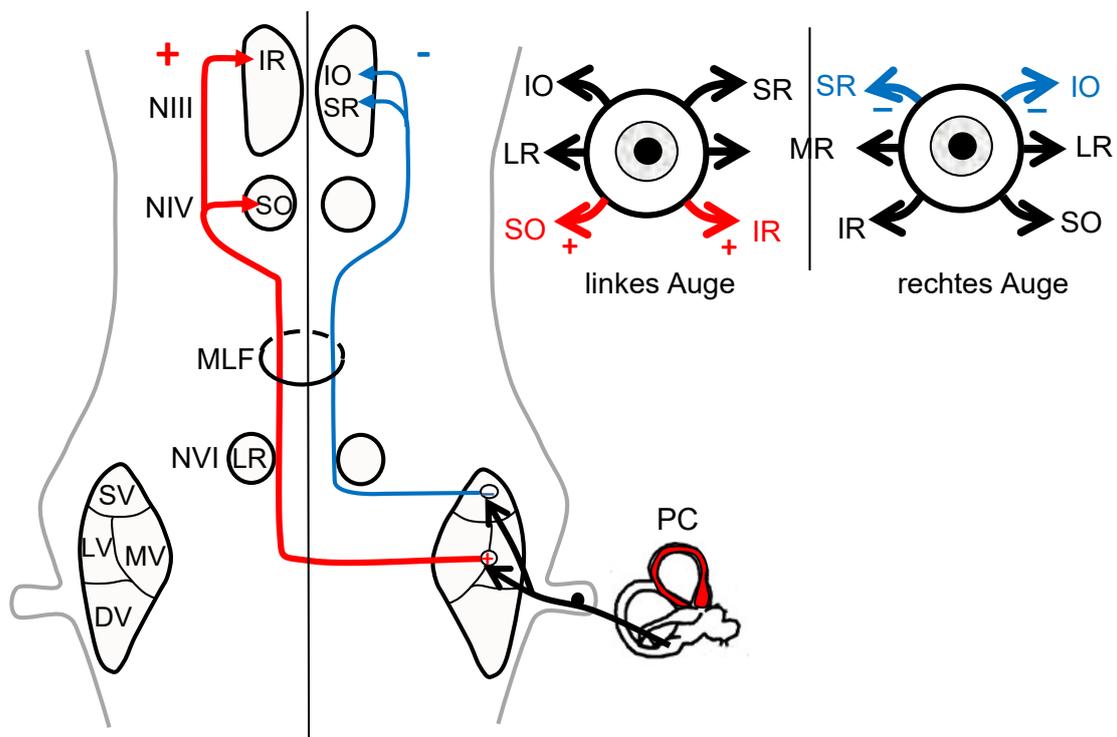


Abb. 22a: Verbindungsschema der sekundären Vestibularisneurone, die bei einer Aktivierung des hinteren Bogengangs bzw. bei einer Kopf-Rückneigung aktiv werden. Zur reflexhaften Senkung der Sehachse bilden die sekundären vestibulo-okulären Neurone des MV-Gebiets exzitatorische Verbindungen zu den Motoneuronen der senkenden Augenmuskeln der Gegenseite (IR, SO) aus, während vom SV-Gebiet ipsilaterale, inhibitorische Verbindungen zu den Motoneuronen der hebenden Augenmuskeln (SR, IO) ausgebildet werden. Zu Gunsten der Übersichtlichkeit jeweils nur für eine Seite dargestellt.

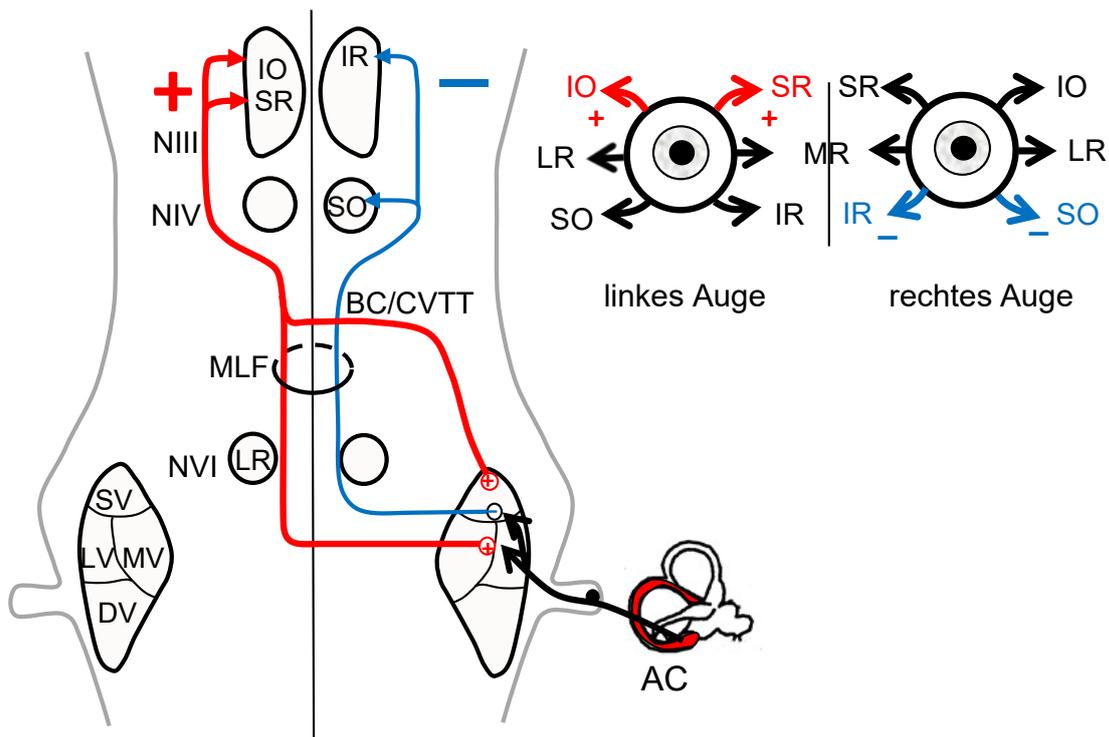


Abb. 22b: Verbindungsschema der sekundären Vestibularisneurone, die bei einer Aktivierung des vorderen Bogengangs bzw. bei einer Kopf-Vorneigung aktiv werden. Zur reflexhaften Hebung der Sehachse bilden die sekundären vestibulo-okulären Neurone des MV-Gebiets sowie craniale Anteile des SV-Gebiets exzitatorische Verbindungen zu den Motoneuronen der hebenden Augenmuskeln der Gegenseite (SR, IO) aus, während vom SV-Gebiet ipsilaterale, inhibitorische Verbindungen zu den Motoneuronen der senkenden Augenmuskeln (IR, SO) ausgebildet werden. Zu Gunsten der Übersichtlichkeit jeweils nur für eine Seite dargestellt.

Aufgrund bisher bekannter Verschaltungsmuster des Vestibulariskerngebiets sowie der Ergebnisse aus dem histologischen und morphologischen Vergleich Tracer-positiver sekundärer vestibulo-okulärer Affenneurone mit den Neuronen des menschlichen Vestibulariskerngebiets lag der Fokus der zu untersuchenden Zellen auf den größeren Neuronen des SV- und MVm-Gebietes an der Grenze zum LV.

