

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie
der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Abgrenzung verschiedener Teilbereiche
des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns
für *design-based* stereologische Untersuchungen

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

vorgelegt von
Anna Fichtl
aus München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|--|--------------------------------------|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Christoph Schmitz |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. Eva Grill |
| | Prof. Dr. med. Dennis Nowak |
| | Prof. Dr. med. David Anz |
| Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: | Dr. rer. hum. biol. Maren Kiessling |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 26.05.2020 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|-----------|
| I. | Tabellenverzeichnis | 3 |
| II. | Abbildungsverzeichnis | 4 |
| 1. | Einleitung | 5 |
| 2. | Zielsetzung | 13 |
| 3. | Material und Methoden | 15 |
| 3.1. | Materialien und Hersteller | 15 |
| 3.2. | Untersuchtes Gewebe | 17 |
| 3.2.1. | Untersuchung der Kleinhirnhälften | 21 |
| 3.2.2. | Makroskopische Identifikation von Kleinhirnfissuren (Untersuchungsteil A) | 21 |
| 3.2.3. | Gelatinebeschichtung von Objektträgern | 23 |
| 3.2.4. | Herstellung der histologischen Präparate | 23 |
| 3.2.5. | Mikroskopische Identifikation von Kleinhirnfissuren (Untersuchungsteil B) | 25 |
| 3.2.6. | Erstellung der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Abbildungen | 25 |
| 4. | Ergebnisse | 27 |
| 4.1. | Identifikation von anatomisch abgrenzbaren Fissuren im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn | 27 |
| 4.1.1. | Kombination makroskopischer und mikroskopischer Untersuchungen | 34 |
| 4.2. | Histologische Identifikation anatomisch abgrenzbarer Fissuren im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn ohne vorherige makroskopische Untersuchung | 37 |
| 5. | Diskussion | 41 |
| 5.1. | Validität der Ergebnisse | 41 |
| 5.2. | Identifikation von Teilbereichen im früh-postnatalen Kleinhirn | 43 |

| | | |
|----------|--|----|
| 5.2.1. | Vergleich der Identifikationsmethoden aus den Untersuchungsteilen A und B | 45 |
| 5.3. | Relevanz von <i>design-based</i> stereologischen Untersuchungen am gesamten früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn | 47 |
| 5.3.1. | Praktische Empfehlungen für <i>design-based</i> stereologische Untersuchungen von Gesamtzellzahlen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn | 50 |
| 5.3.1.1. | Verwendung menschlicher Kleinhirne für die Untersuchung von normaler und pathologischer menschlicher Kleinhirnentwicklung | 52 |
| 5.3.1.2. | Verwendung der gesamten Kleinhirnrinde als ROI | 53 |
| 5.3.1.3. | Verwendung unterschiedlicher Zählschemata für die stereologische Ermittlung von Purkinjezellen und Granularzellen | 53 |
| 5.3.1.4. | Verwendung dynamischer statt statischer Zählschemata für die stereologische Ermittlung von Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen | 54 |
| 5.3.1.5. | Überlegungen zur stereologischen Ermittlung der Gesamtzahlen von anderen Zelltypen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn | 58 |
| 5.4. | Vergleich der Einteilung des früh-postnatalen Kleinhirns in Teilbereiche anhand der vorliegenden Arbeit mit der in der Literatur beschriebenen Einteilung des erwachsenen Kleinhirns | 59 |
| 5.5. | Ausblick/aktueller Stand weiterer Untersuchungsmethoden des menschlichen Kleinhirns | 60 |
| 5.5.1. | Alternative Untersuchungsverfahren des menschlichen Kleinhirns | 60 |
| 5.5.2. | Alternative Leitstrukturen zur Einteilung des Säugetier-Kleinhirns | 64 |
| 6. | Zusammenfassung | 67 |
| 7. | Publikation | 68 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 69 |
| | Danksagung | 81 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 82 |

I. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Tabelle 1: Material- und Herstellerverzeichnis | 15 |
| Tabelle 2: Charakteristika der in Untersuchungsteil A untersuchten (n=6) Fälle | 18 |
| Tabelle 3: Charakteristika der in Untersuchungsteil B untersuchten (n=14) Fälle | 19 |
| Tabelle 4: Beschreibung der Fissuren im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn nach Schmahmann et al. (1999) | 22 |
| Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit | 40 |
| Tabelle 6: Empfehlenswerte Zählschemata für die Bestimmung von Gesamtzahlen an Purkinjellen und Granularzellen im früh-postnatalen (< einem Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn | 57 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------------|--|-----------|
| Abbildung 1: | Lobi, Lobuli und Fissuren der menschlichen Kleinhirnhemisphären | 11 |
| Abbildung 2: | Schmeazeichnung eines erwachsenen menschlichen Kleinhirns von ventral, losgelöst vom Hirnstamm | 14 |
| Abbildung 3: | Makroskopische Beurteilung von Fissuren des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns | 29 |
| Abbildung 4: | Markierung der am nativen Kleinhirn identifizierten Fissuren mit verschiedenen Acrylfarben | 30 |
| Abbildung 5: | Sequenzielle makro- und mikroskopische Beurteilung von Kleinhirnfissuren anhand von Markierungen mit Acrylfarben | 33 |
| Abbildung 6: | Beispiel für die mikroskopische Re-Evaluation einer zuvor makroskopisch beurteilten Kleinhirnfissur | 34 |
| Abbildung 7: | Anzahl der Lobuli im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn | 36 |
| Abbildung 8: | Mikroskopische Beurteilung von Fissuren des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns | 38 |
| Abbildung 9: | Vergleich der Identifizierbarkeit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kleinhirnfissuren aus den Untersuchungsteilen A und B | 46 |
| Abbildung 10: | Stereologische Zählung von Purkinjezellen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn | 50 |
| Abbildung 11: | Wichtige Schritte bei der Ermittlung des Volumens einer Gehirnregion und der Gesamtzahl von innerhalb dieser Gehirnregion lokalisierten Neuronen mit <i>design-based</i> stereologischen Methoden | 57 |
| Abbildung 12: | MRT-basierte Abgrenzung verschiedener Zelltiefen im erwachsenen menschlichen Kleinhirn. | 62 |
| Abbildung 13: | Zebrinstreifen im Mäusekleinhirn | 64 |

1. Einleitung

Das Kleinhirn steht über verschiedene Fasertrakte mit dem Großhirn, dem Hirnstamm und dem Rückenmark in Verbindung (z.B. Paxinos, 1990; Roostaei et al., 2014; Witter und De Zeeuw, 2015). Dabei ist es maßgeblich an motorischen und sensorischen Funktionen sowie an höheren kognitiven und emotionalen Leistungen beteiligt, die jeweils verschiedenen Teilbereichen des Kleinhirns zugeschrieben werden können (z. B. Stoodley und Schmahmann, 2009; Buckner, 2013; Witter und De Zeeuw, 2015). Die Untersuchung einzelner Teilbereiche des Kleinhirns – besonders in Hinblick auf ihre Funktion – ist z.B. bei der Ursachenforschung möglicher Beeinträchtigungen von medizinischem Interesse. Dafür stehen je nach Art der Untersuchung (*in vivo* versus *post mortem*, funktionell versus strukturell) verschiedene Methoden zur Verfügung: Für eine funktionelle *in vivo* Untersuchung eignen sich beispielsweise die Positronen-Emissions-Tomographie (PET; z. B. Petacchi et al., 2010) und die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT; z. B. Schraa-Tam et al., 2012).

Strukturelle Studien umfassen neben der *in vivo* Magnetresonanztomographie (Schmahmann et al., 1999) auch verschiedene Ansätze, die mikroskopische Kleinhirnanatomie und deren Zusammenhang mit verschiedenen neurokognitiven Funktionsbereichen zu verstehen. So gelang es im Rahmen einer Metaanalyse von über 50 Studien zur funktionellen Bildgebung des menschlichen Kleinhirns (Stoodley und Schmahmann, 2009), den verschiedenen Lobuli des Kleinhirns folgende Funktionen zuzuordnen:

- (i) Sensomotorische Aufgaben aktivieren neben dem Lobus anterior (Lobulus V) auch den angrenzenden Lobulus VI mit zusätzlichen Foci in Lobulus VIII.
- (ii) Motorische Aktivierung zeigt sich in Lobulus VIIIA/B, wohingegen somatosensorische Aktivierung auf Lobulus VIIIB begrenzt ist.
- (iii) Der Lobus posterior ist an übergeordneten Aufgaben beteiligt.
- (iv) Lobulus VI und Crus I sind an der Sprache und am verbalen Arbeitsgedächtnis beteiligt, während Lobulus VI räumliche Aufgaben erfüllt sowie, gemeinsam mit Crus I und VIIIB, exekutive Funktionen.
- (v) Die Verarbeitung von Emotionen ist in Lobulus VI, Crus I und dem medialen Lobulus VII repräsentiert.

- (vi) Sprachliche Domänen finden sich, kreuzende cerebro-cerebelläre Projektionen widerspiegelnd, vor allem rechts im Kleinhirn, räumliche Bereiche dagegen links.
- (vii) Die Verarbeitung von Emotionen bezieht den zum Vermis gehörenden Bereich des Lobulus VII mit ein und ist somit Bestandteil des Schaltkreises zwischen Kleinhirn und limbischem System.
- (viii) Darüber hinaus aktivieren Sprache und exekutive Aufgaben Regionen von Crus I und Lobulus VII, welche mutmaßlich eine Rolle bei präfronto-cerebellären Schleifen spielen.

Durch seine einzigartige Zytoarchitektur mit klar voneinander abgrenzbaren Zellschichten ist das menschliche Kleinhirn gut zugänglich für quantitativ-mikroskopische Analysen. Dazu muss das Kleinhirn in viele histologische Schnitte aufgeteilt werden, sodass die ursprüngliche dreidimensionale Gestalt des Kleinhirns anhand vieler nahezu zweidimensionaler mikroskopischer Bilder erfasst werden kann. Durch den histologischen Verarbeitungsprozess und die zweidimensionale Betrachtung unter dem Mikroskop kommt es jedoch unweigerlich zum Verlust von Informationen. Zudem ist die komplette quantitativ-histologische Untersuchung eines in Relation zu mikroskopischen Verhältnissen großen Organs wie dem menschlichen Kleinhirn mit erheblichem Zeitaufwand verbunden. Eine Lösung für diese Probleme bietet die Stereologie (griechisch stereos = räumlich, körperlich), einer auf stochastischen und geometrischen Prinzipien basierenden Disziplin, bei der das Größenreduktionsproblem durch statistisch valide Stichprobenauswahl (*Sampling*) und das Dimensionsreduktionsproblem durch geeignete Messverfahren gelöst werden (z.B. Schmitz und Hof, 2005, Glaser et al., 2006; Kipp et al., 2017). Als methodischer Standard hat sich die sog. *design-based* Stereologie etabliert, die sich keinerlei Modellannahmen (beispielsweise zu den geometrischen Eigenschaften einer zu zählenden Struktur) bedient, sondern sich „erwartungstreu“ ausschließlich auf korrekte Stichprobenverfahren stützt (z.B. Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006; Kipp et al., 2017).

Dabei gelten folgende drei praktische Grundprinzipien (z.B. Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006; Kipp et al., 2017):

- (i) die Anwendung von *Systematic and Random Sampling* (SRS),
- (ii) die Ermittlung von Gesamtzellzahlen anstatt von Zelldichten
- (iii) das Zählen von Zellen anstatt von Zellprofilen.

In den folgenden Absätzen wird anhand verschiedener Untersuchungen des Krankheitsbilds „Plötzlicher Kindstod“ (SIDS, sudden infant death syndrome) deutlich, dass quantitativ-histologische Untersuchungen mittels *design-based* Stereologie verlässlichere Erkenntnisse über die physiologische und pathologische mikroskopische Struktur des menschlichen Kleinhirns liefern als vergleichbare Studien, in denen diese Technik nicht angewandt wurde.

Sparks und Hunsaker (2002) stellten eine Hypothese auf, die dem Kleinhirn eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SIDS zuspricht. Diese Hypothese beruht darauf, dass das Kleinhirn durch seine Verbindungen zum Hirnstamm an der respiratorischen und kardiovaskulären Kontrolle beteiligt ist (Cruz-Sánchez et al., 1997; Harper et al., 2000), ebenso wie auf der Beobachtung, dass Kinder, die von SIDS betroffen sind, an anhaltender Apnoe leiden und plötzlich aufhören zu atmen (Steinschneider, 1972; Guilleminault et al., 1975).

Höchstwahrscheinlich lenkten Gadsdon und Emery (1976) als erste die Aufmerksamkeit auf die mögliche Mitwirkung des Kleinhirns an SIDS. Studien an *post mortem* Kleinhirnen von SIDS-Patienten in den darauffolgenden Jahren kamen zu teils widersprüchlichen Ergebnissen. In einigen Studien fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Purkinjenzell-Dichte (Oehmichen et al., 1989; Riedel et al., 1989) und der Zelldichte innerhalb der weiteren Kleinhirnschichten (Riedel et al., 1989) zwischen Kleinhirnen von SIDS-Patienten und Kontrollfällen. Andere Studien hingegen ließen aufgrund der Messung einer höheren Zelldichte in der äußeren Granularzellschicht in den Kleinhirnen von SIDS-Patienten eine Entwicklungsverzögerung des Kleinhirns vermuten (Cruz-Sánchez et al., 1997) oder berichteten darüber hinaus von weiteren kortikalen Veränderungen des Kleinhirns beim SIDS, beispielsweise von einem immunhistochemisch sichtbar gemachten erhöhten Apoptoseindex in der inneren Granularzellschicht (Lavezzi et al., 2006; 2007) (Die Zellen der äußeren Granularzellschicht migrieren von der Fetalzeit an bis ins frühe postnatale Lebensalter ins Innere der Kleinhirnrinde, um dort die innere Granularzellschicht

zu bilden (ten Donkellar, 2003). Der daraus resultierende Rückgang der Zelldichte in der äußeren Granularzellschicht zeigt demnach einen physiologischen Reifungsprozess an.) Allerdings wurde in keiner dieser Studien streng nach den Kriterien der *design-based* Stereologie vorgegangen. Anders die Studie von Kiessling et al. (2013), die die durchschnittlichen Gesamtzahlen von Purkinje- und Granularzellen in den Kleinhirnen von SIDS-Patienten im Alter von zwei bis 10 Monaten gegenüber alters- und geschlechts-gematchten Kontrollen mit *design-based* Stereologie untersuchten und hier keine Veränderung fanden.

Müller-Starck et al. (2014) untersuchten dieselben SIDS- Fälle und Kontrollen, die zuvor von Kiessling et al (2013) untersucht worden waren, diesmal aber mit der *design-based* stereologischen Methode „space balls“ (Calhoun und Mouton, 2000; Mouton et al., 2002). Sie ermittelten damit die durchschnittlichen Gefäßlängendichten von Mikrogefäßen innerhalb der verschiedenen Kleinhirnschichten. Auch darin unterschieden sich SIDS-Fälle und Kontrollen nicht voneinander. Kontrollfälle mit einer niedrigen Wahrscheinlichkeit von Hypoxie und solche mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von Hypoxie zeigten dabei keine Unterschiede.

Ein mögliches Defizit der Studien von Kiessling et al. (2013) und Müller-Starck et al. (2014) könnte allerdings sein, dass die Untersuchungen am Kleinhirn *in toto*, nicht aber separat für funktionell relevante Teilbereiche des Kleinhirns erfolgten (siehe dazu Stoodley und Schmahmann, 2009), so wie dies in der Vergangenheit bereits bei manch anderen *design-based* stereologischen Studien der Fall war: So untersuchten Andersen et al. (2003) in den vier verschiedenen Teilbereichen Lobus anterior, Lobus posterior, Vermis und Lobus flocculonodularis jeweils die Gesamtzahl an zerebellären Neuronen. Die untersuchten Kleinhirne stammten von 19- bis 84-jährigen Personen ohne bekannte neurologische Erkrankungen. Andersen et al. (2003) beobachteten eine altersabhängige Neurodegeneration, die mit etwa 65 Lebensjahren messbar begann. Dabei wurde der größte Neuronenverlust mit 40,9% der Purkinjezellen und 40,6% der Granularzellen im Lobus anterior verzeichnet. In Lobus posterior, Vermis und Lobus flocculonodularis fiel der Neuronenverlust dagegen weniger deutlich aus (im Vermis und im Lobus flocculonodularis fand sich sogar eine Zunahme der Gesamtzahl an Purkinjezellen), sodass Andersen et al. (2003) insgesamt einen altersabhängigen Verlust von 11,7% der

Gesamtzahl an Purkinjezellen und 12,7% der Gesamtzahl an Granularzellen im menschlichen Kleinhirn verzeichneten.

Dieses Beispiel zeigt, dass eine Untersuchung mit *design-based* Stereologie an Teilbereichen des menschlichen Kleinhirns gegenüber einer Untersuchung am ganzen menschlichen Kleinhirn möglicherweise zu anderen Ergebnissen führt.

Dementsprechend erscheint es vielversprechend, auch die Erhebung quantitativer Parameter wie der Gesamtzahl an Zellen und der Mikrogefäß-Längendichten bei SIDS und neurologischen Entwicklungsstörungen, die das Kleinhirn betreffen (z. B. Steinlin, 2008; Stoodley und Limperopoulos, 2016), für spezifische Teilbereiche des Kleinhirns separat mit *design-based* Stereologie durchzuführen.

Letzteres würde jedoch eine eindeutige und reproduzierbare Identifikation von Teilbereichen im früh postnatalen menschlichen Kleinhirn erfordern, die in solchen Studien als *regions of interest* dienen können.

Diesbezüglich muss vermerkt werden, dass das menschliche Kleinhirn innerhalb des ersten Lebensjahres über eine weitaus größere strukturelle und funktionelle Plastizität verfügt als bisher angenommen wurde (Kiessling et al, 2014), und dass es während dieser Zeitspanne womöglich äußerst sensibel auf interne und externe Reize reagiert. Etwa 85% der zerebellären Granularzellen entstehen beim Menschen erst postnatal und die durchschnittliche Anzahl an Granularzellen pro Purkinjezelle steigt im menschlichen Kleinhirn von rund 480 im ersten Lebensmonat auf ca. 2.700 im 11. Lebensmonat an (Kiessling et al., 2014). Dies könnte für neuropsychiatrische Erkrankungen mit erwiesener Kleinhirnbeteiligung bedeutsam sein: Zu diesen zählen der sich bereits in der Kindheit manifestierende Autismus (Purkinjezell-Verlust, Palmen et al., 2004; abnormale Kleinhirnanatomie, Fatemi et al., 2012) einschließlich autistischer Charakteristika, die mit Veränderungen des Vermis assoziiert sind (Kleinhirnhypoplasie, Hashimoto et al., 1995; störungsspezifisch gesteigerte Kleinhirnaktivierung, Christakou et al., 2013) sowie die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (vermindertes Volumen der vermalen Lobuli VIII-X bei Jungen, Berquin et al., 1998; Mostofsky et al., 1998; vermindertes Volumen der vermalen Lobuli VIII-X auch bei Mädchen, Castellanos et al., 2001; mögliche Beeinträchtigung fronto-cerebellärer Bahnen, Durston et al., 2011). Stoodley (2016) fassten die beiden genannten neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen sowie zusätzlich die Entwicklungsdyslexie als Folge gestörter cerebro-cerebellärer Kreisläufe

zusammen. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge zwischen strukturellen Kleinhirnveränderungen und der Schizophrenie (strukturelle Veränderungen im anterioren Vermis und dem korrespondierenden Nucleus fastigii, Martin und Albers, 1995; Volumenminderung im Vermis bei Männern, Joyal et al., 2004; abnorme Kleinhirnmorphologie, Andreasen und Pierson, 2008), Stimmungsschwankungen und bipolaren Störungen (Dysfunktion im Bereich des Vermis und der paravermalen Kleinhirnregionen, Strakowski et al., 2005; Volumenminderung des Kleinhirns, Baldaçara et al., 2011) sowie Beeinträchtigungen des räumlichen und motorischen Lernens (Störung der synaptischen Konvergenz ponto- und olivocerebellärer Bahnen auf Purkinjezellen, Gasbarri et al., 2003) beschrieben.

Die Entwicklung des menschlichen Kleinhirns beginnt etwa in der vierten Entwicklungswoche mit der Ausbildung des Kleinhirnterritoriums im Rautenhirn. Zellproliferation und Migration bilden die Grundlage für die weitere Differenzierung und Fältelung an der Oberfläche des Kleinhirns. So entstehen in der 12. Entwicklungswoche die Kleinhirnfissuren (ten Donkelaar et al., 2003). Die Kleinhirnentwicklung des Menschen führt schließlich dazu, dass der Kleinhirnkortex dicht gefaltet und in zehn Lobuli – diese wiederum bestehend aus durch elf Fissuren voneinander getrennten 13 Sublobuli – unterteilt ist (Abbildung 1; Schmahmann et al., 1999). Zum Zeitpunkt der Geburt sind normalerweise bereits alle Fissuren und Lobuli vorhanden (Larsell, 1947).

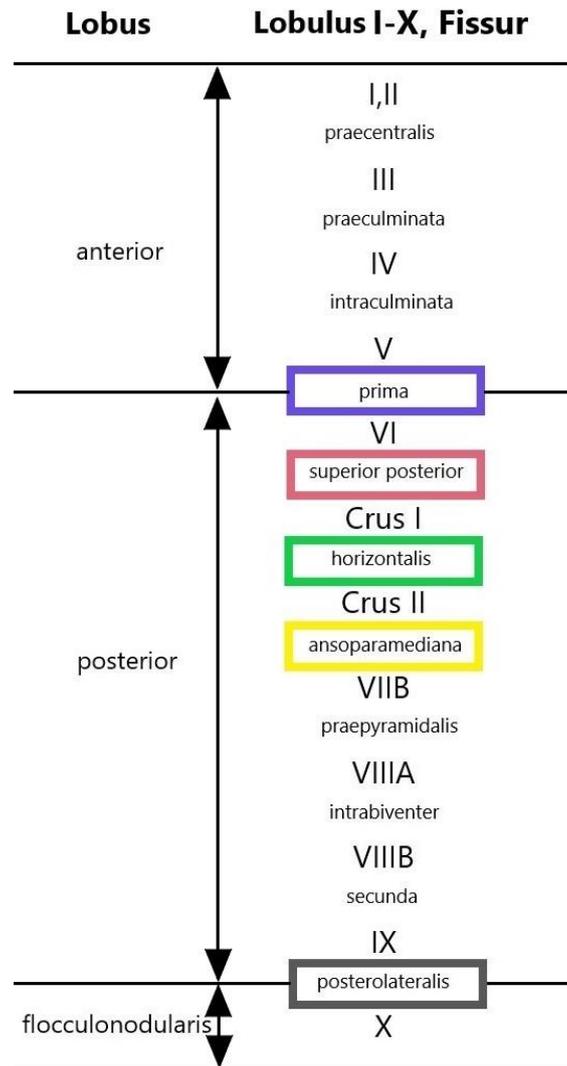


Abbildung 1: Lobi, Lobuli und Fissuren der menschlichen Kleinhirnhemisphären. Der menschliche Kleinhirnkortex wird im Bereich der Hemisphären in drei Lobi und zehn Lobuli untergliedert. Im Gegensatz zu den drei Lobi, die sich sowohl über die Hemisphären als auch den Vermis erstrecken, beziehen sich die Nummerierungen der Lobuli speziell auf den Bereich der Hemisphären. Die lateinische Nomenklatur der dazwischen gelegenen Fissuren entspricht den Bezeichnungen aus Schmahmann et al. (1999): Lobus anterior wird von Lobus posterior durch die Fissura prima getrennt, Lobus posterior von Lobus flocculonodularis durch die Fissura posterolateralis. Die rechteckig umrandeten Fissuren sind Gegenstand dieser Arbeit: Fissura prima (blau), Fissura superior posterior (rot), Fissura horizontalis (grün), Fissura ansoparamediana (gelb), und Fissura posterolateralis (dunkelgrau).

Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, dass das menschliche Kleinhirn noch während des ersten Lebensjahres beträchtlichen Modifikationen unterliegt. Insbesondere weist die Dicke des Kortex in den verschiedenen Teilbereichen des Kleinhirns unterschiedliche Wachstumsraten im Neo- und Archicerebellum auf, vermutlich abhängig von deren embryologischen Ursprung (Tsekhmistrenko, 1996). Auch auf histologischer Ebene zeigen sich postnatal Veränderungen: Zusätzlich zur von Kiessling et al. (2014) beschriebenen Zunahme der Zellzahl in der inneren Granularzellschicht existiert im menschlichen Kleinhirn in den ersten beiden Lebensjahren noch eine zusätzliche Zellschicht, die äußere Granularzellschicht, welche sich physiologisch innerhalb der ersten beiden Lebensjahre wieder zurückbildet (ten Donkelaar et al. 2003).

Dennoch ist die Dynamik von zellulärem und volumetrischem Wachstum verschiedener Unterbereiche innerhalb des Archi- und Neocerebellums noch nicht gänzlich verstanden. Es ist durchaus denkbar, dass sich bestimmte Teilbereiche des Kleinhirns und somit auch entsprechende spezifische Funktionen dieser Teilbereiche schneller entwickeln als andere.

Auf jeden Fall müssen solche möglichen Unterschiede in der Teilbereich-spezifischen Entwicklungsgeschwindigkeit berücksichtigt werden, wenn das sich entwickelnde menschliche Kleinhirn Teilbereich-spezifisch untersucht werden soll.

2. Zielsetzung

Der vorliegenden Arbeit liegt die Annahme zugrunde, dass eine zweifelsfreie Identifikation von *regions of interest* (ROIs), vergleichbar mit den Bedingungen beim erwachsenen menschlichen Kleinhirn gemäß den oben erwähnten Beschreibungen von Nieuwenhuys et al. (1980), Schmahmann et al. (1999) und Skefos et al. (2014), auch am früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn möglich ist.

Basierend auf in der Literatur etablierten makroskopischen (Nieuwenhuys et al., 1980), mikroskopischen (Skefos et al., 2014) und MRT-gestützten (Schmahmann et al., 1999) Unterteilungen der erwachsenen menschlichen Kleinhirnrinde wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen an 20 *post mortem* Kleinhirnhälften, die von Kindern im Alter von einem Tag bis elf Monate stammten, durchgeführt. Dabei war es Ziel der Arbeit, die folgenden fünf verschiedenen ROIs im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn zu identifizieren (Abbildung 2):

- Die erste ROI umfasst die Lobuli IV bis VI der Kleinhirnhemisphäre und befindet sich, begrenzt von der Fissura superior posterior (rote Linie in Abbildung 2), innerhalb des Lobus anterior (blaues Areal in Abbildung 2). Innerhalb dieser ersten ROI befindet sich die Fissura prima (blaue Linie in Abbildung 2), welche Lobuli V und VI voneinander trennt.
- Die zweite ROI beinhaltet Crus I (rotes Areal in Abbildung 2) und ist von der Fissura superior posterior und der Fissura horizontalis (grüne Linie in Abbildung 2) begrenzt.
- Die dritte ROI besteht aus Crus II (grünes Areal in Abbildung 2) und ist von der Fissura horizontalis und der Fissura ansoparamediana (gelbe Linie in Abbildung 2) begrenzt.
- Die vierte ROI umfasst die Lobuli VIIB-VIIIB (gelbes Areal in Abbildung 2) und ist von der Fissura ansoparamediana (gelbe Linie in Abbildung 2) und der Fissura posterolateralis (dunkelgrau in Abbildung 2) begrenzt.
- Die fünfte ROI entspricht dem Flocculus (graues Areal in Abbildung 2).

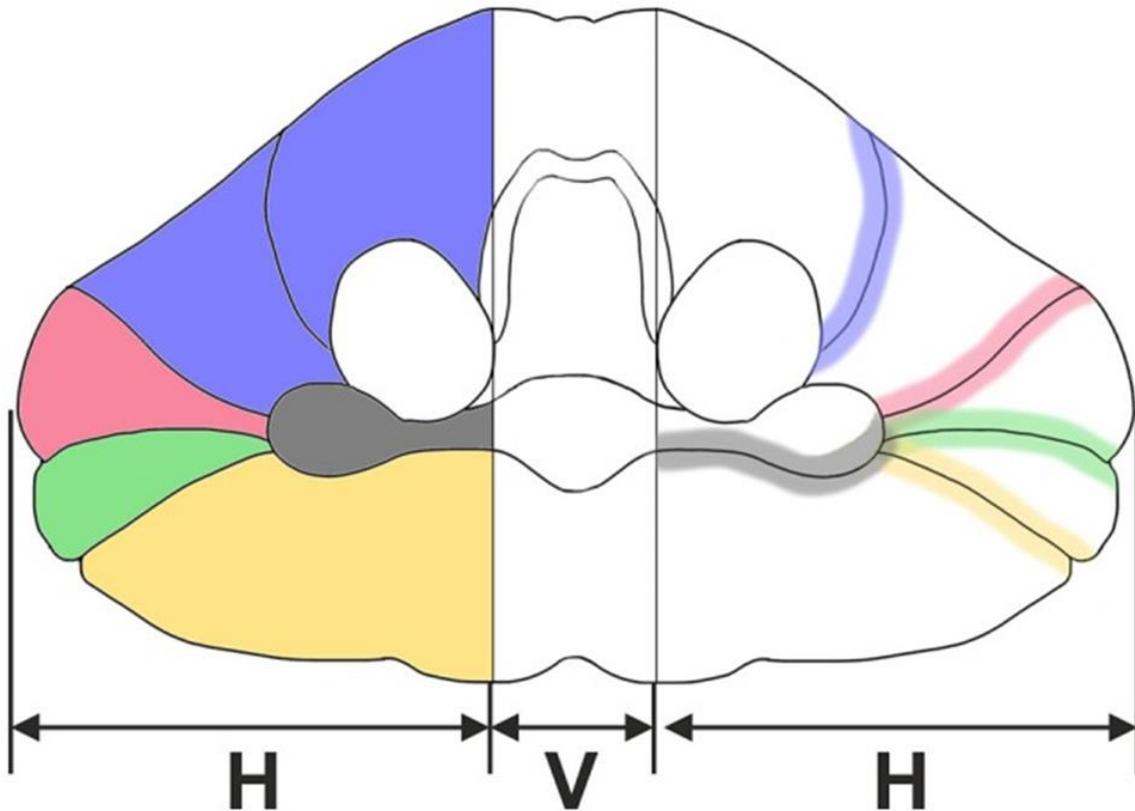


Abbildung 2: Schemazeichnung eines erwachsenen menschlichen Kleinhirns von ventral, losgelöst vom Hirnstamm. Dargestellt sind die dem Vermis (V) und den Hemisphären (H) zugehörigen Areale. Die farbigen Flächen in der linken Bildhälfte repräsentieren fünf *regions of interest*: Lobuli IV-VI (blau), Crus I (rot), Crus II (grün), Lobuli VII B-VIII B (gelb) und Flocculus (dunkelgrau). In der rechten Bildhälfte sind vier anatomisch prominente Fissuren abgebildet, die wichtige Orientierungspunkte an der Kleinhirnoberfläche darstellen: Fissura prima (blau), Fissura superior posterior (rot), Fissura horizontalis (grün), Fissura ansoparamediana (gelb) und Fissura posterolateralis (dunkelgrau). Die beidseits unmittelbar lateral an den Vermis angrenzenden ovalen, weißen Flächen stellen die Pedunculi cerebellares dar.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien und Hersteller

In Tabelle 1 sind Chemikalien, Stammlösungen und Puffer, Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien sowie Geräte und Software-Produkte zusammengefasst, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Material- und Herstellerverzeichnis. Aufgeführt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Stammlösungen und Puffer, Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien sowie Geräte und Software-Produkte.

| | Hersteller | Firmensitz des Herstellers |
|--|----------------------------|-----------------------------------|
| Chemikalien, Stammlösungen und Puffer | | |
| Acrylfarben | CPM, Aldi | Mühlheim an der Ruhr, Deutschland |
| Chrom-III-Kaliumsulfat-Dodecahydrat | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Cresylviolett-Acetat | Waldeck-Division Chroma | Münster, Deutschland |
| Essigsäure, 100% | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol vergällt | CLN | Niederhumme, Deutschland |
| Formaldehydlösung, 4,5% | Fa. Carl Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Gelatine-Pulver | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Malinol | Waldeck Division Chroma | Münster, Deutschland |
| Natriumacetat | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Sucrose | Sigma-Aldrich Chemie | Taufkirchen, Deutschland |
| Tris ultra pur | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Triton X-100, 1% | Sigma-Aldrich Chemie | Taufkirchen, Deutschland |
| Xylol | Merck | Darmstadt, Deutschland |

Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien

Aluminiumfolie

| | | |
|----------------------------|--------------------------|--------------|
| C35-Microtomklingen | Feather Safety Razor Co. | Osaka, Japan |
|----------------------------|--------------------------|--------------|

| | | |
|--|--------------------|------------------------|
| Einmalspritze „Injekt® Luer Solo“, 2 ml | B. Braun Melsungen | Melsungen, Deutschland |
|--|--------------------|------------------------|

Einritzwerkzeug

| | | |
|--|--------|---------------------------|
| Objektträger, 36 × 76 × 1 mm sowie 52 × 76 × 1 mm | Menzel | Braunschweig, Deutschland |
|--|--------|---------------------------|

Pinzette

Anatomisches Skalpell

| | | |
|--|--------------------|------------------------|
| Sterican® Kanüle, Größe 1 Gauge 20 – 0,9 × 40 mm, | B. Braun Melsungen | Melsungen, Deutschland |
|--|--------------------|------------------------|

| | | |
|---|--------|---------------------------|
| SuperFrost Plus Objektträger, 25 × 75 × 1 mm | Menzel | Braunschweig, Deutschland |
|---|--------|---------------------------|

Trockeneis

Zellfasertücher

Geräte und Software

| | | |
|-----------------------------|---------|------------------------|
| Wärmeschrank ULE 400 | Memmert | Schwabach, Deutschland |
|-----------------------------|---------|------------------------|

| | | |
|---|-------|----------------|
| Corel Draw X8 und Corel Photo-Paint X8 | Corel | Ottawa, Kanada |
|---|-------|----------------|

| | | |
|----------------------------|-------------------|------------------------|
| GraphPad Prism 7.04 | GraphPad Software | San Diego, Kalifornien |
|----------------------------|-------------------|------------------------|

| | | |
|---|-------|--------------|
| Kamera Canon EOS 5D Mark III mit dem zugehörigen Objektiv Canon EF 24-105 mm 1:4.0 L IS USM Objektiv | Canon | Tokio, Japan |
|---|-------|--------------|

| | | |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|
| Kryostat Typ CM 1950 | Leica Microsystems | Wetzlar, Deutschland |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|

| | | |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Leuchtkasten | Prolite Basic, Kaiser Fototechnik | Buchen, Deutschland |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------|

3.2. Untersuchtes Gewebe

Die vorliegende Arbeit basiert auf *post mortem* Untersuchungen an Kleinhirnhälften von 20 Kindern im Alter zwischen einem Tag und elf Lebensmonaten. Die Kleinhirnhälften wurden im Zusammenhang mit Autopsien von 1999 bis 2001 im Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München von Herrn Univ. Prof. Dr.med. Andreas Büttner (heute: Direktor des Instituts für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Rostock) gesammelt. Relevante klinische Daten zu den Fällen wurden dokumentiert (Tabelle 2 und 3).

Tabelle 2: Charakteristika der in Untersuchungsteil A untersuchten (n=6) Fälle. Individuelle Werte von Alter, Geschlecht, ausgewerteter Kleinhirnhälfte, mittlerem *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie), Todesursache, Körpergewicht, Gehirngewicht und Körperlänge. Fallnr.: Fallnummer; Alter [Mo]: Alter in Monaten; H: : Ausgewertete Kleinhirnhälfte; li: links; re: rechts; PMI [h]: *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) in Stunden; Körpergewicht [kg]: Körpergewicht in Kilogramm; Gehirngewicht [kg]: Gehirngewicht in Kilogramm ; Körperlänge [cm]: Körperlänge in Zentimetern.

| Fallnr. | Alter [Mo] | Geschlecht | H | PMI [h] | Todesursache | Körpergewicht [kg] | Gehirngewicht [kg] | Körperlänge [cm] |
|---------|------------|------------|--------|-----------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 10/61 | 1 | weiblich | links | 30 | Infekt | 2,5 | 0,387 | 47 |
| 10/43 | 2,5 | männlich | links | 49 | SIDS | 5,6 | 0,583 | 62 |
| 10/91 | 4 | weiblich | links | 29 | SIDS | 6,3 | 0,723 | 65 |
| 10/60 | 6 | männlich | links | 32 | SIDS / kardial | 6,7 | 0,589 | 69 |
| 10/44 | 8 | weiblich | rechts | 27 | SIDS | 7,0 | 0,789 | 73 |
| 10/48 | 10 | weiblich | links | unbekannt | Ersticken an Erdnuss | 11,5 | 1,229 | 81 |

Tabelle 3: Charakteristika der in Untersuchungsteil B untersuchten (n=14) Fälle. Individuelle Werte von Alter, Geschlecht, ausgewerteter Kleinhirnhälfte, mittlerem *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie), Todesursache, Körpergewicht, Gehirngewicht und Körperlänge. Fallnr.: Fallnummer; Alter [Mo]: Alter in Monaten; H: : Ausgewertete Kleinhirnhälfte; li: links; re: rechts; PMI [h]: *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) in Stunden; Körpergewicht [kg]: Körpergewicht in Kilogramm; Gehirngewicht [kg]: Gehirngewicht in Kilogramm ; Körperlänge [cm]: Körperlänge in Zentimetern.

| Fallnr. | Alter [Mo] | Geschlecht | H | PMI [h] | Todesursache | Körpergewicht [kg] | Gehirngewicht [kg] | Körperlänge [cm] |
|---------|------------|------------|--------|---------|------------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 10/46 | 0,03 | weiblich | rechts | 33 | Ersticken | 2,7 | 0,335 | 49 |
| 10/76 | 0,03 | weiblich | links | 10 | Erwürgen | 3,3 | unbekannt | 50 |
| 10/70 | 0,83 | männlich | links | 42 | Ersticken (Tötung) | 4,3 | 0,540 | 54 |
| 10/79 | 1,5 | männlich | links | 36 | Herzfehler | 5,4 | 0,594 | 61 |
| 10/71 | 3 | männlich | rechts | 28 | Infekt | 5,5 | 0,721 | 63 |
| 10/80 | 3 | männlich | links | 27 | Waterhouse-Friedrichsen Syndrom | 5,4 | 0,539 | 55 |
| 10/99 | 4 | männlich | rechts | 25 | Unklar | 6,6 | 0,826 | 64 |
| 10/92 | 7 | männlich | links | 11 | Erwürgen | 6,8 | 0,751 | 70 |
| 10/64 | 8 | männlich | links | 53 | Otitis media | 7,9 | 1,239 | 72 |
| 10/84 | 9 | weiblich | links | 29 | MCAD- / Adrenogenitales Syndrom | 7,8 | 0,911 | 75 |
| 10/45 | 10 | männlich | links | 29 | Sepsis | 8,9 | 0,956 | 74 |
| 10/58 | 10 | weiblich | links | 76 | CO-Intoxikation | 5,5 | 0,836 | 65 |
| 10/65 | 10 | weiblich | links | 7 | Myokarditis | 8,6 | 0,967 | 73 |
| 10/77 | 11 | männlich | links | 56 | Herzfehler | 8,8 | 0,960 | 73 |

Die Kleinhirne wurden während der Autopsie entnommen, mediosagittal zerteilt und eine der beiden Kleinhirnhälften (links oder rechts) nach dem Zufallsprinzip bis zur Untersuchung in 10% neutral gepufferter Formalinlösung gelagert. Sie stammen von Kindern mit unterschiedlichen Todesursachen - unter anderem Ersticken, Herzdefekt oder Infekt -, die von Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der LMU München diagnostiziert wurden (Tabelle 2).

Die Genehmigung zur Verwendung dieser Kleinhirnhälften in der vorliegenden Arbeit wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock unter der Registriernummern A 2012-0053 erteilt.

3.2.1. Untersuchung der Kleinhirnhälften

Alle hier beschriebenen Untersuchungen wurden am Lehrstuhl für Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt der LMU München durchgeführt.

3.2.2. Makroskopische Identifikation von Kleinhirnfissuren (Untersuchungsteil A)

Die sechs Kleinhirnhälften aus Untersuchungsteil A (Tabelle 2) wurden zunächst eine Woche lang mit fließendem Leitungswasser gespült.

Anschließend folgte die Herstellung einer Tris-gepufferten Salzlösung, indem 24,2 g Tris ultra pur (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gemeinsam mit 17,0 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1,9 Liter destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst wurden und die daraus entstandene Lösung mit Eisessig (= 100% Essigsäure, Merck) auf einen neutralen pH (7,4) eingestellt und schließlich mit Aqua dest. auf 2 Liter aufgefüllt wurde. Für jede Kleinhirnhälfte wurden je nach Größe 400 - 500 ml Tris-gepufferte Salzlösung in einen Glasbehälter gefüllt. Dort lagerten die Kleinhirnhälften unter Hinzugabe von Sucrose in aufsteigender Konzentration (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland; Sucrose-Konzentration 10%, 20% und 30%). Die Sucrose-Lösung wurde im Zuge der schrittweisen Konzentrationserhöhung jeweils komplett ausgetauscht. In dieser Lösung wurden die Kleinhirnhälften bei 4°C jeweils so lange belassen, bis sie zum Boden des Behälters gesunken waren. Für den Fall, dass eine Kleinhirnhälfte bei einer Sucrose-Konzentration von 30% nicht binnen ein bis zwei Tagen zum Boden des Behälters gesunken war, wurde die Sucrose-Lösung nochmals bei gleicher Konzentration erneuert. Anschließend wurden die Kleinhirnhälften mit Zellfasertüchern trocken getupft und die Meningen und oberflächlichen Gefäße behutsam mit Skalpell und Pinzette entfernt. Das makroskopische Erscheinungsbild der Kleinhirnhälften wurde aus verschiedenen Perspektiven (dorsal, ventral, kranial, kaudal, lateral und medial) fotografisch dokumentiert (Canon EOS 5D Mark III Kamera und dem zugehörigen Canon EF 24-105 mm 1:4.0 L IS USM Objektiv [Canon, Tokio, Japan]; diese Kamera wurde für alle Aufnahmen in der vorliegenden Arbeit verwendet).

Danach wurden an den Kleinhirnhälften aus Untersuchungsteil A anhand der makroskopisch sichtbaren Merkmale, basierend auf den Beschreibungen von Schmahmann et al. (1999) (die entsprechenden Kriterien sind in Tabelle 4 aufgeführt), die Fissura prima,

Fissura superior, Fissura posterior, Fissura horizontalis, Fissura ansoparamediana und Fissura posterolateralis (Abbildung 2, rechts) markiert.

Tabelle 4: Beschreibung der Fissuren im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn nach Schmahmann et al. (1999). Aufgeführt sind die verschiedenen in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten Fissuren, die dafür verwendete Abkürzung auf den Objektträgern bei und nach histologischer Verarbeitung, die jeweilige für die Markierung mit Acrylfarbe verwendete Farbe je Fissur und eine Beschreibung der morphologischen Kriterien zur Identifikation der einzelnen Fissuren. Abk.: Abkürzung. Verw. Farbe: verwendete Farbe.

| Fissura | Abk. | Verw. Farbe | Morphologische Kriterien |
|---------------------------|-------------|--------------------|---|
| prima | B | blau | 1) Trennt den Lobus anterior des Kleinhirns (Lobuli I bis V) vom Lobus posterior (Lobuli VI bis IX). 2) Trennt Lobulus V von Lobulus VI sowohl im Vermis als auch in den Hemisphären. |
| superior posterior | R | rot | Trennt Lobulus VI von Lobulus VII im Vermis und Lobulus VI von Crus I (des Lobulus ansiformis) in den Hemisphären. |
| horizontalis | G | grün | Trennt Lobulus VIIAf von Lobulus VIIAt im Vermis sowie Crus I von Crus II in den Hemisphären |
| ansoparamediana | Y | gelb | Befindet sich an der ventralen Oberfläche des „Tuber“, trennt Lobuli VIIAt von VIIB (kürzlich Lobulus paramedianus oder gracilis genannt). |
| postero-lateralis | S | dunkelgrau | Bildet die Grenze zwischen Lobus posterior des Kleinhirns und dem Lobus flocculonodularis, trennt Lobulus IX von Lobulus X (in älterer Terminologie Nodus im Vermis, Flocculus in den Hemisphären). |

Für jede der oben genannten Fissuren wurde eine andere Acrylfarbe verwendet (Fissura prima: blau; Fissura superior posterior: rot; Fissura horizontalis: grün; Fissura ansoparamediana: gelb; Fissura posterolateralis: dunkelgrau) (Tabelle 4). Diese wurden solange mit Leitungswasser verdünnt (3/1 v/v), bis sie eine mittelflüssige Konsistenz hatten, und anschließend mittels 2 ml-Spritzen mit Kanüle (Gauge 20 - 0,9 x 40 mm; Sterican; Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) gewebsschonend unter Berücksichtigung der

jeweiligen Farbe je Fissur in die zuvor identifizierten Fissuren eingefüllt. Für den Fall, dass eine Fissur nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden die benachbarten, auch in Frage kommenden Fissuren ebenfalls mit derselben Acrylfarbe markiert. Dann wurden die Kleinhirne erneut aus denselben Perspektiven wie zuvor ohne Markierungen fotografiert.

3.2.3. Gelatinebeschichtung von Objektträgern

Für die Beschichtung mit Gelatine wurden die Objektträger (36 × 76 × 1 mm sowie 52 × 76 × 1 mm; Menzel, Braunschweig, Deutschland) in der Spülmaschine gereinigt und in Metallständern bei 37 °C eine Stunde lang im Wärmeschrank getrocknet.

Währenddessen wurden 50 g Gelatine-Pulver (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einen Liter Aqua dest. eingerührt und durch allmähliches Erwärmen auf 60 °C gelöst. Nachdem die Lösung wieder abgekühlt war, wurden 0,32 g Chromalaun (Chrom (III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat; Merck) hinzugeben und die fertige Gelatinelösung in ein Glasgefäß filtriert.

Die in Metallständern lagernden Objektträger wurden für zwei Sekunden vollständig in die Gelatinelösung getaucht. Danach tropfte die überschüssige Gelatine auf ein Tuch ab und die Objektträger wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet. Am Folgetag wurden die Objektträger für 30 Minuten in eine 4,5 %-ige Formaldehydlösung (pH 7, säurefrei, phosphatgepuffert; Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und über Nacht zum Ausdampfen unter dem Abzug belassen.

3.2.4. Herstellung der histologischen Präparate

Für die histologische Verarbeitung wurden die sechs Kleinhirnhälften aus Untersuchungsteil A mit Aluminiumfolie umwickelt und je nach Größe bis zu einer Stunde in einer Isolierbox mit zerkleinertem Trockeneis eingefroren.

Mit einem Kryostaten vom Typ CM 1950 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit C35-Microtomklingen (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan), wurden aus den mit Acrylfarbe markierten sechs Kleinhirnhälften jeweils fünf Schnittserien von 100 µm dicken Schnitten hergestellt (sagittale Schnittführung). Dazu wurde jeder 24. Schnitt pro Schnittserie größenabhängig entweder auf SuperFrost Plus Objektträger (25

× 75 × 1 mm; Menzel) oder auf die vorher mit Gelatine beschichteten Objektträger (wie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben) aufgezogen. So betrug der Abstand zwischen den Schnitten der einzelnen Serien konstant 24 × 100 µm, entsprechend 2,4 mm. Das Schneiden mit dem Kryostaten erfolgte bei -20 °C Innentemperatur und -18 °C am Probenhalter.

