

Verteilung der  
calciumbindenden Proteine  
Calbindin<sub>D28k</sub> und Calretinin  
in der afferenten Hörbahn  
des Huhns  
*Gallus gallus f. domestica*

Jan Schulz  
Nelkenstraße 1  
30167 Hannover  
Tel.: 0511-714392  
[Jan.Schulz@WizArtsInf.de](mailto:Jan.Schulz@WizArtsInf.de)

Present address:  
Jan Schulz  
Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research  
Columbusstraße  
27568 Bremerhaven  
Tel.: +49 (0471) 4831-1313  
[www.awi-bremerhaven.de](http://www.awi-bremerhaven.de)

In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
AVCN	Anteroventraler cochleärer Nucleus
Ca	Calcium
CaBP	Calciumbindende Proteine
CB	Calbindin <sub>D28k</sub>
CR	Calretinin
DAB	Diaminobenzidin
FLM	Fasciculi longitudinalis medialis
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HK	Hühnerküken
IC	Colliculus inferior
IID	Intensitätsunterschied zwischen den Ohren (Interaural intensity difference)
Ipc	Nucleus istmi, pars parvocellularis
IR	Immunreaktivität
ITD	Laufzeitunterschied zwischen den Ohren (Interaural time difference)
LL	Nucleus lemniscus lateralis
LLi	Nucleus lemniscus lateralis, pars intermedia
LLv	Nucleus lemniscus lateralis, pars ventralis
MLd	Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis
MSO	Oliva superior medialis
NA	Nucleus angularis
NL	Nucleus laminaris
NM	Nucleus magnocellularis cochlearis
NVIII	Nervus octavus
NVIIIc	Nervus octavus, pars cochlearis
NVIIIv	Nervus octavus, pars vestibularis
NGS	Normal Goat Serum
OS	Nucleus olivaris superior
P	Nach dem Schlupf; engl. posthatch; nachfolgend Alter in Tagen
PB	Phosphat Puffer
PBS	Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt
PTX	Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt und Triton X100
PVCN	Posteroventraler cochleärer Nucleus
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Uptake Protein
SGFPv	Stratum griseum et fibrosum periventriculare
SLU	Nucleus semilunaris
Swant	Swiss Antibodies
TIFF	Tagged Image File Format
VED	Nucleus vestibularis descendens
VEL	Nucleus vestibularis lateralis
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur die in dieser Arbeit verzeichneten Hilfen verwendet habe.

Hannover, den 01.02.2001

Jan Schulz

Gutachter:

1. Prüfer : Frau Prof. Dr. E. Zimmermann
2. Prüfer : Herr Prof. Dr. K. Wächtler

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
1.1 CALCIUMBINDENDE PROTEINE .....	6
1.2 CALCIUMBINDENDE PROTEINE IM ZNS DER VERTEBRATEN .....	10
1.3 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>12</b>
2.1 TIERE UND TIERART .....	12
2.2 ANÄSTHESIE .....	13
2.3 PERFUSION .....	13
2.4 PRÄPARATION .....	14
2.5 SCHNEIDEN DER PRÄPARATE .....	14
2.6 IMMUNHISTOCHEMISCHE BEARBEITUNG DER PROBEN .....	16
2.7 AUFZIEHEN DER SCHNITTE AUF OBJEKTTRÄGER .....	19
2.8 MIKROSKOPIE UND BILDVERARBEITUNG .....	19
2.9 ZELLZÄHLUNGEN UND STATISTIK .....	20
2.10 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....	22
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>23</b>
3.1 IMMUNREAKTIVITÄT DER EINZELNEN KERNGEBIETE .....	23
3.1.1 <i>Nucleus angularis</i> .....	24
3.1.1.1 Calretinin .....	24
3.1.1.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	27
3.1.2 <i>Nucleus magnocellularis cochlearis</i> .....	28
3.1.2.1 Calretinin .....	28
3.1.2.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	33
3.1.3 <i>Akzessorisches Kerngebiet dorsolateral des NM</i> .....	33
3.1.3.1 Calretinin .....	34
3.1.3.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	36
3.1.4 <i>Nucleus laminaris</i> .....	36
3.1.4.1 Calretinin .....	36
3.1.4.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	38
3.1.5 <i>Nucleus olivaris superior</i> .....	39
3.1.5.1 Calretinin .....	39
3.1.5.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	41
3.1.6 <i>Nucleus lemniscus lateralis</i> .....	42
3.1.6.1 Calretinin .....	42
3.1.6.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	44
3.1.7 <i>Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis</i> .....	44
3.1.7.1 Calretinin .....	44
3.1.7.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	47
3.2 FASERVERBINDUNGEN ZWISCHEN DEN EINZELNEN KERNGEBIETEN .....	47
3.2.1 <i>Einlaufende Fasern des Hörnerven und Innenohr</i> .....	47
3.2.1.1 Calretinin .....	48
3.2.1.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	48
3.2.2 <i>Kreuzende Fasern vom Nucleus magnocellularis cochlearis der ipsi- und kontralateralen Seite</i> .....	50
3.2.2.1 Calretinin .....	50
3.2.2.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	50
3.2.3 <i>Fasern vom Nucleus laminaris in Richtung Nucleus olivaris superior, ipsilateral</i> .....	50
3.2.3.1 Calretinin .....	50
3.2.3.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	52
3.2.4 <i>Kreuzende Fasern der Olive der ipsi- und kontralateralen Seite</i> .....	52
3.2.4.1 Calretinin .....	52
3.2.4.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	53
3.2.5 <i>Fasern zum Lateralen lemniscus</i> .....	53
3.2.6 <i>Fasern vom Nucleus lemniscus lateralis zum MLD</i> .....	53
3.2.6.1 Calretinin .....	53

3.2.6.2 Calbindin <sub>D28k</sub> .....	53
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
4.1 SPEZIFITÄT DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER .....	55
4.2 IMMUNREAKTIONEN DER PRÄPARATE .....	57
<i>Übersicht über die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten in Bezug auf CaBP's</i> .....	57
<i>Papilla basilaris und NVIII</i> .....	59
<i>Nucleus angularis</i> .....	59
<i>Nucleus magnocellularis cochlearis</i> .....	61
<i>Akzessorisches Kerngebiet</i> .....	64
<i>Nucleus laminaris</i> .....	65
<i>Nucleus olivaris superior</i> .....	67
<i>Nucleus lemniscus lateralis</i> .....	67
<i>Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis</i> .....	68
4.3 VERGLEICHE MIT ANDEREN ARTEN .....	70
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>6. LITERATURNACHWEISE .....</b>	<b>76</b>
<b>ANHANG A; VERWENDETE LÖSUNGEN .....</b>	<b>83</b>
<i>ABC-Peroxidase Inkubation</i> .....	83
<i>Acetat-Imidazol-Puffer, pH 7.2</i> .....	83
<i>Antikörper-Inkubation, primärer, 3% NGS, 10mM PBS</i> .....	83
<i>Antikörper-Inkubation, sekundärer, 3%NGS, 10mM PBS</i> .....	83
<i>Diaminobenzidin-Entwicklerlösung, blau, Imidazol, aus DAB-Stammlösung</i> .....	83
<i>Entkalkungslösung, schonend</i> .....	83
<i>Gelatine zur Einbettung</i> .....	83
<i>Gelatine-Chromalaunlösung für Objektträgerbeschichtung</i> .....	83
<i>Imidazolösung, 0.2M</i> .....	83
<i>PB, Phosphatpuffer, 0.1M, pH 7,4</i> .....	83
<i>PBS, Phosphatpuffer, 10 mM, pH 7,4</i> .....	83
<i>PTX, Phosphatpuffer mit 0.05% Detergenz und 8.5g NaCl auf 1000ml H<sub>2</sub>O, pH 7,4</i> .....	83
<i>Perfusions-Fixierlösung</i> .....	83
<i>Perfusions-Spüllösung</i> .....	83
<i>TRIZMA, 1 M, pH 7,2</i> .....	83
<i>Wasserstoffperoxid-Inkubation, 0.3% in 10mM PBS</i> .....	83
<b>ANHANG B; BILDNACHWEISE .....</b>	<b>84</b>
<b>ANHANG C; DANKSAGUNG .....</b>	<b>85</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Calciumbindende Proteine

Gegenüber anderen Metallionen besitzt Calcium sehr hohe Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation seiner Komplexe [EIGEN und HAMMES, 1963]. Es ist dadurch prädestiniert für die Steuerung von rasch ablaufenden Vorgängen innerhalb von Zellen. Bei vielen eukaryotischen Übertragungsprozessen besitzt es deshalb eine wichtige Schlüsselrolle als intrazellulärer Mediator. Durch die relativ geringe Größe gegenüber organischen Molekülen besitzt es zudem die Fähigkeit, relativ schnell im Zellmedium zu diffundieren.

Obgleich Calciumionen bei transmembranen Signalwegen und intrazellulären Übermittlungen eine Schlüsselrolle spielen [BAIMBRIDGE et al., 1992], stellen sie nicht den einzigen Akteur, sondern agieren mit einer Vielzahl von Proteinen. Durch die Fähigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$  mehrere Liganden mit vorzugsweise negativen Ladungswolken asymmetrisch zu binden, ist es in der Lage Proteinabschnitte quer zu vernetzen und große Konfigurationsänderungen hervorzurufen [STRYER, 1996].

Calcium, das innerhalb der Euzyte nicht in einer homogenen Verteilung vorliegt, ist stets in Speichern der Zelle gesammelt und wird nur zur Regulation von Zellaktivitäten ins Cytosol entlassen [z.B. BLAUSTEIN, 1988]. Die größten Calciumspeicher der Zelle sind unter anderem das endoplasmatische Retikulum, das sarkoplasmatische Retikulum im Muskel sowie Mitochondrien und Calciosomen [MELDOLESI et al., 1988; MILLER, 1992]. Die intrazellulären Calciumspeicher können dabei sowohl als Quelle, als auch als Senke des Spiegels dienen [SIMPSON et al., 1995].

Diese Funktionen werden dabei in vielen Fällen von Proteinen moduliert. Proteine, die speziell mit dem Calcium in Wechselwirkung treten können, werden als calciumbindende Proteine (CaBP) bezeichnet.

Auf eine Erregung der Zelle hin wird das freie Ion aus den Speichern ausgeschüttet und greift je nach Zelle in unterschiedlicher Weise in den Metabolismus ein. Dabei dient es unter anderem als ‚Second Messenger‘ bei der Ankopplung vieler interzellulärer Prozesse an die Membranerregung [SHEPHERD, 1988] von G-Proteinen. Parallel dazu existieren Interaktionen mit weiteren Systemen von ‚Second Messenger‘ Kaskaden. So ist bekannt, daß  $\text{Ca}^{2+}$  als Aktivator der cAMP-Phosphodiesterase auftreten und somit in die Kontrolle der cAMP-Konzentration eingreifen kann [KARLSON, 1988].

Durch die vielfältigen Funktionen die Calcium innehat, ist es wichtig, daß die Zelle den Calciumspiegel niedrig hält und die Homeostasis bewahrt. Der geringen intrazellulären Konzentration

ration kommt dabei eine Schutzfunktion zu, die dafür sorgt, daß die Zelle keinen Schaden durch endogene Substanzen erleidet [KRETSINGER, 1976]. So sind zum Beispiel viele Proteasen nur in Gegenwart der hohen extrazellulären Calciumkonzentrationen aktiv. Andere autolytischen sogar unter einem zu geringen Calciumspiegel. Deutlich zeigt sich dies auch an der Schädigung von Herzmuskelzellen, wenn infolge eines Infarktes unkontrolliert Calciumionen einströmen [FLECKENSTEIN, 1983]. Die hohe und allgegenwärtige Konzentration von Phosphat und einigen anderen Ionengruppen erhöht auch die Gefahr, daß schwer lösliche Salze ausfallen. Aus diesem Grund existieren Mechanismen, die den niedrigen Spiegel an freien Calciumionen von etwa 100nM im unerregten Zustand gegenüber der mehr als 1000fach höheren [STRYER, 1996] extrazellulären Konzentration aufrecht erhalten. Hierbei spielen CaBP's eine wichtige Rolle im Zellgeschehen.

Innerhalb des Blutes liegt Calcium jedoch nur zu einem geringen Teil in der Form des freien, diffusiblen Ions vor. Der weitaus größere Teil ist in Proteinbindungen assoziiert, wodurch es möglich ist eine Gesamtkonzentration von bis zu  $5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  aufrecht zu erhalten, ohne daß hier schwer lösliche Calciumsalze ausfallen [KARLSON, 1988; STRYER, 1996]. Zudem existiert ein Netzwerk von Interaktionen zwischen Calcium und Phosphat [WILLIAMS, 1990], um zum Beispiel die Homeostasis aufrecht zu erhalten.

Weiterhin ist Calcium direkt beteiligt an der Exocytose [SHEPHERD, 1988; KNIGHT et al., 1989; BURGOYNE und MORGAN, 1995], der Langzeitpotenzierung (LTP) bei neuronalen Lernvorgängen [KENNEDY, 1989; MALENKA et al., 1989; KANDEL und HAWKINS, 1992; EDWARDS, 1995] sowie der Modulierung der Eigenschaften von Neuronen [NAHORSKI, 1988; MARTY, 1989; KENNEDY, 1989; BAIMBRIDGE et al., 1992] und der Steuerung calciumabhängiger Membrankanäle [MARTY, 1989]. Zudem spielt es eine entscheidende Rolle bei der Modulierung lang anhaltender Impulse und der Transmitterfreisetzung an Synapsen [SHEPHERD, 1988; KANDEL und HAWKINS, 1992].

Viele Proteine, die Calciumionen binden können, zeichnen sich dabei durch eine besondere Struktur aus. Diese besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices, E und F, die über eine Schleife aus mehreren Aminosäuren miteinander verbunden sind [PERSECHINI et al., 1989]. Diese Schleife stellt dabei die Koordinationsstelle zum Binden von Calcium. Räumlich sind diese so angeordnet, als wenn man von der geschlossenen rechten Hand Daumen und Zeigefinger abspreizen würde. Der Daumen entspricht der F-Helix, der Zeigefinger der E-Helix und die Mulde zwischen der Daumenmaus und dem gekrümmten Mittelfinger bildet eine unregelmäßig geformte Koordinationsstelle für das Calciumion [STRYER, 1996]. In der Nähe der Koordinationsstelle, die aus nur 30 Aminosäuren gebildet wird, sind dabei sechs Sauerstoffatome lokalisiert [KRETSINGER,

1987]. Durch diese Homologie wird die gesamte Struktur EF-Hand genannt und die zugehörigen Proteine entsprechend EF-Hand Proteine. Die calciumbindenden Domänen, welche zu mehreren in einem Protein vorhandenen sein können, gehen dabei vermutlich auf ein einzelnes Vorfahren zurück [PERRET et al., 1990]. Nach der ‚Exon shuffling theory‘ [GILBERT, 1978] sind daraus vermutlich die einzelnen Entwicklungszweige der Proteine entstanden [PERRET et al., 1990].

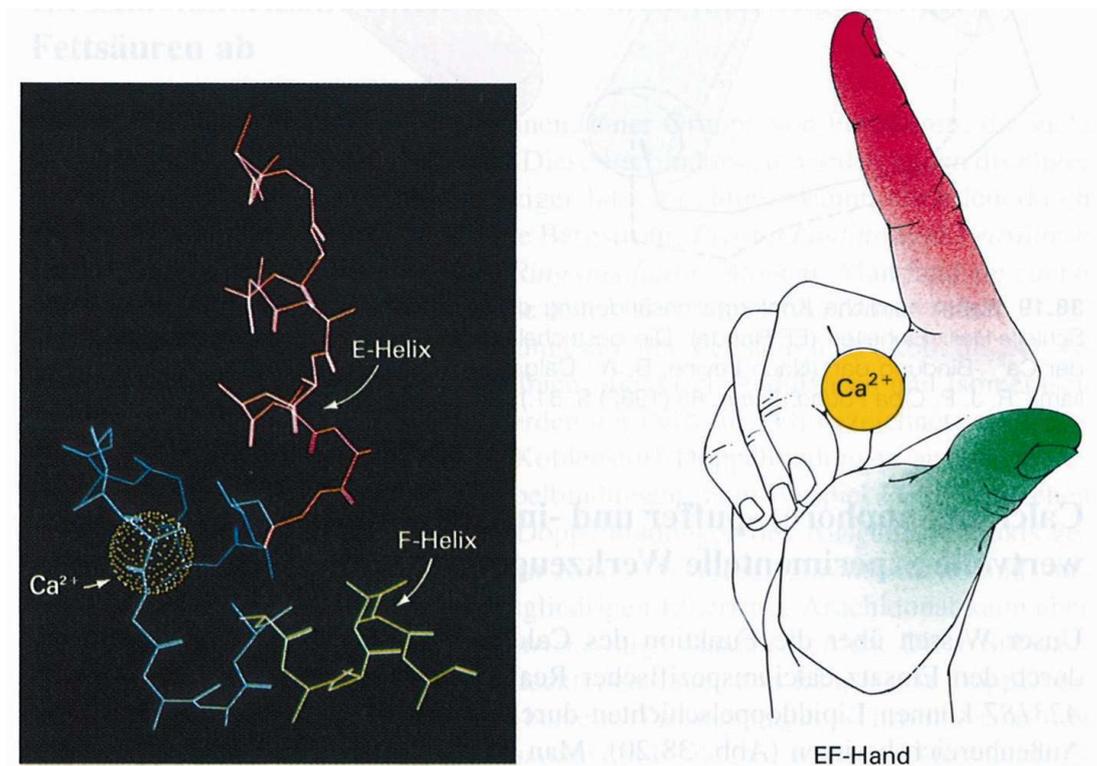


Abbildung 1.1: Das Strukturprinzip einer Calciumbindestelle von calciumbindenden Proteinen der EF-Hand Familie. Diese wird aus einer hochkonservierten Helix-Schleife-Helix Einheit gebildet, die allen Proteinen dieser Familie gemein ist (Abbildung entnommen und verändert aus STRYER, 1996).

Bis heute sind bereits über 160 verschiedene Proteine dieser Familie identifiziert, die sich größtenteils in 10 Subfamilien untergliedern lassen [PERSECHINI et al., 1989]. Innerhalb von Zellen können diese in unterschiedlichen Vergesellschaftungen auftreten. Eine Vielzahl sind bereits im zentralen Nervensystem der Vertebraten nachgewiesen [z.B. JANDE et al., 1981; PERSECHINI et al., 1989; ROGERS, 1989; ROGERS et al., 1990; BAIMBRIDGE et al., 1992], wobei viele neuronale Subpopulationen allerdings nur bestimmte CaBP's exprimieren [BAIMBRIDGE et al., 1992]. Auch als Komponenten des Cytoskeletts sind sie beschrieben [SCHLEICHER et al., 1990].

Eine Störung des Vorkommens dieser Proteine steht vermutlich in direktem Zusammenhang mit vielen humanpathogenen, neurodegenerativen Krankheiten [HEIZMANN und BRAUN, 1992]. Ebenfalls wird ein Zusammenhang mit dem Down-Syndrom vermutet, bei dem auf

dem fehlerhaften Chromosom 21 die Information für eine Untereinheit des S-100 Proteins kodiert ist [ALLORE et al., 1988], welches in Gliazellen abundant ist [HEIZMANN und BRAUN, 1992].

Obleich die genaue Funktion der CaBP's bis heute noch nicht geklärt ist, legen die Verteilungsmuster nahe, daß sie nicht an den grundlegenden Eigenschaften von Neuronen beteiligt sind, wohl aber die Eigenschaften einzelner neuronaler Subtypen mitbestimmen [BAIMBRIDGE et al., 1992]. Gleichzeitig muß jedoch bemerkt werden, daß der hohe Konservierungsgrad [PARMENTIER, 1990; ROGERS et al., 1990] sowie ihr Zusammenhang mit einzelnen Krankheiten die Vermutung nahe legt, daß sie neben dem Puffern und Binden von freiem Calcium noch weitere Funktionen besitzen.

Durch ihre gute Löslichkeit sind diese Proteine gewöhnlich im gesamten Cytosol präsent, ebenso wie in den dünnen, plasmatischen Ausläufern von Neuronen. Durch diese Verteilung eignen sich Antikörper gegen CaBP's als hervorragende Werkzeuge, um einzelne Neuronenpopulationen in vielen Teilen des Nervensystems samt ihrer Verbindungen aufzuzeigen [BAIMBRIDGE et al., 1992].

In dieser Arbeit werden exklusiv die beiden CaBP Calbindin<sub>D28k</sub> (CB) und Calretinin (CR) untersucht. Von diesen ist bekannt, daß sie im afferenten auditorischen System vieler Vertebraten auftreten. Calbindin<sub>D28k</sub> ist ein Protein der EF-Hand Familie mit einer Masse von etwa 28k Dalton, welches in vielen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems von Vögeln, Säugern und anderen Spezies vorkommt [BAIMBRIDGE et al., 1992]. Es besitzt sechs EF-Hand Domänen von denen zwei scheinbar nicht oder nicht mehr in der Lage sind Calciumionen zu binden [PARMENTIER et al., 1987].

Im Gegensatz zu der kleineren Calbindin Variante mit 9kDa erscheint nur dieses in Neuronen und wurde erstmalig dargestellt im intestinalen Trakt des Hühnchens, in dem beide nebeneinander vorkommen. Das Vorkommen im Intestinaltrakt, der Niere und im Drüsengewebe wird dabei über die Konzentration von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D gesteuert [JANDE et al., 1981]. Aus diesem Grund findet sich in älteren Literaturen häufig die Bezeichnung Vitamin D abhängiges CaBP [z.B. JANDE et al., 1981; ROTH et al., 1981]. Inzwischen ist der Name Calbindin<sub>D28k</sub> gebräuchlich, zumal sich gezeigt hat, daß das Auftreten im Gehirn der Vertebraten offensichtlich unabhängig ist von der Konzentration 1,25-Dihydroxy-Vitamin D's [PERSECHINI et al., 1989].

Calretinin ist ein weiteres Protein der EF-Hand Familie [BAIMBRIDGE et al., 1992], welches ein Homologon zum CB-Protein darstellt [ROGERS, 1987] und nach cDNA Analysen zu 60%

mit diesem übereinstimmt [ROGERS et al., 1990]. Vier EF-Hand Domänen konnten bei diesem Protein bestimmt werden [PERSECHINI et al., 1989].

## 1.2 Calciumbindende Proteine im ZNS der Vertebraten

Die umfassendste Kartierung für die beiden CaBP Calbindin<sub>D28k</sub> und Calretinin liegt vom Gehirn der Ratte vor [BAIMBRIDGE et al., 1992]. In der Aufrechterhaltung der Ca<sup>2+</sup>-Homeostasis scheinen calciumbindende Proteine eine große Rolle zu spielen. Sie sind sowohl bei Vögel als auch Säugern stets abundant [ROGERS, 1989; PARKS et al., 1997].

Die Analyse der endogenen Verteilung dieser Proteine kann dabei potentiell unterschiedliche Organisationen des Gehirns aufdecken. Die Funktionsweise selbst jedoch kann dadurch nicht dargelegt werden. Die Ergebnisse können nur als Grundlage für weitere, eingehendere Untersuchungen dienen. Im Vergleich mit diesen können sich dann grundlegende Mechanismen abzeichnen. Ebenso besteht die Möglichkeit, Vergleiche zu anderen Arten zu ziehen, um Ähnlichkeiten und allgemeine Organisationsprinzipien aufzudecken.

Ein gemeinsames Vorkommen von Substanzen kann dabei nach TAKAHASHI et al. (1987) auf zwei Möglichkeiten hinweisen: Zum einen kann die Substanz für die Signalverarbeitung nötig sein, auf der anderen Seite können die Zellen auch einen gemeinsamen Marker enthalten, weil eine ähnliche Entwicklung durchlaufen wurde.

Neben den Säugern sind die Vögel die einzige Klasse, die sowohl ein komplexes Innenohr als auch eine komplexe Vokalisation entwickelt haben [MANLEY et al., 1985]. Zusätzlich lassen sich viele Stationen der afferenten Hörbahn homologisieren.

So entspricht der Nucleus angularis (NA) der Vögel vermutlich dem posteroventralen cochleären Nucleus (PVCN) [BOORD, 1968] und der Nucleus magnocellularis cochlearis (NM) dem anteroventralen cochleären Nucleus (AVCN) [PARKS et al., 1983]. Die Aufgabe der zeitlichen Koinzidenzdetektion, die beim Vogel vom Nucleus laminaris (NL) übernommen wird, geschieht in der medialen superioren Olive (MSO) der Säuger [TAKAHASHI et al., 1987].

Akustische Raumkarten entstehen in beiden Entwicklungszweigen erstmals im Mittelhirn. Je nach Autor werden hier unterschiedliche Bezeichnungen verwendet wie Colliculus inferior (IC) [TAKAHASHI et al., 1987], Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis (MLd) [KUENZEL und MASSON, 1988] oder Torus semicircularis [PUELLES et al., 1994].

KUBKE und CARR (2000) weisen darauf hin, daß CARR und CODE (2000) anhand von vergleichenden Daten feststellen, daß das Huhn den plesiomorphen Zustand eines auditorischen Systems darstellt. Aus diesem Grund eignet sich die Analyse dieses Systems, um grundlegende Aussagen über die einzelnen Stationen der Gehörbahn zu treffen.

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Verteilung der calciumbindenden Proteine Calbindin<sub>D28k</sub> und Calretinin in der afferenten Hörbahn des Huhns –*Gallus gallus f. domestica*– innerhalb der ersten Lebenswochen immunhistochemisch darzustellen. Weiterhin soll die Untersuchung klären, ob es zu altersbedingten Veränderungen im Auftreten kommt, obwohl das Huhn als Nestflüchter zum Zeitpunkt des Schlupfes bereits über ein gut entwickeltes Gehörssystem verfügt. Aus diesem Grund werden in dieser Fragestellung nur minimale Veränderungen des Auftretens erwartet.

Weiterhin soll an Hand dieser Ergebnisse bestimmt werden, ob sich Subpopulationen von Neuronen erkennen oder ganze Kerngebiete an Hand ihrer Verteilung an CaBP untergliedern lassen.

Neben den Innenohren werden in Dünnschnitten des Gehirns die folgenden Kerngebiete der afferenten Hörbahn auf Calbindin<sub>D28k</sub> und Calretinin untersucht:

- Nucleus angularis (NA)
- Nucleus magnocellularis cochlearis (NM)
- Nucleus laminaris (NL)
- Nucleus olivaris superior (OS)
- Nucleus lemniscus lateralis (LL)
- Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis (MLd)

Daneben sollen die Faserverbindungen zwischen einzelnen auditorischen Kerngebieten, sofern sie sich mit einem der beiden Antikörper darstellen lassen, gezeigt werden. Weiterhin wird ein Kerngebiet beschrieben, welches in der Literatur bislang nicht erwähnt wird, aber von verschiedenen Autoren als auditorisch identifiziert wurde [KAISER, persönliche Mitteilung].

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Tierart

Bei der untersuchten Tierart handelte es sich um *Gallus gallus f. domestica*, Rasse ‚selected leghorn‘. Die Tiere wurden aus dem Institut für Geflügelzucht der Tierärztlichen Hochschule Hannover bezogen und hatten ein Alter von wenigen Stunden nach dem Schlupf bis hin zu 40 Tagen. Das Alter wird hier mit P für engl. posthatch, nach dem Schlupf, angegeben. Die darauf folgende Zahl entspricht den Tagen nach dem Schlupf. Verwendet wurden P0(5), P1(2), P13(3), P19(1), P25(1), P29(1) und P40(1). In Klammern jeweils die untersuchte Anzahl der entsprechenden Altersstufe. In Tabelle 2.1 sind die Tier-ID's, der Schlupftag, das Alter und das Gewicht der einzelnen Tiere aufgeführt.

Alle Versuche sind nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes [BMELF, 1998] in der Novellierung vom 25.05.1998 an der Tierärztlichen Hochschule Hannover/Institut für Zoologie durchgeführt worden. Es handelte sich dabei um einen anzeigepflichtigen Tierversuch zur Organentnahme (Aktenzeichen 99/189).

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Versuchstiere

Tier ID	Schlupf	Alter	Gewicht in g
HK 37	09.03.2000	P 25	212
HK 38	22.03.2000	P 19	127
HK 39	22.03.2000	P 29	235
HK 40	05.05.2000	P 0	46
HK 41	05.05.2000	P 0	45
HK 42	06.05.2000	P 13	76
HK 43	06.05.2000	P 13	62
HK 44	26.05.2000	P 0	41
HK 45	26.05.2000	P 0	41
HK 46	08.06.2000	P 1	42
HK 47	08.06.2000	P 1	35
HK 48	07.07.2000	P 0	45
HK 49	21.06.2000	P 40	344
HK 50	25.08.2000	P 13	82

## 2.2 Anästhesie

Vor Beginn der Organentnahme wurden die Tiere mit Pentobarbital (20mg/ml, Natriumsalz) narkotisiert. Die applizierte Menge betrug 500 $\mu$ l-1000 $\mu$ l, wurde intramuskulär verabreicht und führte im weiteren Verlauf zum respiratorischen Stillstand.

Alle weiteren Schritte folgten, nachdem das Tier ein chirurgisches Narkosestadium erreicht hatte [CAMPBELL und LAWSON, 1958] und keine Reaktionen mehr auf Schmerzreize zeigte. Die Überprüfung erfolgte anhand des Krallenreflexes auf ein Zwicken.

## 2.3 Perfusion

Nachdem ein tiefes Narkosestadium erreicht worden war, wurde der Bauchraum eröffnet. Von dort ausgehend erfolgte die Durchtrennung des Brustbeins, bis das Herz frei zugänglich war. Für die Dauer der Behandlung wurden die Rippen mit einer Spreizklammer fixiert und auseinandergehalten. In einigen Fällen wurde ein Teil der Rippen entfernt, um eine besser Zugänglichkeit zum Herzen zu gewährleisten.

In das noch aktive Herz wurde in den linken Ventrikel eine Kanüle gesetzt, durch welche die Lösungen für die Perfusion zugeführt wurden. Ein Schnitt in das rechte Atrium ermöglichte, daß das Blut abfließen konnte. Die Lösungen wurden durch eine pericyclische Pumpe (Cole-Parmer, Masterflex<sup>®</sup>, Model 7554-95) mit einer Frequenz von etwa 1-2 Hz zugeführt, angepaßt an den reduzierten Herzschlag zu Beginn der Perfusion.

Zum Spülen des Gefäßsystems wurde 0.85% Kochsalzlösung verwendet, der 0.5% Natriumnitrit zur Gefäßerweiterung zugesetzt waren (pH 7.4). Als Kontrolle für den Erfolg des Ausspülens diente der Zustand der Leber, welche nach wenigen Sekunden in Folge des Blutverlustes ihre tiefrote Färbung verlor und einen leicht gelblichen Farbton annahm.

Weiterhin wurde der größte Teil der Erythrocyten aus dem Gefäßsystem des Gehirns entfernt, welche einen starken Hintergrund bei der späteren Diaminobenzidin (DAB)-Entwicklung gegeben hätten. Zudem wurde ausgeschlossen, daß Erythrocyten unter der nachfolgenden Formaldehydbehandlung koagulierten und Kapillaren obstruieren konnten, was zu einer Beeinträchtigung der Fixierung hätte führen können.