Hierbei konnten trotz einiger Einschränkungen bezüglich der Schnitt- und Neuronenzahlen in den genauer untersuchten Kerngebieten SV und MV festgestellt werden, dass der Gehalt AT-8-markierter sekundärer vestibulo-okulärer Neurone

tendenziell mit dem Ausmaß der okulären Symptomatik in Beziehung steht. Für die Sakkaden-erzeugenden Areale PPRF, RIMLF und OPN der gleichen Patientenfälle konnten bereits eine dem Krankheitsstadium entsprechende Tau-pathologie nachgewiesen werden, die ausgehend von diesen prämotorischen Arealen später auch die Motoneurone der Augenmuskelkerne erfasst (Horn et al., 2013; Feige et al., 2013). Der in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Tau-Gehalt im VN-Gebiet in den fortgeschrittenen Erkrankungsstadien, besonders deutlich sichtbar im Fall VIII, scheint insofern überraschend, da die prämotorischen Anteile der Sakkaden-generierenden und reflexhaften Augenbewegungsformen bis zur ihrer Konvergenz auf Ebene der Motoneurone der extraokulären Augenmuskeln in neuroanatomisch weitgehend voneinander getrennten Regionen zu finden sind, das VN-Gebiet also vergleichsweise weit entfernt von den bisher gezeigten Manifestationsorten der PSP im sakkadengenerierenden System liegt. Auch die über lange Zeit robuste Auslösbarkeit des VOR im Krankheitsverlauf der PSP scheint eher für ein von Neurodegeneration verschontes VN-Gebiet zu sprechen (Das und Leigh, 2000).

In den für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Gewebeproben mit gering ausgeprägter okulomotorischer Symptomatik, zum Beispiel Fall I – bemerkenswerter Weise der Fall mit dem höchsten Lebensalter – sind deutlich weniger putativ sekundäre vestibulo-okuläre Neurone Tau-positiv als in dem als schwersten PSP-Fall dokumentierten Fall VIII. Für die Stadien II und III ergab sich in dieser Untersuchung ein recht gemischtes Bild, allerdings zeigte sich auch hier eine leichte Abhängigkeit zwischen der beschriebenen Schwere der Symptomatik und dem Gehalt an hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Nachdem bisherige Ergebnisse darauf hindeuten, dass sich die PSP entlang neuronaler Verbindungen bevorzugt in anterograder Richtung ausbreitet (Horn et al., 2013), ist die Vermutung naheliegend, dass der Ausfall des VOR in späten Erkrankungsstadien primär auf einer progressiven Schädigung der Neurone der okulomotorischen Kerne (NIII, NIV, NVI) beruht und damit die gemeinsame Effektorstrecke des Sakkaden- und des VOR-Systems betrifft und nicht die Ursprungsgebiete des VOR im VN-Komplex. Aus der progredienten Tau-Pathologie des Superioren- und Medialen Vestibularkerngebiets, die sich in dieser Arbeit abzeichnete, ergibt sich allerdings die

Frage, ob eine progressive Neurodegeneration der sekundären vestibulo-okulären Neurone als Ursache für den in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien der PSP zu beobachtenden VOR-Verlust in Frage kommen könnte. Hierzu müsste zum Beispiel in weiterführenden Arbeiten der Anteil der Tau-Pathologie der Vestibulariskerne mit der Tau-Pathologie der Augenmuskelkerne in unterschiedlichen Krankheitsstadien verglichen werden. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob die Beteiligung des VN-Komplexes für eine sich parallel entwickelnde Progressionslinie im Verlauf der PSP spricht oder ob die funktionelle Zellgruppe der sekundären vestibulo-okulären Neurone durch eine Verbindung mit bereits von der Tau-Pathologie betroffenen Systemen - beispielsweise über Schnittstellen des Sakkaden- und VOR-Systems - in das Krankheitsgeschehen involviert wird.

4.4 Ausbreitungswege der Tau-Pathologie

Eine infektionsartige beziehungsweise „Prion-ähnliche“ Ausbreitung der Tau-Pathologie entlang neuronaler Netzwerke wird für viele neurodegenerative Erkrankungen aus dem Formenkreis der Proteinopathien diskutiert (Guo und Lee, 2014; Brettschneider et al., 2015; Mudher et al., 2017). Neben der Ausbreitung entlang neuronaler Projektionen wird als ursächlich für die stereotype, sukzessive Ausbreitung des pathologischen Taus oft auch eine unterschiedliche Vulnerabilität einzelner Hirnregionen gegenüber den pathologischen Proteinen in Erwägung gezogen (Jackson, 2014). Neben intrinsischen neuronalen Charakteristika, die eine erhöhte Vulnerabilität bedingen könnten beziehungsweise der Anfälligkeit bestimmter Zellgruppen durch ihre Konnektivität zu bereits betroffenen Zellen (Mudher et al., 2017; Franzmeier et al., 2022) wird außerdem noch eine durch Zellbruchstücke sterbender Neurone verursachte chronische Überaktivierung der Mikroglia und eine damit einhergehende Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine als ursächlich für eine Ausbreitung des abnormalen Proteins diskutiert (Glass et al., 2010; Guo und Lee, 2014). Die letzte Überlegung legt allerdings eine räumlich nahe Beziehung der involvierten Zellen zu Grunde und ist damit für die am Mausmodell beobachtete Ausbreitung pathologischen Proteins (Clavaguera et al., 2009) in weiter entfernte Hirnstrukturen wenig plausibel.

Die Befunde dieser Arbeit sprechen nicht gegen das Argument, wonach der zu beobachtenden stereotypen zeitlich-räumlichen Ausbreitung vieler neurodegenerativer Erkrankungen eine selektive Vulnerabilität einzelner Strukturen zugrunde liegt, die wiederum Ausdruck einer spezifischen zellulären Ausstattung ist (Mattson und Magnus, 2006; Walsh et al., 2016). Überlegungen, wonach der in späteren Erkrankungsphasen bei PSP zu beobachtende VOR-Verlust auf einen gleichzeitig bestehenden Alterseffekt zurückzuführen sein könnte, weisen ebenfalls in die Richtung einer speziellen Vulnerabilität. Das Argument einer alleinig altersentsprechenden VOR-Schädigung scheint, bezogen auf die bei der PSP zu beobachtende Symptomatik allerdings nicht sehr überzeugend, da zwischen der häufig vorkommenden Verschlechterung des VOR im Alter (Baloh et al., 1993, 2001; Li et al., 2015) und einem kompletten Ausfall des VOR, wie er in den Endstadien der PSP vorkommt, ein erheblicher Qualitätsunterschied besteht. Auch die in dieser Arbeit zu beobachtende deutliche Zunahme des AT-8-markierten Neuronenanteils in den Vestibulariskernen, die primär mit der Symptomenschwere und nicht dem Patientenalter korreliert, spricht gegen die Annahme eines reinen Alterseffekts. Es gibt Überlegungen, wonach bei den Tauopathien grundsätzlich ein Nachlassen der zellulären Abwehrmechanismen gegenüber einer Ablagerung pathologischen Taus für die verstärkte Neurodegeneration verantwortlich sein könnte, wodurch auch die erhöhte Inzidenz von Tauopathien in höheren Altersgruppen erklärt werden könnte (Guo und Lee, 2014; Mudher et al., 2017). Dass in dieser Arbeit AT-8-markierte Neurone nahezu ausschließlich innerhalb der Gruppe der NP-NF-exprimierenden Neurone zu finden waren, legt die Überlegung nahe, dass die NP-NF-exprimierenden Neurone einer Zellpopulation angehören, die möglicherweise nicht nur gegenüber Alterungsprozessen besonders vulnerabel ist, sondern auch der Akkumulation pathologischer Tau-Formationen weniger lange standhalten kann und damit die „Alterungserscheinungen“, die NP-NF-positive Neurone möglicherweise verstärkt zeigen und eine geringere Widerstandskraft gegenüber pathologischem Tau-Protein eventuell Hand in Hand gehen oder vielleicht sogar eine ähnliche Ursache haben.

Die Diskussion der „Prion-Qualitäten“ des Tau-Proteins bezieht sich auf die in vitro und in vivo gezeigte Fähigkeit mancher Tau-Proteine (Oligomere/Aggregate) bis dato unauffällige physiologische Tau-Proteine zu einer Umformung in

dieselbe pathologische Tau-Form zu veranlassen sowie die Fähigkeit der Ausbreitung dieser pathologischen Tau-Formen auch über Zellgrenzen hinweg. Über die genaue Maschinerie der Weitergabe wird in viele Richtungen geforscht (Guo und Lee, 2014).

Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass sich die PSP entlang neuronaler Verbindungen ausbreitet (Ahmed et al., 2014; Gibbons et al., 2019). Der Ausbreitungsweg scheint dabei nicht auf spezifische Transmitter festgelegt zu sein, da man in den Bahnen zur Sakkadengeneration eine Tau-Pathologie sowohl in den excitatorischen prämotorischen Burst-Neuronen wie auch den vorgeschalteten inhibitorischen Omnipause-Neuronen findet (Horn et al., 2013). Neben einer anterograden Ausbreitungsform pathologischen Tau-Proteins wurde bereits auch auf die Möglichkeit einer retrograden Ausbreitung pathologischer Tau-Proteine hingewiesen (Wu et al., 2013; Ahmed et al., 2014). Möglicherweise deutet die in dieser Arbeit beschriebene progressive Tau-Pathologie in den sekundären vestibulo-okulären Neuronen auf eine retrograde Ausbreitung der Tau-Pathologie – ausgehend vom Netzwerk des Sakkaden-generierenden Systems bzw. ihrer gemeinsamen Endstrecke – hin. Zur Diskussion stehen als Ausgangsort dieser retrograden Ausbreitung der Tau-Pathologie neben den Kerngebieten der äußeren Augenmuskeln möglicherweise auch das vom Sakkaden- und VOR-System gemeinschaftlich genutzte neuronale Integrationszentrum des Interstitiellen Nucleus von Cajal (IC), welches das Geschwindigkeitssignal der Burstneurone aus dem RIMLF in ein Augenpositionssignal in den Motoneuronen umwandelt (Helmchen et al., 1998, Goldberg et al., 2012, McCrea, 1987a/b, Iwamoto, 1990). Denkbar wäre auch, dass eine Ausbreitung der Tau-Pathologie über direkte Verknüpfungen zum prämotorischen Sakkadensystem auf dem Boden der inhibitorisch wirksamen, VOR unterdrückenden Efferenzkopien für willkürliche Sakkaden während Kopfbewegungen erfolgt (Goldberg et al., 2012; McCrea et al., 1978 a/b; Roy und Cullen, 1998; Straka et al., 2016).

Für eine sich nicht diffus, sondern über synaptische Kontakte entlang neuronaler Netzwerke ausbreitende Pathologie spräche in dieser Arbeit auch insbesondere die in den AT-8-gefärbten Schnitten deutlich erkennbare, komplette Aussparung mancher benachbarten Strukturen, wie z. B. der oberen Olive (siehe Abb.16), die

einem anderen System – hier der Hörbahn – angehören (Moore, 2000; Thompson et al., 2000).

Unter dem Eindruck der sich verdichtenden Hinweise auf eine Ausbreitung der Tau-Pathologie entlang neuronaler Netzwerke (Ahmed et al., 2014; Franzmeier et al., 2022) stellen die bereits gut untersuchten Bahnen des Augenbewegungssystems zusammen mit einer genauen Diagnostik der Augenbewegungsstörungen, zukünftig eine besonders gute Möglichkeit dar, die Ausbreitungswege der Tau-pathologie weiter zu studieren.

5 Zusammenfassung

PSP ist eine neurodegenerative Tauopathie, deren klinisches Bild von häufigen Stürzen und einer progressiven Einschränkung der Okulomotorik geprägt ist. Charakteristischerweise kommt es hierbei im Verlauf der Erkrankung zu einer frühzeitigen, progredienten Einschränkung der willkürlichen Sakkaden, während der vestibulo-okuläre Reflex (VOR) erst spät im Erkrankungsverlauf beeinträchtigt ist.

In dieser Arbeit sollten die den vestibulo-okulären Reflex vermittelnden sekundären vestibulo-okulären Neurone in PSP-Fällen unterschiedlicher Erkrankungsstadien im Rahmen eines Pilotprojekts daraufhin untersucht werden, ob diese von Degeneration verschont bleiben, wie es hinsichtlich des klinischen Verlaufs der okulomotorischen Einschränkung bei PSP zu erwarten wäre.

Während die prämotorischen Burst-Neurone des Sakkadensystems des Menschen bereits identifizierbar und hinsichtlich Degeneration bei PSP gut untersucht sind, gab es für die entsprechenden sekundären vestibulo-okulären Neurone des VOR bisher keinen histochemischen Marker. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst ein Marker für die sekundären VOR-Neurone gesucht.

Im Affengewebe können sekundäre vestibulo-okuläre Neurone an Hand retrograder Tracermarkierungen nach Injektion in den Ncl. Oculomotorius sicher identifiziert werden. Nachdem sich in der Reanalyse einer Doppelimmunfluoreszenz auf Tracer und nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NP-NF) zeigte, dass sekundäre vestibulo-okuläre Neurone NP-NF enthielten, konnten mit NP-NF als histochemischem Marker putative sekundäre vestibulo-okuläre Neurone auch in menschlichem Gewebe identifiziert werden.

Diese Neurone konnten daraufhin durch die Verwendung einer immunhistochemischen Färbung gegen hyperphosphoryliertes Tau-Protein (AT-8) hinsichtlich Anzeichen von Degeneration untersucht werden. Bei der Analyse von auf NP-NF und AT-8 angefärbten benachbarten Dünnschnitten zeigte sich ein tendenziell zum allgemeinen Schweregrad der okulomotorischen Einschränkungen passender Tau-Anteil innerhalb der Gruppe der sekundären vestibulo-okulären Neurone.

Bislang wurde als Ursache für den späten Ausfall des VOR im Verlauf der PSP eine zunehmende Schädigung der gemeinsamen motorischen Endstrecke (Hirnnervenkerne III, IV und VI) angenommen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint nun auch eine fortschreitende Degeneration innerhalb der sekundären vestibulo-okulären Neurone als Ursache möglich. Offen bleibt, ob es sich dabei um ein sich parallel entwickelndes Geschehen handelt oder ob die Tauopathie im Sinne einer weiteren Ausbreitungslinie von bereits betroffenen neuronalen Strukturen – beispielsweise den okulomotorischen Kernen oder auch von Schnittstellen mit dem prämotorischen Sakkadensystem – auf die sekundären vestibulo-okulären Neurone übergreift. Die Vermutung, dass sich Tauopathien entlang neuronaler Netzwerke ausbreiten, wird in dieser Arbeit durch die Beobachtung gestützt, dass benachbarte Strukturen, die einem anderen System angehören - wie zum Beispiel die Neurone des oberen Olivenkomplex - keine AT-8-Markierungen zeigten.

Literaturverzeichnis

- Ahlfeld, J., Mustari, M., Horn, A. K. E., 2011. Sources of calretinin inputs to motoneurons of extraocular muscles involved in upgaze. *Ann NY Acad Sci* 1233: 91-99.
- Ahmed, Z., Cooper, J., Murray, T. K., Garn, K., McNaughton, E., Clarke, H., Parhizkar, S., Ward, M. A., Cavallini, A., Jackson, S., Bose, S., Clavaguera, F., Tolnay, M., Lavenir, I., Goedert, M., Hutton, M. L., O'Neill, M. J., 2014. A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: the pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathol.* 127(5):667-83.
- Akaike, T., 1983. Neuronal organization of the vestibulospinal system in the cat. *Brain Res* 259(2): 217-27.
- Alvarez, J. C., Diaz, C., Suarez, C., Fernandez, J. A., Gonzalez del Rey, C., Navarro, A., Tolivia, J., 2000. Aging and the human vestibular nuclei: morphometric analysis. *Mech Ageing Dev* 114(3): 149-172.
- Anson, E., Jeka, J., 2016. Perspectives on Aging Vestibular Function. *Front Neurol* 6: 269.
- Arendt, T., Stieler, J. T., Holzer, M., 2016. Tau and taupathies. *Brain Res Bull* 126 (pt3): 238-292.
- Armstrong, R. A., Cairns, N. J., 2013. Spatial patterns of the tau pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurol Sci* 34(3): 337-344.
- Baizer, J. S., 2009. Nonphosphorylated neurofilament protein is expressed by scattered neurons in the vestibular and precerebellar brainstem. *Brain Res* 1298: 46-56.
- Baizer, J. S., Broussard, D. M., 2010. Expression of calcium-binding proteins and nNOS in the human vestibular and precerebellar brainstem. *J Comp Neurol* 518: 872-895.
- Baizer, J. S., Paolone, N. A., Witelson, S. F., 2011. Nonphosphorylated neurofilament protein is expressed by scattered neurons in the human vestibular brainstem. *Brain Res* 1382: 45-56.