Je eine aus den so entstandenen fünf Schnittserien pro Kleinhirnhälfte wurde nach dem Zufallsprinzip für die Färbung mit Cresylviolett ausgewählt. Die verbliebenen vier Schnittserien wurden bei -20°C gelagert.

Da ein Auswaschen der Acrylfarben während der Cresylviolett-Färbung nicht auszuschließen war, wurde die Position der Fissuren anhand der vorher gesetzten farbigen Markierungen auf der Rückseite der Objektträger mit einem scharfen Messer eingeritzt. Zusätzlich wurden die Fissuren, um sie nach der Cresylviolett-Färbung auch weiterhin den verschiedenen Acrylfarben (und damit der jeweiligen Fissur) zuordnen zu können, mit Abkürzungen versehen (B = Fissura prima, R = Fissura superior posterior, G = Fissura horizontalis, Y = Fissura ansoparamediana, S = Fissura posterolateralis). Für den oben beschriebenen Fall, dass keine klare Zuordnung einer Fissur möglich war und mehrere Fissuren in Frage kamen, die mit der jeweils entsprechenden gleichen Farbe markiert wurden, wurde zusätzlich eine fortlaufende Nummer vergeben (z. B. bei zwei für Y = Fissura ansoparamediana in Frage kommenden Fissuren erfolgte die Ergänzung mit fortlaufenden Zahlen von kranial nach kaudal: Y1, davon kaudalwärts Y2, etc.).

Nachdem die Objektträger auf einen Leuchtkasten (Prolite Basic; Kaiser Fototechnik, Buchen, Deutschland) gelegt und die Schnitte erneut fotografiert worden waren, wurden diese mit Cresylviolett gefärbt. Dazu wurde zunächst Acetatpuffer hergestellt. 2,721 g Natriumacetat × 3 H₂O (Merck) wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst sowie 4,804 ml Eisessig (Merck) in 400 ml Aqua dest, beide Lösungen vermischt (500 ml) und mithilfe von Eisessig (Merck) auf einen pH-Wert von 3,8 eingestellt. Die so entstandene Lösung diente als Grundlage für die Cresylviolett-Acetat-Lösung. 100 ml des Acetatpuffers wurden mit 0,5 g Cresylviolett-Acetat (Waldeck-Division Chroma, Münster, Deutschland) vermischt und die daraus entstandene Farbstofflösung wiederum 1:1 mit Acetatpuffer (pH 3,8) verdünnt und zum Abschluss filtriert.

Zu Beginn der Cresylviolett-Färbung wurden die ausgewählten Schnitte für 30 Minuten in Acetatpuffer mit 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie; pH 3,8) gelegt und

anschließend für je 5 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 90%; hergestellt aus Ethanol 99% vergällt; CLN, Niederhummel, Deutschland) gespült und in 96%-igem Alkohol über Nacht gelagert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (90%, 70%, 70%) wieder in wässriges Milieu überführt und für 5 Minuten mit Aqua dest. gespült. Dann wurden die Schnitte 25-35 Sekunden in die Cresylviolett-Acetat-Lösung getaucht und dann kurz in Aqua dest. geschwenkt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde anschließend die Farbintensität bis zum gewünschten Ergebnis eingestellt. Dazu wurden die ausgewählten Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe (70% mit 3 Tropfen Eisessig (Merck), 90%, 96% mit 3 Tropfen Eisessig, 100%, 100%) getaucht, sodass Teile des Kleinhirngewebes entfärbt wurden. Dies erfolgte so lange, bis der gewünschte Kontrast zum für Untersuchungen vorgesehenen Kleinhirnannteil erreicht wurde. Zum Abschluss wurden die Schnitte noch zweimal für 5 Minuten in Xylol gelegt, mit Malinol (Waldeck Division Chroma) eingedeckt und nach einer anschließenden Aushärtungszeit von drei Tagen erneut fotografiert (Abbildung 4).

3.2.5. Mikroskopische Identifikation von Kleinhirnfissuren (Untersuchungsteil B)

Die weiteren 14 Kleinhirnhälften aus Untersuchungsteil B (Tabelle 3) wurden bereits im Rahmen früherer Studien verarbeitet und analysiert (Kiessling et al., 2013; 2014). Die entsprechenden Schnitte waren prinzipiell auf dieselbe Weise hergestellt worden wie oben für die sechs Kleinhirnhälften aus Untersuchungsteil A beschrieben (es handelte sich also ebenfalls um Serien 100 µm dicker, mit Cresylviolett gefärbter Sagittalschnitte). Allerdings wurden weder die Fissuren der Kleinhirnhälften mit Acrylfarben noch die Fissuren auf den Objektträgern markiert. Auch die Fotografien zu diesen beiden Arbeitsschritten entfielen folglich. Nachdem die gefärbten Schnitte der ausgewählten Serien auf dem Leuchtkasten (Prolite Basic) fotografiert waren, wurden diese in hoher Auflösung am Computer nach den zu identifizierenden Fissuren untersucht und mittels Corel Draw X8 (Version 18.1.0.661; Corel, Ottawa, Kanada) kenntlich gemacht.

3.2.6. Erstellung der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Abbildungen

Alle Abbildungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit Corel Photo-Paint X8 und Corel Draw X8 (beide Versionen 18.1.0.661; Corel) erstellt. Es erfolgten lediglich geringfügige

Anpassungen von Kontrast und Helligkeit, ohne die Erscheinung der Originalbilder zu verändern.

4. Ergebnisse

4.1. Identifikation von anatomisch abgrenzbaren Fissuren im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn

Die an den sechs nativen Kleinhirnhälften aus Untersuchungsteil A (Tabelle 2) farbig markierten Fissuren waren über den gesamten Verarbeitungsprozess hinweg deutlich sichtbar. Auch die Morphologie der markierten Fissuren blieb durch die histologische Verarbeitung weitgehend unverändert, sodass ein nachträgliches Verwechseln markierter Fissuren ausgeschlossen werden konnte.

Die Identifikation der fünf zu bestimmenden Fissuren – Fissura prima, Fissura superior posterior, Fissura horizontalis, Fissura ansoparamediana und Fissura posterolateralis (Tabelle 4) gelang nicht lückenlos: Je nach Größe der Kleinhirnhälften konnten makroskopisch wie mikroskopisch maximal drei dieser fünf Fissuren zuverlässig identifiziert werden. Bei den drei gut identifizierbaren Fissuren handelte es sich um die Fissura superior posterior, Fissura horizontalis sowie Fissura posterolateralis. So geht aus Tabelle 5 hervor, dass die Fissura superior posterior und die Fissura horizontalis in 19 von den insgesamt 20 untersuchten Fällen reproduzierbar lokalisiert werden konnten; die Identifikation der Fissura posterolateralis gelang in 17 von 20 Fällen.

Eine präzise Lagebestimmung der Fissura prima und Fissura ansoparamediana war hingegen nicht möglich: Die Fissura prima konnte in maximal 15 von 20 Fällen, die Fissura ansoparamediana in maximal 18 von 20 Fällen grob lokalisiert werden. Für diese beiden Fissuren galt, dass sich die im jeweiligen Kleinhirnbereich direkt benachbarten Fissuren makroskopisch zum Teil nicht signifikant voneinander unterschieden; damit ist gemeint, dass sich Parameter, die normalerweise eine Identifikation ermöglichen - etwa die Tiefe und der Verlauf der Fissuren -, ähnelten. Dies wird deutlich in Abbildung 3C, die beispielhaft die linke Kleinhirnhälfte eines 6 Monate alten Kindes aus kranialer Perspektive zeigt: Diese Perspektive ist prinzipiell am besten dazu geeignet, die vermutete Lage der Fissura prima zu bestimmen, da sie den Lobus anterior in vollem Umfang erfasst. Die in Frage kommenden Fissuren innerhalb des Lobus anterior glichen sich hier allerdings weitgehend, sodass eine zweifelsfreie Identifikation der Fissura prima nicht möglich war und erst weiter kaudalwärts ein leicht veränderter Fissurenverlauf die Lage der

nächstgelegenen, ebenfalls zu bestimmenden Fissura superior posterior anzeigte (roter Pfeil in Abbildung 3C).

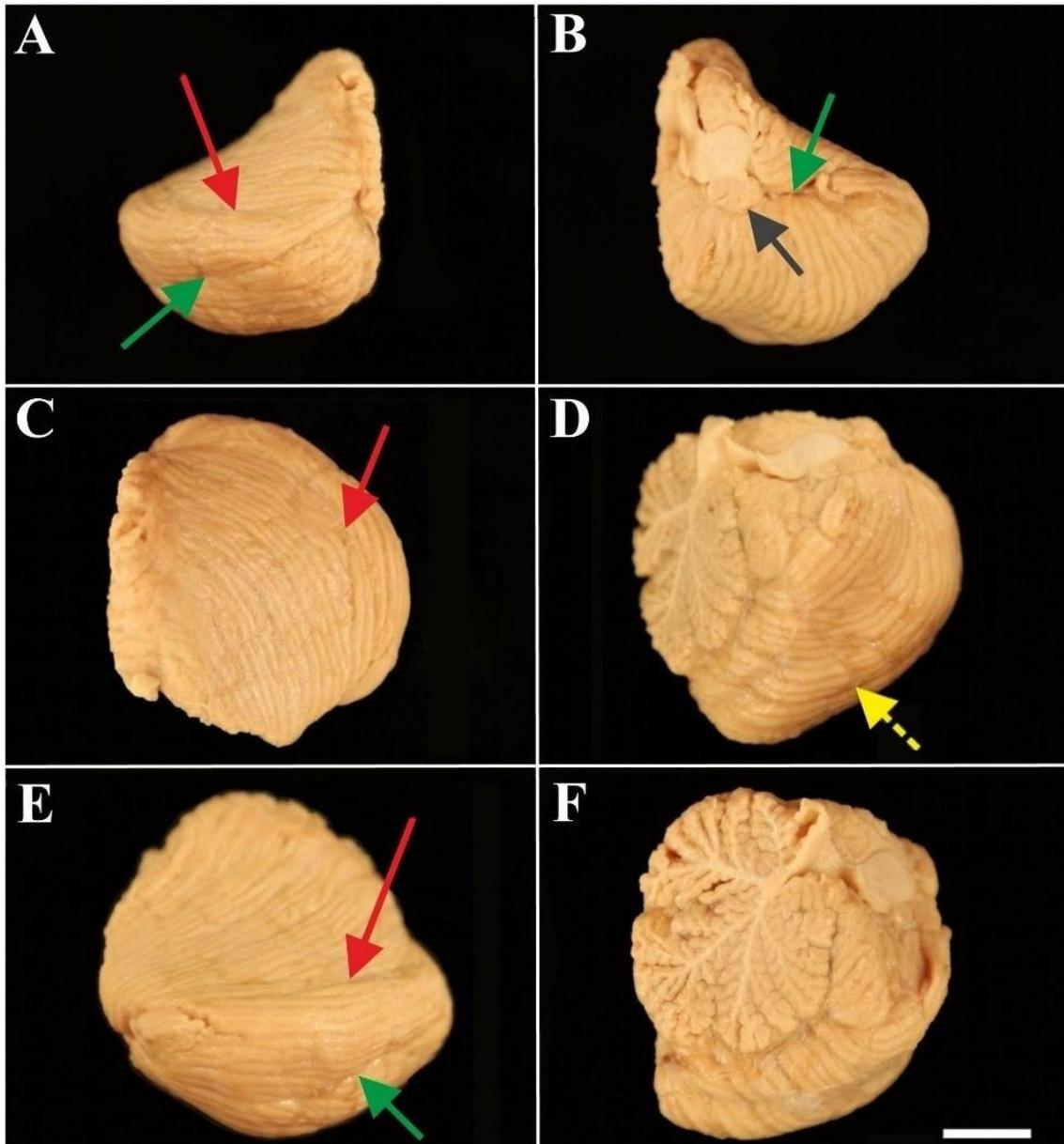


Abbildung 3: Makroskopische Beurteilung von Fissuren des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns. Repräsentative linke Kleinhirnhälfte eines 6 Monate alten Kindes. Die Kleinhirnhälfte wird aus den folgenden Perspektiven gezeigt: von dorsal (A), von ventral (B), von kranial (C), von kaudal (D), von lateral (E) und von medial (F). Die bunten Pfeile verweisen auf prominente, makroskopisch sichtbare Fissuren. Die Farbgebung der Pfeile entspricht den verwendeten Farben in Abbildung 2; die Pfeile zeigen auf die Fissura superior posterior (roter Pfeil in (A,C,E)), die Fissura horizontalis (grüner Pfeil in (A,B,E)) und die Fissura posterolateralis (dunkelgrauer Pfeil in (B)). In der kaudalen Perspektive war eine Identifikation prominenter, makroskopisch sichtbarer Fissuren weniger offensichtlich (gepunkteter gelber Pfeil in (D), der auf die mögliche Lage der Fissura ansoparamediana verweist), während eine eindeutige Identifikation in der medialen Ansicht überhaupt nicht gelang (F). Der Messbalken in (F) repräsentiert 1 cm in (A-F).

Weiterhin zeigte sich, dass sich die verschiedenen in Untersuchungsteil A makroskopisch untersuchten Kleinhirnhälften insbesondere hinsichtlich der zu identifizierenden Fissura prima morphologisch vielfältig darstellten. Abbildung 4 zeigt exemplarisch zwei Kleinhirnhälften von Kindern unterschiedlichen Lebensalters, bei denen eine Bestimmung der Fissura prima gleichermaßen schwierig erschien.

Darüber hinaus bestanden teils deutliche Unterschiede hinsichtlich der absoluten Position der identifizierten Fissuren entlang der Kleinhirnoberfläche je nach Größe der jeweiligen Kleinhirnhälfte: So scheint sich beispielsweise die Fissura superior posterior (rot in Abbildung 4) im Zuge der frühen postnatalen Entwicklung des menschlichen Kleinhirns etwas nach kaudal zu verlagern.

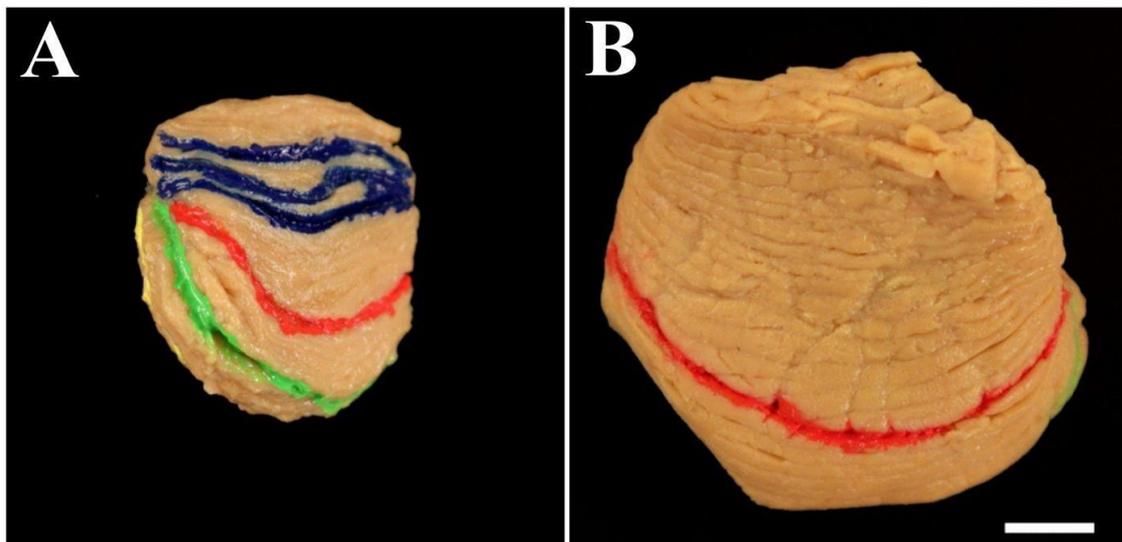


Abbildung 4: Markierung der am nativen Kleinhirn identifizierten Fissuren mit verschiedenen Acrylfarben. Repräsentative rechte Kleinhirnhälfte eines 2,5 Monate alten Kindes (A; Fallnummer 10/43 in Tabelle 2) und linke Kleinhirnhälfte eines 10 Monate alten Kindes (B; Fallnummer 10/48 in Tabelle 2) aus kranialer Sicht. Die im Rahmen der histologischen Verarbeitung auf der Kleinhirnoberfläche entfernten Gefäße hinterließen vertikale Abdrücke auf der Kleinhirnoberfläche (B). Die mit blauer Acrylfarbe gefüllten Fissuren (A) repräsentieren drei denkbare Positionen der Fissura prima (Farbgebung entsprechend der in Abbildung 2 verwendeten Farben). In (B) kamen mehr als drei benachbarte Fissuren als wahrscheinlichste Position der Fissura prima infrage, sodass hier auf eine Markierung mit blauer Farbe verzichtet wurde. Als weitere mit Acrylfarbe gefüllte Fissuren sind die Fissura superior posterior (rot in (A,B)), die Fissura horizontalis (grün in (A,B)) sowie die Fissura ansoparamediana (gelb in (A)) abgebildet. Der Messbalken in (B) repräsentiert 1 cm in (A,B).

Abbildung 5 verdeutlicht, dass die markierten Fissuren auch nach der histologischen Verarbeitung einschließlich Kryoschneiden und Cresylviolett-Färbung noch eindeutig zugeordnet werden konnten. Die visköse Acrylfarbe drang in allen Fällen zuverlässig in die Fissuren ein und lagerte sich nachhaltig und gut sichtbar am Fissurengrund ab. Aber auch im gefärbten Schnitt ist eine Abgrenzung bestimmter *regions of interest* (ROIs) - hier der dritten ROI zwischen Crus II und den Lobuli VIIB-VIIIB - nicht zuverlässig nachzuvollziehen (Abbildung 5D).

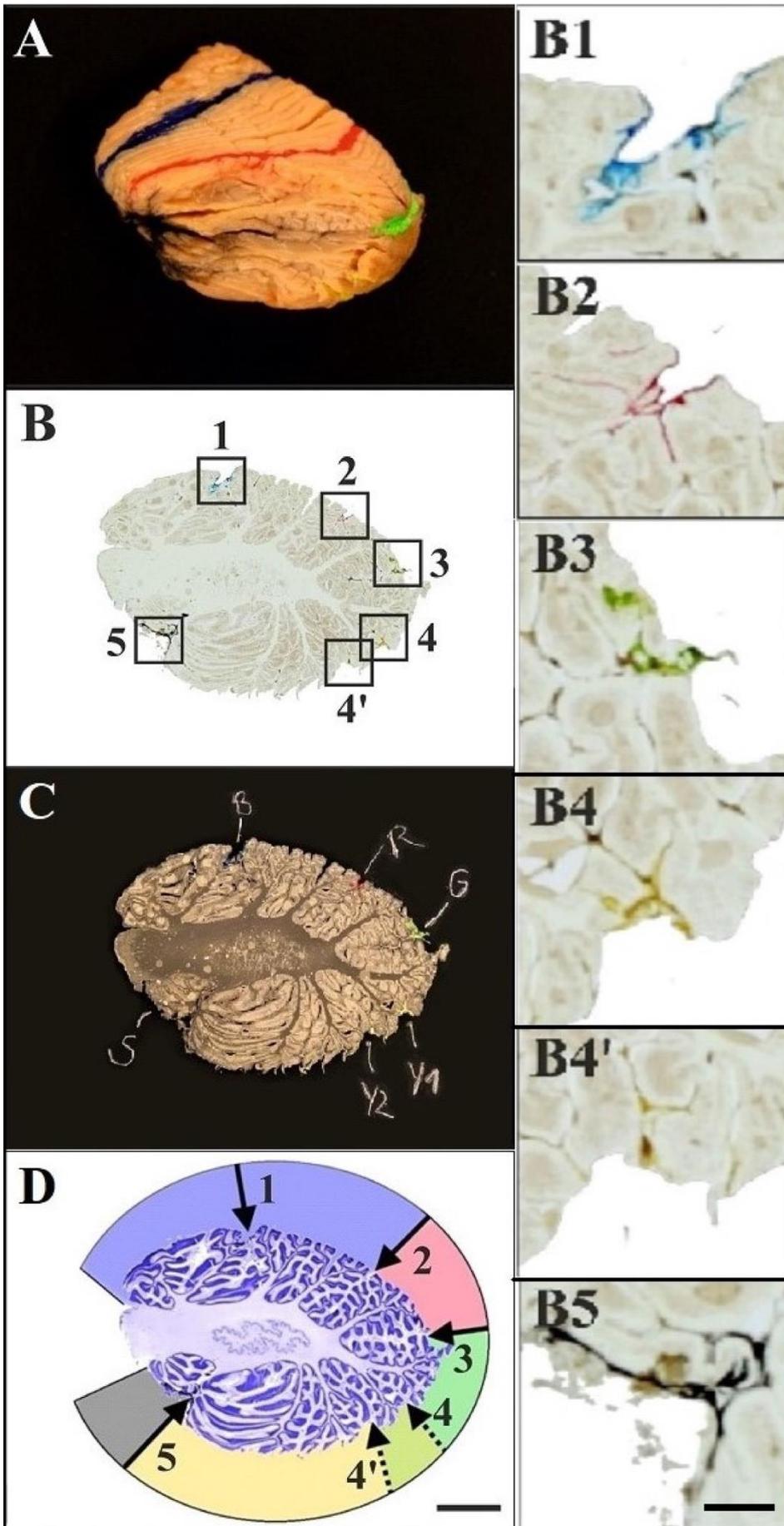


Abbildung 5: Sequenzielle makro- und mikroskopische Beurteilung von Kleinhirnfissuren anhand von Markierungen mit Acrylfarben (Kleinhirnhälfte eines 6 Monate alten Kindes; Fallnummer 10/91 in Tabelle 2). Die Abbildung zeigt die linke Kleinhirnhälfte von lateral (A) und daraus jeweils denselben, 100 µm dicken sagittalen Schnitt 170 nach verschiedenen Arbeitsschritten (B-D). Die identifizierten Fissuren wurden mit folgenden Acrylfarben gefüllt: blau - Fissura prima, rot - Fissura superior posterior, grün - Fissura horizontalis, gelb - die in diesem Schnitt beiden möglichen Fissurae ansoparamedianae (hier war eine Zuordnung nicht eindeutig möglich) und dunkelgrau - Fissura posterolateralis. Dann wurde die Kleinhirnhälfte in 100 µm dicke sagittale Schnitte geschnitten und beispielhaft der Schnitt 170 weiterverarbeitet (B - D). In (B) sind nach der Herstellung des Schnitts 170 die farbigen Markierungen entsprechend Abbildung (A) gut zu erkennen. Zur Verdeutlichung wurden die mit (B1-5) bezeichneten Quadrate, die die Position der Markierungen anzeigen ((B) und (D): Fissura prima: 1; Fissura superior posterior: 2; Fissura horizontalis: 3; Fissura posterolateralis: 5), vergrößert dargestellt. Da die in diesem Schnitt möglichen Fissurae ansoparamedianae nicht eindeutig einer Fissur zuzuordnen waren, gibt es für diese zwei Markierungen, die mit 4 und 4` bezeichnet sind (in (B) und (D) und als (B4) und (B4`)). Abbildung (C) zeigt denselben Schnitt wie (B); hier wurden die entsprechenden Fissuren aber zusätzlich mit Buchstaben gekennzeichnet (Fissura prima: B; Fissura superior posterior: R; Fissura horizontalis: G; die beiden möglichen Fissurae ansoparamedianae: Y1 und Y2; Fissura posterolateralis: S; Tabelle 5) und diese in die Unterseite des Objektträgers geritzt. So wurde sichergestellt, dass die mit Acrylfarbe gefüllten Fissuren auch nach möglichem Farbverlust im Rahmen der weiteren histologischen Verarbeitung identifiziert werden konnten. In Abbildung (D) ist derselbe Schnitt wie in (B) und in (C) nach der Färbung mit Cresylviolett dargestellt. Die Pfeile zeigen die Position der einzelnen Fissuren an, die Nummerierung entspricht der Nummerierung in Abbildung (B). Die farbigen Bereiche in (B) repräsentieren die in Abbildung 2 beschriebenen ROIs: Lobuli IV-VI (blau), Crus I (rot), Crus II (grün), Lobuli VIIIB-VIIIB (gelb) und Flocculus (dunkelgrau), die anhand der Fissuren (Tabelle 5) als Grenzen identifizierbar sind. Da die Fissura ansoparamediana, die die untere Begrenzung von Crus II darstellt, nicht eindeutig zu identifizieren war, gibt es für Crus II in diesem Falle zwei verschiedene mögliche Positionen. Die Grenze zwischen Crus II und den Lobuli VIIIB-VIIIB kann entweder durch die Fissur 3 und 4 begrenzt sein und den hellgrünen Bereich einschließen, oder aber durch die Fissuren 3 und 4` den lindgrünen Bereich einschließen. Anmerkung: Im Zuge der Gewinnung der hier abgebildeten Kleinhirnhälfte während der Autopsie kam es zu einem minimalen Verlust von Kleinhirngewebe posterolateral (sichtbar in Abbildung (A) anhand des Abbruchs der grün markierten Fissura horizontalis), dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Identifikation von Fissuren. Die hier gezeigten Fotografien wurden mit einer Canon EOS 5D Mark III Kamera und dem zugehörigen Canon EF 24-105 mm 1:4.0 L IS USM Objektiv (Canon, Tokio, Japan) erstellt (die Abbildungen (B) und (D) unter Zuhilfenahme eines Leuchtkastens (Prolite Basic)). Die Originalfotos wurden mit der Software Corel Photo-Paint X8 und Corel Draw X8 (beide Versionen 18.1.0.661; Corel, Ottawa, Kanada) geringfügige in Kontrast und Helligkeit angepasst. Der Messbalken in (D) repräsentiert 1 cm in (A-D)., der Messbalken in (B5) repräsentiert 200 µm in (B1-B5).

