

Aus der  
Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. W. Lange

**Abgrenzung funktioneller Nervenzellgruppen in den  
Augenmuskelkernen des Mittelhirns beim Menschen**

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

vorgelegt von  
Patricia Ardeleanu  
aus  
Alzenau

Jahr  
2007

---

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter(in): Professor Dr. med. J. A.  
Büttner-Ennever, Ph. D. (London)

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Neumann  
Priv.-Doz. Dr. K. Jahn

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

Dekan: Professor Dr.med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2007

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Augenmuskeln .....	1
1.1.1 Feinbau der Augenmuskeln.....	3
1.1.1.1 Orbitale und globale Schicht .....	3
1.1.1.2 Motorische Innervation.....	4
1.1.1.3 Sensorische Innervation.....	5
<b>1.2 Motoneurone der Augenmuskeln .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Identifizierung funktioneller Neurone beim Menschen.....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Perineuronale Netze.....	8
<b>1.4 Fragestellung .....</b>	<b>10</b>
<b>2 Material, Methoden und Auswertung</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Affe.....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Operation und Injektion .....	12
2.1.2 Perfusion .....	12
2.1.3 Histologische Aufarbeitung .....	13
2.1.3.1 Nachweis des Tracers und der perineuronalen Netze .....	13
2.1.3.2 Immunocytochemische Anfärbung der perineuronalen Netze.....	14
<b>2.2 Mensch .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Obduktionsfälle.....	16
2.2.2 Präparation .....	17
2.2.3 Histologische Aufarbeitung .....	18
2.2.3.1 Anfärbung der perineuronalen Netze .....	18
2.2.4 Auswertung .....	19
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Affe.....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Tracer .....	20

---

3.1.1.1	Motoneurone des Nucleus oculomotorius .....	20
3.1.1.2	Doppelmarkierung auf perineuronale Netze und Tracer .....	21
3.1.2	Serienschnitte mit perineuronalen Netzen und Nissl .....	23
3.1.2.1	Nucleus trochlearis .....	23
3.1.2.2	Nucleus oculomotorius.....	24
3.1.2.3	Edinger-Westphal-Komplex .....	25
<b>3.2</b>	<b>Mensch .....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Perineuronale Netze und Nissl .....	26
3.2.1.1	Nucleus trochlearis .....	26
3.2.1.2	Nucleus oculomotorius.....	26
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Perineuronale Netze und Augenmuskelkerne beim Rhesusaffen .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Edinger-Westphal-Kern Komplex beim Rhesusaffen .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung der Motoneurone von multipel-innervierten Muskelfasern beim Menschen.....</b>	<b>33</b>
4.3.1	Nucleus trochlearis.....	33
4.3.2	Nucleus oculomotorius .....	34
4.3.3	Motoneurone von multipel-innervierten Muskelfasern .....	34
4.3.4	Wo liegt der Edinger-Westphal-Kern beim Menschen?.....	35
<b>4.4</b>	<b>Funktion der Motoneurone von einzeln- und multipel-innervierten Muskelfasern.....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Anhang zu Material und Methoden .....</b>	<b>50</b>
	<b>Lösungen .....</b>	<b>50</b>
	<b>Protokolle .....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>58</b>

---

## Abkürzungen

AM:	Anteromedianer Kern
CCN:	Nucleus centralis caudalis
CSPG:	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan
DAB:	Diaminobenzidin
DR:	Nucleus raphe dorsalis
EW:	Nucleus Edinger-Westphal
HRP:	Meerrettichperoxidase
INC:	Interstitieller Nucleus von Cajal
IO:	Musculus obliquus inferior
IR:	Musculus rectus inferior
LR:	Musculus rectus lateralis
M:	Musculus
MIF:	Multipel-innervierte Muskelfaser
MLF:	Fasciculus longitudinalis medialis
MRF:	Mesenzephalic Formatio reticularis
MR:	Musculus rectus medialis
NB:	Nucleus von Bechterew
Ncl:	Nucleus
NIII:	Nervus oculomotorius
NVI:	Nervus abducens
NVII:	Nervus facialis
III:	Nucleus oculomotorius
IIIc:	C-Gruppe des Nucleus oculomotorius
IIIs:	S-Gruppe des Nucleus oculomotorius
IIIp:	Nucleus von Perlia
IV:	Nucleus trochlearis
VI:	Nucleus abducens

---

PAV:	Parvalbumin
PBS:	Phosphatpuffer/NaCl
PFA:	Paraformaldehyd
SR:	Musculus rectus superior
SIF:	Einzel-innervierte Muskelfaser
SO:	Musculus obliquus superior
TBS:	Tris-Puffer/NaCl
UR:	Urocortin-Gruppe
URdm:	Dorsomediale Urocortin-Gruppe
URd:	Dorsale Urocortin-Gruppe
WFA:	Wisteria floribunda Agglutinin
WGA-HRP:	Weizenkeimagglutinin gekoppelt an Meerrettichperoxidase

# 1 Einleitung

## 1.1 Augenmuskeln

Die Bewegungen des Auges werden bei allen Wirbeltieren durch das Zusammenspiel von sechs äußeren Augenmuskeln ermöglicht, vier „geraden“ Musculi recti inferior (IR), superior (SR), medialis (MR) und lateralis (LR) sowie zwei „schrägen“ Musculi obliqui inferior (IO) und superior (SO) (Abb. 1). Zu den Augenmuskeln rechnet man gewöhnlich wegen seines gemeinsamen Ursprungs, Verlaufs und Innervation auch den Musculus levator palpebrae superioris, welcher als Lidheber fungiert, und phylogenetisch erst ab den Säugetieren vorhanden ist.

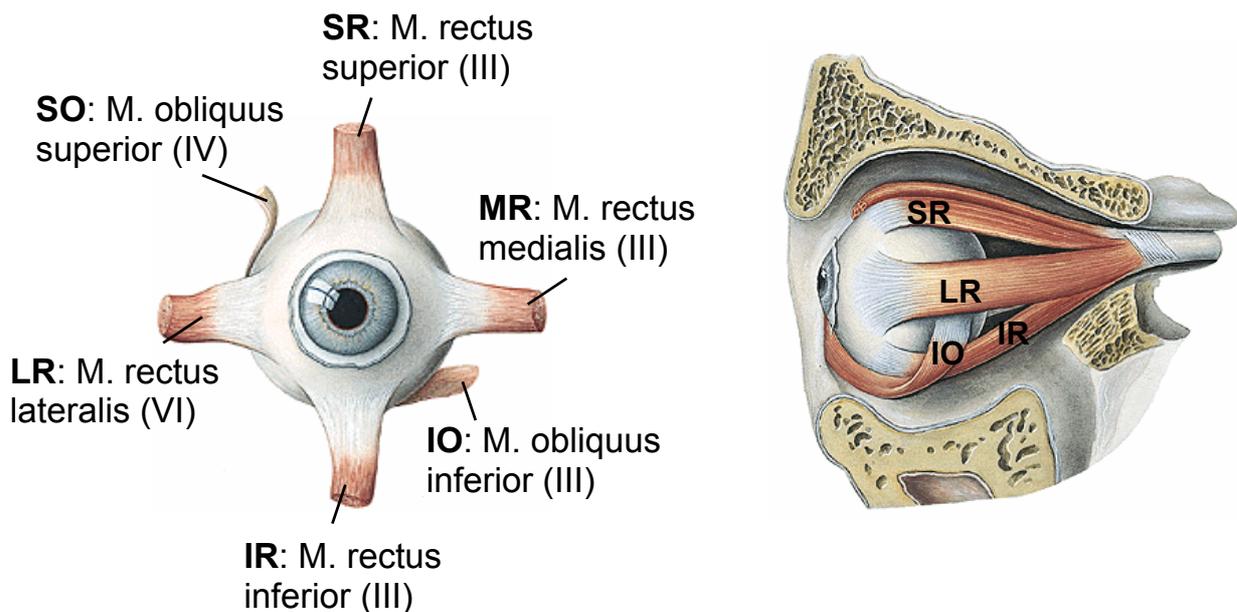


Abb. 1: Augenmuskeln beim Menschen, schematisiert in der Ansicht von frontal (links, rechtes Auge) und lateral (rechts, linkes Auge).

Die vier Musculi recti und der Musculus obliquus superior entspringen einem gemeinsamen Sehnenring, dem Anulus tendineus communis, an der Öffnung des Sehnervenkanals in die Augenhöhle (Abb. 1). Der Musculus obliquus inferior entspringt an der medialen Wand der Augenhöhle im Bereich des Tränennasengangs. Die schrägen Augenmuskeln setzen hinter dem Äquator an

(Abb. 1). Durch die symmetrische Verteilung des Musculus rectus medialis und lateralis an den gegenüberliegenden Seiten des Augapfels bewegen sie diesen als funktionelle Agonisten in horizontaler Richtung. Der Musculus obliquus superior wird hingegen durch die Trochlea am Stirnbein umgelenkt, so dass die Sehne von vorne an den Augapfel herantritt und somit den Blick nach außen unten lenkt. Ähnlich verläuft die Sehne des Musculus obliquus inferior, welcher den Blick nach außen oben ermöglicht. Die jeweiligen Einzelzugrichtungen weichen jedoch um etwa 15% von der Vertikalen ab. Die Richtung der Augenbewegung und Augenstellung resultiert aus der Kontraktion eines oder mehrerer Augenmuskeln bei gleichzeitiger Relaxation der Agonisten, deren Einzelzugrichtung sich wiederum aus den jeweiligen Muskelansatzstellen und dem Muskelverlauf ergeben (Übersicht: Leigh und Zee, 2006).

Beim Primaten lassen sich fünf verschiedene Augenbewegungstypen unterscheiden: Der vestibulo-okuläre Reflex, der optokinetische Reflex, Sakkaden (Blicksprünge), langsame Augenfolgebewegungen (smooth pursuit) und Vergenz (einzige diskongjugierte Augenbewegung). Die verschiedenen Augenbewegungen werden über unterschiedliche prämotorische Bahnen im Hirnstamm generiert, enden aber auf den Motoneuronen der Augenmuskeln als gemeinsame Endstrecke (Übersicht: Büttner und Büttner-Ennever, 2006). Zu den schnellen Augenbewegungen gehören Sakkaden und die raschen Phasen des optokinetischen oder vestibulären Nystagmus. Sakkaden sind bei Primaten der häufigste Augenbewegungstyp. Bei raschen Blicksprüngen (=Sakkaden) wird das Auge aus der Ruhestellung mit hoher Geschwindigkeit auf ein neues Ziel gerichtet. Die prämotorischen Areale hierfür finden sich in zwei spezialisierten Anteilen der Formatio reticularis. Bei den langsamen Augenbewegungen unterscheidet man willkürliche Folgebewegungen von den Reflexbewegungen des optokinetischen oder des vestibulären Nystagmus, welche beide der Blickstabilisierung bei bewegtem Kopf dienen. Konvergenzbewegungen der Augen sind Teil des Naheinstellreflex, einhergehend mit der verstärkten Krümmung der Linse und einem Engerwerden der Pupille bei Fixation naher Objekte. Die präganglionären Neurone des Musculus sphincter pupillae (Pupillenkonstriktion) und des Musculus ciliaris (Linsenkrümmung) liegen im Edinger-Westphal-Kern-Komplex (Übersicht: Büttner-Ennever, 2006). An die Augenmuskeln werden dadurch hohe Anforderungen gestellt. Diese zeigen sich in

der Anzahl von mindesten 6 verschiedenen Muskelfasertypen (Spencer und Porter, 2006).

## 1.1.1 Feinbau der Augenmuskeln

### 1.1.1.1 Orbitale und globale Schicht

Der Augenmuskel kann im Unterschied zum normalen Skelettmuskel beim Säuger in zwei histologisch voneinander abgrenzbare Regionen aufgeteilt werden. Zum einen in eine äußere, der Orbita zugewandten Schicht, die sog. orbitale Schicht, welche aus schmalen Fasern besteht und zum anderen in eine dem Augenerbulbus zugewandte globale Schicht, mit breiteren Fasern (Abb. 2; Oh et al., 2001; Übersicht: Spencer und Porter, 2006). Neuere Untersuchungen beschreiben beim Menschen zusätzlich eine dritte Region außerhalb der orbitalen Schicht (Wasicky et al., 2000), welche als „*marginal layer*“ bezeichnet wird.

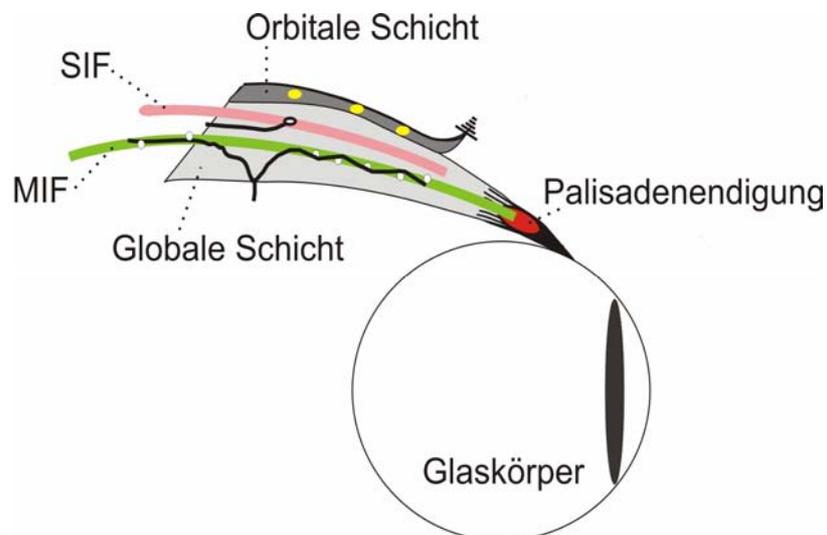


Abb. 2: Orbitale und globale Schicht des Augenmuskels

Die globale Muskelschicht erstreckt sich über die gesamte Muskellänge vom Anulus tendineus communis und setzt über eine definierte Sehne am Bulbus an. Die orbitale Schicht hingegen endet mehr proximal und geht über in Bindegewebsblätter der Musculi recti (sog. Tenonsche Kapsel) und bildet dort die sog. „Pulleys“, welche die

Zugrichtung der Augenmuskeln modulieren (Porter et al., 1996; Demer et al., 2000; Khanna und Porter, 2001; Demer, 2002; Ruskell et al., 2005).

### 1.1.1.2 Motorische Innervation

Bereits 1955 konnten Siebeck und Kruger zwei grundlegende Fasertypen identifizieren, welche aufgrund ihrer histologischen Erscheinung als „Fibrillenstruktur“ und „Felderstruktur“ bezeichnet wurden (Siebeck und Kruger, 1955). Bis jetzt konnten mindestens sechs unterschiedliche Arten von Muskelfasern in den Augenmuskeln identifiziert werden, welche jedoch an Hand der Innervation in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden können: einzeln- und multipel-innervierte Muskelfasern (Lennerstrand und Nichols, 1977; Bondi und Chiarandini, 1983; Übersicht: Spencer und Porter, 2006).

Die „**einzeln-innervierten**“-Fasern (**SIFs**=singly innervated fibers) entsprechen den Fibrillenstruktur-Fasern und machen etwa 80% des Augenmuskels aus. Sie entsprechen den typischen Skelettmuskelfasern. Die Innervation erfolgt durch relativ große, 7-11µm dicke Nerven, deren motorische Endplatten in Form von breiten sog. „en plaque“ Endigungen im zentralen Drittel der Muskelfaser terminieren (Namba et al., 1968; Kaczmarek, 1974), wobei pro Faser nur eine solche Endigung vorhanden ist. Die SIFs reagieren auf elektrische Stimulation mit einer Alles-oder-nichts-Antwort, welche als Aktionspotential über die gesamte Länge der Muskelfaser fortgeleitet wird und im Muskel zu einer schnellen Kontraktion führt, so dass sie aufgrund dessen wahrscheinlich den twitch-Fasern entsprechen.

Die „**multipel-innervierten**“-Fasern (**MIFs**=multiply innervated fibers) entsprechen den Felderstruktur-Fasern und umfassen 10-20% des Augenmuskels. Multipel-innervierte Muskelfasern findet man äußerst selten bei Säugetieren (Porter et al., 1995; Übersicht: Spencer und Porter, 2006). Sie treten lediglich in den Augenmuskeln, dem Larynx und in Muskeln des Mittelohres auf und sind ansonsten eher bei Amphibien und Vögeln verbreitet (Morgan und Proske, 1984). Die Innervation dieser Muskelfasern erfolgt über dünne 3-5 µm starke myelinisierte Nerven, deren motorische Endplatten als sog. „en grappe“ Endigungen über die gesamte Länge des Muskels verteilt sind. Auf einen elektrischen Reiz antworten diese mit einer tonischen Kontraktion, welche nicht über die gesamte Muskelfaser

fortgeleitet wird, sondern lokal an den en grappe Endigungen bleibt. Die Kontraktion der multipel-innervierten Muskelfasern ist langsamer als die aller anderen Fasertypen, aber sie können die Muskelspannung über eine längere Zeitdauer mit weniger Energieaufwand als die SIFs aufrechterhalten und entsprechen damit am ehesten den non-twitch-Fasern (Lennerstrand und Nichols, 1977; Morgan und Proske, 1984; Nelson et al., 1986; Spencer und Porter, 2006).

### **1.1.1.3 Sensorische Innervation**

Für den Skelettmuskel wurde nachgewiesen, dass die sensorische Information, welche für die motorische Kontrolle des Skelettmuskels benötigt wird, durch neuromuskuläre Spindeln und Golgi-Sehnenorgane vermittelt wird. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen zwar, dass das Gehirn sensorische Eingänge von den Augenmuskeln erhält, es herrscht allerdings noch keine Einigkeit darüber, welche sensorischen Strukturen propriozeptive Signale des Augenmuskels aufnehmen und über welche Bahnen sie ins Gehirn gelangen (Büttner-Ennever et al., 2006). Die Existenz propriozeptiver Organe im Augenmuskel vom Säuger zeigt bisher ein relativ uneinheitliches Bild. Muskelspindeln werden beim Menschen und zwei-zehigen Säugern gefunden, nicht jedoch bei Katzen und nicht bei allen Affenarten (Bruenech und Ruskell, 2001; Büttner-Ennever et al., 2006).

Die weitere Analyse der Literatur verdeutlicht, dass Muskelspindeln immer in der orbitalen Schicht und der Übergangszone zwischen der orbitalen und der globalen Schicht liegen, niemals jedoch mit der globalen Schicht assoziiert sind (Greene und Jampel, 1966; Ruskell, 1989; 1999; Übersicht: Büttner-Ennever et al., 2006).

Als weiteren Propriozeptor findet man Golgi-Sehnenorgane in den äußeren Augenmuskeln von Paarhufern, wie beispielsweise dem Schaf, Kamel, Schwein (Ruskell, 1990; 1999, Blumer et al., 2000). Sie weisen strukturelle Merkmale auf, welche in den skelettalen Golgi-Sehnenorganen nicht zu finden sind. Desweiteren sind sie ausschließlich mit den multipel-innervierten Muskelfasern assoziiert, welche lediglich in den Augenmuskeln vorkommen und in diesem Fall dazu dienen die Sensitivität der Golgi-Sehnenorgane zu regulieren. Die Golgi-Sehnenorgane liegen in einer speziellen Schicht des Augenmuskels, die als „peripheral patch layer“ bezeichnet wird (Blumer et al., 2000). Diese „dritte“ Muskelschicht umgibt die orbitale

Seite des Augenmuskels und ist bisher beim Schaf (Harker, 1972) und möglicherweise beim Menschen (Wasicky et al., 2000) beschrieben worden.

Als dritten möglichen Propriozeptor enthält die globale Schicht aller Augenmuskeln sogenannte Palisadenendigungen an den Muskelsehnenübergängen (Dogiel, 1906; Cilimbaris, 1910; Ruskell, 1999). Gesichert ist bisher, dass die Palisadenendigungen einzig und alleine an der Spitze der multipel-innervierten Muskelfasern der globalen Schicht inserieren. Unklar ist bisher jedoch, wo ihre Zellsomata liegen und ob sie motorisch oder sensorisch wirken. Eine Hypothese besagt, dass die Palisadenendigungen zusammen mit den MIFs einen komplizierten propriozeptiven Apparat bilden, vergleichbar mit einer „umgekehrten“ Muskelspindel (Robinson, 1991).

## 1.2 Motoneurone der Augenmuskeln

Die motorische Innervation der äußeren Augenmuskeln ist innerhalb der Vertebraten relativ konstant und erfolgt von drei Kerngebieten im Hirnstamm. Die Motoneurone des Musculus rectus lateralis (LR) liegen im Nucleus abducens (VI), die des Musculus obliquus superior (SO) im Nucleus trochlearis (IV). Die Motoneurone des Musculus rectus inferior (IR), superior (SR), medialis (MR) und Musculus obliquus inferior (IO) liegen topographisch organisiert im Nucleus oculomotorius (III) (Abb. 3A).

Kürzlich konnte am Rhesusaffen mit retrograden Tracermethoden gezeigt werden, dass beide Muskelfasertypen des Augenmuskels, SIF- und MIF-Fasern, von jeweils voneinander getrennt liegenden Motoneuronengruppen innerviert werden. Die SIF-Motoneurone gruppieren sich innerhalb, die MIF-Motoneurone eher außerhalb der klassischen Augenmuskelkerne. Dabei liegen die MIF-Motoneurone des IR und MR dorsomedial zum Ncl. oculomotorius, die MIF-Motoneurone des SR und IO an der Mittellinie zwischen den beiden Ncl. oculomotorii, die des SO formen eine Kappe dorsal zum Ncl. trochlearis, und die des LR bilden eine Schale um den medialen Teil des Ncl. abducens. Die MIF-Motoneurone des IR und MR dorsomedial zum Ncl. oculomotorius bilden die größte und am meisten kompakte Gruppe von MIF-Motoneuronen, die als C-Gruppe (IIIc) bezeichnet wird (Abb. 3B) (Büttner-Ennever und Akert, 1981, Büttner-Ennever et al., 2001, Übersicht: Büttner et al., 2006).

Die Verteilung der SIF- und MIF-Motoneurone der Augenmuskeln im Hirnstamm des Menschen ist bisher nicht bekannt.

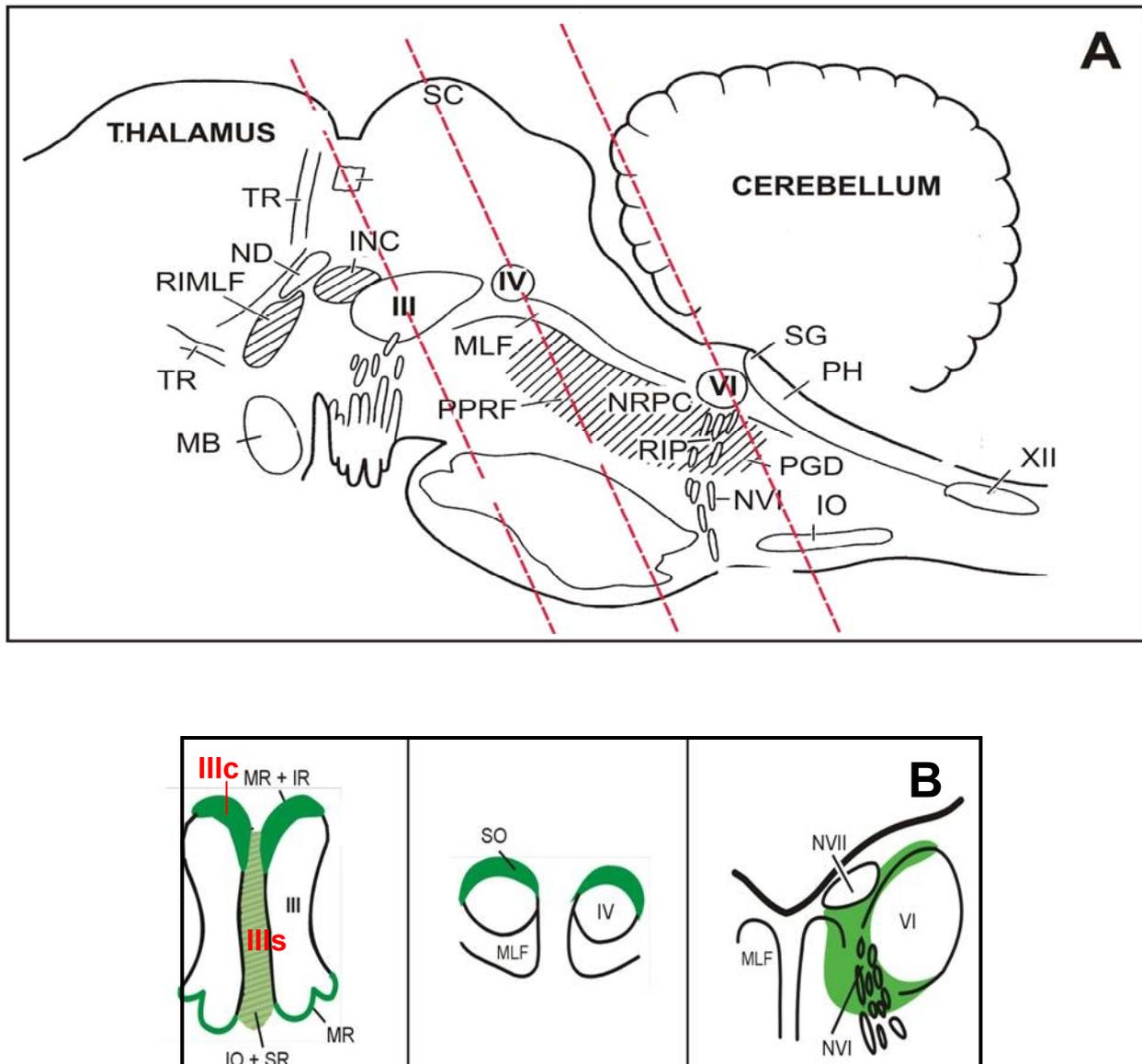


Abb. 3: A: Schematisierte Lateralsicht eines Affenhirns. B: Ausschnittsvergrößerungen aus Transversalschnitten von den entsprechenden Ebenen aus A. Die MIF-Motoneurone der äußeren Augenmuskeln liegen außerhalb der klassischen Augenmuskelkerne (grüne Markierung). Die C-Gruppe (IIIc) enthält MIF-Motoneurone des M. rectus medialis (MR) und des M. rectus inferior (IR); die S-Gruppe (III<sub>s</sub>) enthält MIF-Motoneurone des M. inferior oblique (IO) und des M. rectus superior (SR).