Baizer, J. S., Paolone, N. A., Sherwood, C. C., Hof, P. R., 2013. Neurochemical organization of the vestibular brainstem in the common chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Brain Struct Funct* 218(6): 1463-1485.

Baizer, J. S., 2014. Unique features of the human brainstem and cerebellum. *Front Hum Neurosci* 8: 202.

Balaban, C. D., Yates, B. J., 2004. Vestibuloautonomic Interactions: A Teleologic Perspective, in: Highstein, S. M., Fay, R. R., Popper, A. N. (Hrsg.), *The Vestibular System*. Springer, New York, 286-342.

Baloh, R. W., Jacobson, K. M., Socotch, T. M., 1993. The effect of aging on visual vestibuloocular responses. *Exp Brain Res* 95(3): 509-16.

Baloh, R. W., Enrietto, J., Jacobson, K. M., Lin, A., 2001. Age-related changes in vestibular function: a longitudinal study. *Ann NY Acad Sci* 942: 210-219.

Bickford, M. E., Guido, W., Godwin, D. W., 1998. Neurofilament proteins in Y-cells of the cat lateral geniculate nucleus: normal expression and alteration with visual deprivation. *J Neurosci* 18(16): 6549-6557.

Bloem, B. R., Steijns, J. A. G., Smits-Engelsman, B.C., 2003. An update on falls. *Curr Opin Neurol* 16(1), 15-26.

Bluett, B., Pantelyat, A. Y., Litvan, I., Ali F., Apetauerova, D., Bega, D., Bloom, L., Bower, J., Boxer, A. L., Dale, M. L., Dhall, R., Duquette, A., Fernandez, H. H., Fleisher, J. E., Grossman, M., Howell, M., Kerwin, D. R., Leegwater-Kim, J., Lepage, C., Ljubenkov, P. A., Mancini, M., McFarland, N. R., Moretti, P., Myrick, E., Patel, P., Plummer, L. S., Rodriguez-Porcel, F., Rojas, J., Sidiropoulos, C., Sklerov, M., Sokol, L. L., Tuite, P. J., VandeVrede, L., Wilhelm, J., Wills, AM. A., Xie, T., Golbe, L. I., 2021. Best Practices in the Clinical Management of Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Syndrome: A Consensus Statement of the CurePSP Centers of Care. *Front Neurol* 12:694872.

Bouras, C., Hof, P. R., Giannakopoulos, P., Michel, J. P., Morrison, J.H. 1994. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb Cortex* 4(2):138-150.

- Braak, H., Braak, E., 1989. Cortical and subcortical argyrophylic grains characterize a disease associated with adult onset dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15(1): 13-26.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4): 239-259.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., Del Tredici, K., 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112(4): 389-404.
- Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Del Tredici, K., 2011. Stages of the pathologic progress in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neuro* 70(11): 960-969.
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., 2015. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: A focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* 16(2): 109-120.
- Brodal, A., Pompeiano, O., 1957. The vestibular nuclei in cat. *J Anat* 91: 438-454.
- Brodal, A., 1984. The vestibular nuclei in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 227: 252-266.
- Büttner-Ennever, J. A., 1992. Patterns of connectivity in the vestibular nuclei. *Ann N Y Acad Sci*: 656: 363-378.
- Büttner-Ennever, J. A., 1999. A review of otolith pathways to brainstem and cerebellum. *Ann N Y Acad Sci* 871: 51-64.
- Büttner-Ennever, J. A., 2000. Overview of the vestibular system, in: Beitz, A. J., Anderson, J. H. (Hrsg.), *Neurochemistry of the vestibular system*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 3-24.
- Büttner-Ennever, J. A., Gerrits, N. M., 2004. 33. Vestibular System, in Paxinos, G., Mai, J. K. (Hrsg.), *The Human Nervous System*. (2. Auflage). Elsevier Academic Press (USA), 1212-1240.
- Büttner-Ennever, J. A., Horn, A. K. E., 2004. 16. Reticular Formation: Eye Movements, Gaze, and Blinks, in: Paxinos, G., Mai, J. K. (Hrsg.), *The Human Nervous System*. (2. Auflage). Elsevier Academic Press (USA), 479 – 510.

Büttner, U., Büttner-Ennever, J. A., 2006. Present concepts of oculomotor organization. *Prog Brain Res* 151:1-42.

Büttner-Ennever, J. A., Horn, A. K. E. (Hrsg.), 2014. *Olszewski and Baxter's Cytoarchitecture of the Human Brainstem*. (3. Auflage). Karger, Basel.

Burianova, J., Ladislav, O., Syka, J., 2015. The influence of aging on the number of neurons and levels of non-phosphorylated neurofilament proteins in the central auditory system of rats. *Front. Aging Neurosci* 7: 27.

Bussi re, T., Giannakopoulos, P., Bouras, C., Perl, D.P., Morrison, J.H., Hof, P.R., 2003. Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: stereologic analysis of prefrontal cortex area 9. *J Comp Neurol* 463(3): 281-302.

Campbell, M. J., Morrison, J. H., 1989. Monoclonal antibody to neurofilament protein (SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the human and monkey neocortex. *J Comp Neurol* 282(2): 191-205.

Che Ngwa, E., Zeeh, C., Messoudi, A., Büttner-Ennever, J. A., Horn, A. K., 2014. Delineation of motoneuron subgroups supplying individual eye muscles in the human oculomotor nucleus. *Front Neuroanat* 8:2.

Chen-Huang, C., McCrea, R.A., 1998. Viewing distance related sensory processing in the ascending tract of deiters vestibulo-ocular reflex pathway. *J Vestib Res* 8(2):175-184.

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M., 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11(7):909-913.

Coyle-Gilchrist, I. T., Dick, K. M., Patterson, K., Vázquez Rodr iquez, P., Wehmann, E., Wilcox, A., Lansdall, C. J., Dawson, K. E., Wiggins, J., Mead, S., Brayne, C., Rowe, J. B., 2016. Prevalence, characteristics, and survival of frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Neurology* 86(18): 1736-1743.

Das, V. E., Leigh, R. J., 2000. Visual-vestibular interaction in progressive supranuclear palsy. *Vision Res* 40(15): 2077-2081.

- Dickson, D. W., 1999. Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol* 246(2): II6-II15.
- Dickson, D. W., Ahmed, Z., Algom, A., Tsuboi, Y., Josephs, K., 2010. Neuropathology of variants of progressive supranuclear palsy. *Curr Opin Neurol* 23(4), 394–400.
- Duffy, K. R., Livingstone, M. S., 2005. Loss of Neurofilament Labeling in the Primary Visual Cortex of Monocularly Deprived Monkeys. *Cereb Cortex* 15(8): 1146-1154.
- Eberhorn, A. C., Ardeleanu, P., Büttner-Ennever, J. A., Horn, A. K., 2005. Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *J Comp Neurol* 491(4): 352-366.
- Epema, A. H., Gerrits, N. M., Voogd, J., 1988. Commissural and intrinsic connections of the vestibular nuclei in the rabbit: a retrograde labelling study. *Exp Brain Res* 71: 129-146.
- Feige, J., Zeeh, C., Roeber, S., Arzberger, T., Kretschmar, H., Horn, A. K. E., 2013. Tau pathology in motoneurons of extraocular muscles in progressive supranuclear palsy (PSP). *Anat. Gesell.* <http://anatomische-gesellschaft.de/>
- Ferrer, I., Santpere, G., van Leeuwen, F. W., 2008. Argyrophilic grain disease. *Brain* 131: (6)1416–1432.
- Fischer, D., Mukrasch, M. D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M., 2009. Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochem* 48(42): 10047-10055.
- Franzmeier, N., Brendel, M., Beyer, L., Slemann, L., Kovacs, G. G., Arzberger, T., Kurz, C., Respondek, G., Lukic, M.J., Biel, D., Rubinski, A., Frontzkowski, L., Hummel, S., Müller, A., Finze, A., Palleis, C., Joseph, E., Weidinger, E., Katzdobler, S., Song, M., Biechele, G., Kern, M., Scheifele, M., Rauchmann, B. S., Perneczky, R., Rullman, M., Patt, M., Schildan, A., Barthel, H., Sabri, O., Rumpf, J. J., Schroeter, M. L., Classen, J., Villemagne, V., Seibyl, J., Stephens, A. W., Lee, E. B., Coughlin, D. G., Giese, A., Grossman, M., McMillan, C. T., Gelpi, E., Molina-Porcel, L., Compta, Y., van Swieten, J. C., Laats, L. D., Troakes, C., Al-Sarraj,