4.1.1. Kombination makroskopischer und mikroskopischer Untersuchungen

Bei allen sechs Kleinhirnhälften aus Untersuchungsteil A (Tabelle 2) konnten die Fissura superior posterior, Fissura horizontalis und Fissura posterolateralis unabhängig vom Alter des jeweiligen Kindes nach eindeutigen makroskopischen Kriterien identifiziert werden (Tabelle 5). Im Gegensatz dazu gelang dies bei der Fissura prima und der Fissura ansoparamediana nicht zuverlässig, da sich letztere makroskopisch nicht erkennbar von den angrenzenden Fissuren unterschieden. Anhand der bei jedem Untersuchungsschritt angefertigten Fotografien war eine Re-Evaluation der makroskopisch erkannten Fissuren in den später angefertigten histologischen Schnitten möglich. So konnte beispielsweise die vermutete Lage der Fissura prima im Fall 10/44 aus Tabelle 2 im Zuge der mikroskopischen Kontrolle geringfügig korrigiert werden (Abbildung 6). Aus der mikroskopischen Kontrolle der zuvor makroskopisch beurteilten Fissuren der restlichen fünf Fälle aus Untersuchungsteil A ergaben sich keine Veränderungen.

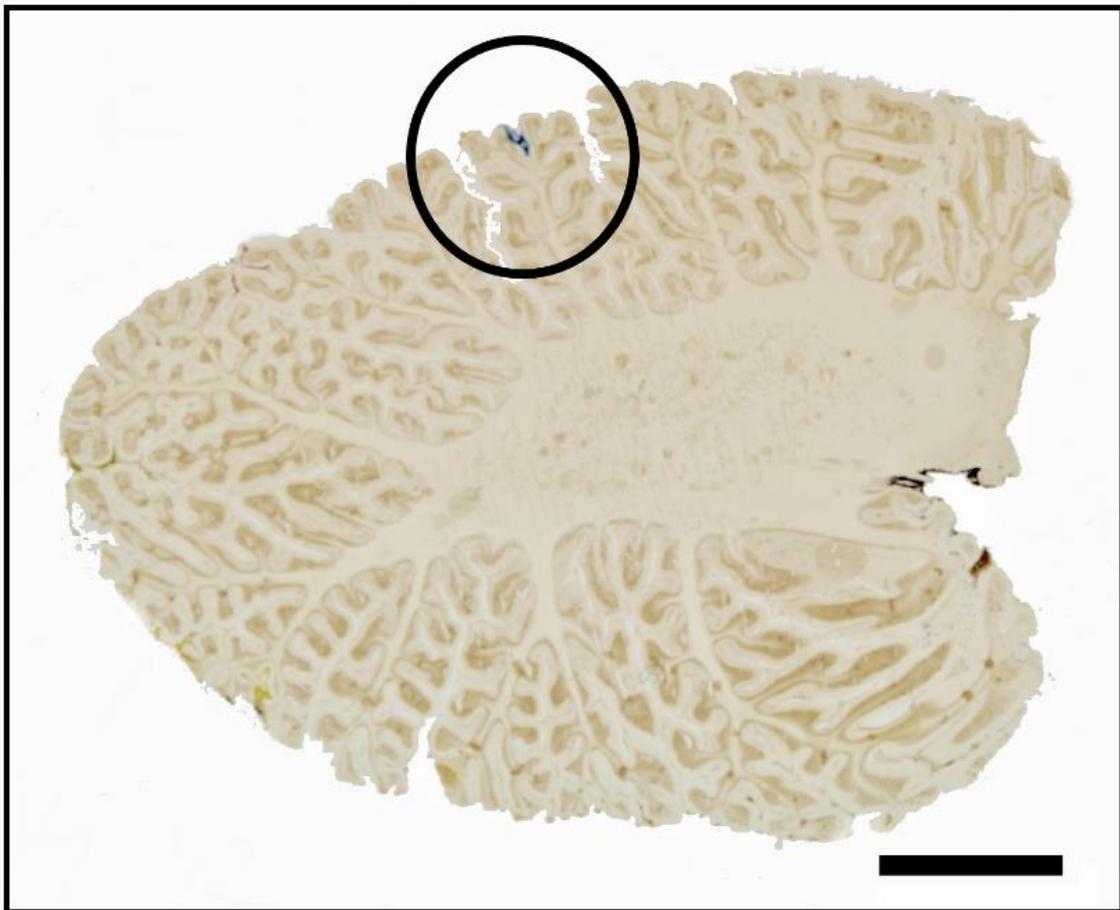


Abbildung 6: Beispiel für die mikroskopische Re-Evaluation einer zuvor makroskopisch beurteilten Kleinhirnfissur. Repräsentativer, 100 µm dicker parasagittaler nativer (d.h.

ungefärbter) histologischer Schnitt der rechten Kleinhirnhälfte eines 8 Monate alten Kindes (Schnitt-Nr. 265 von Fall 10/44 in Tabelle 2) mit Schnittebene knapp lateral der Kleinhirnerne. Analog zu Abbildung 4B sind die an der Kleinhirnoberfläche makroskopisch identifizierten Fissuren vor der Herstellung des histologischen Schnitts mit verschiedenen Acrylfarben markiert worden und im gezeigten Schnitt schwach sichtbar. Im Zentrum des schwarz umkreisten Areals erkennt man die blaue Acrylfarbe, die zur Markierung der Fissura prima diente. Rein makroskopisch war der blau markierte Bereich fälschlicherweise als Fissur erkannt worden, die als wahrscheinlich galt, die Fissura prima darzustellen. In der hier gezeigten mikroskopischen Kontrolle wird jedoch deutlich, dass der blau markierte Bereich innerhalb der schwarzen Umkreisung keine Fissur, sondern ein lobulärer Bestandteil ist. Demzufolge konnte die vermutete Lage der Fissura prima anhand des Schnitts nachträglich korrigiert werden. Am ehesten kommen die den blau markierten Bereich flankierenden Fissuren (beide gut sichtbar innerhalb der schwarzen Umkreisung) in Frage, die Fissura prima darzustellen. Der Messbalken repräsentiert 1 cm.

Auf mikroskopischer Ebene war es anhand der histologischen Schnitte von fünf Fällen aus Untersuchungsteil A nicht möglich, die in anatomischen Atlanten (z.B. Larsell und Jansen, 1972; Voogd und Ruigrok, 2012) beschriebene Anzahl von exakt zehn Lobuli, diese wiederum unterteilt in dreizehn Sublobuli und durch elf Fissuren voneinander getrennt, zu identifizieren. Aufgrund einer variablen Anzahl an Folia unterschied sich die Anzahl an Lobuli und Sublobuli bei den verschiedenen Fällen (Abbildung 7). Die Fissura superior posterior und Fissura horizontalis konnten auf allen histologischen Schnitten zuverlässig identifiziert werden, nicht jedoch die Fissura prima und Fissura ansoparamediana.

(Hierzu sei angemerkt, dass gemäß mehreren Quellen (siehe z. B. Larsell, 1947, Paxinos, 1990, Schmahann et al., 1999) die Fissura prima und die Fissura superior posterior direkt aneinander angrenzen und gemeinsam die Grenzen von Crus I definieren. Dennoch wurde in anderen Studien eine abweichende Lokalisation der Fissura prima beschrieben. So demonstrierten z.B. Schmahann et al. (1999), dass Crus I eine zusätzliche Fissur beinhaltet. Zusätzlich wurde die Fissura ansoparamediana in der Literatur auch als der Fissura horizontalis direkt benachbart (Paxinos, 1990) beschrieben.)

Aufgrund geringfügiger morphologischer Abweichungen in Lobulus VIIIA konnte die exakte Position der Fissura ansoparamediana auf den histologischen Schnitten der Kleinhirnhälften des Untersuchungsteils A allerdings nicht verortet werden. Denn Lobulus VIIIA zeigte in den Fällen 10/71, 10/92, 10/44 und 10/64 (letzterer ist in Abbildung 7A

dargestellt) eine „V-Form“ und bestand aus zwei Folia. Diese beiden Folia waren jedoch nicht vollständig durch eine Fissur getrennt: Sie konvergierten in einen gemeinsamen Ausläufer weißer Substanz, welche ihrerseits in die zentrale weiße Substanz mündete. Im Gegensatz dazu fanden sich an der entsprechenden Stelle in den histologischen Schnitten der anderen Kleinhirnhälften zwei separate Folia, die gänzlich – d. h. bis weit in die zentrale weiße Substanz hinein - durch eine Fissur geteilt waren (Fall 10/45 in Abbildung 7B). Demnach war es unklar, ob und inwiefern innerhalb des Lobulus VIIIA allgemein von einer weiteren Fissur ausgegangen werden muss.

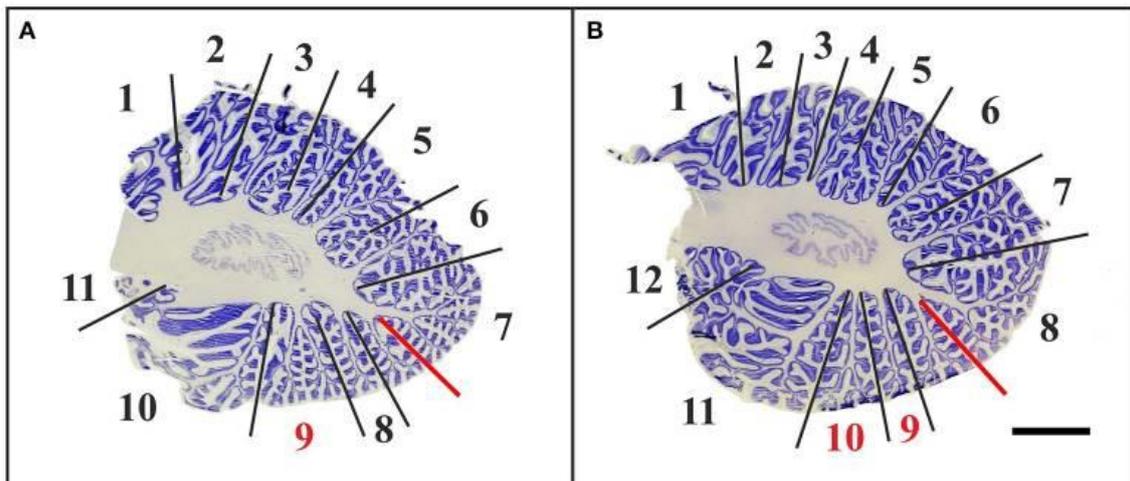


Abbildung 7: Anzahl der Lobuli im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn. Repräsentative 100 µm dicke parasagittale, mit Cresylviolett gefärbte histologische Schnitte der linken Kleinhirnhälfte eines 8 Monate alten Kindes (Schnitt-Nr. 346 von Fall 10/64 in Tabelle 2) (A) sowie der linken Kleinhirnhälfte eines 10 Monate alten Kindes (Schnitt-Nr. 298 von Fall 10/45 in Tabelle 2) (B)). Die Unterteilung der Kleinhirnrinde in einzelne Teilbereiche erfolgt anhand der Fissuren, die bis in die zentrale weiße Substanz reichen (durchgezogene schwarze Linien). Die roten Linien stellen unsichere Unterteilungen dar. Werden die Lobuli zwischen den Linien gezählt, so beträgt die Gesamtanzahl an Lobuli mindestens 11 im Kleinhirnschnitt des 8 Monate alten Kindes (Zahlen in (A)), wohingegen im Kleinhirnschnitt des 10 Monate alten Kindes zwölf Lobuli gezählt werden können (Zahlen in (B)). Die roten Zahlen in (A, B) stehen für morphologisch variable Regionen, welche Teil von Lobulus VIIIA sind. In den hier gezeigten Beispielen findet sich ein V-förmiges Areal in (A), an vergleichbarer Stelle in (B) besteht dieses Areal aus zwei separaten Ausläufern von weißer Substanz. Der Messbalken in (B) repräsentiert 1 cm in (A, B).

4.2. Histologische Identifikation anatomisch abgrenzbarer Fissuren im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn ohne vorherige makroskopische Untersuchung

Im Untersuchungsteil B, der keine vorherige makroskopische Evaluation der Fissuren enthielt, gelang die Identifikation der Fissura superior posterior und der Fissura horizontalis auf sagittalen Kleinhirn-Schnitten durch rein histologische Betrachtung ebenso zuverlässig wie im Untersuchungsteil A. Im Gegensatz dazu konnte die Fissura ansoparamediana in zwei Fällen aus Untersuchungsteil B nicht bestimmt werden, und zwar aufgrund der bereits beschriebenen „V-förmigen“ Bereiche in Lobulus VIIIA: Es fanden sich kleine zusätzliche Folia am Grund der Fissuren, besonders der Fissura superior posterior (Abbildung 8A). Diese Folia konnten aufgrund ihrer Lage unterhalb der Kleinhirn-Oberfläche nicht eindeutig einer der *regions of interest* (ROIs; abgebildet in Abbildung 2) zugeordnet werden und fanden sich darüber hinaus ebenso in den mikroskopischen Kontrollen aller im Untersuchungsteil A untersuchten Kleinhirnhälften.

Zudem war es in zwei Fällen aus Untersuchungsteil B (Fall 10/79 und 10/84 in Tabelle 3) nicht möglich, die Fissura posterolateralis zuverlässig zu bestimmen. Wegen der klaren Struktur des Flocculus konnte die Fissura posterolateralis in makroskopischen Untersuchungen stets identifiziert werden. Dies war jedoch nicht möglich, sobald Fissuren und Lobuli nur zweidimensional auf histologischer Ebene beurteilt werden konnten. Insbesondere war es nicht möglich, die Fissura posterolateralis auf Schnitten, die den Übergangsbereich des Flocculus zu Lobulus VIIIB enthalten, eindeutig zu bestimmen (Abbildung 8).

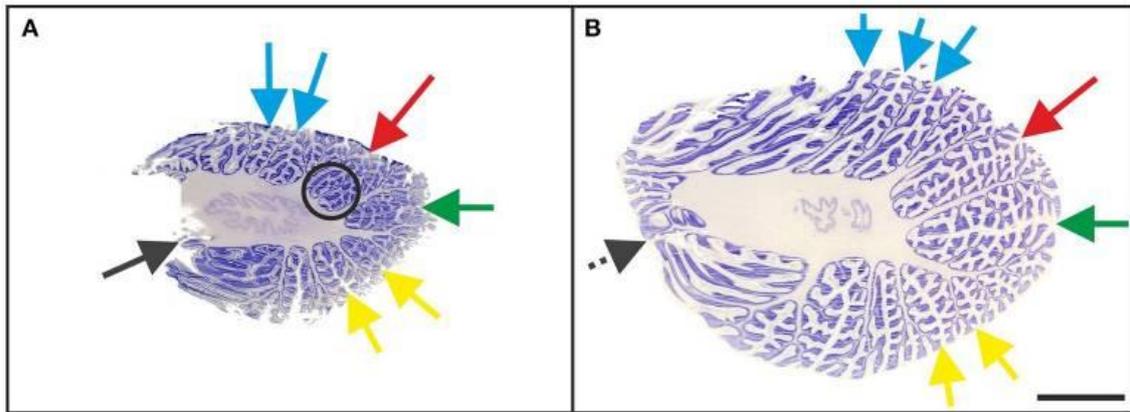


Abbildung 8: Mikroskopische Beurteilung von Fissuren des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns. Repräsentative 100 µm dicke parasagittale, mit Cresylviolett gefärbte histologische Schnitte der linken Kleinhirnhälften eines 3 Monate alten Kindes ((A); Schnitt-Nr. 203 von Fall 10/80 in Tabelle 3) und eines 11 Monate alten Kindes ((B); Schnitt-Nr. 250 von Fall 10/77 in Tabelle 3). Die Pfeile deuten auf prominente Fissuren (Farben entsprechend Abbildung 2): Fissura prima (blau), Fissura superior posterior (rot), Fissura horizontalis (grün), Fissura ansoparamediana (gelb). Parasagittale histologische Schnitte eignen sich am meisten für die Identifikation der Fissura posterolateralis (dunkelgrauer Pfeil in (A)), wohingegen letztere an weiter lateral gelegenen Schnitten nicht eindeutig abgegrenzt werden konnte aufgrund der Fusion des Flocculus mit dem ihn umgebenden Kleinhirngewebe (gepunkteter dunkelgrauer Pfeil in (B)). Der schwarz umkreiste Bereich beinhaltet zusätzliche Folia am Grund der Fissura superior posterior. Der Messbalken in (B) repräsentiert 1 cm in (A,B).

Demzufolge war eine reproduzierbare Abgrenzung der Teilbereiche so wie in Abbildung 2 gezeigt auf Grundlage einer isolierten Betrachtung von histologischen Schnitten nicht möglich, mitunter bedingt durch den lateralwärts zunehmend komplexen Verlauf der Fissuren. Tabelle 5 fasst die Erkenntnisse hinsichtlich der Identifikation von anatomisch abgrenzbaren Fissuren auf histologischen Schnitten des früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirns, basierend auf der Kombination makroskopischer und mikroskopischer Untersuchungsmethoden, zusammen. Ohne vorherige makroskopische Untersuchung (Vorgehensweise in Untersuchungsteil B) wurden weniger zuverlässige Ergebnisse erzielt als durch die zusätzliche makroskopische Untersuchung vor der histologischen Verarbeitung (Vorgehensweise in Untersuchungsteil A).

Diese Ergebnisse zur Identifikation von Kleinhirnfissuren gelten sowohl für die linke als auch für die rechte Kleinhirn-Hemisphäre.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Identifikation anatomisch abgrenzbarer Fissuren in früh-postnatalen menschlichen Kleinhirnen der in den Tabellen 2 und 3 beschriebenen Fallnummern. Für jede gemäß Tabelle 4 zu bestimmende Fissur ist aufgelistet, ob und in welchem Ausmaß eine sichere Identifikation gelang. Als weitere Orientierungshilfe wurde anhand der histologischen Schnitte, die die jeweilige Kleinhirnhälfte in ihrer größten Ausdehnung umfassten, die Anzahl an Fissuren ermittelt. Deutlich wird hier eine ungefähre Korrelation der Fissurenanzahl und dem Alter der Kleinhirnhälfte. Zu beachten gilt, dass es in keinem Fall möglich war, eine eindeutige Anzahl an Fissuren festzulegen. Abkürzungen: Fallnr.: Fallnummer, V: Verarbeitung, Alter [Mo]: Alter in Monaten, H: Hemisphäre, R: rechts, L: links, FP: Fissura prima, FSP: Fissura superior posterior, FH: Fissura horizontalis, FAP: Fissura anso-paramediana, FPL: Fissura posterolateralis, A-F: Anzahl an Fissuren, Bem.: Bemerkung, +: eindeutige Identifikation möglich, (+): eindeutige Identifikation nicht möglich, da zwei benachbarte Fissuren gleich wahrscheinlich waren, -: keine Identifikation möglich, n. d.: nicht definierbar, †: abnormale/fehlende Fissuren, ‡: Geringeres Ausmaß an Foliation innerhalb des Lobus anterior im Vergleich zur Foliation im erwachsenen menschlichen Kleinhirn.

| Fallnr. | V | Alter [Mo] | H | FP | FSP | FH | FAP | FPL | A-F | Bem. |
|---------|---|------------|---|-----|-----|----|-----|-----|-------|------|
| 10/46 | B | 0,03 | R | (+) | + | + | (+) | + | 11-12 | |
| 10/76 | B | 0,03 | L | (+) | + | + | (+) | + | 10-11 | |
| 10/70 | B | 0,83 | L | (+) | + | + | (+) | + | 12-13 | |
| 10/61 | A | 1 | L | - | + | + | (+) | + | 7-8 | † |
| 10/79 | B | 1,5 | L | - | - | - | - | - | n. d. | ‡ |
| 10/43 | A | 2,5 | L | (+) | + | + | (+) | + | 9-10 | ‡ |
| 10/71 | B | 3 | R | (+) | + | + | (+) | + | 10-11 | |
| 10/80 | B | 3 | L | (+) | + | + | (+) | (+) | 10-11 | ‡ |
| 10/91 | A | 4 | L | (+) | + | + | (+) | + | 9-10 | |
| 10/99 | B | 4 | R | (+) | + | + | (+) | + | 11-12 | |
| 10/60 | A | 6 | L | (+) | + | + | (+) | + | 8-9 | ‡ |
| 10/92 | B | 7 | L | - | + | + | (+) | + | 9-10 | ‡ |
| 10/44 | A | 8 | R | (+) | + | + | (+) | + | 9-10 | |
| 10/64 | B | 8 | L | (+) | + | + | - | + | 11-12 | |
| 10/84 | B | 9 | L | (+) | + | + | (+) | - | 9-10 | ‡ |
| 10/48 | A | 10 | L | (+) | + | + | (+) | + | 11-12 | |
| 10/45 | B | 10 | L | - | + | + | (+) | + | 11-12 | |

| | | | | | | | | | |
|--------------|---|----|---|-----|---|---|-----|---|---------|
| 10/58 | B | 10 | L | (+) | + | + | (+) | + | 9-10 |
| 10/65 | B | 10 | L | - | + | + | (+) | + | 11-12 ‡ |
| 10/77 | B | 11 | L | (+) | + | + | (+) | + | 10-11 |

5. Diskussion

5.1. Validität der Ergebnisse

Die Verwendung vollständiger, makroskopisch und mikroskopisch gut erhaltener menschlicher Kleinhirnhälften gewährleistete hochpräzise morphologische Untersuchungen wie die Identifikation anatomisch abgrenzbarer Fissuren und die Bestimmung funktionell relevanter Teilbereiche. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kleinhirnhälften repräsentieren in der Zusammenschau annähernd den Verlauf im ersten Lebensjahr des Menschen, welches eine kritische Zeitspanne bezüglich der früh-postnatalen Entwicklung des Kleinhirns darstellt (Kiessling et al., 2014). Die Untersuchung nur einer Kleinhirnhälfte pro Fall kann als valide betrachtet werden, da bislang keine biologisch relevante Asymmetrie in der Makroskopie zwischen linker und rechter Kleinhirnhälfte des Menschen beobachtet wurde (Gocmen-Mas et al., 2009). Auch bleiben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dadurch unbeeinflusst, dass Ergebnisse aus Untersuchungen an Kleinhirnhälften von Kindern mit einfließen, die an SIDS verstorben waren. Einige Studien postulierten Unterschiede zwischen SIDS-Fällen und gematchten Kontrollen innerhalb anderer Teile des zentralen Nervensystems außer dem Kleinhirn. Hunt et al. (2017) entdeckten beispielsweise eine veränderte Proteinexpression in pontinen Neuronen von SIDS-Fällen. Kiessling et al. (2013) wiederum konnten in ihren Untersuchungen mittels *design-based* Stereologie keine Unterschiede bezüglich des mittleren Volumens der verschiedenen Kleinhirnschichten sowie der durchschnittlichen Anzahl an zerebellären Purkinjezellen und Granularzellen zwischen SIDS-Fällen und alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen feststellen.