(Abkürzungen in A: INC: Interstitieller Nucleus von Cajal, IO: Oliva inferior, MB: Corpora mammillaria, ND: Ncl. von Darkschewitsch, RIMLF: Rostraler interstitieller Kern des Fasciculus longitudinalis medialis, NRPC: Ncl. reticularis pontis caudalis, PGD: Ncl. paragigantocellularis dorsalis, PH: Ncl. präpositus hypoglossi, PPRF: Paramediane pontine Formatio reticularis, RIP: Ncl. raphe interpositus, SC: Colliculus superior, SG: Ncl. supragenualis, TR: Tractus retroflexus)

### **1.3 Identifizierung funktioneller Neurone beim Menschen**

In der Vergangenheit konnten mit kombinierten Trakt-Tracermethoden und immunhistochemischen Färbemethoden funktionelle Neuronengruppen des okulomotorischen Systems im Hirnstamm des Affen histochemisch charakterisiert werden. Anschließend konnten mit Hilfe derer histochemischen Eigenschaften, z.B. Parvalbumin, Cytochromoxidase, die homologen Kerngebiete im Menschen identifiziert werden (Horn et al., 1994; 1995; Horn und Büttner-Ennever, 1998). Zuletzt erwies sich die Darstellung perineuronaler Netze als ein sehr hilfreiches Vorgehen, um funktionelle Neuronengruppen des okulomotorischen Systems beim Rhesusaffen und Menschen besonders gut hervorzuheben (Horn et al., 2003).

#### **1.3.1 Perineuronale Netze**

Die extrazelluläre Matrix des Gehirns spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität, der Signaltransduktion, sowie vermutlich der Regeneration (Carlson und Hockfield 1996; Matsui F. et al., 1999; Yamaguchi, 2000, Morawski et al., 2004, Sayed et al., 2005). Chemisch gesehen setzt sich die extrazelluläre Matrix hauptsächlich aus Glykoproteinen, Hyaluronsäure und Proteoglykanen zusammen. Der Hauptanteil an extrazellulärer Matrix in einem ausgewachsenen Hirn eines Säugers besteht aus größeren Ansammlungen von Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen (CSPG) in Verbindung mit Hyaluronsäure. Abgesehen von einer mehr diffusen Verteilung im Neuropil einiger Hirnregionen (DeYoe et al., 1990; Brückner et al., 1994b; Seeger et al., 1994; Bertolotto et al., 1996) formen die Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane gitterähnliche Netze um die Somata und proximalen Dendriten von Neuronen, so dass sie deshalb perineuronale Netze genannt wurden (Brauer et al., 1982; Celio und Blümcke, 1994; Celio et al., 1998). Perineuronale Netze finden sich nicht überall, sondern an bestimmten Neuronen, wobei die Korrelation mit funktionellen Parametern noch nicht klar ist (Morris und Henderson, 2000; Adams et al., 2001).

Perineuronale Netze können nun entweder immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane (CSPG) oder durch Lektin-Bindung mit dem N-acetylgalaktosamin-spezifischen *Wisteria floribunda* Agglutinin (WFA) nachgewiesen werden (Härtig et al., 1992; 1994; Brückner et al., 1994b;

1998). Die Darstellung der Motoneurone erfolgte mit der Kresylviolett-färbung nach Nissl.



Abb. 4: Nissl-gefärbte Neurone mit perineuronalen Netzen im Nucleus ruber eines Affen. Die perineuronalen Netze wurden mit einem Antikörper gegen Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan dargestellt. Maßstab = 50µm.

## 1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll vergleichend zum Rhesusaffen, mit Hilfe eines histochemischen Markers versucht werden, die Motoneurone der multipel-innervierten Muskelfasern (MIF) des Musculus obliquus superior im Nucleus trochlearis sowie des Musculus rectus inferior und des Musculus rectus medialis (C-Gruppe) im Nucleus oculomotorius im Hirnstamm des Menschen zu identifizieren (Horn et al., 2003).

Die Darstellung perineuronaler Netze hat sich als besonders geeignet erwiesen, funktionelle Neurone des okulomotorischen Systems zu identifizieren. Mit entsprechenden Methoden sollen die folgenden Fragen bearbeitet werden:

1. Unterscheiden sich im Rhesusaffen SIF- und MIF-Motoneurone, die durch eine Tracer-Injektion in den Musculus rectus medialis (MR) retrograd vormarkiert wurden, bezüglich der Existenz von perineuronalen Netzen?
2. Lassen sich mit Hilfe der perineuronalen Netze als histochemischer Marker die MIF- Motoneurone des Musculus rectus inferior und des Musculus rectus medialis, also die C-Gruppe, und die MIF-Motoneurone des Musculus obliquus superior im Nucleus trochlearis im Menschen identifizieren?

Dazu soll zunächst in einem kombinierten Tracing-Versuch beim Rhesusaffen untersucht werden, inwieweit sich retrograd markierte MIF-Motoneurone an Hand des anschließenden Nachweises von perineuronalen Netzen von den SIF-Motoneuronen unterscheiden. In einer zweiten Versuchsserie sollen entsprechende immunocytochemische Anfärbungen auf perineuronale Netze an Hirnstammschnitten von Human-Gehirnen durchgeführt werden, um potentielle MIF-Motoneurone zu identifizieren.

## 2 Material, Methoden und Auswertung

### 2.1 Affe

Zur näheren Untersuchung, ob sich SIF- und MIF- Motoneurone bezüglich des Vorhandenseins perineuronaler Netze unterscheiden, wurden Schnitte aus einem anderen anatomischen Projekt (B 61) benutzt. Bei diesem Versuch wurde bei einem Rhesusaffen ein Tracer (WGA-HRP) in den Muskelbauch des M. rectus medialis injiziert. Damit sollten alle Motoneurone des M. rectus medialis, SIF- und MIF- Neurone, retrograd markiert werden (Abb. 5). Eine Schnittserie aus diesem Versuch wurde dazu verwendet, jeweils in einem Schnitt die retrograd markierten Motoneurone und anschließend die perineuronalen Netze anzufärben.

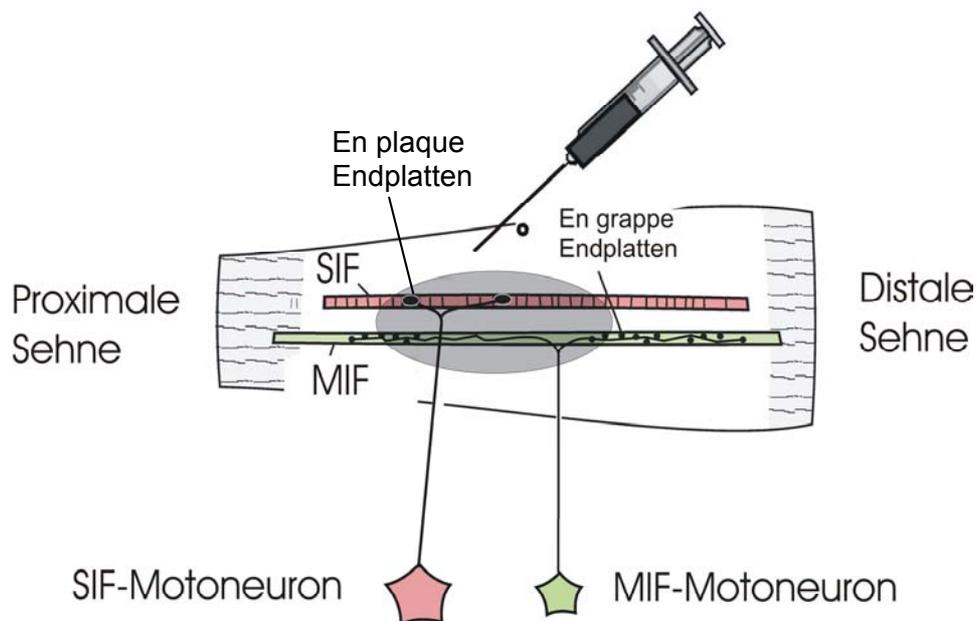


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Augenmuskels. Einzel-innervierte Muskelfaser (SIF) mit ihrer „en plaque“ Nervenendigung im zentralen Drittel des Muskels sowie einer multipel-innervierten Faser (MIF) mit ihren „en grappe“ Nervenendigungen über die gesamte Faserlänge. Durch Tracerinjektion in den Muskelbauch werden sowohl SIF- als auch MIF-Motoneurone markiert.

Desweiteren wurden Schnittserien von zwei weiteren Rhesusaffen, jeweils einem Gefrier- (A96032) sowie einem Paraffinfall (Z30), auf perineuronale Netze angefärbt und anschließend mit Kresylviolett gegengefärbt.

Für die Versuche wurden männliche Tiere der Gattung *Macaca mulatta* und *Macaca fascicularis* verwendet.

### **2.1.1 Operation und Injektion**

Die im Folgenden beschriebenen operativen Eingriffe erfolgten durch die Betreuer.

Nach initialer Inhalationsnarkose mit Halothan erfolgte eine intravenöse Injektion mit Natrium-Pentobarbital (30mg/kg/KG). Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden gegebenenfalls weitere 0,3mg nachinjiziert.

Zur Freilegung der Augenmuskeln wurden unter sterilen Bedingungen zunächst die Augenlider mit Hilfe eines Lidspreizers oder zweier Haltenähte auseinander gezogen. Mit einer kleinen Haltenaht an der Sklera, direkt oberhalb des zu injizierenden Augenmuskels, konnte der Augapfel in jeder gewünschten Position fixiert werden. Anschließend wurde die Konjunktiva parallel zur Muskelansatzstelle aufgetrennt und der Muskel freipräpariert. Die Injektion des Tracers erfolgte mit einer 25µl Hamilton-Mikroliterspritze, auf deren Ende eine sehr dünne Metallspitze gelötet war. Unter Sichtkontrolle über ein Operationsmikroskop wurden per Hand 25µl des Tracers Weizenkeimagglutinin gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (WGA-HRP; 2,5%; Sigma L-3892) in den Muskelbauch des Augenmuskels injiziert.

Nach der Injektion, welche idealerweise als kleine Wölbung im Muskelgewebe erkennbar war, wurde das Operationsfeld abgedeckt und für 15-20 Minuten in Ruhe gelassen, um eine bestmögliche Traceraufnahme zu ermöglichen.

Anschließend wurde alles in seinen ursprünglichen Zustand gebracht und das Auge mit einer entzündungshemmenden Salbe eingerieben.

### **2.1.2 Perfusion**

Nach einer Überlebenszeit von 2 Tagen wurde das Tier mit einer intraperitoneal verabreichten Überdosis von Natrium-Pentobarbital (80mg/kg KG) eingeschläfert.

Sobald die Atemtätigkeit ausgesetzt hatte, wurde der Thoraxraum eröffnet und aufgespreizt. Um eine mögliche Blutgerinnung zu verhindern wurde dem Tier 1ml Heparin intracardial injiziert. Die große Körperschlagader wurde auf Höhe des Aortenisthmus zur Verhinderung einer Perfusion der unteren Körperhälfte abgeklemmt. Nach Eröffnung des linken Ventrikels wurde das Gehirn transcordial mit folgenden Lösungen perfundiert: 0,9% körperwarme NaCl-Lösung zur Reinigung der Cerebralgefäße von korpuskulären Bestandteilen, 2 Liter 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4) bei 4°C, zur Fixation des Gewebes.

Nun wurde die Kalotte mit einer Knochenzange entfernt, das Gehirn an der Basis vorsichtig angehoben und nach Durchtrennung der austretenden Hirnnerven aus dem Schädel entnommen. Anschließend wurde das Gehirn in Sucrose-Lösungen mit steigenden Konzentrationen (10%, 20%, 30% in 0,1M PBS (pH 7,4) bei 4°C) equilibriert, um beim Gefrierschneiden der Bildung von Eiskristallen im Gewebe vorzubeugen.

### **2.1.3 Histologische Aufarbeitung**

Nach Entnahme aus der Sucrose-Lösung wurde das Gehirn in stereotaktischer Ebene in zwei Blöcke zerlegt. Ein Block enthielt das Mittelhirn mit dem Nucleus oculomotorius (III) und Nucleus trochlearis (IV). Auf den Gefriertisch eines Schlittenmikrotoms (R. Jung AG, Heidelberg, Nr. 17941) wurde zunächst eine etwa 5mm dicke Gelatineplatte gelegt und mit einem Gemisch aus Trockeneis und Aqua dest. ummantelt. Nachdem die Platte auf dem Tisch festgefroren war, wurde der Gewebeblock mit dem rostralen Ende auf die Gelatineplatte gesetzt und durch komplette Abdeckung mit pulverisiertem Trockeneis durchgefroren. Von caudal beginnend wurden mit dem Schlittenmikrotom 40µm dicke Schnitte des Hirnstamms angefertigt und in kaltem 0.1M Phosphatpuffer gesammelt.

#### **2.1.3.1 Nachweis des Tracers und der perineuronalen Netze**

Der Nachweis der Tracersubstanz WGA-HRP (B61) erfolgte unmittelbar nach dem Schneiden durch Reaktion mit Diaminobenzidin nach Adams (Adams, 1977). Hierfür wurden die Schnitte nach 2 Waschungen in 0,1M PBS in 0,05% Diaminobenzidin (DAB, Sigma D-5637) und 0,01 % Wasserstoffperoxid (Merck 1.07210) in 0,1M PBS

(pH 7,4) 20 min. inkubiert und dann in 0,1M PBS gewaschen. Als positiv wurde ein bräunlicher und granulierter intrazellulärer Niederschlag gewertet.

Anschließend wurden die Schnitte zur Darstellung der perineuronalen Netze, hier durch Lektin-Bindung mit Wisteria floribunda Agglutinin (WFA) weiter behandelt: Hierzu wurden die Schnitte in einer Lösung mit dem biotinylierten Lektin WFA (1:1000; Sigma L-1766, 1µg/ml in 0,1M PBS) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschung und einer Inkubation in Extra-Avidin-Peroxidase (1:1000; Sigma) und einer anschließenden mit Nickel intensivierten DAB-Reaktion wurde die Lektinbindungsstelle als schwarzer Niederschlag sichtbar gemacht. Somit konnten die schwarz gefärbten Netze sehr gut von den braun gefärbten, retrograd markierten, Zellen unterschieden werden (Abb.8).

### 2.1.3.2 Immuncytochemische Anfärbung der perineuronalen Netze

Alternativ wurden in diesem Fall (B61) und in zwei anderen Fällen (A96032 und Z30) die perineuronalen Netze mit einem Antikörper gegen CSPG (Biogenesis 2083-5005) oder nach Bindung mit Wisteria floribunda Lektin (WFA) dargestellt: Dazu mussten die Schnitte des Paraffinfalls (Z30) zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert werden, um dann auf dem Objektträger in den verschiedenen Lösungen inkubiert zu werden. Die Schnitte von B61 und A96032 wurden frei schwimmend prozessiert.

	TRACER WGA-HRP	PNET
B61	MR	WFA
A96032	-	CSPG
Z30	-	CSPG

Tabelle 1: Darstellung der perineuronalen Netze in den Fällen A96032 und Z30 mit einem Antikörper gegen CSPG und im Fall B61 mit WFA. Die Tracerinjektion (WGA-HRP) erfolgte in den Muskelbauch des M. rectus medialis (MR).

Der immunhistochemische Prozeß beginnt zunächst mit der Blockierung unspezifischer Bindungen durch 5% Normal-Goat-Serum (Vector S-1000) in 0,3% Triton X-100 und 0,1 M TBS (pH 7,6) für eine Stunde. Zuvor wurde die Aktivität endogener Peroxidasen mit 0,6 % Wasserstoffperoxid für 15 Minuten blockiert. Dann wurden die Schnitte über Nacht mit dem Primärantikörper Rabbit-Anti-CSPG (1:5000; Biogenesis 2083-5005) in 0,1M TBS inkubiert. Nach gründlicher Waschung erfolgte in einem nächsten Schritt die Reaktion mit dem zweiten Antikörper, biotinyliertes Goat-Anti-Rabbit IgG (1:200 in TBS; Vector Laboratories BA-1000) 1 Stunde, und nach Pufferspülung nachfolgend mit einem Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Kit 1:50 in 0,1M TBS, pH 7,6; Vector Laboratories). Der Nachweis der Antikörperbindungsstelle erfolgte entweder mit einer einfachen Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion mit Braunfärbung oder mit einer intensivierten DAB-Reaktion unter Zugabe von Ammonium-Nickelsulfat, welches zu einem schwarzem Reaktionsprodukt führte.

Nach dem Aufziehen und Trocknen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in DEPEX eingedeckelt. Die Schnitte von den Fällen Z30 und A96032 wurden zusätzlich mit 0,5% Kresylviolett gegengefärbt.

Hierzu wurden die Schnitte zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entfettet sowie in einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser rehydriert. Die Färbung erfolgte in einer 0,5%igen Kresylviolettacetatlösung. Über essigsaureres Wasser und einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde die Farbe wiederum differenziert und nach der Entwässerung in Xylol wurden die Schnitte mit DEPEX eingedeckelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

## 2.2 Mensch

Die Darstellung der perineuronalen Netze an vergleichbaren menschlichen Schnittserien erfolgte an vier Gehirnen.

### 2.2.1 Obduktionsfälle

Untersucht wurden Gehirne, welche uns mit freundlicher Genehmigung von der Gewebebank des Instituts für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt wurden.

Bei der Auswahl der Obduktionsfälle wurde auf die Abwesenheit neurologischer sowie okulomotorischer Erkrankungen Wert gelegt. Ebenso war der neuropathologische Befund in allen Fällen unauffällig. Das Gewebe entstammt folgenden Fällen: 1) Fall 1: 78-jährige Frau, Tod im akuten Herz-Kreislaufversagen bei Myokardinfarkt. 2) Fall 2: 59-jährige Frau, Tod durch respiratorisches Versagen bei Herz-Kreislaufstillstand. 3) Fall 3: 89-jährige Frau, Tod durch Herzversagen. 4) Fall 4: 54-jährige Frau, Tod durch Herz-Kreislaufversagen. Post-mortem-Intervall (PMD) 24 h, Gesamtfixierzeit (GFZ) ca. 1 Monat (Tabelle 2).

Alle Untersuchungen unterlagen der Kontrolle durch die Ethikkommission und wurden gemäß den staatlichen Regularien durchgeführt.

	PMD	GFZ	FIXATIV	SCHNITTTECHNIK
Fall 1	24 h	11 Tage	PFA 4%	Gefrierschnitt
Fall 2	24 h	24 h	PFA 4%	Gefrierschnitt
Fall 3	48 h	8 Tage	PFA 4%	Gefrierschnitt
Fall 4	24 h	7 Tage	PFA 4%	Paraffinschnitt
PMD = Post mortem Dauer, GFZ = Gesamtfixierungszeit, PFA = Paraformaldehyd				

Tabelle 2: Übersicht über die Fixierungsbedingungen der bearbeiteten Fälle

## 2.2.2 Präparation

Zunächst lagerte man die vom Hirnstamm bis zum Diencephalon reichenden Präparate aus der Neuropathologie für 1-2 Tage in 4% Paraformaldehyd (in 0.1M PBS, pH 7,4), um die für ein seitengleiches Durchtrennen notwendige Erhärtung zu erreichen. Zuvor wurden die verbliebenen Hirnhautreste mit einer anatomischen Pinzette entfernt sowie die Cerebralgefäße von korpuskulären Blutbestandteilen gereinigt, da diese selbst eine endogene Peroxidaseaktivität besitzen und in nachfolgenden Färbungen unspezifische Färbeartefakte hervorrufen würden (Bourne et al., 1983). Anschließend wurde ein Block herausgeschnitten, welcher von caudal im Bereich des Übergangs von der Pons in das Mittelhirn bis rostral an die Corpora mammillaria reicht, so dass Ncl. oculomotorius und Ncl. trochlearis in einem Gewebekblock liegen (Abb. 6).

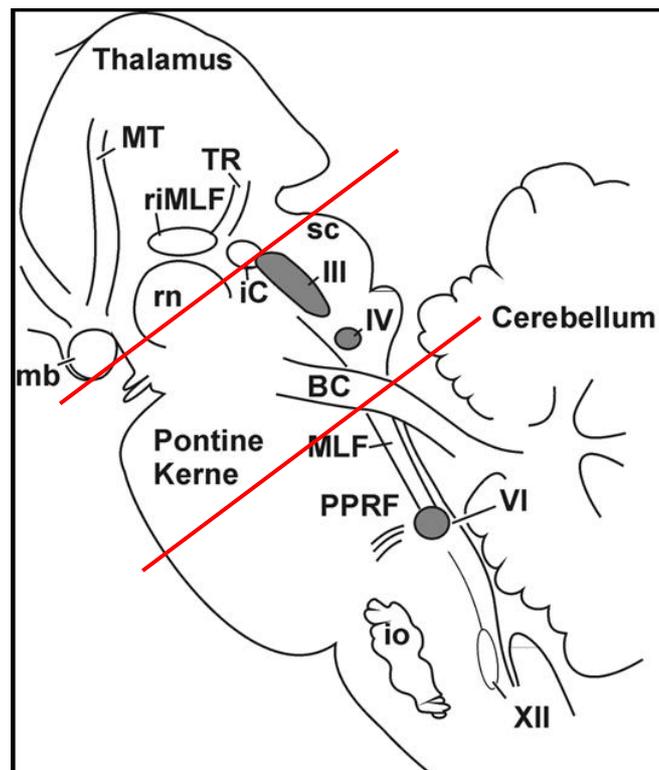


Abb. 6: Schematisierte Lateralansicht des Hirnstamms vom Menschen.

Die roten Linien markieren den bearbeiteten Gewebekblock, der den Ncl. oculomotorius (III) und den Ncl. trochlearis (IV) enthält.

Um die bestmögliche Fixierung für die Histologie zu erreichen, wurde der Block auf eine Größe von nicht mehr als 2 x 2 x 2 cm gebracht und mit einem Schnitt auf der linken Seite zur späteren Orientierung markiert.

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten (Fall 1-3) wurden die Blöcke in aufsteigender Sucrosereihe (10%-20%-30% in 0,1M PBS) jeweils bis zum Zeitpunkt des Absinkens aufbewahrt.

Für Paraffinschnitte (Fall 4) wurde eine gepufferte Paraformaldehydlösung (PFA 4% in 0,1M PBS, pH 7,4) verwendet. Nach ausreichender Fixierung erfolgte anschließend die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin.

### **2.2.3 Histologische Aufarbeitung**

Für Gefrierschnitte wurde der Block auf einer Gelatineplatte mit Trockeneis ummantelt und gefroren. Am Tetrander (Fa. Jung, Heidelberg) wurden 40µm dicke Transversalschnitte angefertigt und in 0,1M Phosphatpuffer bei pH 7,4 in Serie aufgefangen und in Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe diente der Anfertigung von Nisslpräparaten, um einen Vergleich zwischen den unterschiedlich gefärbten Nachbarschnitten zu ermöglichen.

Paraffinschnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom der Fa. Jung, Heidelberg angefertigt. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 10µm für die immunhistochemischen Färbungen angelegt sowie versetzt eine orientierende Serie von Nisslpräparaten. Die Paraffinschnitte wurden im Wasserbad (Temperatur < 50°C) gestreckt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

#### **2.2.3.1 Anfärbung der perineuronalen Netze**

Der Nachweis der perineuronalen Netze beim Menschen gestaltet sich nach dem gleichen Prinzip wie beim Affen (genaues Protokoll siehe Anhang).