S., Robinson, J. L., Xie, S. X., Irwin, D. J., Roeber, S., Herms, J., Simons, M., Bartenstein, P., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Levin, J., Höglinger, G., Ewers, M., 2022 Tau deposition patterns are associated with functional connectivity in primary tauopathies. *Nat Commun.* 13(1):1362.

Gacek, R.R., 1978. Location of commissural neurons in the vestibular nuclei of the cat. *Exp Neurol* 59: 479-491.

Gdowski, G. T., McCrea, R. A., 2000. Neck proprioceptive inputs to primate vestibular nucleus neurons. *Exp Brain Res* 135(4): 511-526.

Gibbons, G. S., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., 2019. Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review. *JAMA Neurol.* 1;76(1):101-108.

Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F. H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140: 918-934.

Goldberg, J. M., Wilson, V. J., Cullen, K. E., Angelaki, D., Broussard, D., Büttner-Ennever, J.A., Fukushima, K., Minor, L., 2012. *The Vestibular System: A Sixth Sense.* Oxford University Press, New York.

Goldstein, D. S., Robertson, D., Esler, M., Straus, S. E., Eisenhofer, G., 2002. Dysautonomias: clinical disorders of the autonomic nervous system. *Ann Intern Med* 137: 753-763.

Graf, W., Gerrits, N., Yatim-Dhiba, N., Ugolini, G., 2002. Mapping the oculomotor system: the power of transneuronal labelling with rabies virus. *Eur J Neurosci* 15(9): 1557-1562.

Grinberg, L. T., Heinsen, H., 2009. Argyrophilic grain disease: an update about a frequent cause of dementia. *Dement Neuropsychol* 3(1): 2–7.

Guo, J. L., Lee, V. M., 2014. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med* 20(2): 130-138.

Helmchen, C., Rambold, H., Fuhry, L., Buttner, U., 1998. Deficits in vertical and torsional eye movements after uni- and bilateral muscimol inactivation of the interstitial nucleus of Cajal of the alert monkey. *Exp Brain Res* 119(4): 436-452.

Highstein, S. M., Holstein, G. R., 2006. The anatomy of the vestibular nuclei. *Prog Brain Res* 151: 157-203.

Höglinger, G. U., Respondek, G., Stamelou, M., Kurz, C., Josephs, K. A., Lang, A. E., Mollenhauer, B., Müller, U., Nilsson, C., Whitwell, J. L., Arzberger, T., Englund, E., Gelpi, E., Giese, A., Irwin, D. J., Meissner, W. G., Pantelyat, A., Rajput, A., van Swieten, J. C., Troakes, C., Antonini, A., Bhatia, K. P., Bordelon, Y., Compta, Y., Corvol, J. C., Colosimo, C., Dickson, D. W., Dodel, R., Ferguson, L., Grossman, M., Kassubek, J., Krismer, F., Levin, J., Lorenzl, S., Morris, H. R., Nestor, P., Oertel, W. H., Poewe, W., Rabinovici, G., Rowe, J. B., Schellenberg, G. D., Seppi, K., van Eimeren, T., Wenning, G. K., Boxer, A. L., Golbe, L. I., Litvan, I. 2017. Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria. *Mov Disord* 32(6):853-864.

Hof, P. R., Morrison, J. H. 1990. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer`s disease: II. Primary and secondary visual cortex. *J Comp Neurol* 301, 55-64.

Holstein, G. R., 2012. 35 The Vestibular System, in: Paxinos, G. Mai, J. K. (Hrsg.), *The Human Nervous System*. (3. Auflage). Elsevier Academic Press (USA), 1239-1269.

Horn, A. K. E., 1990. Untersuchungen zur Anwendung von Tetanustoxin als transsynaptischen Tracer im okulomotorischen System von Säugetieren. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität.

Horn, A. K., Büttner-Ennever, J. A., Suzuki, Y., Henn, V., 1995. Histological identification of premotor neurons for horizontal saccades in monkey and man by parvalbumin immunostaining. *J Comp Neurol* 359(2): 350-363.

Horn, A. K., Büttner-Ennever, J. A. 1998. Premotor neurons for vertical eye movements in the rostral mesencephalon of monkey and human: histologic identification by parvalbumin immunostaining. *J Comp Neurol* 392(4): 413-27.

Horn, A. K. E., Adamczyk, C. 2012. 9 Reticular Formation: Eye movements, Gaze and Blinks, in: Mai, J. K., Paxinos, G. (Hrsg.), *The Human Nervous System*. (3. Auflage). Elsevier Academic Press (USA), 328–366.

Horn, A. K. E., Roeber, S., Arzberger, T., Feige, J., Kretzschmar, H., 2013. Using the premotor network for eye movements as tool for the investigation of the progression line in progressive supranuclear palsy (PSP). *Anat. Gesell.*

<http://anatomische-gesellschaft.de/>

Horn, A. K. E., 2020. Neuroanatomy of Central Vestibular Connections, in: Fritsch, B., Straka, H. (Hrsg.), *The Senses: A Comprehensive Reference*. Elsevier Academic Press, 6:21-37.

Horn, A. K. E., Straka, H., 2021. Functional Organization of Extraocular Motoneurons and Eye Muscles. *Annu Rev Vis Sci* 7:793-825.

Iwamoto, Y., Kitama, T., Yoshida, K., 1990. Vertical eye movement-related secondary vestibular neurons ascending in medial longitudinal fasciculus in cat. II. Direct connections with extraocular motoneurons. *J Neurophysiol* 63(4): 918-935.

Jackson, W. S., 2014. Selective vulnerability to neurodegenerative disease: the curious case of Prion Protein. *Dis Model Mech* 7(1):21-29.

Jecmenica Lukic, M., Kurz, C., Respondek, G., Grau-Rivera, O., Compta, Y., Gelpi, E., Troakes, C.; Barcelona Brain Bank collaborative group, the MDS-endorsed PSP study group; van Swieten, J. C., Giese, A., Roeber, S., Arzberger, T., Höglinger, G, 2020. Copathology in Progressive Supranuclear Palsy: Does It Matter? *Mov Disord.* 35(6):984-993.

Jho, Y. S., Zhulina, E. B., Kim, M. W., Pincus, P. A., 2010. Monte carlo simulations of tau proteins: Effect of phosphorylation. *Biophys J* 99: 2387-2397.

Kirkcaldie, M. T., Dickson, T. C., King, C. E., Grasby, D., Riederer, B. M., Vickers, J.C., 2002. Neurofilament triplet proteins are restricted to a subset of neurons in the rat neocortex. *J Chem Neuroanat* 24(3): 163-171.

Kovacs, G. G., Milenkovic, I., Wohrer, A., Hoftberger, R., Gelpi, E., Haberler, C., Honigschnabel, S., Reiner-Concin, A., Heinzl, H., Jungwirth, S., Krampla, W., Fischer, P., Budka, H., 2013. Non-Alzheimer neurodegenerative pathologies and their combinations are more frequent than commonly believed in the elderly brain: A community-based autopsy series. *Acta Neuropathol* 126(3): 365-384.

Kovacs, G. G., 2016. Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: Turning towards precision medicine. *Int J Mol Sci* 17(2): 189.