Anschließend wurde zur Fixierung eine 0.1M Phosphatpufferlösung (pH 7.4) mit 4% Formaldehyd zugeführt. Die Spüllösung besaß Raumtemperatur, die Temperatur des darauf folgenden Fixiermittels lag bei etwa 5°C.

Nach etwa 20 bis 30 Minuten der Fixierung wurde die Perfusion abgebrochen. Zur Kontrolle des Perfusionserfolges diente neben der Steifheit des gesamten Körpers auch die des Augensinnes. Die Perfusion wurde an allen Tieren erfolgreich durchgeführt.

## 2.4 Präparation

Vor Beginn der eigentlichen Präparation wurde der Kadaver dekapitiert und der Kopf in 0,1M Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt für mindestens 20 Minuten eingelegt, um eventuelles Formaldehyd aus dem Gefieder zu entfernen.

Zuerst wurden die Knochenkapseln, in welchen die Innenohren liegen, herauspräpariert und diese anschließend separat aus den Knochen gewonnen. Im Anschluß wurde auch das Gehirn vollständig herauspräpariert. Dies geschah sowohl von dorsal, um eine Verletzung im vorderen Telencephalon zu vermeiden, als auch von ventral, um das Mittelhirn nicht zu verletzen.

Die entnommenen Organe wurden für weitere ein bis drei Stunden in 4%iger Formaldehyd-Phosphatpufferlösung nachfixiert, um die Stabilität des Gewebes weiter zu erhöhen.

Zur Kryoprotektion des Gewebes beim nachfolgenden Gefrierschneiden wurde das Gehirn für mindestens 12 Stunden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 30% Saccharose auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Während es zu Beginn der Behandlung noch an der Oberfläche schwamm, erhöhte sich im Laufe der Nacht das spezifische Gewicht durch die eindringende Zuckerlösung soweit, daß es zu Boden sank. Eine mögliche Zellschädigung durch Eiskristallbildung im Cytoplasma während des Auftauens auf dem Messer und der Überführung in die Auffanglösung wurde somit weitgehend verhindert.

## 2.5 Schneiden der Präparate

Da sich weder im oberen Kleinhirn noch in der Lingula für diese Arbeit relevante Anteile der Gehörbahn befanden, konnten diese entfernt werden. Dazu wurden die Kleinhirnstiele vorsichtig mit einer Schere durchtrennt und das gesamte Kleinhirn abgenommen. Die darunterliegende Lingula wurde mit einer Pinzette vorsichtig abgehoben.

Vereinzelt wurde nur ein Teil des Kleinhirns entfernt, um an Hand der laut Literaturangaben starken Immunreaktionen [JANDE et al., 1981; ROTH et al., 1981; ROGERS et al., 1990] eine Referenz für die Effizienz der Methode und die Effektivität der Antikörper zu haben. Diese Immunreaktion konnte in allen darauf kontrollierten Bereichen dargestellt werden (Vergleiche

Abbildung 2.1 a und b).

Für die hier vorliegende Arbeit wurden Frontalschnitte angefertigt sowie zur Rekonstruktion des MLd eine linke Gehirnhälfte sagittal geschnitten (HK49, P40).

Frontalschnitte:

Vor dem Auffrieren des Gehirns wurde mit einer Rasierklinge ein Referenzschnitt im Vorderhirn gelegt, um eine glatte Fläche zum Auffrieren zu erhalten. Die Ausrichtung des Präparates während des Auffrierens erfolgte stets so, daß der Hirnstamm eine möglichst gerade Linie bildete, zu der senkrecht die Schnittebene lag.

Um in den späteren Schnitten die linke und rechte Seite differenzieren zu können, wurde ebenfalls mit einer Rasierklinge die linke Seite sowohl des Mittel-, als auch des Stammhirns ventrolateral angekerbt. Dies geschah mit entsprechender Vorsicht, um nicht Kerne der Gehörbahn in Mitleidenschaft zu ziehen.

Sagittalschnitte:

Sagittalschnitte sind nur von einer linken Gehirnhälfte von HK49 angefertigt worden. Dazu wurde das Gehirn nach der normalen Kryoprotektion in 30%iger Saccharoselösung aus der Lösung entfernt und vorsichtig mit einem fusselfreien Tuch (Kimwipes, Kimberly Clark) trocken getupft. Anschließend wurde das Gehirn in einem vorbereiteten Schälchen, in dem bereits eine Schicht Gelatine eingegossen und abgekühlt war, ausgerichtet und mit weiterer Gelatine-Lösung von etwa 37°C ausgegossen. Die Einbettung in Gelatine war nötig, da entgegen den Frontalschnitten, in der sagittalen Ebene viele Teile des Gehirns keinen direkten Zusammenhang in der gleichen Schnittebene besitzen. Anderenfalls wären die Schnitte beim Schneiden auseinandergefallen und die Relation zwischen den einzelnen Anteilen verlorengegangen.

Nachdem die Lösung bei 4°C fest geworden war, wurde das umgebende Schälchen entfernt und der gesamte Gelatineblock mit dem eingebetteten Gehirn in eine 30% Saccharoselösung mit 4% Formaldehyd zur Nachfixierung der Gelatine überführt.

Nach einer Nacht bei 4°C und kontinuierlicher Bewegung wurde der Block soweit zurechtgeschnitten, daß an allen Seiten des Gehirns etwa 3 bis 4 Millimeter fixierte Gelatine überstand. Zur Identifizierung der Seiten wurde eine Kerbe in die Gelatine geschnitten. Aufgefroren wurde das Gehirn mit der medialen Seite. Die Richtung des Schnittes verlief von ventral nach dorsal.

Im weiteren Verlauf glichen sich die Arbeitsschritte für beide Präparatserien wieder:

Mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Microm, HM 500 OM) wurden von den Gehirnen Dünnschnitte von 40µm Stärke angefertigt. Der Messerwinkel betrug 16°, die Temperatur der Box

+5°C. Die Objekttemperatur wurde im Laufe des Schneidens von anfänglich -40°C auf bis zu -15°C erhöht, wenn sich der Abstand Messer zu Objektblock verringerte.

Die Schnitte wurden mit einem Pinsel vom Messer abgenommen und in 0.1M Phosphatpuffer aufgefangen (pH 7.4). Dies geschah in Cell Wells von 6 mal 4 Feldern der Firma Corning, New York. Je nach Alter und individuellen Größenunterschieden der Tiere wurden von jedem Gehirn zwischen 170 und 210 Schnitte gewonnen. Geschnitten wurde jeweils vom Hirnstamm bis über das Mesencephalon hinaus. Sagittal wurde die Hirnhälfte vollständig geschnitten, wobei etwa 190 Schnitte gewonnen wurden.

Die Schnitte 1 bis 6 wurden dabei in der ersten Zeile in jeweils einer Säule (=Spalte) abgelegt, die Schnitte 7-12 jeweils in einer Säule der zweiten Reihe und so fort. Der 25., der 49. und so fort Schnitt wurde wieder in Säule eins, Zeile eins des gleichen Cell Wells abgelegt.

Diese Methode ermöglichte es, benachbarte Schnitte alternierend immunhistochemisch zu behandeln, indem in jeder Säule ein beliebiger Antikörper zugesetzt werden konnte.

Durch diese Methode war es möglich für die einzelnen Schnitte beim Aufziehen auf Objektträger die exakte Position innerhalb des Gehirns anzugeben. Zwei aufeinanderfolgende Schnitte in einem Töpfchen hatten einen Abstand von (6 Schnitte pro Reihe \* 4 Reihen \* 40µm Schnittdicke = ) 960µm.

## **2.6 Immunhistochemische Bearbeitung der Proben**

Die gesamte immunhistochemische Behandlung wurde nach der ‚free-floating‘ Technik und Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode durchgeführt. Dies geschah direkt in den Cell Wells, indem die entsprechende Lösung jeweils zugegeben wurde und die Schnitte darin frei flottierten. Für die Waschschrte wurden die Schnitte in selbstgefertigte Waschschalen überführt, die auf der Unterseite keinen Boden besaßen, sondern ein feinmaschiges Gitter, so daß einfach nur die unterstehende Schale mit der Lösung gewechselt wurde und nicht in jedem Töpfchen pipettiert werden mußte.

Von allen immunhistochemisch reagierenden Substanzen, wurde eine Lösung von 500µl in den entsprechend unten angegebenen Konzentrationen in den Cell Wells vorgelegt. Durch das größere Volumen der in Gelatine eingebetteten Schnitte wurden für die sagittalen Schnitte 1000µl vorgelegt.

Zuerst wurden die Schnitte mit 10mM Phosphatpuffer, der 0.3% Wasserstoffperoxid enthielt, für 30 Minuten inkubiert. Das Wasserstoffperoxid zersetzte dabei eventuell vorhandene endo-

gene Peroxidasen, die im späteren Entwicklungsschritt einen starken Hintergrund liefern würden.

Anschließend wurde 5 mal 5 Minuten mit 10mM PBS (pH 7.4) gewaschen, um verbliebenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu entfernen.

Im Anschluß daran wurde der primäre Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 zugesetzt. Das Solvens war 10mM PBS mit einem Zusatz von Triton X100 (PTX), pH 7.4. Weiterhin enthielt die Lösung 3% ‚Normal Goat Serum‘ (NGS). Diese Konzentration wurde vorher im Labor für die im folgenden angegebenen Zeiten als optimal ermittelt und stellen gute Ergebnisse sicher.

Alternierend wurden in den jeweiligen Säulen der Cell Wells Antikörper auf Calbindin<sub>D28k</sub> und Calretinin verwendet. Es handelte sich dabei um rabbit-anti-Calbindin<sub>D28k</sub> und rabbit-anti-Calretinin (beide Swiss Antibodies, Swant). Um später eventuelle Kreuzreaktivitäten ausschließen zu können, wurde zusätzlich ein monoklonaler mouse-anti-Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper (Swant) eingesetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C und ständiger Bewegung auf einem Schüttler (IKA Vibrax VXR) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst wieder 5 mal 5 Minuten in 10mM PBS (pH 7.4) gewaschen, um primäre Antikörper, die nicht im Gewebe gebunden waren, zu entfernen.

Anschließend wurden die Schnitte in die Lösung des sekundären Antikörpers überführt. Es handelte sich dabei um einen biotinylierten goat-anti-rabbit Antikörper (Vector Laboratories) sowie goat-anti-mouse bei den monoklonalen Antikörpern (Vector Laboratories) in einer Konzentration von 1:200 in PBS mit 3% Normal Goat Serum. Die Inkubationszeit war ebenfalls über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler.

Nach der Inkubation wurde wieder 5 mal 5 Minuten mit 10mM PBS (pH 7.4) gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen.

Die folgende Behandlung der Präparate mit dem Avidin-Biotin-Complex geschah wieder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Die eingesetzte Konzentration lag bei 1:200 in 10mM PBS. Nach wiederum 5 maligem Waschen in PBS (pH 7.4) á 5 Minuten wurde eine Vorbehandlung für die Diaminobenzidin (DAB) Entwicklung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte 2 mal 5 Minuten in Acetat-Imidazol Puffer gewaschen und danach in einer DAB-Imidazolösung (pH 6.5) mit Nickelintensivierung entwickelt. Die Dauer der Entwicklung erfolgte durch visuelle Kontrolle des blau-schwarzen Reaktionsproduktes.

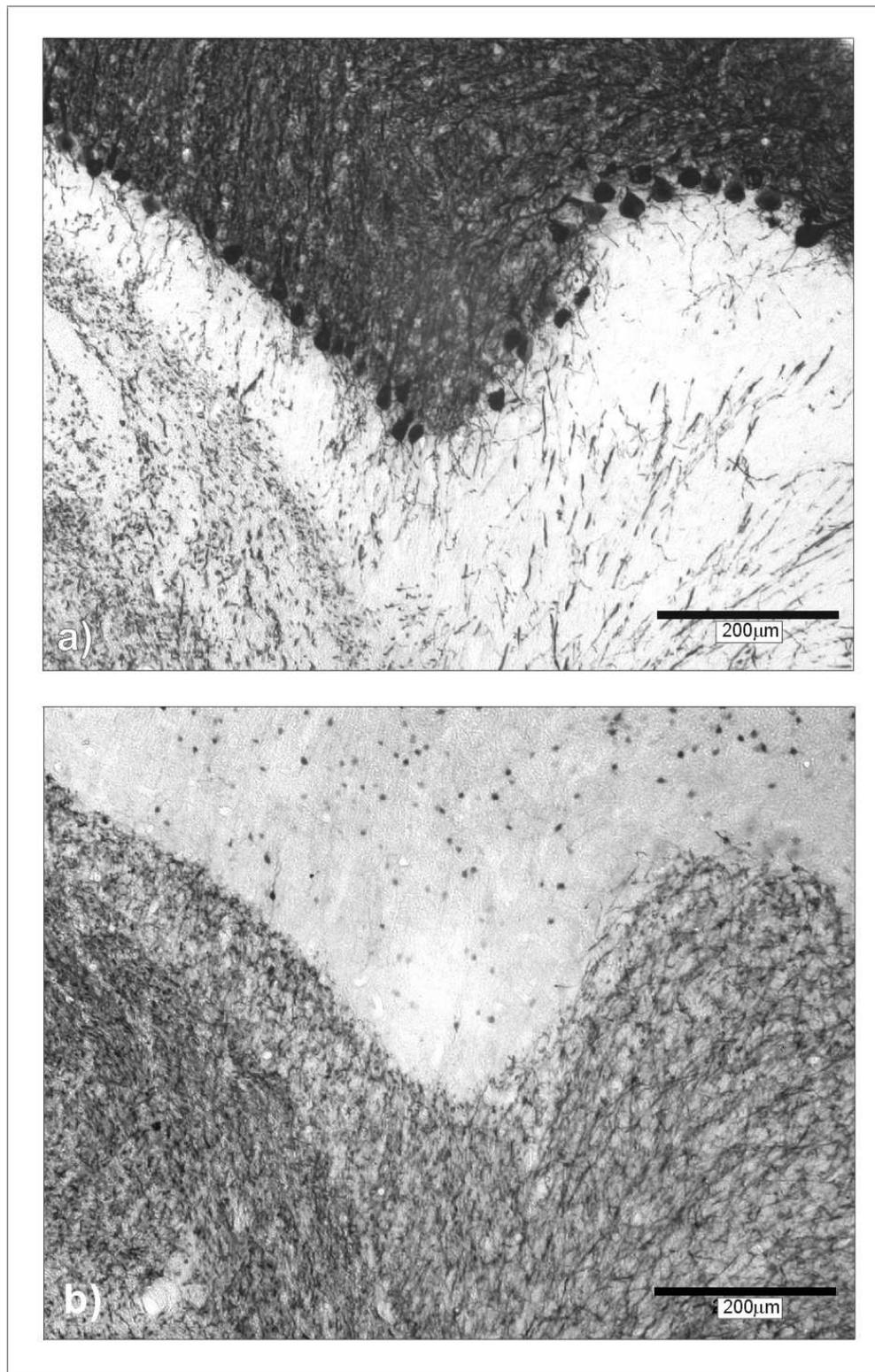


Abbildung 2.1: Immunreaktionen des Cerebellums: a) P40, Calbindin monoklonal, deutlich angefärbt sind die Purkinje Zellen sowie die Fasern der Molekularschicht; die Fasern der Körnerschicht zeigen eine deutlich verringerte Immunreaktion; b) P40, Calretinin, die Purkinjezellen weisen keine Färbung auf, dafür sind die Fasern der Körnerschicht deutlich intensiv angefärbt.

In beiden Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten. Die Schnitte besitzen einen Abstand von 40µm zueinander und zeigen jeweils das gleiche Areal des Cerebellums.

Die in den hier beschriebenen Experimenten beobachteten Entwicklungszeiten betragen zwischen 3 und 8 Minuten.

Anschließend erfolgte noch ein einmaliges Waschen in Acetat-Imidazolpuffer und 10 Waschvorgänge in PBS, alle je 5 Minuten, um die Entwicklung vollständig abubrechen und verbliebenes DAB zu entfernen.

In Kontrollproben wurde eine PTX Lösung verwendet, der der primäre Antikörper fehlte. Die Inkubationszeiten sowie die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben. In keinem Fall wurde dabei eine spezifische Immunreaktivität gesehen.

## **2.7 Aufziehen der Schnitte auf Objektträger**

Im Anschluß an die Immunhistochemie wurden die Schnitte auf chromalaungelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen.

Die Anordnung erfolgte stets so, daß die vier untereinanderliegenden Töpfchen einer Säule ebenfalls untereinander aufgezogen wurden und nach rechts der jeweils rostralwärts nächste Schnitt folgte. Die Abstände auf einem Objektträger betragen somit untereinander 240µm und nebeneinander 960µm.

Um ein besseres Ausrichten auf dem Objektträger zu gewährleisten, wurde in diesem Schritt mit PTX gearbeitet. Nach einer mindestens 12 stündigen Trocknungszeit wurden die Objektträger noch für mindestens 30 Minuten im Wärmeschrank bei 60°C erhitzt, um eine optimale Haftung zwischen Schnitt und Gelatine sicherzustellen.

Nach Abkühlung wurden die Präparate über die aufsteigende Alkohol- und Xylolreihe (VE H<sub>2</sub>O, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100%, 100%, Xylol I, Xylol II, Xylol III) á fünf Minuten entwässert. Einzelne Objektträger wurden mit Neutralrot gegengefärbt und über die Alkohol/Xylolreihe ausdifferenziert, wobei sie nur in den Xylolbädern fünf Minuten verblieben.

Anschließend wurden alle Schnitte unter DPX (Fluka) eingedeckelt.

## **2.8 Mikroskopie und Bildverarbeitung**

Die Präparate wurden mit einem Leitz Labormikroskop (Type 020-441.003) betrachtet und ausgewertet.

Übersichtszeichnungen sowie Skizzen der Zellen und deren Verteilung wurden an einem Forschungsmikroskop Universal (Zeiss) mit Camera Lucida angefertigt. Die verwendeten Objek-

tive betragen 2,5 und 6,3fach für Übersichten, 10fach zur detaillierten Übersicht in Teilen von Kerngebieten sowie 40fach für einzelne Zellen.

Photos sowie genauere Beobachtungen wurden an einem Zeiss Axioplan Mikroskop gewonnen. Die verwendeten Objektive betragen 5fach, 10fach und 40fache Vergrößerung.

Photos wurden über eine im Strahlengang liegende Digitalkamera (Diagnostic Instruments, Modell 1.3.0) aufgenommen und auf einem angeschlossenen PC dargestellt. Zur Digitalisierung wurde Metamorph (Universal Imaging Corp., Version 4.01) verwendet. Hierunter wurden die Bilder mit 600dpi bei 5,55cm Breite und 12 Bit Tiefe/Graustufen über den Grünkanal digitalisiert. Nach der Einstempelung eines Eichbalkens in jedem Bild wurde bei gleicher dpi Zahl die Farbtiefe auf 8 Bit reduziert, unter Photoshop 4.0 (Adobe) nachkontrastiert und im Tagged Image File Format (TIFF) für die weitere Verarbeitung gespeichert. Die weitere Aufarbeitung der Bilder wurde unter Corel Draw 8.0 (Corel) vektororientiert durchgeführt.

Zeichnungen, die mit der Camera lucida angefertigt wurden, wurden erst mit Bleistift vor-skizziert und anschließend mit Zeichentusche aufgearbeitet (Rapidograph 0.25mm, 0.35mm und 0.50mm, Rotring). Dabei wurde immer wieder mit dem mikroskopischen Bild verglichen, um die entsprechend darzustellende Charakteristik zu gewährleisten und herauszuarbeiten. Gleiches gilt für Zeichnungen, die zur Verdeutlichung von Zuständen innerhalb des Gehirns dienen sollen.

Für die Darstellung in dieser Arbeit wurden die Zeichnungen unter Photoshop 4.0 mit 600-1000dpi gescannt und mit Corel Draw 8.0 weiterverarbeitet.

## **2.9 Zellzählungen und Statistik**

Zur Ermittlung von eventuell altersbedingten Verteilungen der CR positiven Zellen wurden vom NA Skizzen angefertigt. Unter Corel Draw 8.0 wurde um die Kerngebiete jeweils ein Polygonzug gelegt und nach dem on top Verfahren die Zellen markiert, die eine immunhistochemische Färbung aufwiesen. Die Grenze zwischen dorsolateralem und medioventralem Teil des Kerns wurde an Hand von zwei Merkmalen gezogen: Der Kern gleicht in seinen Umrissen einem auf dem Kopf stehenden L, dessen kurzer Ausläufer nach lateral weist. Zum einen diente ventral der Scheitelpunkt des L's als Stützpunkt. Auf der dorsalen Seite wurde die Hälfte der Strecke der horizontalen Ausdehnung genommen durch den die Grenzlinie gelegt wurde. Als zusätzliche Hilfe für den ventralen Stützpunkt diente zudem ein häufig angetroffenes Blutgefäß. Für jedes Tier wurde dies an zwei Schnitten im Abstand von 80µm durchge-

führt, in denen das Kerngebiet seine maximale Ausdehnung aufwies. Da in mehreren Fällen nicht mehr als zwei Schnitte pro Tier mit diesen Eigenschaften zur Verfügung standen, wurde zur gleichbleibenden Validierung auf die Zählung eventuell weiterer vorhandener Schnitte verzichtet.

Die Zellzahlen in den einzelnen Abschnitten wurden über den Quotienten dorsolateral zu medial in Verhältnis gesetzt. Diese Zahl gab damit an, wie die Zellen anteilig auf die beiden Bereiche des Kerngebietes verteilt waren.

Das arithmetische Mittel der Quotienten eines Tieres wurde dargestellt und statistisch ausgewertet (Statistika V.5.1, StatSoft). Dazu wurden drei unterschiedliche Tests durchgeführt.

Für den Mann-Whitney U-Test wurden zwei Alterskategorien geschaffen. Die eine beinhaltete die sehr jungen Tiere der Altersstufe P0 und P1, wogegen die anderen Kategorie alle weiteren zusammenfaßte. Der Auswahl lag in diesem Fall die Annahme zu Grunde, daß bei den jüngsten Tieren der zweiten Kategorie (ab P13) durch den Abstand zum P1 Stadium eine deutliche Veränderung zu sehen sein müßte, falls vorhanden. Die Signifikanzgrenze wurde mit  $p=0,05$  festgelegt.

Für den Kruskal-Wallis ANOVA Test wurden die Kategorien gleich den sieben untersuchten Altersstufen gesetzt um zu erkennen, ob sich zwischen den einzelnen Altersstufen Veränderungen zeigten. Die Signifikanzgrenze wurde ebenfalls mit  $p=0,05$  festgelegt.

Um einen Zusammenhang der dorsolateral liegenden Zellen im Bezug zum Alter zu erkennen, wurden die Prozentwerte der dorsolateral liegenden CR positiven Zellen nach der Spearman Rank Order Korrelation mit dem absoluten Alter bewertet. Dies geschah, um festzustellen, ob der im Mikroskop gewonnene Eindruck statistisch Bestand hat. Die Signifikanzgrenze wurde mit  $p=0,05$  festgelegt.

Weiterhin wurde mit der Spearman Rank Order Korrelation die absolute Zellzahl der CR positiven Zellen im NA mit dem absoluten Alter verglichen. Dies geschah, um festzustellen, ob sich die Anzahl der absolut CR positiven Zellen im NA im Bezug zum Alter veränderte. Die Signifikanzgrenze wurde auch hier mit  $p=0,05$  festgesetzt.

## 2.10 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Tabelle 2.2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
AVCN	Anteroventraler cochleärer Nucleus
Ca	Calcium
CaBP	Calciumbindende Proteine
CB	Calbindin <sub>D28k</sub>
CR	Calretinin
DAB	Diaminobenzidin
FLM	Fasciculi longitudinalis medialis
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HK	Hühnerküken
IC	Inferiorer colliculus
IID	Intensitätsunterschied zwischen den Ohren (Interaural intensity difference)
Ipc	Nucleus istmi, pars parvocellularis
IR	Immunreaktivität
ITD	Laufzeitunterschied zwischen den Ohren (Interaural time difference)
LL	Nucleus lemniscus lateralis
LLi	Nucleus lemniscus lateralis, pars intermedia
LLv	Nucleus lemniscus lateralis, pars ventralis
MLd	Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis
MSO	Mediale superiore Olive
N	Nucleus
NA	Nucleus angularis
NL	Nucleus laminaris
NM	Nucleus magnocellularis cochlearis
NVIII	Nervus octavus
NVIIIc	Nervus octavus, pars cochlearis
NVIIIv	Nervus octavus, pars vestibularis
NGS	Normal Goat Serum
OS	Nucleus olivaris superior
P	Nach dem Schlupf; engl. Posthatch; nachfolgend Alter in Tagen
PB	Phosphat Puffer
PBS	Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt
PTX	Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt und Triton X100
PVCN	Posteroventraler cochleärer Nucleus
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Uptake Protein
SGFP <sub>v</sub>	Stratum griseum et fibrosum periventriculare
SLU	Nucleus semilunaris
Swant	Swiss Antibodies
TIFF	Tagged Image File Format
VED	Nucleus vestibularis descendens
VEL	Nucleus vestibularis lateralis
ZNS	Zentrales Nervensystem

### 3. Ergebnisse

Wenn an den entsprechenden Stellen nicht explizit darauf hingewiesen wird, daß es sich um den polyklonalen Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper handelt, beziehen sich die hier präsentierten CB-Ergebnisse stets auf den monoklonalen Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper. Alle Abbildungen des Gehirns entstammen Frontalschnitten deren Färbung, ebenso wie das Alter des Tieres jeweils im begleitenden Text angegeben wird. Bei den Abbildungen des Innenohres handelt es sich um Whole-Mount Präparate.

#### 3.1 Immunreaktivität der einzelnen Kerngebiete

Bei allen Versuchstieren zeigten die relevanten Kerngebiete mindestens eine Teilreaktion auf einen der verwendeten Antikörper. Die Bestimmung der Kerne erfolgte durch die immunhistochemischen Reaktionen sowie durch Gegenfärbung mit Neutralrot und den Vergleich mit dem Hirnatlas des Huhns [KUENZEL und MASSON, 1988]. Eine Übersicht über die schematisierte Lage der dargestellten Kerngebiete und Fasertrakte wird in Abbildung 3.1 gegeben.

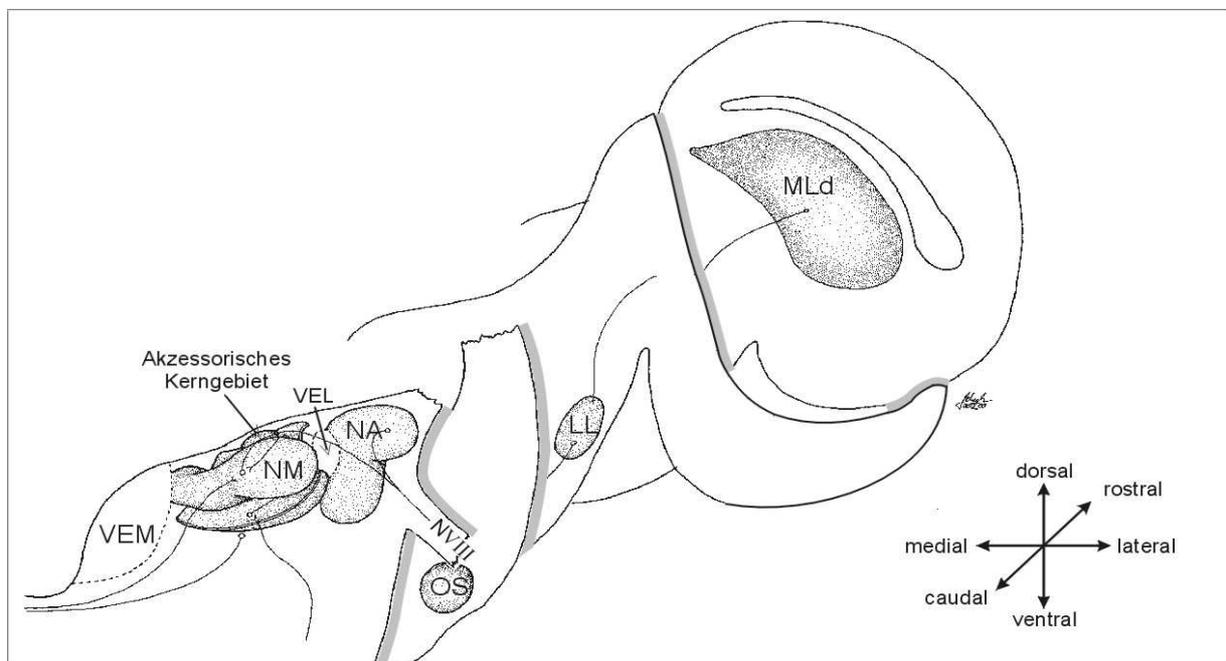


Abbildung. 3.1: Schematisierte Lage der Kerngebiete zueinander, die an Hand der Immunreaktionen gefunden wurden; dargestellt für eine rechte Hirnhälfte. Die relativen Abstände und Größen sind in dieser Abbildung nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Der NL befindet sich ventral des NM und umhüllt diesen nach rostral. Fasern sind durch Linien dargestellt, offene Kreise entsprechen Projektionsorten, invertierte Pfeilspitzen zeigen ableitende Fasern an.

### 3.1.1 Nucleus angularis

Der Nucleus angularis zeigte sich im Mikroskop in seiner maximalen Ausdehnung als ein um 180° gedrehtes, L-förmiges Kerngebiet im dorsolateralen Bereich des Stammhirns. Der kurze Arm des L's wies dabei eine leichte Drehung nach caudal auf, wodurch er in den Frontalschnitten im caudalen Bereich zuerst als dreieckige Struktur erschien, die nach ventral vom einlaufenden Nervus octavus, pars cochlearis (NVIIIc) begrenzt wurde.

Durch seine Struktur sowie durch seine Größe war er leicht zu erkennen und zu identifizieren. Aufgrund der immunhistochemischen Reaktionen ließ er sich gegenüber benachbarten Gebieten abgrenzen, da im umliegenden Gewebe entweder andere Immunreaktionen stattfanden oder Fasertrakte eine Differenzierbarkeit ermöglichten.

Eine Untergliederung des Kerns in mehrere Subkerne war nicht möglich, jedoch zeigte sich mindestens eine Subpopulation von Neuronen.

#### 3.1.1.1 Calretinin

Innerhalb des Nucleus waren, wie durch Gegenfärbungen gesehen, nicht alle Zellen angefärbt, sondern verschiedene Neurone unterschiedlicher Größe und Form (Abbildung 3.5).

Es war stets eine erhöhte Dichte von CR-IR Neuronen im dorsolateralen Teil des Kernes zu finden (Abbildung 3.2). In der ventralen Spitze des Kerngebietes konnte bis auf eine Ausnahme (HK49) bei keinem Tier eine randständige immunreaktive Zelle gesehen werden. Zudem ließ sich im mikroskopischen Bild eine Veränderung im Bezug zum Alter vermuten.

Während bei den jungen Tieren (P0 und P1) die überwiegende Mehrheit der Zellen im dorsolateralen Abschnitt zu sehen waren, nahm das Verhältnis dorsolateral zu medial mit zunehmenden Alter ab. Neben der Tier-ID sind in Tabelle 3.1 die Kategorien für die Statistik, die Ergebnisse der Zählungen sowie die arithmetischen Mittelwerte angegeben und der Prozentsatz, wieviel Zellen sich im dorsolateralen Teil befanden.