Die Färbung mit WFA beim Menschen war bei den Paraffinschnitten nicht möglich und stellte sich bei den Gefrierschnitten als höchst unzuverlässig heraus, so dass für alle Untersuchungen die Darstellung der perineuronalen Netze nur mit CSPG-

Immunhistochemie erfolgte, in gleicher Weise wie beim Affen (siehe Abschn. 2.1.3.2.)

Nach dem Aufziehen und Trocknen der Schnitte erfolgte die Gegenfärbung mit Kresylviolett (siehe Anhang). Die Nissl-Färbung ist die klassische Färbemethode zur Darstellung der Zellmorphologie sowie zur Beurteilung der Perikarya.

#### **2.2.4 Auswertung**

Die Analyse der Gehirnschnitte erfolgte mit einem Leica Lichtmikroskop DMRB (Bensheim, Deutschland). Dokumentiert wurden die Färbungen mit Hilfe einer 3-CCD Videokamera (Hamamatsu, C5810), die auf dem Lichtmikroskop montiert ist und die Bilder digitalisiert in einen Computer mit der Adobe Photoshop Software 5.0. überträgt. Die Schärfe, der Kontrast sowie die Helligkeit wurden solange nachgestellt bis das Bild am Computer das mikroskopische Bild genau wiedergab. Arrangiert und beschriftet wurden die Bilder mit Hilfe einer Zeichen-Software (CorelDraw Version 11.0, Corel Cooperation, 2002). Zur besseren Dokumentation wurden an einer Schnittserie des Humanfalls (Fall 4) die netztragenden und netzlosen Neurone im Ncl. trochlearis und Ncl. oculomotorius mit der Zeichen-Software CorelDraw ausgeplottet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Affe**

#### **3.1.1 Tracer**

Die Grundlage des retrograden Tracings beruht auf der Fähigkeit von Axonen, bestimmte Substanzen aus dem Extrazellulärraum aufzunehmen und sie zurück (retrograd) in die Zellkörper der Neuronen zu transportieren. Meerrettichperoxidase, gekoppelt an ein Lektin, wie das Weizenkeimagglutinin (WGA-HRP) erreicht über axonalen Transport den Zellkörper des Neurons, wo es in Lysosomen und proximalen Dendriten lokalisiert ist. Die markierten Zellkörper werden mit Peroxidase-Reaktionen sichtbar gemacht. Ein lösliches Chromogen wird hierbei durch enzymatische Reaktion von HRP mit dem Substrat Wasserstoffperoxid zu einem leicht zu identifizierenden, schwarz-granulärem Reaktionsprodukt oxidiert.

##### **3.1.1.1 Motoneurone des Nucleus oculomotorius**

Wie bei Büttner-Ennever et al., 2001 werden nach Tracerinjektion in den Muskelbauch des rechten M. rectus medialis drei Gruppen von Motoneuronen im ipsilateralen Nucleus oculomotorius (III) retrograd markiert, welche sich zunächst hinsichtlich ihrer Lage, Größe und Form unterscheiden lassen. Die retrograd markierten Neurone der A-Gruppe, welche durch die schwarzen Granula leicht zu identifizieren sind, liegen ventral in den rostralen drei Vierteln des Kerns und reichen als „Füßchen“ weit in die benachbarten Fasern des Fasciculus longitudinalis medialis (MLF). Die B-Gruppe liegt eher innerhalb der caudalen Hälfte dorsal im III. Die MIF-Motoneurone der C-Gruppe (IIIc), sind eher langgestreckt und liegen außerhalb des klassischen Kerns an seiner dorsomedialen Grenze und erstrecken sich über die gesamte Länge des Nucleus oculomotorius (Abb. 7A, B) (Büttner-Ennever und Akert, 1981). Man findet aber auch MIF-Motoneurone an der ventralen Grenze in der Nähe des MLF und der Ursprungsfasern des III. Hirnnerven als auch an der lateralen Grenze.

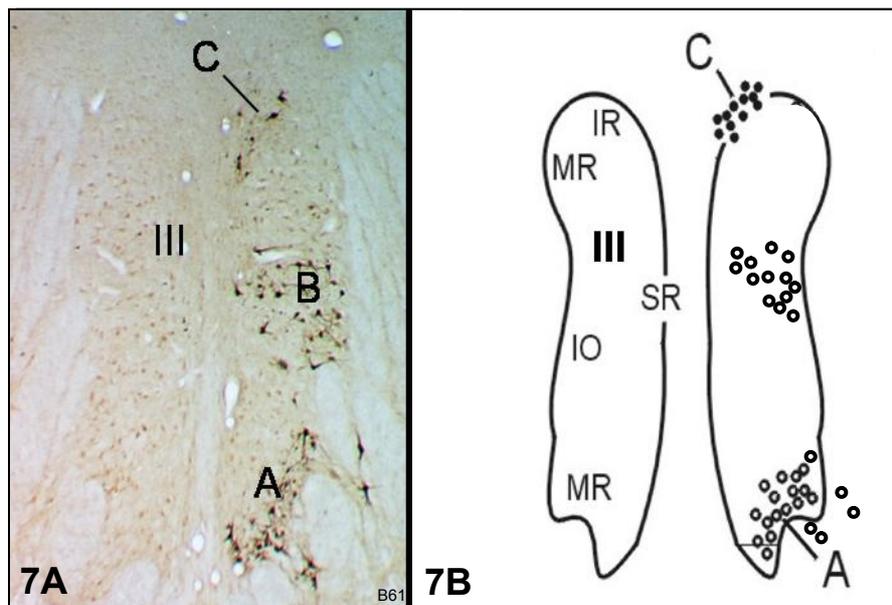


Abb. 7: Affe: Transversalschnitt durch den Ncl. oculomotorius (III) nach Tracerinjektion in den Muskelbauch des MR sowie eine schematisierte Ansicht. Die MIF-Motoneurone der C-Gruppe (IIIc, schwarze Punkte) liegen in der Peripherie des klassischen III. Die SIF-Motoneurone der dorsalen B-Gruppe und der ventralen A-Gruppe liegen innerhalb der Grenze und sind in B durch offene Kreise dargestellt.

### 3.1.1.2 Doppelmarkierung auf perineuronale Netze und Tracer

Bei Analyse der doppelmarkierten Schnitte mit dem Tracer WGA-HRP und den perineuronalen Netzen durch WFA hebt sich der Ncl. oculomotorius mit seinen stark angefärbten schwarzen Netzen deutlich aus seiner Umgebung heraus (Abb. 8). Dorsal grenzt sich der Kern gegen eine Region mit leichter Neuropil-Färbung ab, welche lateral durch die Nuclei von Cajal begrenzt wird, die sich wiederum durch starke Anfärbung der perineuronalen Netze selektiv hervorheben (Abb. 8). Ventrolateral erkennt man den grob strukturierten Fasciculus longitudinalis medialis (MLF) sowie beginnende Fasern des III. Hirnnerven.

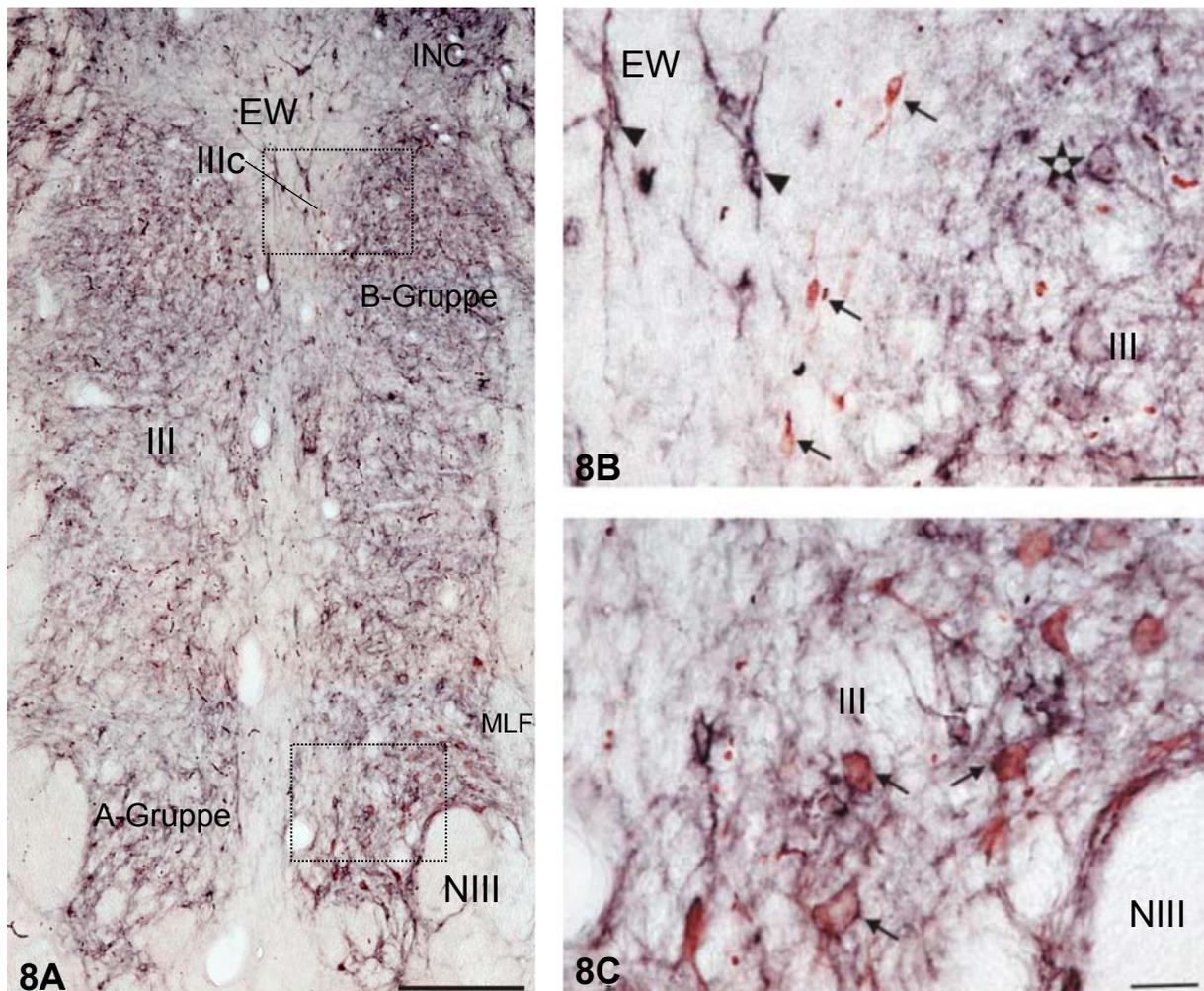


Abb. 8: Affe: Frontalschnitt durch den III mit retrograd markierten Motoneuronen (WGA-HRP, braun) und Darstellung der perineuronalen Netze (WFA, schwarz). **A:** Darstellung der retrograd markierten Neurone (braun) der A-, B- und C-Gruppe (IIIc). **B, C** zeigen jeweils Ausschnitte aus Abb. 8A. **B:** Retrograd markierte Motoneurone der C-Gruppe (IIIc) (braun, Pfeile) tragen keine perineuronalen Netze. Die medial von IIIc liegenden Motoneurone des EW (Pfeilköpfe), wie auch die SIF-Motoneurone des III (Stern) sind von prominenten perineuronalen Netzen umgeben. **C:** Retrograd markierte Motoneurone der A-Gruppe werden ebenfalls von perineuronalen Netzen umgeben (Pfeile). Maßstab = 500 $\mu$ m in A; 50 $\mu$ m in B, C.

Bei stärkerer Vergrößerung wird ersichtlich, dass die bereits erwähnten drei Gruppen von Motoneuronen sich auch hinsichtlich ihrer Netzanfärbung unterscheiden. Alle innerhalb der A- und B- Gruppe liegenden braun markierten SIF-Motoneurone werden von schwarz angefärbten perineuronalen Netzen umhüllt (Abb. 8A, C), wohingegen die kleineren, spindelförmigen retrograd markierten MIF-Motoneurone

der C-Gruppe (IIIc) dorsomedial des Nucleus oculomotorius keine perineuronale Netze besitzen (Abb. 8A, B).

Auf Höhe des rostralen Drittels des Ncl. oculomotorius erscheint dorsomedial der paarige Ncl. Edinger–Westphal, welcher zahlreiche mittelgroße Neurone enthält (Abb. 8A, B). Nur eine Subpopulation dieser Neurone ist bis weit in die Dendriten von prominenten Netzen umgeben (Abb. 8B, Pfeilköpfe), welche diesen Teil des Edinger–Westphal-Kern-Komplexes damit klar von den direkt lateral angrenzenden netzfreien MIF-Motoneuronen der C-Gruppe (IIIc) unterscheidet (Abb. 8B, Pfeile). Damit liegen die MIF-Motoneurone zwischen den Neuronen des Edinger–Westphal-Kerns, charakterisiert durch vereinzelte netztragende Neurone, und den SIF-Motoneuronen, welche alle von perineuronalen Netzen eingehüllt werden.

### **3.1.2 Serienschritte mit perineuronalen Netzen und Nissl**

#### **3.1.2.1 Nucleus trochlearis**

Der rundlich imponierende Nucleus trochlearis ist bereits deutlich in der Nissl-Färbung abzugrenzen. Er besteht caudal aus einer Zellgruppe mittelgrosser, multipolarer Motoneurone und rostral zusätzlich aus einer dem zentralen Kern dorsal angrenzenden Gruppe aus kleineren Neuronen (Abb. 9A, Pfeil). Aufgrund der braunen perineuronalen Netzanfärbung hebt sich der Kern noch deutlicher gegen seine Umgebung ab. Der Nucleus trochlearis liegt eingebettet in die ungefärbten Fasern des Fasciculus longitudinalis medialis (MLF) und grenzt sich nach dorsal klar von einer Region mit einer nur leichten Neuropilanfärbung ab. Rostralwärts erscheint dorsal zwischen den beiden Trochleariskernen der Nucleus centralis caudalis (CCN), der die Motoneurone des Lidhebers enthält, die wiederum von Netzen umhüllt sind (Abb. 9B). Schon in der Übersicht erkennt man dazwischen eine Region, welche dem Trochlearis zugehörig scheint, jedoch keine Netze aufweist (Abb. 9B, Pfeil). Bei genauer Analyse bei hoher Vergrößerung wird deutlich, dass eine Gruppe von Motoneuronen im dorsalen Teil des Nucleus trochlearis liegt, deren Neurone kleiner und rundlicher erscheinen, als diejenigen des klassischen Ncl. trochlearis und eine Art Kappe an der dorsalen Grenze des Kerns formen, entsprechend der Lage der MIF-Motoneurone des Musculus superior obliquus (Abb. 9C, 3B; Büttner-Ennever et al., 2001).

### 3.1.2.2 Nucleus oculomotorius

Geht man bei der Analyse der Schnitte weiter nach rostral erscheint, bereits in der Nissl-Färbung deutlich abzugrenzen, V-förmig der Ncl. oculomotorius ventral des Nucleus centralis caudalis (CCN), welcher selber immer mehr abnimmt. Der Nucleus oculomotorius besteht aus plumpen, mittelgrossen Neuronen, welche am caudalen Pol ventral und ventrolateral direkt dem Fasciculus longitudinalis medialis (MLF) anliegen (Abb. 9D). Noch deutlicher grenzt sich der Kern in seiner gesamten Ausdehnung durch die braunen perineuronalen Netze von seiner Umgebung ab (Abb. 9E). Eine genaue Zuordnung zu den einzelnen Augenmuskeln ist ohne Tracer nicht eindeutig möglich. Eindeutig zu erkennen sind jedoch die grossen, netztragenden Motoneurone der A- und B-Gruppe sowie des CCN dorsal des Kerns. Dorsomedial des Kerns, zwischen der B-Gruppe und dem CCN imponiert in der Übersichtsaufnahme eine Aufhellungszone (Abb. 9E, Pfeilkopf), welche sich in der Detailaufnahme als ein Gruppe kleinerer, eher rundlicher Neurone ohne perineuronale Netze darstellt (Abb. 9F, Pfeile).

Weiter nach rostral gehend ist bereits in der Nissl-Färbung, weiter dorsomedial des Kerns die paarige Gruppe grösserer Neurone des Edinger-Westphal zu sehen, welche deutlich von den Neuronen des Nucleus oculomotorius abzugrenzen ist (Abb. 9G, J, M). Direkt lateral des EW, noch vor dem Interstitiellem Nucleus von Cajal (INC) im periaquäduktalem Grau, liegen die kleineren Neurone der Urocortin-Gruppe (UR), dorsolateral des III (Abb. 9G, J, M). Verdeutlicht wird dies in der Übersichtsaufnahme mit Darstellung der perineuronalen Netze. In dieser zeigt sich an der dorsomedialen Seite des Ncl. oculomotorius (III) mit seinen netztragenden Neuronen eine Zellpopulation ohne perineuronale Netzanfärbung (Abb. 9H, K, L, N, O, geschlossene Pfeile), bei welcher es sich um die Motoneurone der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius (IIIc) handelt. Dorsolateral des III hingegen liegt eine Zellgruppe, welche sich aufgrund der kleinen, eher länglicheren Neurone und der fehlenden Netze sichtbar von den prominenten, medial liegenden netztragenden Neuronen des EW unterscheidet und der Urocortin-Gruppe (UR) entspricht (Abb. 9I, L).

In den rostralsten Abschnitten geht der EW in den Anteromedianen Kern (AM) über, welcher sich dorsal des Nucleus oculomotorius befindet (Abb. 9P). Dessen Neurone besitzen keine perineuronalen Netze und imponieren im Vergleich zu den netztragenden Motoneuronen des Nucleus oculomotorius kleiner und in vertikalen Zügen angeordnet. In Abb. 9Q sieht man deutlich die von Netzen umgebenden

Abb. 9 **A-F**: Affe: Frontalschnitte durch den Ncl. trochlearis (IV) und den Ncl. oculomotorius (III) von caudal nach rostral mit Nissl-Färbung (violett) und zusätzlicher Darstellung der perineuronalen Netze (CSPG, braun) des jeweiligen Nachbarschnittes. **A/D**: Darstellung des IV und III mit Nissl-Färbung. Abseits liegende Neuronengruppe dorsal bzw. dorsomedial (Pfeil). **B/E**: Darstellung der perineuronalen Netze. Dorsale Kappe des IV als auch dorsomedial liegende Gruppe des III tragen keine Netze (Pfeil bzw. Pfeilkopf). **C/F**: Detailaufnahmen markiert durch Quadrat in B bzw. E. **C**: Deutlich sind die kleinen netzlosen Neurone (geschlossene Pfeile) von den grösseren netztragenden Neuronen (offene Pfeile) abzugrenzen. **F**: Die netzlosen Motoneurone der C-Gruppe des Ncl. oculomotorius (IIIc) (Pfeile) unterscheiden sich deutlich von den netztragenden Motoneuronen des III und des Nucleus centralis caudalis (CCN). Maßstab = 500µm in A, B, D, E; 50µm in C, F.

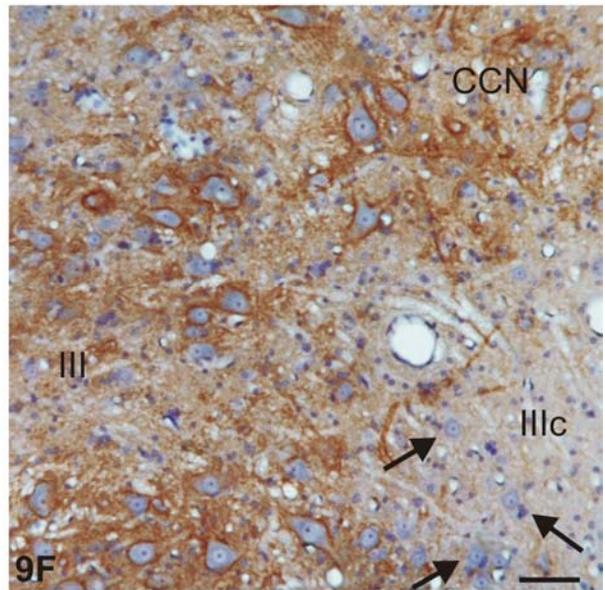
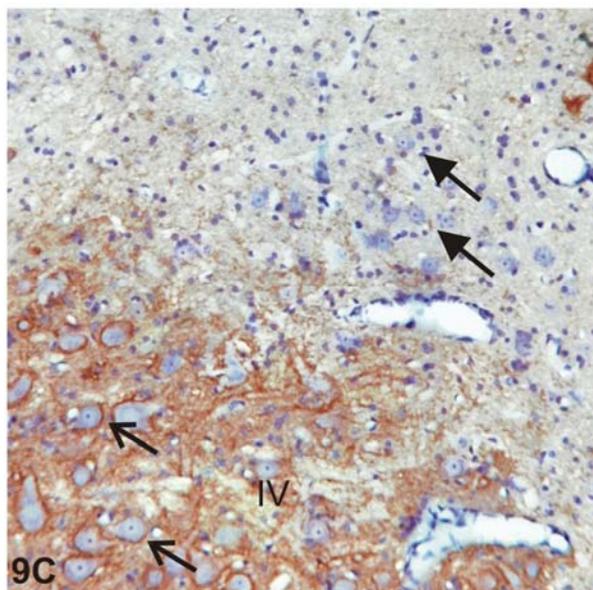
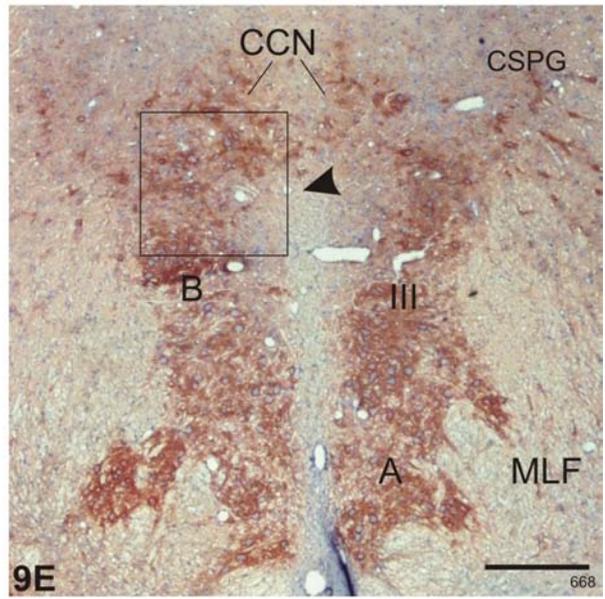
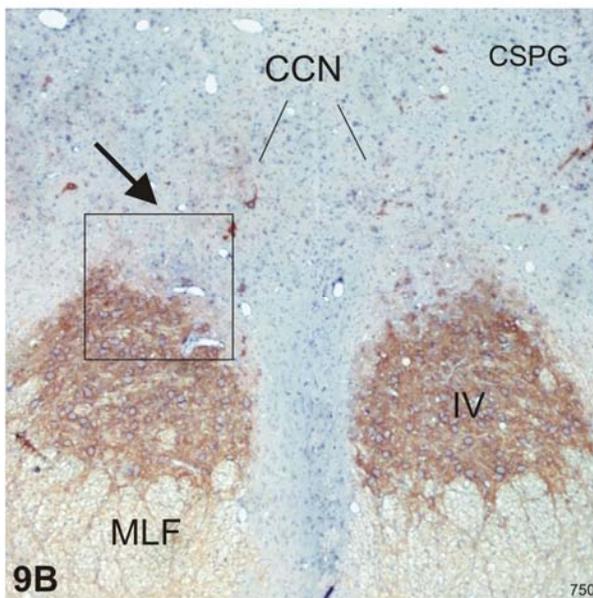
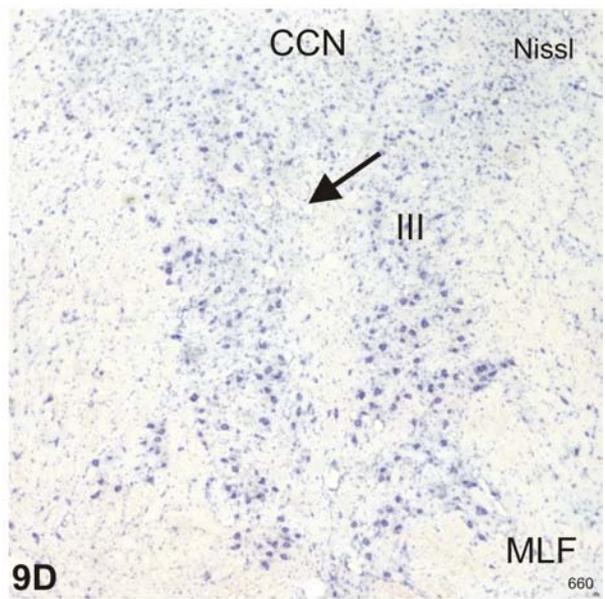
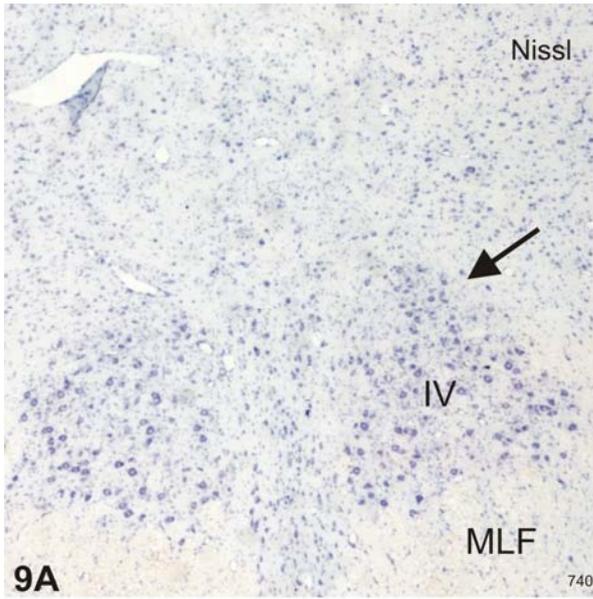


Abb. 9 **G-L**: Affe: Frontalschnitte in Höhe des mittleren Drittels des Ncl. oculomotorius (III). **G/J**: Violette Motoneurone des III in Nissl-Färbung heben sich vom umgebenden MLF ab. Dorsal ist eine Gruppe grösserer Neurone des Edinger-Westphal (EW) zu erkennen, daneben kleinere Neurone der Urocortin-Gruppe (UR). **H/K**: Deutlich unterscheidet sich der EW mit eingestreuten netztragenden Neuronen von den netzlosen Zellen von UR und IIIc (Pfeilkopf) von den durchgängig netztragenden Motoneuronen des III. **I/L**: Detailaufnahmen markiert durch Quadrat in H und K. Klare Abgrenzung zwischen den netztragenden Motoneuronen des III und des EW (offene Pfeile) von den kleinen netzlosen Neuronen von UR und IIIc (geschlossene Pfeile). Maßstab = 500µm in G, H, J, K; 50µm in I, L.