Kovacs, G. G., Lukic, M. J., Irwin, D. J., Arzberger, T., Respondek, G., Lee, E. B., Coughlin, D., Giese, A., Grossman, M., Kurz, C., McMillan, C. T., Gelpi, E., Compta, Y., van Swieten, J. C., Laats, L. D., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Robinson, J. L., Roeber, S., Xie, S. X., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Höglinger, G.U., 2020. Distribution patterns of tau pathology in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 140(2): 99-119.

Lamb, R., Rohrer, J. D., Lees, A. J., Morris, H. R., 2016. Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration: Pathophysiology and Treatment Options. *Curr Treat Options Neurol* 18(9): 42.

Lee, C. C., Winer, J. A., 2008. Connections of cat auditory cortex: III. Corticocortical system. *J Comp Neurol* 507(6): 1920-1943.

Leigh, R. J., Zee, D. S., 2014. *The Neurology of Eye Movements.* Oxford University Press, New York, 55-385.

Levin, J., Kurz, A., Arzberger, T., Giese, A., Höglinger, G. U., 2016. The differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Dtsch Arztebl Int* 113(5): 61-69.

Li, C., Layman, A. J., Geary, R., Anson, E., Carey, J. P., Ferrucci, L., Agrawal, Y., 2015. Epidemiology of vestibulo-ocular reflex function: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Otol Neurotol* 36(2): 267-272.

Lienbacher, K., Mustari, M., Ying, H. S., Büttner-Ennever, J. A., Horn, A. K. E., 2011. Do palisade endings in extraocular muscles arise from neurons in the motor nuclei? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(5): 2510-2519.

Litvan, I., Agid, Y., Calne, D., Campbell, G., Dubois, B., Duvoisin, R. C., Goetz, C. G., Golbe, L. I., Grafman, J., Growdon, J. H., Hallett, M., Jankovic, J., Quinn, N. P., Tolosa, E., Zee, D. S., 1996. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 47(1): 1–9.

Lopez, I., Honrubia, V., Baloh, R. W., 1997. Aging and the human vestibular nucleus. *J Vestib Res* 7(1): 77-85.

Mattson, M. P., Magnus, T., 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7(4):278-294.

- McCrea, R. A., Strassmann, E., May, E., Highstein, S. M., 1987a. Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the horizontal vestibulo-ocular reflex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 264: 547-570.
- McCrea, R. A., Strassman, A., Highstein, S. M., 1987b. Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the vertical vestibulo-ocular reflexes of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 264: 571-594.
- McGibbon, C. A., (2003). Toward a better understanding of gait changes with age and disablement: neuromuscular adaptation. *Exerc Sport Sci Rev* 31(2): 102-108.
- McMillan, A., Mustari, M., Horn, A., 2017. Identification of secondary vestibulo-ocular neurons in human based on their histochemical characteristics found in monkey. *J Neurol* 264(3): 583-585.
- Merchant, S. N., Vellasquez-Villasenor, L., Tsuji, K., Glynn, R. J., Wall, C. III, Rauch, S. D., 2000. Temporal bone studies of the human peripheral vestibulae system. Normative vestibular hair cell data. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 181: 3-13.
- Moore, J. K., 2000. Organization of the human superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51(4):403-412.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., Mucke, L., 2011. The many faces of Tau. *Neuron* 12; 70(3): 410-426.
- Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Alavi Naini, S. M., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., Buée, L., Goedert, M., Brion, J. P., 2017. What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol Commun* 19;5(1): 99.
- Newlands, S. D., Perachio, A. A., 2003. Central projections of the vestibular nerve: a review and single fiber study in the Mongolian gerbil. *Brain Res Bull* 60: 475-495.
- Nieuwenhuys, R., Voogd, J., van Huijzen, C., 2008. *The Human Central Nervous-System*. (4. Auflage). Springer, New York.

- Park, J. J., Tang, Y., Lopez, I., Ishijima, A., 2001. Age-related change in the number of neurons in the human vestibular ganglion. *J Comp Neurol* 431(4): 437-443.
- Peterson, B. W., Boyle, R., 2004. Vestibulocollic reflexes, in: Highstein, S. M., Fay, R. R., Popper, A. N. (Hrsg.), *The Vestibular System*. Springer, New York, 343-374.
- Planel, E., Richter, K. E., Nolan, C. E., Finley, J. E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman, M., Wang, L., Schachter, J. B., Nelson, R. B., Lau, L. F., Duff, K. E., 2007. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27(12): 3090-3097.
- Pompeiano, O., 1972. Spinovestibular relations: Anatomical and physiological aspects. *Prog Brain Res* 37, 263-296.
- Ransmayr, G., Benesch, H., Nowakowski, C., König, G., Heinsen, H., Riederer, P., Hersh, L. B., 1994. Neurofibrillary tangles without cell loss in the lateral vestibular nucleus of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 177(1-2):11-14.
- Respondek, G., Stamelou, M., Kurz, C., Ferguson, L. W., Rajput, A., Chiu, W. Z., van Swieten, J. C., Troakes, C., al Sarraj, S., Gelpi, E., Gaig, C., Tolosa, E., Oertel, W. H., Giese, A., Roeber, S., Arzberger, T., Wagenpfeil, S., Höglinger, G. U., 2014. The phenotypic spectrum of progressive supranuclear palsy: a retrospective multicenter study of 100 definite cases. *Mov Disord* 29: 1758–1766.
- Respondek, G., Höglinger, G. U., 2016. The phenotypic spectrum of progressive supranuclear palsy. *Parkinsonism Relat Disord* 1:34-36.
- Rodriguez, R. D., Grinberg, L. T., 2015. Argrophilic grain disease: An underestimated tauopathy. *Dement Neuropsychol* 9(1): 2-8.
- Roy, J. E., Cullen, K. E., 1998. A neural correlate for vestibulo-ocular reflex suppression during voluntary eye-head gaze shifts. *Nat Neurosci* 1(5):404-410.
- Saito, Y., Ruberu, N. N., Sawabe, M., Arai, T., Tanaka, N., Kakuta, Y., Yamanouchi, H., Murayama, S., 2004. Staging of argrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(9): 911-918.

Schraen-Maschke, S., Sergeant, N., Dhaenens, C.M., Bombois, S., Dera-mecourt, V., Caillet-Boudin, M.L., Pasquier, F., Maurage, C.A., Sablonnière, B., Vanmechelen, E., Buée, L., 2008. Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. *Biomark Med* 2(4):363-384.

Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Quinn, N. P., 1999. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 354:1771-1775.

Shinoda, Y., Sugiuchi, Y., Izawa, Y., Hata, Y., 2006. Long descending motor tract axons and their control of neck and axial muscles. *Prog Brain Res* 151: 527-563.

Spencer, R. F., Wenthold, R. J., Baker, R., 1989. Evidence for glycine as an inhibitory neurotransmitter of vestibular, reticular, and prepositus hypoglossi neurons that project to the cat abducens nucleus. *J Neurosci* 9, 2718-2736.

Spillantini, M. G., Goedert, M., 2013. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12,609-622.

Steele, J. C., Richardson, J. C., Olszewski, J., 1964. Progressive supranuclear palsy. A heterogenous degeneration involving the brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch Neurol* 10: 333-359.

Steiger, H., Büttner-Ennever, J., 1978. Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus: a double retrograde tracer study in the cat. *Brain Res* 148: 181-188.

Sternberger, L. A., Sternberger, N. H., 1983. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and non-phosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 80 6126–6130.

Straka, H., Dieringer, N., 2004. Basic organization principles of the VOR: lessons from frogs. *Prog Neurobiol* 73(4): 259-309.

Straka, H., Zwergal, A., Cullen, K. E., 2016. Vestibular animal models: contributions to understanding physiology and disease. *J Neurol* 263: 10-23.