Folglich kann angenommen werden, dass die Morphologie und die anatomische Lokalisation zerebellärer Fissuren von SIDS-Fällen und alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen nicht signifikant voneinander abweichen (dies wird von den Erkenntnissen aus Untersuchungsteil B bekräftigt, dargestellt in Tabelle 5).

Dass jeweils nur eine Hälfte je Kleinhirn untersucht wurde, erweist sich allerdings als mögliche Einschränkung der vorliegenden Arbeit. Der Vermis befindet sich genau zwischen den beiden Hemisphären und da nur jeweils eine Kleinhirnhälfte vorhanden war,

war keine Untersuchung des gesamten Vermis möglich. Dieser ist daher nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Trotzdem sollte erwähnt werden, dass es laut Schmahmann et al. (1999) keinen wirklichen „Vermis“ im Lobus anterior gibt. Vielmehr ist die Verwendung dieses Begriffes, der den paramedianen Bereich des Lobus anterior beschreibt, eine Erweiterung des lateinischen Begriffes „vermis“ (zu Deutsch „Wurm“), so wie er von Malacarne (1776) gebraucht wurde, um die sichtbare Struktur des posterioren und inferioren Erscheinungsbildes des Kleinhirns zu bezeichnen.

Der Vermis (als solcher) erstreckt sich von Lobulus VI bis einschließlich Lobulus X. Mit der Zeit etablierte sich der Gebrauch des Begriffes Vermis, um die „Mittellinie“ zu beschreiben und brachte die Fragestellung mit sich, wie die laterale Ausdehnung des Lobus anterior- „Vermis“ definiert werden sollte (Schmahmann et al., 1999). Eine Idee dazu war, dass der paravermale Sulcus den Vermis seitlich begrenzt (Arslan, 2014). Bei vielen Gehirnen findet sich allerdings kein paravermaler Sulcus und dort, wo ein solcher vorhanden zu sein scheint, könnte es sich stattdessen lediglich um den Abdruck des medialen Astes der Arteria cerebellaris superior auf der Kleinhirnoberfläche handeln (Schmahmann et al., 1999).

Außerdem können die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht direkt auf das erwachsene menschliche Kleinhirn übertragen werden, da die endgültige Entwicklung von verschiedenen Kleinhirnregionen noch weit bis über das erste Lebensjahr hinaus andauert (Tsekhmistrenko, 1996).

Ein weiterer Diskussionspunkt ist, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kleinhirnhälften nicht einheitlich zufällig gewählt wurden, zum Beispiel durch Werfen einer Münze, um zu entscheiden, ob die rechte oder die linke Kleinhirnhälfte ausgewählt und analysiert werden soll. Die Ergebnisse, die in Tabelle 5 zusammengefasst sind, zeigen eindeutig, dass die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit (es ist unmöglich, die Fissura prima und die Fissura ansoparamediana im früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn eindeutig und reproduzierbar zu identifizieren) unabhängig davon sind, ob jeweils die rechte oder die linke Hemisphäre untersucht wurde.

5.2. Identifikation von Teilbereichen im früh-postnatalen Kleinhirn

Das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit lautet, dass die Identifikation verschiedener Teilbereiche, wie in Abbildung 2 gezeigt und basierend auf den von Schmahmann et al. (1999) etablierten Kriterien, im früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn nur teilweise möglich ist. Die Unterteilung des menschlichen Kleinhirns in fünf Teilbereiche, wie in Abbildung 2 demonstriert, stellt eine Kombination funktionaler und morphologischer Aspekte dar. Die Fissura superior posterior, Fissura horizontalis und Fissura posterolateralis konnten in allen 20 untersuchten menschlichen Kleinhirnen zuverlässig identifiziert werden. Im Gegensatz dazu war eine zuverlässige und reproduzierbare Identifikation der Fissura prima und Fissura ansoparamediana nicht möglich.

Dazu passt, dass gemäß Schmahmann et al. (1999) die Fissura prima sowie weitere Fissuren innerhalb des Lobus anterior auf parasagittalen Schnitten mit zunehmendem Abstand von der Mittellinie immer schwieriger unterscheidbar werden. Während die Fissura prima auf mediosagittalen Schnitten noch unverwechselbar ist, setzt sie sich dann jedoch gemeinsam mit einer unbezeichneten kleinen Fissur im Intermediärbereich der Hemisphären fort.

Teilbereich-spezifische Untersuchungen an früh-postnatalen Kleinhirnen scheinen also durchführbar, sofern diese auf Crus I (begrenzt von der Fissura superior posterior und der Fissura horizontalis) und den Flocculus (begrenzt von der Fissura posterolateralis) limitiert bleiben. Diese beiden Teilbereiche konnten bei allen 20 untersuchten Kleinhirnhälften eindeutig und zuverlässig bestimmt werden. In Anbetracht der funktionellen Bedeutung von Crus I und dem Flocculus erscheint eine isolierte Untersuchung aber nur bei letzterem sinnvoll, um biologisch relevante Ergebnisse zu erhalten. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass die Kontrolle von Augenbewegungen spezifisch im Lobus flocculonodularis repräsentiert wird, wohingegen Crus I funktionell nicht gänzlich von Lobulus VI und Crus II getrennt werden kann (Timmann, 2012). Folglich wären isolierte Untersuchungen des Flocculus einer isolierten Untersuchung des Crus I, ohne eindeutigen funktionellen Kontext, vorzuziehen. Separate Untersuchungen der weiteren in Abbildung 2 dargestellten Teilbereiche sind nicht möglich, da die zugehörigen begrenzenden Fissuren nicht zuverlässig identifiziert werden können.

Die vorliegende Arbeit befasst sich als erste Arbeit überhaupt mit der Fragestellung, ob die fünf Teilbereiche, wie in Abbildung 2 gezeigt, bei früh-postnatalen menschlichen Kleinhirnen zuverlässig voneinander abgegrenzt werden können. Für Validität und Eignung der Identifikationskriterien zerebellärer Fissuren des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns, so wie in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die zugrundeliegenden Kriterien wurden von Beschreibungen über die Abgrenzung von Kleinhirn-Teilbereichen, die aus vielfältigen Methoden am menschlichen Kleinhirn des Erwachsenen hervorgingen, abgeleitet.

Namentlich hierfür ist beispielsweise der von Schmahmann et al. (1999) entwickelte Atlas des erwachsenen menschlichen Kleinhirns basierend auf hochauflösenden MRT-Bildern zu nennen. Hinsichtlich der Identifikation von Fissuren erwähnten die Autoren, dass die exakte Lokalisationsbestimmung der Fissura ansoparamediana bereits in der Vergangenheit zu Kontroversen geführt hatte. Während Schmahmann et al. (1999) die genaue Position der Fissura ansoparamediana in ihren MRT-Aufnahmen angaben, stellten sie andererseits keine reproduzierbaren Identifikationskriterien bereit, die für *design-based* stereologische Studien des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns auf mikroskopischer Ebene verwendet werden könnten. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und dem Atlas von Schmahmann et al. (1999) zumindest teilweise dadurch bedingt sind, dass der Atlas von MRT-Aufnahmen eines einzigen Gehirns erstellt wurde, das zudem von einer erwachsenen Person stammte. Daher scheint es angeraten, die Arbeit von Schmahmann et al. (1999) anhand einer größeren Stichprobe unter Berücksichtigung früh-postnataler Gehirne zu wiederholen.

Skefos et al. (2014) bestimmten die Dichte von Purkinjezellen in *post mortem* Kleinhirnen von acht Autismus-Fällen im Alter von fünf bis 56 Lebensjahren und von acht Kontrollen im Alter zwischen vier und 52 Lebensjahren mittels *design-based* Stereologie. Zu diesem Zweck unterteilten die Autoren das Kleinhirn in vier verschiedene Teilbereiche mit der Fissura prima, Fissura horizontalis, Fissura ansoparamediana und Fissura posterolateralis als Orientierungshilfe. Die Autoren fanden eine geringere durchschnittliche Purkinjezell-Dichte bei den Autismus-Fällen verglichen mit den Kontrollen, und zwar am deutlichsten in Crus I und II. Wie oben dargelegt, war eine zuverlässige und

reproduzierbare Identifikation von Teilbereichen innerhalb des menschlichen Kleinhirns, wie von Skefos et al. (2014) vorgeschlagen, in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Allerdings untersuchten Skefos et al. (2014) keine früh-postnatalen Kleinhirne und demonstrierten zudem ihre Vorgehensweise bei der Identifikation von Unterteilungen des menschlichen Kleinhirns anhand eines einzigen histologischen Schnittes, ohne das Alter der zugehörigen Person anzugeben. Daher bleibt unklar, ob die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen von Skefos et al. (2014) und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit dem Alter der untersuchten Personen geschuldet sein könnten. Anhand der vorliegenden Arbeit fand sich keine Korrelation zwischen dem Alter der untersuchten Personen und der Anzahl an Fissuren (sowie der Machbarkeit, diese eindeutig zu identifizieren, wie in Tabelle 5 dargestellt). Erwähnenswert ist außerdem, dass Skefos et al. (2014) in manchen Fällen während der histologischen Verarbeitung einen Verlust von bis zu 10% des Gewebes verzeichneten. Auch wiesen manche Schnitte Folia mit ausgefransten Rändern auf. Diese Komplikationen hinderten Skefos et al. (2014) daran, eine Schätzung der Gesamtzahl von Purkinjezellen durchzuführen und in einigen Fällen konnten nicht alle Unterteilungen vollständig analysiert werden.

5.2.1. Vergleich der Identifikationsmethoden aus den Untersuchungsteilen A und B

Die Hauptegebnisse der vorliegenden Arbeit (Tabelle 5) legen nahe, dass es zwischen den Untersuchungsteilen A und B keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Erkennungsrate von Fissuren am früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn gab. Um dazu statistisch signifikante Aussagen zu treffen, müsste man eine ergänzende Studie mit größerer Fallzahl und identischem methodischen Ansatz durchführen. Die unterschiedlichen Erkennungsraten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kleinhirnfissuren sind in Abbildung 9 dargestellt.

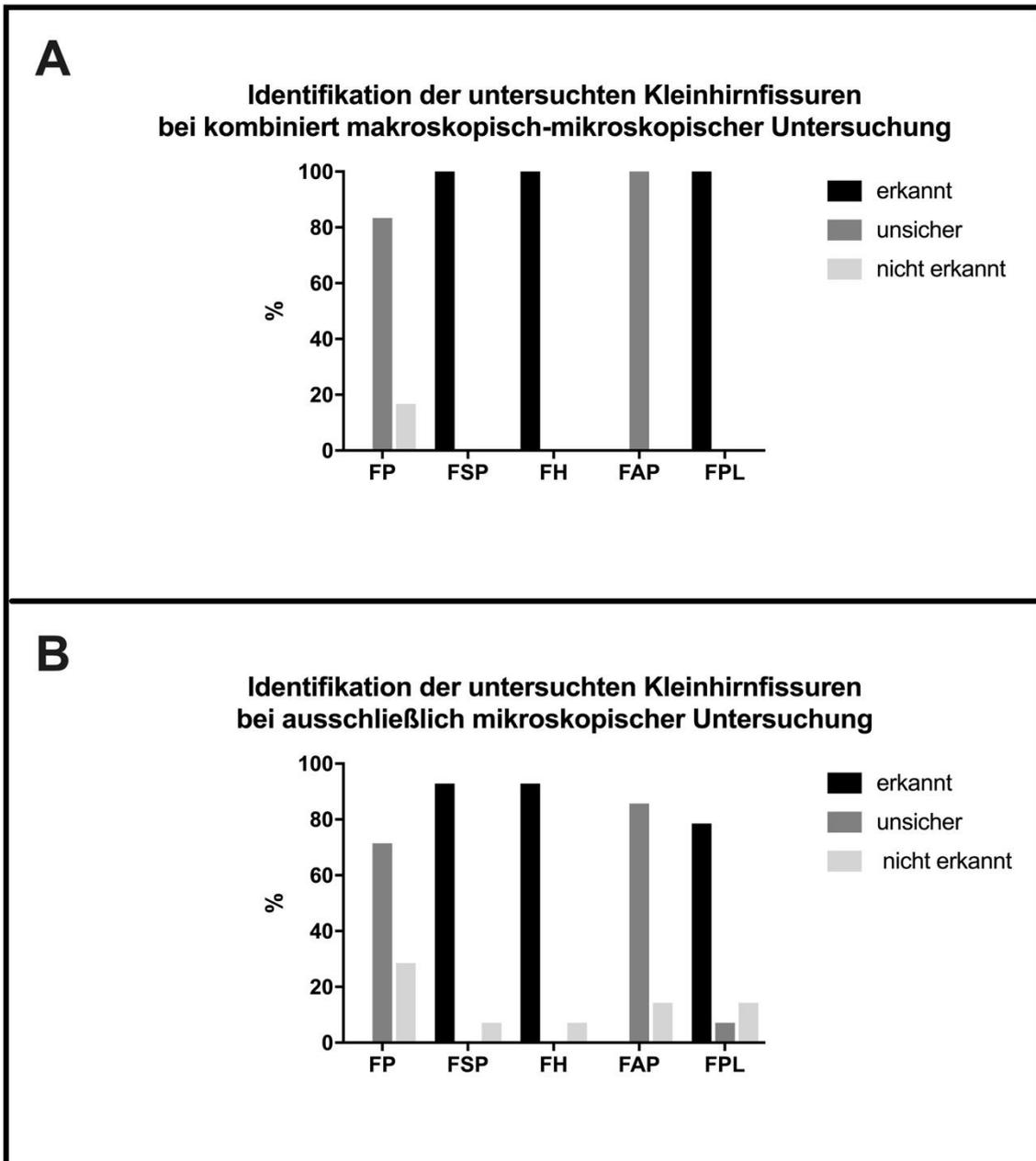


Abbildung 9: Vergleich der Identifizierbarkeit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kleinhirnfissuren aus den Untersuchungsteilen A und B. Die Daten der Diagramme in (A) und (B) sind Tabelle 5 entnommen. (A) zeigt die Ergebnisse aus Untersuchungsteil A und (B) die Ergebnisse aus Untersuchungsteil B. In (A) und (B) wird deutlich, zu welchem prozentualen Anteil die untersuchten Fissuren jeweils als „erkannt“ (schwarze Balken), „unsicher“ (dunkelgraue Balken) oder „nicht erkannt“ (schwarze Balken) eingestuft wurden. Analog zu Tabelle 5 ist mit „erkannt“ gemeint, dass eine Identifikation der jeweiligen Fissur möglich war, mit „unsicher“, dass eine Identifikation der jeweiligen Fissur nicht zweifelsfrei möglich war aufgrund mehrerer benachbarter Fissuren, die in Frage kamen, sowie mit „nicht erkannt“, dass eine Identifikation der jeweiligen Fissur nicht möglich war. In (A) entsprechen 100% den n = 6 im Untersuchungsteil A untersuchten Kleinhirnhälften, während für die Abbildung (B) gilt: 100% entsprechen den n = 14 im Untersuchungsteil B untersuchten Kleinhirnhälften. FP: Fissura prima; FSP: Fissura superior posterior; FH: Fissura horizontalis; FAP: Fissura ansoparamediana; FPL: Fissura posterolateralis.

Eine klare Empfehlung zur Verwendung der im Untersuchungsteil A angewandten Methode (kombiniert makroskopisch/mikroskopische Untersuchung) sei jedoch für die Identifikation der Fissura posterolateralis – und damit für die Identifikation des Flocculus – ausgesprochen. Die Morphologie des Flocculus hebt sich auf makroskopischer Ebene so deutlich vom umgebenden Kleinhirngewebe ab, dass eine Identifikation sehr viel sicherer gelingt als durch ausschließlich mikroskopische Untersuchung einzelner sagittaler Kleinhirnschnitte, auf denen der Flocculus womöglich gar nicht oder nur teilweise angeschnitten ist. Sofern also eine makroskopische Beurteilung des nativen Kleinhirns möglich ist, sollte diese in jedem Fall der histologischen Verarbeitung und mikroskopischen Re-Evaluation vorangehen.

5.3. Relevanz von *design-based* stereologischen Untersuchungen am gesamten früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn

Aus den oben erläuterten Gründen sind *design-based* stereologische Studien an funktionell relevanten Teilbereichen des früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirns nicht durchführbar – mit Ausnahme des Flocculus und Crus I. Das bedeutet jedoch nicht, dass *design-based* stereologische Studien am früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn mit dem gesamten Kleinhirn als *region of interest* (ROI) irrelevant wären. Tatsächlich trifft das Gegenteil zu, wie anhand folgender Beispiele demonstriert wird: Kiessling et al. (2014) untersuchten 14 Kleinhirnhälften (mit verschiedenen Todesursachen außer SIDS) von Kindern, die im Alter von einem Lebenstag bis elf Monate nach der Geburt gestorben waren, mittels *design-based* Stereologie. Die Autoren bestimmten die Gesamtzahl von Purkinjezellen und Granularzellen sowie die Volumina der verschiedenen Kleinhirnschichten. Die Gesamtzahl von Purkinjezellen erwies sich über die untersuchte Altersspannweite hinweg als stabil und die von Kiessling et al. (2014) ermittelte durchschnittliche Gesamtzahl von Purkinjezellen ($13,0 \times 10^6$) glich weitgehend der in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Gesamtzahl von Purkinjezellen im erwachsenen menschlichen Kleinhirn: $15,3 \times 10^6$ (Andersen et al., 1992; Korbo und Andersen, 1995), $14,3 \times 10^6$ (Andersen und Pakkenberg, 2003; Andersen et al., 2003), $14,9 \times 10^6$ (Andersen, 2004) bzw. $11,2 \times 10^6$ (Agashiwala et al., 2008). Allerdings wurde in all diesen

Studien - mit Ausnahme derjenigen von Kiessling et al. (2014) – die ermittelte durchschnittliche Gesamtzahl von zerebellären Purkinjezellen beider Kleinhirnhälften durch zwei geteilt, um diese mit der ermittelten durchschnittlichen Gesamtzahl von zerebellären Purkinjezellen mit den Zahlen aus der Studie von Kiessling et al. (2014) vergleichbar zu machen, die nur an jeweils einer Kleinhirnhälfte erhoben wurden.

Anders als bei der ermittelten durchschnittlichen Gesamtzahl von zerebellären Purkinjezellen zeigte sich bei den früh-postnatalen Kleinhirnen im Vergleich zu den adulten Kleinhirnen ein komplett anderes Bild bei der ermittelten durchschnittlichen Gesamtzahl von zerebellären Granularzellen. Konkret fanden sich - im Gegensatz zum erwachsenen menschlichen Kleinhirn - bei den früh-postnatalen Kleinhirnen am Tag der Geburt nur etwa 15% der zerebellären Granularzellen an ihrer endgültigen Position in der inneren Granularzellschicht (Kiessling et al., 2014). Folglich entstehen näherungsweise 85% der Granularzellen im menschlichen Kleinhirn erst nach der Geburt (wobei mit 'Entstehung' hier die Einnahme der endgültigen, funktionell relevanten Position der Zellen in der Granularzellschicht des Kleinhirns gemeint ist; auf die Frage, wann die Zellen in der äußeren Granularzellschicht angelegt werden [d.h., wann sich die entsprechenden Vorläuferzellen zum letzten Mal teilen], kann und soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden). Diese Daten werden von einer altersabhängigen Volumenzunahme der zerebellären Molekularzellschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz gestützt. Kiessling et al. (2014) schlussfolgerten daraus, dass das menschliche Kleinhirn während des ersten Lebensjahres, basierend auf seiner großen Plastizität, möglicherweise äußerst sensibel gegenüber äußeren Einflüssen ist. Des Weiteren gingen die Autoren von einer sehr großen Plastizität des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns im Zusammenhang mit dem Erwerb neuer Fähigkeiten aus.

Diesbezüglich untersuchten Knickmeyer et al. (2008) die Kleinhirne gesunder Personen im Verlauf der ersten beiden Lebensjahre mittels MRT und beobachteten dabei eine Volumenzunahme des Kleinhirns von 240% während des Untersuchungszeitraums. Sie mutmaßten, dass das früh-postnatale zerebelläre Wachstum direkt mit dem motorischen Lernen verknüpft sein könnte. Übereinstimmend mit dieser Hypothese betonte Johnson (2001) den hohen Stellenwert von Verhaltenstests bei Kindern zum besseren Verständnis der funktionellen Entwicklung des Gehirns einschließlich des Kleinhirns. Ergänzend dazu sollte die Beobachtung von Groszer et al. (2008) an Mäusen erwähnt

werden, dass sich eine abnormale Foliation des Kleinhirns und Defizite im motorischen Lernen bei solchen Mäusen fanden, die eine beim Menschen mit sprachlichen Beeinträchtigungen einhergehende Mutation trugen. Dabei handelte es sich um eine Punktmutation im FOXP2-Gen, dessen Produkt ein bei vielen Wirbeltierarten ähnlicher Transkriptionsfaktor ist. Dieser wird in Zusammenhang mit sensomotorischer Integration und motorischem Lernen exprimiert. Bei Mäusen mit homozygoter Mutation zeigte sich vorwiegend ein gestörtes Kleinhirnwachstum, während die Produktion von Spezies-typischen Lauten weitgehend normal war. Mäuse mit heterozygoter Mutation zeigten signifikante Defizite beim Spezies-typischen motorischen Lernen bei abnormaler synaptischer Plastizität in striatalen und zerebellären Neuronenkreisläufen. In Anlehnung an frühere Berichte in der Literatur über eine mögliche Beteiligung des Kleinhirns an der Pathogenese von Autismus (eine Literaturübersicht findet sich in Palmen et al., 2004) führten Whitney et al. (2009) mit *design-based* Stereologie eine Studie an zehn Kleinhirnhälften (sechs Fälle mit Autismus und vier Kontrollen im Alter zwischen 17 und 54 Jahren) durch. Sie untersuchten die Volumina der Kleinhirnschichten und die Dichten von Purkinjezellen, Korbzellen und Sternzellen, fanden aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Autismus-Fällen und Kontrollen. Die biologische Bedeutung dieser Daten geht aus der Tatsache hervor, dass das *numerical matching* zwischen zerebellären Purkinjezellen und deren assoziierten Interneuronen einen Hinweis auf den Zeitraum liefern könnte, in dem sich die für Autismus charakteristischen Beeinträchtigungen entwickeln (die *numerical matching* Hypothese besagt, dass die endgültige Anzahl der inneren Granularzellen durch die Anzahl der davor entstandenen Purkinjezellen und deren synaptische Kontakte determiniert wird; Details finden sich bei Kiessling et al., 2014). Für das Überleben der Korb- und Sternzellen sind synaptische Kontakte zu den Purkinjezellen während der Kleinhirnentwicklung essenziell. Fehlen die Purkinjezellen zu der Zeit, in der diese Interneurone die synaptischen Kontakte ausbilden können, gehen die Interneurone zugrunde (Sotelo und Triller, 1979; Feddersen et al., 1992). Daher sind auch Korb- und Sternzellen im Falle eines frühen Verlustes von Purkinjezellen (oder einer Entwicklungsbeeinträchtigung der Formation der Purkinjezellen) in ihrer Anzahl vermindert (Whitney et al., 2009). Dieser Effekt führte im Mausmodell zu schweren Kleinhirndefekten sowohl hinsichtlich der Größe als auch der Foliation (Feddersen et al., 1992; Smeyne et al., 1995). Dahingegen führt der Verlust von Purkinjezellen erst nach

der Ausbildung der synaptischen Kontakte mit den Korb- und Sternzellen zu keinerlei sichtbaren Kleinhirnmissbildungen (Feddersen et al., 1992), da der Tod von Purkinjezellen das Überleben der Korb- und Sternzellen zu dieser Zeit nicht mehr beeinflusst (Sotelo und Triller, 1979; Jeong et al., 2000; Duchala et al., 2004).