Nach dem Mann-Whitney U-Test mit den beiden Kategorien Jung und Alt, wie in der Tabelle 3.1 angegeben, zeigte sich keine statistische Signifikanz auf einen Unterschied in den Quotientenwerten ( $p=0,110233$ ;  $z=-1,59719$ ). Auch der Kruskal-Wallis ANOVA Test mit sieben Alterskategorien (P0 bis P40) ergab keine Signifikanz ( $p=0,4513$ ).

In Abbildung 3.3 sind die Quotienten dorsolateral zu medial als Boxplots gegen das Alter aufgetragen. Trotz der nicht erreichten Signifikanzgrenzen läßt sich erkennen, daß ab dem Alter P19 keine Quotientenwerte mehr über 0,9 liegen. Augenscheinlich ist, daß die hohen Werte ausschließlich in den ersten drei Kategorien P0 bis P13 auftraten. Der Minimumwert im P0 Stadium sowie die unteren 25% rührten dabei nur von einem Tier (HK45) her.

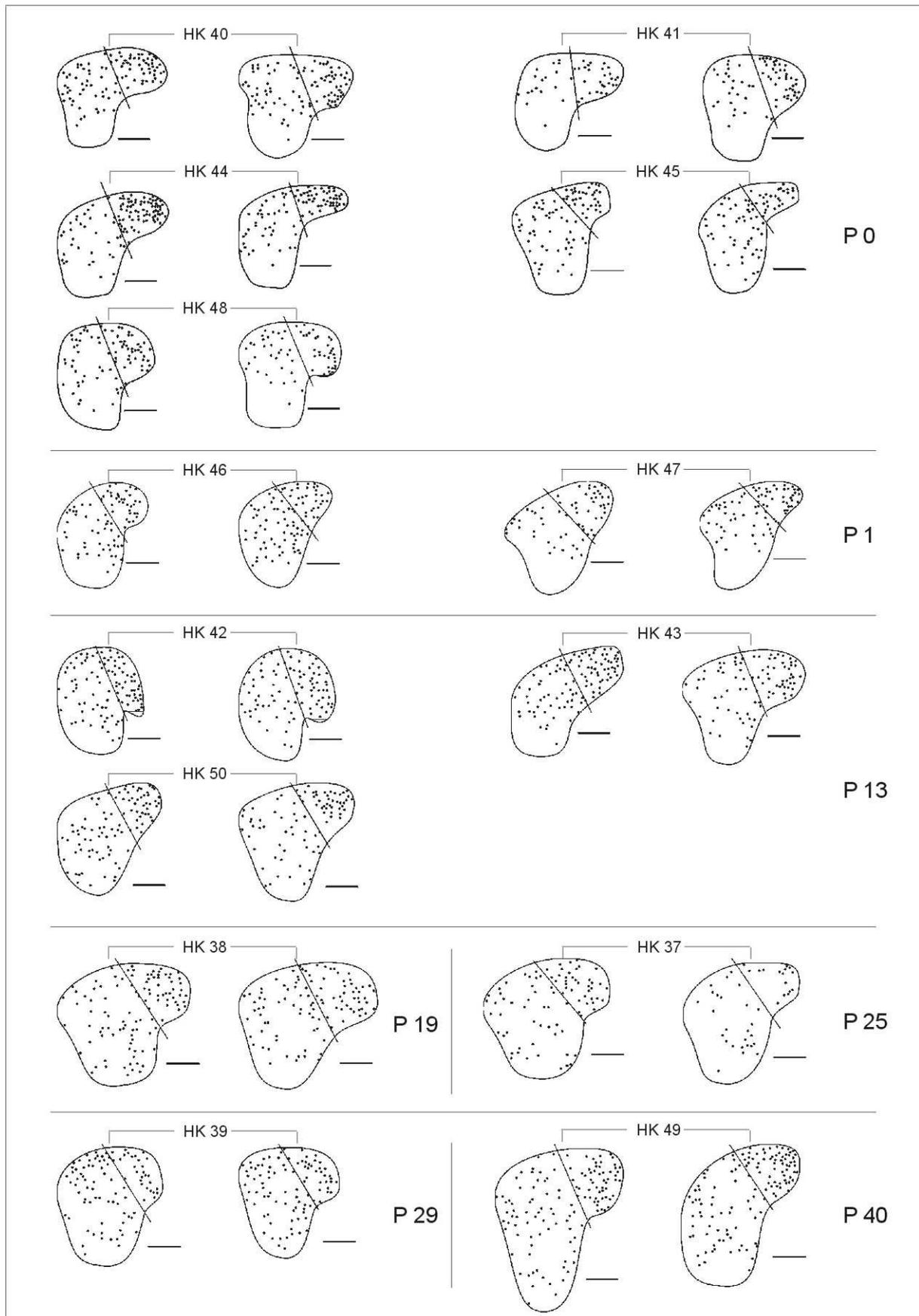


Abbildung 3.2: Skizzen der vorgefundenen Verteilung der CR positiven Zellen im Nucleus angularis der verschiedenen Altersstufen. Der angegebene Maßstab entspricht jeweils 200µm, der Abstand zwischen 2 Schnitten 80µm; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

Der Vergleich der Gesamtzellzahlen in Bezug zum Alter nach der Spearman Rank Order Korrelation ergab ebenfalls keinen Hinweis darauf, daß die Anzahl der immunhistochemisch angefärbten Zellen mit zunehmendem Alter ansteigt ( $p=0,209376$ ;  $R=0,357598$ ).

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Zellzählungen für den Nucleus angularis

Tier ID	Alter	Kategorie	1. Schnitt				2.Schnitt +80µm				Arith. Mittel der Zellzahl	Arith. Mittel der Quotienten	% Dorsolateral
			Zellen medial	Zellen dorsolat	Zellen gesamt	Quotient dorso:med	Zellen medial	Zellen dorsolat	Zellen gesamt	Quotient dorso:med			
HK40	0	jung	47	47	94	1	47	46	93	0,979	93,5	0,98	49,73
HK41	0	jung	18	28	46	1,556	26	40	66	1,538	56,0	1,55	76,78
HK44	0	jung	38	73	111	1,921	41	50	91	1,220	101,0	1,57	60,89
HK45	0	jung	51	33	84	0,647	49	27	76	0,551	80,0	0,60	37,50
HK48	0	jung	39	40	79	1,026	32	32	64	1,000	71,5	1,01	50,34
HK46	1	jung	44	32	76	0,727	63	28	91	0,444	83,5	0,59	35,32
HK47	1	jung	26	36	62	1,385	40	38	78	0,950	70,0	1,17	52,00
HK42	13	alt	51	47	98	0,922	42	44	86	1,048	92,0	0,98	49,45
HK43	13	alt	51	52	103	1,020	45	42	87	0,933	95,0	0,98	49,47
HK50	13	alt	54	43	97	0,796	44	41	85	0,932	91,0	0,86	46,15
HK38	19	alt	62	42	104	0,677	61	41	102	0,672	103,0	0,67	40,29
HK37	25	alt	50	33	83	0,660	26	16	42	0,615	62,5	0,64	39,20
HK39	29	alt	65	27	92	0,415	62	30	92	0,484	92,0	0,45	30,97
HK49	40	alt	69	55	124	0,797	67	58	125	0,866	124,5	0,83	45,38

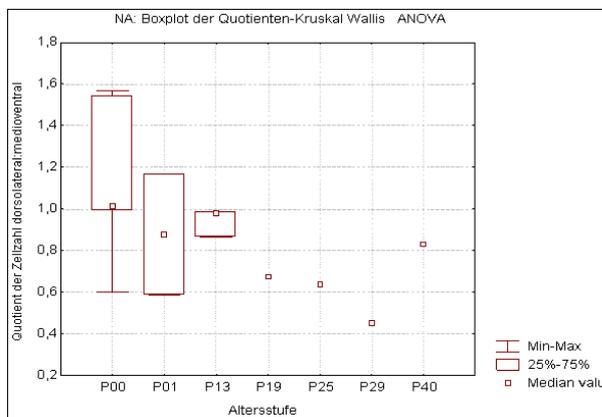


Abbildung 3.3: Boxplots der Quotienten im Vergleich zum Alter in Tagen

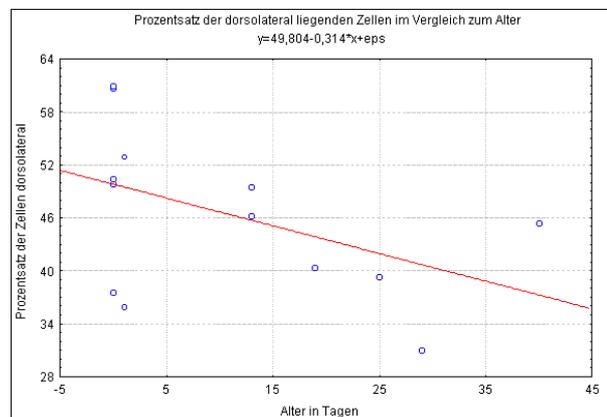


Abbildung 3.4: Prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Altersstufen

Die Prozentzahl der dorsolateral gelegenen CR positiven Zellen im Vergleich zum Alter wies dagegen eine statistische Signifikanz auf ( $R=-0,576501$ ;  $p=0,030926$ ). Trotz der individuellen Varianz erscheint hier eine Korrelation ( $R^2=-0,33235$ ).

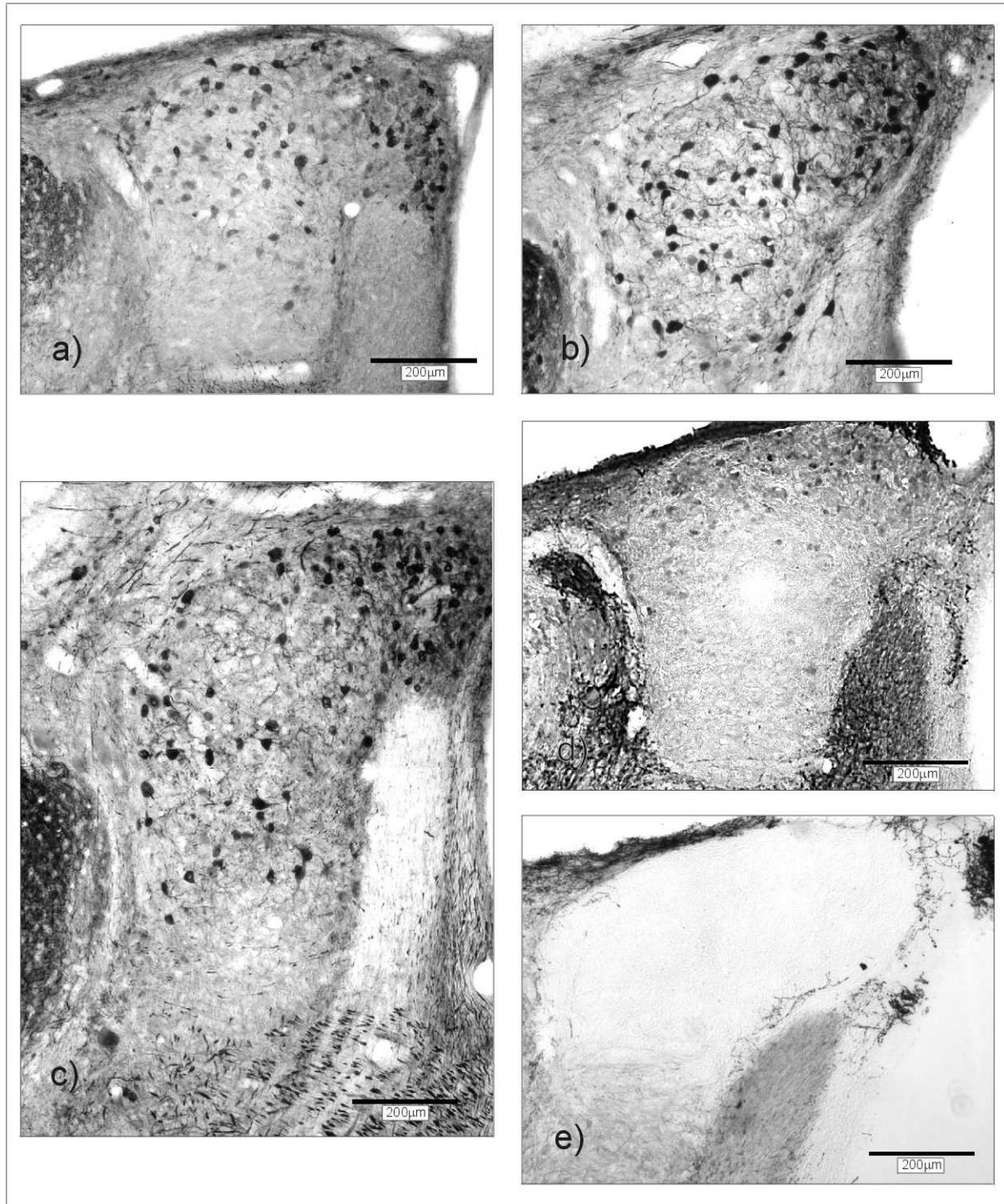


Abbildung 3.5: Immunreaktionen des Nucleus angularis; a) P0, Calretinin; b) P13, Calretinin, die Grenzen des Kerns sind in der Calretininfärbung teilweise nicht deutlich und nur schwer zu bestimmen; c) P40, Calretinin, zusammengesetzt aus zwei Einzelbildern; d) P0, Calbindin<sub>D28k</sub> polyklonal, teilweise deutliche Reaktionen im dorsalen NA, im Gegensatz zu den Arealen, die auch der monoklonale Antikörper färbt, aber deutlich schwächer; e) P13, Calbindin<sub>D28k</sub> monoklonal, entgegen dem polyklonalen Antikörper konnten hier keine immunreaktiven Zellen im dorsalen NA gesehen werden, ventral die Fasern, die horizontal den Kern passieren; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

### 3.1.1.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Für den monoklonalen Calbindin<sub>D28k</sub>-Antikörper konnten im Nucleus angularis keine immunreaktiven Zellen nachgewiesen werden. Bei der Verwendung des polyklonalen Antikörpers wurden teilweise leicht angefärbte Zellen gesehen, die sich in der Intensität nur leicht vom

Hintergrund abhoben. Dazu traten einige Zellen auf, die zum Teil eine deutliche Immunreaktivität zeigten, aber insgesamt schwächer waren als in Bereichen, in denen sowohl der monoklonale wie auch der polyklonale AK eine Anfärbung bewirkte (Abbildung 3.5 d).

In den Schnitten, in denen der NA in seiner vollen Ausdehnung erschien, konnten im ventralen Bereich einzelne Fasern dargestellt werden. Bei den Altersstufen P0 und P1 waren diese nur sehr schwach angefärbt. Ab der Altersstufe P13 waren diese Fasern deutlich zu erkennen (Abbildung 3.5 e). Die höchste Dichte dieser Fasern befand sich dabei stets in der ventralen Spitze des Kerns und nahm nach dorsal hin ab.

In einigen Fällen wurden am dorsalen Rand sehr große Zellen beobachtet, die mit einem Teil ihres Zellkörpers in das Kerngebiet hineinragten, deren Ausläufer jedoch alle in den dünnen Fasertrakt dorsal zwischen NA und dem vierten Ventrikel liefen. Vom Aussehen her entsprachen diese den immunreaktiven Zellen, die in den Ausläufern der cerebellaren Pedunkel gefunden wurden.

### 3.1.2 Nucleus magnocellularis cochlearis

Der Nucleus magnocellularis cochlearis war im Mikroskop leicht an Hand seiner Form und der dichten Zellpackung zu erkennen. Er erschien in Frontalschnitten als flach ovaler Kern, der in der horizontalen seine größte Ausdehnung besaß und nach rostral seine Position leicht nach medial verlagert.

Umgeben wurde er stets von einem deutlich sichtbaren Neuropil. Dies setzt sich zum einen aus dem dorsal einlaufenden Nervus octavus, pars cochlearis zusammen, den ebenfalls auf der Dorsalseite entspringenden efferenten Fasern zum ipsilateralen NL sowie den Fasern auf der ventralen Seite, die zum kreuzenden cochleären Bündel hinzogen.

#### 3.1.2.1 Calretinin

Wie auch für den NA zeigten die Zellen des Nucleus magnocellularis cochlearis eine Antikörperreaktion auf Calretinin. Soweit mittels Kerngegenfärbungen beobachtet werden konnte, zeigten alle Zellen des NM eine positive Reaktion auf Calretinin. Dabei ließen sich jedoch Muster unterschiedlicher Intensitäten erkennen, die in allen Altersstufen kongruent waren.

Zwei unterschiedliche Typen von Zellen konnten identifiziert werden. Im rostralen Bereich des Kerns fanden sich Zellen, die in ihrer Struktur homogen waren. Es handelte sich stets um runde bis ovoide Zellen, bei denen nur kurze oder keine Axone gesehen wurden und überwie-

gend nach horizontal oder ventral ausgerichtet waren. Die Anordnung der Zellen zeigte sich teilweise in Form von Säulen entlang der dorsoventralen Achse (Abbildung 3.6 b). Zwischen den Zellen, welche die Säule bildeten, verliefen Fasern. Die Zusammensetzung bestand aus homogen angefärbten Zellen, die in ihrer Intensität keine Gradienten entlang einer möglichen Achse erkennen ließen.

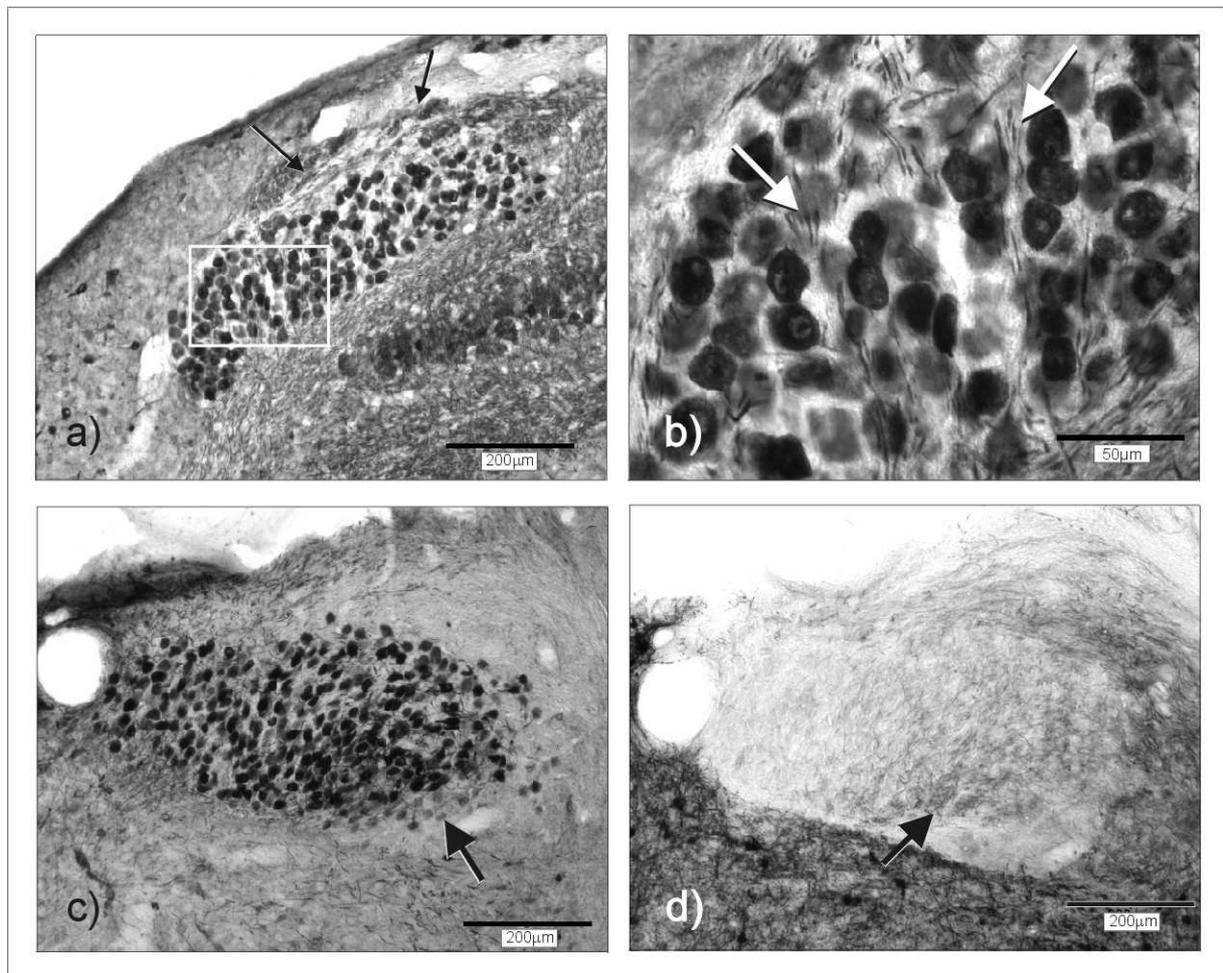


Abbildung 3.6: Immunreaktionen des Nucleus magnocellularis cochlearis; a) P0, Calretinin, dorsal sind sowohl die schwach gefärbten Fasern des NVIIIc, wie auch die stark gefärbten Fasern vom NM zum NL zu sehen (Pfeile); b) P0, Calretinin, vergrößerter Ausschnitt des unter a eingerahmten Areals, die Pfeile markieren die gesehenen Fasern, die zwischen den teilweise säulenartig aufgereihten Isofrequenzneuronen entlanglaufen; c) P13, Calretinin, caudaler Abschnitt des NM, nach lateral hin stehen die Zellen dichter gedrängt und weisen eine andere Form auf (s. Abbildung 3.7 und 3.8), diesen aufliegend befindet sich das im Text erwähnte Band der schwächer gefärbten Zellen (Pfeil); d) P13, Calbindin monoklonal, 40µm hinter dem in c dargestellten Schnitt, im Bereich der sich verändernden caudolateralen Zellen ist die Dichte der CB positiven Fasern deutlich höher (Pfeil); in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

Im caudalen Bereich des NM fanden sich bei allen darauf untersuchten Tieren Zellen, deren Struktur sowohl kantiger war, als auch längere plasmatische Fortsätze trugen als im rostralen Bereich. Dabei war eine Anhäufung dieser Zellen im lateralen Bereich des Kerngebietes zu verzeichnen (Abbildung 3.6 c).

Die Unterschiede im Erscheinungsbild zwischen caudal und rostral werden in den Abbildungen 3.7 und 3.8 gezeigt. Hier sind für die Altersstufen P0, P1, P13 und P40 repräsentativ einige Neurone aus verschiedenen Präparaten ausgewählt und gezeichnet worden. Zusätzlich sind einige Bilder mit hoher Vergrößerung aus den entsprechenden Arealen abgebildet. Es ist zu erkennen, daß die Neurone im caudalen Abschnitt stets kantiger waren und längere Fortsätze trugen als rostral. Im Verlauf des Älterwerdens schienen die Zellen eine fortschreitende Abrundung, wie auch eine Größenzunahme aufzuweisen.

Im caudalen Bereich dieses Kerngebietes traten stets einzelne Zellen auf, bei denen die Intensität der Anfärbung schwächer war (Abbildung 3.6 c). Zudem zeigte sich in allen Altersstufen am lateralen Rand stets ein Saum von diesen Zellen, der sich rostralwärts bis zu der Höhe hinzog, auf der der Nucleus laminaris in den Schnitten im vollen Transekt erschien (zur Übersicht: etwa dem Bereich, der in Abbildung 3.10 c und h gezeigt ist). Diesem Saum legte sich dorsal und lateral ein schmales Band an, welches keine oder nur schwache Anfärbungen aufwies. Soweit beobachtet werden konnte, befanden sich hier nur Fasern (Abbildung 3.6 c).

Umgeben wurde der Nucleus magnocellularis cochlearis stets von einem stark CR-IR positiven Neuropil (siehe auch Abbildung 3.9). Wegen der Dichte der Fasern ließ sich der Verlauf nur schwer bestimmen. Die Fasern, die an der ventralen Seite entsprangen, zeigten eine Ausrichtung, die überwiegend nach medial wies. Die Fasern auf der dorsalen Seite legten den Schluß nahe, daß sie das Kerngebiet sowohl lateral, als auch rostralateral umrundeten. Diese Fasern, die den NM auf der dorsalen Seite verließen, kreuzten sich mit den einlaufenden Fasern des Nervus octavus, pars cochlearis, so daß sich ein teilweise schachbrettartiges Muster ergab, da die Fasern des Nerven von der Intensität her nur dem Hintergrund entsprachen (siehe Abbildung 3.6 a sowie schematische Abbildung 3.10).

Auffällig war besonders, daß die Zellen des NM, im Durchlicht betrachtet, zum Rand hin eine intensivere Färbung aufwiesen als im zentralen Teil. Gleiches galt auch für Fortsätze, die intensiver in der Färbung waren, als die übrige Zelle.

---

Abbildung 3.7 und 3.8 (folgende Seiten): Übersicht über die Zellen des Nucleus magnocellularis cochlearis; im Zentralteil ist jeweils eine Übersicht über verschiedene Zellen des caudalen und rostralen Bereiches gegeben. Der Navigationszeiger in der Mitte trennt dabei jeweils nach rostral und caudal sowie nach den einzelnen Altersstufen. Die Photos stellen hochauflösende Abbildung einzelner CR-IR Zellen des entsprechend zugeordneten Quadranten dar. Zu sehen ist die kantigere Struktur der caudalen Zellen sowie die Größenzunahme bei fortschreitendem Alter; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

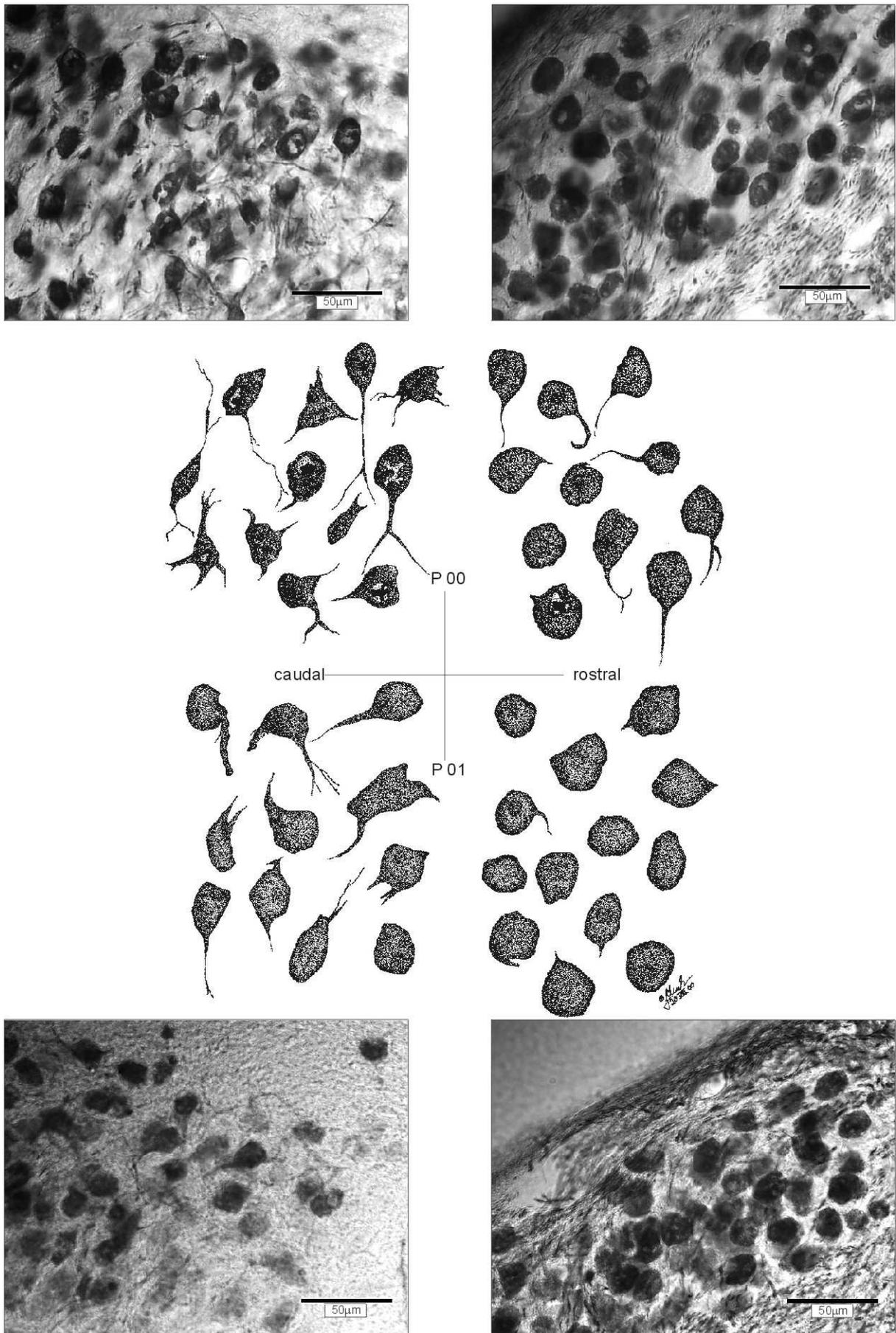


Abbildung 3.7: Erläuterung siehe vorherige Seite

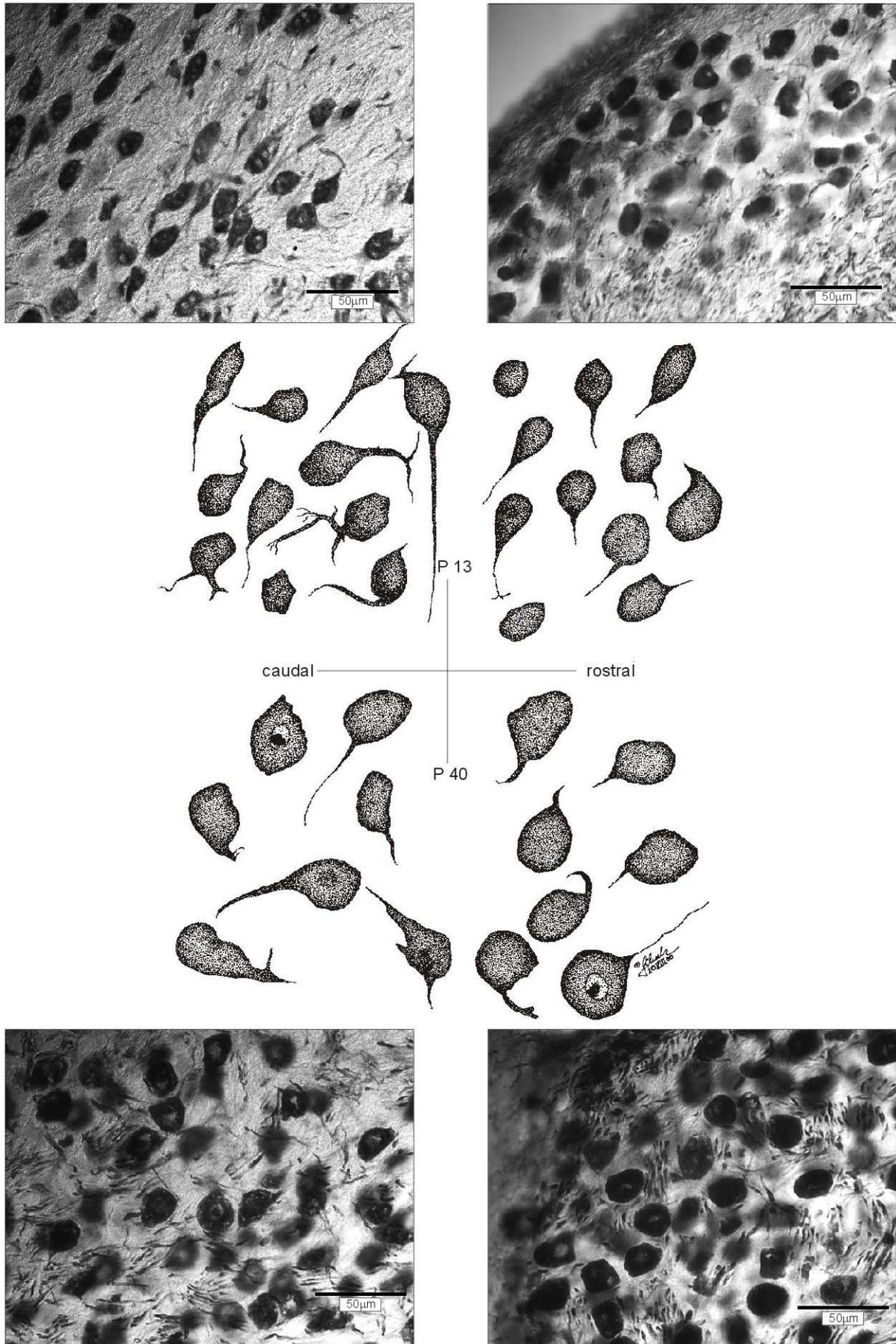


Abbildung 3.8: Erläuterung siehe vorherige Seite

Bei Zellen, die während des Schneidens angeschnitten wurden, ließ sich erkennen, daß man in sie hineinschauen konnte. Es zeigte sich, daß sich keine Reaktionsprodukte des Entwicklungsschrittes im Cytosol befanden. Die Ausnahme bildete der Zellkern, welcher trotzdem angefärbt war und sich in vielen Fällen erkennen ließ (Abbildung 3.7 und 3.8).

### 3.1.2.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

In einigen Fällen war bei dem polyklonalen Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper eine Immunreaktivität wie im Nucleus angularis zu verzeichnen gewesen (Abbildung 3.11 e). Wie bereits beim NA konnte mit dem monoklonalen Antikörper keine CB-IR Zelle angefärbt werden. Der Kern sowie die ihn umgebenden Fasern waren bei einer entsprechenden immunhistochemischen Färbung deutlich abgegrenzt. Zum NL hin war eine Grenze nicht zu erkennen, da dieser ebenfalls keine CB Immunreaktivität zeigte (vergl. 3.1.4.2 und Abbildung 3.11 d).

Auf der dorsolateralen Seite im caudalen Abschnitt des Kerngebietes konnten positive Fasern gesehen werden, die den Kern umrundeten und diesen infiltrierten (Abbildung 3.6 d). Das Auftreten war kongruent zu dem Areal, welches auf Calretinin negativ reagierte und in dem vorwiegend Fasern gefunden wurden. In der Altersstufe P0 und P1 waren diese Fasern ähnlich der Hintergrundfärbung nur schwach gefärbt und sehr dünn. Bei allen älteren untersuchten Tieren war die Intensität stärker. Zusätzlich wurden im caudalen Bereich CB positive Fasern gesehen, die im Bereich der caudolateral gelegenen, kantigen CR-IR Zellen deutlich dichter waren (Abbildung 3.6 d).

### 3.1.3 Akzessorisches Kerngebiet dorsolateral des NM

Neben den drei großen Kerngebieten der afferenten cochleären Hörbahn, die sich im Hirnstamm finden, konnte noch ein viertes dargestellt werden, welches im stereotaktischen Hirnatlas von KUENZEL und MASSON (1988) nicht aufgeführt ist. In den Übersichtszeichnungen finden sich jedoch an den entsprechenden Stellen, wo in den vorliegenden Untersuchungen das Gebiet identifiziert wurde, Areale, in denen die Fasertrakte unterbrochen eingezeichnet sind. Die korrespondierenden Areale sind dort auf den Tafeln P1.2 und P1.4 zu sehen [KUENZEL und MASSON, 1988].

### 3.1.3.1 Calretinin

Dorsolateral des NM ließ sich bei den meisten Tieren ein kleines Gebiet finden, welches aus Calretinin positiven Zellen besteht. Caudal begann dieses bereits in Schnitten, in denen der NA noch nicht voll ausgebildet war und eine dreieckige Form besaß, die nach ventral vom einlaufenden NVIIIc begrenzt wurde (Abbildung 3.10 a, b, f, g). Trotz einer anderen Darstellung war dies auch bei dem jungen Tier (P0) in der Übersichtszeichnung der Fall. Wenige Mikrometer hinter dem in Abbildung 3.10 b dargestellten, begann das Areal. Der NA besaß dort noch nicht seine maximale Ausdehnung. Durch zwei Schnitte, die im entsprechenden Bereich zerstört waren, wurde eine andere Serie mit den oben erwähnten Merkmalen gezeichnet.

Vorzufinden war dieses Gebiet in einem caudorostralen Abschnitt von etwa 240 $\mu$ m (P0) bis 320 $\mu$ m (P40). Die Zellen lagen dabei überwiegend in der Bahn des NVIIIc zum NM. Calretinin positive Fasern tangierten den Kern nur in der Minderheit. Eine Übersicht des caudorostralen Auftretens dieser Zellen ist in Abbildung 3.10 zu finden.

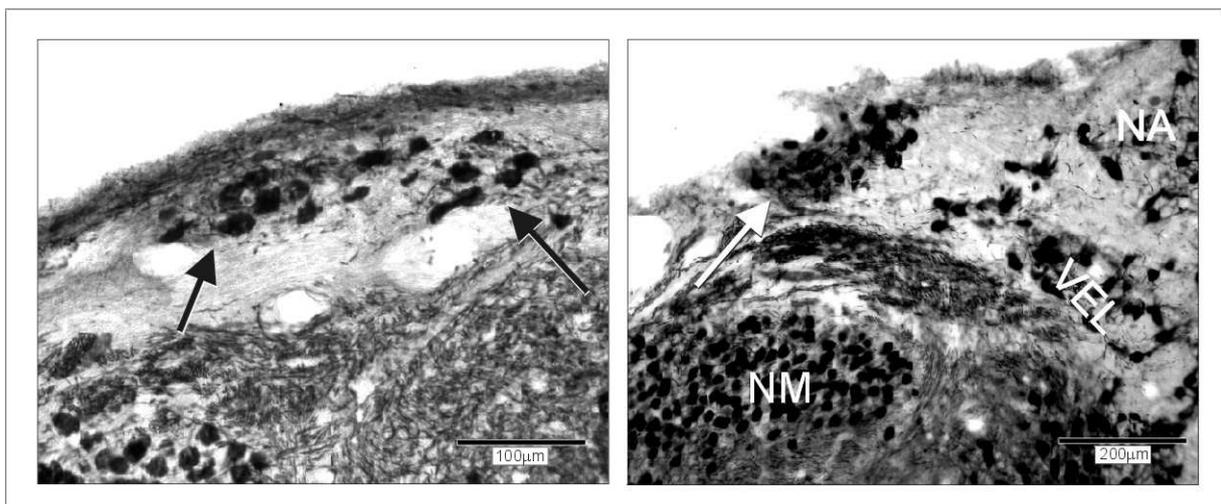


Abbildung 3.9: Lage der hier als akzessorisches Kerngebiet angesprochenen Zellen im dorsalen Hirnstamm; links Vergrößerung der Zellen (Pfeile), rechts Übersicht der Lage dorsal des NM; zu sehen ist die deutliche Absetzung zu den Zellen des VEL und des NA; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

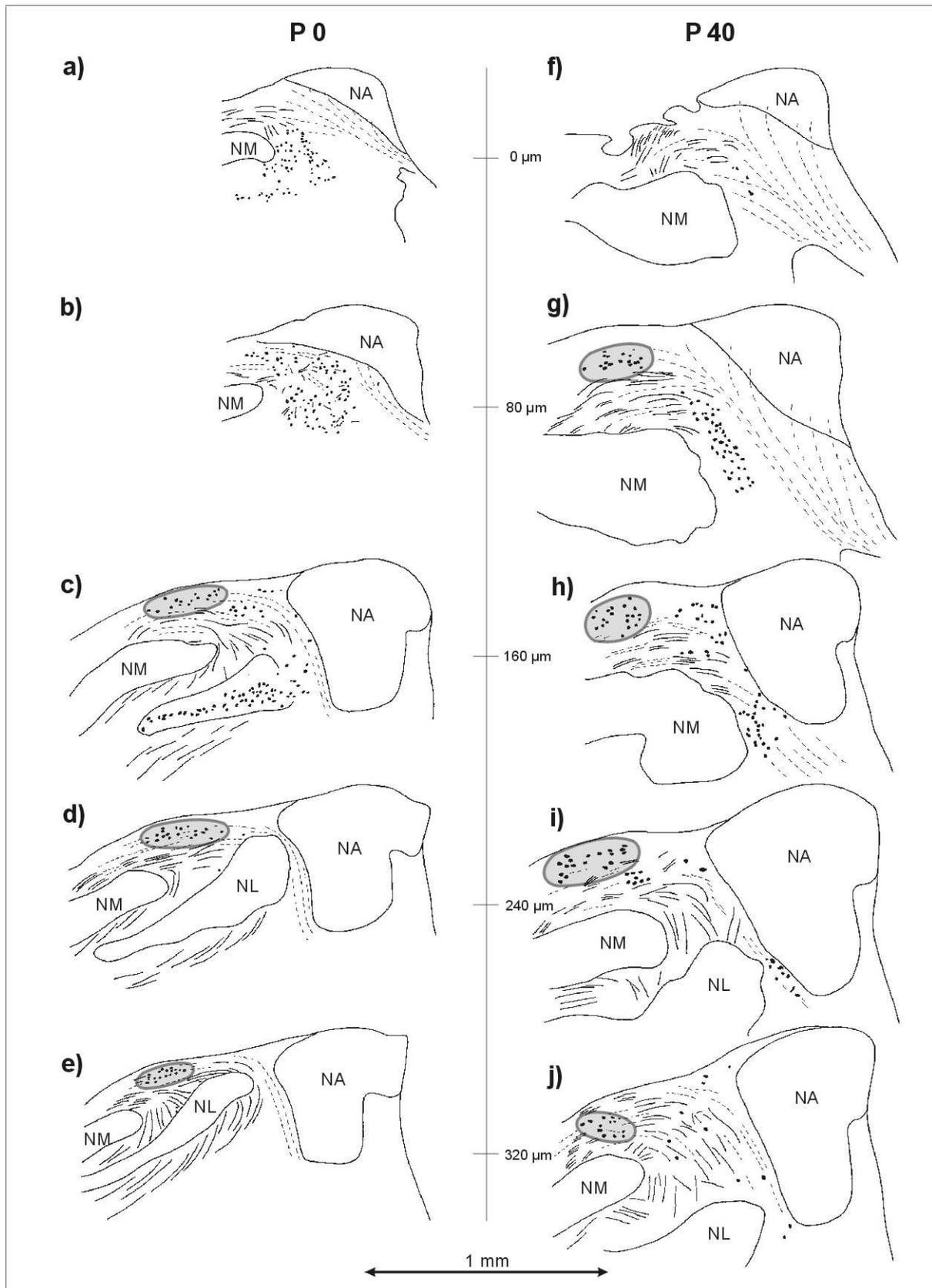


Abbildung 3.10: Übersicht über das Auftreten des akzessorischen Kerngebietes von caudal (0µm) nach rostral (320µm) zweier Tiere. Zellen sind durch schwarze Punkte, Fasern vom NM durch schwarze Linien und einlaufende Fasern des NVIIIc durch gestrichelte Linien dargestellt; Kerngebiete sind nur im Umriß eingezeichnet, wenn ihre Grenzen eindeutig zu bestimmen waren; die Zellen, die hier als akzessorisches Kerngebiet angesprochen werden, sind grau hinterlegt; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

Diese Zellen wurden bereits von verschiedenen Experimentatoren beobachtet [KAISER, persönliche Mitteilung], jedoch noch nicht gesondert beschrieben. In der vorliegenden Untersuchung konnten an Hand des Materials keine Gradienten in Bezug auf Anfärbung oder Zellform entlang der dorsoventralen, mediolateralen oder rostrocaudalen Achse gesehen werden. Weiterhin konnten sowohl lateral des NM, als auch des NL einzelne Zellen gesehen werden, die eine CR-IR aufwiesen. Diese lagen dabei stets außerhalb des sich um den NL intensivierenden Neuropils. Nach lateral wurden sie vom NA begrenzt. Bei sehr jungen Tieren (P0 und P1) lagen die Zellen teilweise sehr dicht dem lateralen Ende des NM an und das Neuropil des NL besaß noch nicht seine maximale Immunreaktivität, so daß eine genau Diskriminierung nicht immer möglich war. Ein solcher Fall ist in der Übersichtszeichnung von HK48 (P0, Abbildung 3.10 c und h) zu sehen, wo aus den genannten Gründen der NL nicht als geschlossenes Gebiet, sondern einzelne Zellen eingezeichnet wurden. Diese Zellen sind durch den räumlichen Abstand zum dorsal gelegenen akzessorischen Kerngebiet vermutlich nicht diesem zuzuordnen, sondern gehören zum VEL.

#### 3.1.3.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

In diesem Bereich konnten weder CB positive Fasern noch Zellen gesehen werden. Auch im näheren Umfeld waren keine Färbungen anzutreffen, so daß hier keine Möglichkeit zur Identifizierung gegeben war. Nur an Hand von Gegenfärbungen waren diese Zellen in CB-Schnittserien darstellbar.

#### 3.1.4 Nucleus laminaris

Der Nucleus laminaris ist ein langgestrecktes Kerngebiet entlang dessen mittlerer Achse sich die Neurone befinden, welche von einem starken Neuropil umgeben werden. An Hand der Immunhistochemie konnten keine Untergliederungen ausgemacht werden.

##### 3.1.4.1 Calretinin

Wie auch für den NM beschrieben, zeigten hier alle Zellen in allen Altersstufen eine deutliche Immunreaktion auf Calretinin.

Innerhalb des NL ließ sich eine erhöhte Zahl von Zellen im lateralen Anteil finden. Hier ist das Prinzip der perlschnurartigen Aufreihung der Zellen nicht mehr klar vorzufinden gewesen, welche im medioventralen Teil deutlich zu sehen war. Es erschienen oft zwei bis drei Zellen parallel nebeneinander (siehe auch Abbildung 3.10 c).

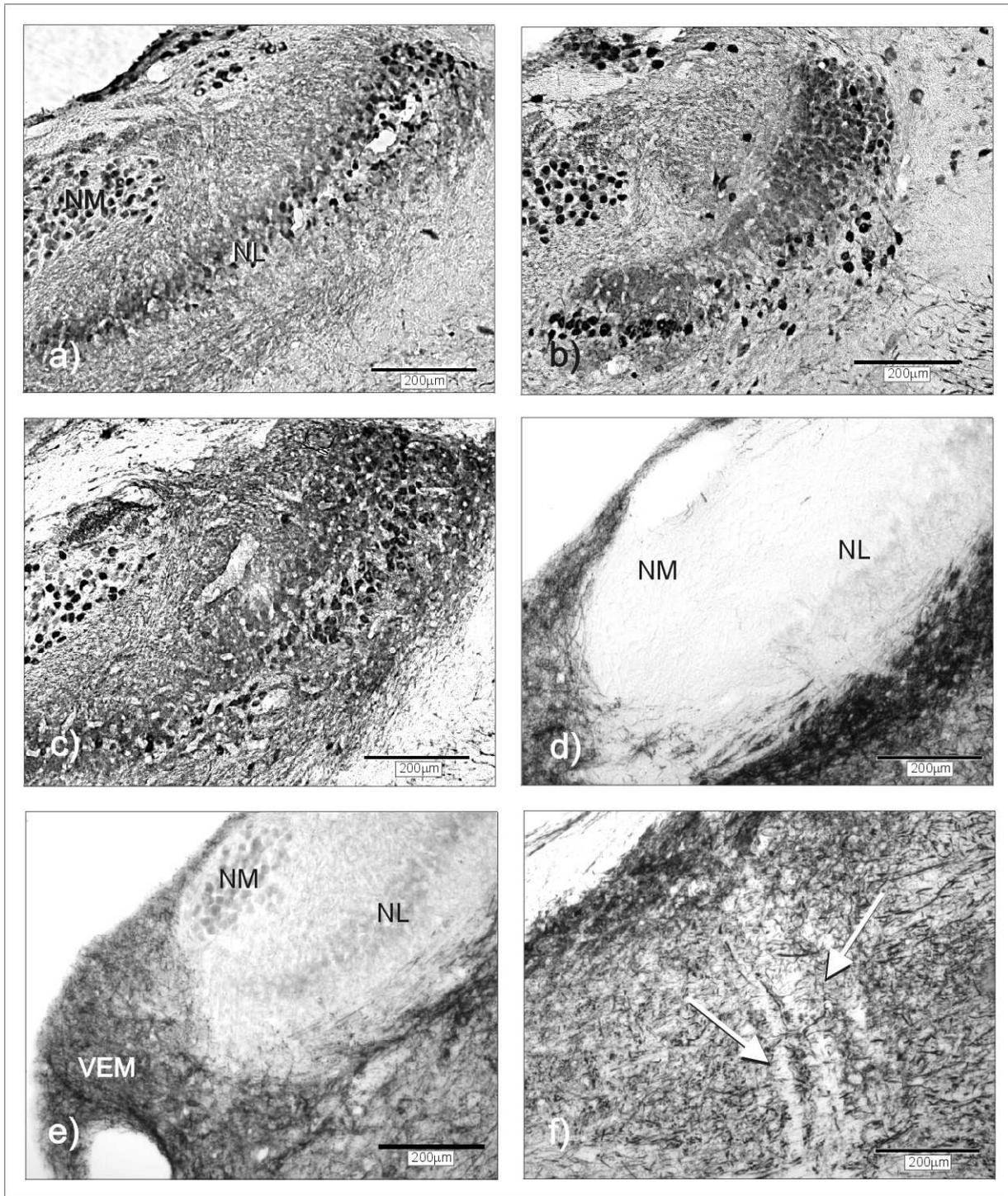


Abbildung 3.11: Immunreaktionen des Nucleus laminaris; a) P0, Calretinin; b) P1, Calretinin; c) P13, Calretinin; d) P1, Calbindin monoklonal, der monoklonale Antikörper zeigt weder im NM noch im NL eine Immunreaktion; e) P0, Calbindin polyklonal, Kreuzreaktion des polyklonalen Antikörpers; neben den deutlichen Reaktionen in den vestibulären Kernen weisen auch NM und NL eine diffuse Färbung auf; f) P0, Calbindin monoklonal, die projizierenden CB negativen Fasern vom NL passieren den VED und sind bereits ab der Altersstufe P0 zu erkennen (Pfeile); in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

Zusätzlich schienen die Neurone in diesem Gebiet breite Bereiche zu bilden. Bei näherer Betrachtung und einer genaueren Analyse der Lage innerhalb eines Schnittes ließ sich erkennen, daß diese Anhäufungen von Neuronen meist in verschiedenen Parallaxen zueinander lagen. Dies war nur deutlich unter dem Axioplan-Mikroskop zu erkennen. Denkt man sich die Neurone als Punkte auf einer Ebene, so verändert diese ihre Steigung. Von der Lage unterhalb des Nucleus magnocellularis cochlearis knickt sie ab und dringt weiter dorsorostral in den Bereich unterhalb des vierten Ventrikels vor (Abbildung 3.11 c), wobei sie den NM in einem gewissen Abstand umhüllt (siehe auch Abbildung 3.1).

Diese Lageveränderung bildete sich erst innerhalb der ersten zwei Lebenswochen deutlich aus. Bei sehr jungen Tieren erschien der NL noch nicht so ausgeprägt und verblieb größtenteils ventral des NM (Abbildung 3.11 a und b).

Einzelne Axone und Dendriten des NL waren nur sehr schwer auszumachen, da diese sehr kurz waren und sich das dichte Neuropil direkt um den Kern noch einmal verstärkte.

Durch alle Altersstufen kam es vor, daß der dorsolaterale Abschnitt des NL nicht immer eindeutig vom NM zu trennen war, da sie fast aneinander grenzten. Zum anderen befanden sich häufig einzelne Neurone im lateralen Grenzbereich, die nicht genau zugeordnet werden konnten. Diese lagen nicht innerhalb der zellulären Schicht, die der NL ausbildet und wiesen keinen Anschluß zu dem vorhandenen Neuropil auf. Auch hier handelte es sich wahrscheinlich um einzelne Neurone, die zum VEL gehörten (vergleiche auch 3.1.3.1).

#### 3.1.4.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Wie auch beim NM war im Nucleus laminaris keine Immunreaktivität auf Calbindin<sub>D28k</sub> vorhanden. Auch hier hob sich das Kerngebiet bei entsprechenden immunhistochemischen Behandlungen vom umgebenden positiv reagierenden Gewebe ab. Im dorsalen Anschluß ließ sich, wie bereits erwähnt, keine Grenze zum NM ziehen. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung von Neuronen und Fasern war nicht gegeben (Abbildung 3.11 d).

In einzelnen Schnitten färbte der polyklonale Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper sowohl Zellen als auch Fasern diffus an (Abbildung 3.11 e). Besonders in dem sich um das Kerngebiet herum verstärkenden Neuropil war dies deutlich. Zeitgleich traten in den Schnitten dann auch im NA und NM diffuse Muster auf.

### 3.1.5 Nucleus olivaris superior

Die Oliva superior erscheint in den Querschnitten als rundliches Kerngebiet im ventrolateralen Bereich des Hirnstammes. Die Ausdehnung in der rostrocaudalen Achse ist um ein Vielfaches höher als die der anderen auditorischen Kerne im Stammhirn.

Lateral befindet sich nur noch ein schmaler Bereich, der zwischen etwa  $150\pm 25\mu\text{m}$  (P0) und  $230\pm 20\mu\text{m}$  (P40) breit ist und den Kern von der Oberfläche des Hirns trennt. Dieser besteht aus zwei gleich breiten Abschnitten, wobei der Äußere, lateral gelegene, überwiegend Fasern besitzt, wogegen im Inneren, der direkt den Kern tangiert, zusätzlich noch Zellen gesehen wurden, von denen einzelne Verbindungen in das Kerngebiet ausgehen konnten. Dies konnte an Hand der beiden verwendeten AK gesehen werden. Eventuell andere Unterteilungen waren durch die hier verwendeten immunhistochemischen Behandlungen nicht ersichtlich.

Durch das Fehlen anderer charakteristischer Kerngebiete in der direkten Umgebung war eine deutliche Bestimmung häufig schwierig. Zudem wurde das Kerngebiet nicht auf der Höhe gefunden, mit der es im stereotaktischen Atlas von KUENZEL und MASSON (1988) angegeben wird. In allen Fällen lag das Areal, welches hier als die superiore Olive identifiziert wurde, weiter ventral.

Eine Untergliederung in Subkerne konnte nicht vorgenommen werden.

#### 3.1.5.1 Calretinin

In den Altersstadien P0 sowie P1 ließ sich die Position der Oliva superior häufig nicht allein an Hand der Immunreaktion auf Calretinin bestimmen. Die Intensität der Färbung ist von der Stärke her etwa identisch mit der des umliegenden Gewebes (Abbildung 3.12 a und c). Um das Kerngebiet deutlich abzugrenzen, wurden benachbarte Calbindin<sub>D28k</sub> Schnitte zum Vergleich herangezogen, die  $40\mu\text{m}$  vor oder hinter dem entsprechenden CR Schnitt lagen (Abbildung 3.12 b). Als weitere Hilfe diente die Tatsache, daß im Randbereich, vermutlich aufliegend, häufig Axone zu erkennen waren, welche die OS zu umrunden schienen (Abbildung 3.12 a).

Abbildung 3.12 (folgende Seite): Immunreaktionen des Nucleus olivaris superior; a) P0, Calretinin, caudales Drittel, das Kerngebiet hebt sich nur sehr schwach vom umgebenden Gewebe ab; b) P0, Calbindin monoklonal,  $40\mu\text{m}$  weiter rostralwärts als Bild a; durch den Vergleich mit CB Schnitten ist die Position leicht zu identifizieren; c) P1, Calretinin, bereits eine leichte optische Kontrastierung zum umgebenden Gewebe ist erkennbar; d) P13, Calretinin, caudales Drittel; e) P40, Calretinin, rostraler Abschnitt; f) P40, Calbindin monoklonal, im markierten Bereich liegt die im Text erwähnte Zelle die außerhalb des Kerngebietes lag, deren Ausläufer sich jedoch überwiegend innerhalb der OS befanden; g) Camera lucida Zeichnung der unter Bild f eingefassten und im Text beschriebenen Zelle; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

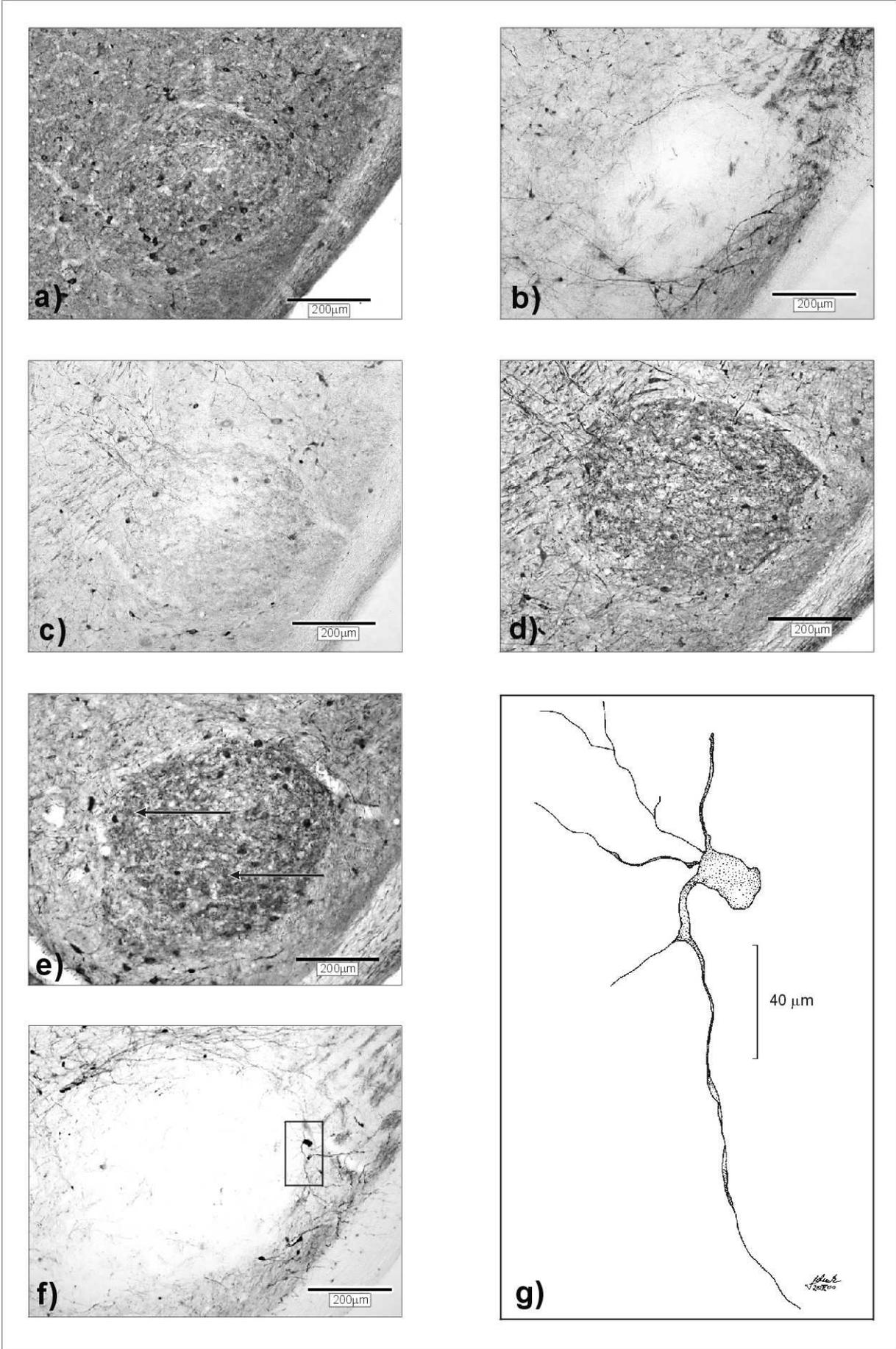


Abbildung 3.12: Erläuterung siehe vorherige Seite

Innerhalb der OS ließ sich keine vergleichbar hohe Ordnung erkennen. Außerdem konnte in einigen Fällen bereits anhand der Fasern, die aus den weiter caudal gelegenen auditorischen Kernen einliefen, erkannt werden, wo die OS lag (Abbildung 3.12 d, im Bild links oben). Diese Fasern wurden nur im caudalen Drittel der OS vorgefunden, nicht aber in den rostralen Abschnitten (Abbildung 3.12 e).

Im Kern selbst waren stets einzelne Zellen zu finden, die eine deutliche CR-IR aufwiesen. Daneben ließen sich auch Zellen zeigen, deren Immunfärbung nur schwach war (exemplarisch dargestellt in Abbildung 3.12 e, Pfeile). Anhand der Gegenfärbung ließ sich erkennen, daß auch hier sehr viel mehr Zellen vorhanden, als immunreaktiv waren. Die Gesamtzahl der immunreaktiven Neurone variierte in den hier untersuchten Tieren nicht stark und auch das Verteilungsmuster ließ keinen Rückschluß auf eine mögliche Untergliederung in Subkerne zu. Zur Altersstufe P1 hin ließ sich bereits eine leichte optische Kontrastierung verzeichnen (Abbildung 3.12 c). Entweder nahm die Färbung innerhalb des Kerngebietes zu, außerhalb ab oder beides. In jedem Fall war die OS bereits als leichter Schatten zu identifizieren.

In allen älteren untersuchten Altersstadien ließ sich der Nucleus olivaris superior deutlich vom umgebenden Gewebe abgrenzen (Abbildung 3.12 e). Die Gesamtfärbung im umgebenden Gewebe hatte in diesen Altersstadien deutlich ab- und innerhalb der Olive zugenommen. Im inneren Abschnitt des Bandes, das den Kern gegen die Oberfläche hin abgrenzt, sind einzelne CR-IR Zellen gefunden worden.

#### 3.1.5.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Innerhalb der Oliva superior sind keine CB-IR Zellen gefunden worden. Die OS stach stets als weißes Areal hervor. Jedoch zeigte sich, daß im umliegenden Gewebe stets Calbindin<sub>D28k</sub> positive Fasern und Zellen vorhanden waren (Abbildung 3.12 b und f). Dies war in einigen Fällen hilfreich, um die Position des Kernes in auf Calretinin immunreaktiv behandelten Schnitten genau lokalisieren zu können. Besonders bei sehr jungen Tieren (P0 und P1) stellte dies eine große Hilfe dar, da sich die OS, wie oben beschrieben, hier häufig nur sehr schwer vom angrenzenden Gewebe diskriminieren ließ (Abbildung 3.12 b). Auch bei den älteren Tieren konnte durch diese Methode die Lage der Olive genau bestimmt werden (Abbildung 3.12 f).

Es ließen sich in allen Altersstufen einzelne CB positive Fasern erkennen, die innerhalb des Kerngebietes lagen. Interessanterweise wurden lateral und nur auf etwa gleicher Höhe mit dem Nucleus olivaris superior einzelne CB-IR Zellen gefunden. Lokalisiert sind diese in dem bereits erwähnten, schmalen medialen Streifen, der den Kern von der Hirnoberfläche trennt.

In einem Fall (HK49, P40) ließ sich sogar eine CB positive Zelle erkennen (monoklonaler Antikörper), welche scheinbar nicht mehr innerhalb des Kerngebietes lag, ihre Dendriten sich jedoch in diesem verzweigten (Abbildung 3.12 f). Diese Zelle ist als Camera lucida Zeichnung vergrößert in Abbildung 3.12 g dargestellt. Alle Ausläufer, die nach medial wiesen, lagen dabei innerhalb des Kerngebietes. Nur der Fortsatz, der nach ventral wies zog in den bereits erwähnten medialen Streifen. Da in dem Material keine morphologische Struktur gesehen wurde, die auf das Axon hindeutete, läßt sich nicht sagen, wo der mögliche Projektionsort lag.

Im Verhältnis zu den CR positiven Zellen lagen die CB Zellen in einer höheren Abundanz vor. Zudem waren die CB positiven Zellen stets größer und intensiver gefärbt als im CR-Material.

### 3.1.6 Nucleus lemniscus lateralis

Der Nucleus lemniscus lateralis ist der erste Kern der afferenten Hörbahn, der sich nicht mehr im Myelencephalon befindet und der einzige, der im Metencephalon lokalisiert ist. Er befindet sich dabei am lateralen Rand direkt ventralwärts vom Nucleus semilunaris (SLU). In den Schnitten zeigt er sich als oval mit der größten Ausdehnung in der dorsoventralen Achse.

#### 3.1.6.1 Calretinin

Wie bei den vorherigen Kernen reagieren auch die Zellen des Lemniscus lateralis Calretinin positiv. Die Trennung in den Nucleus lemnisci lateralis, pars ventralis sowie den pars intermedia war erkennbar.

Innerhalb des Kerngebietes finden sich viele CR-IR Fasern. Dazwischen lassen sich Zellen erkennen. Anhand von Gegenfärbungen ist zu erkennen, daß nicht alle Zellen innerhalb des LL eine Immunreaktivität aufwiesen.

Die immunreaktiven Zellen befanden sich dabei fast ausschließlich auf der lateralen Seite des LL. Im medialen Abschnitt wiesen sie zudem eine verringerte Intensität der Immunfärbung und eine geringere Anzahl auf. Dazu ist die Dichte der CR immunreaktiven Fasern auf der medialen Seite höher als auf der lateralen.

Die Ausdehnung des Subkerns LL, pars intermedia (LLi) beginnt an der dorsalen Spitze des LL und zieht von dort auf der lateralen Seite nach ventral, wobei er nur in den etwa oberen zwei Dritteln zu sehen ist. Im Verlauf verjüngt er sich von dorsal nach ventral.

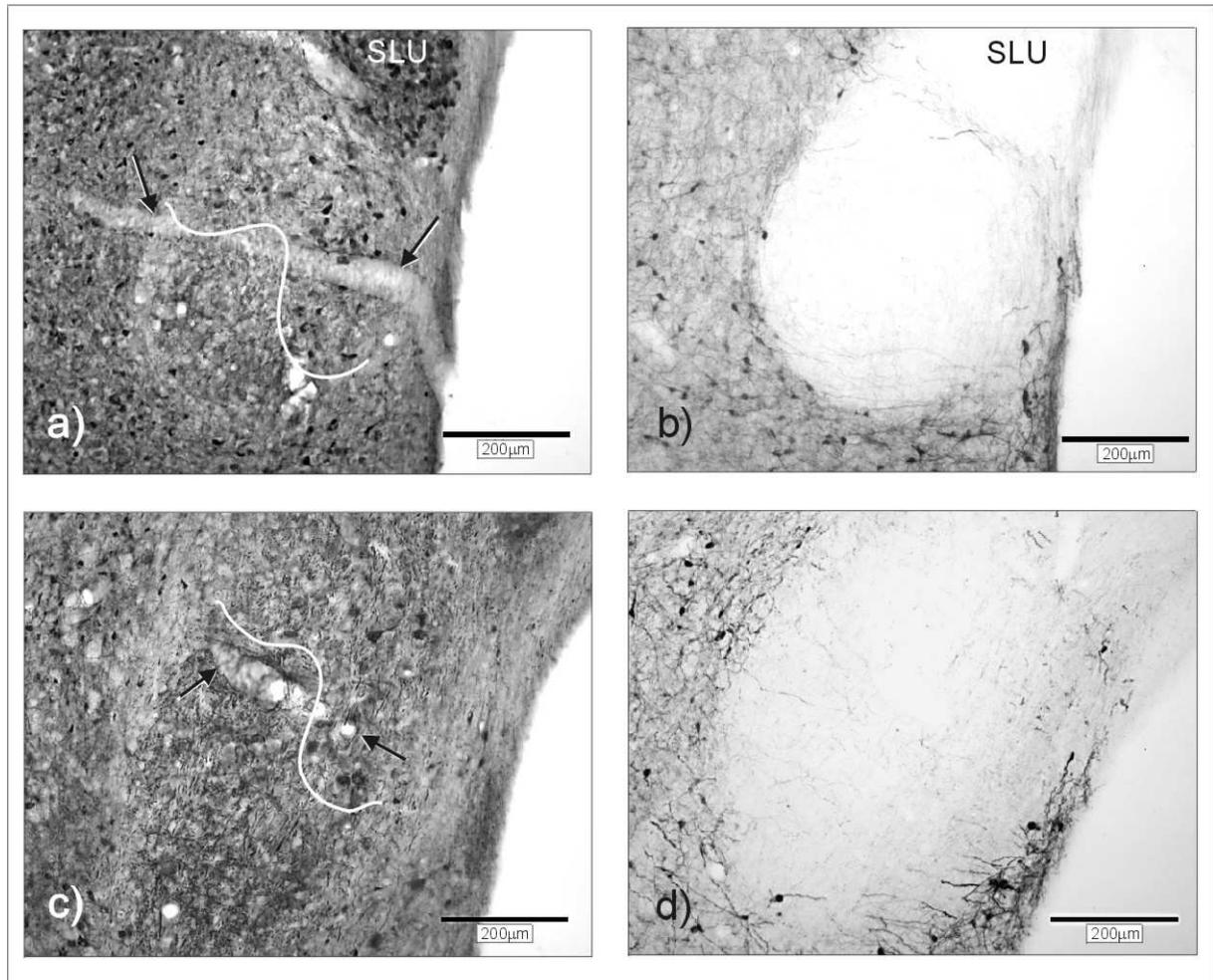


Abbildung 3.13: Immunreaktionen des Nucleus lemniscus lateralis; a) P0, Calretinin; b) P0, CB monoklonal; c) P40, Calretinin; d) P40, CB monoklonal, die im Text erwähnten Blutgefäße sind auf den Bildern durch Pfeile gekennzeichnet; die Trennlinie zeigt die Grenze zwischen dem LLi und LLv; die Bilder b und d sind jeweils 40 µm hinter den Abbildungen a und c gelegen; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

Dieser Kern sitzt dem Nucleus lemniscus lateralis, pars ventralis (LLv) im dorsalen Bereich dachartig auf. Dafür besitzt der LLv im ventralen Bereich eine größere Ausdehnung, so daß der Gesamtkern im Umriß wieder oval erscheint. In den jungen Altersstufen konnte ein erhöhter Hintergrund oder eine teilweise schwächere Immunreaktion dieses Erscheinungsbild abschwächen.

Da diese beiden Subkerne in anderen Immunfärbungen sehr schlecht zu diskriminieren sind, wird statt dessen häufig ein größeres Blutgefäß zur Abgrenzung verwendet [KAISER, persönliche Mitteilung], welches den Kern horizontal passiert (Abbildung 3.13 a und c, Pfeile). Die Lage wurde dabei immer zwischen dem unteren Drittel bis etwa zur Hälfte der Höhe des Kerns ausgemacht, jedoch nicht in allen Schnitten angetroffen.

Weiter rostral endet der Kern schnell, und es sind nur noch die über die gesamte Breite auslaufenden CR positiven Fasern zu erkennen.

### 3.1.6.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Wie in den bereits vorherig beschriebenen Kernen, ist auch hier wiederum keine Immunreaktivität einer Zelle auf Calbindin<sub>D28k</sub> zu finden gewesen. Umliegend wird der LL von CB-IR Gewebe kelchartig eingefasst. Sowohl ventral als auch lateral und medial war diese Reaktivität vorzufinden. Auf der dorsalen Seite, wo die Fasern in Richtung des MLD ausliefen, fand sich dagegen keine Färbung.

Im ventralen Teil des Kerngebietes (LLv) konnten ab der Altersstufe P0 einzelne, dünne Fasern gefunden werden, die den Kern horizontal passierten (Abbildung 3.13 b). Bei älteren Tieren waren diese ebenfalls dünn, konnten aber im gesamten Subkern gefunden werden. Ab der Altersstufe P13 waren ebenfalls im dorsal aufsitzenden Subkern Fasern zu finden, die dann der dorsoventralen Achse folgten (Abbildung 3.13 d).

### 3.1.7 Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis

Innerhalb des Kerns wurde ein für alle Altersstufen gleichermaßen charakteristisches Verteilungsmuster der beiden Immunreaktivitäten gefunden. Die Muster wiesen dabei nur minimale Überlappungen auf und sind in der Abbildung 3.14 exemplarisch für ein Tier der Altersstufe P40 dargestellt. Areale, die immunreaktive Fasern aufwiesen, sind dabei grau hinterlegt und angefärbte Zellen durch einen Punkt dargestellt.

#### 3.1.7.1 Calretinin

Der gesamte Kern wurde gegen den Ventrikel von einem Band begrenzt, welches eine deutliche CR-IR aufwies. Sowohl dorsomedial, als auch lateroventral verlängerte sich dies und zog um den Ventrikel herum ins Optische Tectum. Die angefärbten Zellen in diesem Band waren durchweg fusiform. In der Altersstufe P0 waren diese noch schwächer angefärbt, nahmen aber schnell in der Intensität zu. Ab dem Alter P13 zeigten sie sich sehr deutlich. Die Ausrichtung der Fortsätze erschien ab diesem Alter streng geordnet, indem sie stets parallel zum Ventrikel verliefen. Bei jüngeren Tieren war dies noch nicht so deutlich ausgeprägt.

---

Abbildung 3.14 (folgende Seite): Schematische Übersicht der Calbindin- und Calretininimmunreaktivität im MLD einer rechten Hirnseite; die dorsolaterale Linie, die die Struktur jeweils begrenzt stellt den lateralen Ventrikel dar; einzelne immunreaktive Zellen sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet, reaktive Fasern durch grau hinterlegte Areale.

---



Abbildung 3.14: Erläuterung siehe vorherige Seite

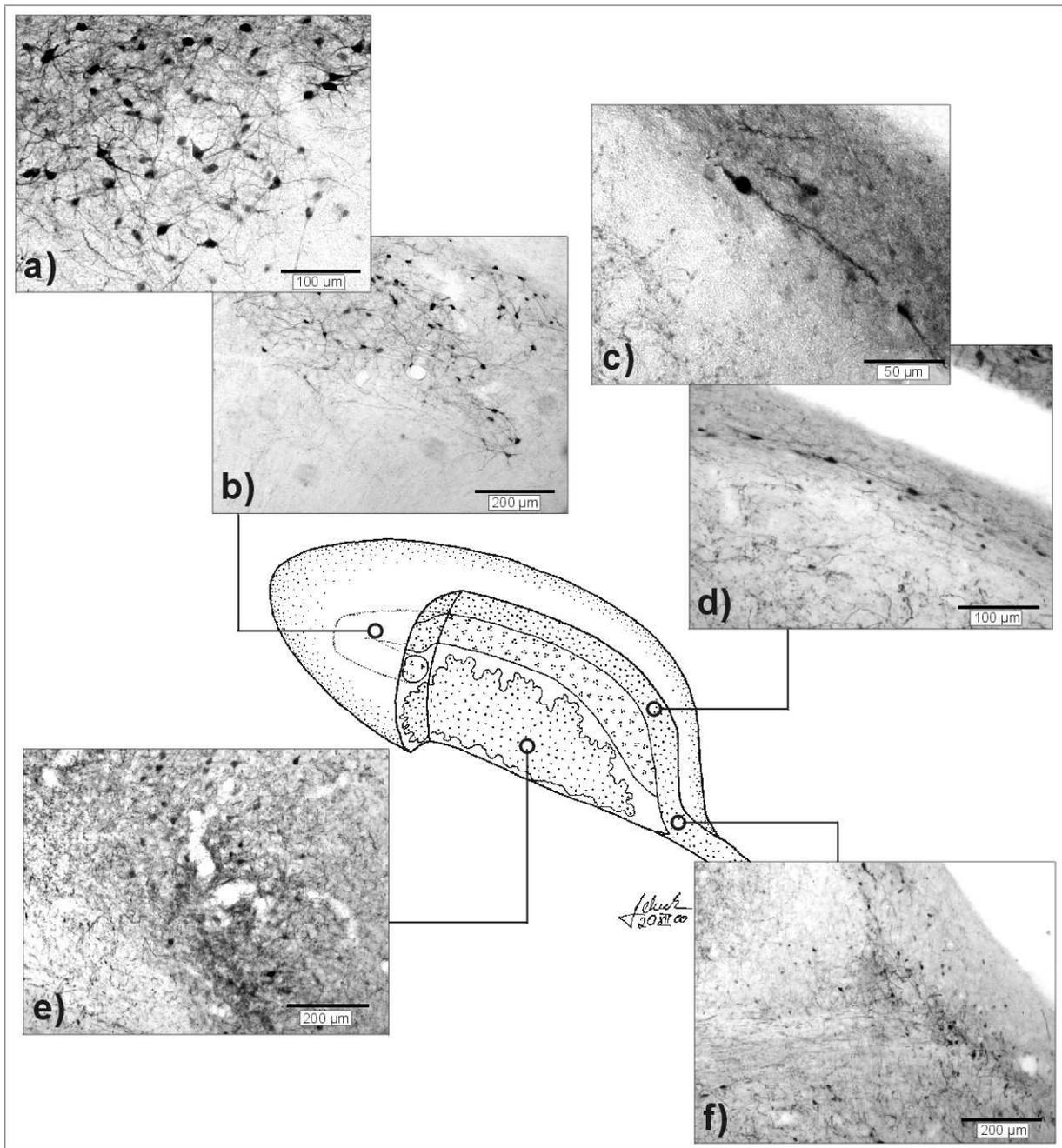


Abbildung 3.15: Zellen des MLd; a) P1, Calbindin monoklonal, rostrale, dorsomediale Zellen; b) P40, Calbindin monoklonal, der im Text erwähnte Zellbogen, der medial aus dem gleichen CB positiven Band hervorgeht, wie das Band unterhalb der äußersten CR Schicht; c) P1, Calretinin, Zellen in dem CR positiven Band unterhalb des Ventrikels, welches dem Externen Nucleus der Schleihereule entsprechen könnte; d) P40, Calretinin, Angaben wie Bild c, nur daß die Fortsätze der fusiformen Neurone in dieser Altersstufe eine strengere Ausrichtung erfahren haben; e) P40, Calretinin, CR positive Fasern sowie einzelne Zellen des Core Bereiches; f) P40, Calretinin, der CR positive Streifen, in dem die in den Bildern c und d gezeigten Zellen liegen, zieht ventral vom MLd zum optischen Tectum und löst sich dort auf; in allen Fällen dorsal oben und lateral zur Rechten.

Im Inneren des Kerns wurde stets ein immunreaktives Areal gesehen, dessen Grenze meandrierte und keine scharfe Abgrenzung aufwies (Abbildung 3.14 rechte Hälfte). Besonders deutlich war dies stets auf der Seite des Ventrikels. Von caudal nach rostral fanden sich

immer einzelne Felder, die sich durch eine besonders intensive Färbung auszeichneten (in der Abbildung 3.14 dunkelgrau). Diese verschoben sich von ventral nach dorsal, je weiter man sich dem rostralen Ende des Kerns näherte und zeigten eine besonders hohe Dichte an CR positiven Fasern.

Im caudalen Bereich wurden stets Fasern gesehen, die nur eine schwache Immunreaktivität aufwiesen und orthogonal zur Fläche des ventralen MLd verliefen und in diesen hineinzogen. Durch Verfolgung konnte festgestellt werden, daß es sich dabei um Fasern vom Lemniscus lateralis handelte. Im rostralen Bereich waren diese nicht mehr zu sehen und wurden bald durch tektobulbäre Fasern ersetzt, die an der ventralen Fläche des MLd entlangliefen (Abbildung 3.14, +1000µm und +1240µm).

#### 3.1.7.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Die Calbindin Immunreaktivität beschränkte sich fast nur auf den Raum, der zwischen den beiden Calretinin positiven Feldern liegt. Es gibt nur sehr wenige Überlappungen, wobei nicht genau gesagt werden kann wie stark diese sind, da die Schnitte jeweils einen Abstand von mindestens 40µm haben und nicht im selben Schnitt mit zwei Antikörpern gearbeitet wurde.

Die in der Abbildung 3.14 +240µm und +480µm gezeigten Areale sind für alle Tiere charakteristisch gewesen. Stets wurde caudal am dorsomedialen Ende eine Aufspaltung des Areals gesehen, von dem der ventrale Zellbogen wie ein Finger in Richtung des CR positiven Areals des Cores zeigte.

Die angefärbten Zellen waren in allen Altersstufen multipolar und wiesen einen hohen Verzweigungsgrad auf.

### **3.2 Faserverbindungen zwischen den einzelnen Kerngebieten**

#### 3.2.1 Einlaufende Fasern des Hörnerven und Innenohr

Die Ohren befanden sich alle in einem schlechten Zustand, so daß die Auswertung lückenhaft ist. Es konnten keine Angaben gemacht werden, ob sich altersbedingte Unterschiede zeigen. Weiterhin zeigte die hier verwendete immunhistochemische Methode deutliche Unterschiede in der Intensität der Anfärbung.

Im mikroskopischen Bild waren vom Hörnerven zwei Anteile zu unterscheiden. Im caudalen Bereich ließ sich der cochleäre Anteil (NVIIIc) vom weiter rostral gelegenen vestibulären Teil (NVIIIv) unterscheiden.

#### 3.2.1.1 Calretinin

Ohr: Im Bereich der Haarzellen konnten nur einzelne Calretinin positive Fasern beobachtet werden, die sich zwischen diesen verzweigten (Abbildung 3.16 b). Zudem konnte ein dichtes Netz von CR positiven Zellen gesehen werden, welches sich über den gesamten Limbus legte (Abbildung 3.16 c).

NVIIIc: Die Fasern waren bei allen Altersstufen nur sehr schwach gefärbt, aber deutlich genug, um den Verlauf zu erkennen. Vom Nervenstumpf einlaufend zogen Fasern zum einen in den NA und zum anderen weiter und in den NM, wo sie sich weit verzweigten (Abbildung 3.16 d). Im NA war besonders zu erkennen, daß sie in die dorsolaterale Spitze zogen noch bevor der Kern in den Schnitten voll erschien. Weiter rostral konnten keine ähnlichen Beobachtungen mehr gemacht werden.

NVIIIv: Auch hier ist nur eine schwache Anfärbung zu verzeichnen gewesen.

#### 3.2.1.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Ohr: Im Bereich des Innenohrs ließ sich nur an den Haarzellen eine CB-Reaktivität darstellen. Dabei waren nicht die gesamten Haarzellen angefärbt, sondern nur die Stereovilli auf diesen. Weitere Beobachtungen konnten für Calbindin nicht gesondert gemacht werden.

NVIIIc: Innerhalb der Fasern des cochleären Anteils konnten nur sehr wenige und dünne CB positive Fasern gesehen werden. Nur in dem Bereich des caudalen NM waren positive Fasern zu sehen, wie bereits dort beschrieben (Abbildung 3.6 d und 3.11 d).

NVIIIv: Im vestibulären Teil des Hörnerven sind deutliche und intensive immunhistochemische Reaktionen mit dem CB Antikörper gesehen worden (Abbildung 3.16 e und f). Es ließ sich keine besondere CB-Verbindung zu den auditorischen Kernen erkennen. Alle Fasern die einliefen, zogen zu anderen Kerngebieten.

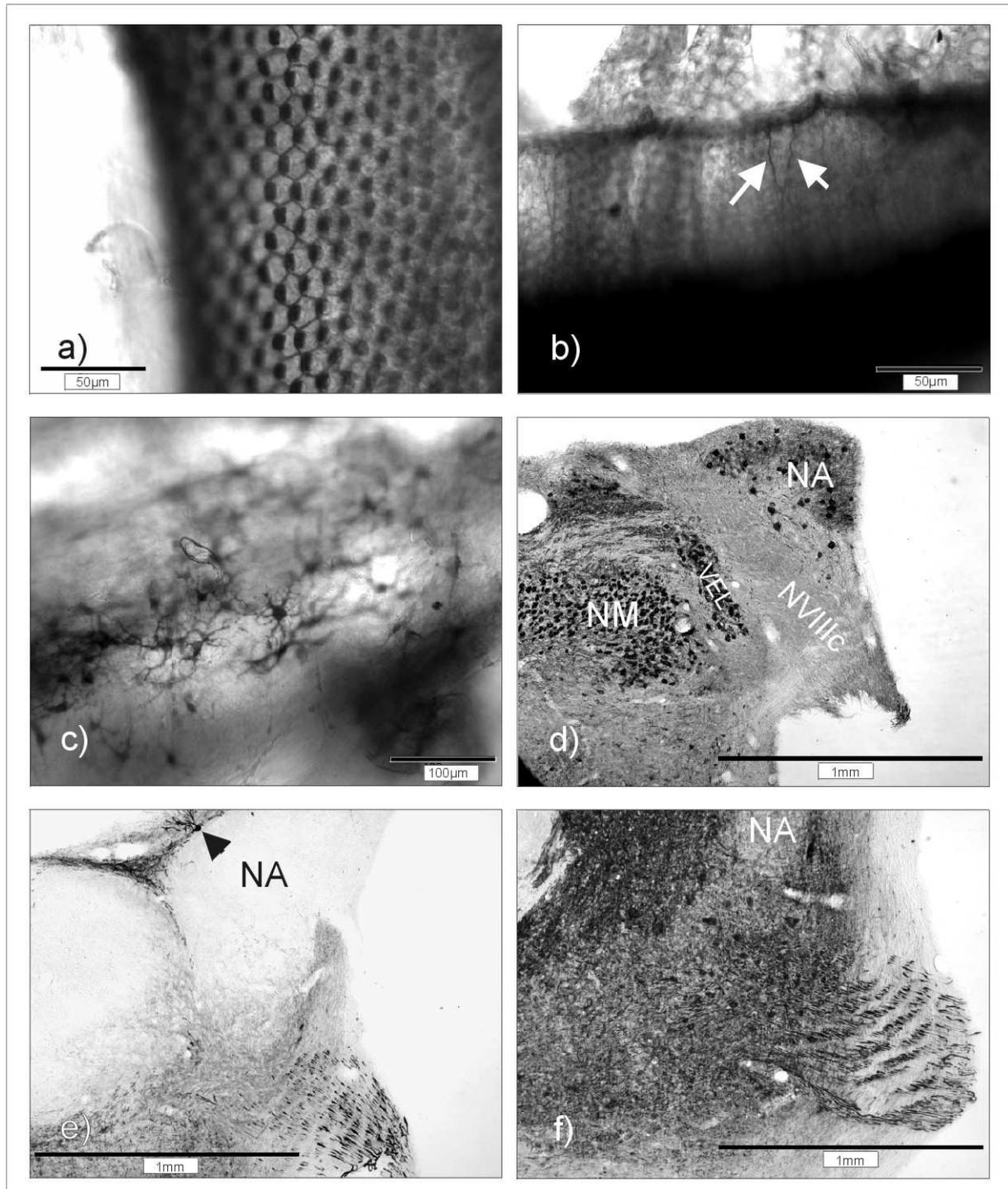


Abbildung 3.16: Immunreaktionen des Innenohrs und des Hörnervens; a) P40, Calbindin monoklonal, die Haarzellen weisen eine deutlich Reaktion an den Stereovilli und der kutikulären Platte auf; b) P40, Calretinin, einzelne gefärbte Fasern, die zur Basis der Haarzellen ziehen; c) P40, Calretinin, deutlich angefarbte Zellen, die dem Limbus aufliegen; d) P40, Calretinin, caudaler Teil der einlaufenden Fasern des NVIIIc; e) P40, Calbindin monoklonal, Übergang von NVIIIc nach NVIIIv, deutlich einsetzende CB positive Fasern; f) P40, Calbindin monoklonal, der NVIIIv kennzeichnet sich durch dichte CB positive Fasern, die nicht zu den auditorischen Kerngebieten ziehen; Abbildung d-f dorsal oben und lateral zur Rechten.

### 3.2.2 Kreuzende Fasern vom Nucleus magnocellularis cochlearis der ipsi- und kontralateralen Seite

#### 3.2.2.1 Calretinin

Die Faserverbindungen, die vom NM der ipsi-, auf den NL der kontralateralen Seite projizieren, waren auf ihrer gesamten Länge und in allen Altersstufen gut angefärbt. Diese waren leicht zu erkennen, da sie ein breites Band bildeten, welches im Mikroskop deutlich die Kerngebiete der beiden Seiten miteinander verband (Abbildung 3.17 a). Mit zunehmendem Alter wurde das Neuropil dichter und erschwerte damit die Identifizierung der Herkunft und Terminierung der Fasern.

Es war nicht möglich diese Fasern von eventuell ebenfalls angefärbten, kreuzenden Fasern der Nuclei vestibularis medialis zu unterscheiden. Diese Kerne wiesen ebenfalls ein CR-IR auf.

#### 3.2.2.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Die Faserverbindungen zwischen den Kerngebieten stachen, genauso wie der NM und der NL dadurch hervor, daß sie keine Immunreaktivität zeigten und sich vom benachbarten Gewebe optisch unterschieden, welches auf CB reagierte.

In der Medialen unterhalb des vierten Ventrikels zeigten sich bei allen Tieren kleine Körperchen, die sehr dünne Fasern nach ventral entsendeten. Hierbei handelte es sich vermutlich um Radialglia, die schwach angefärbt war (Abbildung 3.17 b). Diese Verbindungen konnten nicht genau verfolgt werden.

### 3.2.3 Fasern vom Nucleus laminaris in Richtung Nucleus olivaris superior, ipsilateral

#### 3.2.3.1 Calretinin

Bereits ab der Altersstufe P0 konnten Fasern vom NL zum Nucleus olivaris superior gesehen werden. Es waren in dieser Altersstufe zwar noch wenige CR-IR Fasern, doch ließen sich diese bereits gut erkennen. Sie bildeten ein schmales Band, welches in der dorsalen Hälfte des Myelencephalons leicht nach lateral abknickte und dann ventral in Richtung der OS zog (Abbildung 3.17 c).

Abbildung 3.17 (folgende Seite): Immunreaktionen der Faserverbindungen; a) P29, Calretinin, deutlich angefärbtes kreuzendes cochleäres Bündel; der Pfeil weist auf die Stelle, die in Bild b dargestellt ist; b) P13, Calbindin monoklonal, das unter Bild a markierte Areal, in dem die im Text erwähnten Zellen gefunden wurden (großer Pfeil), die kleinen Pfeile markieren die Grenze zum vierten Ventrikel; c) P13, Calretinin, Übersicht über das Areal in der Nähe der OS; d) P13, Calbindin monoklonal, Gegenfärbung, Übersicht über das Areal in der Nähe der OS, 40µm hinter dem in Bild c dargestellten Bereich, die Pfeile markieren die Anteile des Nervus facialis; e) Calretinin, auslaufende Fasern vom LL in Richtung MLd; Abbildung a-b dorsal oben, Bildmitte Mediallinie des Gehirns; Abbildung c-e dorsal oben, lateral rechts.

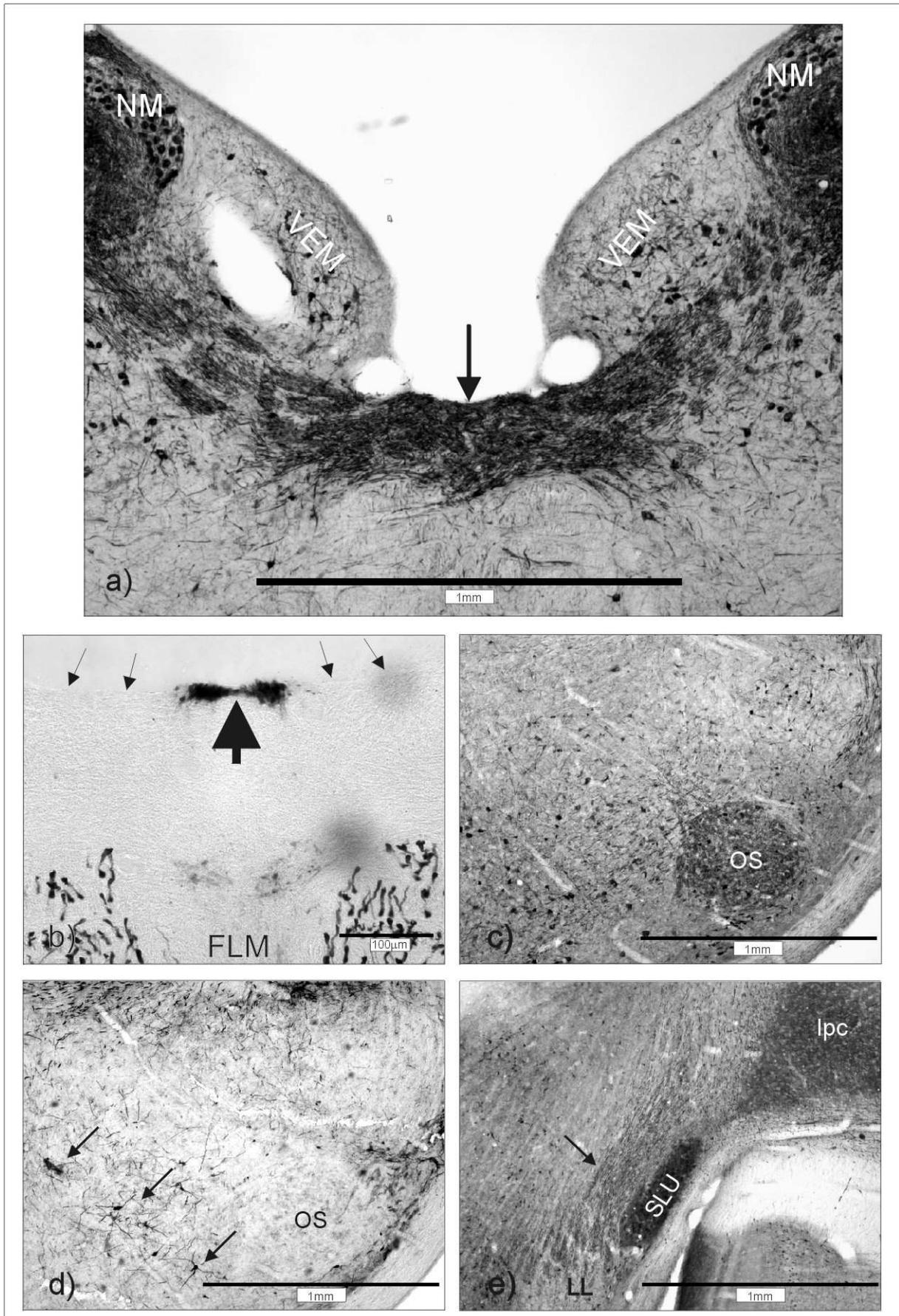


Abbildung 3.17: Faserverbindungen; Erläuterung siehe vorherige Seite

Zur Altersstufe P1 ließ sich bereits eine leichte Zunahme erkennen. Der Fasertrakt wurde dichter und die DAB Färbung intensiver.

Bei den Tieren ab der Stufe P13 waren deutlich mehr CR-IR positive Fasern zu sehen. Zudem hatte der Fasertrakt bis zu dieser Altersstufe weiter in Umfang und Dichte zugenommen.

Einzelne Fasern schienen an der ipsilateralen Olive in Richtung der Trapezkörper vorbeizulaufen (Abbildung 3.12 d und 3.17 c). Diese Fasern hatten ihren Ursprung in einem gemeinsamen Band, welches von den weiter dorsocaudal liegenden Kernen im Hirnstamm herabzog und den Kern medial passierte, ohne daß sie weiteren Kontakt mit der OS zu haben schienen. In diesem Bereich verliefen orthogonal Fasern zu oder von der Olive, die sie kreuzten. Es konnten aber keine Verzweigungen gesehen werden.

#### 3.2.3.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Ebenso wie die Neurone des NL wiesen auch die zur OS projizierenden Fasern keine CB Immunreaktivität auf. Mit Hilfe dieser Reaktion konnte der Verlauf der Fasern nicht direkt gezeigt werden.

Da die Fasern jedoch den Nucleus vestibularis descendens, wie auch die einlaufenden Fasern des Nervus octavus kreuzten, in denen jeweils eine CB-IR gezeigt werden konnte, waren sie indirekt zu verfolgen (Abbildung 3.11 f). Da bereits in den sehr jungen Altersstadien die projizierenden Fasern vom NL ausgebildet waren, ließen sie sich bei allen Tieren wenigstens in Form einzelner heller, dünner Streifen durch die Kerngebiete sehen (Abbildung 3.11 f). Dies verlor sich im weiteren Verlauf, da in der ventralen Hirnhälfte keine weiteren großen CB-IR Kerngebiete lagen, die einen entsprechenden Hintergrund als Negativnachweis hätten liefern können (Abbildung 3.17 d).

### 3.2.4 Kreuzende Fasern der Olive der ipsi- und kontralateralen Seite

#### 3.2.4.1 Calretinin

Bei den frisch geschlüpften Küken (P0) konnten die kreuzenden Fasern zwischen den Oliven nicht eindeutig gesehen werden. Zwar existierten bereits einzelne Fasern, die in die entsprechende Richtung verliefen, jedoch waren diese sehr schwach und nur in geringer Anzahl vorhanden. Eine Verfolgung der Fasern bis zur kontralateralen Seite war nicht möglich. In den meisten Fällen schienen die Fasern bereits vor dem Erreichen der Raphe Kerne und der Fasciculi medialis longitudinalis im Bereich der Trapezkörper ipsilateral zu enden, mit denen sie sich kreuzten. Hinzu kam, daß in dieser Altersstufe ein hoher Hintergrund im entsprechenden Bereich vorhanden war, der eine genaue Differenzierung weiter erschwerte.

In der Altersstufe P1 waren die Faserverbindungen deutlicher, aber in der medialen dennoch nur schwach zu erkennen.

Bei den untersuchten Tieren ab dem Alter P13 waren die Fasern gut zu sehen und zu verfolgen. Die Dicke des Fasertraktes nahm bis zu diesem Alter hin zu, so daß sie deutlich hervortraten. Weiterhin nahm der Hintergrund in den entsprechenden Arealen des Myelencephalons ab, so daß ein besserer Kontrast gegeben war.

Zudem konnte gesehen werden, daß medial und rostral des Nervus facialis, in dem Bereich in dem die Efferenzen entstehen, viele CR positive Zellen lagen (Abbildung 3.17 c und d).

#### 3.2.4.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Wie bereits bei den Faserverbindungen vom Nucleus laminaris zur Nucleus olivaris superior, war auch bei den kreuzenden Fasern zwischen den Oliven der ipsi- und kontralateralen Seite keine Calbindin<sub>D28k</sub> Immunreaktivität festzustellen. Auch ergaben sich durch diese Schnitte keine Hilfen, um eventuelle Fasern nach dem Ausschlußprinzip zu identifizieren (Abbildung 3.17 d). Nur die Motorneurone des Nervus facialis wiesen eine deutliche Anfärbung auf (Abbildung 3.17 d Pfeile).

#### 3.2.5 Fasern zum Lateralen lemniscus

Anhand der verwendeten Immunreaktionen konnten keine Fasern gefunden werden, die zum Nucleus lemniscus lateralis verliefen. Wenige Mikrometer bevor der LL in den CR-Schnitten das erste Mal erschien, waren CR-IR Fasern zu finden gewesen, die von ventral kommend auf der gesamten Höhe verliefen, auf der kurz darauf der LL erschien.

#### 3.2.6 Fasern vom Nucleus lemniscus lateralis zum MLD

##### 3.2.6.1 Calretinin

Die deutlich CR-IR Fasern entsprangen dem Kerngebiet an seiner dorsalen Grenze im rostralen Abschnitt auf der gesamten Breite und zogen von dort medial am SLU vorbei ins zentrale Mesencephalon (Abbildung 3.17 e).

##### 3.2.6.2 Calbindin<sub>D28k</sub>

Wie bereits für die vorgenannten, war auch für diese Fasern keine CB-IR festzustellen gewesen. Einzig im umliegenden Gewebe waren sowohl Fasern als auch Zellen zu erkennen, die

allerdings nicht zum Kerngebiet gehörten. Auf der Dorsalseite war diese Immunreaktivität nicht vorhanden (Abbildung 3.13 b und d).

## 4. Diskussion

### 4.1 Spezifität der verwendeten Antikörper

Neben den normalen Versuchsreihen, die zur Aufklärung der Verteilung der beiden untersuchten Proteine im Gehirn von *Gallus gallus f. domestica* dienten, wurde ein Teil der Schnittserien zur Kontrolle der Spezifität der Primärantikörper verwendet. Zu diesem Zweck wurde in einzelnen Säulen der primäre Antikörper in der PTX Lösung weggelassen. Geschehen ist dies stets parallel zu der eigentlichen Versuchsreihe, so daß von demselben Tier Schnitte mit und ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Bei den Kontrollproben wurde in keinem Fall eine Immunreaktion festgestellt. Eine mögliche unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers im Gewebe kann somit ausgeschlossen werden.

Durch Beobachtungen im Cerebellum konnte bestätigt werden (siehe auch Abbildung 2.1), daß der Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper deutliche Reaktionen mit den Purkinjezellen hervorruft. Der Calretinin Antikörper zeigt dagegen deutliche Anfärbungen in der Körnerschicht. Zusammen mit den weiter unten diskutierten Ergebnissen wurde dies als Hinweis auf die Aktivität der Antikörper gewertet. Zudem zeigten der monoklonale CB und der CR Antikörper keine Überschneidungen in der Anfärbung.

In vielen Schnitten, die mit dem polyklonalen CB Antikörper behandelt wurden, konnten unspezifische Anfärbungen beobachtet werden. Diese traten besonders in den Kerngebieten NA, NM und NL auf.

PARKS et al. (1997) beschreiben, daß die Neurone des NM nur Calretinin exprimieren, nicht jedoch Calbindin. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten schwachen CB Reaktionen konnten nicht mit dem monoklonalen Antikörper gesehen werden. Zu sehen waren diese Reaktionen stets in Bereichen, in denen im selben Tier auch eine hohe CR-IR dargestellt werden konnte. Zudem wurden in denen mit dem polyklonalen Antikörper behandelten Schnitten auch deutliche Anfärbungen in Gebieten gesehen, in denen der monoklonale AK ebenfalls eine Immunreaktion zeigte.

Dies deutet darauf hin, daß der hier verwendete polyklonale CB Antikörper eine Kreuzreaktivität mit Calretinin aufweist. Bereits 1989 wurde von ROGERS und 1990 von RÉSIBOIS et al. beschrieben, daß Antikörper, die auf Calbindin<sub>D28k</sub> reagieren, auch mit Epitopen des Calretinin Proteins interagieren können. Vermutlich ist hier die Homologie der beide Proteine der Grund. Nach den Datenblättern besteht bei dem verwendeten polyklonalen CB Antikörper tatsächlich eine etwa 10%ige Kreuzreaktion mit dem Calretinin Antigen. Der hier verwendete

monoklonale Antikörper ist nach der gleichen Quelle dagegen hochspezifisch auf das Calbindin<sub>D28k</sub> Antigen.

Ebenso soll auch der polyklonale Calretinin Antikörper von Swant, der hier verwendet wurde, eine 10%ige Kreuzreaktion mit dem Calbindin<sub>D28k</sub> Antigen eingehen. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann nicht bestätigt werden, daß die beiden Antikörper im gleichen Maße Kreuzreaktionen bei der hier verwendeten Tierart eingehen. Die Calretinin Ergebnisse weisen durchweg eine hohe Spezifität auf, die nicht mit denen von Calbindin<sub>D28k</sub> korreliert erscheint. Es wurde nur eine höhere Hintergrundaktivität beobachtet, die ebenfalls nicht mit den monoklonalen CB Ergebnissen übereinstimmt, wie in den ventralen Bereichen des Myelencephalons festgestellt wurde.

Die Ergebnisse von JANDE et al. (1981), die eine der ersten Übersichten von Calbindin<sub>D28k</sub> im Gehirn von Ratte und Huhn stellen, scheinen solche Kreuzreaktivitäten aufzuzeigen. Die nach dem drei-plus System dargestellten Ergebnisse (+++ stark, ++ moderat, + wenig, - keine Reaktion) geben in den Kerngebieten NM und NL (NA ist nicht aufgeführt) ein zwei-plus an für Areale, in denen nach den hier vorliegenden Ergebnissen mit dem monoklonalen Antikörper keine Reaktivität gefunden wurde. Nur die mit drei-plus angegebenen Kerne (z.B. die vestibulären Nuclei) oder Zellen (Purkinje) zeigten in der hier vorliegenden Arbeit eine Reaktion.

Die Ergebnisse von ROTH et al. (1981) scheinen dagegen keine Kreuzreaktionen aufzuweisen. Bei einer Interpolation der eigenen Ergebnisse hätte die dort verwendete Konzentration von 1:100 zu einer deutlichen Kreuzreaktion führen müssen. Neben der Möglichkeit, daß der dort verwendete Antikörper spezifischer war, könnte auch durch die Darstellung (vorhanden/nicht vorhanden) die Möglichkeit bestehen, daß die Autoren schwache Reaktionen von Anfang an als negativ bewerteten. Wegen der hohen Konzentration erscheint diese Möglichkeit aber als unwahrscheinlich. Die in der Arbeit angegebenen Ergebnisse zu denen im Hirnstamm liegenden Kernen stimmen mit den hier vorliegenden überein.

Die hier geschilderten Probleme, die zu unterschiedlichen Interpretationen des Auftretens der beiden Proteine führen können, legen den Schluß nahe, daß für zukünftige Untersuchungen nur noch hochspezifische Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper verwendet werden sollten. Hierfür würde sich der monoklonale Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper von Swant eignen, der nach den hier vorliegenden Ergebnissen keine Kreuzreaktion in der untersuchten Tierart zeigt.

## 4.2 Immunreaktionen der Präparate

### Übersicht über die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten in Bezug auf CaBP's

Tabelle 4.1: Übersicht über die Ergebnisse der Immunreaktivitäten der hier vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen anderer Autoren. Sofern nicht anders erwähnt, beziehen sich die Ergebnisse stets auf *Gallus gallus*

Bereich	Eigene Ergebnisse	Ergebnisse aus der Literatur
Ohr	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dünne Fasern, die an der Basis der Haarzellen entlanglaufen</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stereovilli der Haarzellen</li> <li>- Kutikuläre Platte der Haarzellen</li> </ul>	<p>ROGERS, 1989:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Viele Haarzellen sind sowohl CR wie auch CB positiv</li> </ul> <p>COPPENS et al., 2000:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reaktion von Haarzellen und Neuronen mit einem CB Antikörper bei adulten Beagles</li> <li>- Reaktion einzelner Fasern, die die Haarzellen erreichen mit einem CR Antikörper</li> </ul>
NVIII	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schwache Färbung des NVIIIc</li> <li>- Einzelne Teile im NVIIIv</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wenige Fasern im NVIIIc, diese nur caudal gelegen</li> <li>- Deutliche Anfärbung im NVIIIv</li> </ul>	<p>ROGERS, 1989:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Viele CR und CB positive Fasern im NVIIIv</li> </ul>
NA	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Einzelne angefärbte Zellen</li> <li>- Altersabhängige fortschreitende Dynamik von dorsolateral nach medioventral</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Anfärbungen</li> </ul>	<p>ROGERS, 1989:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Viele CR positive Neurone</li> </ul> <p>KUBKE et al., 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fortschreitende Dynamik der CR positiven Zellen von dorsolateral nach ventral bei <i>Tyto alba</i></li> </ul>
NM	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Deutliche Immunreaktion aller Zellen im rostralen Bereich</li> <li>- Anfärbung der Zellen legt den Schluß nahe, daß die CR Proteine überwiegend randständig gebunden vorliegen</li> <li>- Im caudalen Bereich einzelne Zellen, deren Anfärbung schwächer war</li> <li>- Deutliche Anfärbung der Fasern, die zum NL ziehen</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Anfärbungen</li> </ul>	<p>JANDE et al., 1981:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderate Reaktion der Neurone mit einem CB Antikörper bei <i>Gallus gallus</i></li> </ul> <p>ROGERS, 1989:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alle Neurone sind CR positiv</li> <li>- deutlich angefärbte Axone</li> </ul> <p>FRISINA et al., 1995:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CB positive Neurone im AVCN bei <i>Chinchilla laniger</i></li> </ul> <p>PARKS et al., 1997:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Die Neurone des NM weisen bei <i>Gallus gallus</i> nur eine deutliche Reaktion mit einem CR Antikörper auf, nicht jedoch mit einem CB Antikörper</li> </ul> <p>KUBKE et al., 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CR positive Zellen im NM bei <i>Tyto alba</i></li> </ul> <p>TRUSSEL, 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hoher Spiegel der Neurone des NM an SERCA</li> </ul> <p>HACK et al., 2000:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lokalisation von CR Proteinen in Neuronen des NM überwiegend unterhalb der Plasmamembran</li> </ul>
NL	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Deutliche Anfärbung sämtlicher Zellen</li> </ul>	<p>JANDE et al., 1981:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderate Reaktion der Neurone mit einem CB</li> </ul>

	<p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Anfärbungen</li> </ul>	<p>Antikörper</p> <p>ROGERS, 1989:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alle Neurone sind CR positiv</li> <li>- deutlich angefarbte Axone</li> </ul> <p>FRISINA et al., 1995:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CB positive Fasern in der MSO bei <i>Chinchilla laniger</i></li> </ul> <p>KUBKE et al., 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CR positive Zellen im NL bei <i>Tyto alba</i></li> </ul> <p>TRUSSEL, 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hoher Spiegel der Neurone des NL an SERCA</li> </ul>
Akzessorisch	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Deutliche Anfärbung sämtlicher Zellen</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine Anfärbungen</li> </ul>	<p>Bisher keine Literaturangaben</p>
OS	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anfärbung einzelner Zellen mit sowohl deutlicher, als auch schwächerer Reaktion</li> <li>- Lateral der OS einzelne Zellen liegend, deren Axone die OS zu umrunden scheinen</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine angefarbten Zellen innerhalb der OS, dafür vereinzelt Fasern</li> <li>- Lateral der OS einzelne Zellen, deren Ausläufer in die OS eindringen</li> <li>-</li> </ul>	<p>KUBKE et al., 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CR positive Zellen in der OS bei <i>Tyto alba</i></li> </ul>
LL	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Untergliederung in den LLv und LLi möglich</li> <li>- LLv besitzt wenige angefarbte Zellen, die in der Intensität schwächer sind</li> <li>- LLi zeigt deutlich angefarbte Zellen, die in großer Zahl vorhanden sind</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Keine angefarbten Zellen</li> <li>- Im LLv dünne Fasern, die horizontal verlaufen</li> <li>- Im LLi ebenfalls dünne Fasern, die der dorso-ventralen Achse folgen</li> </ul>	<p>PUELLES et al., 1994:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CR positive Fasern, die vom LL zum MLd ziehen</li> </ul> <p>KUBKE et al., 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CR positive Zellen und Fasern, deren Entwicklung bei <i>Tyto alba</i> im LLi beginnt</li> </ul>
MLd	<p>CR:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Zwei deutlich voneinander getrennte Bereiche sind auszumachen</li> <li>- Eine äußere Schicht unterhalb des Ventrikels, deren Fortsätze der vereinzelt angefarbten Neurone eine deutliche Ausrichtung parallel zum Ventrikel aufzeigen</li> <li>- Ein innerer Core Bereich, in dem einzelne Zellen angefarbt sind. Zudem lassen sich viele angefarbte Fasern finden</li> </ul> <p>CB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Zwischen den beiden CR positiven Arealen liegt eine Schicht von CB positiven Neuronen, die hoch verzweigt sind. Nicht alle Neurone sind angefarbt.</li> <li>- Diese Struktur nimmt caudomedial in der Mächtigkeit zu und entspringt ein weiteres dünnes Band. Dies weist fingerförmig in Richtung des CR positiven Cores und endet nach wenigen Mikrometern</li> </ul>	<p>TAKAHASHI et al., 1987:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CB positive Fasern im Core des IC bei <i>Tyto alba</i></li> </ul> <p>PUELLES et al., 1994:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CR positive Zellen in der periventriculären Lamina</li> <li>- CR positive Zellen und Fasern im Core-Bereich</li> <li>- CB und CR positive Zellen im Shell-Bereich</li> <li>- CB positive Zellen im präisthmischen superficialen Bereich</li> </ul> <p>KUBKE et al., 1999:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CR positive Zellen im Core des IC bei <i>Tyto alba</i></li> <li>- CR positive Zellen im externen Nucleus des IC bei <i>Tyto alba</i></li> </ul>

### Papilla basilaris und NVIII

Wie an extramedullär gelegenen Teilen des NVIII gesehen wurde, konnte eine Unterteilung des Nerven vorgenommen werden. Wie bei der Schleiereule (KUBKE und CARR, 2000) ließen sich ein caudaler und ein rostraler Teil (dort posterior und anterior) erkennen. Der caudale Anteil zeigte sich als schwach CR positiv mit sehr wenigen und dünnen CB positiven Fasern, die vermutlich ebenfalls zu den auditorischen Kernen zogen (siehe Abbildung 3.16 d, e, Abbildung 3.6 d sowie Teildiskussion Nucleus magnocellularis cochlearis). Der rostrale Part des NVIII zeichnete sich durch eine deutliche CB Immunreaktivität aus. Einzelne Fasern konnten bis zu den vestibulären Nuclei hin verfolgt werden. Eine weitere Untergliederung ließ sich durch die Immunreaktionen nicht bestimmen. Besonders die Efferenzen waren nicht auszumachen, obgleich vermutet werden kann, daß sie CR positiv sein müßten. Dies wurde daraus geschlossen, daß sich zwischen den Haarzellen einzelne CR positive Fasern verteilten, wie auch, daß im Bereich des Hirnstamms, in dem die Efferenzen entstehen, viele CR positive Zellen gefunden wurden. Weiterhin zogen von der OS CR positive Fasern nach medial zu dem entsprechenden Gebiet.

In der Papilla basilaris wurden CB Reaktionen nur an den Stereovilli der Haarzellen gesehen (Abbildung 3.16 a). Diese sind bei Vögeln fest mit Actinfilamenten auf der kutikulären Platte verankert [MANLEY, 1990]. Da auf Actin und Myosin basierende Motilität als calciumkontrolliert nachgewiesen ist [KRETSINGER, 1987], könnte sich hier ein Kontrollmechanismus zeigen. Auch für adulte Beagles ist gezeigt worden, daß nur in den Haarzellen und den Neuronen eine CB-IR existiert sowie eine CR-IR in Fasern, die die Basis der Haarzellen erreichen [COPPENS et al., 2000]. In der Arbeit über diesen Säuger wird eine CB-IR im Cytoplasma der Haarzellen, der kutikulären Platte und den Stereovilli angegeben, nachgewiesen mit dem polyklonalen rabbit $\alpha$ Calbindin<sub>D28k</sub> Antikörper von Swant. Der Zellkern zeigt keine Anfärbung.

Lediglich die starke Anfärbung der Stereovilli und das Ausbleiben einer Anfärbung des Zellkerns kann hier bestätigt werden. Aufgrund der großen Artunterschiede ist auch ein artspezifisches Erscheinungsbild möglich.

### Nucleus angularis

Anhand der vorliegenden Daten war es nicht möglich eine Untergliederung dieses Kerngebietes vorzunehmen, wie sie von HÄUSLER et al. (1999) für *Columba livia* beschrieben wird. Die Gesamtzahl der angefärbten Zellen war zu gering, um durch morphologische Vergleiche Rückschlüsse ziehen zu können.

Die großen CB positiven Zellen, die vereinzelt am dorsalen Rand gefunden wurden (Abbildung 3.16 e) besaßen Ähnlichkeit mit den angefärbten Zellen des Kleinhirns. Durch die Nähe zu den cerebellaren Pedunkeln, auf die bereits ROGERS (1989) in diesem Zusammenhang hinwies, handelt es sich bei diesen vermutlich um einzelne Ausläuferzellen des Kleinhirns. Eine ähnliche Vermutung äußern auch BOORD und RASMUSSEN (1963) an Schnittserien von *Columba livia*.

Obwohl hier keine signifikante Veränderung in der Zellzahl und der Verhältnisse im Bezug zum Alter gefunden wurde (Abbildung 3.3), ist es offensichtlich, daß erst ab den P13 Tieren CR positive Zellen im ventralen Bereich des NA gesehen wurden (Abbildung 3.2). Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich dagegen in der prozentualen Verteilung der positiven Zellen. Eine ähnliche Entwicklung ist bereits für die Schleiereule beschrieben. Dort entwickelt sich eine fortschreitende CR Dynamik ab dem 17. Tag im Ei und bewegt sich von dorsolateral nach ventral voran. Zum Zeitpunkt des Schlupfes bleibt bei der Schleiereule nur der ventrale Teil des NA frei von gefärbten Zellen, um in der dritten Woche nach dem Schlupf sein adultes Verteilungsmuster zu erlangen [KUBKE et al., 1999].

In welchem Alter sich das adulte Verteilungsmuster bei der hier untersuchten Art einstellt, konnte nicht bestimmt werden. Die Probengröße von 14 Tieren stellte hierzu nicht genügend Daten zur Verfügung. Es läßt sich aber durch die Streuung der Werte erkennen, daß dies vermutlich individuell unterschiedlich ist.

Festzustellen ist nur, daß ab dem Alter P13 erste Zellen im Bereich des ventralen NA zu finden sind. Da keine Informationen über den Zeitraum von P2 bis P12 vorliegen, kann hier nur vermutet werden, daß eine ähnliche Entwicklung beim Huhn sehr früh geschieht. Bei Tier HK46 (P1) ist bereits zu erkennen, daß die Zellen sehr weit nach ventral vordringen, obgleich die Daten eine sichtbare Veränderung des Verhältnisses dorsolateral zu medial erst zwischen dem 13. und 19. Tag zeigen.

Dies könnte mit einer Veränderung des Mittelohrs und der damit einhergehenden Modifikation des Schalldurchtrittes [SAUNDERS et al., 1986] zusammenhängen. Die Autoren beschreiben, daß beim Huhn bis etwa zum 70. Tag wiederkehrende Veränderungen auftreten können. Diese treten im Abstand von 14 bis 30 Tagen auf. Wie sich dies auf die Reifung des Systems auswirken könnte, bleibt unklar [siehe SAUNDERS et al., 1986].

Sobald genügend Informationen über die Verteilung in den einzelnen Altersstufen vorliegen, wäre es interessant den Nestflüchter *Gallus gallus* mit dem Nesthocker *Tyto alba* zu vergleichen, der beim Erlangen seines adulten Verteilungsmusters noch nicht flügge ist. Für das

Huhn wird ein adultes Erscheinungsbild der anderen Kerngebiete mit P25 angegeben [PARKS et al., 1987].

Ein Schwachpunkt der so gewonnenen Ergebnisse liegt in der Methodik, mit der die Trennung nach dorsolateralem und medioventralem Teil des Kerngebietes vorgenommen wurde. Während der Polygonzug bei der Auswertung um den NA gelegt wurde, können Fehler gemacht worden sein. Der NA wird medial von CR positiven Fasern begrenzt, deren Intensität nicht immer eine eindeutige Differenzierung vom Kerngebiet selbst ermöglichte. Dadurch ist es möglich, daß der Polygonzug nicht die wirkliche mediale Grenze des Kerngebietes traf und der dorsale Stützpunkt der Trennlinie falsch gelegt wurde. Auch könnten dadurch vereinzelt Zellen des VEL mit in die Auswertung gelangt sein. Dementsprechend würden die hier angegebenen Quotientenwerte von den wirklichen abweichen. Die Streuung der Werte ist jedoch so hoch, daß sie nicht von der beschriebenen Fehlerquelle abhängig sein kann. Der R-Wert der Spearman Rank Order Korrelation von  $-0.576501$  zeigt hier auch eine hohe Individualität an.

Für Folgeversuche würde es sich anbieten die zu untersuchenden Schnitte gleichzeitig mit Antikörpern auf Calretinin und Calbindin<sub>D28k</sub> zu behandeln. Nach den hier beobachteten Verhältnissen würde ein hochspezifischer CB Antikörper nur die Umgebung des Kerns anfärben und somit die Grenzen deutlich festlegen. Der Calretinin Antikörper würde neben umliegendem Gewebe eindeutig die Zellen von Interesse markieren.

Die fortschreitende CR positive Dynamik steht dabei im Widerspruch zu den Ergebnissen von SAUNDERS et al. (1973), die eine Reifung von tieffrequenten zu höherfrequenten Verschaltungen im Hirnstamm in der Entwicklung beschreiben. Dies wirft die Fragestellungen auf, ob es sich bei dieser Dynamik um einen Hinweis auf den Reifezustand des NA handeln kann.

Die vorgefundenen CB positiven Fasern liegen stets im ventralen Teil des NA wo tieffrequente Schallreize verschaltet werden [RUBEL et al., 1976; HÄUSLER et al., 1999]. Im Vergleich mit den Befunden des NM (siehe genauere Diskussion im Teilkapitel Nucleus magnocellularis cochlearis) könnten diese mit einer Infraschallsensibilität zusammenhängen.

#### Nucleus magnocellularis cochlearis

Wie in der vorliegenden Arbeit wurden auch von ROGERS (1989) und PARKS et al. (1997) im NM nur Neurone gefunden die Calretinin, nicht jedoch Calbindin<sub>D28k</sub> exprimierten (Abbildung 3.6 a-d, Abbildung 3.11d). Fasern um den NM wiesen eine deutliche CR-IR auf. Die Ausnahme bildeten dabei die Fasern des NVIIIc, die nur eine schwache Immunreaktivität

---

aufwiesen sowie einzelne Fasern, die im caudolateralen Abschnitt des Kerns lagen und auf Calbindin<sub>D28k</sub> reagierten.

Die zellmorphologische Unterteilung des Kerngebietes in einen caudolateralen Abschnitt sowie einen rostromedialen [KUBKE, CARR, 2000] konnte durch die Immunreaktion auf Calretinin bestätigt werden. Die beschriebene Dreiteiligkeit des Kerns [BOORD, 1968] ließ sich immunhistochemisch nicht zeigen. Der rostromediale Teil des Kerns erscheint dabei in Übereinstimmung mit JHAVERI und MOREST (1982A) als homogene Zellgruppe von großen, runden bis ovalen Zellkörpern mit wenigen oder keinen Dendriten. Diese waren, wenn vorhanden, von kurzer Länge. Diese Zellen unterschieden sich deutlich vom caudolateralen Teil, wo neben den scheinbar kleineren und kantigeren Zellen auch eine verminderte Intensität der Calretininfärbung am äußeren Rand des Kerngebietes beobachtet werden konnte.

In nahezu allen Zellen, mit den erwähnten Einschränkungen, konnte beobachtet werden, daß die CR-Anfärbung nahe der Zellmembran deutlich stärker war als in den übrigen Teilen der gleichen Zelle. Intakte Zellen erschienen zum Rand hin intensiver gefärbt als im Zentrum. Auch bei angeschnittenen Zellen ließ sich dies gut erkennen. Da das Cytoskelett verhindern sollte, daß Substanzen ausgespült werden sowie auch in diesen Fällen die Färbung im Randbereich intensiver war, legt es die Vermutung nahe, daß die meisten Proteine randständig in oder nahe der Zellmembran gebunden sind. Die von PARKS et al. (1997) beschriebene schwächere Reaktion von Zellen des NM im Vergleich zu denen des NA könnte darauf zurückzuführen sein, da die Immunreaktion im NA homogen erscheint.

In neueren Untersuchungen von HACK et al. (2000) wird diese Eigenschaft erstmalig beschrieben. Diese Autoren vermuten, daß die Lokalisation von CR unter der Plasmamembran eine besondere Adaptation des NM ist um den Calciumeinstrom räumlich zu begrenzen. Dies würde eine besondere Anpassung darstellen, da nach bisheriger Meinung CR ein lösliches Protein ist, welches frei verteilt im Cytosol als Puffer fungiert [BAIMBRIDGE et al., 1992]. Dies könnte besonders in der Hinsicht interessant sein, daß der NM, der phasenbezogene auditive Signale verarbeitet, eine der höchsten Entladungsraten innerhalb des ZNS der Vertebraten besitzt [ZIRPEL et al., 1998]. Auch zeigen sowohl Neurone des NM, als auch die des NL, einen hohen Spiegel des sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium uptake protein (SERCA), was auf einen permanenten Calciumeinstrom hindeutet [TRUSSEL, 1999].

Zudem wies der Zellkern eine starke CR-IR auf (Abbildung 3.6 b).

Da das Neuropil um den NM stark CR positiv war (Abbildung 3.17 a), konnten keine Zellfortsätze bis zu den Fasertrakten verfolgt werden. Ob die bilaterale Projektion zum NL der ipsi- und kontralateralen Seite auf der Bifurkation der Axone beruht wie von Ramon y Cajal

[in PARKS und RUBEL, 1975] vermutet wurde oder aber von unterschiedlichen Zellen in gleichen Abschnitten des NM herrührte konnte nicht gezeigt werden. In dieser Hinsicht war es jedoch auffällig, daß sich viele der beobachteten Axone aufspalten, wie auch exemplarisch gezeigt in den gezeichneten Zellen der Abbildungen 3.7 und 3.8.

Da Aufgrund der verwendeten Immunreaktionen keine hodologische Beobachtungen gewonnen werden konnten, lassen sich die Faserverbindungen nur durch Literaturangaben bestimmen. Die Fasern, die den NM medioventral verlassen und in die Decussatio cochlearis dorsalis ziehen stellen dabei die projizierenden Anteile auf den ventralen NL der kontralateralen Seite. Entsprechend stellen die Fasern, die den NM dorsorostral umrunden die Projektionswege zum NL der ipsilateralen Seite (die genaue Diskussion ist unter dem Teilkapitel Nucleus laminaris zu finden).

Die Anordnung der Neurone in Form von dorsoventralen Säulen (RUBEL und PARKS, 1975) wurde zwar ebenfalls gesehen, jedoch erscheint es nicht als das fundamentale Organisationsprinzip des NM. Nicht in allen Fällen wurde die Anordnung beobachtet, die der von RUBEL und PARKS (1975) entsprach. In vielen Fällen wurden die Zellen in einer homogenen Verteilung gesehen, wobei die Fasern sich ihren Weg durch die Zellzwischenräume bahnten, was dann partiell zu einzelnen Säulen führen konnte. Da allerdings nicht in der gleichen Ausrichtung wie in der genannten Arbeit geschnitten wurde, kann es sein, daß die entsprechend beschriebene Achse nicht getroffen wurde und sich dadurch ein anderes Bild zeigte.

Die Zellen des caudolateralen Abschnittes, die überwiegend vom apikalen Drittel der Cochlea innerviert werden [BOORD und RASMUSSEN, 1963; RUBEL et al., 1976], unterschieden sich deutlich vom Rest des Kerngebietes, wie hier beobachtet wurde. Die Autoren BOORD und RASMUSSEN (1963) legten die Vermutung nahe, daß dieser Teil eine vestibuläre Funktion besitzt. Nachfolgend erschienen mehrere Arbeiten, in denen versucht wurde nachzuweisen, daß die Neurone nicht auf auditorische Reize reagierten. Sowohl RUBEL und PARKS (1975) bei *Gallus gallus*, wie auch MANLEY et al. (1985) bei *Sturnus vulgaris* haben in Versuchen keinerlei Hinweise auf eine auditorische Verarbeitung von Zellen dieses Bereiches erhalten. Jedoch sind in allen Fällen nur Apparaturen verwendet worden, die keine Frequenzen unterhalb von 100Hz erzeugen konnten. In den Arbeiten wird zudem explizit darauf hingewiesen, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß diese Neurone sehr hohe Erregungsschwellen besitzen könnten, spezifisch auf Frequenzen unterhalb von 100Hz reagieren oder beides. KAISER und MANLEY (1996) konnten durch Tracerexperimente zeigen, daß keine vestibulären Verbindungen der Macula lagena zu den auditorischen Kernen bestehen. Wie BOORD und RASMUSSEN

(1963) in ihrer Studie anmerkten, können durch die komplizierte Operation eventuell nicht nur Fasern von der Macula lagena benutzt worden sein, sondern auch die der Papilla basilaris. Weiterhin wird sowohl für *Gallus gallus* [WARCHOL und DALLOS, 1989], wie auch für *Columba livia* [SCHEMULY und KLINKE, 1990A, 1990B] eine Sensitivität auf Infraschall angegeben. Bei der Taube sind die entsprechenden Haarzellen im apikalen Bereich der Basilar-membran gefunden worden [SCHEMULY und KLINKE, 1990A], jedoch ohne einen Anschluß an die Macula lagena. Da sich die Infraschalleinheiten der Taube signifikant von denen der normalen auditorischen Einheiten unterscheiden [SCHEMULY und KLINKE, 1990A, 1990B], bleibt in weiteren Experimenten zu klären, ob dies auch beim Huhn der Fall ist. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf der Tatsache liegen, daß im caudolateralen Abschnitt des NM Calbindin<sub>D28k</sub> positive Fasern gefunden wurden. CB-IR wurde ansonsten nur in den vestibulären Kernen gesehen. Infraschall verarbeitende Zellen könnten zudem eine höhere zeitliche Integration von Signalen aufweisen [HÄUSLER et al., 1999] und somit ein evolutives Erklärungsmuster für das differente Auftreten in den caudolateralen Zellen liefern, wie es hier gesehen wurde. Der Selektionsdruck hingehend zu einer besonderen Adaptation in diesem Bereich wäre dementsprechend sehr viel niedriger als im rostromedialen Teil, da der Calcium-einstrom geringer ist.

In diesem Zusammenhang ist vermutlich auch der interaurale Kanal [ROSOWSKI und SAUNDERS, 1980] der Vögel von Bedeutung, der eine Verbesserung der Schalldruckunterschiede zwischen den Ohren bewirkt. Besonders bei großen Wellenlängen ist dies von Bedeutung, wenn die Welle um den Schädel des Tieres herum gebeugt wird [DUDEL et al., 1996].

#### Akzessorisches Kerngebiet

Die vorgefundenen Zellen des akzessorischen Kerngebietes lagen in der Bahn, welche die einlaufenden Fasern des NVIIIc zum NM nehmen. Bei Ableitungsexperimenten mit anschließender Anfärbung der Zellen *in vivo* konnte eine auditorische Funktion gezeigt sowie Tuningkurven einer einzelnen Zellen aufgenommen werden [KAISER, persönliche Mitteilung].

Da der genaue Faserverlauf des NVIIIc durch die schwache Immunreaktion im entsprechenden Gebiet nicht verfolgt werden konnte, läßt sich nicht sagen wo eventuelle Projektionsorte liegen. Zwei Möglichkeiten sind dabei wahrscheinlich: Zum einen könnten die Neurone Signale vom einlaufenden NVIIIc auf ihrem Weg zum NM intrinsisch modifizieren als auch solche Signale die vom NM zum NL projiziert werden. Da in direkter Umgebung des Kerngebietes jedoch fast ausschließlich die schwach angefärbten Fasern des Hörnerven zu finden waren (Abbildung 3.9 und 3.10), erscheint die erste Möglichkeit als die plausiblere.

Eventuell ergibt sich hiermit ein Hinweis auf eine analoge Struktur zum ‚Cochlear Root Ganglion‘ bei Säugern.

Interessant erscheint weiterhin die Tatsache, daß im stereotaktischen Atlas von KUENZEL und MASSON (1988) die Fasern des NVIIIc an den Stellen unterbrochen eingezeichnet wurden, an denen das Gebiet hier gefunden wurde. Dies ist dabei nur auf den zwei hintereinander liegenden Tafeln 1.2 und 1.4 mit einem Abstand von 0,2mm der Fall. Dies würde sich mit den vorliegenden Ergebnissen decken, bei denen eine rostrocaudale Ausdehnung zwischen 240 und 320µm gefunden wurde; gemessen an Hand der Anzahl der aufeinander folgenden Schnitte, in denen die Zellen zu finden waren. Auf der Tafel 1.4 [KUENZEL und MASSON, 1988] ist zu sehen, daß der Nucleus angularis noch nicht voll ausgebildet ist, so wie es auch in der vorliegenden Untersuchung erkannt wurde. Warum diese Zellen nicht verzeichnet sind könnte in der dort verwendeten Schnittdicke von jeweils 200µm begründet sein. Dadurch waren differenzierte Einteilungen im entsprechenden Gebiet vermutlich nicht vorzunehmen. Es erscheint als möglich, daß die Zellen dem VEL zugerechnet wurden, dessen Ausdehnung nach den hier vorliegenden Ergebnissen teilweise an andere Kerngebiete heranreichen kann.

#### Nucleus laminaris

Im Nucleus laminaris wurde ausschließlich eine Immunreaktion auf Calretinin festgestellt. Morphologisch zeigte sich dieses Kerngebiet als eine zweidimensionale Schicht, deren Zellen ebenso wie im NM tonotopisch organisiert sind [PARKS und RUBEL, 1975; RUBEL und PARKS, 1975]. Die Anhäufung von Zellen im caudolateralen Teil des Kerngebietes könnte dabei durch die Veränderung der Lage im weiteren Verlauf herrühren. Wie hier in Abbildung 3.1 dargestellt, beschreibt das Kerngebiet in einem gewissen Abstand eine Umhüllende des NM. Durch die Steigung erscheinen in den mit 40µm relativ dicken Schnitten lateral mehrere Zellen gleichzeitig im Frontalschnitt. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß Neurone dieses Bereiches andere Eigenschaften aufweisen könnten [JHAVERI und MOREST, 1982A; KÖPPL und CARR, 1997] auf die die Calretininfärbung keine Hinweise gibt. Bestätigt werden kann, daß dieser Teil des Kerngebietes, der ebenfalls niederfrequente Signale verarbeitet, in Übereinstimmung mit RUBEL und PARKS (1975) sowie KÖPPL und CARR (1997) teilweise keine deutliche Trennung zu angrenzenden Kernen aufweist. Weiterhin beschreiben SMITH und RUBEL (1979) perilaminäre Zellen in diesem Bereich (siehe auch KÖPPL und CARR, 1997).

Bei frisch geschlüpften Tieren schien der NL im rostralen Teil noch nicht seine maximale Ausdehnung zu besitzen. Verschiedene Autoren beschreiben, daß der NL sich erst nach dem Schlupf voll entwickelt [z.B. SAUNDERS et al. 1973] und etwa um P25 sein adultes Stadium

erreicht [PARKS et al., 1987]. Im Verlauf der ersten Lebenswochen dringt der NL bis unter den vierten Ventrikel vor.

Wie bereits im Teilkapitel Nucleus magnocellularis cochlearis erwähnt, können keine hodo-logischen Aussagen über Verbindungen mit dem NM getroffen werden. Durch verschiedene Versuche ist bereits gezeigt worden, daß auf der dorsalen Seite die Fasern des ipsilateralen NM und auf der ventralen die des kontralateralen NM terminieren. So erfährt das ventrale Neuropil stets schwere Degenerationen, wenn das dorsale cochleäre Bündel durchtrennt [PARKS und RUBEL, 1975] oder das kontralaterale Ohr verschlossen wird [GRAY et al., 1982]. Die Projektionsrichtung ist dabei stets vom NM zum NL [KONISHI, 1993].

Ob es sich bei der gefundenen medialen Struktur unterhalb des vierten Ventrikels tatsächlich um Glia handelt, bleibt in einem möglichen Folgeexperiment abzuklären. Hier würde der Ein-satz eines GFAP Antikörpers von Wert sein, der dann Reaktionen mit dieser Struktur zeigen müßte.

Die Intensivierung des Neuropils in direkter Umgebung der monozellulären Schicht zeigt den Bereich an in dem sowohl die Axone des ipsi- und kontralateralen NM terminieren, als auch die Dendriten des Nucleus laminaris. PARKS et al. (1983) konnten zeigen, daß etwa 42% des Perikaryons und etwa 62% der Dendritenoberfläche von axonalen Endigungen des NM be-setzt sind. Die Fasern des NM ziehen bis zu den Zellen des NL und treten dort mit den kurzen Dendriten [SMITH und RUBEL, 1979] oder den Zellen selbst in Kontakt. Dabei weisen die Da-ten von RUBEL und PARKS (1975) darauf hin, daß jeder Punkt des NL räumlich getrennte In-nervationen von gleichen Orten des NM erhält und in der Erweiterung auch von gleichen Or-ten der Cochlea. Dabei wird beim Huhn in jedem NL eine Hemisphäre abgebildet [HYSON et al., 1994].

Die projizierenden Fasern vom NL verlaufen nach ventral und ziehen dabei an den vestibulä-ren Kernen vorbei. Dabei kreuzen sie sich mit den Fasern des NVIIIv. Deutlich sichtbar war dies in Schnitten, die auf CB immunhistochemisch behandelt wurden (Abbildung 3.11 f). Die Fasern vom NL, die selbst keine CB Immunreaktivität aufweisen, sind bei Tieren ab der Al-terstufe P13 als helles Band im VED zu erkennen. Im CR Material konnten dabei keine Ver-zweigungen im entsprechenden Kerngebiet gesehen werden. Bei jüngeren Tieren war dies nicht so deutlich ausgeprägt. Um den genauen Faserverlauf bestimmen zu können, müssen jedoch CR-IR Schnitte mit herangezogen werden, da diese Ergebnisse nicht immer deutlich ausfallen und somit nur als Hinweis auf die Lage dienen können.

### Nucleus olivaris superior

Durch die Immunreaktionen auf die Antigene Calretinin und Calbindin<sub>D28k</sub> waren keine Untergliederungen im Nucleus olivaris superior zu sehen. Auch altersabhängige Unterschiede waren durch die Immunreaktionen nicht zu erkennen.

Jedoch läßt sich beobachten, daß am lateralen Rand stets CB positive Zellen und innerhalb der OS CB positive Fasern gefunden wurden. Die Zellen sind dabei immer in der medialen Hälfte des Bandes gelegen, welches den Kern von der Außenfläche des Gehirns trennt. Dieses ist etwa 150 bis 230µm breit und läßt sich an Hand der Immunreaktionen in zwei Abschnitte untergliedern, wobei der mediale Abschnitt stets eine höhere Reaktion auf die beiden Antikörper zeigt als der laterale. In der Literatur sind über diese Bereiche des Gehirns keine genauen Angaben zu finden. Nach eigenen Beobachtungen scheinen hier jedoch viele Fasern zu verlaufen, die im Hirnstamm nach dorsal ziehen. Dabei können diese sowohl die rostralen Abschnitte des NA tangieren, als auch zu den cerebellaren Pedunkeln hinaufziehen. Da eine Verlaufsanalyse über mehrere Millimeter in diesen Bereichen im Material nicht möglich war, läßt sich hier nur spekulieren, ob hier auditorische Verbindungen mit dem Cerebellum bestehen oder Efferenzen verlaufen [siehe auch YANG et al., 1998].

### Nucleus lemniscus lateralis

Die Auswertung der Immunreaktionen auf Calretinin legten eine Untergliederung des Nucleus lemniscus lateralis in zwei Subkerne nahe.

Da sich dieser Kern durch andere Färbemethoden nur schwer in die beschriebenen Abschnitte trennen läßt, stellt sich die Immunreaktion auf das CR Antigen als ein bedeutendes Werkzeug für weitere Untersuchungen dar. Die von vielen Forschern vorgenommene Abgrenzung an Hand des horizontal passierenden Blutgefäßes [KAISER, persönliche Mitteilung] kann damit abgelöst werden durch eine sehr viel exaktere und präzisere Methode. Wie im vorliegenden Material beobachtet werden konnte gibt die Abgrenzung an Hand des Blutgefäßes nur grob die cytologischen Gegebenheiten wieder. Weiterhin wurde beobachtet, daß das Blutgefäß nicht in allen Schnitten zu finden ist.

Die Untergliederung könnte neben der morphologischen auch auf funktionelle Unterschiede in den beiden Subkernen hinweisen. Nach Untersuchungen an *Tyto alba* von MANLEY et al. (1988) entsteht im LLi (der von diesen Autoren als Nucleus lemniscus lateralis posterior, LLp, bezeichnet wird) eine ortsabhängige Kodierung der IID.

Bei *Tyto alba* entspricht dies dem Elongationswinkel der Schallquelle [MANLEY et al., 1988]. Die CB positiven Fasern des LLv, die überwiegend horizontal ausgerichtet sind und die des

LLi, welche der dorsoventralen Achse folgen (Abbildung 3.13 b und d), können dabei ein Hinweis sein, daß auch *Gallus gallus* unterschiedliche neuronale Verarbeitungen in diesen Subkernen vollführt.

#### Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis

Die Bezeichnung MLd folgt hier dem stereotaktischen Atlas von KARTEN und HODOS (1967) über *Columba livia*, der die zentrale Masse dieser Struktur unterhalb des Ventrikels als MLd benennt. Dabei trennt das Stratum Griseum et Fibrosum Periventriculare (SGFPv) den MLd vom Ventrikel. Die hier gewonnene Ergebnisse deuten eine Untergliederung des MLd an, wie sie auch schon von PUELLES et al. (1994) gezeigt wurde. Durch fehlende Literatur zu diesem Kerngebiet bei *Gallus gallus* muß vermehrt auf die Schleiereule zurückgegriffen werden, wo diese Struktur gut untersucht ist.

Die von PUELLES et al. (1994) beschriebene CR positive periventriculäre Lamina, die mit dem SGFPv identisch ist und direkt unterhalb des Ventrikels liegt, konnte nicht als deutlich CR positives Areal dargestellt werden. Eine Untergliederung in einen Kern- und einen Shellbereich ließ sich ebenfalls nicht erkennen. Nur vereinzelt konnten CR positive Neurone bis direkt unter den Ventrikel gesehen werden.

Die erste deutlich CR positive Struktur vom Ventrikel aus zeigte sich als stark immunreaktives Band parallel zur Ventrikeloberfläche. Sowohl positiv angefärbte Neurone als auch Fasern ziehen an den Enden dieser Struktur weiter um den Ventrikel herum in Richtung des optischen Tectums. Die Organisation der CR positiven Neurone könnte dabei auf eine topologieerhaltende Karte hinweisen, die der Kohonentopologie entspricht, wie sie aus neuronalen Netzwerken bekannt ist [siehe auch KOHONEN, 1995]. Diese würde nach dem beobachteten zunehmenden Ordnungsgrad der Neurone bei älteren Tieren darauf hindeuten, daß sie nach dem Schlupf modifiziert wird.

PUELLES et al. (1994) konnten diese Organisation an den von ihnen verwendeten Sagittalschnitten vermutlich nicht oder nur schlecht erkennen, wie hier durch persönliche Beobachtungen an eigenen Sagittalschnitten vermutet werden kann. Diese Struktur würde von der Lage her dem externen Nucleus der Schleiereule [TAKAHASHI und KONISHI, 1988] entsprechen, in dem ebenfalls eine CR-Immunreaktivität nachgewiesen wurde [KUBKE et al., 1999] und in dem eine akustische Raumkarte der Schallquellen entsteht [KÖPPL et al., 2000].

FELDMAN und KNUDSEN (1997) konnten in Versuchen an *Tyto alba* zeigen, daß zwischen dieser Schicht und dem optischen Tectum Kontakte existieren. Auch topologische Zusammenhänge zwischen Schall und optischer Kalibrierung konnten belegt werden, indem diese

Karte experimentell neu strukturiert wurde. Dies entspricht einem weiteren wichtigen Merkmal der Kohonenkarte, indem die synaptische Plastizität erhalten bleibt und neu organisiert werden kann.

FELDMAN und KNUDSEN (1997) geben den externen Nucleus dabei als das Areal an, welches sich unter dem gesamten Ventrikel ausdehnt (siehe dort Abbildung 2), wogegen TAKAHASHI und KONISHI (1988) diesen nur im ventrolateralen Bereich angeben (siehe dort Abbildung 16). Die Angaben von FELDMAN und KNUDSEN (1997) entsprechen dabei eher den hier am Huhn gesehenen Gegebenheiten.

Direkt unterhalb der Schicht, die dem externen Nucleus entspricht, befindet sich ein CB positives Band von hochverzweigten Neuronen (Abbildung 3.15 a und b). Im caudalen Abschnitt ist dabei bei allen Tieren zu beobachten, daß es medial im Umfang zunimmt. Von diesem zieht sich dann parallel und ventral zu dem CB positiven Band unterhalb der CR Schicht ein kurzes, CB positives Stück hakenartig nach lateral hin (siehe Abbildung 3.14, +240µm). Dabei könnte es sich nach Vergleichen mit den Befunden von PUELLES et al. (1994) um das prä-isthmische, superfizielle Areal handeln (siehe dort Abbildung 1c), welches nach diesen Autoren einen schmalen Streifen im caudalen Bereich des MLd bildet. Interessant wäre es, den gemeinsamen Ausgang des CB-positiven Bandes und des eben beschriebenen ‚Zellhakens‘ aus der im Umfang größeren Struktur mit den Ergebnissen dieser Autoren in Einklang zu bringen. Dies ist hier nicht möglich gewesen, da dies Band nicht als räumlich getrennt vom zentralen Teil des MLd gesehen wurde (vergleiche dort mit Abbildung 1).

Das andere, direkt unter dem CR positiven Band liegende CB positive Areal, umhüllt dabei den ebenfalls CR positiven Core des MLd. Nach Injektionsexperimenten von TAKAHASHI und KONISHI (1988) könnte dies mit den Projektionsorten des NA von *Tyto alba* übereinstimmen. Auch die von diesen Autoren beobachtete Trennung in sich nicht überlappende Zonen mit dem Coreareal stimmt dabei überein, obgleich hier eine vollständige Trennung an Hand der Ergebnisse nicht explizit bestätigt werden kann. Diese wären allerdings nur minimal wie sich durch Vergleiche von 40µm auseinander liegenden Schnitten vermuten läßt.

Im Core des MLd findet sich ausschließlich eine Immunreaktion auf Calretinin. Nach der bereits erwähnten Arbeit von TAKAHASHI und KONISHI (1988) ist diese morphologisch identisch mit den Projektionsorten des NL. Dabei wird in der Schleiereule sowohl die Spatiotopie, als auch die Tonotopie der Signale aufrecht erhalten, indem in den dorsalen Teilen des MLd Cores tieffrequentere und in den ventralen höherfrequentere Signale abgebildet werden (siehe dort Abbildung 8, kleines Bild). Auch TAKAHASHI et al. (1987) beschreiben terminierende Fasern des NL im Core Bereich des MLd. Jedoch wird dort eine Immunreaktion auf Calbin-

din beschrieben. Der verwendete polyklonale Antikörper scheint jedoch eine Kreuzreaktion eingegangen zu sein. Im Zusammenhang mit diesem Antikörper wird bei diesen Autoren unter anderem auf die Arbeit von JANDE et al. (1981) hingewiesen. In einer Arbeit von KUBKE et al. (1999) wird ebenfalls über eine CR Immunreaktivität im MLd Core berichtet.

### 4.3 Vergleiche mit anderen Arten

Neben den Säugern sind die Vögel die einzigen rezenten Vertreter, die neben einer komplexen Vokalisation auch ein komplexes Innenohr entwickelt haben [MANLEY et al., 1985]. Die Organisation der Gehörbahn zeigt sich in allen Fällen als ein ‚distributed system‘, wie es für motorische und sensorische Systeme höherer Funktion typisch ist [SHEPHERD, 1988]. Die beschriebene tonotopische Organisation der primären auditorischen Kerne NA, NM und NL scheint dabei ein grundlegendes Prinzip zu sein, welches bei allen bisher darauf untersuchten Vögeln ähnlich ist [RUBEL und PARKS, 1975; TAKAHASHI und KONISHI, 1988].

Gegenüber den Neuronen des NA existieren für die des NM eine Vielzahl von Veröffentlichungen zu verschiedenen Arten [z.B. JHAVERI und MOREST, 1982A, 1982B, 1982C; CARR und BOUDREAU, 1993]. Im rostralen NM werden sowohl bei *Tyto alba* [TAKAHASHI und KONISHI, 1988] als auch bei *Gallus gallus* [WARCHOL und DALLOS, 1990] hohe Frequenzen abgebildet, im caudalen tiefe Frequenzen. Bei beiden Arten besitzen die Neurone einen großen runden oder ovalen Zellkörper mit wenigen oder keinen Dendriten [JHAVERI und MOREST, 1982A]. Die Innervation des NM erfolgt dabei durch den NVIII stets auf der dorsalen Seite [z.B. HÄUSLER et al., 1999]. Auch die Größenabnahme der Neurone des NM von caudolateral nach rostromedial scheint zwischen den drei im Hirnstamm gut untersuchten Arten *Tyto alba* [TAKAHASHI und KONISHI, 1988; CARR und BOURDEAU, 1993], *Columba livia* [HÄUSLER et al., 1999] und *Gallus gallus* [RUBEL und PARKS, 1988] hochgradig korreliert zu sein.

Ein möglicher Zusammenhang mit den hier beschriebenen Bereichen des caudalen NM und der Sensibilität auf Infraschall wird ebenfalls von verschiedenen Autoren geäußert. Neben den bereits erwähnten Befunden zu diesem Thema (siehe Diskussion Nucleus magnocellularis cochlearis) erscheint die Möglichkeit Infraschall wahrnehmen zu können als wichtiger Teil der Orientierung bei *Columba livia* [KREITHEN und QUINE, 1979]. Auch ist bereits für eine taxonomisch ebenfalls zu den Hühnervögeln gehörende Art, dem Perlhuhn, Infraschallsensitivität nachgewiesen [THEURICH et al., 1984].

Der ebenfalls tonotopisch organisierte NL [PARKS und RUBEL, 1975] dient dabei stets der Schallquellenortung durch Koinzidenzdetektion [OVERHOLT et al., 1992; KUBKE und CARR, 2000]. Während beim Huhn nur eine Hemisphäre im NL abgebildet wird [HYSON et al., 1994], laufen bei der Schleiereule beide Seiten zusammen und bilden im NL eine ortsgebundene Kodierung des Azimuth [KÖPPL et al., 2000]. Bei *Tyto alba* ist die Zahl der Neurone im NL dazu deutlich erhöht [PARKS und RUBEL, 1975; CARR und KONISHI, 1990], wie auch das auditorische System allgemein vergleichsweise groß ist gegenüber des Huhns [KUBKE und CARR, 2000] und die hohe Abhängigkeit des Beutegreifers von der Schallquellenlokalisierung widerspiegelt. Der mediale Part des NL, in dem die wichtigsten Frequenzen für die Schallquellenortung verschaltet werden, ist dabei besonders prominent [KÖPPL und CARR, 1997]. In der vorliegenden Arbeit konnten für das Huhn keine Besonderheiten in diesem Gebiet gesehen werden.

Alle Vögel und Reptilien bei denen eine tonotopische Organisation des NM gezeigt werden konnte weisen dabei ein ähnliches Bauprinzip auf, so daß dies vermutlich den Grundbauplan für nicht säugetierartige, terrestrische Vertebraten darstellt. So ist bei mehreren Schlangen neben dem Nucleus angularis ein Nucleus magnocellularis cochlearis zu finden, der sich morphologisch in zwei Teile untergliedern läßt, wie dies auch bei Vögeln der Fall ist [MILLER, 1980].

Auch bei Reptilien, wo ein deutlich ausgebildeter NL zu finden ist, ist er ähnlich in Position und Struktur zum Gegenstück der Vögel [MILLER, 1975]. Nach Untersuchungen von MILLER und KASAHARA (1979) an einigen Schildkröten findet sich ein NL auch in dieser Entwicklungslinie, ist dort jedoch nicht als monozelluläre Schicht ausgebildet.

Daneben sind diese Kerngebiete auch mit denen der Mammalier homologisierbar. PARKS et al. (1983) beschreiben die Homologie von NM und AVCN. Die großen, runden Zellen des NM sind dabei ähnlich den buschigen Zellen des AVCN. Daneben existiert noch ein weiterer Typ aus stellaten Zellen, der denen der caudolateralen Region des NM entspricht [KUBKE und CARR, 2000]. Auch für die adulte Ratte wird ein Fehlen von Calbindin positiven Zellen beschrieben. Jedoch sind einzelne Fasern vorhanden die in diesen eindringen [FRIAUF, 1994]; ähnlich zu den hier beobachteten Verhältnissen bei *Gallus gallus*.

Säugetier verwenden eine ähnliche Art der ITD (in der MSO) wie Vögel um eine Schallquelle im Azimuth zu bestimmen [KÖPPL et al., 2000]. Diese scheint dabei jedoch auch auf monaurale Stimuli reagieren zu können [OERTEL, 1999].

Das Einsetzen und die Aufrechterhaltung der CR Expression scheint bei Vögeln nicht von den normalen auditorischen Eingängen der Cochlea abhängig zu sein [PARKS et al., 1997; STACK

und CODE, 2000]. Dies scheint einen weiteren Unterschied zu den Säugern zu repräsentieren, wo afferente Einflüsse auf die Expression beschrieben wurden [WINSKY und JACOBOWITZ, 1995]. Trotz der Möglichkeit anderer synaptischer Eingänge beim Huhn [JACKSON und PARKS, 1988], die die CR Expression regulieren könnten, schlossen PARKS et al. (1997), daß die basale Expression von CR davon nicht beeinflußt wird.

Bei Säugern werden neben Calretinin, welches bei Vögeln das einzige zu sein scheint, auch weitere CaBP's gefunden. Dabei handelt es sich in erster Linie um Parvalbumin und Calbindin<sub>D28k</sub> [PARKS et al., 1997]. So werden von FRISINA et al. (1995) Ergebnisse für *Chinchilla laniger* mit einem spezifischen Antikörper beschrieben, die im AVCN eine deutliche CB Immunreaktionen von Neuronen und Fasern zeigen und im DVCN Zellkörper. Ein Auftreten von CB in Neuronen konnte hier nicht gezeigt werden.

Neben den bereits angesprochenen Kernen lassen sich auch weitere höhere Stationen der afferenten Gehörbahn mit Kerngebieten der Säuger homologisieren. Bereits 1968 schloß BOORD an Hand von Faserverbindungen und Projektionen der auditorischen Kerne im Hirnstamm auf die Homologie von MLd und dem Colliculus inferior der Säuger.

Alles in allem deuten die verschiedenen Ergebnisse darauf hin, daß die grundlegenden Arbeitsweisen mit denen die heutigen höheren Vertebraten Schall wahrnehmen und verarbeiten aus denen der alten Reptilien hervorgegangen sind [OERTEL, 1999]. Die Systeme, die mit dem Octavolateralissystem assoziiert sind evolvierten dagegen separat. Somit scheinen die Grundzüge für die Systeme bereits vor 290 Millionen Jahren im ausgehenden Karbon determiniert gewesen zu sein, wo die einzelnen hier erwähnten Linien begannen zu diversifizieren.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Verteilung der beiden calciumbindenden Proteine Calbindin<sub>D28k</sub> (CB) und Calretinin (CR) in der afferenten Gehörbahn von *Gallus gallus f. domestica* aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden von 14 Tieren des Alters P0 bis P40 die Innenohren als ‚whole mount‘ sowie Dünnschnitte des Gehirns immunhistochemisch nach der ABC-Methode aufgearbeitet.

Neben den Innenohren wurden die Kerngebiete Nucleus angularis (NA), Nucleus magnocellularis cochlearis (NM), Nucleus laminaris (NL), Nucleus olivaris superior (OS), Nucleus lemniscus lateralis (LL) sowie der Nucleus mesencephalicus lateralis, pars dorsalis (MLd) ausgewertet. Zusätzlich wurde ein neues Kerngebiet beschrieben, welches dorsal im caudalen Hirnstamm liegt und bereits von verschiedenen Autoren als auditorisch erkannt wurde (KAISER, persönliche Mitteilung), jedoch in der Literatur bislang keine Erwähnung fand.

Weiterhin wird die Spezifität des polyklonalen CB Antikörpers im Vergleich zur monoklonalen Variante sowie Ähnlichkeiten des gesamten Systems mit anderen Spezies diskutiert und auf die Probleme die daraus entstehen hingewiesen.

Die anfängliche Vermutung hat sich bestätigt, daß bei dieser Tierart nach dem Schlupf nur geringe altersbedingte Veränderungen im Auftreten der Proteine gezeigt werden konnten.

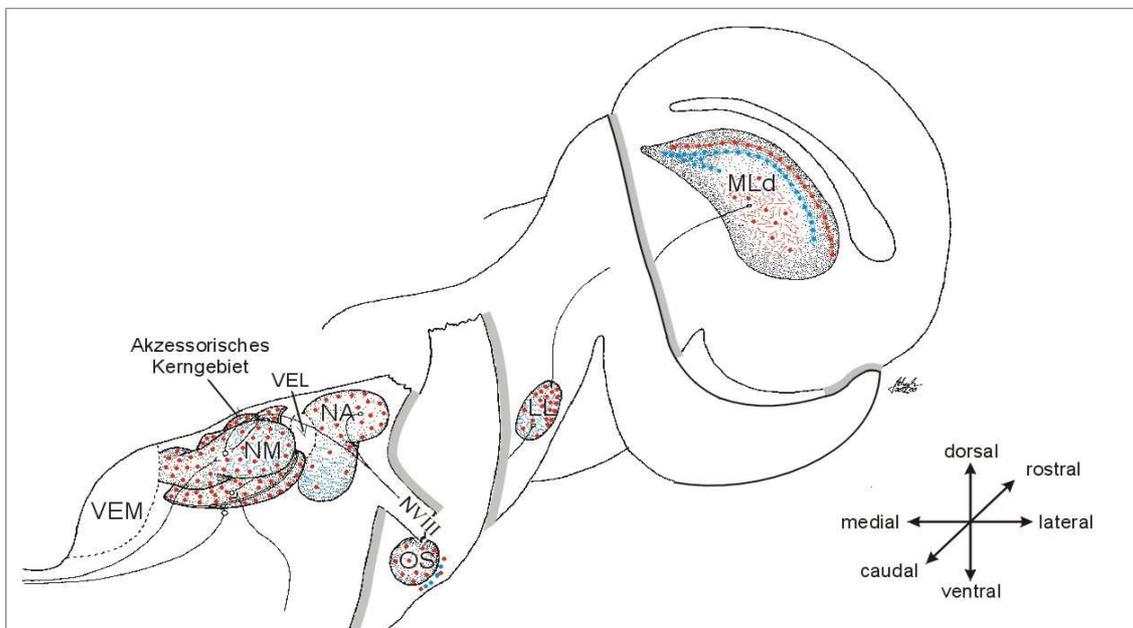


Abbildung 5.1: Die Verteilung der beiden Proteine Calbindin<sub>D28k</sub> (blau) und Calretinin (rot) in der afferenten Gehörbahn von *Gallus gallus f. domestica*. Das Auftreten ist bei allen Tieren gleich und erfährt nur marginale, altersbedingte Veränderungen.

In den Innenohren zeigten sich einzelne CR positive Fasern zwischen den basalen Anteilen der Haarzellen sowie eine deutliche CB Reaktion an den Stereovilli und den kutikulären Platten der Haarzellen.

Im NA erschienen einzelne CR positive Zellen, welche bei frisch geschlüpften Tieren (P0) noch nicht im ventralen Teil des Kerngebietes vorhanden waren. Erst bei älteren Tieren konnten auch im ventralen NA CR positive Zellen gesehen werden. Die prozentuale Verteilung der CR positiven Zellen im dorsolateralen Teil zeigte sich signifikant korreliert mit dem Alter. Bei keinem der untersuchten Tiere konnte ein CB positives Neuron im NA gesehen werden. Dafür traten in allen Altersstufen im ventralen Bereich CB positive Fasern auf, die den Kern horizontal infiltrierten.

Der NM zeigte eine deutliche und ausschließliche CR Immunreaktivität in allen Zellen. Ein caudaler und ein rostraler Part des Kerngebietes konnten unterschieden werden. Während im rostralen Teil die Zellen rund bis ovoid erschienen, erschienen sie im caudalen Abschnitt deutlich kantiger und trugen längere plasmatische Fortsätze. Zudem fanden sich in diesem Teil auch deutlich CB positive Fasern sowie eine verminderte CR-IR der lateralen Zellen. In dieser Arbeit wird vermutet, daß das Auftreten der CB positiven Fasern in den ersten beiden Kerngebieten mit einer möglichen Sensitivität auf Infraschall im Zusammenhang stehen könnte.

Dorsal des NM wurde eine weitere CR positive Struktur beschrieben, die sehr dicht mit den Fasern des NVIIIc in Verbindung steht. Es handelt sich dabei um das bereits erwähnte Kerngebiet, welches in der Literatur nicht erwähnt wird, jedoch in der unmittelbaren Nähe der schwach CR positiven Fasern des NVIIIc liegt.

Die Zellen des NL zeichneten sich durch eine deutliche und CR Immunreaktivität aus. Gleiches galt auch für das gesamte umgebende Neuropil. Es konnten im NL keine CB positiven Strukturen gefunden werden.

In der OS wurden ebenfalls nur CR positive Zellen und Fasern gefunden. Lateral gelegen zeigten sich jedoch stets CR und CB positive Zellen, von denen bisher nicht beschriebene Verbindungen in die OS ausgingen.

Der LL konnte an Hand der CR Reaktion in die beiden Teile LL, pars ventralis und LL, pars intermedia differenziert werden. Diese Immunfärbung zeigt sich somit als ein mächtiges Werkzeug um die beiden Anteile darzustellen zumal sie sich in anderen Färbungen fast nicht voneinander unterscheiden lassen. Die CB Färbung zeigte einzelne dünne, einlaufende Fasern im LL, pars ventralis, die horizontal verliefen. Im LL, pars intermedia folgten diese

Fasern der dorsoventralen Achse. In beiden Fällen war eine Zunahme bei älteren Tieren zu verzeichnen.

Im MLd konnten mehrere Areale immunhistochemisch dargestellt werden. Zum einen ist eine CR positive Struktur zu erkennen, welche der des externen Colliculus inferior der Schleiereule zu entsprechen scheint. Die Fortsätze der CR positiven Neurone wiesen bereits bei jungen Tieren eine Ordnung parallel zum Ventrikel auf, die sich bei älteren Tieren noch weiter erhöhte. Weiterhin können ein ebenfalls CR positives ‚Core Areal‘ und ein CB positives ‚Shell Areal‘ diskriminiert werden. Eine weitere Struktur scheint mit dem von PUELLES et al. (1994) beschriebenen präisthmischen, superfiziellen Areal zu korrespondieren.

Ogleich die genaue Funktion der calciumbindenden Proteine im zentralen Nervensystem der Vertebraten noch nicht aufgeklärt ist, läßt sich feststellen, daß sich Antikörper gegen diese als hervorragendes Mittel eignen, um funktionelle Differenzierungen und Subpopulationen von Neuronen darzustellen.

## 6. Literaturnachweise

ALLORE, R.; O'HANLON, D.; PRICE, R.; NEILSON, K.; WILLARD, H.F.; COX, D.R.; MARKS, A.; DUNN, R.J.; 1988: *Gene Encoding the  $\beta$ -Subunit of S100 Protein is on Chromosome 21: Implications for Down Syndrome*; Science 1988, 239, 1311-1313

BAIMBRIDGE, K.G.; CELIO, M.R.; ROGERS, J.H.; 1992: *Calcium-binding proteins in the nervous system*; Trends in Neurosciences, 15, 303-308

BLAUSTEIN, M.P.; 1988: *Calcium transport and buffering in Neurons*; Trends in Neurosciences, 11, 438-443

BMELF; 1998: *Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.Mai.1998 (BGBl. I S.1105)*; Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BMELF), Bonn

BOORD, R.L.; 1968: *Ascending Projections of the Primary Cochlear Nuclei and Nucleus Laminaris in the Pigeon*; Journal of Comparative Neurology, 133, 523-541

BOORD, R.L.; RASMUSSEN, G.L.; 1963: *Projections of the Cochlear and Lagenaar Nerves on the Cochlear Nuclei of the Pigeon*; Journal of Comparative Neurology, 120, 463-473

BURGOYNE, R.D.; MORGAN, A.; 1995: *Ca<sup>2+</sup> and secretory-vesicle dynamics*; Trends in Neurosciences, 18, 191-196

CAMPBELL, J.R.; LAWSON, D.D.; 1958: *The Signs and Stages of Anaesthesia in Domestic Animals*; Veterinary Record, 70, 545-550

CARR, C.E.; BOUDREAU, R.E.; 1993: *Organization of the nucleus magnocellularis and the nucleus laminaris in the barn owl: encoding and measuring interaural time differences*; Journal of Comparative Neurology, 334, 337-355

CARR, C.E.; KONISHI, M.; 1990: *A Circuit for Detection of Interaural Time Differences in the Brain Stem of the Barn Owl*; Journal of Neuroscience, 10, 3227-3246

COPPENS, A.G.; RÉSIBOIS, A.; PONCELET, L.; 2000: *Immunolocalization of calbindin D28k and calretinin in the dog cochlea during postnatal development*; Hearing Research, 145, 101-110

DUDEL, J.; MENZEL, R.; SCHMIDT, R.F.; 1996: *Neurowissenschaft - Vom Molekül zur Kognition*; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

EDWARDS, F.A.; 1995: *LTP – a structural model to explain the inconsistencies*; Trends in Neurosciences, 18, 250-255

EIGEN, M.; HAMMES, G.G.; 1963: *Elementary steps in enzyme reactions (as studied by relaxation spectrometry)*; Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 25, 1-38.

FELDMAN, D.E.; KNUDSEN, E.I.; 1997: *An Anatomical Basis for Visual Calibration of the Auditory Space Map in the Barn Owl's Midbrain*; Journal of Neuroscience, 17, 6820-6837

FLECKENSTEIN, A.; 1983: *Calcium antagonism in heart and smooth muscle*, Wiley, New York

FRIAUF, E.; 1994: *Distribution of calcium-binding protein Calbindin<sub>D28k</sub> in the auditory system of adult and developing rats*; The Journal of Comparative Neurology, 349:193-211

FRISINA, R.D.; ZETTEL, M.L.; KELLEY, P.E.; WALTON, J.P.; 1995: *Distribution of CalbindinD-28k immunoreactivity in the Cochlear Nucleus of the young adult chinchilla*; Hearing Research, 85, 53-68

GILBERT, W.; 1978: *Why genes in pieces*; Nature, 271, 501

GRAY, L.; SMITH, Z.; RUBEL, E.W.; 1982: *Developmental and experimental changes in dendritic symmetry in n.laminaris of the chick*; Brain Research, 244, 360-364

HACK, N.J.; WRIDE, M.C.; CHARTERS, K.M.; KATER, S.B.; PARKS, T.N.; 2000: *Developmental Changes in the Subcellular Localization of Calretinin*; Journal of Neuroscience, 20, RC67(1-5), [www.jneurosci.org/cgi/content/full/4042](http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/4042)

HÄUSLER, U.H.L.; SULLIVAN, W.E.; SOARES, D.; CARR, C.E.; 1999: *A morphological Study of the Cochlear Nuclei of the pigeon (Columba livia)*; Brain, Behavior and Evolution, 54, 290-302

HEIZMANN, C.W.; BRAUN, K.; 1992: *Changes in Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in human neurodegenerative disorders*; Trends in Neurosciences, 15, 259-264

HYSON, R.L.; OVERHOLT, E.M.; LIPPE, W.R.; 1994: *Cochlear microphonic measurements of interaural time differences in the chick*; Hearing Research, 81, 109-118

JACKSON, H.; PARKS, T.N.; 1988: *Induction of aberrant functional afferents to the chick cochlear nucleus*; Journal of Comparative Neurology, 271, 106-114

JANDE, S.S.; MALER, L.; LAWSON, D.E.M.; 1981: *Immunohistochemical mapping of vitamin D-dependent calcium-binding protein in brain*; Nature, 294, 765-767

JHAVERI, S.; MOREST, D.K.; 1982A: *Neuronal Architecture in Nucleus Magnocellularis of the Chicken with Observations on Nucleus Laminaris: A Light and Electron Microscope study*; Neuroscience, 7, 809-836

JHAVERI, S.; MOREST, D.K.; 1982B: *Sequential Alterations of Neuronal Architecture in Nucleus Magnocellularis of the Developing Chicken: A Golgi Study*; Neuroscience, 7, 837-853

JHAVERI, S.; MOREST, D.K.; 1982C: *Sequential Alterations of Neuronal Architecture in Nucleus Magnocellularis of the Developing Chicken: An Electron Microscope Study*; Neuroscience, 7, 855-870

KAISER, A.; MANLEY, G.A.; 1996: *Brainstem Connections of the Macula Lagena in the Chicken*, Journal of Comparative Neurology, 374, 108-117

KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D.; 1992: *Molekulare Grundlagen des Lernens*; Spektrum der Wissenschaft, 11.1992, 66-76

KARLSON, P.; 1988: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart

KARTEN, H.J.; HODOS, W.; 1967: *A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (Columbia livia)*; John Hopkins Press, Baltimore

KENNEDY, M.B.; 1989: *Regulation of neuronal function by calcium*; Trends in Neurosciences, 12, 417-420

KNIGHT, D.E.; VON GRAFENSTEIN, H.; ATHAYDE, C.M.; 1989: *Calcium-dependent and calcium independent exocytosis*; Trends in Neurosciences, 12, 451-458

KOHONEN, T.; 1995: *Self-Organizing Maps*; Springer Verlag Berlin Heidelberg; Managing Editor: H.K.V. Lotsch

KÖPPL, C.; CARR, C.E.; 1997: *Low Frequency Pathway in the Barn Owls's Auditory Brainstem*; Journal of Comparative Neurology, 378; 265-282

KÖPPL, C.; MANLEY, G.A.; KONISHI, M.; 2000: *Auditory processing in birds*; Current Opinion in Neurobiology, 10, 474-481

KONISHI, M.; 1993: *Listening with two ears*, Scientific American, 268(4), 34-41

KREITHEN, M.L.; QUINE, D.B.; 1979: *Infrasound detection by the homing pigeon: a behavioral audiogram*; Journal of Comparative Physiology, 129, 1-4

KRETSINGER, R.H.; 1976: *Calcium binding proteins*; Annual Review of Biochemistry, 45, 239-266.

KRETSINGER, R.H.; 1987: *Calcium in Nervous System Function*; Encyclopedia of Neuroscience; Birkhäuser Verlag, Boston, Basel, Stuttgart

KUBKE, M.F.; CARR, C.E.; 2000: *Development of the auditory brainstem of birds*; Hearing Research, 147, 1-20

KUBKE, M.F.; GAUGER, B.; BASU, L.; WAGNER, H.; CARR, C.E.; 1999: *Development of Calretinin Immunoreactivity in the Brainstem Auditory Nuclei of the Barn Owl (Tyto alba)*; Journal of Comparative Neurology, 415; 189-203

KUENZEL, W.J.; MASSON, M.; 1988: *A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Chick (Gallus domesticus)*; The Johns Hopkins Press Ltd., London

MALENKA, R.C.; KAUER, J.A.; PERKEL, D.J.; NICOLL, R.A.; 1989: *The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission-ist role in long-term potentiation*; Trends in Neurosciences, 12, 444-450

MANLEY, G.A.; 1990: *Peripheral Hearing Mechanisms in Reptiles and Birds*; Springer Verlag Berlin Heidelberg

MANLEY, G.A.; GLEICH, O.; LEPPELSACK, H.-J.; OECKINGHAUS, H.; 1985: *Activity patterns of cochlear ganglion neurones in the starling*; Journal of Comparative Physiology, 157, 161-181

MANLEY, G.A.; KÖPPL, C.; KONISHI, M.; 1988: *A neural Map of Interaural Intensity Differences in the Brain Stem of the Barn owl*; Journal of Neuroscience, 8, 2665-2676

MARTY, A.; 1989: *The physiological role of calcium-dependent channels*; Trends in Neurosciences, 12, 420-424

MELDOLESI, J.; VOLPE, P.; POZZAN, T.; 1988: *The intracellular distribution of calcium*; Trends in Neurosciences, 11, 449-452

MILLER, M.R.; 1975: *The Cochlear Nuclei of Lizards*; Journal of Comparative Neurology, 159, 375-406

MILLER, M.R.; 1980: *The Cochlear Nuclei of Snakes*; Journal of Comparative Neurology, 192, 717-736

MILLER, M.R.; KASAHARA, M.; 1979: *The Cochlear Nuclei of Some Turtles*; Journal of Comparative Neurology, 185, 221-236

MILLER, R.J.; 1992: *Neuronal  $Ca^{2+}$ : getting it up and keeping it up*; Trends in Neurosciences, 15, 317-319

NAHORSKI, S.R.; 1988: *Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis*; Trends in Neurosciences, 11, 444-448

OERTEL, D.; 1999: *The Role of Timing in the Brain Stem Auditory Nuclei of Vertebrates*; Annual Reviews in Physiology, 61, 497-519

OVERHOLT, E.M.; RUBEL, E.W.; HYSON, R.L.; 1992: *A Circuit for Coding Interaural Time Differences in the Chick Brainstem*; Journal of Neuroscience, 12, 1698-1708

PARKS, T.N.; CODE, R.A.; TAYLOR, D.A.; SOLUM, D.A.; STRAUSS, K.I.; JACOBOWITZ, D.M.; WINSKY, L.; 1997: *Calretinin expression in the chick brainstem auditory nuclei develops and is maintained independently of cochlear nerve input*; Journal of Comparative Neurology, 383, 112-121

PARKS, T.N.; COLLINS, P.; CONLEE, J.W.; 1983: *Morphology and Origin of Axonal Endings in Nucleus Laminaris of the Chicken*; Journal of Comparative Neurology, 214, 32-42

PARKS, T.N.; JACKSON, H.; CONLEE, J.W.; 1987: *Axon-target cell interactions in the developing auditory system*; Current topics in Developmental Biology, 21, 309-340

PARKS, T.N.; RUBEL, E.W.; 1975: *Organization and Development of Brain Stem Auditory Nuclei of the Chicken: Organization of Projections from N. magnocellularis to N. laminaris*; Journal of Comparative Neurology, 164, 435-448

PARMENTIER, M.; 1990: *Structure of the Human cDNAs and Genes Coding for Calbindin D28k and Calretinin*; Advances in Experimental Medicine and Biology, 269, 27-34

PARMENTIER, M.; LAWSON, D.E.M.; VASSART, G.; 1987: *Human 27kDa Calbindin complementary DNA sequence-Evolutionary and functional implications*; European Journal of Biochemistry, 170, 207-215

PERRET, C.; LOMRI, N-E.; THOMASSET, M.; 1990: *Evolution of the EF-Hand family of calcium binding proteins*; Advances in Experimental Medicine and Biology, 269, 17-20

PERSECHINI, A.; MONCRIEF, N.D.; KRETSINGER, R.H.; 1989: *The EF-hand family of calcium-modulated proteins*; Trends in Neurosciences, 12, 462-467

PUELLES, L.; ROBLES, C.; MARTINEZ-DE-LA-TORRE, M.; MARTINEZ, S.; 1994: *New Subdivision for the Avian Semicircularis: Neurochemical Maps in the Chick*; Journal of Comparative Neurology, 340, 98-125

RÉSIBOIS, A.; BLANCHIER, F.; ROGERS, J.H.; LAWSON, D.E.M.; POCHE, R.; 1990: *Comparison between rat brain calbindin and calretinin immunoreactivities*; Advances in Experimental Medicine and Biology, 269, 211-214

ROGERS, J.; 1987: *Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons*; Journal of Cell Biology, 105, 1343-1353; Erratum 1990: Journal of Cell Biology, 110, 1845

ROGERS, J.; 1989: *Two calcium-binding proteins mark many chick sensory neurons*; Neuroscience, 31, 697-709;

ROGERS, J.; KHAN, M.; ELLIS, J.; 1990: *Calretinin and other CaBPs in the nervous system*; Advances in Experimental Medicine and Biology, 269, 195-203

ROSOWSKI, J.J.; SAUNDERS, J.C.; 1980: *Sound Transmission Through the Avian Interaural Pathways*; Journal of Comparative Physiology, 136, 183-190

ROTH, J.; BAETENS, D.; NORMAN, A.W.; SEGURA, L-M.G.; 1981: *Specific neurons in chick central nervous system stain with an antibody against chick intestinal vitamin D-dependent calcium binding protein*; Brain Research, 222, 452-457

RUBEL, E.W.; PARKS, T.N.; 1975: *Organization and Development of the Brain Stem Auditory Nuclei of the Chicken: Tonotopic Organization of N. magnocellularis and N. laminaris*; Journal of Comparative Neurology, 164, 411-434

RUBEL, E.W.; PARKS, T.N.; 1988: *Organization and development of the avian brainstem auditory system*; In: Auditory Function - Neurobiological Bases of Hearing (ed. G.M. Edelman, W.E. Gall, W.M. Cowan) Neuroscience Institute, John Wiley & Sons, New York, 3-92

RUBEL, E.W.; SMITH, D.J.; MILLER, L.C.; 1976: *Organization and Development of Brain Stem Auditory Nuclei of the Chicken: Ontogeny of N. magnocellularis and N. laminaris*; Journal of Comparative Neurology, 166, 469-489

SAUNDERS, J.C.; COLES, R.B.; GATES, G.R.; 1973: *The Development of Auditory Evoked Responses in the Cochlear Nuclei of the Chick*; Brain Research, 63, 59-74

SAUNDERS, J.C.; RELKIN, E.M.; ROSOWSKI, J.J.; BAHL, C.; 1986: *Changes in middle-ear input admittance during postnatal auditory development in chicks*; Hearing Research, 24, 227-235

SCHERMULY, L.; KLINKE, R.; 1990A: *Origin of infrasound sensitive neurones in the papilla basilaris of the pigeon cochlear ganglion*; Hearing Research, 48, 69-77

SCHERMULY, L.; KLINKE, R.; 1990B: *Infrasound sensitive neurons in the pigeon cochlear ganglion*; Journal of Comparative Physiology, 166, 355-363

SCHLEICHER, M.; EICHINGER, L.; WITKE, W.; NOEGEL, A.A.; 1990: *Ca<sup>2+</sup> Binding Proteins as Components of the Cytoskeleton*; Advances in Experimental Medicine and Biology, 269, 99-102

SHEPHERD, G.M.; 1988: *Neurobiologie*; Oxford University Press, Inc. Second Edition

SIMPSON, P.B.; CHALLISS, R.A.; NAHORSKI, S.R.; 1995: *Neuronal Ca<sup>2+</sup> stores: activation and function*; Trends in Neurosciences, 18,

SMITH, Z.D.J.; RUBEL, E.W.; 1979: *Organization and Development of Brain Stem Auditory Nuclei of the Chicken: Dendritic Gradients in Nucleus Laminaris*; Journal of Comparative Neurology, 186, 213-240

STACK, K.; CODE, R.; 2000: *Calretinin-immunoreactivity in the chick cochlear nucleus after deafferentation*; ARO Abstracts, 23, 271, No. 941

STRYER, L.; 1990: *Biochemie*; Spektrum–der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg

TAKAHASHI, T.T.; CARR, C.E.; BRECHA, N.; KONISHI, M.; 1987: *Calcium Binding Protein-Like Immunoreactivity Labels the Terminal Field of Nucleus Laminaris of the Barn Owl*; Journal of Neuroscience, 7, 1843-1856

TAKAHASHI, T.T.; KONISHI, M.; 1988: *Projections of the Cochlear Nuclei and Nucleus Laminaris to the Inferior Colliculus of the Barn Owl*; Journal of Comparative Neurology, 274, 190-211

THEURICH, M.; LANGER, G.; SCHEICH, H.; 1984: *Infrasound responses in the midbrain of the guinea fowl*; Neuroscience Letters, 49, 81-86

TRUSSEL, L.O.; 1999: *Synaptic mechanisms for coding timing in auditory neurons*; Annual Review in Physiology, 61, 477-496

WARCHOL, M.E.; DALLOS, P.; 1989: *Neural response to very low-frequency sound in the avian cochlear nucleus*; Journal of Comparative Physiology, 166, 83-95

WARCHOL, M.E.; DALLOS, P.; 1990: *Neural Coding in the chick cochlear Nucleus*; Journal of Comparative Physiology, 166, 721-734

WILLIAMS, R.J.P.; 1990: *Calcium and steady cell states*; Advances in Experimental Medicine and Biology, 269, 7- 17

WINSKY, L.; JACOBOWITZ, D.M.; 1995: *Effects of unilateral cochlea ablation on the distribution of Calretinin mRNA and immunoreactivity in the guinea pig ventral cochlear nuclei*; Journal of Comparative Neurology, 354, 564-582

YANG, L.; MONSIVAIS, P.; RUBEL, E.W.; 1998: *Firing properties and morphology of neurons in the chick superior olivary nucleus*; Association for Research in Otolaryngology, Abstracts of the 21. Midwinter Research Meeting, Abstract 377

ZIRPEL, L.; LIPPE, W.R.; RUBEL, E.W.; 1998: *Activity-Dependent Regulation of  $[Ca^{2+}]$  in avian cochlear Nucleus Neurons: Roles of Protein Kinase A and C and Relation to Cell Death*; Journal of Neurophysiology, 79, 2288-2302

## **Anhang A; Verwendete Lösungen**

ABC-Peroxidase Inkubation

Lösung 1:500

Acetat-Imidazol-Puffer, pH 7.2

Antikörper-Inkubation, primärer, 3% NGS, 10mM PBS

Lösung 1:5000, 3% NGS

Antikörper-Inkubation, sekundärer, 3%NGS, 10mM PBS

Antikörper 1:200, 3%NGS

Diaminobenzidin-Entwicklerlösung, blau, Imidazol, aus DAB-Stammlösung

Entkalkungslösung, schonend

Gelatine zur Einbettung

Gelatine der Qualität Bloom 300 oder Baker-Grade

Gelatine-Chromalaunlösung für Objektträgerbeschichtung

Imidazolösung, 0.2M

PB, Phosphatpuffer, 0.1M, pH 7,4

PBS, Phosphatpuffer, 10 mM, pH 7,4

PTX, Phosphatpuffer mit 0.05% Detergenz und 8.5g NaCl auf 1000ml H<sub>2</sub>O, pH 7,4

Perfusions-Fixierlösung

Perfusions-Spüllösung

TRIZMA, 1 M, pH 7,2

Wasserstoffperoxid-Inkubation, 0.3% in 10mM PBS

## Anhang B; Bildnachweise

Abbildung	Herkunft/Lokalisationscode	Bemerkung
1.1	Biochemie, Stryer, 1996, Seite 1025	-
2.1 a	HK 49, Immunreaktion des Cerebellums	CB mono
2.1 b	HK 49, Immunreaktion des Cerebellums	CR
3.1	Zeichnung nach der Analyse der Lage in verschiedenen Schnittserien	-
3.2	Übersicht der CR positiven Zellen im NA, unterschiedliche Präparate	-
3.3	Boxplots der Quotienten, NA, Statistika V5.1	-
3.4	Prozentuale Verteilung, NA, Statistika V5.1	-
3.5 a	HK 48, S3/1-3/3	CR
3.5 b	HK 50, S1/1-3/2	CR
3.5 c	HK 49, S3/1-2/4	CR
3.5 d	HK 45, S6/1-2/3	CB poly
3.5 e	HK 43, S6/1-2/3	CB mono
3.6 a	HK 48, S1/1-3/3	CR
3.6 b	HK 48, S1/1-3/3	CR
3.6 c	HK 50, S1/1-2/4	CR
3.6 d	HK 50, S2/1-2/4	CB mono
3.7	Unterschiedliche Zellen der Altersstufe P0 und P1	CR
3.8	Unterschiedliche Zellen der Altersstufe P13 und P40	CR
3.9l	HK 50, S1/1-3/3	CR
3.9r	HK 50, S1/1-3/1	CR
3.10	Zeichnung verschiedener Schnitte von HK 48(P0) und HK 49(P40)	-
3.11 a	HK 45, S1/1-2/4	CR
3.11 b	HK 46, S3/1-2/1	CR
3.11 c	HK 43, S1/1-2/4	CR
3.11 d	HK 47	CB mono
3.11 e	HK 45	CB poly
3.11 f	HK 43, S6/1-2/4	CB mono
3.12 a	HK 48, S1/1-4/1	CR
3.12 b	HK 48, S2/1-4/1	CB mono
3.12 c	HK 47, S1/1-2/4	CR
3.12 d	HK 43, S1/1-3/3	CR
3.12 e	HK 49, S1/1-4/3	CR
3.12 f	HK 49, S2/1-4/3	CB mono
3.12 g	Camera lucida Zeichnung des unter 3.12 f angegebenen Neurons	-
3.13 a	HK 48, S5/2-1/2	CR
3.13 b	HK 48, S6/2-1/2	CB mono
3.13 c	HK 49, S3/2-1/1	CR
3.13 d	HK 49, S4/2-1/1	CB mono
3.14	Camera lucida Zeichnung unterschiedlicher Schnitte des MLd von HK 49	-
3.15 a	HK 46, S5/1-4/4	CB mono
3.15 b	HK 49	CB mono
3.15 c	HK 46, S2/1-5/2	CR
3.15 d	HK 49	CR
3.15 e	HK 49	CR
3.15 f	HK 49	CR
3.15 Mitte	Zeichnung des MLd, aus verschiedenen Schnitten rekonstruiert	-
3.16 a	HK 49 Ohr	CB mono
3.16 b	HK 49 Ohr	CR
3.16 c	HK 49 Ohr	CR
3.16 d	HK 49, S5/1-2/2	CR
3.16 e	HK 49, S6/1-2/3	CB mono
3.16 f	HK 49, S4/1-3/1	CB mono
3.17 a	HK 39, S3/1-4/3	CR
3.17 b	HK 43, S6/1-3/1	CB mono
3.17 c	HK 50, S1/1-4/2	CR
3.17 d	HK 50, S2/1-4/2	CB mono
3.17 e	HK 50, S1/2-1/1	CR
5.1	Zeichnung wie 3.1, mit farblicher Darstellung der Verteilung der Proteine	-

## **Anhang C; Danksagung**

Zu allererst bin ich Frau Prof. Zimmermann zu Dank verpflichtet, die mir dies zugleich spannende und komplexe Thema zur Bearbeitung überlassen hat.

Daneben möchte ich auch Herrn Dr. Alexander Kaiser danken, der die Betreuung übernommen hat und mir in vielen Teilproblemen weiterhalf.

Auch Herrn Prof. Klaus Wächtler gebührt mein Dank, der sich bereiterklärt hat als Gutachter diese Arbeit zu bewerten.

Daneben schulde ich Frau Birgit Haßfurth Dank, die mich in der Anfangsphase dieses Projektes mit viel Liebe und Mühe bei der Einarbeitung unterstützt hat. Zudem danke ich unserem Institutspräparator Herrn Rüdiger Brüning, dessen Kenntnisse in graphischer Gestaltung mit in die Bilder eingeflossen sind. Ebenso darf Frau Dr. Ute Radespiel nicht unerwähnt bleiben, die mir bei der Statistik weitergeholfen hat.

Eine weitere Person, die mit dieser Arbeit zwar nicht in direktem Kontakt steht, ohne sie sie aber gar nicht erst entstanden wäre, ist Herr Dr. Wolfgang Weidemann. Er war mir durch all die Jahre hindurch stets ein hervorragender Lehrer und hat es durch sein immenses Wissen geschafft, mich für viele Fragen der Zoologie zu interessieren. Ohne Ihn wäre ich heute sicherlich nicht mehr bei der Biologie.

Letztendlich möchte ich auch Frau Silke Polenz danken, die es trotz aller Umstände immer wieder geschafft hat, mich zu unterstützen und die viele Korrekturen an dieser Arbeit durchgeführt hat.