Stratmann, K., Heinsen, H., Korf, H. W., Del Turco, D., Ghebremedhin, E., Seidel, K., Bouzrou, M., Grinberg, L. T., Bohl, J., Wharton, S. B., den Dunnen, W., Rüb,

U., 2016. Precortical Phase of Alzheimer's Disease (AD)-Related Tau Cytoskeletal Pathology. *Brain Pathol* 26(3): 371-386.

Tang, Y., Lopez, I., Baloh, R. W., 2001. Age-related change of the neuronal number in the human medial vestibular nucleus: a stereological investigation. *J Vestib Res*. 2001;11(6):357-363.

Terman, A., Brunk, U. T., 1998. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS*. 106(2): 265-276.

Thompson, A. M., Schofield, B. R., 2000. Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech*. 15;51(4): 330-354.

Tolnay, M., Clavaguera, F., 2004. Argyrophilic grain disease: a late-onset dementia with distinctive features among tauopathies. *Neuropathology* 24(4): 269-283.

Tsang, Y. M., Chiong, F., Kuznetsov, D., Kasarskis, E., Geula, C., 2000. Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res* 861(1),45-58.

Walsh, D. M., Selkoe, D. J., 2016. A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 17(4): 251-260.

Wasicky, R., Horn, A. K., Büttner-Ennever, J. A., 2004. Twitch and nontwitch-motoneuron subgroups in the oculomotor nucleus of monkeys receive different afferent projections. *J Comp Neurol* 479(2): 117-129.

Williams, D. R., de Silva, R., Paviour, D. C., Pittman, A., Watt, H. C., Kilford, L., Holton, J. L., Revesz, T., Lees, A. J., 2005. Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism. *Brain* 128(6): 1247-1258.

Williams, D. R., Holton, J. L., Strand, C., Pittman, A., de Silva, R., Lees, A. J., Revesz, T., 2007. Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain* 130 (Pt 6): 1566-1576.

Williams, D. R., Holton, J. L., Strand, K., Revesz, T., Lees, A. J., 2007. Pure akinesia with gait freezing: a third clinical phenotype of progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 22:2235–2241.

Wu, J. W., Herman, M., Liu, L., Simoes, S., Acker, C., Figueroa, H., Steinberg, J., Margittai, M., Kaye, R., Zurzolo, C., Di Paolo, G., Duff, K. E., 2013. Small misfolded Tau Species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem* 288(3): 1856-1870.

Xiao, S., McLean, J., Robertson, J., 2006. Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. *Biochim. Biophys Acta* 1762, 1001-1012.

Yoshida, M., 2014. Astrocytic inclusions in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Neuropathol* 34(6): 555-570.

Zhang, J. H., Sampogna, S., Morales, F. R., Chase, M. H., 2000. Age-dependant changes in the mid-sized neurofilament subunit in sensory-motor systems of the cat brainstem: an immunocytochemical study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55 B233-241.

Zwergal, A., Strupp, M., Brandt, T., Büttner-Ennever, J. A., 2009. Parallel ascending vestibular pathways, anatomical localization and functional specialization. *Ann N Y Acad Sci* 1164: 51-59.

Anhang

Färbeprotokolle:

Protokoll 1: Nissl-Färbung

Protokoll 2: LFB-Färbung

Protokoll 3: NP-NF/SMI-32-Färbung

Protokoll 4: AT-8-Färbung

Nisslfärbung für Paraffinschnitte

Lösung:

0,5% Cresylechtviolett Bayer Leverkusen (513459) in Aqua dest.

0,5 ml Eisessig pro 1 Liter Farblösung

Entfetten:

1. 2x 15 min Xylol
2. 5 min 100% Alkohol
3. 5 min 96% Alkohol
4. 5 min 90% Alkohol
5. 5 min 70% Alkohol
6. 5 min Aqua dest.

Färbung:

1. kurz waschen 1% Essigsäure
2. 5-10 min 0,5% Cresylviolett-Farblösung
3. kurz waschen 1% Essigsäure
4. kurz differenzieren 100% Alkohol
5. 2 min 70% Alkohol
6. 2 min 90% Alkohol
7. 2 min 96% Alkohol
8. 2 min 100% Alkohol
9. 2x 15 min Xylol
10. eindecken DPX

Luxolfärbung für Paraffinschnitte

Lösungen:

Luxolblau:

0,1 g Luxol-Fast-Blue, 100 ml 95% Alkohol, 0,5 ml 10% Essigsäure

Karbolfuchsin:

1 g basisches Fuchsin, 10 ml 100% Alkohol, 100 ml 5% Karbol-Wasser (=Phenol);
alles mischen und filtrieren

Fixierung:

10 ml Essigsäure, 10 ml konz. Formalin, 1000 ml Aqua dest.

0,05% Lithiumcarbonatlösung:

0,5 g Lithiumcarbonat, 10000 ml Aqua dest.

Färbung:

- | | |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1. 2x 15 min | Xylol |
| 2. 10 min | 100% Alkohol |
| 3. 10 min | 96% Alkohol |
| 4. 2h bei 60°C | Luxolblau |
| 5. spülen | 95% Alkohol |
| 6. spülen | Aqua dest. |
| 7. 10 sek | 0,05% Lithiumcarbonatlösung |
| 8. 30 sek differenzieren | 70% Alkohol |
| 9. spülen | Aqua dest. |
| 10. 25 sek | 0,05% Lithiumcarbonatlösung |
| 11. differenzieren | 70% Alkohol |
| 12. 25 sek | 0,05% Lithiumcarbonatlösung |

13. differenzieren	70% Alkohol
14. 3 min	Karbofuchsin
15. kurz waschen	Fixierung
16. 5 min waschen	Fixierung
17. spülen	Aqua dest.
18. kurz waschen	100% Alkohol
19. 5 min waschen	100% Alkohol
20. trocknen lassen	
21. 2x15 min	Xylol
22. eindecken	DPX

NP-NF/SMI 32-Färbung

Mouse-monoclonal antibody to Neurofilaments (SMI-32 Sternberger Monoclonals Incorporated: CatNr. SMI 32 (Lagerungstemperatur: -20°C))

Pufferlösungen:

0,01M Sodium Citrat Puffer, pH6

2,94g Sodium Citrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) in 900 ml Aqua dest., auf pH 6,0 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

TBS

24,2g Trizma Base + 17,0g NaCl in 2000ml Aqua dest., mit HCl auf pH 7,4 einstellen

Lösung DAB-Reaktionslösung

20 ml 0,05M TBS, pH 7,6 + 40 mg Ammonium Nickel (gut filtern) + 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung + 10µl 30% H₂O₂

Vorbehandlung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

- | | |
|----------------|---|
| 1. 2x 15 min | Xylol |
| 2. 5 min | 100% Alkohol |
| 3. 5 min | 96% Alkohol |
| 4. 5 min | 90% Alkohol |
| 5. 5 min | 70% Alkohol |
| 6. kurz | Aqua dest. |
| 7. 3x3 min | in 0,01M Citrat-Puffer, pH 6,0 in Mikrowelle, Stufe 8 (in Plastik-Küvetten; zwischen den Kochphasen 0,01M Citrat-Puffer nachfüllen) |
| 8. 15 min (RT) | in Citrat-Puffer abkühlen lassen |

1. Tag

9. spülen	0,1M TBS, pH 7,4
10.30 min	Peroxidaseblockierung (1% H ₂ O ₂ in 0,1M TBS)
11. 3x 10 min	0,1M TBS, pH 7,4
12. 1h (RT)	Präinkubation: 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS, pH 7,4
13. 48h bei 4°C	1. AK: mouse anti-SMI-32 1:5000 in 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS, pH 7,4

2. Tag

14. 3x 10 min	0,1M TBS, pH 7,4
15. 1h bei RT in	biotinierter 2. AK.: biot. Horse anti-Mouse 1:200
16. 3x 10 min	0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)
17. 1h bei RT	0,1M TBS, pH 7,4 Extravidin-Peroxidase 1:1000 in 0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA) (30 min vorher ansetzen)
18. 3x 10 min	0,1M TBS, pH 7,4
19. 10 min	DAB-Reaktion (0,025% DAB + 0,015% H ₂ O ₂ in 0,05M TBS, pH 7,6)
20. 3x 10 min	0,1M TBS, pH 7,4
21. 5 min	Aqua dest.
22. trocknen lassen	
23. 5 min	70% Alkohol
24. 5 min	90% Alkohol
25. 5 min	96% Alkohol
26. 5 min	100% Alkohol
27. 1x 5, 1x 15 min	Xylol
28. eindecken	DPX