5.3.1. Praktische Empfehlungen für *design-based* stereologische Untersuchungen von Gesamtzellzahlen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn

Die *design-based* Stereologie beruht darauf, dass umfangreiche Messungen an histologischen Präparaten (beispielsweise Volumenmessungen oder die Ermittlung von Gesamtzellzahlen im menschlichen Kleinhirn) durch stichprobenartiges Vorgehen erleichtert werden, und dass dabei dennoch aufgrund verschiedener Software-gestützter mathematischer Parameter hochpräzise und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Mit Hilfe einer Computersoftware (z.B. Stereo Investigator; MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) wird ein Gitter aus quadratischen Probenahmegebieten mit festgelegter Kantenlänge zufällig über das histologische Bild der vorher definierten *region of interest* (ROI) gelegt. Jedes Probenahmegebiet enthält einen *unbiased virtual counting space*, welcher Tiefenmessungen erlaubt, sodass dort Messungen im dreidimensionalen Raum möglich sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sei für einen ersten Überblick auf Abbildung 10 verwiesen, die beispielhaft Regeln für die Ermittlung der Gesamtanzahl von Purkinjezellen im früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn verdeutlicht.

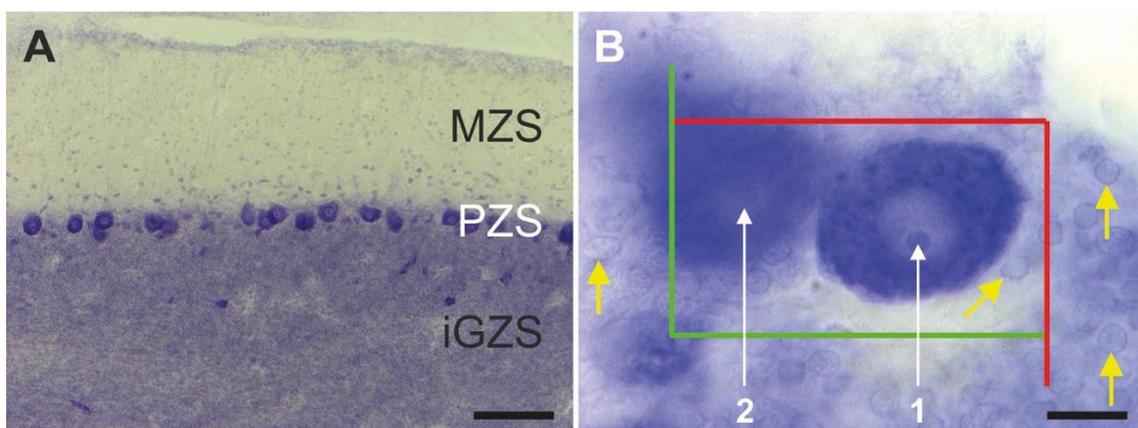


Abbildung 10: Stereologische Zählung von Purkinjezellen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn. Die Abbildung zeigt zwei repräsentative Ausschnitte aus dem mit Cresylviolett gefärbten Schnitt 202 der linken *post mortem* Kleinhirnhälfte eines 11 Monate

alten Kindes (Fall 10/77 in Tabelle 3). Bei mittlerem Abbildungsmaßstab sind die Molekularzellschicht (MS), die Purkinjzellschicht (PZS) sowie die innere Granularzellschicht (iGZS) gut zu erkennen (A). Abbildung (B) zeigt einen Ausschnitt aus der Purkinjzellschicht mit Purkinjzellen (weiße Pfeile) sowie Granularzellen (gelbe Pfeile). Im Zentrum von (B) ist exemplarisch ein *unbiased counting frame* für die Zählung von Purkinjzellen zu sehen. Ein solcher *unbiased counting frame* wird für stereologische Messungen von der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) erstellt und auf dem Computermonitor auf das mikroskopische Live-Bild projiziert. Befindet sich eine zu zählende Struktur innerhalb des von roten und grünen Linien umgrenzten *unbiased counting frame* oder genau auf Höhe der grünen Linien und tritt dabei in den Fokus (hier der Nucleolus der Purkinjzelle Nr. 1, weißer Pfeil), so wird sie per Mausklick manuell gezählt. Die Bereiche, ab denen nicht mehr gezählt werden darf, werden von den roten Linien flankiert. Befindet sich eine Struktur innerhalb des *unbiased counting frames*, tritt während der Tiefenmessung jedoch nicht in den Fokus (hier der Nucleolus der Purkinjzelle Nr. 2, weißer Pfeil), so darf sie ebenfalls nicht gezählt werden. Diese Abbildung wurde mit einem Lichtmikroskop Eclipse 50i (Nikon Corporation, Tokio, Japan) erstellt; Objektiv in (A): 10x / 0,25; ∞/- (Nikon; das Symbol "∞" bedeutet, dass das verwendete Objektiv auf unendlich korrigiert war); Objektiv in (B): 100x/1,25 Öl ∞/0,17 (Nikon; das Symbol "∞" besagt, dass das verwendete Objektiv auf unendlich korrigiert war, und die Zahl 0,17, dass das verwendete Objektiv für Deckglasdicken von 0,17 mm korrigiert war); Kamera: AxioCam HRc (4164 x 3120 Bildpunkte; Zeiss); Software: AxioVision (Version 4.8.; Zeiss). Die Originalfotografie wurde mit der Software Corel Photo-Paint X8 und Corel Draw X8 (beide Versionen 18.1.0.661; Corel) beschriftet sowie leicht in Kontrast und Helligkeit angepasst. Der Messbalken in (A) repräsentiert 100 µm, der Messbalken in (B) repräsentiert 10 µm.

Ausführliche Erläuterungen zu den theoretischen wie praktischen Voraussetzungen für die Durchführung von *design-based* stereologischen Untersuchungen finden sich z.B. in Schmitz und Hof (2005), Kiessling et al. (2013) und Kipp et al. (2017) (neben vielen anderen Publikationen). Grundsätzlich muss beachtet werden, dass es zum jetzigen Zeitpunkt noch keine vollautomatisierten Methoden zur stereologischen Zählung von Zellen gibt, die der manuellen Zählmethode überlegen oder nicht unterlegen sind (Schmitz et al., 2014). Deshalb sollte die Entscheidung darüber, ob Zellen im jeweiligen Probenahmegebiet gezählt werden, trotz des zeitlichen Mehraufwands nach wie vor manuell gefällt werden.

Darüber hinaus sollten für die *design-based* stereologische Ermittlung von Gesamtzellzahlen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn die in den folgenden Abschnitten erläuterten Kriterien berücksichtigt werden.

5.3.1.1. Verwendung menschlicher Kleinhirne für die Untersuchung von normaler und pathologischer menschlicher Kleinhirnentwicklung

Zwischen der Kleinhirnentwicklung von Menschen und Nagetieren bestehen einige wichtige Unterschiede. So beginnt beispielsweise die Bildung der inneren Granularzellschicht beim Menschen pränatal (Rakic und Sidman, 1970; Sidman und Rakic, 1973), während sie bei Mäusen erst postnatal beginnt (Shimada et al., 1977; Huard et al., 1999). Hinsichtlich der Mikrogefäße findet sich in der äußeren Granularzellschicht des Kleinhirns von Ratten keine Aussprossung von Kapillaren bis zum postnatalen Tag 18 (Yu et al., 1994). Dagegen konnte eine Aussprossung von Mikrogefäßen beim Menschen im vergleichbaren Entwicklungsstadium (ein Jahr postnatal) schon zwischen dem ersten Tag und elf Lebensmonaten postnatal in allen Kleinhirnschichten beobachtet werden (Müller-Starck et al., 2014). Daher lassen sich pathologische Veränderungen der Kleinhirnentwicklung bei Mäusen und Ratten vermutlich nicht direkt mit Veränderungen der Kleinhirnentwicklung beim Menschen gleichsetzen. Dies muss bei der Verwendung von Tiermodellen für die Erforschung der normalen und pathologischen Kleinhirnentwicklung bedacht werden. Auch aus Ergebnissen von Untersuchungen bereits entwickelter, erwachsener Kleinhirne am Tiermodell können nicht ohne Vorbehalt Rückschlüsse auf das erwachsene menschliche Kleinhirn gezogen werden. Bei prinzipiell ähnlicher

Organisation der Kleinhirnrinde in Lobuli und Fissuren beim Menschen und anderen Säugetierarten (Larsell und Jansen, 1972) gibt es zwar (z. B. von Luo et al., 2017) Bemühungen, Crus I und/oder Crus II als speziesübergreifende „homologe“ Kleinhirnareale zu definieren; jedoch räumten diese Autoren ein, dass zwischen diesen Arealen beim Menschen, nicht-hominiden Affen und Nagetieren deutliche morphologische Unterschiede bestehen. Erschwerend findet sich in der Literatur keine einheitliche Nomenklatur von Crus I und Crus II bei den verschiedenen Spezies (Luo et al., 2017).

5.3.1.2. Verwendung der gesamten Kleinhirnrinde als ROI

Möglicherweise können funktionell relevante Teilbereiche beim erwachsenen menschlichen Kleinhirn zuverlässig abgegrenzt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, scheint dies für früh-postnatale (< ein Lebensjahr) menschliche Kleinhirne – mit Ausnahme des Flocculus und Crus I – nicht zu gelten. Folglich sollte die gesamte Kleinhirnrinde als *region of interest* (ROI) definiert werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten.

5.3.1.3. Verwendung unterschiedlicher Zählschemata für die stereologische Ermittlung von Purkinjezellen und Granularzellen

Im Alter von einem Jahr beträgt das Verhältnis von Granularzellen zu Purkinjezellen im menschlichen Kleinhirn etwa 2700:1 (Kiessling et al., 2014). Daraus ergibt sich, dass für die Ermittlung der Gesamtzellzahlen zwei unterschiedliche Zählschemata nötig sind: eines, um Purkinjezellen zu zählen und ein davon abweichendes, um die in der humanen Kleinhirnrinde viel häufiger vorkommenden Granularzellen zu zählen. Anhand Abbildung 10 wird zudem der Größenunterschied zwischen Purkinjezellen und Granularzellen deutlich, welcher je nach Zelltyp die Verwendung unterschiedlicher Mikroskop-Objektive nahelegt.

5.3.1.4. Verwendung dynamischer statt statischer Zähl schemata für die stereologische Ermittlung von Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen

Dies stellt den wichtigsten Unterschied bei der Bestimmung der Zählparameter für die *design-based* Stereologie zwischen dem früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) und dem erwachsenen menschlichen Kleinhirn dar. Im normalen menschlichen Kleinhirn bleibt die Gesamtzahl von Purkinjezellen während des ersten Lebensjahres stabil (Kiessling et al., 2014). Trotzdem erfährt die *region of interest* (ROI; hier: gesamte Kleinhirnrinde einer Kleinhirnhälfte) während dieser Zeit eine substantielle Größenzunahme, von ca. 5 cm³ am ersten postnatalen Tag (Summe aus den Volumina von Molekularzellschicht, Purkinjezellschicht und innerer Granularzellschicht) bis zu etwa 30 cm³ nach elf Lebensmonaten (Kiessling et al., 2014). Infolgedessen fällt die Purkinjezellichte (Gesamtzahl von Purkinjezellen geteilt durch das Volumen der gesamten Kleinhirnrinde) beim menschlichen Kleinhirn am ersten postnatalen Tag ungefähr sechs Mal höher aus als nach einem Lebensjahr. Ein statisches Zähl schema (z. B. ein *Optical Fractionator* Zähl schema (West et al., 1991, 1996; Schmitz und Hof, 2005) mit konstanter *section sampling fraction* und konstanter *area sampling fraction*) wäre nicht praktikabel, um unter diesen Bedingungen die Gesamtzahl von Purkinjezellen zu bestimmen. Zudem steigt die Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht pro Kleinhirnhälfte von rund 5×10^9 am ersten postnatalen Tag auf ca. 40×10^9 im Alter von 11 Monaten an (Kiessling et al., 2014). Während dieser Zeitspanne vergrößert sich das Volumen der inneren Granularzellschicht je Kleinhirnhälfte von ungefähr 4 cm³ am ersten postnatalen Tag auf etwa 15 cm³ im Alter von 11 Monaten (Kiessling et al., 2014). Als Folge daraus unterliegen sowohl die Granularzellichte als auch die Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns während des ersten Lebensjahres erheblichen Veränderungen. Unter diesen Bedingungen wäre ein statisches Zähl schema für die Bestimmung der Gesamtzahl von Granularzellen nicht dazu geeignet, den sich mit zunehmendem Alter verändernden Verhältnissen in der Kleinhirnrinde im ersten postnatalen Lebensjahr gerecht zu werden. Tabelle 6 fasst Beispiele von empfehlenswerten Zähl schemata für die Bestimmung der Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen in der inneren Granularzellschicht mittels der *Optical Fractionator*

Methode für einige Fälle, die in Tabelle 3 aufgeführt sind, zusammen (entnommen und modifiziert aus Kiessling et al., 2014).

Diese exemplarischen Zählschemata wurden für 100 µm dicke, parasagittale, mit Cresylviolett gefärbte Kryostatschnitte des menschlichen Kleinhirns (wie in der vorliegenden Arbeit verwendet) entwickelt. Sie eignen sich als Ausgangspunkt für die Entwicklung sinnvoller dynamischer Zählschemata in künftigen *design-based* stereologischen Studien am früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn.

Tabelle 6: Empfehlenswerte Zähl schemata für die Bestimmung von Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen im früh-postnatalen (< einem Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn. Die Tabelle wurde leicht modifiziert aus Kiessling et al. (2014) übernommen und zeigt Beispiele anhand der *Optical Fractionator* Methode (West et al., 1991, 1996; Schmitz and Hof, 2005). Abkürzungen: Fallnr.: Fallnummer; \sum S: Anzahl der untersuchten histologischen Schnitte; ssf^{-1} : Kehrwert der *section sampling fraction*; G: Kantenlänge des Gitters in X- und Y-Richtung zur Festlegung der SRS-Positionen der *unbiased virtual counting spaces*; ucf: Kantenlänge der *unbiased counting frames*; asf^{-1} : Kehrwert der *area sampling fraction*; H: Höhe der *unbiased virtual counting spaces*; T: mittlere gemessene Schnitt dicke nach histologischer Aufarbeitung; tsf^{-1} : Kehrwert der *thickness sampling fraction*; uvcs: Gesamtzahl von ausgewerteten *unbiased virtual counting frames* (verteilt auf alle untersuchten Schnitte); N: Gesamtzahl von (in allen untersuchten Schnitten) gezählten Zellen; FK = Fehlerkoeffizient der ermittelten Gesamtzahl von Zellen basierend auf der Voraussagemethode von Schmitz (1998) (siehe auch Schmitz und Hof, 2005). Die Parameter \sum S (folgenderweise auch ssf^{-1}), G, ucf (folgenderweise auch asf^{-1}) und H (folgenderweise auch tsf^{-1}) wurden individuell angepasst aufgrund beträchtlicher interindividueller Größenunterschiede zwischen den untersuchten Kleinhirnen.

| Fallnr. | A [m] | \sum S | ssf^{-1} | G [μ m] | ucf [μ m] | asf^{-1} [10^3] | H [μ m] | T [μ m] | tsf^{-1} | \sum uvcs | \sum N | FK |
|---|----------|----------|------------|-----------------|-------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|------------|-------------|----------|-------|
| Bestimmung der Gesamtzahl von Purkinjezellen | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0.03 | 8 | 36 | 1,300 | 130 | 0.100 | 25 | 35.4 | 1.42 | 1,435 | 2,377 | 0.021 |
| 10 | 4 | 8 | 48 | 2,800 | 150 | 0.348 | 45 | 56.0 | 1.24 | 853 | 720 | 0.037 |
| 12 | 7 | 9 | 48 | 2,900 | 150 | 0.374 | 45 | 58.7 | 1.30 | 943 | 744 | 0.037 |
| 20 | 11 | 8 | 48 | 3,100 | 150 | 0.427 | 45 | 49.7 | 1.14 | 925 | 573 | 0.042 |
| Bestimmung der Gesamtanzahl von Granularzellen | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0.33 | 8 | 36 | 1,300 | 10 | 16.9 | 5 | 35.4 | 7.1 | 1,393 | 793 | 0.036 |
| 10 | 4 | 8 | 48 | 2,800 | 8 | 122.5 | 5 | 56.0 | 11.2 | 829 | 467 | 0.046 |
| 12 | 7 | 9 | 48 | 2,900 | 10 | 84.1 | 5 | 58.7 | 11.7 | 933 | 592 | 0.041 |
| 20 | 11 | 8 | 48 | 3,100 | 8 | 150.2 | 5 | 49.7 | 9.9 | 914 | 489 | 0.045 |

Die in Tabelle 6 aufgeführten Parameter für die Ermittlung der Gesamtzahl von Purkinjezellen und Granularzellen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn anhand der *Optical Fractionator* Methode werden in Abbildung 11 erläutert.

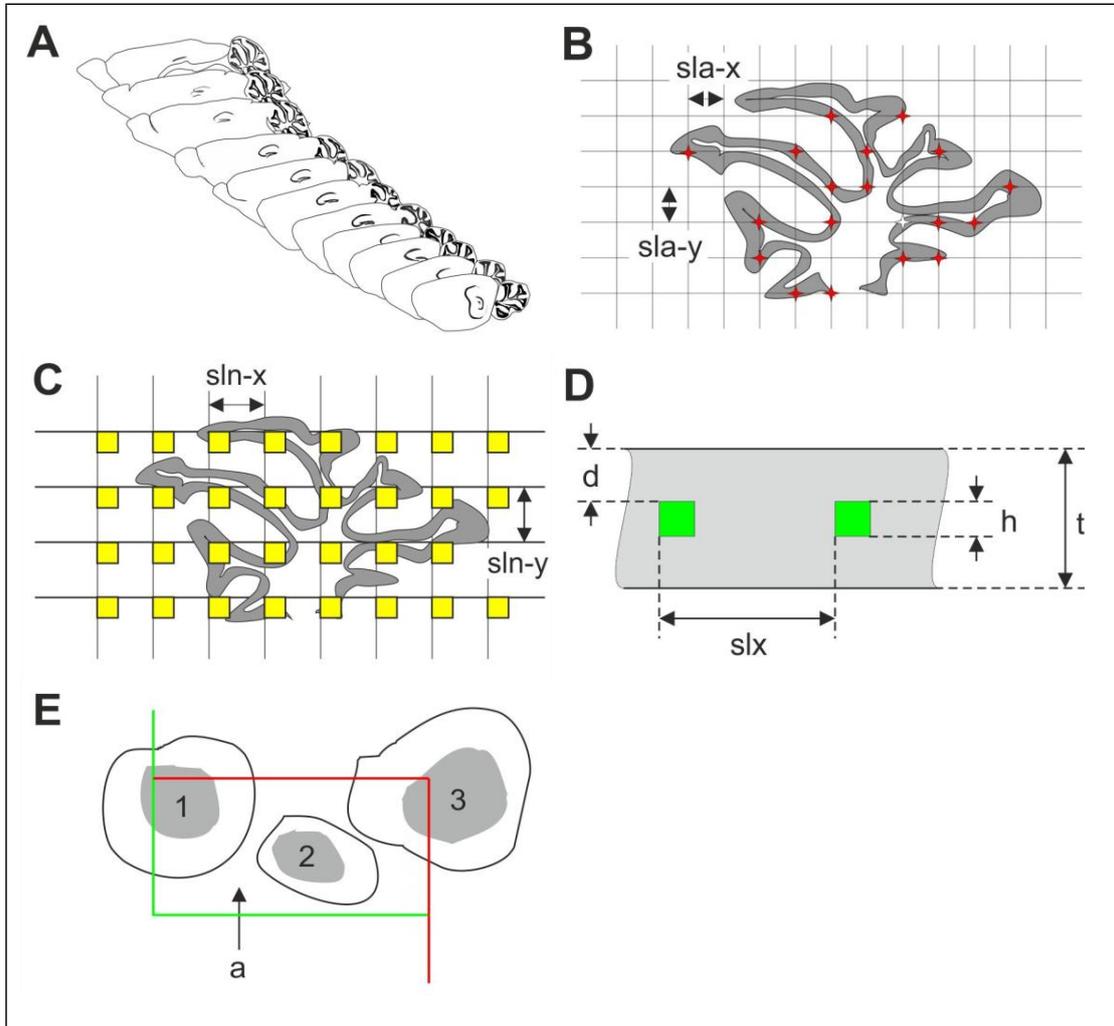


Abbildung 11: Wichtige Schritte bei der Ermittlung des Volumens einer Gehirnregion und der Gesamtzahl von innerhalb dieser Gehirnregion lokalisierten Neuronen mit *design-based* stereologischen Methoden. Die Abbildung wurde leicht modifiziert aus Schmitz und Hof (2005) übernommen und demonstriert schematisch die Vorgehensweise für Messungen innerhalb der Granularzellschicht des Kleinhirns einer Ratte. Auswahl einer *Systematic and Random Sampling* (SRS)-Schnittserie durch die gesamte *region of interest* mit einem für jedes Gehirn unterschiedlichen, zufällig gewählten Start (z. B. jeder 10. Schnitt: Schnitt-Nr. 7, 17, . . .) (A). Ermitteln der Projektionsfläche (z. B. Querschnittsfläche) der Granularzellschicht des Kleinhirns durch zufälliges Positionieren eines rechteckigen Gitters mit den Seitenlängen $sla-x$ und $sla-y$ an der Oberfläche eines Schnitts sowie durch Zählen der Überschneidungen des Gitters mit der Granularzellschicht (rote Pfeile) (B). Ermitteln der Gesamtzahl von Neuronen innerhalb der Granularzellschicht durch zufälliges Positionieren eines rechteckigen Gitters mit den Seitenlängen $sln-x$ und $sln-y$ an der Oberfläche eines Schnitts, Festlegen der Positionen der

unbiased counting spaces (gelbe Quadrate in (C), grüne Quadrate in (D)) mit der Grundfläche a (sogenannter *unbiased counting frame*; gezeigt in (E)) und der Höhe h bei einer Tiefe d innerhalb eines Schnitts mit der Dicke t (C-E). Neuronen werden gezählt, sobald sie innerhalb h in den Fokus treten und sich dabei entweder innerhalb des *unbiased counting frames* (Neuron Nr. 2 in (E)) oder auf Höhe der Einschlusslinien (grüne Linie und Neuron Nr. 3 in (E)) befinden, nicht jedoch auf Höhe der Ausschlusslinien (rote Linie und Neuron Nr. 1 in (E)) des *unbiased counting frames*.