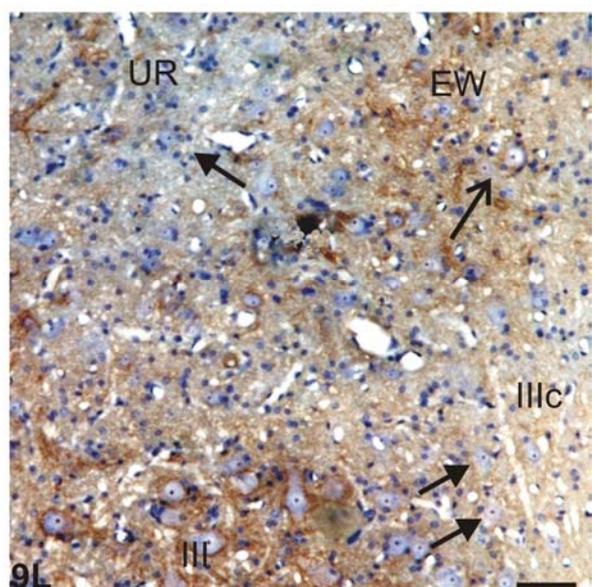
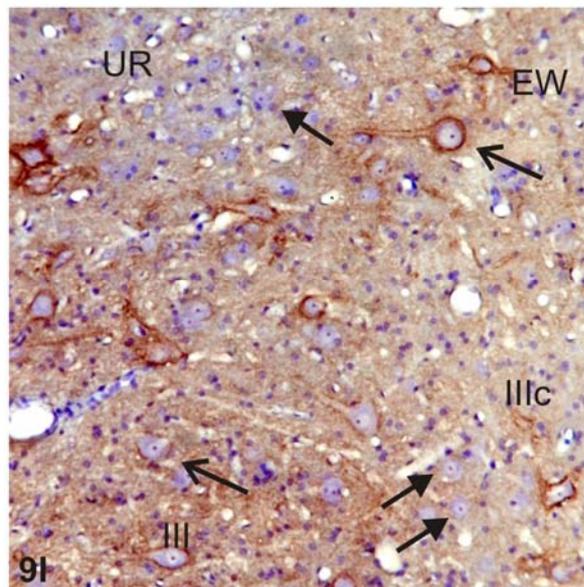
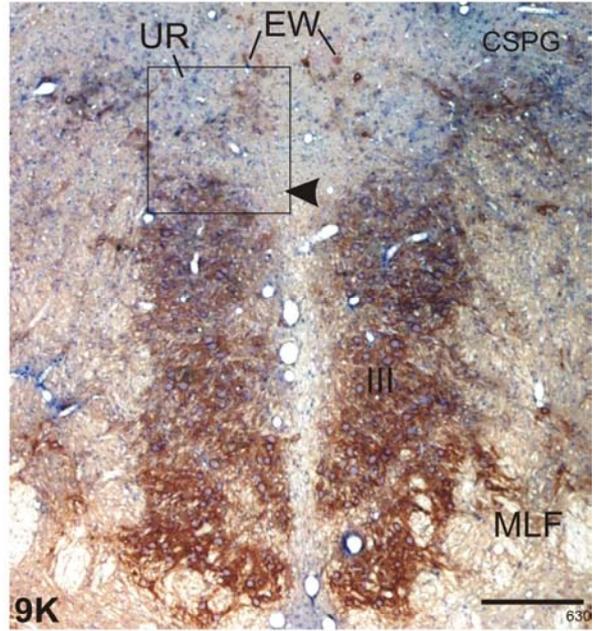
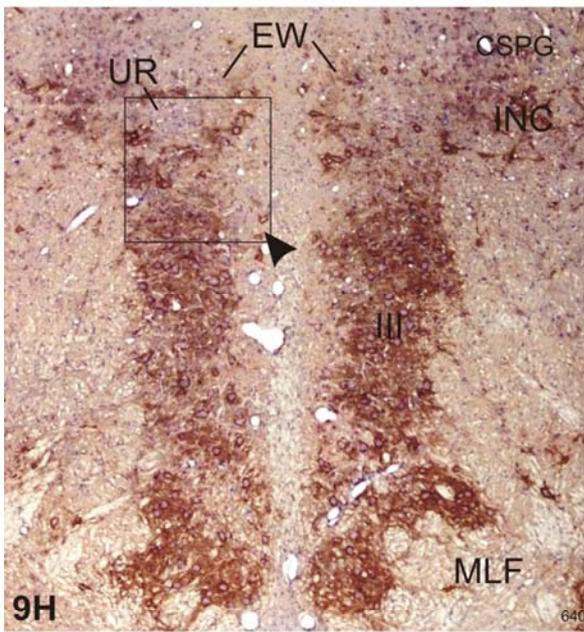
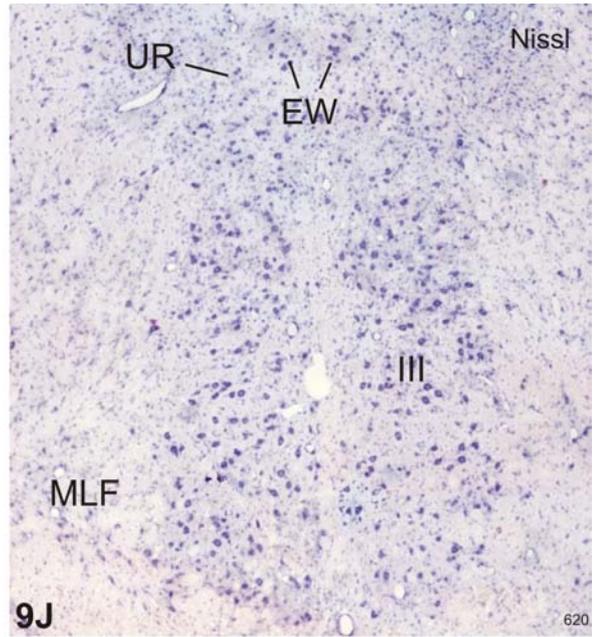
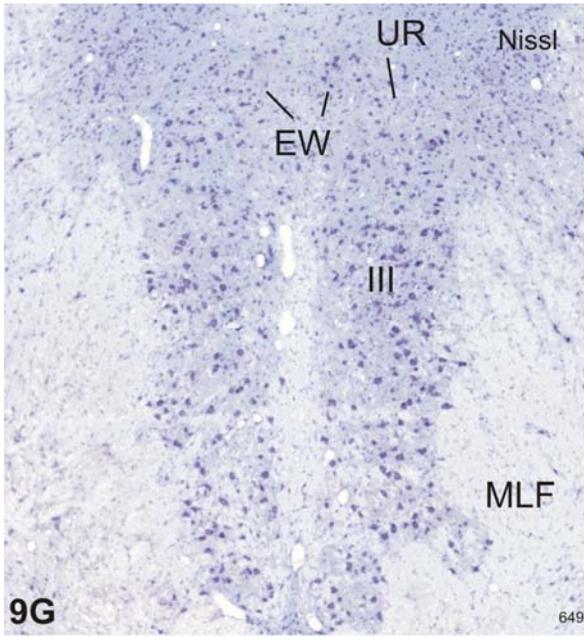
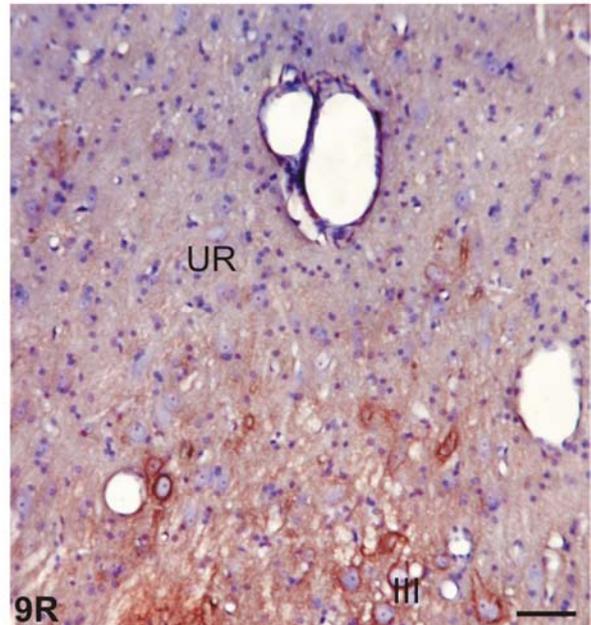
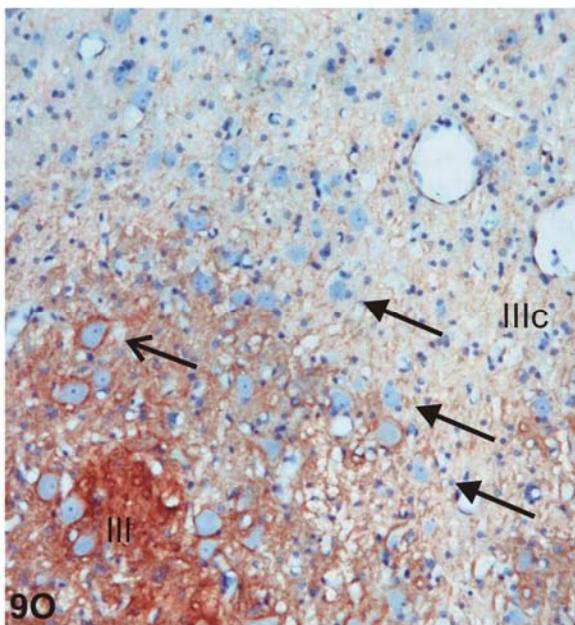
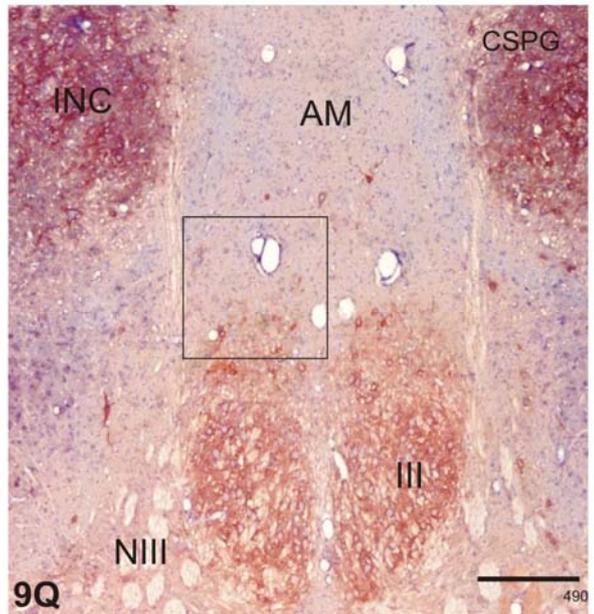
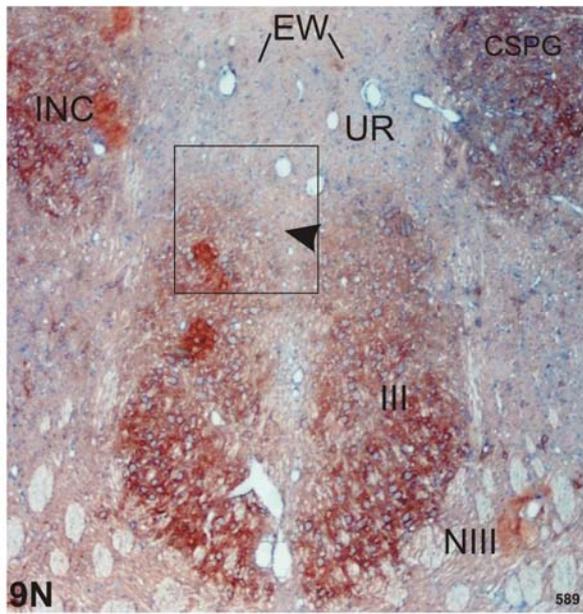
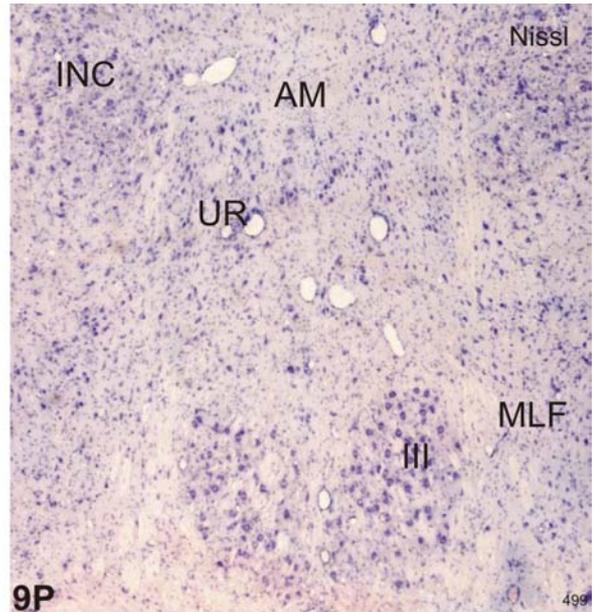
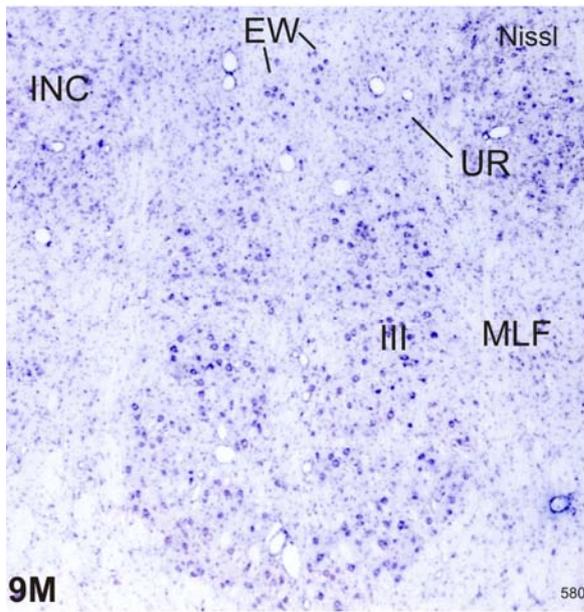


Abb. 9 **M-R**: Affe: Frontalschnitte durch den rostralsten Anteil des Ncl. oculomotorius (III). **M**: Darstellung des III durch Nissl-Färbung. Dorsal ist sowohl der EW als auch die UR-Gruppe abzugrenzen, welche medial des Interstitiellen Nucleus von Cajal (INC) liegt. **N**: Neben dem III und dem INC sind auch einzelne Neurone des EW von Netzen umgeben, womit die UR-Gruppe deutlich abgegrenzt wird. **O**: Detailaufnahme markiert durch Quadrat in N. Prominente Netze der Motoneurone in III (offener Pfeil) lassen sich von netzlosen Neuronen der IIIc-Gruppe (geschlossene Pfeile) unterscheiden. **P**: Fortsetzung des EW durch den Anteromedianen Kern (AM) dorsal des III und medial des INC, Färbung: Nissl. **Q**: Neurone des III als auch des INC deutlich von perineuronalen Netzen umgeben. Neurone des AM überwiegend ohne perineuronale Netzanfärbung. **R**: Detailaufnahme markiert durch Quadrat in Q. Abgrenzung zwischen netztragenden Neuronen des III von den netzfreien Neuronen der UR-Gruppe. Maßstab = 500µm in M, N, P, Q; 50µm in O, R.



Neurone des III sowie des INC in Abgrenzung zu den überwiegend netzlosen Neuronen des Anteromedianen Kerns als auch der Urocortin-Gruppe (Abb. 9R).

### 3.1.2.3 Edinger-Westphal-Komplex

Zum besseren Verständnis des Edinger-Westphal-Kern (EW)-Komplexes soll hier auf dessen Zytoarchitektur eingegangen werden, da sich dieser in enger Nachbarschaft zum Ncl. oculomotorius befindet und damit einer der Hauptkandidaten zur Abgrenzung gegen die MIF-Motoneurone ist.

Der Begriff Edinger–Westphal-Komplex wird in der Literatur für eine lose Gruppe von Neuronen dorsal des Ncl. oculomotorius verwendet, die u.a. präganglionäre Neurone des Musculus ciliaris (Akkommodation der Linse) und des Musculus sphincter pupillae (Pupillenkonstriktion) enthalten (Übersicht: Büttner-Ennever, 2005). Trotz vielfach unterschiedlicher Bezeichnungen werden beim Primaten allgemein zwei „viscerale Kerngruppen“ voneinander getrennt: der eigentliche EW und der Anteromediane Kern (AM). Der EW besteht aus zwei schlanken Säulen mittelgrosser, in Nissl sich stark anfärbender Neurone, eine auf jeder Seite der Mittellinie und dorsal der rostralen drei Fünftel des Nucleus oculomotorius (Abb. 10A, B). Der AM liegt rostral zu den Motoneuronen des Ncl. oculomotorius und bildet die Fortsetzung des rostralen Pols des EW, aber eine wirkliche Grenze kann man nicht ziehen (Abb. 10C, D). Lateral zum EW im periaquäduktalen Grau liegt eine Gruppe kleinzelligerer Neurone, die selektiv das Neuropeptid Urocortin enthalten, und deshalb hier als Urocortin-Gruppe (UR) bezeichnet wird (Abb. 10A, B) (Vasconcelos et al., 2003).

Wichtig ist auch zu bedenken, dass die Lokalisation des EW im Menschen, wie durch Olszewski und Baxter (1982) gezeigt, nur auf zytoarchitektonischen Eigenschaften basiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass man auch mit einer einfachen Darstellung der perineuronalen Netze, kombiniert mit einer Nissl-Färbung, die MIF-Motoneurone im Nucleus trochlearis und oculomotorius (IIIc-Gruppe) beim Rhesusaffen gut identifizieren kann. Außerdem lässt sich der EW anhand seiner eingestreuten Neurone mit stark ausgeprägten perineuronalen Netzen gut von der Urocortin-Gruppe (UR) abgrenzen, die keine netztragenden Neurone enthält. Diese Kriterien dienen zur Identifizierung der entsprechenden Zellgruppen beim Menschen.

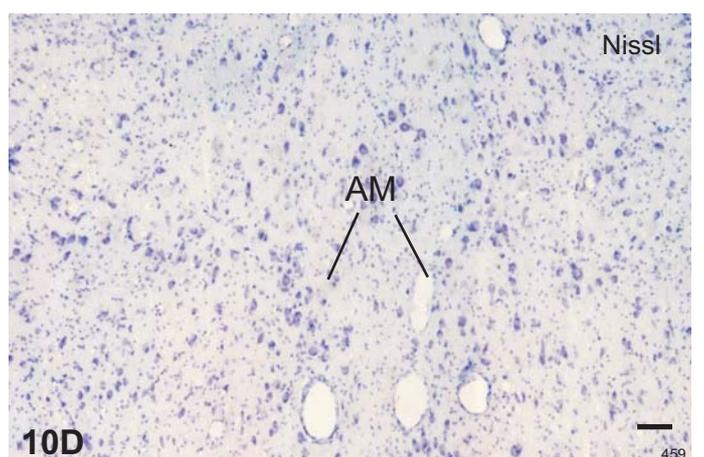
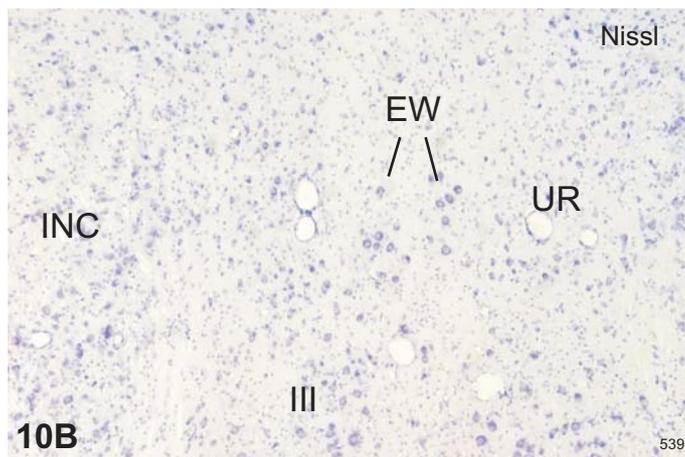
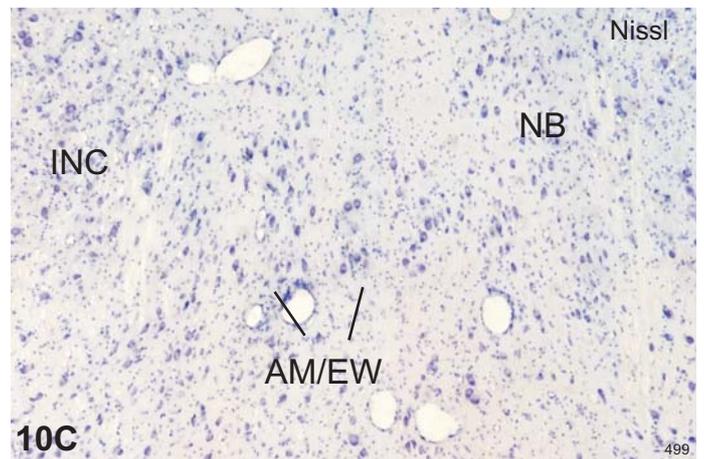
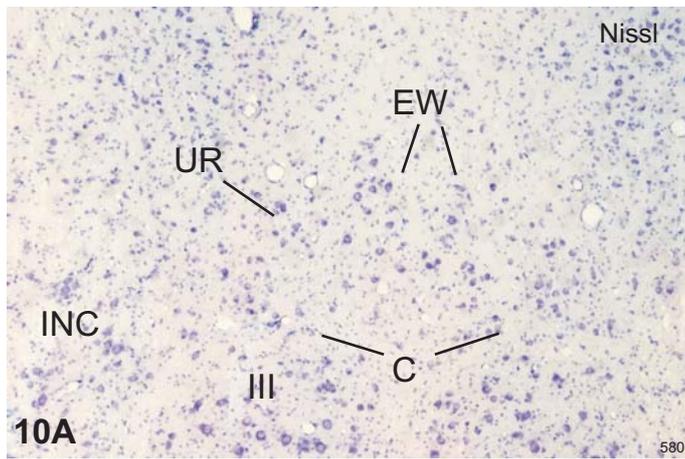


Abb. 10: Frontalschnitte in Nissl-Färbung durch die rostralsten Anteile des Ncl. oculomotorius (III). **A/B**: Dorsal des III ist deutlich die Gruppe mittelgrosser, stark angefärbter Neurone des EW-Kerns abzugrenzen, lateral davon liegen die etwas schmälere Neurone der Urocortin-Gruppe (UR). Die C-Gruppe (IIIc) liegt an der dorsomedialen Grenze des III. **C/D**: Übergang des EW in den Anteromedianen Kern (AM), welcher lateral durch den Interstitiellen Kern von Cajal (INC) sowie den Nucleus von Bechterew (NB) begrenzt wird. Maßstab = 50µm in A, B, C, D.

## **3.2 Mensch**

### **3.2.1 Perineuronale Netze und Nissl**

#### **3.2.1.1 Nucleus trochlearis**

Der Nucleus trochlearis des Menschen liegt im Tegmentum des Mittelhirns auf der Höhe der Colliculi inferiores ventral des Aquäduktes. Durch alle Schnittebenen hindurch behält er seine rundliche Form. Ähnlich wie beim Affen enthält der Kern eine grosse Gruppe von Neuronen, welche in die Fasern des MLF eingebettet sind. Sie sind multipolar, zeigen das klassische Bild von Motoneuronen, und können in der Nissl-Färbung gut identifiziert werden (Abb. 11A). Dorsal dieser Gruppe scheint sich eine Population kleinerer Neurone von dem klassischen Hauptkern abzugrenzen (Abb. 11A, Pfeil), deutlicher sichtbar mit der CSPG-Immunfärbung darstellen. Die braungefärbten perineuronalen Netze heben den Nucleus trochlearis selektiv gegen die ungefärbten Fasern des MLF sowie seiner Umgebung ab (Abb. 11B). Bereits in der Übersicht erkennt man jedoch eine Zellgruppe an der dorsalen Grenze des Kerns, deren Neurone im Unterschied zu den grossen Motoneuronen des Nucleus trochlearis keine Netze aufweisen und auch deutlich kleiner sind, als die sie umgebenden Zellen des periaquäduktalen Graus (Abb. 11B, Pfeil). Bei Betrachtung mit hoher Vergrößerung wird deutlich, dass diese netzlosen Neurone im dorsalen Ncl. trochlearis kleiner und rundlicher sind als diejenigen des klassischen Ncl. trochlearis und eine Art Kappe an der dorsalen Grenze des Kerns formen, entsprechend der Lage der MIF-Motoneurone beim Affen (Abb. 11C, offene und geschlossene Pfeile, 12A, schwarze Punkte, 3B; Büttner-Ennever et al., 2001).

#### **3.2.1.2 Nucleus oculomotorius**

Der humane Nucleus oculomotorius befindet sich im Tegmentum des Mittelhirns, ventral des zentralen Graus und des Aquäduktes auf der Höhe der Colliculi superiores. Er erstreckt sich vom rostralen Pol des Ncl. trochlearis ungefähr 5mm nach rostral. In den caudalen Anteilen wird der Ncl. oculomotorius lateral sowie

Abb. 11 **A-F**: Mensch: Frontalschnitte durch den Ncl. trochlearis (IV) und den Ncl. oculomotorius (III) von caudal nach rostral mit Nissl-Färbung (violett) und zusätzlicher Darstellung der perineuronalen Netze (CSPG, braun) des jeweiligen Nachbarschnittes. **A/D**: Darstellung des IV und III mit Nissl-Färbung. Dorsal von IV bzw. medial von III liegende Gruppe von Neuronen (Pfeil) zu erkennen. **B/E**: Darstellung der perineuronalen Netze. Dorsale Kappe des IV als auch mediale Gruppe des III tragen keine Netze (Pfeile). **C/F**: Detailaufnahmen markiert durch Quadrat in B bzw. E. **C**: Deutlich sind die kleinen netzlosen Neurone der dorsalen Gruppe (geschlossene Pfeile) von den grösseren netztragenden Neuronen des IV (offener Pfeil) abzugrenzen. **F**: Die kleineren, medial liegenden netzlosen Motoneurone (geschlossenen Pfeile) unterscheiden sich deutlich von den netztragenden Motoneuronen des III (offene Pfeile). Maßstab = 500µm in A, B, D, E; 50 µm in C, F.

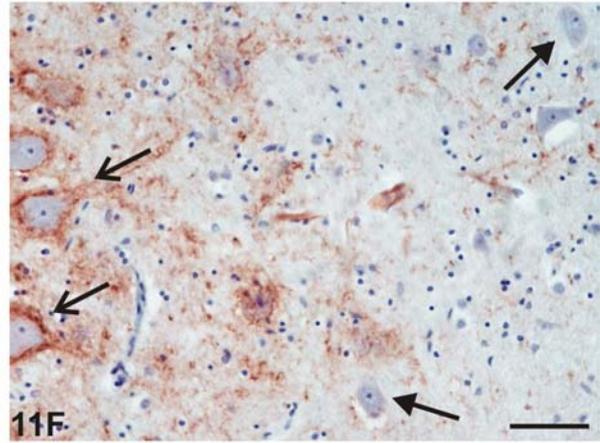
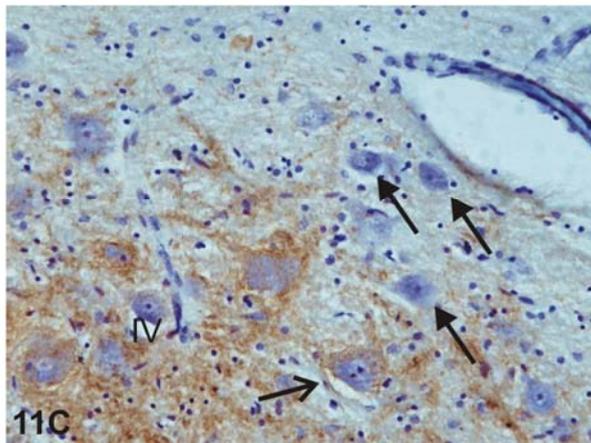
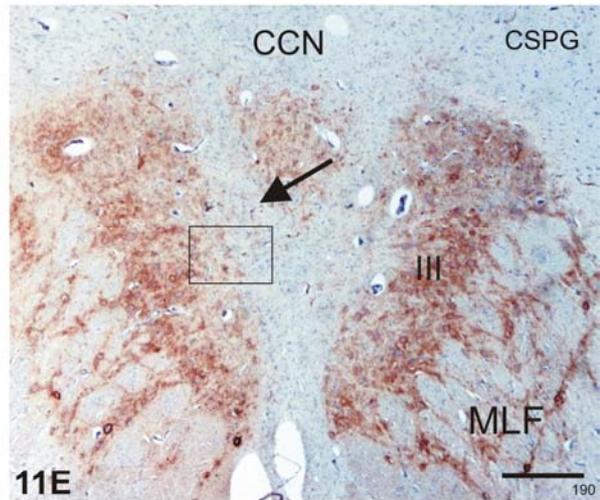
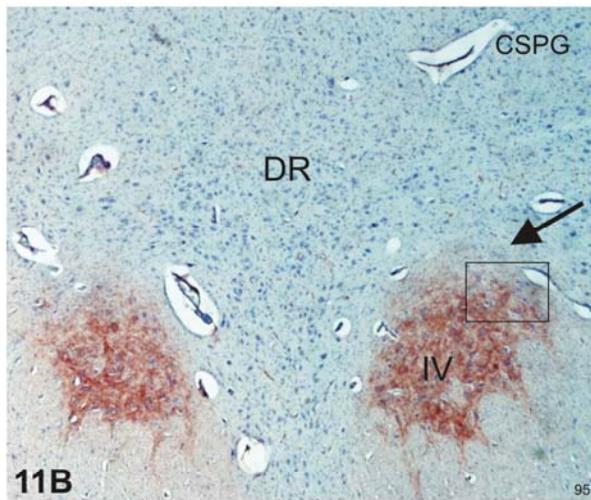
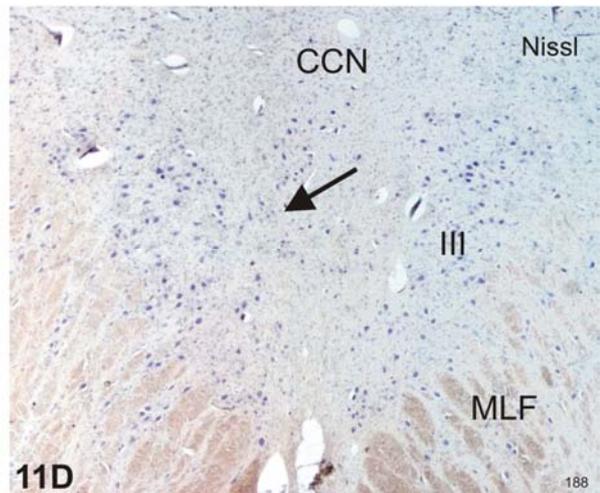
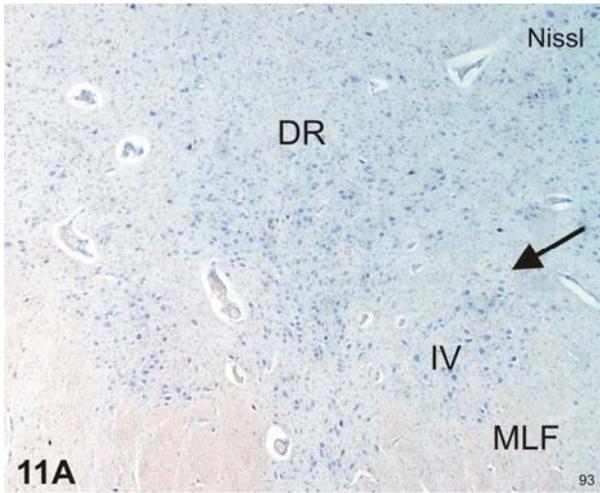


Abb. 11 **G-L**: Mensch: Frontalschnitte durch das caudale Drittel des Ncl. oculomotorius (III). **G/J**: Dorsomedial und dorsal des III sind bereits in der Nissl-Färbung deutlich zwei separat liegende Gruppe von Neuronen abzugrenzen, die hier als dorsomediale Urocortin-Gruppe (URdm) und dorsale Urocortin-Gruppe (URd) bezeichnet werden. **H/K**: Durch zusätzliche Darstellung der perineuronalen Netze (braun) heben sich die violetten, netzlosen Neurone von URdm und URd und der medialen IIIc+s Gruppe von den netztragenden Neuronen des III als auch des Nucleus centralis caudalis (CCN) ab. **I/L**: Detailaufnahmen markiert durch Quadrat in H und K. Deutlich unterscheiden sich die Neurone von URdm (geschlossene Pfeile) und URd (gedoppelte Pfeile) durch ihre Grösse und der fehlenden Netzanfärbung von den grösseren, netztragenden Motoneuronen des III (offener Pfeil). Maßstab = 500µm in G, H, J, K; 50 µm in I, L. Stern = Gefässanschnitt.

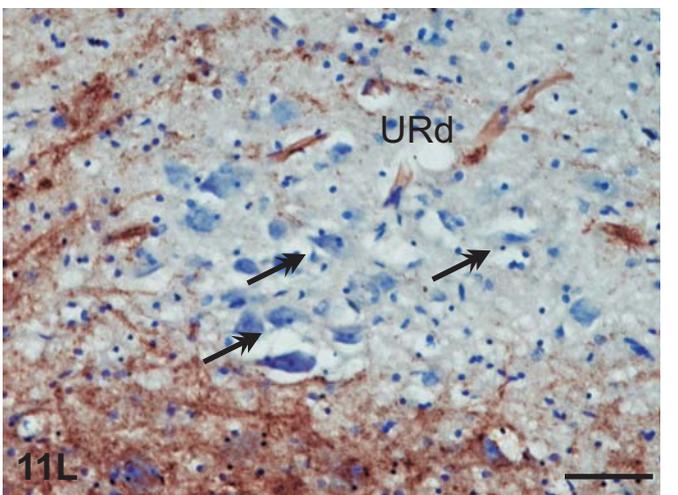
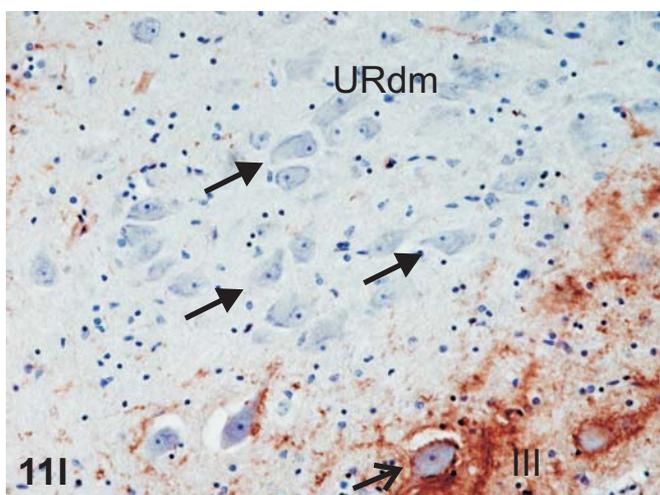
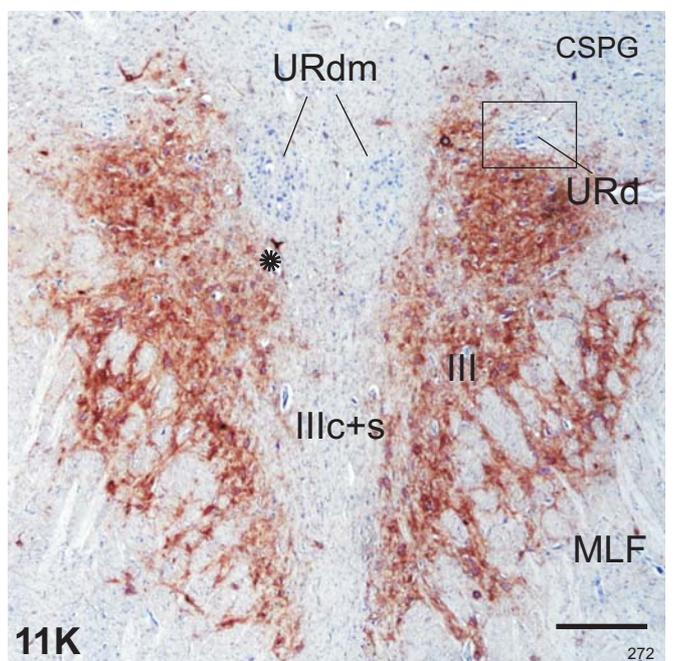
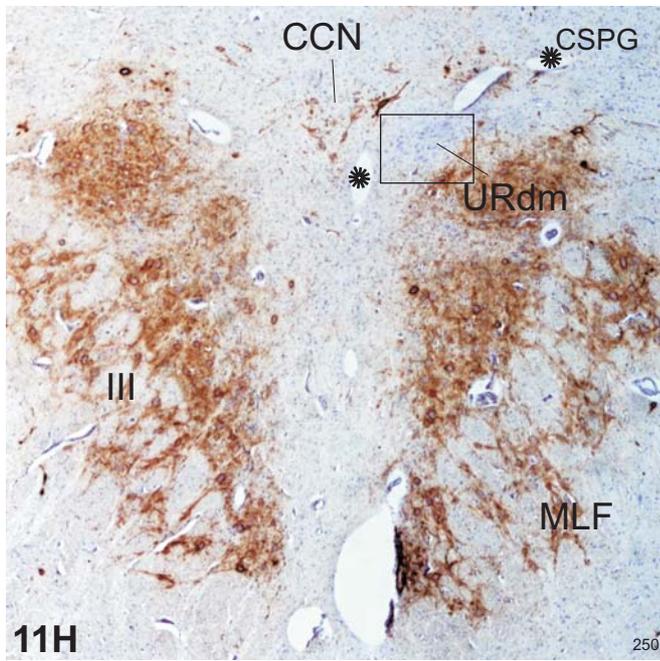
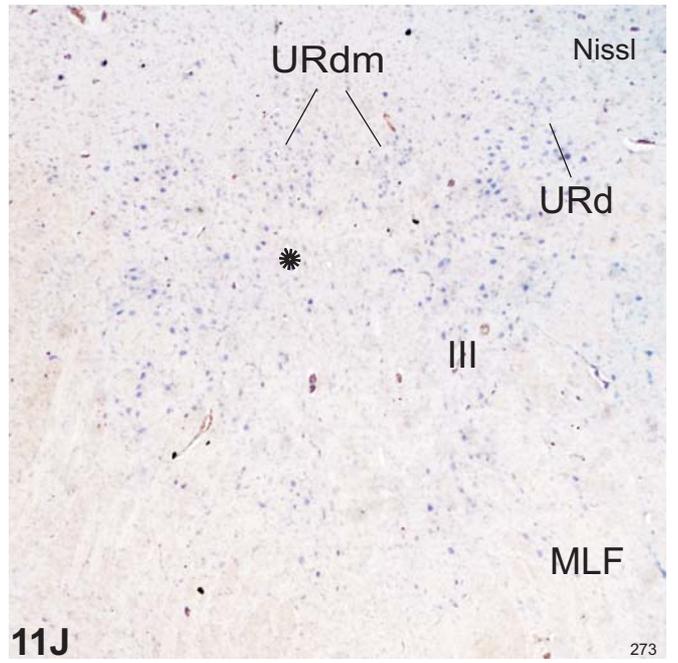
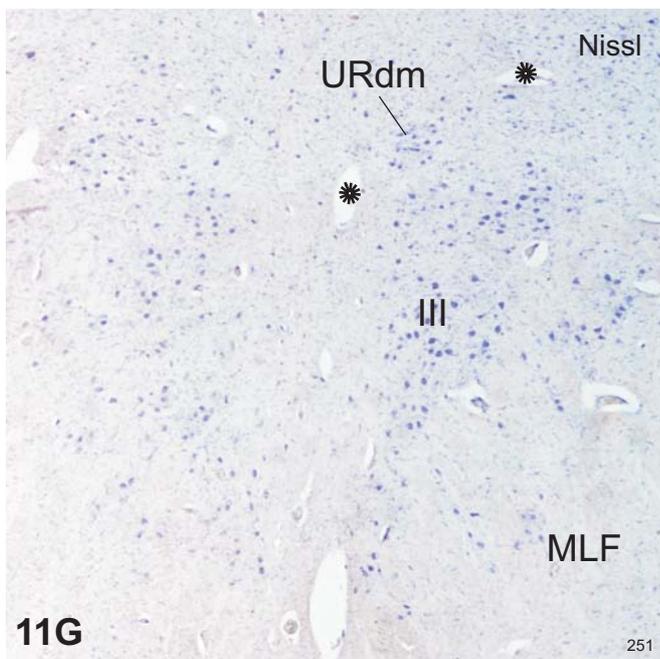


Abb. 11 **M-T**: Mensch: Frontalschnitte in Höhe des mittleren Drittels des Ncl. oculomotorius (III). **M/Q**: Die Neurone von URdm scheinen sich der URd-Gruppe räumlich anzunähern. Deutlich sind auch die vereinzelt Neurone in IIIc+s zu erkennen. **N/R**: Durch Darstellung der perineuronalen Netze (braun) heben sich dorsal URdm und URd und medial IIIc+s anhand ihrer netzlosen Neurone, und dorsal der Edinger-Westphal (EW) mit den eingestreuten netztragenden Neuronen ab. Lateral liegen die netztragenden Neurone des Interstitiellen Nucleus von Cajal (INC). Zusätzlich erscheint an der Mittellinie eine Gruppe netztragender Neurone, die dem Nucleus von Perlia (IIIp) entsprechen. **O/P**: Detailaufnahmen markiert durch Quadrat in N und R. Die Neurone von URdm und URd erscheinen deutlich kleiner und netzlos im Vergleich zu den Neuronen des III. Zu beachten ist auch, dass die Neurone von URd (gedoppelte Pfeile) kleiner und schmaler zu sein scheinen, als die Neurone von URdm (geschlossene Pfeile). **S/T**: Neurone des EW als auch des Nucleus von Perlia (IIIp) sind von prominenten Netzen (offene Pfeile) umgeben. Die Neurone von URdm und URd sind dagegen deutlich kleiner und netzlos (geschlossene Pfeile). Maßstab = 500µm in M, N, Q, R; 50 µm in O, P, S, T. Stern = Gefässanschnitt.

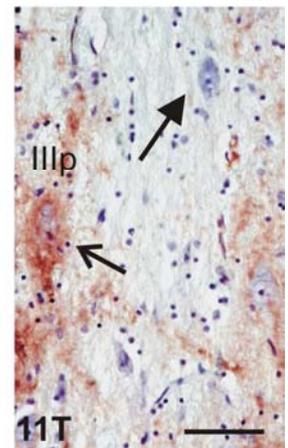
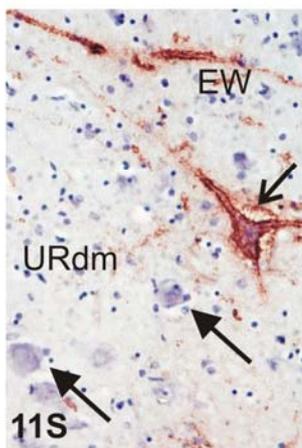
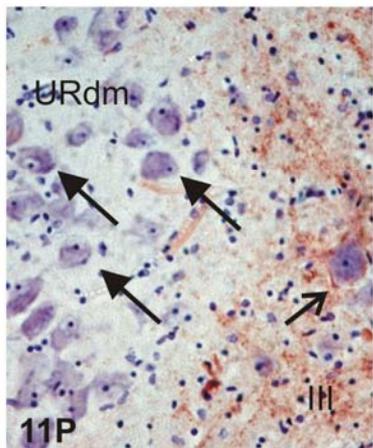
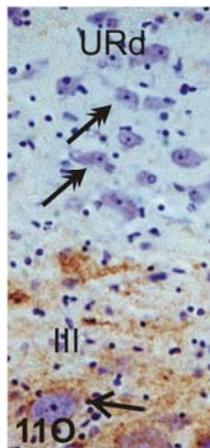
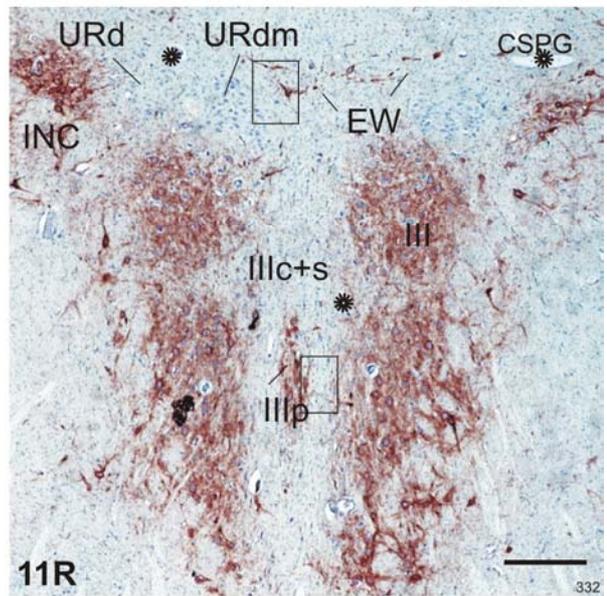
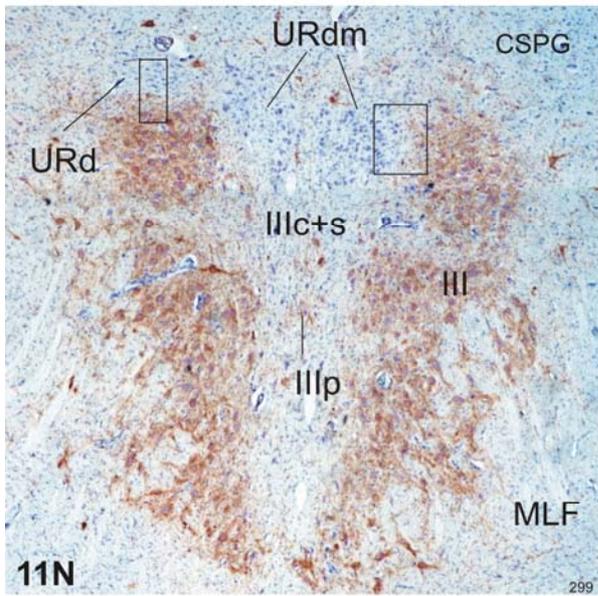
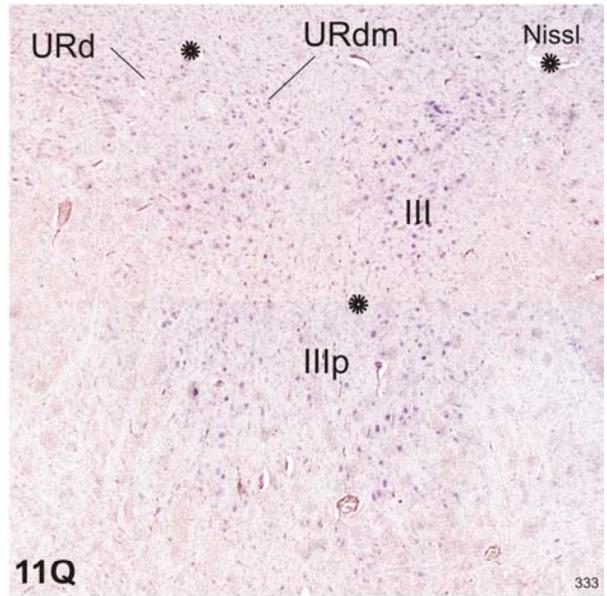
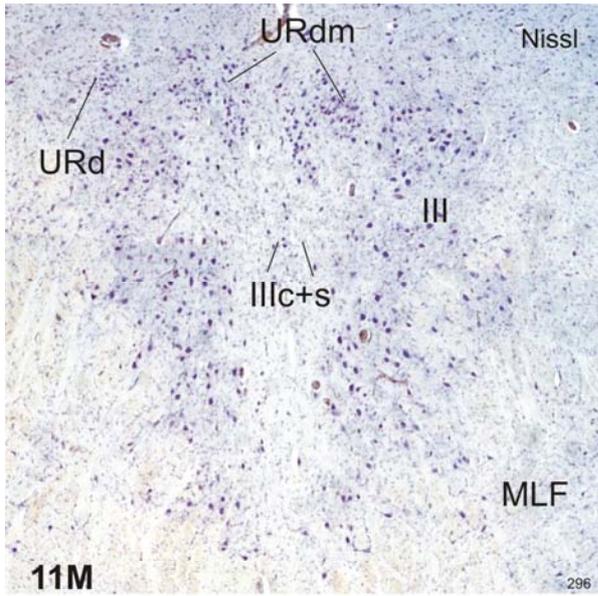
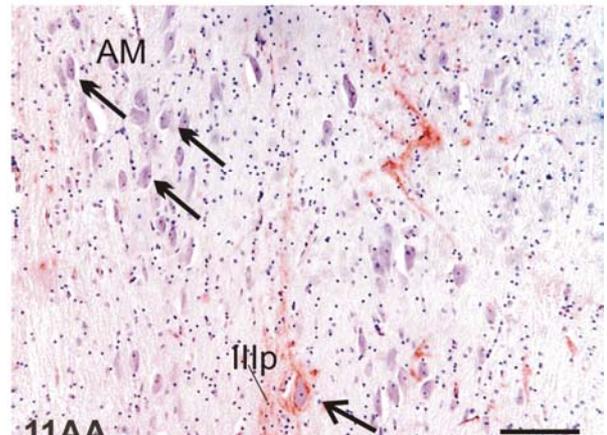
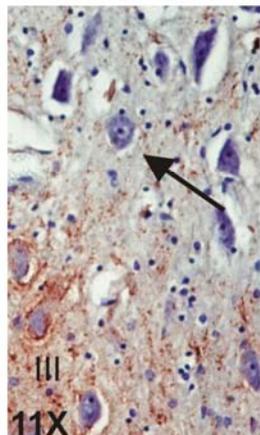
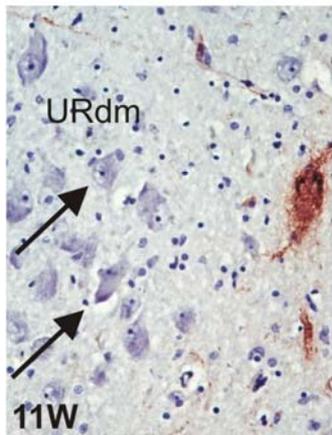
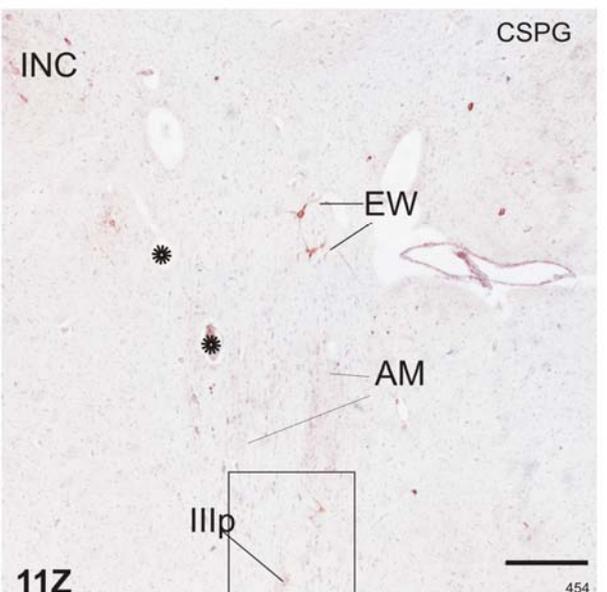
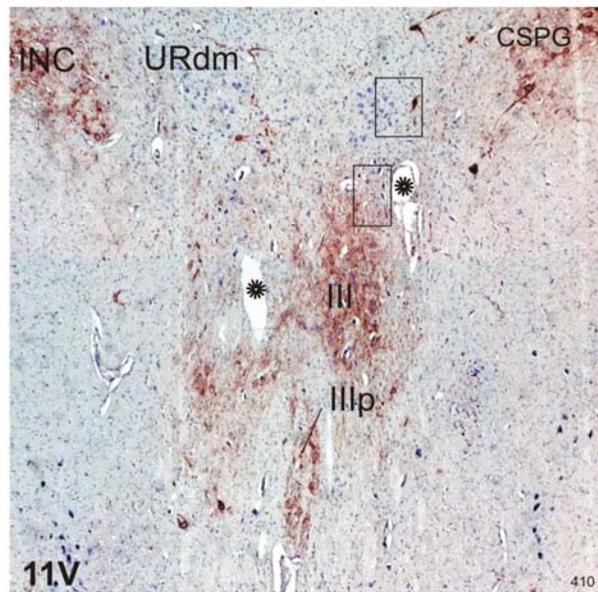
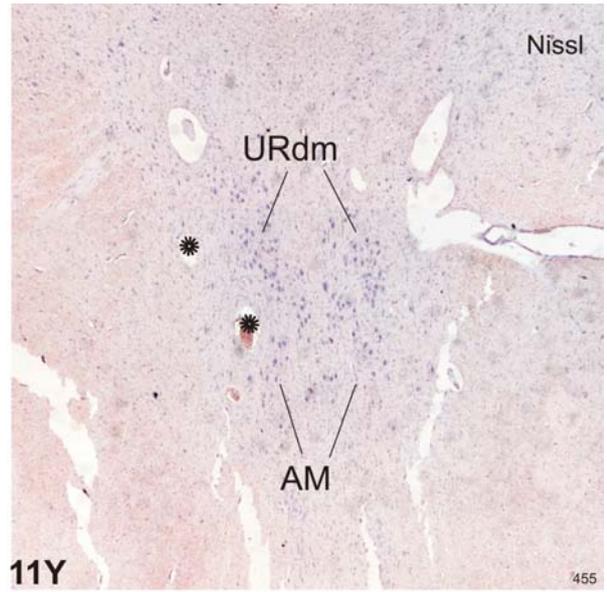
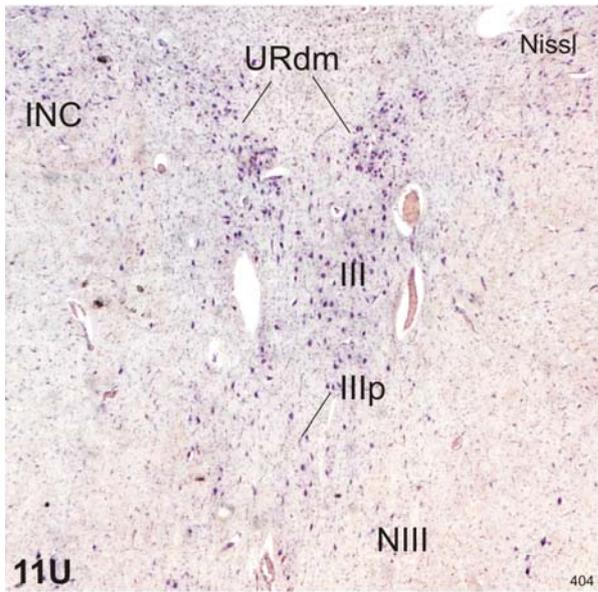


Abb. 11 **U-AA**: Mensch: Frontalschnitte durch die rostralsten Anteile des Ncl. oculomotorius (III). **U/V**: Verschmelzung von URdm und URd zu einer zusammenhängenden Population, welche sich durch Darstellung der perineuronalen Netze von den medial liegenden Neuronen des EW als auch von den lateral liegenden Neuronen des Interstitiellen Nucleus von Cajal (INC) abgrenzt. **W/X**: Detailaufnahmen markiert durch Quadrate in V. Neurone von URdm (geschlossene Pfeile) sind deutlich kleiner und netzlos im Vergleich zu den Neuronen des EW und des III. **Y/Z**: Rostralster Abschnitt mit Übergang des EW in den Anteromedianen Kern (AM). Vereinzelt Anschnitte netztragender Neurone des EW und des III. **AA**: Detailaufnahme markiert durch Quadrat in Z. Netztragende Neurone des IIIp (offener Pfeil), umgeben von kleinen, eher schmalen netzlosen Neuronen (gedoppelte Pfeile). Maßstab = 500µm in U, V, Y, Z; 50 µm in W, X, AA.



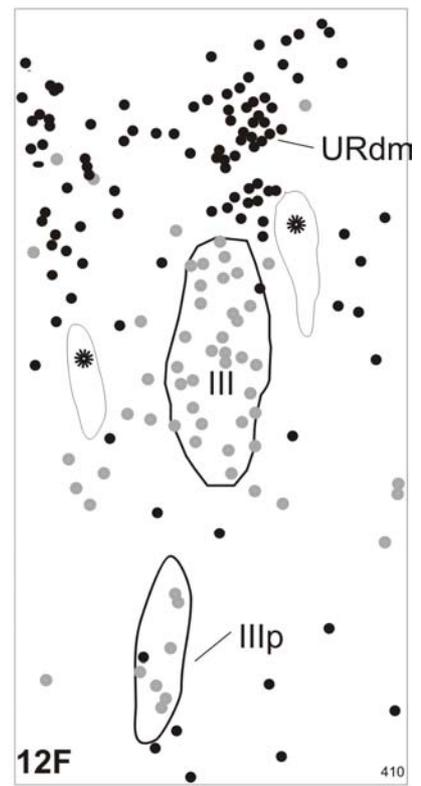
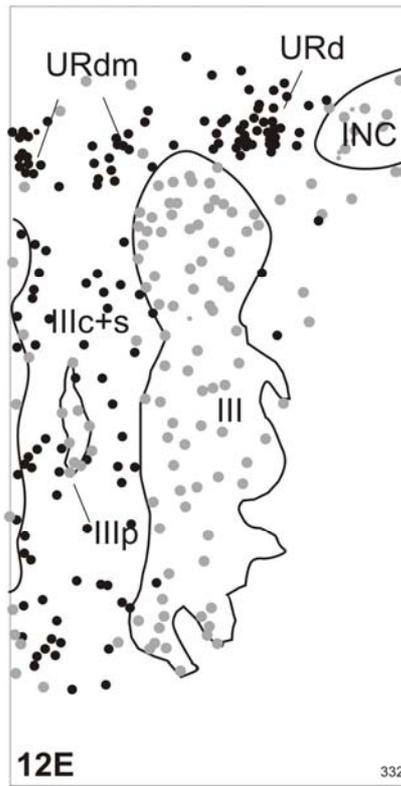
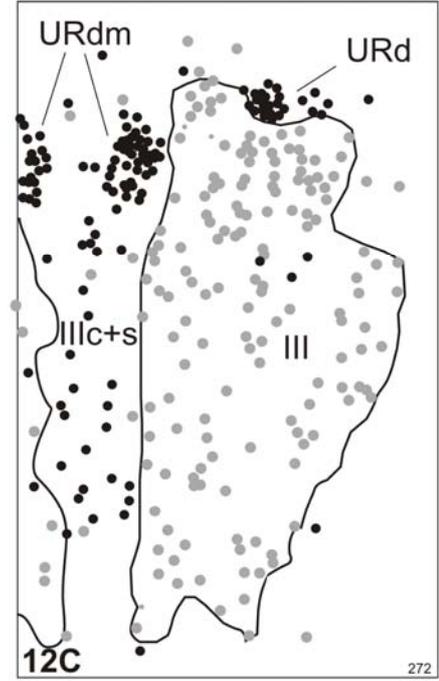
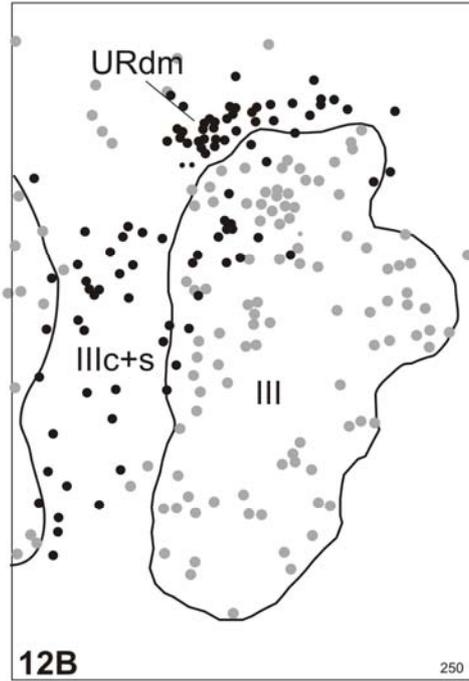
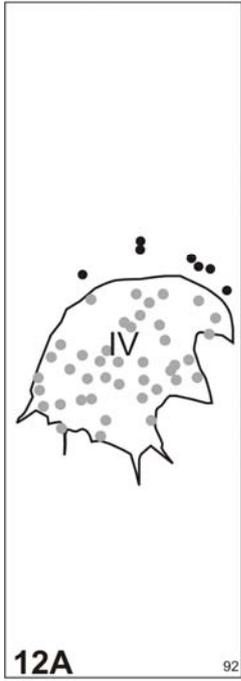
ventrolateral durch die Fasern des MLF begrenzt. Dorsomedial sitzt ihm der Ncl. centralis caudalis (CCN) auf (Abb. 11D, E).

Der klassische Ncl. oculomotorius besteht aus mittelgroßen multipolaren Motoneuronen, welche sich in der Nissl-Färbung intensiv violett anfärben (Abb. 11D). Die CSPG-Immunfärbung zeigt, dass sich der Nucleus oculomotorius beim Menschen, vergleichbar zum Affen, ebenfalls durch die intensive Braunfärbung seiner perineuronalen Netze von der Umgebung abhebt (Abb. 11E). Die systematische Analyse bei Betrachtung mit hoher Vergrößerung ergab, dass die große Mehrheit aller Neurone innerhalb des klassischen Ncl. oculomotorius mit perineuronalen Netzen (Abb. 11E, F, offene Pfeile) umhüllt sind, wohingegen sich v.a. im dorsomedialen Teil eine kleine Population von Neuronen abgrenzt, welche zum einen keine perineuronalen Netze aufweist und zum anderen deutlich kleiner ist als die sie umgebenden Neurone (Abb. 11E, F, geschlossene Pfeile).

Bewegt man sich bei der Analyse der Schnitte weiter von caudal nach rostral so erscheint an der dorsomedialen Grenze des Ncl. oculomotorius eine relativ große abgegrenzte Neuronengruppe, die keinerlei perineuronale Netze aufweist. Diese Gruppe exprimiert Urocortin (Ryabinin et al., 2005) und wird hier in Entsprechung zu den Befunden am Affen als dorsomediale Urocortin-Gruppe (URdm) bezeichnet (Abb. 11H, I, P, geschlossene Pfeile, K; Abb. 13), die sich weiter rostral von einer dorsalen Urocortin-Gruppe (URd) abgrenzen lässt (Abb. 11L, O, gedoppelte Pfeile, M, N, Q, R; Abb. 13). Diese Neurone zeigen eine deutliche Nissl-Anfärbung, sind kleiner als die Neurone des klassischen Ncl. oculomotorius und eher von rundlicher Form (Abb. 11G, I, geschlossene Pfeile, P, X). Dorsal wird diese URdm-Gruppe zunächst von netztragenden Neuronen des CCN begrenzt, welcher sich nach rostral immer weiter verringert (Abb. 11H).

Auf dieser Ebene beginnend liegen zudem an der Mittellinie eher verstreut zwischen den beiden Nuclei Neurone von kleinerem und spindelförmigem Aussehen ohne perineuronale Netze, welche den MIF-Motoneuronen in der C- und S-Gruppe beim Affen ähnlich sind und deshalb hier als IIIc+s bezeichnet werden (Abb. 11K, N, R; 12B-E). Weiter rostral zwischen den mittleren Dritteln des Nucleus oculomotorius erscheint in der Nissl-Färbung (Abb. 11Q) eine unpaarige, zentral gelegene Gruppe von mittelgrossen Neuronen, welche ebenfalls wie die Motoneurone des Oculomotorius von perineuronalen Netzen umgeben sind und welche in der Lokalisation dem Nucleus von Perlia von Olszewski entsprechen und hier

Abb. 12: Mensch: Plots von Frontalschnitten des Ncl. trochlearis (IV) (**A**) und des Ncl. oculomotorius (III) (**B-F**) von caudal nach rostral. Die Schnitte wurden mit Nissl-Färbung und CSPG zur Darstellung der perineuronalen Netze doppelmarkiert, anschliessend wurden die Umrisse der Kerne eingetragen. SIF-Motoneurone (helle Punkte) sind von perineuronalen Netzen umgeben, also CSPG-positiv, während MIF-Motoneurone (ausgefüllte Kreise) CSPG-negativ, also nicht von perineuronalen Netzen umgeben sind. **A**: In IV formen die CSPG-negativen MIF-Motoneurone eine Gruppe an der dorsalen Grenze. **B-F**: In III liegen die SIF-Motoneurone innerhalb der klassischen Grenze des Kerns, wohingegen die MIF-Motoneurone medial liegen, wobei keine klare Abgrenzung zwischen einer C- und S-Gruppe sichtbar ist, daher die zusammenfassende Bezeichnung IIIc+s. Als kompakte netzlose Neurone erscheinen URdm und URd dorsal zu III. **E/F**: Die Neurone des Ncl. von Perlia (IIIp) sind CSPG-positiv, der weiter rostral erscheinende und dorsal des III liegende Anteromediane Kern (AM) dagegen CSPG-negativ. Maßstab = 500µm in A bis F.



dementsprechend bezeichnet werden (IIIp) (Abb. 11N, R, T, offener Pfeil, 12E). In Abbildung 11T ist ein vergrößerter Ausschnitt aus diesem Bereich zu sehen, in welchem sich die netztragenden, mittelgrossen Neurone (offener Pfeil) gut von den kleinen, eher etwas länglichen Neuronen ohne perineuronale Netze (geschlossener Pfeil) abgrenzen lassen.

Dorsomedial zum URdm mit seinen kleinen, netzlosen Neuronen (Abb. 11R, S, geschlossene Pfeile, W) wird dieser von einer Lage vereinzelter Neuronen mit stark ausgeprägten Netzen begrenzt, genau wie sie im Evinger-Westphal-Komplex (EW) beim Affen beobachtet worden waren und deshalb auch hier beim Menschen als EW angenommen und so bezeichnet wird (Abb. 11R, S, offener Pfeil). In der Detailaufnahme in Abb. 11S ist deutlich der Unterschied zwischen Grösse und Netzanfärbung der einzelnen Neurone zu sehen.

Wie bereits oben erwähnt wird bei genauer Analyse weiter rostral ein zweiter, begrenzter Komplex netzloser Neurone deutlich, welcher sich am dorsalen Pol des Ncl. oculomotorius befindet, und Urocortin enthält (Ryabinin et al., 2005). Aufgrund seiner Lage wird er als URd bezeichnet. Im Vergleich zu den URdm-Neuronen besteht die URd aus etwas kleineren und länger gestreckten Neuronen, die sich in der Nissl-Färbung schwächer anfärben (Abb. 11M, Q), mit Hilfe der braunen perineuronalen Netzanfärbung jedoch deutlich abzugrenzen sind (Abb. 11 N, R).

Auf weiter rostralen Schnitten verlängert sich der Ncl. oculomotorius und die beiden netzlosen Neuronengruppen, URdm und URd, kommen direkt nebeneinander zu liegen und scheinen sich zu einem gemeinsamen Komplex zu vereinigen, wobei die beiden Zellgruppen an Hand der unterschiedlichen Morphologie ihrer Zellen weiterhin klar voneinander abgegrenzt werden können (Abb. 11 O, P). Auf weiter rostralen Ebenen verschwindet die lateraler gelegene URd-Gruppe und die URdm-Gruppe kommt am rostralen Ende des Ncl. oculomotorius dorsal gelegen (Abb. 11U, V). Ab dieser Ebene verringert sich der durch die CSPG-Färbung abgegrenzte Ncl. oculomotorius zusehends. Dorsal und rostral liegen nach wie vor vereinzelt Neurone mit prominenten Netzen, wie man sie im EW des Affen gesehen hat (Abb. 11Z). Die URdm-Gruppe netzloser Neurone dehnt sich nun immer mehr nach dorsal aus (Abb. 11Y). Der EW selbst geht in den rostralsten Abschnitten in den Anteromedianen Kern (AM) über, dessen kleine, längliche Neurone sich in vertikalen Zügen dorsal des sich verringernden Ncl. oculomotorius befinden (Abb. 11Z).

Abbildung 11AA zeigt die Neurone des AM in Relation zu den etwas grösseren, netztragenden Neuronen der Gruppe von IIIp.

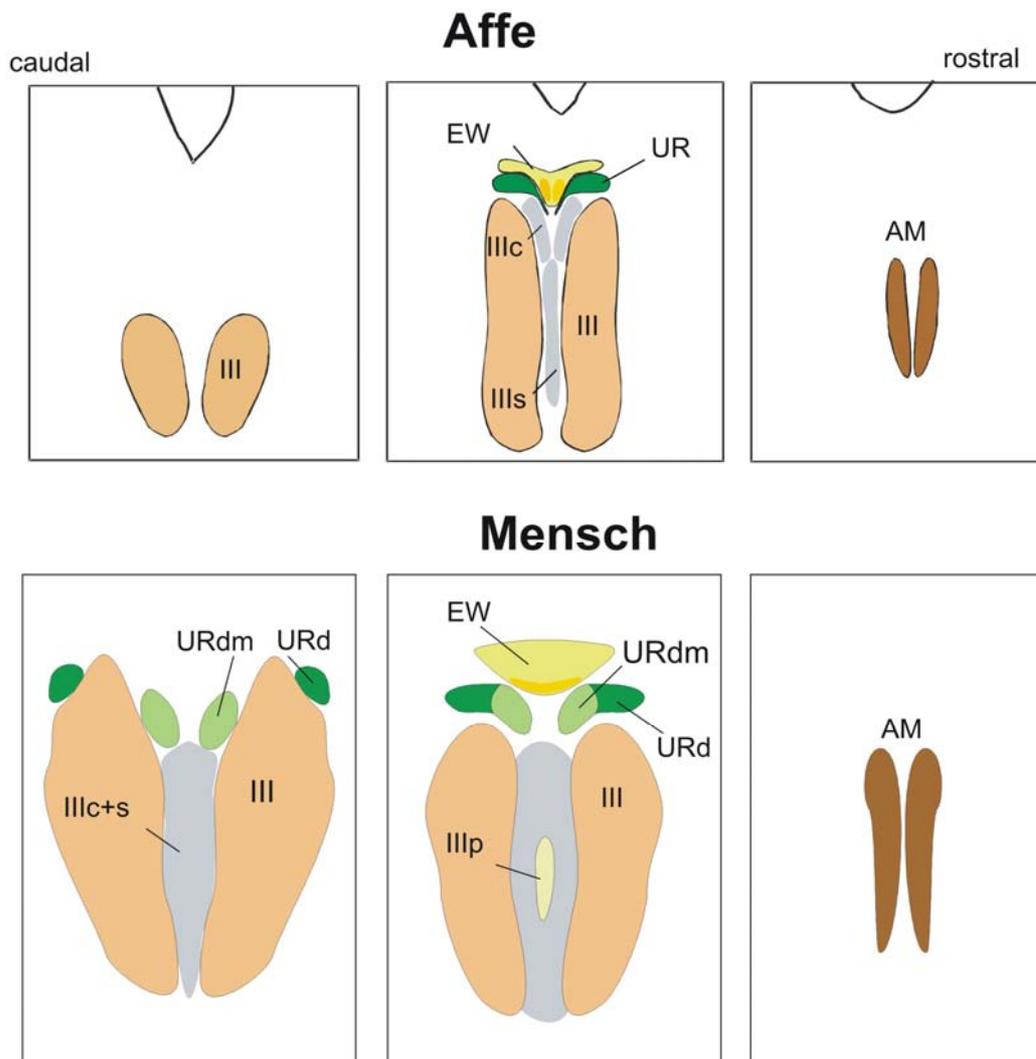


Abb. 13: Zusammenfassende Übersicht der identifizierten Neuronengruppen auf schematisierten Frontalschnitten durch den Ncl. oculomotorius beim Affen (obere Reihe) und beim Menschen (untere Reihe).

## 4 Diskussion

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten zunächst beim Affen, dass die SIF-Motoneurone der äußeren Augenmuskeln von starken perineuronalen Netzen umhüllt sind. Im Unterschied dazu tragen die MIF-Motoneurone (in der C-Gruppe und der dorsalen Kappe des Ncl. trochlearis) keine Netze, womit erstmals ein histochemischer Unterschied von SIF- und MIF-Motoneuronen aufgezeigt wird. Außerdem zeigte sich, dass der EW vereinzelt Neurone mit stark ausgeprägten Netzen enthält, während die lateral gelegene Urocortin-Gruppe (UR) und der Anteromediane Kern (AM) keine perineuronalen Netze enthalten. Vergleichende Untersuchungen mit ähnlichen Anfärbungen an humanen Hirnschnitten ermöglichten die Identifizierung einer Gruppe von netzlosen Neuronen in dem dorsalen Teil des Ncl. trochlearis, sowie von drei Neuronengruppen assoziiert mit dem Ncl. oculomotorius, die zumindest teilweise die MIF-Motoneurone beim Menschen repräsentieren könnten.

### 4.1 Perineuronale Netze und Augenmuskelkerne beim Rhesusaffen

Es war nicht überraschend zu sehen, dass der überwiegende Anteil von Neuronen innerhalb des Ncl. trochlearis und Ncl. oculomotorius von stark ausgeprägten perineuronalen Netzen umhüllt sind. Doppelmarkierungsversuche am Affen zeigten, dass die Mehrheit der netztragenden Neurone cholinerg sind und somit Motoneurone, in diesem Fall SIF-Motoneurone, repräsentieren (Eberhorn et al., 2005). Ein kleiner Anteil der netztragenden Neurone im Ncl. oculomotorius, die nicht cholinerg sind repräsentiert internukleäre Neurone, die nicht zu den äußeren Augenmuskeln ziehen, sondern den Ncl. abducens aktivieren (Maciewicz et al., 1983). Die internukleären Neurone weisen eine ähnliche Physiologie wie die SIF-Motoneuron auf, mit schnellen Feuerungsraten und einer hohen metabolischen Aktivität. Sie benutzen jedoch im Unterschied zu den Motoneuronen vermutlich Glutamat als Transmitter (Carpenter et al., 1992; Nguyen und Spencer, 1999).

Obwohl perineuronale Netze bereits 1893 von Camillo Golgi beschrieben wurden, ist ihre Funktion noch unklar. Manche Autoren schreiben ihnen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität, bei der

Signaltransduktion und vermutlich der Regeneration nach Läsionen zu (Carlson und Hockfield, 1996; Matsui et al., 1999; Yamaguchi, 2000). Einige weitere Studien lassen vermuten, dass sie während der Entwicklung zur Stabilisierung synaptischer Kontakte beitragen (Hockfield et al., 1990), dem neuronalen Schutz gegen Toxine, wie beispielsweise gegen Glutamat (Okamoto et al., 1994) oder zum Schutz degenerativer Erkrankungen dienen könnten (Brückner et al., 1999). Härtig et al., 1994 zeigte, dass perineuronale Netze sehr oft mit Parvalbumin-immunoreaktiven Neuronen assoziiert sind. Dieses Calcium-bindende Protein wiederum ist häufig in Neuronen enthalten, welche eine hohe Cytochrom-Oxidase-Aktivität aufweisen (z.B. Braun et al., 1985; Blümcke und Celio, 1992; Johnson und Casagrande, 1995; Horn et al., 2003). Beide Substanzen, sowohl Parvalbumin als auch Cytochrom-Oxidase, sind in hohen Konzentrationen in Neuronen mit ausgeprägtem metabolischem Energieverbrauch zu finden (Wong-Riley, 1989). Durch Doppelmarkierungen konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die netztragenden SIF-Motoneurone im Gegensatz zu den netzlosen MIF-Motoneuronen Parvalbumin-positiv sind (Eberhorn et al., 2005).

Dementsprechend unterstützen mehrere Studien die Hypothese, dass perineuronale Netze bevorzugt mit sehr aktiven Neuronen mit hoher Feuerungsrate assoziiert sind (Brückner et al., 1993). So wurde gezeigt, dass nur die schnell-feuernden, Parvalbumin-positiven Neurone in den Septumkernen der Ratte perineuronale Netze tragen (Morris und Henderson, 2000), während langsam feuernde Neurone im selben Kern keine Netzanfärbung aufweisen (Hobohm et al., 1998; Morris und Henderson, 2000). Ebenso zeigte sich, dass schnell feuernde Neurone des sakkadischen Systems beim Primaten mit perineuronalen Netzen assoziiert sind (Horn et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass beim Rhesusaffen die MIF-Motoneurone im Unterschied zu den SIF-Motoneuronen der äußeren Augenmuskeln nicht von perineuronalen Netzen umgeben sind. Dies spiegelt möglicherweise ein unterschiedliches Feuerungsverhalten beider Motoneuronengruppen wieder.

Obwohl bisher keine Ableitstudien von MIF-Motoneuronen am Primaten existieren, so lassen sich Rückschlüsse an Hand von Experimenten am Frosch und an der Katze ziehen (Dieringer und Precht, 1986; Nelson et al., 1986; Shall und Goldberg,

1992). Beim Frosch etwa feuern die MIF-Motoneurone mit ca. 50 Hz (Dieringer und Precht, 1986), während SIF-Motoneurone beim Affen maximale Feuerungsraten bis zu 800 Hz erlangen können (Robinson, 1970; Fuchs und Luschei, 1971; Fuchs und Kaneko, 1988; Ling et al., 1999), wozu ein bemerkenswert hoher Grad an metabolischer Aktivität aufgebracht werden muss und somit die Anwesenheit der perineuronalen Netze um SIF-Motoneuronen erklärt werden könnte. Dahingegen wird beim Affen, anlehnend an die Ableitstudien am Frosch, eine niedrigere Feuerungsrate von MIF-Motoneuronen angenommen, was die Abwesenheit von perineuronalen Netzen erklären könnte.

## **4.2 Edinger-Westphal-Kern Komplex beim Rhesusaffen**

Ebenso wie zu den äußeren Augenmuskeln sendet der Nucleus oculomotorius parasymphatische Efferenzen über den Nervus oculomotorius (NIII) zu dem ipsilateralen ciliaren Ganglion, dessen Ganglienzellen die Muskulatur der Iris und der Linse kontrollieren. Der nach seinen Entdeckern benannte Edinger-Westphal-Komplex (EW) wird häufig einfach für diese lose Gruppe von präganglionären Neuronen verwendet. Beim Affen liegen die parasymphatischen präganglionären Neurone für die Pupille und die Linse überwiegend im EW, aber auch im Anteromedianen Kern (AM), der die rostrale Fortsetzung des EW bildet (Akert et al., 1980; Burde und Loewy, 1980; Burde und Williams, 1989; Ishikawa et al., 1990; May et al., 1992; Sun und May, 1993; Übersicht: Büttner-Ennever, 2006). Die präganglionären Neurone werden durch die cholinergen Neurone des EW repräsentiert und sind nicht von perineuronalen Netzen umgeben (Eberhorn et al., 2005). Ausser diesen präganglionären, cholinergen Neuronen enthält der EW noch Neurone mit Projektionen zum Hirnstamm, dem Cerebellum als auch dem Rückenmark (Loewy und Saper, 1978; Loewy et al., 1978; Sugimoto et al., 1978; Sekiya et al., 1984; Rost, 1990; May et al., 1992). Welche dieser Neuronenpopulationen des EW die prominenten Netze trägt ist unbekannt und müsste mit weiteren kombinierten Tracingmethoden geklärt werden.

Die Urocortin-Gruppe (UR) neben dem EW, als auch der Anteromediane Kern, bestehen aus kleineren Neuronen, welche ebenfalls beide nicht von perineuronalen Netzen umgeben sind. Neueren Untersuchungen zufolge sind sie durch ihren Gehalt an dem Neuropeptid Urocortin charakterisiert, weshalb die Gruppe hier so

bezeichnet wurde. Die Urocortingruppe ist nicht cholinerg (Vasconcelos et al., 2003; Ryabinin et al., 2005). Dies bedeutet, dass es sich beim Affen bei den Urocortin positiven Neuronen des UR nicht um die präganglionären Motoneurone des EW handeln kann, welche das ciliare Ganglion versorgen. Bzgl. des Anteromedianen Kerns werden noch weitere Untersuchungen nötig sein, ob er cholinerg ist oder nicht, da er präganglionäre Neurone enthält und somit, wenigstens teilweise cholinerg sein müsste.

Die Lokalisation der präganglionären Neurone ist immer wieder Gegenstand von Verwirrungen, denn in manchen Spezies liegen sie verstreut außerhalb der zytoarchitektonischen Grenzen der visceralen Kerne. Beim Affen sind die präganglionären Neurone weitestgehend auf den EW und den AM beschränkt (Akert et al., 1980; Burde und Loewy, 1980; Ishikawa et al., 1990; May et al., 1992; Sun und May, 1993). Einige Untersuchungen fanden auch Zellen lateral des EW in dem Lateralen Visceralen Kern (LVC) des ventrolateralen periaquäduktalen Graus, der sich lateral an die UR-Gruppe anschließt (Burde und Williams, 1989). Die meisten Neurone des dorsomedialen EW sind grösser als die umgebenden Zellen. Gamlin und Kollegen konnten zeigen, dass präganglionäre Neurone, welche die Linsenakkommodation unterstützen und zum ciliaren Ganglion projizieren, sich auf diese Zellgruppe beschränkten (Gamlin et al., 1994).

### **4.3 Identifizierung der Motoneurone von multipel-innervierten Muskelfasern beim Menschen**

#### **4.3.1 Nucleus trochlearis**

Ebenso wie beim Affen werden die grösseren, im Hauptkern liegenden Neurone von perineuronalen Netzen umgeben. Dadurch grenzen sie sich deutlich gegen die kleineren dorsal gelegenen Neurone ab, welche keine perineuronalen Netze besitzen. An Hand der ähnlichen Lokalisation und derselben histochemischen Eigenschaften kann man davon ausgehen, dass es sich bei der dorsalen netzfreien Gruppe um MIF-Motoneurone des Nucleus trochlearis beim Menschen handelt (Wasicky et al., 2004).

### **4.3.2 Nucleus oculomotorius**

Wie beim Affen hebt sich der Nucleus oculomotorius aufgrund der starken Anfärbung der perineuronalen Netze deutlich von seiner Umgebung ab. Entsprechend der Befunde am Affen repräsentieren die netztragenden Neurone im Ncl. oculomotorius höchstwahrscheinlich SIF-Motoneurone und eventuell internukleäre Neurone, die durch entsprechende Doppelfärbungen auf Acetylcholin voneinander abgegrenzt werden müssten (Eberhorn et al., 2005a).

Zusätzlich zeigt sich in der Mittellinie zwischen den Nuclei oculomotorii eine unpaarige Zellgruppe, deren Neurone ebenfalls von perineuronalen Netzen umgeben sind. Diese entspricht, aufgrund ihrer Lage als auch der Zellanordnung dem von Olszewski beschriebenen Nucleus von Perlia (IIIp), dessen Funktion noch ungeklärt ist. Einige Autoren sehen Hinweise für eine Beteiligung bei der Konvergenz. Aufgrund ihrer Netzanfärbung kann es sich bei diesen Neuronen nicht um die gesuchten MIF-Motoneurone handeln.

### **4.3.3 Motoneurone von multipel-innervierten Muskelfasern**

In Anlehnung an die Befunde am Affen sollten die MIF-Motoneurone keine perineuronalen Netze tragen. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Gruppen netzloser Neurone identifiziert, für welche eine neue Nomenklatur eingeführt wurde: URdm, URd und IIIc+s.

Sofort ins Auge fallen dem Betrachter die zwei dominanteren Gruppen URdm und URd dorsomedial und dorsal zum Ncl. oculomotorius, deren kleinere Neurone sehr kompakt gepackt sind, selbst in der Nissl-Färbung als eigenständige Gruppe erkannt werden können und offensichtlich keine perineuronalen Netze tragen. Diese beiden Zellgruppen zusammen wurden von Olszewski und Baxter (1982) als Edinger-Westphal-Kern bezeichnet. Aus den folgenden Gründen wird eine Homologie der Gruppen URdm und URd mit MIF-Motoneuronen ausgeschlossen: Beide Gruppen sind nicht cholinerg (Ryabinin et al., 2005), eine Eigenschaft, welche auch für die MIF-Motoneurone gefordert wird und beim Affen für die MIF-Motoneurone nachgewiesen wurde (Eberhorn et al., 2005). Außerdem enthalten die beiden Gruppen selektiv das Peptid Urocortin (Ryabinin et al., 2005) und entsprechen damit der Urocortin-Gruppe beim Rhesusaffen (Vasconcelos et al., 2003).

Die Neurone der Dritten in Frage kommenden netzlosen Gruppe IIIc+s zwischen den beiden Nuclei oculomotorii entsprechen aufgrund ihrer Lokalisation sowie ihrer Morphologie am ehesten den MIF-Motoneuronen der S- und C-Gruppe beim Affen und wurden daher hier so bezeichnet. Allerdings wäre diese Gruppe weitaus weniger stark ausgeprägt, wie man es vielleicht beim Menschen annehmen könnte. Neueste Befunde zeigen, dass diese netzlosen Neurone cholinerg sind, und damit höchstwahrscheinlich die MIF-Motoneurone repräsentieren.

#### **4.3.4 Wo liegt der Edinger-Westphal-Kern beim Menschen?**

Die netzlosen Gruppen URdm und URd entsprechen dem Edinger-Westphal-Kern bei Olszewski und Baxter (1982). Neuere Untersuchungen am Menschen zeigten, dass diese beiden Gruppen und der rostraler gelegene Anteromediane Kern (AM) selektiv das Peptid Urocortin enthalten (Ryabinin et al., 2005). Vergleicht man diese Befunde mit den Daten vom Affen, welche zeigten, dass der eigentliche EW keine Urocortin-positiven Neurone enthält, sondern nur die lateral angrenzenden Neurone, so muss man davon ausgehen, dass URd und URdm beim Menschen nicht dem EW entsprechen (Vasconcelos et al., 2003). Ausgehend davon, dass der EW beim Primaten Sitz der cholinergen präganglionären Neurone für Pupille und Linse ist, muss der EW beim Menschen ebenfalls cholinerge Neurone enthalten. Ryabinin et al., (2005) zeigte jedoch bereits, dass die Urocortin-positiven Gruppen, die hier URd und URdm entsprechen, keine cholinergen Neurone enthalten.

Bei genauerer Analyse der Anfärbungen mit dem CSPG-Antikörper entdeckt man oberhalb der Gruppen URdm und URd ein dünnes Band von Zellen, von denen einige von prominenten perineuronalen Netzen umgeben sind. Diese Neurone entsprechen in ihrer Häufigkeit und Morphologie denjenigen im traditionellen EW des Affen, die zwischen den cholinergen präganglionären Neuronen liegen (Eberhorn et al., 2005). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass als möglicher Kandidat für den EW als Sitz der präganglionären Neurone beim Menschen diese Zellgruppe oberhalb des Ncl. oculomotorius in Frage kommt, welche von perineuronalen Netzen umgeben ist (Ryabinin et al., 2005 Fig.2). In weiteren Studien müsste überprüft werden,

inwieweit diese Gruppe zusätzlich cholinerge Neurone enthält, denn bisherige Beschreibungen liefern keine eindeutigen Befunde (Ryabinin et al., 2005 Fig.2).

Die genaue Lokalisation des EW ist wichtig für klinisch-anatomische Studien, in welchen versucht wird, degenerative Veränderungen im EW bei Alzheimer-Patienten mit Pupillenstörungen zu korrelieren – aber keine Korrelation gefunden wurde (Scinto et al., 1999; 2001; Rüb et al., 2001). Diese Arbeitsgruppen legten für die Lokalisierung des EW den Atlas von Olszewski und Baxter (1982) zu Grunde, der an Hand der vorliegenden Arbeit mit den Befunden von Ryabinin et al., (2005) dem URdm und URd entspricht. Im Lichte der vorliegenden Daten müssten die Ergebnisse dieser klinisch-anatomischen Studien neu interpretiert werden, und besonderes Augenmerk auf die dorsal gelegene Neuronengruppe – als möglichen Kandidaten für den EW – gerichtet werden.

#### **4.4 Funktion der Motoneurone von einzeln- und multipel-innervierten Muskelfasern**

Durch mehrere Untersuchungen konnte bisher gezeigt werden, dass die Motoneurone der einzeln (SIF)- und multipel-innervierten (MIF) Fasern der äusseren Augenmuskeln deutlich getrennt voneinander in den jeweiligen Hirnnervenkernen liegen. Unterschiedliche prämotorische Eingänge der SIF- und MIF-Motoneurone legen nahe, dass beide Motoneuronengruppen auch unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Für den Musculus lateralis rectus wurde mit transsynaptischen Tracerversuchen gezeigt, dass die SIF-Motoneurone Eingänge von allen prämotorischen Arealen erhalten, die (sakkadische) Augenbewegungen erzeugen, während die MIF-Motoneurone Eingänge nur von Kerngebieten erhalten, die eher mit der Blickstabilisierung assoziiert sind (Büttner-Ennever et al., 2002, Wasicky et al., 2004; Ugolini et al., 2006). Dazu passen auch die Befunde zu prämotorischen Eingängen der MIF-Motoneurone aus der mesenzephalen reticulären Formation (MRF), welche reziprok eng mit dem Colliculus superior verknüpft ist. Wenn nun der Colliculus superior eine Art Schnittstelle zwischen sensorischen und motorischen Signalen darstellt, könnte er Signale aus dem spinalen Nucleus trigeminus, welcher die Spannung der äußeren Augenmuskeln betrifft, über den Colliculus superior und der MRF wieder zurück zu den MIF-Motoneuronen übertragen, welche somit mehr in

die Generierung von Blickbewegungen und damit in die Blickstabilisierung involviert wären. Wieviel sie zu der Spannung der Augenmuskeln *in vivo* beitragen ist noch unklar. In experimentellen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich Augenmuskeln durch Succinylcholin durch Depolarisation der MIFs und nicht der SIFs kontrahieren (Bach-y-Rita et al., 1977).

Nun stellt sich die Frage, welche Rolle die MIF-Motoneurone genau in der oculomotorischen Kontrolle spielen. Die MIF-Muskelfasern der globalen Schicht erstrecken sich über die gesamte Länge des Augenmuskels (Mayr et al., 1975) und kontrahieren sich langsamer als sie SIF-Muskelfasern, sind ausdauernder (Lennerstrand und Nichols, 1977; Morgan und Proske, 1984) und besitzen eine niedrigere Feuerungsrate als SIF-Fasern (Dieringer und Precht, 1986). Wie bereits in der Einleitung erwähnt sind nur die MIF-Muskelfasern der globalen Schicht an ihren proximalen und distalen Enden mit Palisadenendigungen assoziiert (Übersicht: Büttner-Ennever et al., 2005) und formen bei den Säugetieren eine gemeinsame Einheit (Alvarado-Mallart und Pincon Raymond, 1979; Blumer et al., 1998; Lukas et al., 2000; Eberhorn et al., 2005b). Eine Hypothese besagt, dass diese Einheit möglicherweise Teil eines komplexen propriozeptiven Apparates ist und als „umgekehrte Muskelspindel“ fungiert (Robinson, 1991; Steinbach, 2000). Es ist möglich, dass sie ein sensorisches oder propriozeptives Feedback-Signal zum zentralen Nervensystem unterstützt, welches die Muskelaktivität reguliert (Übersicht: Büttner-Ennever et al., 2005)

Unterstützt wird diese Ansicht dadurch, dass die globalen MIFs das gleiche schwere Myosin besitzen wie die intrafusalen Fasern der Palisadenendigungen mit Kernsack (Nuclear-bag-Fasern Typ I) (Pedrosa-Domellöf et al., 1991), womit globale MIF-Motoneurone gamma-Motoneuronen ähneln könnten, wie es bereits von mehreren Autoren für kleine Motoneurone des Nucleus oculomotorius des Hasen, des Meerschweinchens sowie der Ratte postuliert wird (Akagi, 1978; Gomez-Segade und Labandeira-Garcia, 1983; Labandeira-Garcia et al., 1983).

Diese Vorgaben führen momentan zu der Annahme, dass die MIF-Motoneurone eher an der Stabilisierung der Augenposition beteiligt sind, wohingegen SIF-Motoneurone eher in die Generierung von Blickbewegungen involviert sind (Büttner-Ennever et al. 2001, 2002).

## 5 Zusammenfassung

Die äußeren Augenmuskeln der Säugetiere können an Hand morphologischer Eigenschaften in 2 Kategorien eingeteilt werden: die einzeln-innervierten, sich schnell kontrahierenden Muskelfasern (SIFs) und die eher langsamen, ermüdungsresistenteren multipel-innervierten Muskelfasern (MIFs). Beim Affen konnte durch retrograde Tracing-Methoden nachgewiesen werden, dass auch 2 Gruppen von Motoneuronen existieren, welche räumlich getrennt voneinander im Hirnstamm angeordnet sind. Während sich die Motoneurone der SIF-Fasern innerhalb der klassischen Grenzen der Augenmuskelkerne befinden, liegen die Motoneurone der MIF-Fasern getrennt von diesen in der Peripherie, außerhalb der jeweiligen Kerne.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit sich die Motoneurone der SIFs und MIFs nicht nur an Hand der Lage, sondern auch bezüglich histochemischer Eigenschaften voneinander unterscheiden. Dazu wurden zunächst am Rhesusaffen die Motoneurone der multipel-innervierten (MIF) Muskelfasern und der einzeln-innervierten (SIF) Muskelfasern mit einem Tracer retrograd markiert und mit kombinierten immunhistochemischen Methoden auf die Anwesenheit von perineuronalen Netzen untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass im Unterschied zu den SIF-Motoneuronen die MIF-Motoneurone (der C-Gruppe) beim Affen *nicht* von perineuronalen Netzen umgeben sind. Der Nachweis perineuronaler Netze wurde in Hirnstammschnitten vom Menschen durchgeführt, um die MIF-Motoneurone beim Menschen zu identifizieren. Im dorsalen Teil des Ncl. trochlearis wurde entsprechend der Befunde beim Rhesusaffen eine dorsale Gruppe netzloser Neurone identifiziert, die als Homolog der MIF-Motoneurone des M. superior obliquus angenommen werden. Im Nucleus oculomotorius kristallisierten sich 3 Populationen netzloser Neurone heraus: die dorsal gelegene URd-Gruppe, die dorsomediale URdm-Gruppe und die medial gelegene Illc+s-Gruppe. Der Vergleich mit den Befunden am Rhesusaffen legt nahe, dass die netzlosen Neurone der medialen Illc+s-Gruppe beim Menschen am ehesten das Homolog zu den MIF-Motoneuronen der C- und S-Gruppe beim Affen darstellt. Die netzlosen Neurone der URd- und der URdm-Gruppe sind nicht cholinerg, enthalten das Peptid Urocortin und entsprechen somit der Urocortin-Gruppe beim Rhesusaffen.

## 6 Literatur

Adams I, Brauer K, Arelin C, Härtig W, Fine A, Mader M, Arendt T, Brückner G. 2001. Perineuronal nets in the rhesus monkey and human basal forebrain. *Neuroscience* 108:285-298.

Akagi Y. 1978. The localization of the motoneurons innervating the extraocular muscles in the oculomotor nuclei of the cat and rabbit, using horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181:745-761.

Akert K, Glicksman MA, Lang W, Grob P, Huber A. 1980. The Edinger-Westphal nucleus in the monkey. A retrograde tracer study. *Brain Res* 184:491-498.

Alvarado-Mallert MA, Pincon Raymond M. 1979. The palisade endings of cat extraocular muscles: a light and electron microscope study. *Tissue Cell* 11:567-584.

Bach-y-Rita P, Lennerstrand G, Alvarado J, Nichols K, McHolm G. 1977. Extraocular muscle fibers. Ultrastructural identification of iontophoretically labeled fibers contracting in response to succinylcholine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16:561-565.

Bertolotto A, Manzardo E, Guglielmone R. 1996. Immunohistochemical mapping of peri-neuronal nets containing chondroitin unsulfate proteoglycan in the rat central nervous system. *Cell Tissue Res* 283:283-295.

Blümcke I, Celio MR. 1992. Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities coexist within cytochrome oxidase-rich compartments of squirrel monkey area 18. *Exp Brain Res* 92:39-45.

Blumer R, Lukas JR, Wasicky R, Mayr R. 1998. Presence and structure of innervated myotendinous cylinders in sheep extraocular muscle. *Neurosci Lett* 248:49-52.

Blumer R, Lukas JR, Wasicky R, Mayr R. 2000. Presence and morphological variability of Golgi tendon organs in the distal portion of sheep extraocular muscle. *Anat Rec* 25:359-368.

Bondi AY, Chiarandini DJ. 1983. Morphologic and electrophysiologic identification of multiply innervated fibers in rat extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:516-519.

Bourne JA. Handbuch I der Immunperoxidasefärbemethoden. Hamburg: Dako Corporation, 1983.

Brauer K, Werner L, Leibnitz L. 1982. Perineuronal nets of glia. J Hirnforsch 23:701-708.

Braun K, Scheich H, Schachner M, Heizmann CW. 1985a. Distribution of parvalbumin, cytochrome oxidase activity and  $^{14}\text{C}$ -2-deoxyglukose uptake in the brain of the zebra finch. I. Auditory and vocal motor systems. Cell Tissue Res 240:101-115.

Braun K, Scheich H, Schachner M, Heizmann CW. 1985b. Distribution of parvalbumin, cytochrome oxidase activity and  $^{14}\text{C}$ -2-deoxyglukose uptake in the brain of the zebra finch. II. Visual system. Cell Tissue Res 240:117-127.

Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard D, Oertel WH, Reichenbach A. 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. Glia 8:3183-3200.

Brückner G, Bringmann A, Härtig W, Köppe G, Delpech B, Brauer K. 1998. Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulfate proteoglykans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. Exp Brain Res 121:300-310.

Brückner G, Hausen D, Härtig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K. 1999. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. Neurosci 92:791-805.

Brückner G, Seeger G, Brauer K, Härtig W, Kacza J, Bigl V. 1994b. Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglykan components and parvalbumin in the Mongolian gerbil and rat. Brain Res 658:67-86.

Bruenech JR, Ruskell GL. 2001. Muscle spindles in extraocular muscles of the human infants. Cells Tissue Organs 169: 388-394.

Burde, RM, Loewy AD. 1980. Central origin of oculomotor parasympathetic neurons in the monkey. Brain Res 198:434-439.

Burde RM, Williams F. 1989. Parasympathetic nuclei. *Brain Res* 498:371-375.

Büttner U, Büttner-Ennever JA. 2006. Present concept of oculomotor organization. *Prog Brain Res*. 151: 1-42.

Büttner-Ennever JA, Akert K. 1981. Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. *J Comp Neurol* 197:17-27.

Büttner-Ennever JA, Horn AKE, Graf W, Ugolini G. 2002. Modern concepts of brainstem anatomy: from extraocular motoneurons to proprioceptive pathways. *Ann N Y Acad Sci*. 956:75-84.

Büttner-Ennever JA, Horn AKE, Scherberger H, D'Ascanio P. 2001. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. *J Comp Neurol* 438:318-335.

Büttner-Ennever JA, Konakci KZ, Blumer R. 2006: Sensory control of extraocular muscles. *Prog Brain Res* 151: 81-93.

Carlson SS, Hockfield S. 1996. In; Comper WD, editor. *Extracellular matrix*, vol 1. Tissue function. Amsterdam: Harword Academic Publishers. 1-3.

Carpenter MB, Periera AB, Guha N. 1992: Immunocytochemistry of oculomotor afferents in the squirrel monkey (*Saimiri Sciureus*). *J Hirnforsch* 33:151-167.

Celio MR, Baier W, Scharer L, de Viragh PA, Gerday C. 1988. Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin. *Cell Calcium* 2:81-6

Celio MR, Blümcke I. 1994. Perineuronal nets – a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Rev* 19:1128-1145.

Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. 1998. Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 21:510-515.

Cilimbaris PA. 1910. Histologische Untersuchungen über die Muskelspindeln der Augenmuskeln. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 75:692-747.

Demer JL. 2002. The orbital pulley system: A revolution in concepts of orbital anatomy. *Ann N Y Acad Sci* 956:17-32.

Demer JL, Yeul Oh S, Poukens V. 2000. Evidence for active control of rectus extrocular muscle pulleys. *Invest Ophthal Vis Sci* 41:1280-1290.

DeYoe EA, Hockfield S, Garren H, Van Esen DC. 1990. Antibody labelling of functional subdivisions in visual cortex: Cat-301 immunoreactivity in striate and extrastriate cortex of the macaque monkey. *Vis Neurosci* 5:67-81.

Dieringer N, Precht W. 1986. Functional organization of eye velocity and eye position signals in abducens motoneurons of the frog. *J Comp Physiol* 158:179-194.

Dogiel AS. 1906. Die Endigungen der sensiblen Nerven in den Augenmuskeln und deren Sehnen beim Menschen und den Säugetieren. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 68:501-526.

Eberhorn A, Horn A, Messoudi A, Büttner-Ennever J. (2003). Twitch and non-twitch motoneurons of extraocular muscles have different histochemical properties. *Soc Neurosci Abstr.*33:391.18.

Eberhorn AC, Ardeleanu P, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2005. Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *J Comp Neurol* 491:352-366.

Eberhorn AC, Horn AKE, Eberhorn N, Fischer P, Boergen KP, Büttner-Ennever JA. 2005. Palisade endings in extraocular eye muscles revealed by SNAP-25 immunoreactivity. *J Anat* 206:307-315.

Fuchs AF, Luschei ES. 1971. Development of isometric tension in simian extraocular muscle. *J Physiol* 219:155-166.

Fuchs AF, Scudder CA, Kaneko CR. 1988. Discharge patterns and recruitment order of identified motoneurons and internuclear neurons in the monkey abducens nucleus. *J Neurophysiol* 60:1874-1895.

Gamlin PDR, Zhang YH, Clendaniel RA, Mays LE. 1994. Behaviour of identified Edinger-Westphal neurons during oculomotor accommodation. *J Neurophysiol* 72:2368-2382.

Gomez-Segade LA, Labandeira-Garcia JL. 1983. Location and quantitative analysis of the motoneurons innervating the extraocular muscles of the guinea-pig, using horseradish peroxidase (HRP) and double or triple labelling with fluorescent substances. *J Hirnforsch* 24:613-626.

Greene T, Jampel R. 1966. Muscle spindles in the extraocular muscles of the macaque. *J Comp Neurol* 126:547-549.

Härtig W, Brauer K, Bigl V, Brückner G. 1994. Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Res* 635:307-311.

Härtig W, Brauer K, Brückner G. 1992. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* 3:869-872.

Harker DW. 1972. The structure and innervation of sheep superior rectus and levator palpebrae extraocular muscles. II. Muscle spindles. *Invest Ophthalmol* 11:970-979.

Hobohm C, Härtig W, Brauer K, Brückner G. 1998. Low expression of extracellular matrix components in rat brain stem regions containing modulatory aminergic neurons. *J Chem Neuroanat* 15:135-142.

Hockfield S, Kalb RG, Zaremba S, Fryer H. 1990. Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* 55:505-514.

Horn AKE, Brückner G, Härtig W, Messoudi A. 2003. Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J Comp Neurol* 455:341-352.

Horn AKE, Büttner-Ennever JA. 1998. Premotor neurons for vertical eye-movements in the rostral mesencephalon of monkey and man: the histological identification by parvalbumin immunostaining. *J Comp Neurol* 392:413-427.

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

Horn AKE, Büttner-Ennever JA, Wahle P, Reichenberger I. 1994. Neurotransmitter profile of saccadic omnipause neurons in nucleus raphe interpositus. *J Neurosci* 14:2032-2046.

Ishikawa S, Sekiya H, Kondo Y. 1990. The center for controlling the near reflex in the midbrain of the monkey: a double labelling study. *Brain Res* 519:217-222.

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

Johnson JK, Casagrande VA. 1995. Distribution of calcium-binding proteins within the parallel visual pathways of a primate (*Galago crassicaudatus*). *J Comp Neurol* 356:238-260.

Kaczmarek F. 1974. Motor end-plates in the extraocular muscles of small mammals. *Acta Anat (Basel)* 89: 372-386.

Khanna S, Porter JD. 2001. Evidence for rectus extraocular muscle pulleys in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1986-1982.

Konacki KZ, Streicher J, Hoetzenecker W, Blumer MJ, Lukas JR, Blumer R. 2005. Molecular characteristics suggest an effort function of palisade endings in extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:155-165.

Konacki KZ, Streicher J, Hoetzenecker W, Haberl I, Blumer MJ, Wieczorek G, Meingassner JG, Paal SL, Holzinger D, Lukas JR, Blumer R. 2005. Palisade Endings in Extraocular Muscles of the Monkey are Immunoreactive for Choline Acetyltransferase and Vesicular Acetylcholine Transporter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:4548-4554.

Labandeira Garcia JL, Gomez Segade LA, Suarez Nunez JM. 1983. Localisation of motoneurons supplying the extra-ocular muscles of the rat using horseradish peroxidase and fluorescent double labelling. *J Anat* 137:247-261.

Lennerstrand G, Nichols KC. 1977. Morphology of motor units in cat extraocular nodule. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 55: 913-918.

- Ling L, Fuchs AF, Phillips JO, Freedman EG. 1999. Apparent dissociation between saccadic eye movements and the firing patterns of premotor neurons and motoneurons. *J Neurophysiol* 82:2808-2811.
- Loewy AD, Saper CB. 1978. Edinger-Westphal nucleus: Projections to the brain stem and spinal cord in the cat. *Brain Res* 150:1-27.
- Loewy AD, Saper CB, Yamodis ND. 1978. Reevaluation of the efferent projections of the Edinger-Westphal nucleus in the cat. *Brain Res* 141:153-159.
- Lukas JR, Blumer R, Denk M, Baumgartner I, Neuhuber W, Mayr R. 2000. Innervated myotendinous cylinders in human extraocular eye muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2422-2431.
- Maciewicz R, Phipps BS. 1983. The oculomotor internuclear pathway: a double retrograde labeling study. *Brain Res* 262:1-8.
- Matsui F, Nishizuka M, Oohira A. 1999. Proteoglykans in perineuronal nets. *Acta Histochem Cytochem* 32:141-147.
- May PJ, Porter JD, Gamlin PDR. 1992. Interconnections between the primate cerebellum and midbrain near-response region. *J Comp Neurol* 315: 98-116.
- Mayr R, Gottschall J, Gruber H, Neuhuber W. 1975. Internal structure of cat extraocular muscle. *Anat Embryol* 148:25-34.
- Morawski M, Bruckner MK, Riederer P, Bruckner G, Arendt T. 2004. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol* 188:309-315.
- Morgan DL, Proske U. 1984. Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties. *Physiol Rev* 64:103-138.
- Morris NP, Henderson Z. 2000. Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex. *Eur J Neurosci* 12:828-838.
- Namba T, Nakamura T, Takahashi A, Grob D. 1968. Motor nerve endings in extraocular muscles. *J Comp Neurol* 134: 385-396.

Nelson JS, Goldberg SF, McClung JR. 1986. Motoneuron electrophysiological and muscle contractile properties of superior oblique motor units in cat. *J Neurophysiol* 55:715-726.

Nguyen LT, Spencer RF. 1999. Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: neurotransmitters. *J Comp Neurol* 411:73-86.

Oh SY, Poukens V, Cohen MS, Demer JL. 2001. Structure-function correlation of laminar vascularity in human rectus extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:17-22.

Oh SY, Poukens V, Demer JL. 2001. Quantitative analysis of rectus extraocular muscle layers in monkey and human. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 42:10-16.

Okamoto M, Mori S, Endo H. 1994. A protective action of chondroitin sulphate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate. *Brain Res* 637:57-67.

Olszewski J, Baxter D. 1982. *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem*. Karger, Basel, 199.

Pedrosa-Domellöf F, Soukop T, Thornell LE. 1991. Rat muscle spindle immunocytochemistry revisited. *Histochemistry* 96:327-338.

Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. 1995. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. *Surv Ophthalmol* 39:451-484.

Porter JD, Poukens V, Baker RS, Demer JL. 1996. Structure-function correlations in the human medial rectus extraocular muscle pulleys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:468-472.

Robinson DA. 1970. Oculomotor unit behavior in the monkey. *J Neurophysiol* 38:393-404.

Robinson DA. 1991. Overview, in vision and vision dysfunction. In: *Eye movements* (Carpenter RHS, ed), pp 320-331. Boca Raton: CRC Press.

Rost GK. 1990. Separate populations in the oculomotor nucleus project to the cerebellum and the abducent nucleus. A retrograde fluorescent double-labelling study in the cat. *Arch Ital Biol* 128:47-53.

Ruskell GL. 1979. The incidence and variety of Golgi tendon organs in extraocular muscles of the rhesus monkey. *J Neurocytol* 8:639-653.

Ruskell GL. 1989. The fine structure of human extraocular muscle spindles and their potential proprioceptive capacity. *J Anat* 167:199-214.

Ruskell GL. 1990. Golgi tendon organs in the proximal tendon of sheep extraocular muscles. *Anat Rec* 227: 25-31.

Ruskell GL. 1999. Extraocular muscle proprioceptors and proprioception. *Prog Retin Eye Res* 18:269-291.

Ruskell GL, Kjellevoid Haugen I, Bruenech JR, van der Werf F. 2005. Double insertions of extraocular rectus muscles in humans and the pulley theory. *J Anat* 206:295-306.

Ryabinin AE, Tsivkovskaia NO, Ryabinin SA. 2005. Urocortin 1-containing neurons in the human Edinger-Westphal Nucleus. *J Neurosci* 134:1317-1323.

Sayed R, Mubarak W, Ohtsuka A, Atoji Y, Murakami T. 2005. Perineuronal Nets in the Central Nervous System. *Anat Histol Embryol* 34:45.

Scinto LF, Frosch M, Wu CK, Daffner KR, Gedi N, Geula C. 2001. Selective cell loss in edinger-westphal in asymptomatic elders and Alzheimer's patients. *Neurobiol Aging* 22:729-736.

Scinto LF, Wu CK, Firla KM, Daffner KR, Saroff D, Geula C. 1999. Focal pathology in the Edinger-Westphal nucleus explains pupillary hypersensitivity in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 97:557-564.

Seeger G, Brauer K, Härtig W, Brückner G. 1994. Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *J Neurosci* 58:2371-2388.

Sekiya H, Kawamura K, Ishikawa S. 1984. Projections from the Edinger-Westphal complex of monkey as studied by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Arch Ital Biol* 122:311-319.

Shall MS, Dimitrova DM, Goldberg SJ. 2003. Extraocular motor unit and whole-muscle contractile properties in the squirrel monkey. *Exp Brain Res* 151:338-345.

Siebeck R, Kruger P. 1955. The histological structure of the extrinsic ocular muscle as an indication of their function. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol* 156: 636-652.

Spencer RF, Porter JD. 1981. Innervation and structure of extraocular muscles in the monkey in comparison to those of the cat. *J Comp Neurol* 198:649-665.

Spencer RF and Porter JD. 1988. Structural organization of the extraocular muscles. In Büttner-Ennever JA, editor. *Neuroanatomy of the oculomotor system*. Amsterdam; New York; Oxford; Elsevier. p 33-79.

Spencer RF and Porter JD. 2006. Biological organization of the extraocular muscles. *Prog Brain Res*. 151:43-80

Steinbach MJ. 2000. The palisade ending: an afferent source for eye position information in humans. In: Lennerstrand G, Ygge J, Laurent T, editors. *Advances in strabismus research: basic and clinical aspects*. London. Portland Press:33-42.

Sugimoto T, Itoh K, Mizuno N. 1978. Direct projections from the Edinger-Westphal nucleus to the cerebellum and the spinal cord of the cat. *Neurosci Lett* 7:301-305.

Sun WS, May PJ. 1993. Organization of the extraocular and preganglionic motoneurons supplying the orbit in the lesser galago. *Anat Rec* 237:89-103.

Ugolini G, Klam F, Doldan Dans M, Dubayle D, Brandi AM, Büttner- Ennever J, Graf W. 2006. Horizontal eye movement networks in primates as revealed by retrograde transneuronal transfer of rabies virus: Difference in monosynaptic input to “slow” and “fast” abducens motoneurons. *J Comp Neurol* 498:762-785.

Vasconcelos LAP, Donaldson C, Sita LV, Casatti CA, Lotfi CFP, Wang I, Cadinouche MZA, Frigo L, Elias CF, Lovejoy DA, Bittencourt JC. 2003. Urocortin in the central

nervous system of a primate (*Cebus apella*): Sequencing, immunohistochemical, and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 463:157-175.

Wasicky R, Ziya-Ghazvini F, Blumer R, Lukas JR, Mayr R. 2000. Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:980-90.

Wong-Riley, MT. 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12:94-101.

Wasicky R, Horn AKE, Büttner-Ennever JA. 2004. Twitch and non-twitch motoneuron subgroups of the medial rectus muscle in the oculomotor nucleus of monkeys receive different afferent projections. *J Comp Neurol* 479: 117-129.

Yamaguchi Y. 2000. Lecticans. Organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57:276-289.

## 7 Anhang zu Material und Methoden

### Lösungen

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

**Lösung A:** 1500 ml aqua dest. auf 60°C erwärmen

+ 120 g Paraformaldehyd langsam unter Rühren dazugeben

+ 5 Tropfen 40% NaOH

anschließend filtrieren

**Lösung B:** 1500 ml 0,2M PBS, pH 7,4

Lösung A + Lösung B kurz vor Gebrauch zusammengeben.

PH-Wert auf 7,4 einstellen.

Gesamtlösung im Kühlschrank aufbewahren.

- **0,9% NaCl-Lösung**

1 L = 9 g NaCl in 1000 ml aqua dest.; Aufbewahrung im Kühlschrank

- **Sucroselösung**

10%ig: 50 g Sucrose in 500 ml 0,1M PBS, pH 7,4

20%ig: 100 g Sucrose in 500 ml 0,1M PBS, pH 7,4

30%ig: 150 g Sucrose in 500 ml 0,1M PBS, pH 7,4

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

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

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

Lösung A + Lösung B kurz vor Gebrauch zusammengeben, pH 7,4 einstellen

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

- 72,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 13,1 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 40 g NaCl
- 1 g KCl

→ in 5 L aqua dest. lösen und pH 7,4 einstellen

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

- 60,57 g Trizma Base in 800 ml aqua dest. Lösen
- mit 37% HCl pH 7,6 einstellen
- mit aqua dest. auf 1 L auffüllen

- **Acetatpuffer 0,2M, pH 3,3** ( für die TMB-Reaktion zum WGA-HRP- Nachweis)

- 27,2 g Natriumacetat in 800 ml aqua dest. lösen
- mit 0,5M HCl auf pH 3,3 einstellen
- mit aqua dest. auf 1 L auffüllen

## Protokolle

- **DAB-Reaktion für Immunhistochemie**

0,05% DAB + 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,1M PBS, pH 7,4 10-15 min  
3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

- **Intensivierte DAB-Reaktion für Immunhistochemie ( nach Hancock, 1984)**

**mit Nickel:**

0,05% DAB = 1 ml 1%DAB-Lösung + 100 ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5-10 min  
+ 18,9 ml 0,05M TBS, pH 8,90 + 40 mg Ammonium-Nickel

3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

- **Rabbit anti-CSPG + DAB**

CSPG = Chondroitin Sulphate Proteogly: Biogenesis: 2083-5005

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

**Sodium Citrat-Puffer:** ( Demaskierung der Paraffinschnitte im Wasserbad bei 80°C),  
0,01M, pH 8,5 – 9,0

- 2,94g Sodium Citrat
- 1000 ml aqua dest.
- mit 0,1M NaOH auf pH 8,5 – 9,0 einstellen

**\* Entparaffinierung und Rehydrierung:**

- Xylol 2 mal 15 min
- absteigende Alkoholreihe: jeweils 10 min
  - 100%
  - 96%
  - 90%
  - 70%
- Waschen: 0,01M Natrium Citrat-Puffer, pH 8,8 15 min im Wasserbad bei +80°C  
anschließend im Citrat-Puffer ca. 15 min bei RT abkühlen lassen
- Schnitte in aqua dest. spülen
- Schnitte in 0,1M PBS, pH 7,6 spülen 2 mal 10 min

**Immunhistochemie**

**1.Tag**

**\*Peroxidaseblockierung:** 15 min

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS/10% Methanol  
[1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 ml Methanol + 8 ml PBS]

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

**\* Präinkubation:** 1h bei RT

2% Normal Goat Serum (NGS) + 0,3% Triton in 0,1M PBS, pH 7,4

[200 µl NGS + 10 ml (0,3% Triton in PBS)]

**\* 1. Antikörper:** über Nacht auf Schüttler bei RT

rabbit anti-CSPG 1:5000  
[2 µl AK in 10 ml PBS, pH 7,4]

**2.Tag**

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

**\*2.Antikörper:**

1h bei RT

biotinyliertes goat anti-rabbit 1.200

[50 µ AK in 10 ml PBS, pH 7,4]

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

**\*ABC-Kit oder EPA:**

1h bei RT

- EPA: Extravidin-Peroxidase 1:1000

[10 µl in 10 ml]

oder

- ABC-Kit: Ansetzen

1 Tropfen A + 1 Tropfen B je 5 ml 0,1 M PBS, pH 7,4

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

-1 mal in 0,1M TBS, pH 7,6 waschen 10 min

**\*DAB-Reaktion:**

5-10 min

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

**ohne Nickel:**

0,05% DAB = 1 ml 1%DAB-Lösung + 100 ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 18,9 ml 0,05M TBS, pH 8,0

**mit Nickel:**

0,05% DAB = 1 ml 1%DAB-Lösung + 100 ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 18,9 ml 0,05M TBS, pH 8,0

+ 40 mg Ammonium-Nickel

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

- **Wisteria floribunda agglutinin**

WFA = Wisteria floribunda agglutinin: Sigma: L 1766

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

Gefrierschnitte 40 µm oder Vibratomschnitte

### 1. Tag

**\*Peroxidaseblockierung:** 15 min

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS/10% Methanol

[1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 ml Methanol + 8 ml PBS]

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

**\* Hauptinkubation:** über Nacht bei 4°C

WFA 1:1000

[10 µl in 10 ml 0,1M PBS, pH 7,4]

### 2. Tag

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

**\*EPA:** 1h bei RT

- EPA: Extravidin-Peroxidase 1:1000

[10 µl in 10 ml]

-2 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

-1 mal in 0,05M TBS, pH 8,0 waschen 10 min

**\*DAB-Reaktion:** 5-10 min

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

**mit Nickel:**

0,05% DAB = 1 ml 1%DAB-Lösung + 100 ml 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 18,9 ml 0,05M TBS, pH 8,0  
+ 40 mg Ammonium-Nickelsulfat

-3 mal in 0,1M PBS, pH 7,4 waschen je 10 min

• Nisslfärbung für Gefrierschnitte

\* **Farblösung:** 0,5g Kresylviolett in 100 ml aqua dest., pH 7,4

\* **Entfetten:**

- aufsteigende Alkoholreihe:	- 70%	<u>jeweihs 5 min</u>
	- 90%	
	- 96%	
	- 100%	
- Xylol		<u>2 mal 10 min</u>
- absteigende Alkoholreihe:	- 100%	<u>jeweihs 5 min</u>
	- 96%	
	- 90%	
	- 70%	
-aqua dest.		<u>5 min</u>

**Farblösung:** 5 – 10 min

2 Tropfen Eisessig in 100 ml aqua dest. 1 min

- aufsteigende Alkoholreihe:	- 70%	<u>jeweihs 5 min</u>
	- 90%	
	- 96% (Abwarten, bis Färbung hell genug)	
	- 100%	
- Isopropanol		<u>2 mal 5 min</u>

- Xylol 2 mal 15 min
- Eindeckeln in DPX

- **Nisslfärbung für Gefrierschnitte**

\* **Farblösung:** 0,5g Kresylviolett in 100 ml aqua dest., pH 7,4

\* **Entfetten:**

- Xylol 2-3 mal 15 min
- absteigende Alkoholreihe:
  - 100% jeweils 10 min
  - 96%
  - 90%
  - 70% (über Nacht, falls nötig)
- aqua dest. 2 mal 5 min
- **Farblösung:** 5 – 10 min
- 2 Tropfen Eisessig in 100 ml aqua dest. 1 min
- aufsteigende Alkoholreihe:
  - 70% jeweils 5 min
  - 90%
  - 96% (Abwarten, bis Färbung hell genug)
  - 100%
- Isopropanol 2 mal 5 min
- Xylol 2 mal 15 min
- Eindeckeln in DPX

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematisierte Ansicht der Augenmuskeln beim Menschen	1
Abbildung 2:	Orbitale und globale Schicht des Augenmuskels	3
Abbildung 3:	Schematisierte Lateralansicht eines Affenhirns	7
Abbildung 4:	Nissl-gefärbte Neurone mit perineuronalen Netzen	9
Abbildung 5:	Schematische Darstellung eines Augenmuskels	11
Abbildung 6:	Schematisierte Ansicht des humanen Hirnstamms	17
Abbildung 7:	Transversalschnitt durch den Ncl. oculomotorius	21
Abbildung 8:	Frontalschnitt des III mit retrograd markierten Motoneuronen	22
Abbildung 9:	Frontalschnitte durch IV und III, Affe, CSPG und Nissl	24
Abbildung 10:	Frontalschnitte rostraler III, Affe, Nissl	25
Abbildung 11:	Frontalschnitte durch IV und III, Mensch, CSPG und Nissl	26
Abbildung 12:	Plots von Frontalschnitten des IV und III, Mensch	27
Abbildung 13:	Zusammenfassende Übersicht der identifizierten Neurone	29

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

---

Name: Patricia Ardeleanu  
Geburtsdatum/Ort: 21.01.1976 in Alzenau  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Werdegang

---

1982 - 1986                      Grundschule St. Ursula, Augsburg

1986 - 1995                      Maria-Theresia-Gymnasium, Augsburg

1995 – 1998                      Vorklinisches Studium der Humanmedizin  
an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

1998 - 2002                      Klinisches Studium der Humanmedizin an der Ludwig-  
Maximilians-Universität, München

Seit 2002                         Anstellung als Assistenzärztin im Rotkreuz-Krankenhaus,  
München