AT-8-Färbung

Mouse-anti-human-PHF-Tau-monoclonal Antibody (AT8);
Thermo Scientific: MN1020 (Lagerungstemperatur: -20°C)

Produkte:

SuperVision 2; 2-Schritt-Polymersystem.Kit, HRP-konjugiert mit DAB, (Lagerungstemperatur 4°C);
(DCS Innovative Diagnostik-Systeme; Kat-Nr.: PD000KIT)

SeraPlus (Special Processed FBS), (Lagerungstemperatur -20°C)
(PAN Biotech GmbH, KatNr.: 3702-P111606)

Pufferlösungen:

0,01M Natrium Citrat Puffer, pH6

2,94g Natrium Citrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) in 900 ml Aqua dest.,
auf pH 6,0 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Blocking-Lösung

1% Serum (BSA) in 0,1M PBS, pH 7,3

12,7 g Na_2HPO_4 + 3,9 g NaH_2PO_4 + 85 g NaCl in 1000 ml Aqua dest.,
auf pH 7,3 einstellen

Lösung DAB-Reaktionslösung

19,5 ml 0,05M TBS, pH 7,6 + 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung
+ 10µl 30% H_2O_2

Hämalaun-Lösung für Gegenfärbung nach Meyer

Hämalaun: 1000 ml Aqua dest. + 1 g Hämatoxilin + 0,2 g Natriumjodat
+ 50 g Kalialaun + 50 g Chloralhydrat + 1 g krist. Zitronensäure

filtrieren und in dunkler Glasflasche lagern

Vorbehandlung:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

1. 2x 15 min Xylol
2. 10 min 100% Alkohol
3. 10 min 96% Alkohol
4. 10 min 90% Alkohol
5. 10 min 70% Alkohol
6. kurz Aqua dest.
7. 5x3 min in 0,01M Citrat-Puffer, pH 6,0 in Mikrowelle, Stufe 8
(in Plastik-Küvetten; zwischen den Kochphasen
0,01M Citrat-Puffer nachfüllen)
8. 15 min (RT) in Citrat-Puffer abkühlen lassen

1. Tag

9. waschen 0,1M PBS, pH 7,3
10. 15-20 min Peroxidaseblockierung (1% H₂O₂ in 0,1M PBS)
11. 5 min Leitungswasser
12. kurz Aqua dest.
13. 5 min 0,1M PBS, pH 7,3
14. 5 min Blocking-Lösung: 1% BSA in PBS
15. 24h bei 4°C Antikörper: mouse-anti-Tau 1:500 in Blocking-Lösung
(1% BSA in PBS)

2. Tag

16. 2x 5 min 0,1M PBS, pH 7,3
17. 20 min Reagenz SE (DCS-Polymer-Enhancer) mit PBS
18. 2x 5 min 0,1M PBS, pH 7,3
19. 30 min Reagenz Poly-HRP mit PBS
20. 2x 5 min 0,1M PBS, pH 7,3
21. 10 min DAB-Reaktion (0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in
0,05M TBS, pH 8)
auf die Schnitte auftropfen bis sich eine adäquate
Farbentwicklung zeigt
22. 5 min waschen 0,1M PBS, pH 7,3
23. 5 min Aqua dest.
24. trocknen lassen
25. 5 min Aqua dest.

26.5-10 min	Hämalaun-Lösung
27. 10 min bläuen	fließendes Leitungswasser
28. kurz spülen	Aqua dest.
29. 5 min	70% Alkohol
30. 5 min	90% Alkohol
31. 5 min	96% Alkohol
32. 5 min	100% Alkohol
33. 2x 15 min	Xylol
34. eindecken	DPX

Eidesstattliche Versicherung

McMillan, Anja Maria

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

„Identifizierung der sekundären vestibulo-okulären Neurone beim Menschen und deren Tau-Pathologie in unterschiedlichen Stadien bei Fällen mit progressiver supranukleärer Parese (PSP)“

selbstständig 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.

Augsburg, den 10.04.2024

Anja Maria McMillan

Danksagung

Vielen Dank Herrn Prof. Dr. Jens Waschke für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Doktorarbeit an der Anatomischen Anstalt der LMU.

Meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler möchte ich für Ihre Unterstützung ganz besonders danken: für ihre fachliche Betreuung, ihre immer offene Türe, ihren motivierenden Beistand und nicht zuletzt für ihr –in jeder Lebenslage– in mich gesetztes Vertrauen.

Bei Herrn M. phil Ahmed Messoudi möchte ich mich ebenfalls besonders bedanken: für seine Freundschaft und seine Unterstützung im Labor.

Für ihre geduldige, unerschütterliche Hilfe im Labor und ihren Beistand möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Christine Unger bedanken. Danke auch an Karoline Lienbacher, Miriam Barnerßoi und Christina Zeeh für die freundschaftliche Aufnahme in das Oculomotorius-Team und so manches aufheiternde Gespräch.

Ich möchte außerdem meiner Familie danken, allen voran meinen wunderbaren Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre. Danke für Euren liebevollen Rückhalt und Eure Unterstützung durch meine Studienjahre! Vielen Dank ebenso für die unzähligen schönen Stunden, die Ihr für Jonah und Jakob da wart und seid!

Vielen Dank ebenfalls an die Holzhäusener Familie: Danke für Eure offene Türe, „mein“ ruhiges Arbeitszimmer und die vielen erlebnisreichen Stunden, die Ihr den Kindern schenkt!

Schlussendlich vielen Dank, Joachim! Ohne Deine bedingungslose Bereitschaft, dieses Projekt mit mir gemeinsam zu Ende zu bringen, wäre mir der Abschluss dieser Arbeit schlicht unmöglich gewesen. Danke für Dein Vertrauen und Deinen unerschöpflichen Einsatz für unsere Familie!

Publikationen:

Bender, A., Schwarzkopf, R. M., McMillan, A., Krishnan, K. J., Rieder, G., Neumann, M., Elstner, M., Turnbull, D. M., Klopstock, T., 2008. Dopaminergic midbrain neurons are the prime target for mitochondrial DNA deletions. *J Neurol.* 255(8):1231-1235.

McMillan, A., Roeber, S., Mustari, M., Horn, A., 2017. Identification of secondary vestibulo-ocular neurons in human based on their histochemical characteristics found in monkey. Application in post-mortem studies of PSP cases. (Poster)

McMillan, A., Mustari, M., Horn, A., 2017. Identification of secondary vestibulo-ocular neurons in human based on their histochemical characteristics found in monkey. *J Neurol.* 264(3):583-585.

Vogel, B., McMillan, A., Dethleffsen, K., 2019. Peer-Assisted Learning – mehr als eine Methode, in: Noller, J., Beitz-Radzio, C., Kugelmann, D., Sontheimer, S., Westerholz, S. (Hrsg.), *Methoden in der Hochschullehre: Interdisziplinäre Perspektiven aus der Praxis.* Springer, Wiesbaden, 45-62.

Heiß, A., McMillan, A., Horn-Bochtler, A., Messoudi, A., Dethleffsen, K., 2019. SimPli-FiT (Simulationen mündlicher Prüfungen live – Fit durch individualisiertes Training). Symposium Innovationen in der Hochschullehre (Poster). LMU, München.

Heiß, A., McMillan, A., Horn-Bochtler, A., Messoudi, A., Dethleffsen, K., 2021. SimPli-FiT (Simulationen mündlicher Prüfungen live – Fit durch individualisiertes Training) – ein Projekt zur Etablierung von Prüfungssimulationen, in: Frey, D., Uemminghaus, M. (Hrsg.), *Innovative Lehre an der Hochschule.* Springer, Berlin, Heidelberg. 161-163.