5.3.1.5. Überlegungen zur stereologischen Ermittlung der Gesamtzahlen von anderen Zelltypen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn

Es könnte in zukünftigen Studien von Interesse sein, auch andere Zelltypen - wie etwa die unipolaren Bürstenzellen - im früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn mit *design-based* stereologischen Methoden zu untersuchen. Unipolare Bürstenzellen sind Interneurone, welche in der inneren Granularzellschicht des Kleinhirns vorkommen sowie im Nucleus cochlearis posterior, der sich beidseits im dorsolateralen Hirnstamm befindet (Mugnaini et al., 2011). Sie zeichnen sich durch ein schmales Soma (Durchmesser 10-20 μm) aus und besitzen einen einzigen kurzen Dendritenschaft mit büstenartigen dendritischen Fortsätzen (Víg et al., 2005). Ihre glutamatergen Axone enden an Dendriten von Granular- und Golgizellen in den zerebellären Glomeruli (Mugnaini et al., 2011). Man vermutet, dass die unipolaren Bürstenzellen einzelne afferente Signale von Moosfasern verstärken, welche die darüber liegenden Purkinjezellen über aufsteigende Axone von Granularzellen und deren Parallelfasern erreichen (Mugnaini et al., 2011). Da die Größe dieser Zellen in der Kleinhirnrinde von Säugetieren eine Mittelstellung zwischen der Größe von Granularzellen und Golgizellen einnimmt (Mugnaini und Floris, 1994), können sie in Nissl-gefärbten Schnitten gut von Granularzellen unterschieden werden. In der Kleinhirnrinde der Maus existieren mindestens drei Unterformen von unipolaren Bürstenzellen, welche entweder das Calcium-bindende Protein Calretinin exprimieren, den metabotropen Glutamat-Rezeptor (mGluR) 1 α und die Phospholipase C (PLC) β 4 oder die PLC β 4 ohne mGluR1 α (Chung et al., 2009). Bis heute gibt es nur wenige Studien, die sich mit unipolaren Bürstenzellen im menschlichen Kleinhirn befassen (Víg et al., 2005; Wegiel et al., 2013). Víg et al. (2005) beobachteten, dass Calretinin-immunpositive unipolare Bürstenzellen beim Menschen bereits zum Zeitpunkt der Geburt im Vermis vorhanden sind und deren Anzahl zumindest während des ersten

Lebensjahres ansteigt. Dies passt auch zu den Erkenntnissen von Kiessling et al. (2014), dass etwa 85% der Granularzellen im menschlichen Kleinhirn postnatal entstehen. Ferner postulierten Wegiel et al. (2013) eine mögliche Rolle von unipolaren Bürstenzellen in der Neuropathologie des Autismus. Allerdings waren unipolare Bürstenzellen weder Gegenstand der vorliegenden Arbeit noch der Studien von Kiessling et al. (2013, 2014). Demzufolge können die Daten aus Tabelle 6 nicht für die Entwicklung von Zählschemata zur Bestimmung der Gesamtzellzahl von unipolaren Bürstenzellen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn mittels *Optical Fractionator* herangezogen werden. Auch Víg et al. (2005) und Wegiel et al. (2013) führten keine stereologischen Untersuchungen zur Gesamtzahl oder Dichte von unipolaren Bürstenzellen durch. Folglich ist für die Untersuchung dieser Zellen im früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn zunächst eine Pilotstudie nötig, um deren Zelldichte in der inneren Granularzellschicht zu erfassen (hier sind die Daten von Víg et al. (2005) und Wegiel et al. (2013) nicht ausreichend). Anschließend müsste eine stereologische Pilotstudie durchgeführt werden, um deren altersabhängige Gesamtzahl zu bestimmen. Erst auf Grundlage dieser Informationen wären detaillierte stereologische Studien an unipolaren Bürstenzellen und deren möglicher Rolle in der Pathologie von neuropsychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen realisierbar.

5.4. Vergleich der Einteilung des früh-postnatalen Kleinhirns in Teilbereiche anhand der vorliegenden Arbeit mit der in der Literatur beschriebenen Einteilung des erwachsenen Kleinhirns

Mutmaßlich bedingt durch die bessere Verfügbarkeit des Untersuchungsmaterials existieren weitaus mehr *post mortem* Untersuchungen am erwachsenen Kleinhirn des Menschen als am früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirn. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits diskutierten Studien von Andersen et al. (2003) und Luo et al. (2017) beinhalten Abbildungen, die verschiedene makroskopisch sichtbare Kleinhirn-Teilbereiche anhand farbiger Markierungen (Andersen et al., 2003) bzw. Beschriftungen (Luo et al., 2017) an der Oberfläche erwachsener menschlicher Kleinhirne zeigen. Dies entspricht methodisch weitgehend der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen makroskopischen Untersuchung der Kleinhirnoberfläche (Untersuchungsteil A). Im

Gegensatz zum früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn scheint die Identifikation von Kleinhirnfissuren und Teilbereichen gemäß Andersen et al. (2003) und Luo et al. (2017) beim erwachsenen menschlichen Kleinhirn möglich, wobei anzumerken ist, dass keine dieser beiden Gruppen beschrieben hat, nach welchen Kriterien und mit welcher Sicherheit die jeweiligen Teilbereiche voneinander abgegrenzt wurden. Ferner wurde von Luo et al. (2017) berichtet, dass Crus II beim Menschen aufgrund der prominenten Fissura horizontalis zweifelsfrei identifizierbar ist. Unerwähnt bleibt dabei die kaudale Begrenzung von Crus II, gebildet durch die Fissura ansoparamediana, welche bereits von Schmahmann et al. (1999) anhand MRT-Bildern von Kleinhirnen erwachsener Probanden als schwer erkennbar eingestuft worden war. Ebenso ist bemerkenswert, dass im Rahmen von kombiniert makroskopisch-mikroskopischen Untersuchungen am erwachsenen Kleinhirn zusätzlich zu Regionen, die die Kleinhirnhemisphären betreffen, auch der Vermis makroskopisch an der Kleinhirnoberfläche abgegrenzt und separat untersucht wurde (Andersen et al., 2012), jedoch wurden dabei keine Kriterien zur Identifikation des Vermis genannt.

5.5. Ausblick/aktueller Stand weiterer Untersuchungsmethoden des menschlichen Kleinhirns

5.5.1. Alternative Untersuchungsverfahren des menschlichen Kleinhirns

Wie einleitend erwähnt, ist eine detaillierte morphologische Untersuchung des menschlichen Kleinhirns mit verschiedenen Methoden möglich, die – auch unter Berücksichtigung der jeweiligen Fragestellung – verschiedene Vor- und Nachteile bieten.

Die vorliegende Arbeit entstand mit Hilfe von *post mortem* Material und erlaubt daher keine Untersuchung von z.B. Einflüssen durch Medikamente im vorher-nachher-Vergleich. Mit anderen Untersuchungsmethoden hingegen, wie nachfolgend am Beispiel von MRT aufgeführt, können Befunde am lebenden Menschen erhoben und somit auch Verlaufskontrollen durchgeführt werden. Anhand zweier exemplarischer Studien von D'Ambrosio et al. (2017) und Boillat et al. (2018) werden die Möglichkeiten und Grenzen bei strukturellen Kleinhirnuntersuchungen mittels MRT deutlich: Es stehen mittlerweile 7-Tesla-Ultrahochfeldtechnologien zur Verfügung, die es ermöglichen, Kleinhirn-MRT-Scans mit einer Auflösung von bis zu $0,75 \times 0,75 \times 0,9 \text{ mm}^3$ Voxel zu generieren (Boillat

et al., 2018). Diesen Autoren gelang es dank dieses hohen Auflösungsvermögens beispielsweise, innerhalb der Kleinhirnrinde drei verschiedene Zelltiefen (innere, mittlere und äußere Zelltiefe) im Sinne einer Annäherung an die beim Erwachsenen vorhandenen Kortexschichten – der inneren Granularzellschicht, der Purkinjzellschicht und der Molekularzellschicht – darzustellen. Laut Boillat et al. (2018) handelt es sich bei den in Abbildung 12 farbig markierten Bereichen hauptsächlich, aber nicht ausschließlich um die dort zu erwartenden Gewebstypen. Somit sind zwar die ersten vorbereitenden Schritte in Richtung einer scharfen Abgrenzung der einzelnen Zellschichten getan, aber kleinste Verzweigungen des „Arbor vitae“ würden erst durch eine noch höhere Auflösung von $< 0,1 \text{ mm}^3$ sichtbar, wie die Autoren einräumten. Hinzu kommt, dass bestimmte Bereiche der Kleinhirnrinde je nach MRT-Erkennungsalgorithmus in ihrer Größe unterschätzt werden (Abbildung 12). Dies hätte falsch niedrige Ergebnisse bei anhand dieser Methode durchgeführten quantitativen Kleinhirnstudien zur Folge.

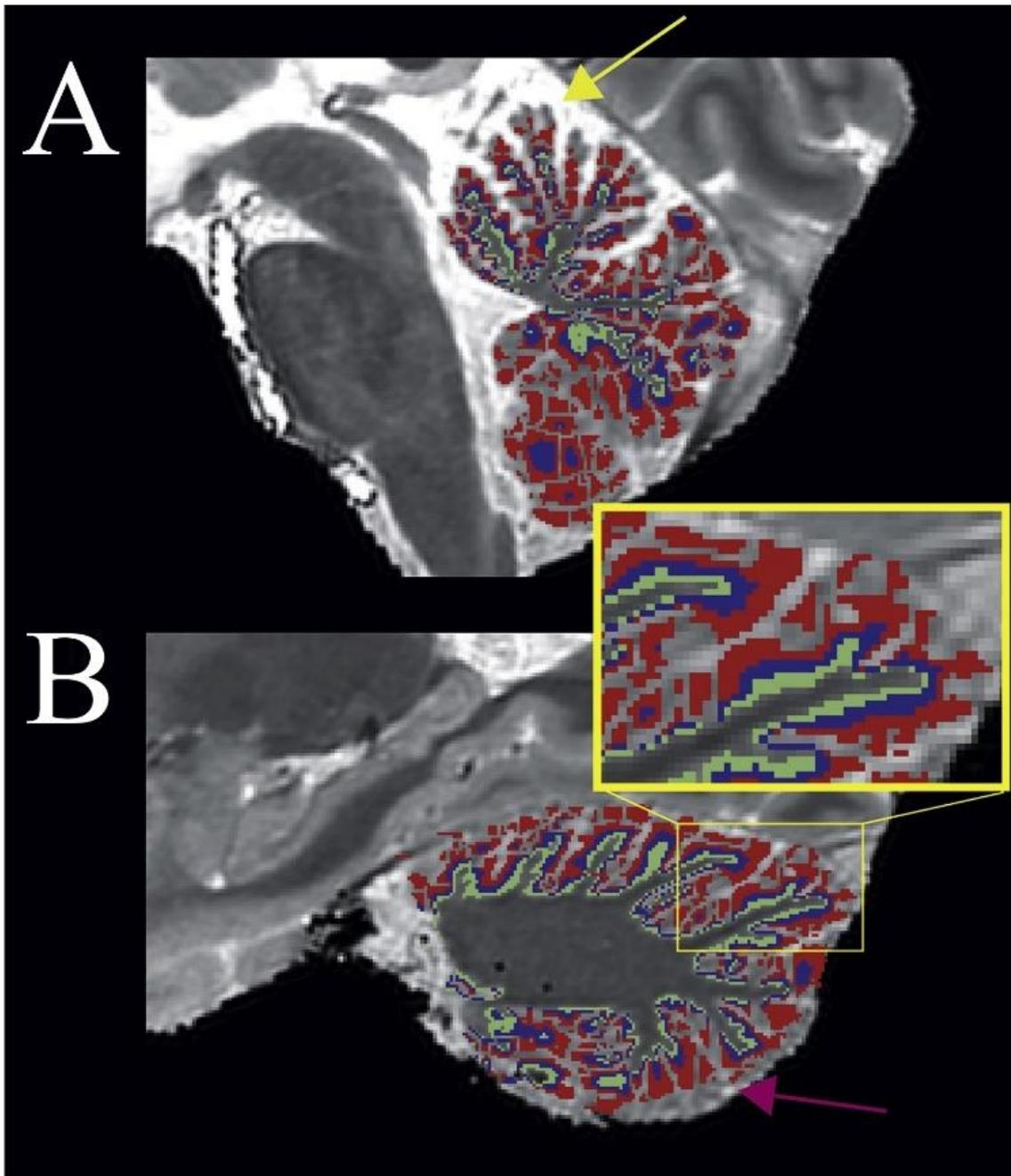


Abbildung 12: MRT-basierte Abgrenzung verschiedener Zelltiefen im erwachsenen menschlichen Kleinhirn (Ausschnitt aus Abbildung 2B in Boillat et al., 2018). Die Abbildung zeigt T1-gewichtete sagittale MRT-Schnittbilder des Kleinhirns eines erwachsenen Probanden. Bildteil (A) zeigt einen medialen Schnitt durch das Kleinhirn und den Hirnstamm, Bildteil (B) eine Schnittebene lateral davon auf Höhe des Nucleus dentatus. Die Resultate der Aufteilung überlagern die T1-Karte in Form einer inneren (grün), mittleren (blau) und äußeren (rot) kortikalen Tiefe, welche näherungsweise die innere Granularzellschicht (grün), der Purkinjezellschicht (blau) und der Molekularzellschicht (rot) entspricht. Der gelbe Pfeil in (A) weist auf einen in seiner Größe unterschätzten Teil der Kleinhirnrinde auf Höhe des Vermis im Lobus anterior. Die äußeren Rindenteile wurden hier fälschlicherweise nicht als solche erkannt und daher nicht farbig markiert. Der violette Pfeil in (B) zeigt auf eine ähnliche Region im basalen Bereich des Lobus posterior.

Auch wenn die Neuroradiologie kontinuierlich technische Fortschritte vorzuweisen hat, ist es bislang noch nicht möglich, allein mit bildgebenden Verfahren präzise quantitative Kleinhirnstudien durchzuführen; geschweige denn, die verschiedenen Zellschichten der Kleinhirnrinde zuverlässig voneinander abzugrenzen oder gar Gesamtzahlen von verschiedenen Zellarten zu bestimmen. Daher bleiben histologische *post mortem* Studien und insbesondere die *design-based* Stereologie auch weiterhin der Goldstandard für zell- und volumenbezogene quantitative Untersuchungen des menschlichen Kleinhirns. Es sei auch erwähnt, dass Boillat et al. (2018) die Kleinhirnoberfläche in sieben ähnlich große parasagittale Bereiche aufteilten, ohne dabei funktionelle und/oder morphologische Gesichtspunkte zu berücksichtigen. D'Ambrosio et al. (2017) wiederum teilten die verschiedenen Lobuli der Kleinhirnrinde mit der *Spacially Unbiased Infratentorial Toolbox (SUIT)* der *Statistical Parametric Mapping* Software ein (verfügbar unter http://www.diedrichsenlab.org/imaging/suit_download.htm). Diese Software wurde aus MRT-Daten von 20 gesunden erwachsenen Probanden generiert und enthält zwei Komponenten: einerseits einen hochauflösenden Kleinhirn-Atlas sowie andererseits einen Atlas der Kleinhirnlobuli basierend auf den in Tabelle 4 beschriebenen Kriterien nach Schmahmann et al. (1999). Aber auch D'Ambrosio et al. (2017) räumten, z.B. bei der Bestimmung des Volumens der einzelnen Lobuli, aufgrund der komplexen Kleinhirnmorphologie Schwierigkeiten bei der Einteilung in Unterbereiche ein.

Ob und inwiefern eine Software-gesteuerte Einteilung, wie in der Studie von D'Ambrosio et al. (2017) beschrieben, auch am früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) Kleinhirn anwendbar ist, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Als weiterer Schritt müssten die Ergebnisse anschließend mit den histologischen Einteilungen des Kleinhirns korreliert werden.

Darüber hinaus gibt es Diskrepanzen hinsichtlich volumetrischer Messungen am Kleinhirn zwischen der Studie von D'Ambrosio et al. (2017) und anderen, methodisch ähnlich aufgebauten Studien (z. B. Anderson et al., 2009; Deppe et al., 2016), da jeweils unterschiedliche Kriterien zur Einteilung sowie verschiedene Parameter für die statistische Analyse herangezogen wurden. Daher können die Aussagen dieser Studien nicht direkt miteinander korreliert werden.

5.5.2. Alternative Leitstrukturen zur Einteilung des Säugetier-Kleinhirns

Im Rahmen histologischer Untersuchungen des menschlichen Kleinhirns sind auch alternative Strukturen als Möglichkeit zur Einteilung des Kleinhirns in Teilbereiche vorstellbar. Denn neben den rein anatomischen Kriterien wie Fissuren, Lobi und Lobuli des Kleinhirns existieren noch weitere, durch immunhistochemische Färbung sichtbar werdende Strukturen entlang der Kleinhirnrinde.

Es wurden zahlreiche Proteine nachgewiesen, die im Kleinhirn von Säugetieren und Vögeln artspezifisch in unterschiedlichem Ausmaß, jedoch stets musterförmig nachweisbar sind (Apps et al., 2018) (Abbildung 13). Dabei handelt es sich um annähernd parasagittal verlaufende Purkinjezell-Zonen, die von außen nicht sichtbar sind (ten Donkelaar et al., 2003). Sie unterscheiden sich anhand von alternierender Gen- und Proteinexpression der Purkinjezellen (Cerminara et al., 2015).

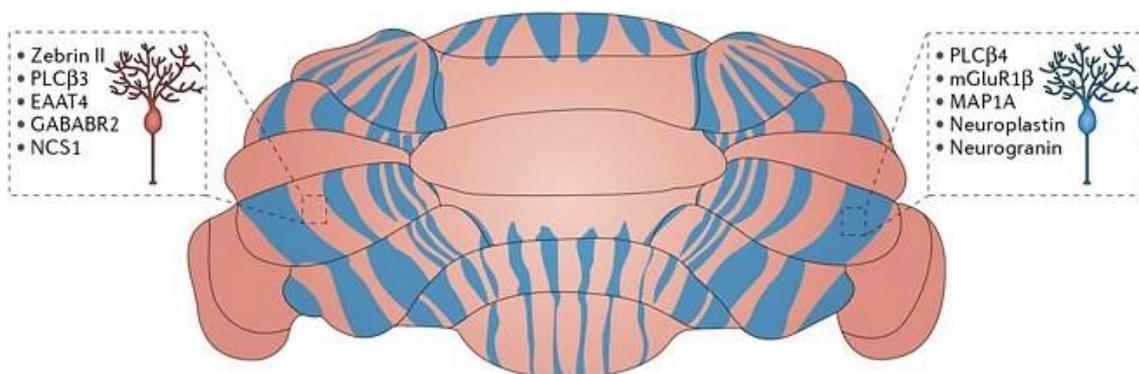


Abbildung 13: Zebrinstreifen im Mäusekleinhirn (Abbildung 3 in Cerminara et al., 2015). Die Abbildung zeigt eine Schemazeichnung eines als Ganzpräparat immunhistochemisch gefärbten Kleinhirns einer Maus. Dargestellt ist die in Streifen angeordnete Expression verschiedener molekularer Marker in der Kleinhirnrinde. Zusammen mit den Zebrin II-positiven Purkinjezellen finden sich in den gleichen Bereichen auch PLC β 3: Phospholipase C β 3; mGluR1 β ; EAAT4: exzitatorischer Aminosäuretransporter 4; GABABR2: GABA B-Rezeptor Subtyp 2 und NCS1: neuronaler Calcium-Sensor 1 (orange). In den Bereichen, die keine Zebrin II-positiven Purkinjezellen enthalten, sind die Marker PLC β 4: Phospholipase C β 4; mGluR1 β : metabotroper Glutamat-Rezeptor 1 β ; MAP1A: mikrotubulus-assoziiertes Protein 1A; Neuroplastin und Neurogranin vorzufinden (blau).

Ein Beispiel dafür sind die sogenannten „zerebellären Module“. Dabei handelt es sich um molekulare Marker wie Zebrin II, dessen Expression sich in der Kleinhirnrinde

immunhistochemisch angefärbt als gestreifte Zonen darstellt (Apps et al., 2018). Diese Zebrin II-positiven Zonen scheinen in nachvollziehbarer, regelhafter Lagebeziehung zu den axonalen Projektionsmustern und den Lobuli des Kleinhirns zu stehen (Luo et al., 2017). Buono et al. (2001) konnten die Expression von Zebrin auch im erwachsenen menschlichen Kleinhirn nachweisen, sodass vermutet wird, dass auch im menschlichen Kleinhirn eine Organisation in solche Module vorliegen könnte (Ashida et al., 2018). Möglicherweise stellen zerebelläre Module – allen voran anhand der Expressionsmuster von Proteinen wie dem bisher im Tierversuch am besten untersuchten Zebrin (Luo et al., 2017) - künftig eine sinnvolle Alternative zur Einteilung des menschlichen Kleinhirns in Teilbereiche dar.

Da die Zebrin II-positiven Streifen bei Tieren an manchen Stellen unmittelbar ineinander übergehen (Apps et al., 2018), ist es bislang nicht möglich, einzelne Streifen ausschließlich durch immunhistochemische Färbung lückenlos und reproduzierbar voneinander abzugrenzen.

Sollten Zebrin II-positive Zonen auch im menschlichen Kleinhirn existieren, stellt sich die Frage, ob diese Zebrin II-positiven Zonen dann ähnlich unklar abgrenzbar wie in den Kleinhirnen von Maus und Ratte angeordnet sind, oder ob sich dazu abweichend für den Menschen klar definierte Zebrin II-positive Zonen ergeben. Als nächster Schritt müsste dann geprüft werden, ob diese aufgrund ihrer räumlichen Verteilung eine reproduzierbare Einteilung in Teilbereiche ermöglichen würden (Boillat et al., 2018). Erst dann könnte die Praktikabilität der hier beschriebenen molekularen Einteilung des Kleinhirns mit derjenigen der bereits vorhandenen histologischen Einteilungsmethoden des menschlichen Kleinhirns verglichen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es für aktuelle wissenschaftliche Fragestellungen grundlegend ist, dass eine valide und reproduzierbare Einteilung des früh-postnatalen (< ein Lebensjahr) menschlichen Kleinhirns zur Verfügung steht. Dies kann anhand der einleitend skizzierten Debatte um eine mögliche Beteiligung des Kleinhirns an der Pathogenese des SIDS demonstriert werden: Lavezzi et al. (2018) wiesen anhand ihrer Untersuchung von Kleinhirnen von SIDS-Patienten und Kontrollen nach, dass BDNF (ein Wachstumsfaktor, der an der Kleinhirnentwicklung beteiligt ist) bei fast allen SIDS-Fällen in der inneren Granularzellschicht vermindert exprimiert wurde. Dieser Defekt wurde in den posterioren Anteilen der Kleinhirnrinde beobachtet. Diese Rindenanteile

sind jedoch funktionell wie morphologisch zu komplex, um aus den sie betreffenden Pathologien einen unmittelbaren Zusammenhang zu den Kleinhirnfunktionen herzustellen, die bei SIDS laut manchen Autoren beeinträchtigt sein könnten, etwa der Regulation des Atemantriebs (Guilleminault et al., 1975; Sparks und Hunsaker, 2002). Auch hier könnte eine differenziertere Einteilung der Kleinhirnrinde, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagen wird, den Weg zu statistisch reproduzierbaren Studienergebnissen ebnen.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beruht auf der Hypothese, dass das früh-postnatale (< ein Lebensjahr) menschliche Kleinhirn wie das Kleinhirn von Erwachsenen anhand makroskopisch und/ oder mikroskopisch identifizierbarer Landmarken – den Kleinhirnfissuren – zuverlässig in verschiedene Teilbereiche eingeteilt werden kann. Die Notwendigkeit zur Überprüfung dieser Hypothese ergab sich aus dem Bestreben, den Wissensstand zur postnatalen Entwicklung des menschlichen Kleinhirns und damit assoziierten Pathologien zu erweitern, sowie speziell aus quantitativ-histologischen (stereologischen) Fragestellungen. Konkret wurde in der Literatur mittels *design-based* stereologischer Untersuchungen gezeigt, dass das früh-postnatale menschliche Kleinhirn eine hohe Plastizität aufweist. Dadurch ist es während des ersten Lebensjahres womöglich besonders vulnerabel gegenüber externen und internen Einflüssen. Bisher liegen allerdings noch keine Studien zum früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn vor, die sich mit funktionell relevanten Kleinhirn-Teilbereichen befassen, so wie dies in manchen *design-based* stereologischen Studien zum erwachsenen Kleinhirn bereits der Fall war. Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es daher, zu prüfen, ob funktionell relevante Unterbereiche des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns anhand der Fissura prima, Fissura superior posterior, Fissura ansoparamediana und Fissura posterolateralis zuverlässig abgegrenzt werden können.

Dazu wurden folgende *post mortem* Untersuchungen an 20 Kleinhirnhälften von Kindern im Alter zwischen einem Tag und 11 Lebensmonaten durchgeführt: 6 der 20 Kleinhirnhälften wurden zunächst makroskopisch in Bezug auf die oben aufgeführten Fissuren untersucht, und die vermutete Position der jeweiligen Fissur mit Acrylfarbe gekennzeichnet. Nach der anschließenden histologischen Verarbeitung dieser Kleinhirnhälften erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der zuvor markierten Fissuren erst anhand nativer Schnitte, dann anhand mit Cresylviolett gefärbter Schnitte. Weitere 14 Kleinhirnhälften wurden rein mikroskopisch (d.h. ohne vorherige makroskopische Untersuchung) untersucht.

Beide Versuchsansätze führten – mit leichter Überlegenheit der Kombination aus makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung – zu ähnlichen Ergebnissen: In 19 Fällen gelang es, die Fissura superior posterior und Fissura horizontalis zuverlässig zu

identifizieren, in 17 Fällen konnte die Fissura posterolateralis eindeutig identifiziert werden. Dagegen konnten die Fissura prima und Fissura ansoparamediana nicht zuverlässig und reproduzierbar identifiziert werden. Auch anhand der in neuroanatomischen Atlanten beschriebenen Einteilung des Kleinhirns in 10 Lobuli und 11 Fissuren konnte die Lage der Fissura prima und Fissura ansoparamediana durch Zählen von Fissuren anhand dafür geeigneter histologischer Schnitte aufgrund einer variablen Anzahl an Lobuli und Fissuren nicht zuverlässig ermittelt werden.

Auf Grundlage der vorliegenden Arbeit ist es also möglich, am früh-postnatalen menschlichen Kleinhirn separate Untersuchungen der Regionen Crus I (anatomisch von der Fissura superior posterior und der Fissura horizontalis begrenzt; funktionell für Sprache und Emotionsverarbeitung relevant), sowie dem Flocculus (anatomisch begrenzt von der Fissura posterolateralis; funktionell an der Koordination von Augenbewegungen beteiligt) durchzuführen. Die zur Identifikation letztgenannter Fissuren vorgeschlagenen Kriterien bedürfen jedoch noch weiterer Erprobung, sodass zusammenfassend empfohlen wird, für *design-based* stereologische Messungen die gesamte Kleinhirnrinde als *region of interest* zu definieren, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, dass das früh-postnatale menschliche Kleinhirn anhand seiner Fissuren nur zum Teil zuverlässig in verschiedene Teilbereiche einteilbar ist. Für die durch makro- und mikroskopische Untersuchung sicher identifizierbaren Fissuren, namentlich die Fissura superior posterior, Fissura horizontalis sowie die Fissura posterolateralis, finden sich in der vorliegenden Arbeit entsprechende eindeutige Kriterien.

7. Publikation

Fichtl A, Buettner A, Hof PR, Schmitz C, Kiessling MC. Delineation of subregions in the early postnatal human cerebellum for design-based stereologic studies. *Front Neuroanat* 2018; 11:134. PMID: 29358908; doi: 10.3389/fnana.2017.00134.

8. Literaturverzeichnis

- Agashiwala RM, Louis ED, Hof PR, Perl DP. A novel approach to non-biased systematic random sampling: a stereologic estimate of Purkinje cells in the human cerebellum. *Brain Res* 2008; 1236: 73-78. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.119
- Andersen BB. Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics. *Brain Res* 2004; 1007: 10-18. doi: 10.1016/j.brainres.2004.01.058
- Andersen BB, Gundersen HJG, Pakkenberg B. Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J Comp Neurol* 2003; 466: 356-365. doi: 10.1002/cne.10884
- Andersen BB, Korbo L, Pakkenberg B. A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *J Comp Neurol* 1992; 326: 549-560. doi:10.1002/cne.903260405
- Andersen BB, Pakkenberg B. Stereological quantification in cerebella from people with schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2003; 182: 354-361. doi: 10.1192/bjp.182.4.354
- Andersen K, Andersen BB, Pakkenberg B. Stereological quantification of the cerebellum in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012; 33(1): 197.e11-20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.013
- Anderson VM, Fisniku LK, Altmann DR, Thompson AJ, Miller DH. MRI measures show significant cerebellar gray matter volume loss in multiple sclerosis and are associated with cerebellar dysfunction. *Mult Scler* 2009; 15(7): 811-817.
- Andreasen NC, Pierson R. The role of the cerebellum in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 81-88. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.01.003
- Ashida R, Cerminara NL, Brooks J, Apps R. Principles of organization of the human cerebellum: macro- and microanatomy. In: *The cerebellum: from embryology to*

diagnostic investigations. Handbook of Clinical Neurology 154 (3), Kapitel 3. Elsevier, Amsterdam 2018: 45-58. doi: 10.1016/B978-0-444-63956-1.00003-5

Baldaçara L, Nery-Fernandes F, Rocha M, Quarantini LC, Rocha GG, Guimarães JL, Araújo C, Oliveira I, Miranda-Scippa A, Jackowski A. Is cerebellar volume related to bipolar disorder? *J Affect Disord* 2011; 135: 305-309. doi: 10.1016/j.jad.2011.06.059

Berquin P, Giedd JN, Jacobsen LK, Hamburger SD, Krain AL, Rapoport JL, Castellanos FX. Cerebellum in attention-deficit hyperactivity disorder: a morphometric MRI study. *Neurology* 1998; 50: 1087-1093. doi: 10.1212/WNL.50.4.1087

Boillat Y, Bazin PL, O'Brien K, Fartaria MJ, Bonnier G, Krueger G, van der Zwaag W, Ganziera C. Surface-based characteristics of the cerebellar cortex visualized with ultra-high field MRI. *NeuroImage* 2018; 17

Buckner RL. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron* 2013; 80: 807-815.

Buono P, D'Armiento FP, Terzi G, Alfieri A, Salvatore F. Differential distribution of aldolase A and C in the human central nervous system. *J Neurocytol* 2001; 30(12): 957-965.

Calhoun ME, Mouton PR. Length measurement: new developments in neurostereology and 3D imagery. *J. Chem Neuroanat* 2000; 20: 61-69. doi: 10.1016/S0891-0618(00)00074-0

Castellanos FX, Giedd JN, Berquin PC, Walter JM, Sharp W, Tran T, Vaituzis AC, Blumenthal JD, Nelson J, Bastain TM, Zijdenbos A, Evans AC, Rapoport JL. Quantitative brain magnetic resonance imaging in girls with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 289-295. doi: 10.1001/archpsyc.58.3.289

- Cerminara NL, Lang EJ, Sillitoe RV, Apps R. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 79-93.
- Christakou A, Murphy CM, Chantiluke K, Cubillo AI, Smith AB, Giampietro V, Daly E, Ecker C, Robertson D; MRC AIMS consortium, Murphy DG, Rubia K. Disorder-specific functional abnormalities during sustained attention in youth with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and with autism. *Mol Psychiatry* 2013; 18: 236-244. doi: 10.1038/mp.2011.185
- Chung SH, Sillitoe RV, Croci L, Badaloni A, Consalez G, Hawkes R. Purkinje cell phenotype restricts the distribution of unipolar brush cells. *Neuroscience* 2009; 164: 1496-1508.
- Cruz-Sánchez FF, Lucena J, Ascaso C, Tolosa E, Quintò L, Rossi ML. Cerebellar cortex delayed maturation in sudden infant death syndrome. *J. Neuropath Exp Neur* 1997; 56: 340-346. doi: 10.1097/00005072-199704000-00002
- D'Ambrosio A, Pagani E, Riccitelli GC, Colombo B, Rodegher M, Falini A, Comi G, Filippi M, Rocca MA. Cerebellar contribution to motor and cognitive performance in multiple sclerosis: An MRI sub-regional volumetric analysis. *Mult Scler* 2017; 23(9): 1194-1203.
- Deppe M, Tabelow K, Krämer J, Tenberge JG, Schiffler P, Bittner S, Schwindt W, Zipp F, Wiendl H, Meuth SG. Evidence for early, non-lesional cerebellar damage in patients with multiple sclerosis: DTI measures correlate with disability, atrophy, and disease duration. *Mult Scler* 2016; 22(1): 73–84.
- Duchala C., Shick HE, Garcia J, Deweese DM, Sun S, Stewart VJ, Macklin WB. The toppler mouse: a novel mutant exhibiting loss of Purkinje cells. *J Comp Neurol* 2004; 476: 113-129. doi: 10.1002/cne.20206

Durstons S, van Belle J, de Zeeuw P. Differentiating frontostriatal and fronto-cerebellar circuits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2011; 69: 1178-1184. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.07.037

Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman ML, Blaha CD, Blatt GJ, Chauhan A, Chauhan V, Dager SR, Dickson PE, Estes AM, Goldowitz D, Heck DH, Kemper TL, King BH, Martin LA, Millen KJ, Mittleman G, Mosconi MW, Persico AM, Sweeney JA, Webb SJ, Welsh JP. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum* 2012; 11: 777-807. doi:10.1007/s12311-012-0355-9

Feddersen RM, Ehlenfeldt R, Yunis WS, Clark HB, Orr HT. Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. *Neuron* 1992; 9: 955–966. doi:10.1016/0896-6273(92)90247-B

Gadsdon DR, Emery JL. Quantitative morphological studies of developing human cerebellar cortex in various disease states. *Arch Dis Child* 1976; 51: 964-967. doi:10.1136/adc.51.12.964

Gasbarri A, Pompili A, Pacitti C, Cicirata F. Comparative effects of lesions to the pontocerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 2003; 116: 1131-1140. doi:10.1016/S0306-4522(02)00780-7

Glaser J, Greene G, Hendricks S. *Stereology for biological research with a focus on neuroscience*. mbf Press, 2006.

Gocmen-Mas N, Pelin C, Canan S, Yazici AC, Zagyapan R, Senan S, Karabekir HS, Sahin B. Stereological evaluation of volumetric asymmetry in healthy human cerebellum. *Surg Radiol Anat* 2009; 31: 177-181. doi: 10.1007/s00276-008-0424-4

Groszer M, Keays DA, Deacon RMJ, de Bono JP, Prasad-Mulcare S, Gaub S, Baum MG, French CA, Nicod J, Coventry JA, Enard W, Fray M, Brown SD, Nolan PM, Pääbo S, Channon KM, Costa RM, Eilers J, Ehret G, Rawlins JN, Fisher SE. Impaired synaptic

plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. *Curr Biol* 2008; 18: 354-362. doi: 10.1016/j.cub.2008.01.060

Guilleminault C, Peraita R, Souquet M, Dement WC. Apneas during sleep in infants: possible relationship with sudden infant death syndrome. *Science* 1975; 190: 677-679. doi:10.1126/science.1188364

Harper RM, Woo MA, Alger JR. Visualization of sleep influences on cerebellar and brainstem cardiac and respiratory control mechanisms. *Brain Res Bull* 2000; 53: 125-131. doi:10.1016/S0361-9230(00)00317-8

Hashimoto T, Tayama M, Murakawa K, Yoshimoto T, Miyazaki M, Harada M, Kuroda Y. Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. *J Autism Dev Disord* 1995; 25: 1-18. doi: 10.1007/BF02178163

Huard JM, Forster CC, Carter ML, Sicinski P, Ross ME. Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* 1999; 126: 1927-1935.

Hunt NJ, Waters KA, Machaalani R. Promotion of the unfolding protein response in orexin/dynorphin neurons in sudden infant death syndrome (SIDS): Elevated pPERK and ATF4 expression. *Mol Neurobiol* 2017; 54(9): 7171-7185. doi: 10.1007/s12035-016-0234-3

Jeong YG, Hyun BH, Hawker R. Abnormalities in cerebellar Purkinje cells in the novel ataxic mutant mouse, pogo. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 125: 61-67. doi: 10.1016/S0165-3806(00)00114-0

Johnson MH. Functional brain development in humans. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 475-483. doi:10.1038/35081509

Joyal CC, Pennanen C, Tiihonen E, Laakso MP, Tiihonen J, Aronen HJ. MRI volumetry of the vermis and the cerebellar hemispheres in men with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2004; 131: 115-124. doi: 10.1016/j.psychresns.2003.09.003

Kiessling MC, Büttner A, Butti C, Müller-Stark J, Milz S, Hof PR, Frank HG, Schmitz C. Cerebellar granule cells are generated postnatally in humans. *Brain Struct Funct* 2014; 219: 1271–1286. doi:10.1007/s00429-013-0565-z

Kiessling MC, Büttner A, Butti C, Müller-Starck J, Milz S, Hof PR, Frank HG, Schmitz C. Intact numbers of cerebellar Purkinje and granule cells in sudden infant death syndrome: a stereologic analysis and critical review of neuropathologic evidence. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72: 861-870. doi: 10.1097/NEN.0b013e3182a31c31

Kipp M, Kiessling MC, Hochstrasser T, Roggenkamp C, Schmitz C. Design-based stereology for evaluation of histological parameters. *J Mol Neurosci* 2017; 61(3): 325-342. doi: 10.1007/s12031-016-0858-9

Knickmeyer RC, Gouttard S, Kang C, Evans D, Wilber K, Smith JK, Hamer RM, Lin W, Gerig G, Gilmore JH. A structural MRI study of human brain development from birth to 2 years. *J Neurosci* 2008; 28: 12176-1218. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3479-08.2008

Korbo L, Andersen BB. The distributions of Purkinje cell perikaryon and nuclear volume in human and rat cerebellum with the nucleator method. *Neuroscience* 1995; 69: 151-158. doi:10.1016/0306-4522(95)00223-6

Larsell O. The development of the cerebellum in man in relation to its comparative anatomy. *J Comp Neurol* 1947; 87: 85-129. doi: 10.1002/cne.900870203

Larsell O, Jansen J. *The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum: the Human Cerebellum, Cerebellar Connections, and Cerebellar Cortex*. University of Minnesota Press, United States, 1972.

Lavezzi AM, Ferrero S, Lattuada D, Pisciolli F, Alfonsi G, Matturri L. Pathobiological expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebellar cortex of

- sudden fetal and infant death victims. *Int J Dev Neurosci*. 2018; 66: 9-17. doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.11.003
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Maturri L. Ontogenesis of human cerebellar cortex and bio-pathological characterization in sudden unexplained fetal and infant death. *Virchows Arch* 2007; 450: 31-40. doi: 10.1007/s00428-006-0311-5
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Terni L, Maturri L. Histological and biological developmental characterization of the human cerebellar cortex. *Int J Dev Neurosci* 2006; 24: 365-371. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2006.06.002
- Luo Y, Fujita H, Nedelescu H, Biswas MS, Sato C, Ying S, Takahashi M, Akita K, Higashi T, Aoki I, Sugihara I. Lobular homology in cerebellar hemispheres of humans, non-human primates and rodents: a structural, axonal tracing and molecular expression analysis. *Brain Struct Funct* 2017; 222(6): 2449-2472. doi: 10.1007/s00429-017-1436-9
- Malacarne MVG. Nuova esposizione della vera struttura del cervelletto umano. Briolo 1776; Torino.
- Martin P, Albers M. Cerebellum and schizophrenia: a selective review. *Schizophr Bull* 1995; 21: 241-250. doi: 10.1093/schbul/21.2.241
- Mostofsky SH, Reiss AL, Lockhart P, Denckla MB. Evaluation of cerebellar size in attention-deficit hyperactivity disorder. *J Child Neurol* 1998; 13: 434-439. doi:10.1177/088307389801300904
- Mouton PR, Gokhale AM, Ward NL, West MJ. Stereological length estimation using spherical probes. *J Microsc* 2002; 206: 54-64. doi: 10.1046/j.1365-2818.2002.01006.x
- Mugnaini E, Floris A. The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 1994; 339: 174-180.

Mugnaini E, Sekerková G, Martina M. The unipolar brush cell: a remarkable neuron finally receiving deserved attention. *Brain Res Re* 2011; 66: 220-245.

Müller-Starck J, Büttner A, Kiessling MC, Angstman NB, Császár N, Haeussner E, Tanja Hochstrasser T, Sternecker K, Hof PR, Milz S, Frank HG, Schmitz C. No changes in cerebellar microvessel length density in sudden infant death syndrome: implications for pathogenetic mechanisms. *J Neuropath Exp Neur* 2014; 73: 312-323. doi:10.1097/NEN.0000000000000055

Nieuwenhuys R, Voogd J, Lange W. *Das Zentralnervensystem des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin 1980.

Oehmichen M, Wullen B, Zilles K, Saternus KS. Cytological investigations on the cerebellar cortex of sudden infant death victims. *Acta Neuropathol* 1989; 78: 404-409. doi:10.1007/BF00688177

Palmen SJ, van Engeland H, Hof PR, Schmitz C. Neuropathological findings in autism. *Brain* 2004; 127: 2572-2583. doi: 10.1093/brain/awh287

Paxinos G. Brainstem and Cerebellum. In: *The Human Nervous System*. Academic Press, San Diego 1990.

Petacchi A, Kaernbach C, Ratnam R, Robin DA, Bower JM. Enhanced activation of cerebellar regions during pitch discrimination in humans: a PET study. *BMC Neurosci* 2010; 11: P84. doi: 10.1186/1471-2202-11-S1-P84

Rakic P, Sidman RL. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol* 1970; 139: 473-500. doi: 10.1002/cne.901390407

Riedel A, Klekamp J, Harper C, Kretschmann HJ. Morphometric study on the postnatal growth of the cerebellum of Australian aborigines and Caucasians. *Brain Res* 1989; 499: 333-343. doi: 10.1016/0006-8993(89)90782-8

- Roostaei T, Nazeri A, Sahraian MA, Minagar A. The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurol Clin* 2014; 32: 859-869.
- Schraa-Tam CKL, Rietdijk WJR, Verbeke WJMI, Dietvorst RC, van den Berg WE, Bagozzi RP, De Zeeuw CI. fMRI activities in the emotional cerebellum: a preference for negative stimuli and goal-directed behavior. *Cerebellum* 2012; 11: 233–245. doi: 10.1007/s12311-011-0301-2
- Schmahmann JD, Doyon J, McDonald D, Holmes C, Lavoie K, Hurwitz AS, Kabani N, Toga A, Evans A, Petrides M. Three-dimensional MRI atlas of the human cerebellum in proportional stereotaxic space. *Neuroimage* 1999; 10: 233-260. doi: 10.1006/nimg.1999.0459
- Schmitz C, Eastwood BS, Tappan SJ, Glaser JR, Peterson DA, Hof PR. Current automated 3D cell detection methods are not a suitable replacement for manual stereologic cell counting. *Front Neuroanat.* 2014; 8: 27. doi: 10.3389/fnana.2014.00027
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 2005; 130: 813-831. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.08.050
- Shimada M, Yamano T, Nakamura T, Morikawa Y, Kusunoki T. Effect of maternal malnutrition on matrix cell proliferation in the cerebrum of mouse embryo: an autoradiographic study. *Pediatr Res* 1977; 11: 728-732. doi: 10.1203/00006450-197706000-00006
- Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 1973; 62: 1-35. doi: 10.1016/0006-8993(73)90617-3
- Skefos J, Cummings C, Enzer K, Holiday J, Weed K, Levy E, Yuce T, Kemper T, Bauman M. Regional alterations in Purkinje cell density in patients with autism. *PLoS ONE* 2014; 9: e81255. doi: 10.1371/journal.pone.0081255

- Smeyne RJ, Chu T, Lewin A, Bian F, Crisman SS, Kunsch C, Lira SA, Oberdick J. Local control of granule cell generation by cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 1995; 6: 230-251. doi:10.1006/mcne.1995.1019
- Sotelo C, Triller A. Fate of presynaptic afferents to Purkinje cells in the adult nervous mutant mouse: a model to study presynaptic stabilization. *Brain Res* 1979; 175: 11-36. doi:10.1016/0006-8993(79)90511-0
- Sparks D L, Hunsaker JC. Neuropathology of sudden infant death (syndrome): literature review and evidence of a probable apoptotic degenerative cause. *Childs Nerv Syst* 2002; 18: 568-592. doi: 10.1007/s00381-002-0629-5
- Steinlin M. Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. *Cerebellum* 2008; 7: 607-610.
- Steinschneider A. Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome: clinical and laboratory observations. *Pediatrics* 1972; 50: 646-654.
- Stoodley CJ. The cerebellum and neurodevelopmental disorders. *Cerebellum* 2016; 15: 34-37.
- Stoodley CJ, Limperopoulos C. Structure-function relationships in the developing cerebellum: evidence from early-life cerebellar injury and neurodevelopmental disorders. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016; 21: 356-364.
- Stoodley CJ, Schmahmann JD. Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuroimage* 2009; 44: 489-501.
- Strakowski SM, Delbello MP., Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 105–116. doi:10.1038/sj.mp.4001585

ten Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Thijssen HOM, Renier WO. Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol* 2003; 250: 1025–1036. doi: 10.1007/s00415-003-0199-9

Timman D. Kleinhirn und exekutiv Funktionen, Sprache sowie visuell-räumliche Funktionen. In: *Kognitive Neurowissenschaften*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2012: 609-617.

Tsekhmistrenko TA. Structural transformations in the human cerebellar cortex from birth to the age of three years. *Neurosci Behav Physiol* 1996; 26: 579-583. doi: 10.1007/BF02359503

Víg J, Takács J, Abrahám H, Kovács GG, Hátori J. Calretinin-immunoreactive unipolar brush cells in the developing human cerebellum. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 723-729.

Voogd J, Ruigrok TJH. Cerebellum and precerebellar nuclei. In: *The Human Nervous System*, Kapitel 15. Academic Press, San Diego 2012; 3: 471-532.

Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Ma SY, Efrain C, Azmitia EC, Banerjee P, Flory M, Cohen IL, London E, Brown WT, Komich Hare C, Wisniewski T. Contribution of olivofloccular circuitry developmental defects to atypical gaze in autism. *Brain Res* 2013; 1512: 106-122.

West MJ, Slomianka LHJG, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-497. doi: 10.1002/ar.1092310411

West MJ, Østergaard K, Andreassen OA, Finsen B. Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: an in situ hybridization study using the optical fractionator method. *J Comp Neurol* 1996; 370: 11-22. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960617)370:1<11::AID-CNE2>3.0.CO;2-O

Whitney ER, Kemper TL, Rosene DL, Bauman ML, Blatt GJ. Density of cerebellar basket and stellate cells in autism: evidence for a late developmental loss of Purkinje cells. *J Neurosci Res* 2009; 87: 2245-2254. doi: 10.1002/jnr.22056

Witter L, De Zeeuw CI. Regional functionality of the cerebellum. *Curr Opin Neurobiol* 2015; 33: 150-155.

Yu BP, Yu CC, Robertson RT. Patterns of capillaries in developing cerebral and cerebellar cortices of rats. *Acta Anat* 1994, 149; 128–133. doi:10.1159/000147567

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Schmitz für die Bereitstellung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit. Sein professioneller Umgang mit den im Laufe der Arbeit entstandenen Fragestellungen war mir ein Vorbild.

Frau Dr. rer. biol. hum. Maren Kiessling für die kontinuierliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit. Durch viele wertvolle Diskussionen zeigte sie mir, was wissenschaftliches Arbeiten bedeutet.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Büttner danke ich für die Bereitstellung der für diese Arbeit essenziellen Kleinhirne sowie Herrn Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank für die Bereitstellung der Laborkapazitäten.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Beate Aschauer, Frau Astrid Baltruschat und Frau Sabine Tost für ihre wertvolle Unterstützung im Labor bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und in die Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Michael Melzer und Frau Johanna Seitz, die mich durch ihre eigene rege Forschungstätigkeit motivierten.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Fichtl, Anna Christina

Name, Vorname

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

**Abgrenzung verschiedener Teilbereiche
des früh-postnatalen menschlichen Kleinhirns
für design-based stereologische Untersuchungen**

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

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

München, 1. September 2019

Ort, Datum

Anna Christina Fichtl

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand