

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen

Abteilung Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie

Abteilungsleiter: Professor Dr. Bültmann

**Cadherine in Gliazellen:
Immunologische Blockierungsexperimente zur
Rolle R-Cadherin exprimierender Gliazellen wäh-
rend der Entwicklung der Hühnchenretina**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrich Siegfried Weigold

aus

Göppingen

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-J. Wagner

Dem Andenken meines viel
zu früh verstorbenen Bruders
Michael (1971-1996) gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Cadherine	3
1.1.1. Cadherine im zentralen Nervensystem	5
1.1.2. Cadherine im visuellen System	6
1.1.3. R-Cadherin im visuellen System	7
1.2. Gliazellen	8
1.2.1. Makrogliazellen im visuellen System.....	13
1.2.2. Makrogliazellen im visuellen System von Vögeln.....	15
1.2.3. R-Cadherin exprimierende peripapilläre Gliazellen	16
1.3. Ziel der Arbeit	17
2. Material und Methodik	19
2.1. Kultivierung der Embryos.....	19
2.2. Injektionsexperimente	19
2.2.1. Lyse-Experimente	19
2.2.2. Kontrollen	20
2.3. Immunfluoreszenz.....	21
2.3.1. Präparation.....	21
2.3.2. Fixierung und Einbettung	21
2.3.3. Schneiden	21
2.3.4. Markierung	21
2.3.5. Mikroskopieren und Dokumentation	22
2.4. Licht- und konventionelle Transmissions-Elektronenmikroskopie	22
2.4.1. Präparation und Fixierung	22
2.4.2. Präparation und Einbettung.....	23
2.4.3. Schneiden und Dokumentation von Semidünnschnitten	23
2.4.4. Schneiden und Dokumentation von Ultradünnschnitten.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Wirkung auf die R-Cadherin exprimierende peripapilläre Glia	25

3.1.1. Experiment	25
3.1.2. Kontrollen	25
3.2. Wirkung auf die Vaskularisation.....	26
3.3. Wirkung auf das Axonwachstum.....	26
3.3.1. Experiment	26
3.3.1.1. Embryonaltag 9.....	26
3.3.1.2. Embryonaltag 10.....	26
3.3.2. Kontrollen	27
3.4. Wirkung auf die Müller´schen Zellen.....	28
3.4.1. Experiment	28
3.4.1.1. Embryonaltag 9.....	28
3.4.1.2. Embryonaltage 10 und 11.....	29
3.4.2. Kontrollen	30
Bildseiten	31
4. Diskussion	42
4.1. Methodik	42
4.2. Ergebnisse.....	43
4.2.1. Experimente	43
4.2.1.1. Vaskularisation	44
4.2.1.2. Axonwachstum	44
4.2.1.3. Müller´sche Zellen	48
4.2.2. Kontrollen	49
4.3. Zusammenfassende Beurteilung	50
4.4. Schlussfolgerung aus der Arbeit.....	51
5. Zusammenfassung.....	52
6. Abkürzungsverzeichnis	53
7. Literaturverzeichnis	54

Danksagung.....60

Lebenslauf61

1. Einleitung

Das Nervensystem besitzt einen hochkomplizierten Aufbau, ohne den es jedoch nicht fähig wäre, die faszinierenden Leistungen zu erbringen, zu denen es in der Lage ist. Unterschieden wird es in zentrales Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn, Rückenmark sowie, aufgrund ihrer Entwicklungsgeschichte, den Augen, und peripheres Nervensystem (PNS), bestehend aus sensorischen und motorischen Nerven sowie den übrigen Sinnesorganen.

Das Nervengewebe zeichnet sich dabei durch verschiedene Besonderheiten aus, die jeweils ihren Teil zum Funktionieren des ganzen Systems beitragen.

So besteht Nervengewebe im Wesentlichen aus nur zwei verschiedenen Zellarten, den Nervenzellen und den Gliazellen, die außerhalb des Nervensystems nicht vorkommen. Innerhalb dieser Gruppen sind unterschiedlichste Ausformungen dieser Zelltypen zu finden, angepasst an den Ort ihres Vorkommens und an ihre Aufgaben. Die in der Histologie des restlichen Körpers vorkommenden Epithel- oder Bindegewebszellen sucht man im Nervensystem vergebens.

Nervenzellen machen ungefähr die Hälfte des Volumens des ZNS aus. Sie nehmen Informationen auf, leiten sie weiter oder verarbeiten sie. Mit anderen Nervenzellen können sie über Ausschüttung von Neurotransmittern an Synapsen kommunizieren. Ihre Fortsätze zur Informationsweiterleitung, die Axone, können im PNS beachtliche Längen erreichen. Beim Menschen erstrecken sie sich beispielsweise von den Ganglien des Sakralmarks bis in die Zehen.

Die Entwicklung dieser Architektur des Nervensystems, von Zentren im Gehirn oder von Sinnesorganen, mit Auswachsen von Axonen, nicht nur über solch lange Distanzen, und deren Herstellung von Kontakten und Verschaltungen mit den richtigen Zielzellen, ist noch immer nicht aufgeklärt und Gegenstand intensiver Forschung.

Gliazellen machen die andere Hälfte des Volumens des ZNS aus. Zahlenmäßig gibt es jedoch doppelt so viele Glia- wie Nervenzellen. Früher wurden sie nur als Kittzellen aufgefasst, die für die Form des Nervensystems und die Narbenbildung wichtig sind. Mittlerweile wird ihnen aber, aufgrund ihrer Fähigkeit zahl-

reiche Stoffwechselprozesse durchzuführen, sowie ihrer Ausstattung mit verschiedensten Ionen-Kanälen und Transportern, eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Umgebungsmilieus der Nervenzellen zugeschrieben, das diese zur Funktion benötigen. Weiter geht man davon aus, dass Gliazellen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems spielen, da sie Leitstrukturen bilden, an denen entlang die Nervenzellen ihre Verbindungen zu anderen Nervenzellen ausbilden. Als besonders wichtig haben sich hierbei die verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Gliazellen herausgestellt.

Eine weitere Besonderheit des Nervengewebes, die für seine regelrechte Funktion unabdingbar ist, ist die Tatsache, dass im gesamten ZNS besondere Blutgefäße existieren, die die sogenannte Blut-Hirn-Schranke ausbilden. Im Gegensatz zu den Kapillaren im restlichen Körper wird hier kein Gewebswasser abgepresst – wenn dem so wäre, wäre das folgende Hirnödem tödlich – und diese Schranke hält viele Stoffe, wie zum Beispiel Bakterientoxine aus der Nahrung, aber auch Serum-Elektrolytstörungen, von den Nervenzellen fern, um nicht die unmittelbare Lebensfähigkeit des Individuums durch ein plötzlich mangelhaft funktionierendes Hirn zu gefährden. Die Blut-Hirn-Schranke ist ebenfalls Gegenstand intensiver Forschung, da sie beispielsweise ein Problem in der Pharmakologie darstellen kann, wenn ein Medikament, das im ZNS wirken soll, nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig ist. Die Wichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke wird vor allem auch dann deutlich, wenn sie zusammenbricht, wie dies bei bösartigen Hirntumoren der Fall sein kann.

In dieser Arbeit soll die Rolle einer Subpopulation von Gliazellen in der Entwicklung des ZNS untersucht werden. Dazu werden Gliazellen, die ein bestimmtes Zelladhäsionsmolekül – R-Cadherin – exprimieren, während der Entwicklung der Netzhaut von Hühnerembryonen untersucht. Dabei wird besonderes Augenmerk auf ihre Rolle in der Entwicklung von Blutgefäßen, die Blut-Hirn-Schranken-Eigenschaften besitzen, und beim Axon-Wachstum gerichtet.

1.1. Cadherine

Wie ihr Name bereits verrät, sind Cadherine Ca^{2+} -abhängige Zell-Adhäsionsmoleküle. Sie werden in zwei große Gruppen eingeteilt, in die klassischen und die nicht klassischen Cadherine. Beide Gruppen bestehen wiederum aus einer Vielzahl einzelner Cadherine, die zum Einen nach dem Ort ihrer Entdeckung, wie beispielsweise E-Cadherin (epitheliales Cadherin) oder N-Cadherin (neurales Cadherin), zum Anderen nummeriert benannt werden. Das Verständnis beider Gruppen ist zur Zeit noch einem ständigen Wandel unterworfen, zumal zu beiden Gruppen regelmäßig neue Cadherine hinzukommen oder ein homologes Cadherin in einer anderen Spezies beschrieben und seine Funktion untersucht wird.

Bei Cadherinen handelt es sich um Zelloberflächen-Glykoproteine (Takeichi, 1995; Huber et al., 1996; Redies, 2000), die, zumindest bei den meisten Cadherinen, aus drei Domänen bestehen: einer zytoplasmatischen, einer transmembranären und einer Calcium-bindenden extrazellulären Domäne, die aus sogenannten „Cadherin Repeats“ von ungefähr 110 Aminosäuren Länge besteht (Vaughn und Bjorkmann, 1996). Diese Repeats ähneln in ihrer Faltungsstruktur der variablen Domäne der Immunglobuline (Overduin et al., 1995; Shapiro et al., 1995). Extrazelluläres Ca^{2+} versteift die Multidomänen-Struktur der Cadherine (Pokutta et al., 1994; Nagar et al., 1996).

Intrazellulär ist bei den meisten Cadherinen die zytoplasmatische Domäne über sogenannte Catenine mit dem Zytoskelett verbunden. Catenine sind eine Gruppe von Proteinen, die wiederum in verschiedene Subgruppen wie beispielsweise α - und β -Catenin oder Plakoglobin unterschieden wird, und nicht nur in der Verbindung zum Zytoskelett, sondern auch in der Signaltransduktion der Zelle eine Rolle spielt (Takeichi, 1995, Huber et al., 1996).

Die bestbekannte und untersuchte Funktion von Cadherinen ist die Zell-Zell-Adhäsion. Cadherine sind dazu in adherens junctions konzentriert (Sathy und Ripps, 2001). Hierbei sind zwei verschiedene Formen zu unterscheiden, die in Aggregations-Assays Cadherin-transfizierter Zellen auftreten und hier untersucht wurden (Redies, 2000):

1. Von einer homotypischen Bindung spricht man, wenn Zellen, die mit zwei verschiedenen Cadherinen transfiziert sind, separate Zell-Aggregate bilden, die nur jeweils einen der Cadherin-exprimierenden Zelltypen enthalten. Diese stärkste und deshalb vorherrschende Form der Cadherin-Adhäsion tritt beispielsweise bei E- und N-Cadherin transfizierten Zellen auf (Redies, 2000), also Cadherinen, deren Aminosäuresequenz nur eine niedrige Homologie aufweist.

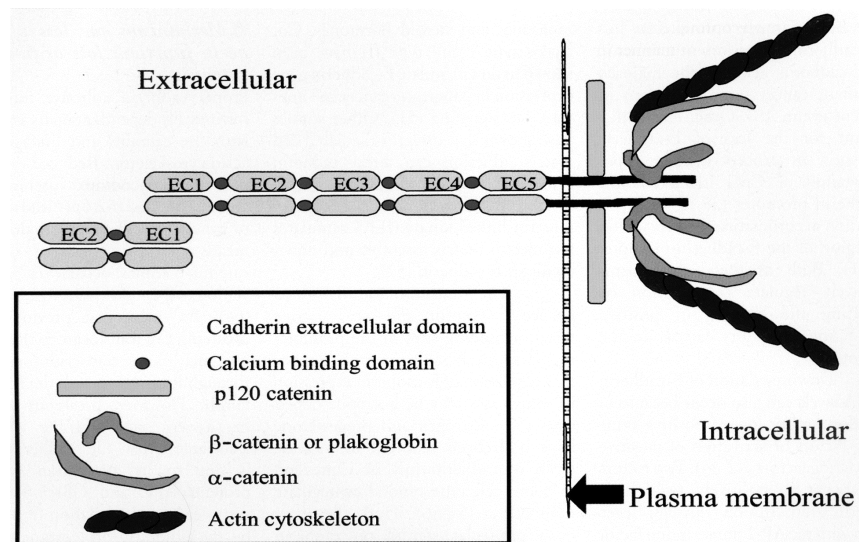
2. Von einer heterotypischen Bindung spricht man, wenn die mit verschiedenen Cadherinen transfizierten Zellen gemeinsam gemischte Aggregate bilden, sich zwar innerhalb der Aggregate nach dem exprimierten Cadherin separieren, aber auch ein Bereich im Aggregat existiert, in dem die verschiedenen Zelltypen aneinander adhäreren. Diese Form der Bindung ist im Normalfall schwächer als die homotypische (Redies, 2000). Die heterotypische Bindung tritt bei bestimmten Cadherin-Kombinationen mit höherer Homologie auf, wie beispielsweise N- und R-Cadherin (Inuzuka et al., 1991a) oder Cadherin-6B und Cadherin-7 (Nakagawa und Takeichi, 1995).

Vom Beginn der Entwicklung an sind Cadherine essentiell. Es hat sich gezeigt, dass Mäuse, denen E-Cadherin fehlt, zum Zeitpunkt der Implantation sterben, da sich die Blastozyste nicht entwickeln kann (Larue et al., 1994).

Aufgrund der überwiegenden Bevorzugung der homotypischen Bindung wird den klassischen Cadherinen eine wichtige Rolle in der Morphogenese zugewiesen, da durch sie Zellen in gleichartige Zellgruppen geordnet werden können, aber auch Zellmigration gelenkt werden kann (Takeichi, 1995). Zudem wird, für zumindest einige klassische Cadherine, eine Rolle bei der Differenzierung embryonaler Gewebe diskutiert, da entdeckt wurde, dass bestimmte Cadherine in Teratomen eine Differenzierung in die Gewebe hervorrufen können, in denen sie im Normalfall vorkommen (Larue et al., 1996; Rosenberg et al., 1997). Weiterhin wird Cadherinen eine wichtige Rolle bei maligner Entartung, Gewebeinvasion und Metastasierung von Zellen zugeschrieben. In bösartigem Tumorgewebe konnte beispielsweise eine Herunterregulierung der Cadherin-Expression bei der Gewebeinvasion (Takeuchi et al., 2002), der Verlust von Cadherinen und damit der von ihnen vermittelten Zell-Zell-Adhäsion oder ein

Umschalten auf die Expression anderer Cadherine bei maligner Entartung und Metastasierung beobachtet werden (Cavallaro und Christofori, 2001; Hajra und Fearon, 2002; Cavallaro et al., 2002).

Grafik der Molekülstruktur von Cadherinen (nach J.E. Lewis, 2002):



1.1.1. Cadherine im zentralen Nervensystem

Ein Schwerpunkt der Erforschung von Cadherinen liegt auf deren Rolle im ZNS. Der Grund dafür liegt darin, dass die Cadherine durch ihre homotypische Bindung eine Separation von Zellen zu Nervenkeimen und deren korrekte Verbindung über Nervenfasern beeinflussen können.

Eines der ersten bekannten Cadherine war das im Nervengewebe vorherrschende, dort entdeckte und deshalb danach benannte N-Cadherin. Sein Expressionsmuster im Nervengewebe und eine wahrscheinliche Rolle bei dessen Differenzierung wurden schon früh in der Cadherin-Forschung beschrieben (Hatta und Takeichi, 1986).

Mittlerweile weiß man, dass über 40 verschiedene Cadherine im Hirngewebe exprimiert werden. Die meisten davon sind bereits genauer untersucht worden (Redies, 2000). Der größere Teil der Untersuchungen zielte auf die Cadherin-Expression von Neuronen ab, weniger auf die von Gliazellen.

Bei diesen Untersuchungen wurde entdeckt, dass für jedes Cadherin zu verschiedenen Zeiten der ZNS-Entwicklung ein gegen die anderen Cadherine abgegrenztes Expressionsmuster besteht. Die Grenzen von Neuromeren – Wülsten in der frühen Entwicklung des Neuralrohres mit erhöhter Mitoseaktivität (Zenker, 1994) – sind gleichzeitig die Grenzen der Expression eines bestimmten Cadherins (Inuzuka et al., 1991b; Matsunami und Takeichi, 1995). Nervenkerne und mit ihnen verbundene Nervenfasern weisen die Expression eines bestimmten Cadherins auf. Die Kerne werden erst durch die Cadherine von der umgebenden grauen Substanz abgegrenzt (Arndt und Redies, 1996). Auch eine Induktion des Auswachsens von Axonen durch R-Cadherin wurde gezeigt (Redies und Takeichi, 1993). Weiter gibt es Belege, dass N-Cadherin während der ZNS-Entwicklung eine Rolle bei der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke in auswachsenden Hirnkapillaren spielt (Gerhardt et al., 1999b; Liebner et al., 2000). Aber auch in der Entwicklung nicht neuronaler ZNS-Strukturen wird den Cadherinen eine wichtige Rolle zugewiesen (Redies et al., 1993).

All diese Ergebnisse führten zur Entwicklung der Vorstellung, dass die Cadherine einen Code zur Entstehung und Ausreifung von ZNS-Strukturen darstellen (Redies und Takeichi, 1996; Redies, 1997; Redies, 2000).

1.1.2. Cadherine im visuellen System

Wie im übrigen ZNS werden auch im visuellen System, bestehend aus Netzhaut, Sehnerv, Chiasma und Tectum, zahlreiche Cadherine exprimiert. Das Cadherin-typische räumlich abgegrenzte Expressionsmuster herrscht in diesen Arealen ebenfalls vor. Von einigen der häufigeren Cadherine wurden genaue Expressionsstudien durchgeführt, die meisten davon beim Hühnchen (Inuzuka et al., 1991b; Redies und Takeichi, 1993; Liu et al., 1997; Wöhrn et al., 1998; Wöhrn et al., 1999; Gerhardt et al., 2000), aber auch in anderen Spezies (Redies, 2000). Das im ganzen ZNS vorkommende N-Cadherin wird ebenfalls in der Retina und dem Sehnerv ubiquitär exprimiert (Redies und Takeichi, 1993). Beim Hühnchen wurde gezeigt, dass sich von Nervenzell-Subpopulationen, die ein bestimmtes Cadherin exprimieren, durcheinander gemischt auswachsende

Axone im Verlauf der Sehbahnen nach ihrer Cadherin-Expression separieren und dann, in Faszikeln geordnet, getrennt von den anderen Axonen ihren weiteren Weg nehmen (Wöhrn et al., 1999).

Im selben Labor, in dem diese Arbeit entstand, wurde beim Hühnchen entdeckt, dass am Sehnervenkopf, einer Schlüsselstelle für von der Retina in Richtung Gehirn auswachsende Axone, neben einer R-Cadherin exprimierenden Subpopulation, deren Untersuchung Gegenstand dieser Arbeit sein soll, eine B-Cadherin exprimierende Subpopulation von Gliazellen existiert, die an der Leitung des Axonwachstums aus der Netzhaut in den Sehnerven beteiligt ist (Gerhardt et al., 2000).

1.1.3. R-Cadherin im visuellen System

Bei der Suche nach weiteren Mitgliedern der Cadherin-Familie entdeckte man in der Netzhaut von Hühnchen ein bis dahin unbekanntes Cadherin. Es wurde dessen cDNA isoliert und sequenziert. Dieses neue mit der Aminosäuresequenz von N-Cadherin zu 74% homologe Cadherin wurde retinales Cadherin oder R-Cadherin genannt (Inuzuka et al., 1991a). In der Folge fand man R-Cadherin in weiteren verschiedenen Spezies. Interessanterweise ist die Bindungsspezifität im Verlauf der Evolution soweit erhalten geblieben, dass beispielsweise Hühnchen-R-Cadherin mit Maus-R-Cadherin eine Bindung eingehen kann (Redies, 2000).

Sein im Hühnchen von dem des N-Cadherin deutlich verschiedenes Expressionsmuster zeigt die stärkste Expression in der Retina – der Name ist also gerechtfertigt – und im Gehirn. Aber auch zahlreiche andere Gewebe, wie Muskel- und Knorpelgewebe exprimieren R-Cadherin, allerdings in wesentlich geringem Ausmaß (Inuzuka et al., 1991b). Es wurde nicht nur gezeigt, dass R-Cadherin mit N-Cadherin heterotypische Bindungen eingehen kann (s. 1.1) (Inuzuka et al., 1991a), sondern auch, dass R-Cadherin-transfizierte Neuroblastomzellen als Substrat zum Axonwachstum N-Cadherin-exprimierender retinaler Axone dienen können (Redies und Takeichi, 1993). Deshalb wird R-Cadherin, das in den Gliazellen des Sehnervs und dort vornehmlich in den äußeren begrenz-

den Gliazellen exprimiert wird, eine wichtige Rolle bei der Leitung der von der Netzhaut zum Tectum wachsenden N-Cadherin-exprimierenden Axone zugeschrieben (Redies und Takeichi, 1993).

Weiter wird R-Cadherin während der Entwicklung der Hühnchenretina stark im retinalen Pigmentepithel, in dessen Morphogenese ihm auch eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Liu et al., 1997), und in den vitrealen Fortsätzen der retinalen Müllerzellen exprimiert (Wöhrn et al., 1998), auf die später noch näher eingegangen wird.

Am Sehnervenkopf des Hühnchens existiert eine Subpopulation von R-Cadherin exprimierenden Gliazellen, die scharf abgegrenzt von der bereits oben erwähnten, für das Axonwachstum am Sehnervenkopf wichtigen, B-Cadherin exprimierenden Subpopulation ist (Gerhardt et al., 2000). Die genauere Untersuchung der R-Cadherin exprimierenden Gliazellen ist Gegenstand dieser Arbeit. Im weiteren Verlauf wird auf sie noch genauer eingegangen werden.

Auch in anderen Spezies erhielt man ähnliche Ergebnisse. So wurde beispielsweise in Zebrafischen ein Cadherin mit hoher Sequenzhomologie zu R-Cadherin isoliert. Es fand sich in Netzhaut und Gehirn ebenfalls ein Expressionsmuster von abgegrenzten Zellgruppen (Liu et al., 1999a). Im Zebrafisch ergab sich ein räumlicher und zeitlicher Zusammenhang zwischen R-Cadherin Expression und in Richtung Tectum auswachsenden Ganglienzell-Axonon. Auch hier wird deshalb dem R-Cadherin eine wichtige Rolle in der Leitung des Axon-Wachstums zugeschrieben (Liu et al., 1999b).

1.2. Gliazellen

Rudolf Virchow hat bereits Mitte des 19. Jahrhunderts den Begriff Neuroglia für die Zellen geprägt, die im zentralen Nervensystem den Raum zwischen den Nervenzellen füllen und diese von den Blutgefäßen trennen (Virchow, 1846). Er sprach von „Nerven kitt“ und hielt die Glia für eine Art Stützgewebe aus einer elektrisch nicht erregbaren Grundsubstanz im Nervensystem.

Nicht zuletzt durch verbesserte Färbemethoden wurde von Forschern wie Golgi, der als erster 1885 eine Silberfärbung verwendete, Cajal und Hortega, die in

den frühen Zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts eine spezifische Silberkarbonat-Färbung entdeckten, mit der vor allem Mikrogliazellen gut darstellbar sind, das morphologische Bild von Glia und Neuronen ständig verfeinert.

Die Einführung des Elektronenmikroskops bedeutete, wie in der gesamten Histologie, auch auf diesem Gebiet einen großen Fortschritt und lieferte weitere beträchtliche morphologische Daten.

Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts gelang es, auch Erkenntnisse über die funktionellen und pathologischen Aspekte der Glia zu gewinnen.

Heute weiß man, dass Gliazellen nicht nur am Zustandekommen der schon lange bei Schädigungen des Nervensystems bekannten Glianarben beteiligt sind, zu denen sie, im Gegensatz zu Neuronen, durch ihre zeitlebens erhaltene Fähigkeit zur Zellteilung befähigt sind, sondern dass sie auch für die Morphogenese und die Aufrechterhaltung des Ionenmilieus des Nervensystems mitverantwortlich sind. Dazu exprimieren Gliazellen eine Reihe spannungsabhängiger und transmitteraktivierter Ionenkanäle sowie vielfältige Rezeptoren und Transporter. Außerdem sind sie in der Lage, zahlreiche neuroaktive Substanzen zu synthetisieren (Somjen, 1988; Dierig, 1994; Kettenmann und Ransom, 1995).

Gliazellen sind weiter Ausgangspunkt zahlreicher bösartiger Tumore des Zentralnervensystems, der Gliome.

Die Hauptgliazellen des PNS sind die Schwann'schen Zellen, die die Myelinscheiden der peripheren Nerven bilden. Neben diesen werden beispielsweise auch die Teloglia der motorischen Endplatte und die Kapselzellen der peripheren Ganglien zu den Gliazellen des PNS gerechnet (Zenker, 1994).

Im ZNS werden Mikro- und Makrogliazellen unterschieden. Mikrogliazellen entstehen, im Gegensatz zu den Makrogliazellen, nicht im Neuroektoderm (Sarchy und Ripps, 2001), sondern wandern in späten Fetalphasen – wobei umstritten ist, ob eventuell auch lebenslang – aus dem Blutgefäßsystem ins ZNS-Gewebe ein. Hier differenzieren sie sich zu ZNS-spezifischen Makrophagen (Reichenbach, 1999). Mikrogliazellen können, wie die Makrophagen des Bindegewebes, an geschädigte Stellen wandern und zu Grunde gegangenes Material phagozytieren (Zenker, 1994).

Makrogliazellen entstehen wie die Nervenzellen aus den Stammzellen der Neuralanlage und imponieren während der Embryonalentwicklung zunächst als Radialgliazellen, die sich von einer Oberfläche des Nervengewebes zur anderen erstrecken. Reichenbach hat dazu das Modell eines "hypothetischen Glions", einer multipotenten Radialgliazelle entworfen, die alle Eigenschaften und Zellbestandteile enthält, die die verschiedenen Makroglia-Zelltypen später aufweisen, und aus der sich die verschiedenen Makrogliazelltypen entwickeln (Reichenbach, 1999).

Nach ihrer Differenzierung werden sie im adulten Zustand in drei Haupttypen unterschieden. Diese sind die Oligodendrozyten, die die Markscheiden im ZNS bilden, die Ependymzellen, die die inneren Liquorräume epithelartig auskleiden und so den Liquor vom unmittelbaren Hirngewebe trennen, und die sternförmigen Astrozyten, die mit ihren Fortsätzen zu den Kapillaren und den Neuronen und den dort gebildeten Membranen zur Blut-Hirn-Schranke beitragen (Reichenbach, 1999).

Die Blut-Hirn-Schranke dient dem Schutz der Neurone vor toxischen Bestandteilen des Blutes und plötzlichen Änderungen seiner Zusammensetzung und deren Auswirkung auf die Hirnfunktion. Sie wird im Endothel der Hirnkapillaren als Schranke zum unmittelbaren Hirngewebe hin ausgebildet. Die Arachnoidea und der Plexus choroidalis bilden die Blut-Liquor-Cerebrospinalis-Schranke aus (Wolburg et al., 1999).

Da die Glia-Differenzierung während der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle spielt, wurden Marker eingeführt, mit deren Hilfe sich der Stand der Differenzierung beobachten lässt. Ein Charakteristikum von Astrozyten im adulten Zustand ist ihre Expression von glialem fibrillärem saurem Protein (GFAP), einem Zytoskelettprotein, die häufig zu ihrer Identifikation herangezogen wird, während unreife Astrozyten nur Vimentin exprimieren (Stichel et al., 1991). Müllerzellen exprimieren Vimentin anstatt GFAP.

Die Glutaminsynthetase (GS) ist ein anderer Marker reifer Makrogliazellen (Mearow et al., 1989), den Astrozyten und Müllerzellen exprimieren. Eine ausführlichere Übersicht zeigt unten Tabelle 1.

Weitere Subtypen – teils für den jeweiligen Ort ihres Vorkommens hoch spezialisiert – sind beispielsweise Bergmann'sche Zellen oder gefiederte Zellen von Fananas im Kleinhirn (Zenker, 1994). Aber auch die Müllerzellen der Retina, die den Charakter der Radialgliazelle – das Erstrecken von einer Oberfläche zur anderen – bewahrt haben und allein Funktionen übernehmen, die in anderen Teilen des ZNS von mehreren kooperierenden Typen von Gliazellen wahrgenommen werden (Reichenbach, 1999), sowie die in dieser Arbeit untersuchten peripapillären Gliazellen der Netzhaut, sind zu diesen für den Ort ihres Vorkommens spezialisierten Makrogliazellen zu rechnen.

Tabelle 1: Übersicht über Glia-Marker (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Reichenbach und Prof. Wolburg, in Vorbereitung zur Veröffentlichung)

Abkürzungen: BLBP, brain lipid-binding protein; CA, carbonic anhydrase; CRALBP, cellular retinaldehyde-binding protein; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NOS, nitric oxide synthase (n neuronal, i inducible form); RAN-2, rat neural antigen-2

(+) schwache; +++ sehr starke Expression

Zelltyp	Antigen	Während d. Entwicklung	Adult	Reaktive Gliosis
Astroglia	GFAP	(+)	++	+++
	Vimentin	+++	-	++
	Nestin	++	-	++
	Cytokeratin F,A		++	
	Glutamin Synthetase		++	
	iNOS		+	+++
	RC1/2 (Antikörper)	++	-	
	RAN-2	+	++	
	BLBP*	++	-	
	S-100b	-	++	
	3CB2 ^C			

	R-Cadherin ^C	+	++	
Müller-Glia	GFAP ^F	-	-	+++
	Vimentin	+	++	+
	RAN-2		++	
	3CB2	++		
	nNOS/iNOS		+	+++
	CA		++	++
	S-100b		++	
	3CB2	++		
	B-Cadherin ^C	+	++	
	F11*	++	++	
	Glutamin Synthetase		++	
	CRALBP		++	
Bergmann-Glia	GFAP		++	
	Vimentin	++	+	
	Nestin	++		
	Glutamin Synthetase		++	
	S-100b		++	
Ependymoglia	GFAP	(+)	++	
	Vimentin		++	
	Cytokeratin		+++	
	RAN-2		++	
Zellen des retinalen Pig- mentepithels	Vimentin		++	
	CRALBP		+++	
	R-Cadherin ^C	++	-	
Pecten Glia (nur bei Vö- geln)	Vimentin	+	++	
	B-Cadherin	+	++	
	Glutamin Synthetase		++	
Epithel des plexus choroideus	Cytokeratin		++	
	GFAP		-	++
	Vimentin		++	
	Neurofilament*		++	

Tabelle 1 ist eine Liste von „Marker Antigenen“, die zur Visualisierung und/oder Identifikation der verschiedenen Typen astro- und ependymogliale Zellen während der ontogenetischen Entwicklung im normalen reifen ZNS und bei reaktiven pathologischen Veränderungen geeignet sind. Obwohl die Liste grundsätzlich die Situation in Säugetieren darstellt, können viele der Antigene auch in den jeweiligen Zelltypen anderer Vertebraten gefunden werden.

In Fällen, in denen ein Antigen nur in Nichtsäugetier-Zellen vorkommt, ist dies durch einen hochgestellten Buchstaben markiert: F, Fische; A, Amphibien; C, Hühnchen. Ein Stern (*) zeigt an, dass die gegen dieses Antigen gerichteten Antikörper nicht selektiv die Gliazellen, sondern auch Neurone markieren.

Antigene, die in den Cytoplasmamembranen exprimiert werden, wie Ionenkanäle, Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle, sind nicht aufgelistet, da deren Markierung normalerweise auf lichtmikroskopischem Niveau eine diffuse Markierung des Neuropil ergibt.

1.2.1. Makrogliazellen im visuellen System

Im Bereich des Sehnervs und der Netzhaut von Vertebraten sind in der Vergangenheit zwei Typen von Makrogliazellen gründlich untersucht und genauer beschrieben worden, die Müller'schen Zellen der Netzhaut und die bereits oben beschriebenen Astrozyten des Sehnervs (z.B. Chan-Ling, 1994).

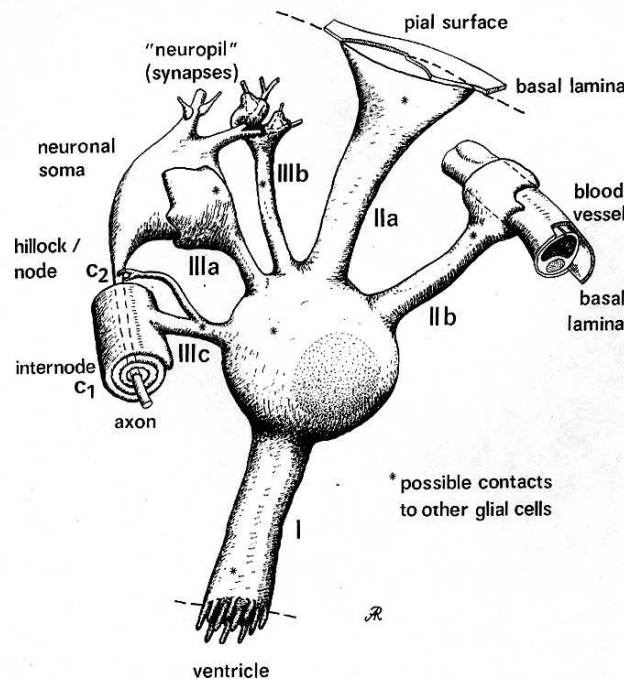
Die Müller'schen Zellen wurden bereits 1851 von Heinrich Müller als Radialfasern in den Netzhäuten verschiedener Vertebraten entdeckt (Müller, 1851). Müller'sche Zellen besitzen in den Retinae aller Vertebraten einen ähnlichen Grundbauplan.

Sie durchziehen als Radialgliazellen das gesamte Nervengewebe der Retina von der vitrealen Oberfläche bis zum subretinalen Spalt, also dem Ventrikelraum (Sarchy und Ripps, 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben Anhaltspunkte geliefert, dass Müllerzellen, wie die Radialgliazellen im Cortex beispielsweise auch, Leitstrukturen für die Zellmigration während der Netzhautentwicklung darstellen (Meller und Tetzlaff, 1976).

Sie sind in nicht vaskularisierten Retinae die einzigen Makrogliazellen (Sarthy und Ripps, 2001) und deshalb so ausgestattet, dass sie die meisten Leistungen erbringen können, die beispielsweise im Gehirn von Ependymo-, Oligodendro- und Astrozyten gemeinsam erbracht werden. Sie können sogar zu Grunde gegangenes Zellmaterial phagozytieren wie Mikrogliazellen (Muchnik Miller und Oberdorfer, 1981; Sarthy und Ripps, 2001).

Das Zell-Soma liegt in der inneren Körnerschicht. Von dort aus erstrecken sich die äußeren Fortsätze vom Typ I nach dem Modell des "hypothetischen Glions" von Reichenbach (s. auch 1.2) mit Mikrovilli zwischen die inneren Segmente der Photorezeptoren und zum Ventrikelspalt (Reichenbach, 1999).

Modell des "hypothetischen Glions" von Reichenbach:



Im Gehirn sind es die Ependymzellen, die mit ihren mit Mikrovilli besetzten Ausläufern – vergleichbar dem Typ I – den Kontakt zum Ventrikel herstellen.

Die inneren Fortsätze vom Typ IIa erstrecken sich zum Glaskörper hin, wo die Endfüße an der inneren Grenzmembran ansetzen und eine durchgehende Grenze ausbilden. In vaskularisierten Säugetiernetzhäuten bilden die Müllerzel-

len zusätzlich Fortsätze vom Typ IIb zu den Basallaminae der Blutgefäße aus. In beiden plexiformen Schichten umschneiden die Müllerzellen mit Fortsätzen vom Typ IIIb das Neuropil. Im Gehirn stellen Astrozyten – ähnlich den Typ II Fortsätzen – die Verbindung zu den Basallaminae flüssigkeitsgefüllter Räume her. Das Umscheiden von Nervenzellen und ihren Fortsätzen – wie die Typ III Fortsätze – wird im Gehirn hauptsächlich von Oligodendro- aber auch von Astrozyten übernommen (Reichenbach, 1999).

Als Gliamarker exprimieren reife Müllerzellen Vimentin, GS, nur im Falle reaktiver Gliosis auch GFAP (Reichenbach, 1999) und viele andere (Tabelle 1).

1.2.2. Makrogliazellen im visuellen System von Vögeln

Außer den Müller'schen Zellen und den Astrozyten, die in allen Vertebraten-Retinae und Sehnerven vorkommen, gibt es bei Vögeln durch die von anderen Vertebraten abweichende Anatomie der Netzhaut und des Sehnervenkopfes noch zusätzliche Typen von Makrogliazellen.

Im Gegensatz zu Säugetiernetzhäuten ist die Netzhaut bei Vögeln vollständig avaskulär. Die Versorgung der Retina wird außer von der Choroidea aus auch über den Glaskörper bewerkstelligt, dessen Glucose-Konzentration bei Vögeln wesentlich höher ist als bei anderen Vertebraten (Krebs, 1972). Die Glucose scheint aus dem Pecten Oculi, einem kammförmigen Gefäßkonvolut, das auf dem Sehnervenkopf steht und sich in den Glaskörper hinein ausdehnt (siehe Bild 4, Frontalschnitt E 10 und Bild 19, REM-Aufnahme Adultstadium), in den Glaskörper abgegeben zu werden. Zu diesem Zweck exprimieren die Endothelzellen des Pecten Oculi in hoher Dichte Glucose-Transportermoleküle (Wolburg et al., 1999).

Die pigmentierten Gliazellen des Pecten Oculi stellen einen eigenständigen Makroglialen Zelltyp dar (Gerhardt et al., 1999a). Diese Zellen bilden weder eine kontinuierliche epitheliale Schicht wie das retinale Pigmentepithel oder Ependymzellen noch haben sie ausgebreitete Ausläufer wie Astrozyten oder Müllerzellen. Ähnlich dem retinalen Pigmentepithel besitzen sie zahlreiche Pigmentgranula, so dass sie von den Zellen des retinalen Pigmentepithels am

Übergang zum Sehnervenkopf abzustammen scheinen, denen sie am ähnlichsten sind.

Von den makroglialen Markern exprimieren die pigmentierten Gliazellen des Pecten Oculi GS und Vimentin als Intermediärfilament, jedoch kein GFAP, den für Astrozyten typischen Marker. Wegen der GS-Expression könnten sie also durch NH₃-Entgiftung wichtig zur Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase sein (Gerhardt et al., 1999a).

Aufgrund der Tatsache, dass diese pigmentierten Gliazellen neben den Endothelzellen die einzige andere im Pecten Oculi vorkommende Zellart sind, von seltenen einzelnen Perizyten abgesehen, ist der Pecten Oculi als Modell-System für die neurovaskuläre Forschung ins Blickfeld gerückt (Gerhardt et al., 1996; Liebner et al., 1997; Wolburg et al., 1999). Da die Blutgefäße des Pecten Oculi Blut-Retina-Schranken-Eigenschaften besitzen, die den Blut-Hirn-Schranken-Eigenschaften im ZNS entsprechen, wird angenommen, dass die pigmentierten Gliazellen eine grundlegende Rolle bei der Induktion der endothelialen Blut-Retina-Schranke spielen müssen. Das Modell-System Pecten Oculi zeichnet sich dabei nicht nur durch diese relativ überschaubare Interaktion, sondern auch durch die einfache Verfügbarkeit und Zugänglichkeit von Vogelaugen aus.

1.2.3. R-Cadherin exprimierende peripapilläre Gliazellen

Als weiterer eigenständiger Typ makroglialer Zellen im visuellen System von Vögeln wurden die peripapillären Gliazellen (ppG) beschrieben (Schuck, 1998; Schuck et al., 2000).

Bei ihnen handelt es sich um Makrogliazellen, die palisadenartig am Übergang des Sehnerven in die Retina entlang der Pectenbasis um die Papilla Nervi Optici und am Abschluss des Ventrikelspaltes zum Sehnerven hin lokalisiert sind (Schema/Bild 20). Die ppG wurden früher zu den Astrozyten des Sehnerven gerechnet (Bhattacharjee, 1993). Es zeigte sich jedoch bei näherer Betrachtung, dass die ppG durch ihre Morphologie und ihre Antigen-Expression wie eine Übergangsform aus Astrozyten und Müllerzellen erscheinen, da sie sich

wie Müllerzellen radialgliaartig vom Ventrikelspalt zum Glaskörper erstrecken, aber andererseits wie Astrozyten GFAP exprimieren und an der Bildung der Glia limitans des Sehnerven beteiligt sind (Schuck et al., 2000). Bei der näheren Untersuchung der ppG wurde festgestellt, dass diese Zellen eine scharf abgegrenzte Zellpopulation darstellen, die während der Netzhautentwicklung R-Cadherin als Oberflächenantigen exprimieren und im weiteren Verlauf der Entwicklung alle GFAP-positiv werden.

Im Zuge dieser Untersuchungen entdeckte man weiter, dass die Gliazellen der Pectenbasis eine zweite Makrogliazell-Population darstellen, die, obwohl in enger räumlicher Beziehung lokalisiert, scharf gegen die ppG abgegrenzt sind. Sie exprimieren zur gleichen Zeit B-Cadherin, zu der die ppG R-Cadherin exprimieren, und sie werden im weiteren Verlauf der Entwicklung GS-positiv, wie die pigmentierten Gliazellen des Pecten Oculi und die Müllerzellen. Zwischen beiden Cadherin-exprimierenden Subpopulationen gibt es sowohl örtlich als auch dem Expressionsmuster nach nahezu keine Überschneidungen (Gerhardt et al. 2000).

Bereits in den Arbeiten von Schuck (Schuck, 1998; Schuck et al., 2000) wurde beschrieben, dass jenseits der durch die ppG vorgegebenen Grenzen, in der bei Vögeln avaskulären Retina, keine Blutgefäße gefunden werden konnten, sondern die Gefäße ausschließlich durch den zwischen den ppG's liegenden Korridor in den Pecten Oculi zogen. Es wurde die Frage aufgeworfen, ob diese Zellen die Barriere darstellen, die die Blutgefäße am Vaskularisieren der Netzhaut hindert. Die Entdeckung der scharf abgegrenzten Cadherin Expression warf ferner die Frage auf, ob diese Zellpopulationen auch an der Steuerung des Axon-Wachstums mitbeteiligt sind, wie dies bei anderen Cadherin-exprimierenden Zellen im ZNS der Fall ist.

1.3. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle der R-Cadherin-exprimierenden peripapillären Gliazellen während der frühen Netzhautentwicklung zu untersuchen.

Zu klären ist dabei im Besonderen, ob sie für in den Pecten Oculi einwachsende Gefäße eine Barriere bilden, die die Avaskularität der Netzhaut bedingt. Zudem soll untersucht werden, ob sie an der Steuerung des Axonwachstums im Bereich des Sehnervenkopfes beteiligt sind.

Eine geeignete Methode, diese Fragen zu klären, dürfte dazu die Entfernung, also die Lyse, der zu untersuchenden Zellen sein, um so durch die Abweichungen der sich entwickelnden Netzhäute vom Normalzustand auf die Rolle der betreffenden Zellen schließen zu können. Zur Erreichung dieses Ziels, wird die Methode der gleichzeitigen Injektion von anti-R-Cadherin-Antikörpern mit prä-adsorbiertem Komplement angewandt. Bei dieser Methode werden zuerst die unspezifischen Komplementfaktoren, einer Reihe von Blutserumproteinen, an Agarose adsorbiert, um sie von den spezifischen Faktoren zu trennen. Die spezifischen Komplementfaktoren können an bereits an Zellen gebundene Antikörper binden und dann über eine Perforation der Zellmembran die Lyse der Zellen hervorrufen. Die Durchführung dieser Experimente an eierschalenlos kultivierten Hühnerembryonen soll es ermöglichen, die weitere Entwicklung der Retina ohne die lysierten Zellen zu beobachten.

Die Auswirkungen werden sowohl mit Lichtmikroskopie von Semi-Dünnschnitten und mit Transmissions-Elektronenmikroskopie als auch mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie beobachtet.

Zusätzlich zur Beobachtung der Auswirkungen der Experimente auf die R-Cadherin-exprimierenden peripapillären Gliazellen, ob sie tatsächlich lysiert werden und ob sich dies auf die Netzhautentwicklung auswirkt, werden die Effekte auf andere R-Cadherin-exprimierende Zelltypen beobachtet, wie beispielsweise die Müllerzellen.

2. Material und Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden Hühnerembryonen eierschalenlos kultiviert, durch Injektion von Antikörpern und präabsorbiertem Komplement in die Augen R-Cadherin-exprimierende Zellen lysiert und die Auswirkungen auf die Netzhautentwicklung mittels Immunfluoreszenz-, Licht- und Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht.

2.1. Kultivierung der Embryos

Für die Injektionsexperimente wurden Hühnchen des Stammes White Leghorn, bezogen von der Firma Anton Weiss, Kirchberg, verwendet.

Die Eier wurden für drei Tage im Brutschrank (Ehret GmbH, Emmendingen) bei 37 °C und 60% Luftfeuchte bebrütet.

An Embryonaltag 3 (E 3), Stadium 20 (HHS 20) nach Hamburger und Hamilton (1951), wurden die Eier geöffnet und die Embryonen in 20 x 100 mm große Petrischalen (Greiner, Frickenhausen) überführt, wie bei Auerbach et al. (1974) sowie Thanos und Bonhoeffer (1983) beschrieben.

Diese wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 100% Luftfeuchte weiter bebrütet.

2.2. Injektionsexperimente

An E6 (HHS 28) wurden den Embryonen unter dem Binokular (Motic, Wetzlar) mit gezogenen Glaskapillaren (WPI, Berlin) 2 µl der jeweiligen im Folgenden genannten Lösungen durch die Pars plana Corporis ciliaris in die Augen injiziert. An E7 (HHS 29) wurden weitere 3 µl der jeweiligen Lösungen injiziert.

2.2.1. Lyse-Experimente

Zu den Lyse-Experimenten wurden monoklonale Maus-anti-Hühnchen-R-Cadherin Antikörper, 1:200 verdünnt (Klon RCD-2, funktionell nicht blockierend, freundlicherweise bereitgestellt von Prof. M. Takeichi, Kyoto, Japan), zusammen mit präabsorbiertem Kaninchen-Komplement (Calbiochem-Novabiochem

GmbH, Bad Soden) in die oben liegenden Augen der Embryos injiziert. Welches das injizierte Auge war, wurde dokumentiert.

Die Antikörper wurden gegen Hank's buffered salt solution (HBSS) diafiltriert (10 mM HEPES, Sigma, Deisenhofen; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1 mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂, pH 7,4).

Um die unspezifischen Komplementfaktoren zu binden, wurde 1 ml Komplement mit 100 mg Agarose (Merck, Darmstadt) 1 Stunde auf Eis inkubiert.

Nach der Zentrifugation (1 min, 5000 U/min, 4 °C) wurde der Überstand zur Herstellung der Injektionslösung verwendet.

Die gemessene Protein-Konzentration in der Injektionslösung für Antikörper und Komplement war 13 µg/µl.

Insgesamt wurden die Augen von 12 Tieren an E9 (HHS 34), von 10 Tieren an E10 (HHS 35) und von 6 Tieren an E11 (HHS 36) der mit RCD-2/Komplement Lösung injizierten Tiere für die Elektronenmikroskopie fixiert. Zusätzlich wurden die Köpfe von jeweils 3 Tieren an E9 (HHS 34) und E10 (HHS 35) für die Immunfluoreszenz fixiert.

2.2.2. Kontrollen

Als Kontrollen wurden HBSS alleine, HBSS mit Komplement (5 µg/µl) oder HBSS mit Komplement (5 µg/µl) und unspezifischen Immunglobulinen der Klasse G (IgG) (Pierce, Rockford, Illinois USA; 2 µg/µl) injiziert.

Insgesamt wurden die Augen von 3 mit HBSS injizierten Tieren an E10 (HHS 35) und von 3 mit HBSS/Komplement/unspezifischen IgGs injizierten Tieren an E10 (HHS 35) sowie von den mit HBSS/Komplement injizierten Tieren von 3 Tieren an E9 (HHS 34), von 6 Tieren an E10 (HHS 35) und von 3 Tieren an E11 (HHS 36) für die Elektronenmikroskopie fixiert. Zusätzlich wurden von jeweils 3 HBSS/Komplement injizierten Tieren an E9 (HHS 34) und E10 (HHS 35) die Köpfe für die Immunfluoreszenz fixiert. Die Augen von jeweils 2 nicht injizierten Tieren wurden zum Vergleich an E9 (HHS 34), E10 (HHS 35) und E11 (HHS 36) für die Elektronenmikroskopie fixiert.

2.3. Immunfluoreszenz

2.3.1. Präparation

An E9 (HHS 34) oder E10 (HHS 35) wurden die Embryonen durch Kühlung anästhesiert, dann dekapitiert. Hornhaut, Linse und Teile der Lider wurden zügig entfernt, um den Zugang des Fixans zu Netzhaut und Sehnerv zu erleichtern.

2.3.2. Fixierung und Einbettung

Die Köpfe wurden in 4% Paraformaldehyd in Hank's modified salt solution (HMSS) (0,1 M Hepes (Sigma, Deisenhofen); 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Glucose, 1 mM CaCl₂, und 1 mM MgCl₂), pH 8,2, 2 Stunden auf Eis fixiert. Danach wurden sie für jeweils 1 Stunde in 12%, 15% und 18%ige Sucrose-Lösungen (Merck, Darmstadt) in HMSS auf Eis überführt, in Tissue Tek® (Miles, Elkhart, Indiana, USA) eingebettet und im Dampf von flüssigem Stickstoff in selbst angefertigten Aluminiumförmchen tiefgefroren. Auf ihnen war die Seite des injizierten Auges markiert.

2.3.3. Schneiden

Nach dem Wegtrimmen überschüssigen Tissue Tek's® wurden Kryoschnitte von 8-12 µm Dicke mit einem Reichert-Jung Frigocut 2800 E Kryotom (Reichert, Wien) angefertigt und auf Poly-L-Lysin (Sigma, Deisenhofen) beschichtete Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen.

2.3.4. Markierung

Die Schnitte wurden in 4% Paraformaldehyd (PFA) in HMSS auf Eis nachfixiert und in TBS-Puffer (50 mM Tris (ICN, Eschwege), 140 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,6) gewaschen.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mit 5% Magermilch, 0,3% Triton X-100 (Serva, Heidelberg) und 0,04% NaN₃ in TBS inkubiert. Mit der selben Lösung wurden die Primärantikörper verdünnt und für 12 Stunden bei 4 °C mit den Schnitten inkubiert.

Es wurden folgende Antikörper zur Immunfluoreszenz-Markierung eingesetzt:

Maus anti-Hühnchen-R-Cadherin 1:200 (RCD-2, s.o.);

Maus anti-B-Cadherin 1:500 (Klon 6D5, Geschenk von P. Hausen, Tübingen);

Kaninchen anti-GFAP, 1:500 (Dako, Hamburg);

Kaninchen anti-Fibronektin, 1:500 (Dako, Hamburg);

Maus anti-Neurofilament 200 kDa, 1:1000 (Cymbus Biotechnology LTD, Hants, UK).

Danach wurden die Schnitte mehrmals in TBS gewaschen und schließlich mit den geeigneten Sekundärantikörpern (Dianova, Hamburg), nach Gebrauchsanleitung verdünnt, 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert.

Als Kontrollen wurden die Primärantikörper weggelassen und nur mit Sekundärantikörpern inkubiert.

Nach nochmaligem mehrfachem Waschen und einmaligem Nachfixieren mit 4%igem PFA wurden die Schnitte mit 10% TBS in Glycerol eingedeckt.

2.3.5. Mikroskopieren und Dokumentation

Die Schnitte wurden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Oberkochen) mikroskopiert und digital gespeichert. Weiterbearbeitet wurden die Bilder mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe, Mountain View, CA, USA).

2.4. Licht- und konventionelle Transmissions-Elektronenmikroskopie

2.4.1. Präparation und Fixierung

An E9 (HHS 34) sowie E10 (HHS 35) und E11 (HHS 36) wurden die Embryonen durch Kühlung anästhesiert, dann dekapitiert. Nach zügigem Herauspräparieren der Augen wurden Hornhaut und Linse entfernt, um den Zugang des Fixans zur Retina zu erleichtern. Die Augen wurden dann, injiziertes und nicht injiziertes getrennt, 2 Stunden auf Eis in 2,5% Glutaraldehyd in HMSS bei pH 8,2 fixiert, da bei diesem pH-Wert die Strukturhaltung des embryonalen Gewebes optimal war. Die Augen wurden danach in 0,1 M Cacodylat-Puffer

(Merck, Darmstadt) bei 4 °C gewaschen und gelagert.

2.4.2. Präparation und Einbettung

Zur weiteren Präparation für die Elektronenmikroskopie wurden die Augen in 0,1 M Cacodylat-Puffer vollständig eröffnet, der Bereich des Pecten Oculi mit anhängender Netzhaut herauspräpariert und in 4 gleich große Stücke geteilt. Zusätzlich wurden Stücke aus den periphereren Anteilen der Retina herauspräpariert und gesondert bis zur Einbettung in Epoxidharz gelagert.

Die Gewebestückchen wurden anschließend in 1% OsO₄ in 0,1 M Cacodylat-Puffer 2 Stunden nachfixiert und in Cacodylat-Puffer gewaschen. Zur Entwässerung wurden sie dann in 50% Ethanol (Merck, Darmstadt) und darauf zur gleichzeitigen Kontrastierung für 12 Stunden bei 4 °C in 70%ige Ethanol gesättigte Uranylacetat (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) Lösung überführt.

Es folgte die weitere Entwässerung in 80% und 96% Ethanol sowie zweimal Ethanol absolut. Darauf wurden die Gewebe zur Einbettung in Propylenoxid (Merck, Darmstadt), in ein Gemisch aus Propylenoxid und Araldit (Serva, Heidelberg) 1:1, in Propylenoxid und Araldit 1:3 und schließlich in reines Araldit eingebracht. Dabei wurden die Gewebestücke in den Einbettformen so ausgerichtet, dass nach der Polymerisation Frontalschnitte durch Pecten Oculi und Retina möglich waren. Das Araldit polymerisierte dann in 2 Tagen im Wärmeschrank bei 60 °C aus.

2.4.3. Schneiden und Dokumentation von Semidünnschnitten

Zur Herstellung von Semidünnschnitten wurde zunächst überflüssiges Araldit mit einer Rasierklinge (Gillette, Berlin) scharf am Gewebe entlang weggetrimmt, so dass sich eine trapezförmige Schnittfläche ergab. An einem Om U3 Ultramikrotom (Reichert, Wien) und einem Leica Ultracut R Ultramikrotom (Leica, Bensheim) wurden mit Glasmessern Semidünnschnitte von 200 - 400 nm angefertigt. Diese wurden mit einer in der Flamme zur Glaskugel geschmolzenen Pasteurpipettenspitze auf unbeschichtete Objektträger (Langenbrinck, Emmen-

dingen) übertragen, auf einer Wärmeplatte (H22 Electronic, Gerhardt, Bonn) getrocknet und mit Richardson-and-Sons-Blue-Lösung angefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckt.

Lichtmikroskopische Bilder im Bereich von 10- bis 40-facher Vergrößerung wurden an einem Zeiss Axiophot Photomikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Fuji T64 Kunstlichtfilm aufgenommen und mit Hilfe eines CanoScan 2700F (Canon) digitalisiert. Weiterbearbeitet wurden die Bilder mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe, Mountain View, CA, USA).

2.4.4. Schneiden und Dokumentation von Ultradünnschnitten

Nach einer weiteren Feintrimmung wurden mit Diamantmessern (Diatome, Zürich; Drukker, Cuijk, Niederlande) an einem Reichert Om U3 Ultramikrotom (Reichert, Wien) 40 - 60nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt und auf mit Formvar (Merck, Darmstadt) befilmte Kupfer-Schlitzgrids (VECO GmbH, Solingen) aufgezogen. Anschließend wurden sie mit Bleicitrat (Merck, Darmstadt) in einer mit NaOH getrockneten Kammer 5 Minuten nachkontrastiert.

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Zeiss EM 10 und einem EM 902 (LEO, Oberkochen) mikroskopiert und auf Agfa Brovira-Speed Negativen fotografiert. Zur Auswertung wurden die Negative mit 2,5-facher Vergrößerung auf Tetanal Speed Photopapier abgezogen und mit Hilfe eines CanoScan 2700F (Canon) digitalisiert. Weiterbearbeitet wurden die Bilder mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe, Mountain View, CA, USA).

3. Ergebnisse

Untersucht wurden die Auswirkungen der Lyse R-Cadherin-exprimierender peripapillärer Gliazellen, hervorgerufen durch gleichzeitige Injektion von Anti-R-Cadherin-Antikörpern und präabsorbiertem Komplement in den Glaskörper, auf die frühe Netzhautentwicklung eierschalenlos kultivierter Hühnerembryonen.

3.1. Wirkung auf die R-Cadherin exprimierende peripapilläre Glia

3.1.1. Experiment

Die Überlebensrate der Embryonen wurde durch die Injektionen gegenüber nicht injizierten Tieren nicht beeinflusst.

Die injizierten Antikörper erreichten die zentrale Retina und konnten dort mit Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Bild 1). Es zeigte sich das gleiche Verteilungsmuster, das für R-Cadherin-exprimierende ppG am Sehnervenkopf bereits für Markierung am Kryoschnitt beschrieben war (Schuck 1998; Gerhardt et al., 2000) und das auch in den R-Cadherin-Expressionsstudien von Redies und Takeichi (Redies und Takeichi, 1993) zu sehen ist.

Bei den RCD-2-antikörper/komplement-injizierten Augen war die Kontinuität am Ventrikelspalt am Übergang von der äußeren Grenzmembran zum retinalen Pigmentepithel als Zeichen der Zell-Lyse unterbrochen, so dass der Ventrikelspalt an dieser Stelle zum Sehnervenkopf eröffnet war. Bei den meisten Tieren war bereits lichtmikroskopisch (Bild 2), regelmäßig aber elektronenmikroskopisch (Bild 3) erkennbar, dass nun Axone direkten Kontakt zum subretinalen Raum ohne dazwischenliegende Gliazellen hatten.

3.1.2. Kontrollen

Auch in den Kontrollen wurde die Überlebensrate der Embryonen durch die Injektionen gegenüber nicht injizierten Tieren nicht beeinflusst.

Die gliale Kontinuität zwischen äußerer Grenzmembran und retinalem Pigmentepithel war in keinem einzigen Fall aufgehoben (Bild 4) und es bestand kein Unterschied in der Morphologie des Abschlusses des Ventrikelspalts zwischen

kontrollinjizierten und nicht injizierten Augen. Die Kontroll-Augen zeigten auch sonst keine Fehlbildungen gegenüber den nicht injizierten.

3.2. Wirkung auf die Vaskularisation

In keinem der Experiment-Augen, wie in keinem der Kontroll-Augen, wurden Blutgefäße oder an Blutgefäße erinnernde Strukturen in der Netzhaut gefunden. Nach der Lyse der R-Cadherin exprimierenden peripapillären Gliazellen zogen Blutgefäße im Nervengewebe weiterhin lediglich durch den Sehnervenkopf in den Pecten Oculi. Jenseits der von den ppG gebildeten Grenze fand auch nach den Lyse-Experimenten keine Vaskularisation der Retina statt.

3.3. Wirkung auf das Axonwachstum

3.3.1. Experiment

3.3.1.1. Embryonaltag 9 (HHS 34)

An E9 (HHS 34) fielen im elektronenmikroskopischen Bild bei einzelnen Tieren bereits axonartig aussehende Strukturen im subretinalen Spalt zwischen Netzhaut und Pigmentepithel des injizierten Auges auf (Bild 5). In diesen Augen waren regelmäßig an Stellen, an denen sich die nervenfaserartigen Strukturen im Ventrikelspalt befanden, Auffaltungen der Netzhaut zu finden, die an Flexner-Wintersteiner'sche Rosetten erinnern (Bild 6).

3.3.1.2. Embryonaltag 10 (HHS 35)

In allen RCD-2-Antikörper/Komplement-injizierten Augen fanden sich bereits im lichtmikroskopischen Bild axonale Strukturen, die den Ventrikelspalt zwischen Netzhaut und Pigmentepithel ausfüllten. Auf einigen Schnitten fanden sich Stellen, an denen diese Fasern von Axonen des Sehnervenkopfes auszugehen schienen (Bild 7). Diese aberrierenden Fasern waren, sofern vorhanden, stets unter der zentralen Retina am Sehnervenkopf nachweisbar. In vielen Fällen waren sie außerdem auch unter der peripheren Retina zu verfolgen (Bild 8), teilweise bis zur Ora serrata.

Im elektronenmikroskopischen Bild glichen diese Fasern den Axonen im Sehnervenkopf. Sie schienen lediglich im Vergleich weniger Filamente und Mikrotubuli zu enthalten (Bild 9). Auch hier fanden sich die an Flexner-Wintersteiner'sche Rosetten erinnernden Auffaltungen.

Bei 2 Augen waren im Ventrikelspalt nur einzelne aberrante Axone zu finden. Der Ventrikelspalt war deshalb noch weitestgehend erhalten. Eine große Anzahl von Axonen fand sich jedoch in den Interzellularräumen des retinalen Pigmentepithels (Bild 10), wo sich die Axone bis in die Netzhautperipherie ausbreiteten. Das gesamte Pigmentepithel schien netzartig von Axonen durchsetzt.

Schließlich wurde eine Immunfluoreszenz-Markierung gegen Neurofilament durchgeführt, um sicherzustellen, dass die nervenfaserartigen Strukturen wirklich fehlgeleitete Axone waren. Zur leichteren Orientierung wurde gegen Fibronectin gegengefärbt. Es zeigte sich ein Einbruch von retinalen Axonen vom Sehnervenkopf aus in den Ventrikelspalt und deren Fortsetzung in Selbigem (Bild 11).

3.3.2. Kontrollen

Bei allen nicht injizierten Augen war der Ventrikelspalt bis dicht an den Sehnervenkopf durch die Zellausläufer von retinalem Pigmentepithel, Müller'schen Zellen, ppG, Stäbchen- und Zapfen-Vorläufern vollständig geschlossen und es befanden sich keine anderen Strukturen in ihm (Bild 12).

Bei nahezu allen kontrollinjizierten Augen fand sich das selbe Bild. Lediglich bei einem HBSS injizierten Auge fanden sich unter der peripheren Retina, nahe der Ora serrata, einige wenige im elektronenmikroskopischen Bild wie Axone aussehende Strukturen. Am Sehnervenkopf war jedoch auch in diesem Auge die Kontinuität zwischen äußerer Grenzmembran und retinalem Pigmentepithel vollständig erhalten. Der Ventrikelspalt war geschlossen und enthielt in den zentralen Anteilen keinerlei ungewöhnliche Strukturen. In der Diskussion (4.2.2) wird auf diesen Befund noch genauer eingegangen.

Bei allen mit Immunfluoreszenz gegen Neurofilament untersuchten Kontrolltieren fand sich keine Markierung subretinal.

Tabelle 2: Übersicht über die Zahlen der Injektionsexperimente und die Ergebnisse:

E10 (HHS 35) Tiere (für Elektronenmikroskopie präpariert)	Gesamtzahl der Tiere	Zell-Lyse, elektronenmikroskopisch sichtbar	Axone im Ventrikelspalt, elektronenmikroskopisch sichtbar
experiment-injiziert	10	10	10
HBSS-injiziert	3	0	1*
HBSS/komplement-injiziert	6	0	0
HBSS/kompl./un-spez. IgG-injiziert	3	0	0
nicht injiziert	2	0	0

*siehe auch Diskussion

3.4. Wirkung auf die Müller'schen Zellen

3.4.1. Experiment

3.4.1.1. Embryonaltag 9 (HHS 34)

Im Gegensatz zu den peripapillären Gliazellen wurden die Müller'schen Gliazellen, die vor allem in den Ausläufern zum Glaskörper hin, Fortsätzen vom Typ IIa nach Reichenbach (Reichenbach, 1999; siehe auch Abbildung des Modells in 1.2.1), R-Cadherin exprimieren (Wöhrn et al., 1998), nicht vollständig, sondern nur partiell lysiert. An E9 (HHS 34) fanden sich bei allen RCD-2-Antikörperinjizierten Tieren, allerdings in unterschiedlich starker Ausprägung, an den Stellen in der Nervenfaserschicht, an denen sich normalerweise die Typ-IIa-Fortsätze der Müllerzellen befinden, von der inneren plexiformen Schicht bis zur inneren Grenzmembran durchgehende Lücken (Bild 13).

Die Lücken waren bereits im lichtmikroskopischen Bild zu sehen. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigte sich die innere Grenzmembran durchgehend

erhalten. An ihr angelegt waren, durch das elektronendichtere Zytoplasma erkennbar, übrig gebliebene Müllerzell-Endfüße (Bild 14). Zwischen den Axonen in der Nervenfaserschicht befand sich optisch leerer Raum an den Stellen, an denen sich sonst die Typ-IIa-Fortsätze befinden. In Folgeschnitten hatte dieser Raum die Form von Typ-IIa-Fortsätzen, war jedoch frei von Zellbestandteilen. Die Müllerzell-Somata waren in ihrer ursprünglichen Form erhalten. Gelegentlich fanden sich von ihnen ausgehend noch Reste von Typ-IIa-Fortsätzen (Bild 15). Die Müllerzell-Fortsätze vom Typ I nach Reichenbach, die sich zu den Photorezeptoren und zum subretinalen Spalt erstrecken, waren von den Lyse-Experimenten nicht beeinflusst.

Um zu überprüfen, ob es sich eventuell auch um beispielsweise Präparations- oder Einbettungsartefakte der für die Elektronenmikroskopie aufbereiteten Gewebe handelte, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenz-Markierung durchgeführt.

Die GFAP-Markierung, die in diesem frühen Stadium der Entwicklung als Marker nahezu alle Strukturen des Nervengewebes in dieser Region anfärbt (Schuck, 1998), auch Müllerzellen (Mey und Thanos, 2000), mit Fibronektin-Gegenfärbung als Bindegewebsdarstellung, erbrachte jedoch ein gleichartiges Bild (Bild16).

Auch hier fanden sich von der inneren plexiformen Schicht bis zur inneren Grenzmembran durchgehende Lücken in Form von Typ-IIa-Fortsätzen bei durchgehend erhaltener innerer Grenzmembran. Im Bereich der Müllerzell-Somata und der Fortsätze vom Typ I nach Reichenbach, die sich zu den Photorezeptoren und zum subretinalen Spalt erstrecken, schien die Retinastruktur normal erhalten.

3.4.1.2. Embryonaltage 10 (HHS 35) und 11 (HHS 36)

Bei den an E10 (HHS 35) fixierten Tieren, mit Axonen im Ventrikelspalt, fanden sich ausnahmslos Müllerzellen, die sich mit ihren Ausläufern vom Ventrikelspalt durch alle Schichten bis zur inneren Grenzmembran erstreckten. Die Typ-IIa-Fortsätze waren durchgehend durch die ganze Nervenfaserschicht beobachtbar

und in ihrer Morphologie nicht von denen der Kontrolltiere zu unterscheiden (siehe Bild 7).

Auch im weiteren Verlauf, bei an E11 (HHS 36) fixierten Tieren, unterschieden sich die Typ-IIa-Fortsätze der Müller'schen Zellen nicht vom Normalzustand (Bild 17).

Die an E9 (HHS 34) lysierten Typ-IIa-Fortsätze schienen also bereits an E10 (HHS 35) vollständig regeneriert und entwickelten sich in der Folge normal weiter.

3.4.2. Kontrollen

Bei den kontrollinjizierten Augen waren weder an E9 (HHS 34), noch an E10 (HHS 35) oder E11 (HHS 36) Auffälligkeiten an den Typ-IIa oder anderen Fortsätzen der Müller'schen Zellen zu sehen. Sie unterschieden sich auch in keiner Weise von den nicht injizierten Augen. In keinem Fall waren in den Semi- oder Ultradünnschnitten den Lücken in den Experimenten vergleichbare Strukturen zu finden (Bild 18).

Auch im konfokalen Laserscan-Mikroskop waren im Immunfluoreszenzbild, mit GFAP-Markierung und anti-Fibronektin als Gegenfärbung, bei kontrollinjizierten Tieren keine Lücken an den Stellen der Typ-IIa-Müllerzellfortsätze zu finden. Die Morphologie der Müllerzellen der kontrollinjizierten Augen glich der der nicht injizierten.

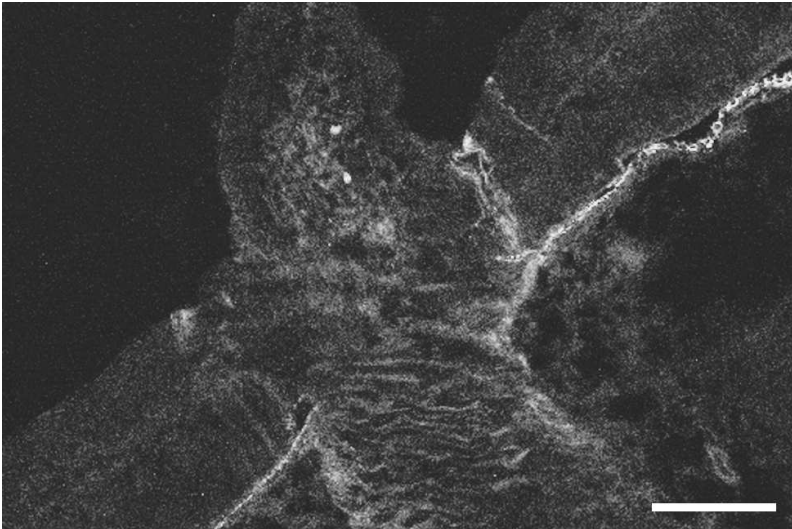


Bild 1: Nachweis der beim Experiment injizierten Antikörper mittels Immunfluoreszenz durch Markierung mit Sekundärantikörpern an E 10 (HHS 35). Es ist die selbe Markierung zu sehen, die aus der Literatur für R-Cadherin bekannt ist: Pigmentepithel und Glia limitans des Sehnerven, peripapilläre Glia und vitreale Fortsätze der Müllerzellen sind markiert. Durch die bereits abgelaufene Lyse ist die Markierung bei den beiden letztgenannten schwächer.

Maßstab entspricht 100 µm.

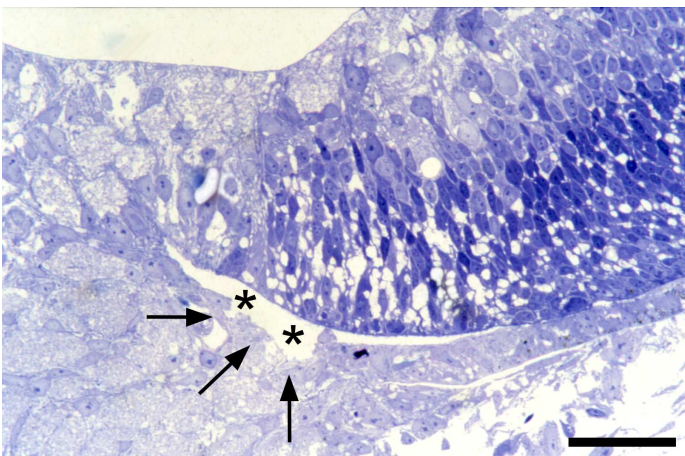


Bild 2: Papillenregion mit eröffnetem subretinalen Raum (markiert durch *) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia (markiert durch Pfeile) E 10 (HHS 35). Es befinden sich keine Gliazellen zwischen Axonen und Ventrikel.

Semidünnschnitt gefärbt mit Richardson's Blue; **Maßstab entspricht 25 µm.**

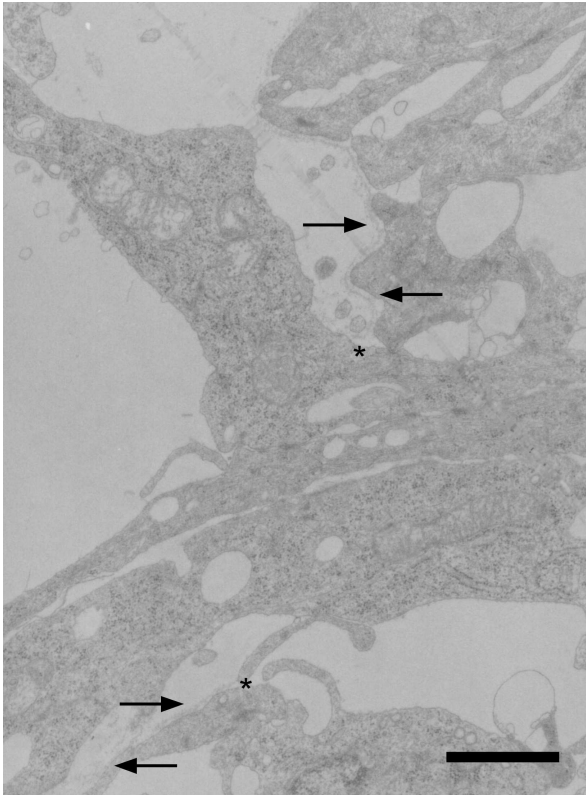


Bild 3: Eröffneter subretinaler Raum nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia. Defekt (Endpunkte markiert durch *) der Bruch'schen Membran (markiert durch Pfeile) mit einer in den subretinalen Raum vorgeschobenen Zelle.

Elektronenmikroskopische Aufnahme; **Maßstab entspricht 1 µm.**

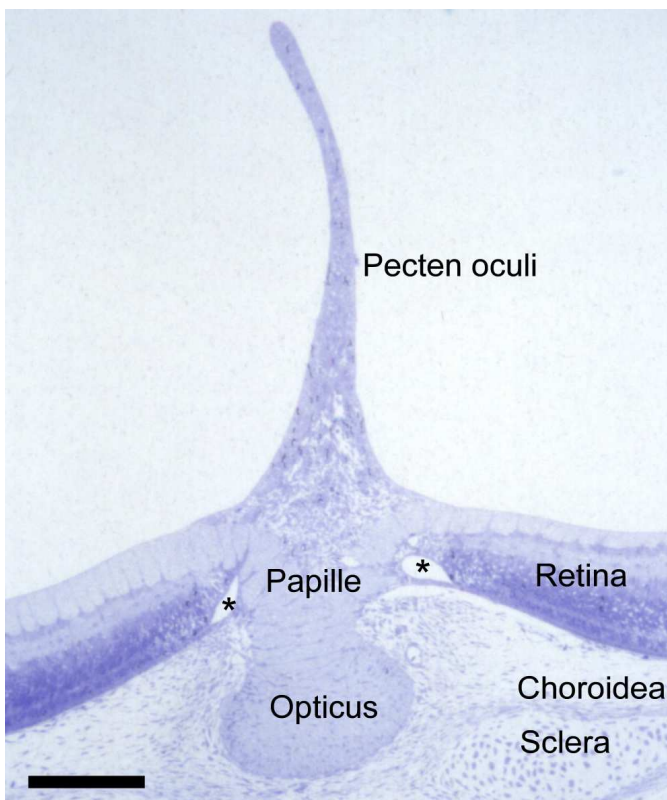


Bild 4: Intakte Papillenregion und subretinaler Raum mit durchgehender Gliogrenze (markiert durch *) bei einem kontrollinjizierten Tier an E 10 (HHS 35) mit dem Pecten Oculi, einem Gefäßkonvolut, das auf der Papilla Nervi Optici steht und sich in den Glaskörper erhebt.

Semidünnschnitt gefärbt mit Richardson's Blue; **Maßstab entspricht 100 µm.**

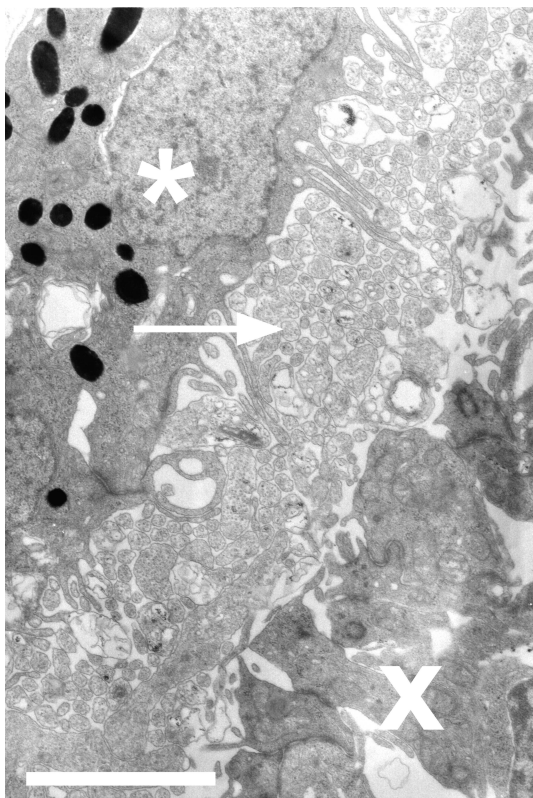


Bild 5: Axone im subretinalen Spalt (markiert durch den Pfeil) zwischen Pigmentepithel (markiert durch *) und Retina (markiert durch x) an E9 (HHS 34) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia.

Elektronenmikroskopische Aufnahme;
Maßstab entspricht 5 µm.

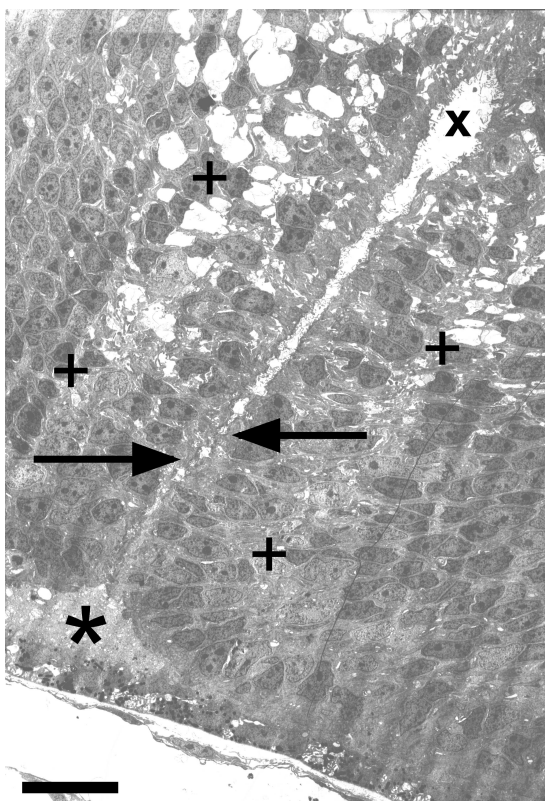


Bild 6: Rosettenbildung der Netzhaut (markiert durch x), mit adherens junctions (markiert durch Pfeile) an E9 (HHS 34) bei in den subretinalen Spalt eingebrochenen Axonen (markiert durch *), nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia.

Stäbchen- und Zapfenvorläufer markiert durch +.

Elektronenmikroskopische Aufnahme;
Maßstab entspricht 10 µm.

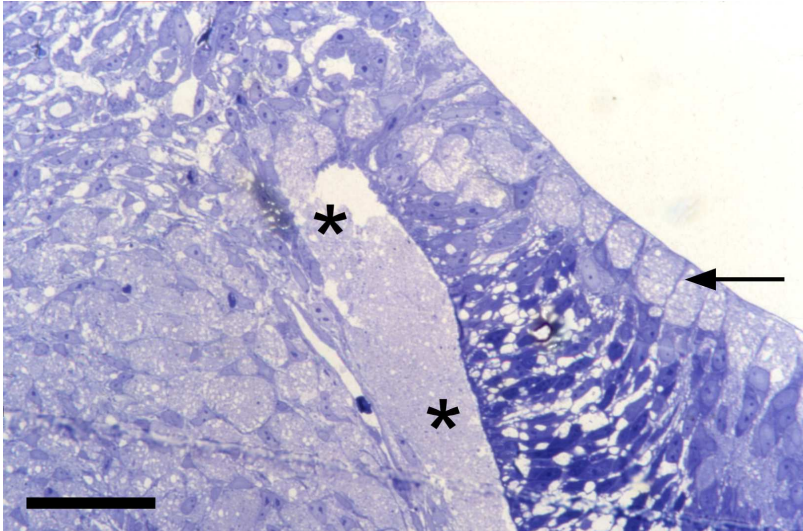


Bild 7: Einbruch von Axonen (markiert durch *) vom Sehnervenkopf aus in den subretinalen Spalt an E10 (HHS 35) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia.

Zu beachten sind auch die intakten, regenerierten, bis zur inneren limitierenden Membran durchgehenden vitrealen Fortsätze der Müllerzellen (markiert durch Pfeil).

Semidünnschnitt gefärbt mit Richardson´s Blue; **Maßstab entspricht 25 µm.**

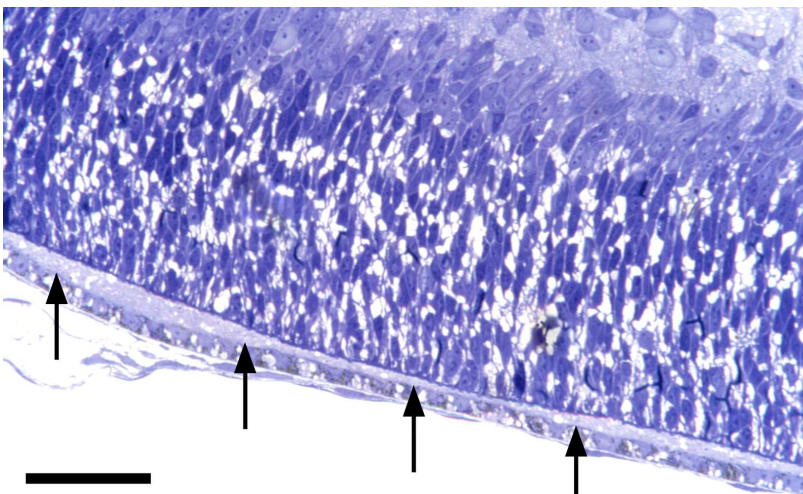


Bild 8: Axone im Ventrikelspalt (markiert durch Pfeile) zwischen Pigmentepithel und der peripheren Retina an E10 (HHS 35) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia.

Semidünnschnitt gefärbt mit Richardson´s Blue; **Maßstab entspricht 25 µm.**

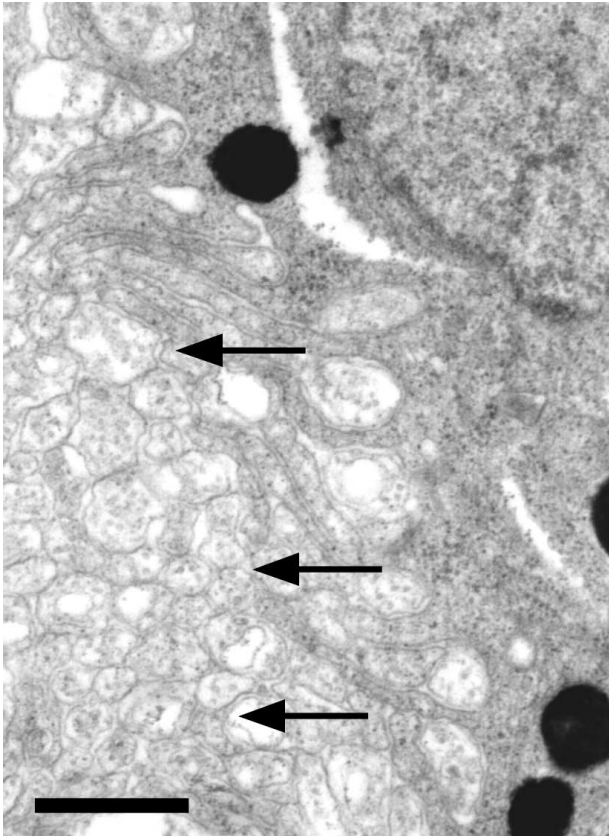


Bild 9: Detailansicht der Axone (links der Pfeile) im Ventrikelspalt an E10 (HHS 35) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia. Sie enthalten weniger Mikrotubuli als normale Axone. Oben und rechts Pigmentgranula des Pigmentepithels.

Elektronenmikroskopische Aufnahme;

Maßstab entspricht 0,5 μm .

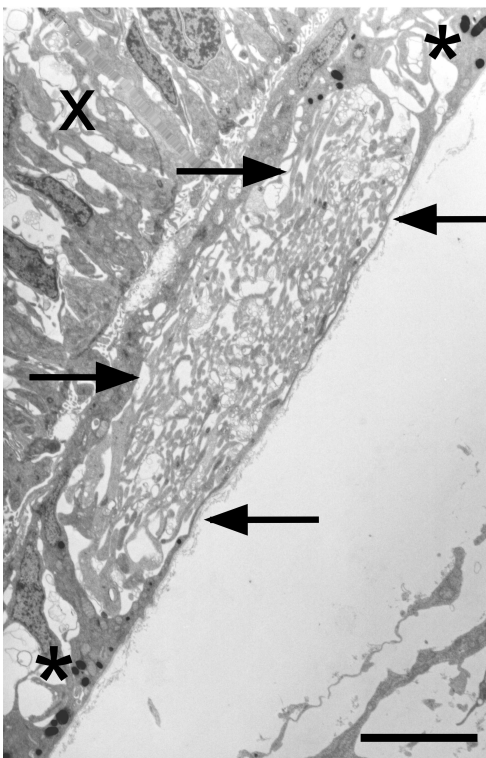


Bild 10: Axone (eingegrenzt durch Pfeile), die sich an E10 (HHS 35) in den Interzellularräumen des retinalen Pigmentepithels (* in Pigmentepithelzellen) ausbreiten, nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia (x markiert Retina). Elektronenmikroskopische Aufnahme;

Maßstab entspricht 5 μm .

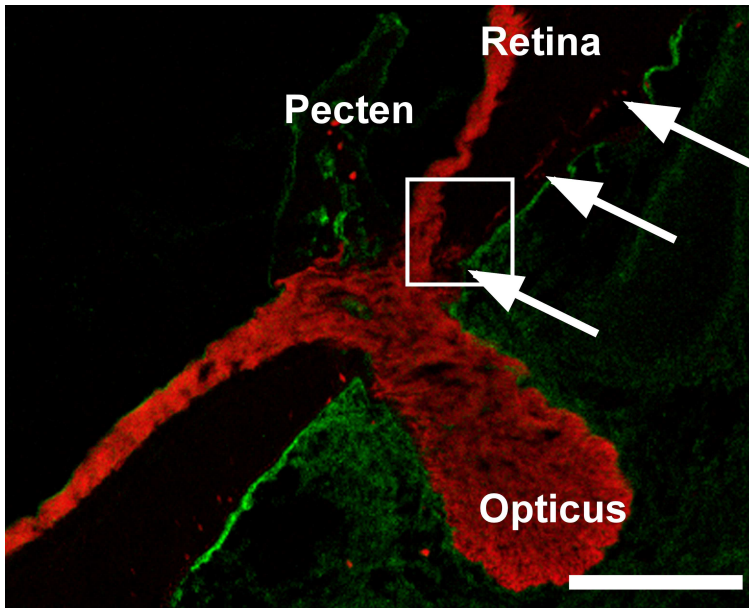
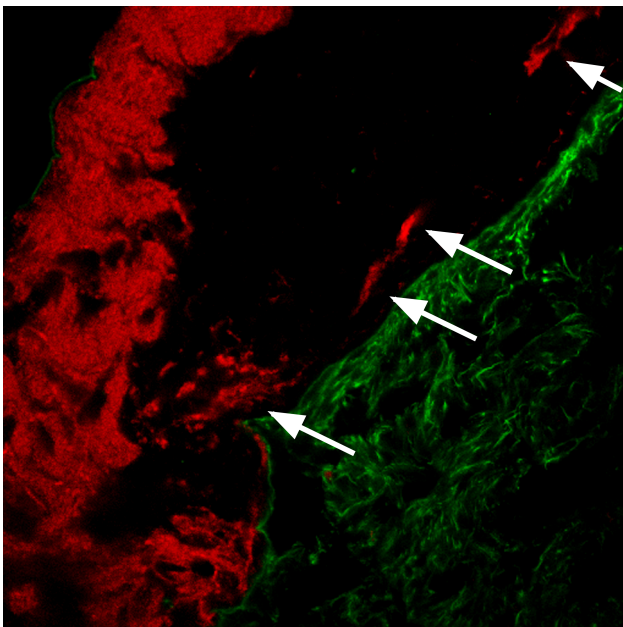


Bild 11: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Axonen (markiert durch Pfeile), die sich nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia unter der Netzhaut an E 10 (HHS 35) ausbreiten, mittels Markierung von Neurofilament (rot), Gegenfärbung zur Bindegewebsdarstellung gegen Fibronectin (Grün). **Maßstab entspricht 250 μm .**



Ausschnittsvergrößerung des eingezeichneten Quadrats der fehlgeleiteten Axone (markiert durch Pfeile).

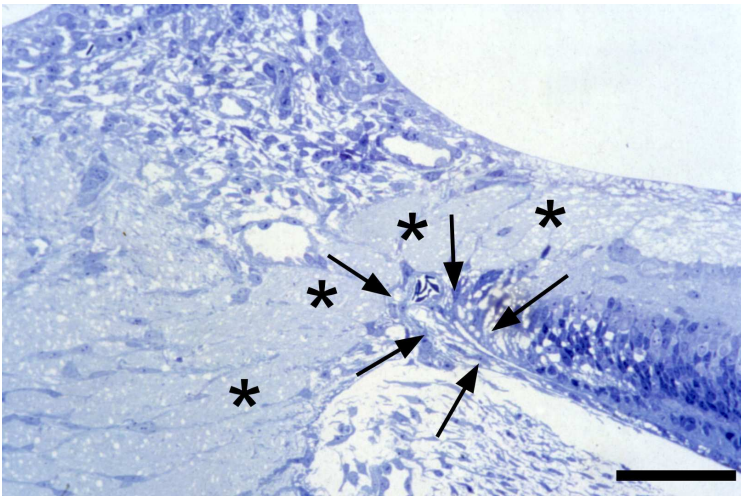


Bild 12: Normalzustand eines subretinalen Spalts bei einem nicht injizierten Tier an E 10 (HHS 35): Der Ventrikelspalt ist geschlossen bis zum Sehnervenkopf, es befinden sich keine Axone in ihm und die peripapilläre Glia ist intakt (umrandet durch Pfeile), die Ganglienzell-Axone ziehen aus der Netzhaut in den Sehnerven (markiert durch *).

Semidünnschnitt gefärbt mit Richardson's Blue; **Maßstab entspricht 50 µm.**

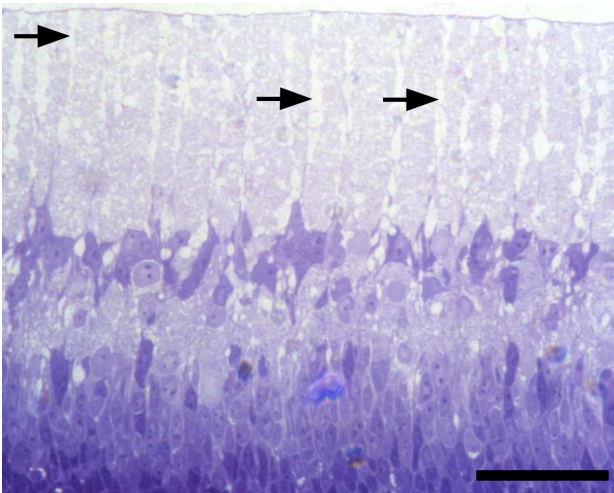


Bild 13: Lücken an den Stellen der lysierten vitrealen Fortsätze der Müllerzellen in der Nervenfaserschicht (angezeigt durch Pfeile) an E9 (HHS 34), durchgehend vom intakten Zell-Soma bis zur erhaltenen inneren limitierenden Membran, nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia.

Semidünnschnitt gefärbt mit Richardson's Blue; **Maßstab entspricht 25 µm.**

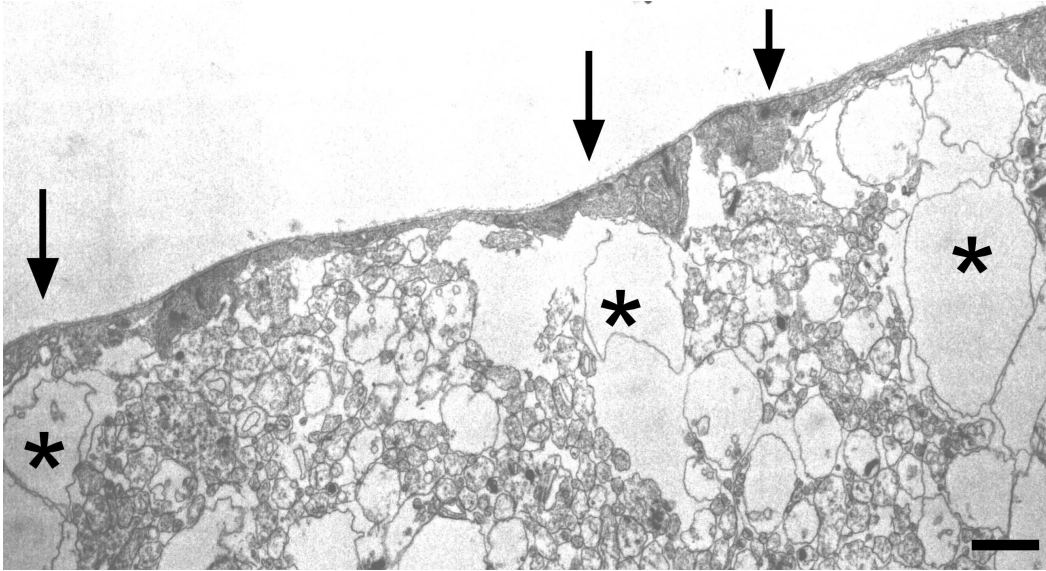


Bild 14: Erhaltene Müllerzell-Endfüße an der intakten inneren limitierenden Membran (markiert durch Pfeile) bei lysierten vitrealen Fortsätzen der Müllerzellen (markiert durch *) an E9 (HHS 34) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia.

Elektronenmikroskopische Aufnahme; **Maßstab entspricht 1 µm.**

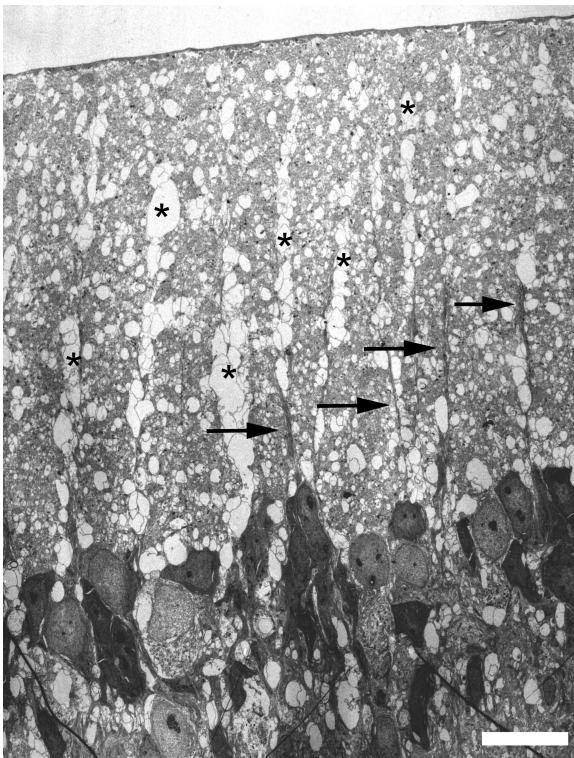


Bild 15: Lücken an den Stellen der lysierten vitrealen Fortsätze der Müllerzellen in der Nervenfaserschicht (markiert durch *) an E9 (HHS 34) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia. Vom intakten Zell-Soma aus sind noch Reste der vitrealen Fortsätze zu sehen (markiert durch Pfeile). Die innere limitierende Membran ist erhalten.

Elektronenmikroskopische Aufnahme; **Maßstab entspricht 10 µm.**

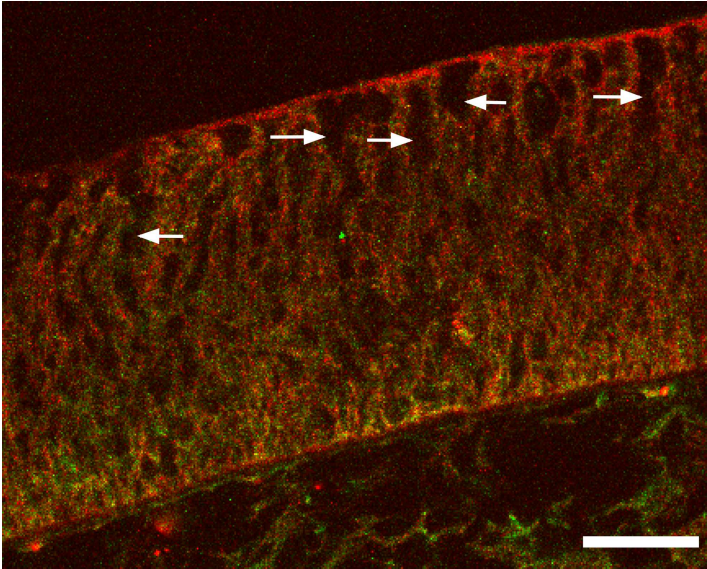


Bild 16: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Lücken an den Stellen der vitrealen Fortsätze der Müllerzellen in der Nervenfaserschicht (markiert durch Pfeile) an E9 (HHS 34), nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia, mittels GFAP-Markierung (rot) zur Darstellung der Müllerzellen, Gegenfärbung zur Bindegewebsdarstellung gegen Fibronektin (grün). **Maßstab entspricht 50 μm .**

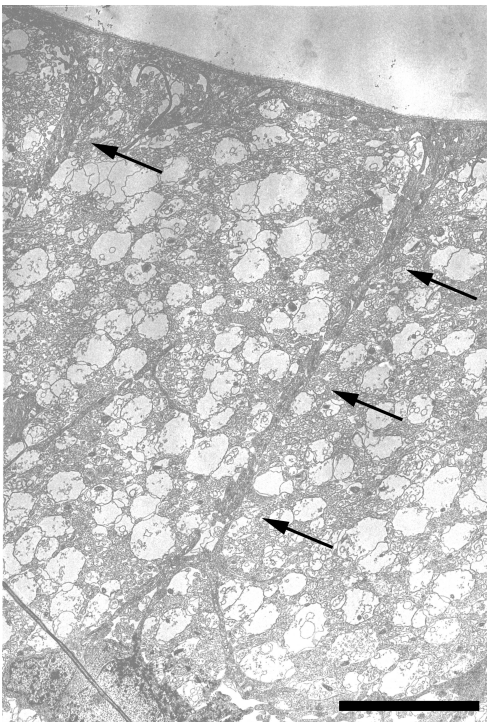


Bild 17: Regenerierte, intakte, bis zur inneren limitierenden Membran durchgehende vitreale Fortsätze der Müllerzellen (Verlauf gezeigt durch Pfeile) an E11 (HHS 36) nach experimenteller Lyse der peripapillären Glia. Elektronenmikroskopische Aufnahme; **Maßstab entspricht 5 μm .**

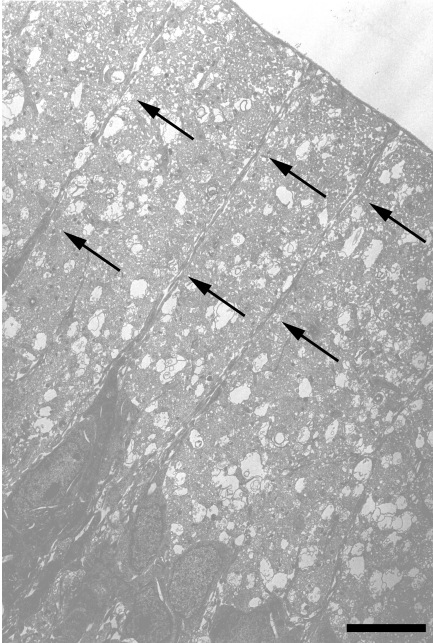


Bild 18: Intakte Müllerzellen bei einem kontrollinjizierten Tier an E9 (HHS 34). Die vitrealen Fortsätze erstrecken sich ununterbrochen vom Zell-Soma bis zur inneren limitierenden Membran (Verlauf gezeigt durch Pfeile). Elektronenmikroskopische Aufnahme; **Maßstab entspricht 5 µm.**

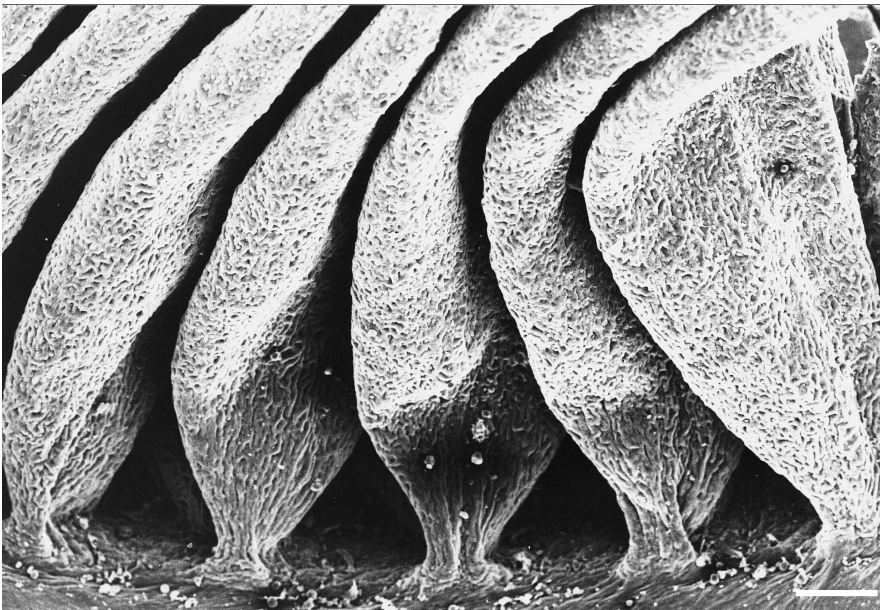
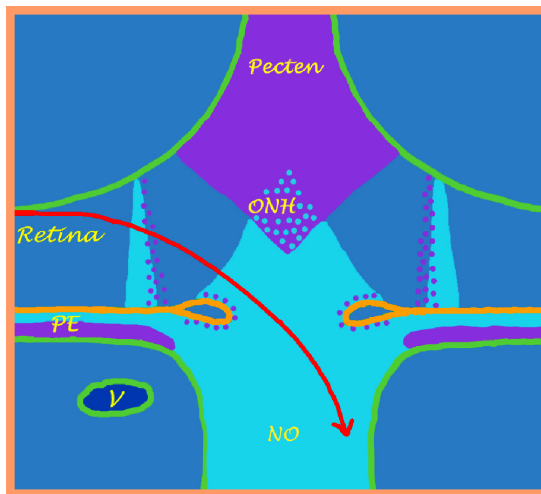


Bild19: Pecten Oculi eines adulten Hühnchens: mehrere kammartig nebeneinander auf der Papille stehende Gefäßkonvolute. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme; Maßstab entspricht 100 µm. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. H. Wolburg, Pathologisches Institut Tübingen.

Schema und Bild 20:

Schema der Papillenregion. Oben der Pecten Oculi, unten der Nervus Opticus (NO), in der Mitte der Sehnervenkopf (ONH), links und rechts die Retina mit Pigmentepithel (PE). Blutgefäß zur Versorgung des Pecten oculi (V).

Der rote Pfeil stellt den Weg dar, den die Ganglienzell-Axone in den Sehnerven nehmen.

Die R-Cadherin-exprimierende peripapilläre Glia befindet sich an den Stellen, die mit lila Punkten markiert sind. Sie stellt einen Teil eines Glia-Gerüsts dar, das zum korrekten Einwachsen der Ganglienzell-Axone in den Sehnerven notwendig ist. Ist sie durch die Lyse-Experimente gestört, ist der orange umrandete Ventrikelspalt eröffnet und Axone dringen in ihn ein.

Die türkisen Punkte stellen die im Text beschriebenen B-Cadherin-exprimierenden Gliazellen dar.

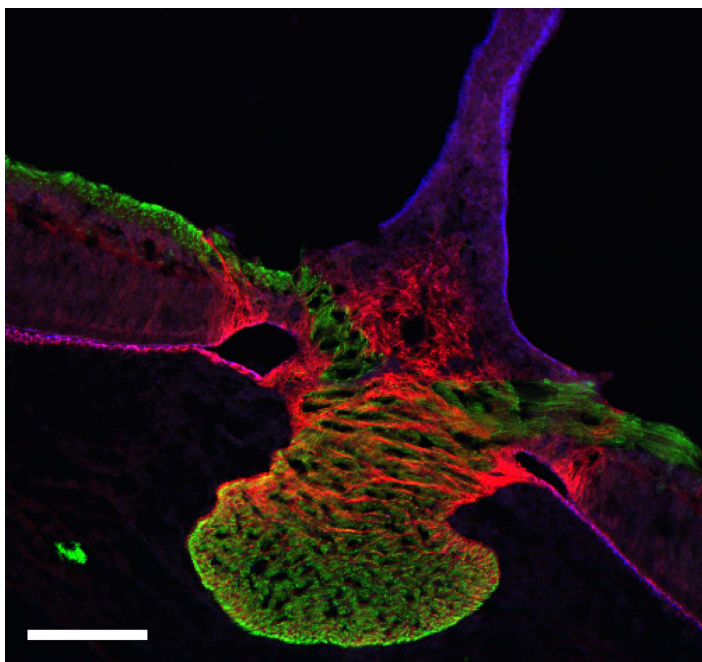


Bild 20 zeigt das selbe im Immunfluoreszenzmikroskopischen Bild (E 10):

R-Cadherin (rot),
B-Cadherin (blau) und
Neurofilament (grün).

**Maßstab entspricht
100 µm.**

4. Diskussion

Diskutiert werden die Methode der Komplement-vermittelten Zell-Lyse R-Cadherin-exprimierender Gliazellen und ihre Auswirkungen auf die frühe Netzhautentwicklung bei Hühnerembryonen, speziell auf die peripapillären Gliazellen, das Axonwachstum, die Vaskularisation und die Müller'schen Zellen.

4.1. Methodik

Die schon lange Zeit angewandte Methode der eierschalenlosen Kultivierung von Hühnerembryonen (Auerbach et al., 1974; Thanos und Bonhoeffer, 1983) eignete sich durch die gute Zugänglichkeit der Augen hervorragend für die Durchführung der Experimente an E6 (HHS 28) und E7 (HHS 29) sowie die Untersuchung der Netzhäute von E9 (HHS 34) bis E11 (HHS 36). Der größte Teil der Embryonen überlebte die Überführung aus dem Ei in die Petrischale und die Durchführung der Injektionen unbeschadet, wobei es keinen Unterschied in der Überlebensrate zwischen Experimenten und Kontrollen gab. Es traten keine makroskopisch sichtbaren Fehlbildungen bei den Embryonen auf und sie unterschieden sich, abgesehen von einer leichten Entwicklungsverzögerung, wohl durch die kurzzeitige Abkühlung der Eier beim Öffnen hervorgerufen, nicht von der Klassifikation im Ei herangewachsener Embryonen (Hamburger und Hamilton, 1951), so dass sie mit dem in vivo Zustand gleichgesetzt werden können. Probleme treten bei dieser Art der Kultivierung erst in späteren Stadien auf, denn bis zum Schlupf überleben die Tiere bei dieser Methode nie.

Die bei der Durchführung der Experimente verwendeten, gegen Hühnchen-R-Cadherin gerichteten, monoklonalen Maus-Antikörper (Klon RCD-2), die freundlicherweise von Herrn Prof. M. Takeichi, Kyoto, Japan, zur Verfügung gestellt wurden, fanden ebenfalls schon lange Zeit Verwendung, wobei mehrfach ihre Spezifität für R-Cadherin gezeigt wurde (Redies et al., 1992; Arndt und Redies, 1996; Schuck, 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit ergab sich kein gegenteiliger Anhaltspunkt.

Die anderen verwendeten Antikörper waren kommerziell hergestellt und vom

Hersteller auf ihre Spezifität getestet.

Die Methode der gleichzeitigen intraokularen Injektion von anti-R-Cadherin-Antikörpern und präabsorbiertem Komplement schien hochspezifisch auf die zu untersuchenden Zellen zu wirken und war so zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit geeignet. Nach den intraokularen Injektionen an E6 (HHS 28) und E7 (HHS 29) waren bei den an E 10 (HHS 35) fixierten Tieren die injizierten Antikörper mittels Immunfluoreszenz in dem selben Muster nachweisbar (Bild 1), wie es für R-Cadherin bei Markierung am Kryo-Schnitt bereits beschrieben war (Redies und Takeichi, 1993; Schuck 1998; Wöhrn et al., 1998; Gerhardt et al., 2000), in der ppG, dem retinalen Pigmentepithel, den vitrealen Fortsätzen der Müllerzellen und der Glia limitans des Sehnervenkopfes. Die injizierten Antikörper erreichten also die vorgesehenen Zielzellen und die Komplementvermittelte Lyse war zuverlässig wirksam, was bei allen Tieren beobachtet werden konnte (Bild 2, Bild 3, Tabelle 2).

Bei allen Kontrollen waren dagegen keine lysierten Zellen sichtbar (Bild 4).

Die Methoden waren also geeignet und ausreichend spezifisch, aussagekräftige Ergebnisse im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit zu erzielen.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Experimente

Durch die RCD-2-Antikörper/Komplement-Injektionen waren in diesen Augen die ppG lysiert, so dass die Kontinuität am Ventrikelspalt am Übergang von der äußeren Grenzmembran zum retinalen Pigmentepithel als Zeichen der Zell-Lyse unterbrochen und der Ventrikelspalt an dieser Stelle zum Sehnervenkopf eröffnet war. Dies konnte man bei den meisten Tieren bereits lichtmikroskopisch erkennen (Bild 2), regelmäßig aber elektronenmikroskopisch (Bild 3). Da in den Kontroll-Augen nichts auch nur annähernd Vergleichbares gefunden werden konnte (Bild 4), kann zum Einen davon ausgegangen werden, dass dieses Phänomen von den durchgeführten Versuchen herrührte, zum Anderen, dass die Komplement-Lyse wirklich die angestrebte ppG entfernte und so zur Beantwortung der Fragestellung der Arbeit geeignet war.

4.2.1.1. Vaskularisation

Schon längere Zeit war bekannt, dass Blutgefäße des ZNS mindestens zwei verschiedene Cadherine exprimieren (Gerhardt et al., 1996; Redies, 2000) und die Cadherine bei der Angiogenese und Morphogenese der Blutgefäße des ZNS eine wichtige Rolle spielen (Gerhardt et al., 1999b; Liebner et al., 2000; Redies, 2000).

In der Literatur war aufgrund der Tatsache, dass jenseits der von der R-Cadherin-exprimierenden ppG gebildeten Grenze die Netzhaut im Hühnchen avaskulär ist, die These aufgestellt worden, dass die ppG eine Barriere für auswachsende Gefäße darstellen könnten (Schuck, 1998; Schuck et al., 2000).

Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

Obwohl die Lyse der R-Cadherin-exprimierenden ppG während der Zeit der Einsprossung von Gefäßen durch den Sehnervenkopf in den Pecten Oculi nachweislich (s.o.) erfolgreich war (Bilder 2+3) und sogar auch die Müller'schen Zellen miterfasste (s.o.), konnte weder licht- noch elektronenmikroskopisch eine Kapillare in der Retina gefunden werden, bei unauffälliger Vaskularisation des Pecten Oculi.

Es kann daraus geschlossen werden, dass die ppG wohl keinen inhibitorischen Einfluss auf die Angiogenese und die Vaskularisation der Netzhaut ausüben, da es auch in ihrer Abwesenheit zu keiner Einsprossung von Gefäßen in die Retina kommt.

4.2.1.2. Axonwachstum

Die Verbindung zwischen den photosensorischen Zellen der Netzhaut und den Sehzentren im Gehirn wird durch die retinalen Ganglienzellen hergestellt, die ab E 2,5 die ersten postmitotischen Zellen in der Hühnchenretina sind und dann mit beginnendem Axonwachstum die Verbindung ins Gehirn knüpfen (Halfter et al., 2001; Thanos und Mey, 2001). Die Axone wachsen in der frühen Embryonalentwicklung zentripetal in Richtung der Papilla Nervi Optici und weiter durch den präformierten Sehnerven ins Gehirn (Thanos und Mey, 2001).

Bisher wurden schon viele verschiedene Faktoren identifiziert und diskutiert, die auswachsenden Nervenfasern den Weg zu den Zellen weisen, mit denen sie ihre Synapsen ausbilden. Es handelt sich um verschiedene Mechanismen, die zur Entwicklung der Gewebearchitektur beitragen, wie beispielsweise die spezielle örtliche Zelldifferenzierung, die Differenzierung der anatomischen Regionen, die miteinander verbunden sein sollen, in zeitlich korrespondierenden Mustern, die abgestufte Expression asymmetrischer Gene und Transskriptionsfaktoren (Thanos und Mey, 2001). Die Existenz und mögliche Rolle chemotaktischer und repulsiver Faktoren ausgehend vom Sehnervenkopf werden diskutiert (Stuermer und Bastmeyer, 2000). Ein weiterer Mechanismus der Lenkung retinofugal wachsender Axone ist die Leitung der Wachstumskegel durch die glialen Endfüße vor allem der Radialgliazellen, von denen die vitrealen Endfüße das Axon-Wachstum fördern, während die äußeren Endfüße repulsiv wirken (Stier und Schlosshauer, 1995).

Auch eine Rolle von Extrazellulär-Matrix-Bestandteilen wird angenommen (Thanos und Mey, 2001). Hierbei wird die Bedeutung verschiedenster Substanzen diskutiert, wobei einige auch bereits eingehender untersucht wurden, wie beispielsweise Laminin, Fibronectin, Neurofascin, Heparan-Sulfat-Proteoglycan (Shiga und Oppenheim, 1991), N-CAM (Honig und Rutishauser, 1996; Honig et al., 1998), Agrin und vor allem Ephrine (Stuermer und Bastmeyer, 2000; Thanos und Mey, 2001). Eine wichtige unabdingbare Rolle bei der Axon-Leitung wurde für die Basalmembranen des ZNS beschrieben (Halfter, 1998; Halfter und Schurer, 1998). Durch die enzymatische Lyse von Basalmembranen im ZNS wird neben anderen Effekten eine Störung der Axon-Leitung am Sehnervenkopf, der Faszikulierung und Ordnung der Axone in der Netzhaut hervorgerufen (Halfter et al., 2001).

Aber auch Cadherinen, vor allem N- (Honig et al., 1998; Stuermer und Bastmeyer, 2000) und R-Cadherin (Bixby, 1992; Mey und Thanos, 1992), wird eine Rolle bei der Axon-Leitung im Hühnchen zugeschrieben. Im Zebrafisch beispielsweise scheint die Rolle von R-Cadherin bei der Axon-Leitung nachgewiesen (Liu et al., 1999b). Untersuchungen, wie sich verschieden stark adhäsiv-

ve Moleküle wie N-Cadherin und Laminin auf das Axonwachstum auswirken, führten zu dem Ergebnis, dass verschiedene starke Adhäsivität keinen Einfluss auf das Ausmaß des Axonwachstums hat (Lemmon et al. 1992). Im Vergleich von Wildtyp- und Albino-Ratten wurde gezeigt, dass Pigmentierung, wie sie beispielsweise im retinalen Pigmentepithel vorkommt, einen inhibitorischen Einfluss auf das Axonwachstum hat (Silver und Sapiro, 1981).

In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Antikörper-Komplement vermittelte Lyse R-Cadherin-exprimierender peripapillärer Gliazellen eine Störung der Axonleitung am Übergang von der Netzhaut in den Sehnerven, also genau in dem Bereich, in dem sich die ppG befindet. Nach der Lyse der ppG an E6 (HHS 28) und E7 (HHS 29) waren vereinzelt bereits an E9 (HHS 34) Axone im subretinalen Spalt zu finden (Bild 5). An E10 (HHS 35) konnten in allen Augen, an denen die Experimente durchgeführt worden waren, Axone im subretinalen Spalt gefunden werden, die sich vom Sehnervenkopf aus unter großen Teilen der Netzhaut (Bild 7+8) und teilweise auch im Interzellularraum des retinalen Pigmentepithels ausbreiteten (Bild 10). Der Ursprung der Axone konnte mit den angewandten Methoden nicht gefunden werden.

Die Ergebnisse in den Kontrollen untermauern die Erklärung, dass die aberranten Axone aufgrund der Lyse der ppG aufgetreten sind und dass die ppG einen Teil eines Glia-Gerüsts darstellen, das zum korrekten Auswachsen von Netzhaut-Axonon in den Sehnerven notwendig ist. Sie halten Axone vom Einwachsen in den Ventrikelraum ab, eventuell ähnlich den repulsiv wirkenden äußeren Endfüßen der Müllerzellen, die von Stier und Schlosshauer (1995) beschrieben wurden. Den anderen Teil dieses Gerüsts, der die Axone vom Einwachsen in die Pectenbasis abhält, stellen die B-Cadherin-exprimierenden Gliazellen in der Pectenbasis dar (Gerhardt et al. 2000; siehe auch Schema/Bild 20). Durch welche Oberflächenantigene oder welche anderen Eigenschaften der Zellen diese Wirkung zustande kommt, bleibt zu klären.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern und Methoden lässt sich lediglich aussagen, dass die R-Cadherin-exprimierende ppG notwendig für das korrekte Einwachsen der retinalen Axone in den Sehnerven ist. Die Rolle des

R-Cadherin, einem Charakteristikum der Zellen, ist hierbei noch zu klären. Dass es eine repulsive Wirkung hat, ist wohl eher unwahrscheinlich, da beispielsweise das dem R-Cadherin zu 74% homologe N-Cadherin ein gutes Wachstums-substrat für die Wachstumskegel der Axone ist (Lemmon et al., 1992; Redies et al., 1992; Redies, 2000; Stuermer und Bastmeyer, 2000) und auch R-Cadherin solche Eigenschaften zugeschrieben werden (Redies und Takeichi, 1993; Liu et al., 1999b; Thanos und Mey, 2001). Es ist also eher von einer bindenden als einer repulsiven Wirkung des R-Cadherin auf die N-Cadherin-exprimierenden Axone auszugehen, wie es auch in der Literatur diskutiert wird (Redies und Takeichi, 1993). Die repulsive Wirkung beruht vermutlich auf einer anderen Substanz.

Rosettenbildung der Retina bei Kontakt mit physiologisch nicht vorkommenden Zellen, wie beispielsweise bei einer Kokultur von Kaninchenretina-Explantaten mit Aderhautmelanomzellen, wurde bereits beschrieben (Germer, 1998).

Interessanterweise reagierten in der vorliegenden Arbeit die Stäbchen- und Zapfen-Vorläufer an zahlreichen Stellen mit Rosettenbildung (Bild 6), an denen sich aberrante Axone zwischen sie und das retinale Pigmentepithel geschoben hatten. Aufgrund des Verlustes des durch Interdigitationen mit Zonulae adhaerentes vermittelten Kontaktes zum retinalen Pigmentepithel, entstanden Rosetten zwischen Stäbchen- und Zapfen-Vorläufern, in denen sie, wie beispielsweise von Flexner-Wintersteiner'schen Rosetten in Retinoblastomen bekannt (Gärtner, 1995), untereinander Zonulae adhaerentes ausbildeten.

Möglicherweise ist dieses Phänomen Ausdruck der bekannten auf Axone repulsiven Wirkung der äußeren Fortsätze der Müller'schen Zellen (Stier und Schlosshauer, 1995), da die aberranten Axone weder in die Innenräume der Rosetten noch in die Retina einwachsen, obwohl in dieser Region keine Basalmembran existiert, die die Axone zurückhalten könnte. Dass die Axone trotz der repulsiven Müllerzell-Fortsätze im Ventrikelspalt wachsen, könnte auf das stark R-Cadherin-exprimierende retinale Pigmentepithel (Liu et al., 1997) als Wachstumssubstrat zurückzuführen sein. Vorstellbar wäre zudem, dass die Bindungseigenschaften der in Zonulae adhaerentes konzentrierten Cadherine zur Roset-

tenbildung beitragen.

4.2.1.3. Müller'sche Zellen

Die Müller'schen Zellen der Netzhaut wurden im Gegensatz zur ppG durch die Komplement-vermittelte Lyse nicht vollständig lysiert. Es wurden lediglich, an E9 (HHS 34) beobachtbar (Bild 13, 15+16), die vitrealen Fortsätze vom Typ-IIa (s.o.; Reichenbach, 1999) lysiert, die stark R-Cadherin exprimieren (Wöhrn et al., 1998). Die innere limitierende Membran blieb dabei erhalten und es waren noch Endfußplatten von Müllerzellen an der Basalmembran anliegend (Bild 14). Das Zell-Soma und die anderen Teile der Müllerzellen waren unverändert. An E10 (HHS 35), an dem die aberranten Axone am ausgeprägtesten zu beobachten waren, schienen die lysierten Fortsätze bereits wieder regeneriert (Bild 7+8).

Nach Experimenten, bei denen die innere limitierende Membran enzymatisch lysiert wurde, wurde bereits beschrieben, dass die Neuroepithelzellen, also die Radialglia- oder Müllerzellen, bei fehlender Basalmembran zurückgezogene vitreale Fortsätze haben. In der Folge ist durch die in der Nervenfaserschicht fehlenden Fortsätze die Axon-Leitung in der Netzhaut gestört (Halfter et al., 2001). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wuchsen die Axone an E9 (HHS 34) ungestört bis zum Sehnervenkopf weiter, obwohl die Fortsätze der Müllerzellen fehlten. Erst am Sehnervenkopf wurden sie durch die fehlende ppG missgeleitet, was an E10 (HHS 35) eindrucksvoll zu beobachten war (Bild 7, 8+10). Die intakte Basalmembran, an der im vorliegenden Fall noch Endfußplatten anlagen, scheint also wichtiger für die Axon-Leitung zu sein als die Fortsätze der Radialgliazellen. Die bekannte repulsive Wirkung der äußeren Müllerzell-Fortsätze (Stier und Schlosshauer, 1995) könnte außerdem zum Weiterwachsen der Axone in der Nervenfaserschicht und zur Vermeidung eines Einbruchs in die Retina beigetragen haben.

Es ist bekannt, dass Müllerzellen die letzten Zellen der Retina sind, die in der Embryonalphase postmitotisch werden (Linser et al., 1997). Zudem weiß man, dass Müllerzellen auch im Adultstadium in der neuronalen Regeneration eine

Rolle spielen (Schlosshauer et al., 1991), beispielsweise für die Wiederherstellung der äußeren limitierenden Membran (Takahashi et al., 1997) und durch die Verhinderung von Apoptose bei Photorezeptoren nach Schädigungen (Harada et al., 2000; Zack, 2000). Müller'schen Zellen wird sogar zugeschrieben eine Art Stammzellen für die Retina-Regeneration zu sein (Reh und Levine, 1998). Trotz dieser bekannten Reparations- und Regenerationsfähigkeit der Müller'schen Zellen ist es beachtenswert, dass sie bei den hier durchgeführten Experimenten durch die Komplementfaktoren nicht vollständig, sondern nur zum Teil lysiert wurden.

In den Müllerzellen könnte eine Kompartimentierung des Zytoplasmas bestehen, die bewirkt, dass nach einer Antikörper-Komplement-vermittelten Lyse nicht die gesamte Zelle lysiert wird, sondern, im Gegensatz zu beispielsweise der ppG, die vollständig lysiert wird, nur die vitrealen Fortsätze vom Typ-IIa (s.o. Modell von Reichenbach, 1999) lysiert werden, die stark R-Cadherin exprimieren (Wöhrn et al., 1998). Der Rest der Müllerzellen, der kein R-Cadherin exprimiert, bleibt von der Lyse unbeeinflusst. Die genauen Umstände hierfür sind noch zu klären. In der Literatur waren keine Angaben dazu zu finden.

Interessant ist weiter die rasche Regeneration der Zellfortsätze innerhalb eines Entwicklungstages nach ihrer Lyse. Sie scheint mit daran beteiligt zu sein, dass in der Netzhautentwicklung keine durch die geschädigten Müllerzellen verursachten Fehlbildungen beobachtet werden konnten. Die besondere Regenerationsfähigkeit embryonalen Gewebes muss hier eine Rolle spielen, denn es ist bekannt, dass Müllerzellen im adulten Stadium bei Netzhautschädigungen auch verformte, irregulär verlaufende vitreale Fortsätze ausbilden können (Grimm, 1998).

4.2.2. Kontrollen

Bis auf die Auffälligkeiten bei dem in Tabelle 2 gesondert gekennzeichneten Tier, unterschied sich die Morphologie der kontrollinjizierten Tiere in keiner Weise von der nicht injizierter Tiere oder von der allgemein bekannten Netzhauthistologie von Hühnerembryonen. Bei dem einen, nur mit HBSS injizierten,

in Tabelle 2 gesondert gekennzeichneten Tier, bei dem unter der peripheren Retina nahe der Ora serrata einzelne axonale Strukturen zu finden waren, trotz erhaltener ppG und geschlossenem Ventrikelspalt, kommt als Erklärung wohl am Ehesten ein Auswachsen der Axone durch das Einstichloch in Frage. Es ist bereits beschrieben, dass Axone durch Injektionsdefekte in Basallaminae wachsen können (Halfter und Schurer, 1998). Leider konnte in diesem Fall die Einstichstelle nicht mehr gefunden und so der Verdacht nicht untersucht werden, dass die Axone durch den Injektionsdefekt in Richtung des stark R-Cadherin exprimierenden retinalen Pigmentepithels (Liu et al., 1997) gewachsen waren. Es wurde zwar in dieser Arbeit versucht, die intraokularen Injektionen durch die Pars plana Corporis ciliaris in den Glaskörper einzubringen, um die Netzhaut nicht zu durchstechen, es ist jedoch durchaus auch möglich, dass bei diesem sechs Tage alten Embryo versehentlich der Stichkanal durch die periphere Netzhaut ging und so dort der subretinale Spalt zum Einwachsen der Axone eröffnet wurde, zumal ein Effekt der Injektion reinen Puffers sehr ungewöhnlich wäre. Ein weiteres Indiz für diese Erklärung und zur Abgrenzung gegen die durch die Experimente hervorgerufenen Effekte ist die geringe Anzahl von Axonen. Ausschließlich unter der peripheren Retina, bei intakten Ventrikelspalt am Sehnervenkopf, waren Axone zu sehen, wohingegen bei den Experiment-Tieren zahlreiche Axone, durch die lysierte ppG vom Sehnervenkopf aus in den Ventrikelspalt ziehend, zu erkennen waren.

4.3. Zusammenfassende Beurteilung

Trotz der relativ geringen Anzahl von Tieren, an denen die Versuche durchgeführt wurden oder die als Kontrollen dienten, die keine statistisch signifikante Aussage der Ergebnisse ermöglicht, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Auswirkungen der Versuche tatsächlich auf die erfolgreichen R-Cadherin Komplementlyse-Experimente zurückzuführen sind.

Die beobachtete Lyse der ppG und der vitrealen Fortsätze der Müller'schen Zellen waren bei allen Tieren, an denen Komplementlyse-Experimente durchgeführt worden waren, aber bei keinem der Kontrolltiere zu finden.

Die Störung der Leitung auswachsender Axone am Sehnervenkopf war in dieser Form nur bei den Antikörper-/Komplement-injizierten Tieren zu finden und hier bei allen. Das Bild der fehlgeleiteten Axone im Kontrolltier war ein grundlegend anderes, was für sich schon auf eine andere Entstehungsgeschichte der Fehlleitung hindeutet. Das bereits als mechanische Komplikation von Injektions-Experimenten im ZNS bekannte Einwachsen von Axonen in den Injektionsdefekt (Halfter und Schurer, 1998) schien auch hier die Ursache der aberranten Axone zu sein.

Die Müller'schen Zellen widerstanden, obwohl sie R-Cadherin exprimierten, der Komplement-vermittelten Zell-Lyse. Von ihnen wurden lediglich die zum Glaskörper reichenden Fortsätze vom Typ IIa (Reichenbach, 1999) lysiert, die jedoch innerhalb eines Entwicklungstages regeneriert wurden. Hierdurch schie- nen keine Fehlbildungen verursacht worden zu sein.

4.4. Schlussfolgerung aus der Arbeit

Aus dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass die eierschalenlose Kultivierung ein dem in vivo Zustand gleichzusetzendes vereinfachendes Verfahren zur Durchführung von Experimenten an Hühnerembryonen in frühen Phasen darstellt. Zudem lässt sich sagen, dass die Komplement-vermittelte Lyse eine zuverlässige Methode zur Entfernung von Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenantigen nahezu exklusiv exprimieren, aus einem Gewebe in vivo ist, vor allem wenn, wie in diesem Fall, die Injektionslösung durch einen flüssigkeitsgefüllten Raum ungehindert zu den Zielzellen gelangen kann.

Die R-Cadherin-exprimierenden peripapillären Gliazellen spielen wider Erwar- ten keine Rolle in der Erhaltung der Avaskularität der Netzhaut, sie sind jedoch wichtiger Bestandteil des Glia-Gerüsts, das den retinalen Ganglienzell-Axonen den Weg in den Sehnerven weist. Ihre Abwesenheit verursacht ein Einwachsen von Axonen in den subretinalen Spalt und das retinale Pigmentepithel.

Müller'sche Gliazellen widerstehen überraschend der vollständigen Komple- ment-vermittelten Lyse. Es werden hierbei nur Teile der Zelle lysiert, die sehr schnell wieder regeneriert werden, so dass im Bereich der Müllerzellen keine

durch die Lyse-Experimente verursachten Störungen der Netzhautarchitektur zu beobachten sind. Die innere limitierende Membran mit den Müllerzellendfüßen scheint wichtiger für die Axon-Leitung zu sein, als die vitrealen Fortsätze der Müllerzellen.

Obwohl die Anzahl der Tiere nicht für eine statistisch signifikante Aussage ausreicht, kann durch die eindeutigen Unterschiede zwischen Experimenten und Kontrollen mit einer hohen Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Veränderungen auf die durchgeführten Versuche zurückzuführen sind.

5. Zusammenfassung

Das Nervensystem zeichnet sich durch eine hochkomplexe Struktur aus, die es benötigt, um seine Aufgaben zu erfüllen. Es ist aus zwei zu unterscheidenden Zelltypen aufgebaut, den Nervenzellen, die die Informationen leiten und verarbeiten, und den Gliazellen, die verschiedenste Aufgaben übernehmen, von der Umscheidung der Axone bis zur Organisation des Aufbaus der Gewebearchitektur während der Entwicklung. Wichtig hierfür sind, neben anderen Mechanismen, verschiedene Zelloberflächenproteine. Unter diesen sind die Cadherine eine herausragende Gruppe.

In dieser Arbeit wurde die Rolle einer Subpopulation von Gliazellen am Sehnervenkopf in der Retina des Hühnchens während der frühen Embryonalentwicklung untersucht. Diese hebt sich von anderen Gliazellen durch ihre eigene Morphologie und ihre R-Cadherin Expression ab. Es bestand in der Literatur der Verdacht, dass diese Zellen am Zustandekommen der Avaskularität der Netzhaut und eventuell an der Leitung der Ganglienzell-Axone beteiligt sein könnten.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Embryonen eierschalenlos kultiviert und ihnen eine anti-R-Cadherin-Antikörper und Komplementfaktoren enthaltende Lösung in die Augen injiziert, um diese sogenannten peripapillären Gliazellen zu lysieren. Die Effekte der Zell-Lyse wurden mit Immunfluoreszenz-,

Licht- und Elektronenmikroskopie ausgewertet.

Es zeigte sich, dass die peripapillären Gliazellen wider Erwarten nicht an der Erhaltung der Avaskularität der Retina beteiligt sind. Auch ohne sie wuchsen keine Blutgefäße in die Retina ein. Weiter war aber zu beobachten, dass sie wichtiger Teil eines Glia-Gerüsts sind, das für die korrekte Leitung der Ganglienzell-Axone aus der Retina in den Sehnerven notwendig ist. Ohne sie wachsen die Axone in den subretinalen Spalt und das retinale Pigmentepithel ein. Zusätzlich wurde noch entdeckt, dass die ebenfalls R-Cadherin-exprimierenden Müllerzellen nicht vollständig lysiert wurden, sondern lediglich die vitrealen Fortsätze, die im Gegensatz zum Zellsoma und anderen Fortsätzen, R-Cadherin exprimieren.

6. Abkürzungsverzeichnis

E	Embryonaltag
GFAP	gliales, fibrilläres, saures Protein (glial fibrillary acidic protein)
GS	Glutaminsynthetase
HBSS	Hank's buffered salt solution
HHS	Stadium nach Hamburger und Hamilton
HMSS	Hank's modified salt solution
IgG	Immunglobulin-G
N-CAM	neuronales Zelladhäsions-Molekül (neuronal cell adhesion molecule)
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
ppG	peripapilläre Glia
RCD-2	monoklonaler, funktionell nicht blockierender Maus-anti-Hühnchen-R-Cadherin Antikörper, Klon RCD-2
TBS	TBS-Pufferlösung
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

- Arndt, K., Redies, C. (1996):** Restricted expression of R-Cadherin by brain nuclei and neural circuits of the developing chicken brain. *J. Comp. Neurol.* 373: 373-399
- Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Folkman, J. (1974):** A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev. Biol.* 41: 391-394
- Bhattacharjee, J. (1993):** A presumably astroglial cell in the retino-pectineal junction in *Gallus domesticus*, demonstrated by non-specific esterase staining. *Europ. J. Morph.* 31: 169-173
- Bixby, J. L. (1992):** Diversity of axonal growth-promoting receptors and regulation of their function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 66-69
- Cavallaro, U., Christofori, G. (2001):** Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochem. Biophys. Acta* 1552: 39-45
- Cavallaro, U., Schaffhauser, B., Christofori, G. (2002):** Cadherins and the tumor progression: Is it all in a switch? *Cancer Lett.* 176: 123-128
- Chan-Ling, T. (1994):** Glial, neuronal and vascular interactions in the mammalian retina. *Prog. Ret. Eye Res.* 13: 357-389
- Dierig, S. (1994):** Extending the neuron doctrine: Carl Ludwig Schleich (1859-1922) and his reflections on neuroglia at the inception of the neural-network concept in 1894. *TINS* 17: 449-452
- Gärtner, J. (1995):** Pathologie des Auges
In: Pfeiffer, J., Schröder, J. M.: Neuropathologie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Gerhardt, H., Liebner, S., Wolburg, H. (1996):** The pecten oculi of the chicken as a new in vivo model of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* 285: 91-100
- Gerhardt, H., Schuck, J., Wolburg, H. (1999a):** Differentiation of a unique macroglial cell type in the pecten oculi of the chicken. *Glia* 28: 201-214
- Gerhardt, H., Liebner, S., Redies, C., Wolburg, H. (1999b):** N-cadherin expression in endothelial cells during early angiogenesis in the eye and brain of the chicken: relation to blood-retina and blood-brain barrier development. *Europ. J. Neurosci.* 11: 1191-1201
- Gerhardt, H., Rascher, G., Schuck, J., Weigold, U., Redies, C., Wolburg, H. (2000):** R- and B-Cadherin expression defines subpopulations of glial cells involved in axonal guidance in the optic nerve head of the chicken. *Glia* 31: 131-143
- Germer, A. (1998):** Untersuchungen zur Rolle der Müllerzellen während der postnatalen Entwicklung der Kaninchenretina. *Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig.*
- Grimm, D. (1998):** Morphologische und morphometrische licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Müllerzellen der gealterten bzw. lichtgeschädigten Rattenretina. *Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. an der Medizinischen Fakultät der Universität*

Leipzig.

- Hajra, K.M., Fearon, E.R. (2002):** Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 255-268
- Halfter, W. (1998):** Disruption of the retinal basal lamina during early embryonic development leads to a retraction of vitreal end feet, an increased number of ganglion cells, and aberrant axonal outgrowth. *J. Comp. Neurol.* 397: 89-104
- Halfter, W., Schurer, B. (1998):** Disruption of the pial basal lamina during early avian embryonic development inhibits histogenesis and axonal pathfinding in the optic tectum. *J. Comp. Neurol.* 397: 105-117
- Halfter, W., Dong, S., Balasubramani, M., Bier, M.E. (2001):** Temporary disruption of the retinal basal lamina and its effect on retinal histogenesis. *Dev. Biol.* 238: 79-96
- Hamburger, V., Hamilton, H. (1951):** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphology* 88: 49-92
- Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H., Wada, K. (2000):** Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* 26: 533-541
- Hatta, K., Takeichi, M. (1986):** Expression of N-Cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* 320: 447-449
- Honig, M.G., Rutishauser, U.S. (1996):** Changes in the segmental pattern of sensory neuron projections in the chick hindlimb under conditions of altered cell adhesion molecule function. *Dev. Biol.* 175: 325-337
- Honig, M.G., Petersen, G.G., Rutishauser, U.S., Camilli, S.J. (1998):** In vitro studies of growth cone behaviour support a role for fasciculation mediated by cell adhesion molecules in sensory axon guidance during development. *Dev. Biol.* 204: 317-326
- Huber, O., Bierkamp, C., Kemler, R. (1996):** Cadherins and catenins in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 685-691
- Inuzuka, H., Miyatani, S., Takeichi, M. (1991a):** R-Cadherin: A novel Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron* 7: 69-79
- Inuzuka, H., Redies, C., Takeichi, M. (1991b):** Differential expression of R- and N-Cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development. *Development* 113: 959-967
- Kettenmann, H.A., Ransom, B.R. (1995):** Neuroglia. Oxford University Press. New York, Oxford
- Krebs, H.A. (1972):** The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation 1-34.
In: Dickens, F., Campbell, P.N.: Essays in Biochemistry, Academic Press, New York
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., Kemler, R. (1994):** E-Cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8263-8267
- Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M., Kemler,**

- R. (1996):** Cadherins can direct tissue formation. *Development* 122: 3185-3194
- Lemmon, V., Burden, S.M., Payne, H.R., Elmslie, G.J., Hlavin, M.L. (1992):** Neurite growth on different substrates: Permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *J. Neurosci.* 12: 818-826
- Lewis, J.E. (2002):** The role of cadherins in tumor suppression. *Mod. Asp. Immunobiol.* 2: 126-129
- Liebner, S., Gerhardt, H., Wolburg, H. (1997):** Maturation of the blood-retina barrier in the developing pecten oculi of the chicken. *Dev. Brain Res.* 100: 205-219
- Liebner, S., Gerhardt, H., Wolburg, H. (2000):** Differential expression of endothelial β -catenin and plakoglobin during development and maturation of the blood-brain and blood-retina barrier in the chicken. *Dev. Dyn.* 217: 86-98
- Linser, P.J., Schlosshauer, B., Galileo, D.S., Buzzi, W.R., Lewis, R.C. (1997):** Late proliferation of retinal Müller cell progenitors facilitates preferential targeting with retroviral vectors in vitro. *Dev. Genet.* 20: 186-196
- Liu, Q., Sanborn, K.L., Cobb, N., Raymond, P.A., Marrs, J.A. (1999a):** R-Cadherin expression in the developing and adult zebrafish visual system. *J. Comp. Neurol.* 410: 303-319
- Liu, Q., Marrs, J.A., Raymond, P.A. (1999b):** Spatial correspondence between R-Cadherin expression domains and retinal ganglion cell axons in developing zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 410: 290-302
- Liu, X., Mizoguchi, A., Takeichi, M., Honda, Y., Ide, C. (1997):** Developmental changes in the subcellular localization of R-Cadherin in chick retinal pigment epithelium. *Histochem. Cell Biol.* 108: 35-43
- Matsunami, H., Takeichi, M. (1995):** Fetal brain subdivisions defined by R- and E-Cadherin expressions: Evidence for the role of Cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* 172: 466-478
- Mearow, K.M., Mill, J.F., Vitkovic, L. (1989):** The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain. *Mol. Brain Res.* 6: 223-232
- Meller, K., Tetzlaff, W. (1976):** Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tiss. Res.* 170: 145-159
- Mey, J., Thanos, S. (1992):** Development of the visual system of the chick – a review. *J. Hirnforsch.* 33: 673-702
- Mey, J., Thanos, S. (2000):** Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res. Rev.* 32: 343-379
- Muchnik Miller, N., Oberdorfer, M. (1981):** Neuronal and neuroglial responses following retinal lesions in the neonatal rats. *J. Comp. Neurol.* 202: 493-504
- Müller, H. (1851):** Zur Histologie der Netzhaut. *Zeitschrift für Wissenschaft und Zoologie* 3: 234-237
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., Rini, J.M. (1996):** Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380: 360-364

- Nakagawa, S., Takeichi, M. (1995):** Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* 121: 1321-1332
- Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K.I., Yau, P., Takeichi, M., Ikura, M. (1995):** Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267: 386-389
- Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., Engel, J. (1994):** Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-Cadherin upon calcium binding. *Europ. J. Biochem.* 223: 1019-1026
- Redies, C., Inuzuka, H., Takeichi, M. (1992):** Restricted expression of N- and R-cadherin on neurites of the developing chicken CNS. *J. Neurosci.* 12: 3525-3534
- Redies, C., Takeichi, M. (1993):** N- and R-Cadherin expression in the optic nerve of the chicken embryo. *Glia* 8: 161-171
- Redies, C., Engelhart, K., Takeichi, M. (1993):** Differential expression of N- and R-Cadherin in functional neuronal systems and other structures of the developing chicken brain. *J. Comp. Neurol.* 333: 398-416
- Redies, C., Takeichi, M. (1996):** Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Dev. Biol.* 180: 413-423
- Redies, C. (1997):** Cadherins and the formation of neural circuitry in the vertebrate CNS. *Cell Tissue Res.* 290: 405-413
- Redies, C. (2000):** Cadherins in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 61: 611-648
- Reh, T.A., Levine, E.M. (1998):** Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J. Neurobiol.* 36: 206-220
- Reichenbach, A. (1999):** Neuroglia – das andere zelluläre Element im Nervensystem: Die Müllersche Gliazelle. SMVerlagsgesellschaft, Wessobrunn.
- Rosenberg, P., Esni, F., Sjodin, A., Larue, L., Carlsson, L., Gullberg, D., Takeichi, M., Kemler, R., Semb, H. (1997):** A potential role of R-Cadherin in striated muscle formation. *Dev. Biol.* 187: 55-70
- Sarthy, V., Ripps, H. (2001):** The Retinal Müller Cell – Structure and Function. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moskau.
- Schlosshauer, B., Grauer, D., Dütting, D., Vanselow, J. (1991):** Expression of a novel Müller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. *Development* 111: 789-799
- Schuck, J. (1998):** Glio-vaskuläre Interaktionen in der Papilla nervi optici des Hühnchens, des Meerschweinchens und der Ratte. *Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.*
- Schuck, J., Gerhardt, H., Wolburg, H. (2000):** The peripapillary glia of the optic nerve head in the chicken retina. *Anat. Rec.* 259: 263-275
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grübel, G., Legrand, J.-F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., Hendrickson, W.A. (1995):** Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374: 327-337
- Shiga, T., Oppenheim, R.W. (1991):** Immunolocalization studies of putative

- guidance molecules used by axons and growth cones of intersegmental interneurons in the chick embryo spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 310: 234-252
- Silver, J., Sapiro, J. (1981):** Axonal guidance during development of the optic nerve: The role of pigmented epithelia and other extrinsic factors. *J. Comp. Neurol.* 202: 521-538
- Somjen, G.G. (1988):** Nervenketten: Notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1: 2-9
- Stichel, C.C., Müller, C.M., Zilles, K. (1991):** Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity during rat visual cortex development. *J. Neurocytol.* 20: 97-108
- Stier, H., Schlosshauer, B. (1995):** Axonal guidance in the chicken retina. *Development* 121: 1443-1454
- Stuermer, C.A.O., Bastmeyer, M. (2000):** The retinal axons pathfinding to the optic disk. *Prog. Neurobiol.* 62: 197-214
- Takahashi, K., Lam, T.T., Fu, J., Tso, M.O.M. (1997):** The effect of high-dose methylprednisolone on laser-induced retinal injury in primates: an electronmicroscopic study. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 235: 723-732
- Takeichi, M. (1995):** Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 619-627
- Takeuchi, T., Liang, S.B., Ohtsuki, Y. (2002):** Downregulation of expression of a novel cadherin molecule, T-cadherin, in basal cell carcinoma of the skin. *Mol. Carcinog.* 35:173-179
- Thanos, S., Bonhoeffer, F. (1983):** Investigations on the development and topographic order of retinotectal axons: anterograde and retrograde staining of axons and perikarya with rodamine in vivo. *J. Comp. Neurol.* 219: 420-430
- Thanos, S., Mey, J. (2001):** Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res. Rev.* 35: 205-245
- Vaughn, D.E., Bjorkmann, P.J. (1996):** The (greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 16: 261-273
- Virchow, R. (1846):** Ueber das granulirte Ansehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allg. Zeitschr. Psychiatr.* 3: 242-250
- Wöhrn, J.-C.P., Puelles, L., Nakagawa, S., Takeichi, M., Redies, C. (1998):** Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo. *J. Comp. Neurol.* 396: 20-38
- Wöhrn, J.-C.P., Nakagawa, S., Ast, M., Takeichi, M., Redies, C. (1999):** Combinatorial expression of cadherins and the sorting of neurites in the tectofugal pathways of the chicken embryo. *Neurosci.* 90: 985-1000
- Wolburg, H., Liebner, S., Reichenbach, A., Gerhardt, H. (1999):** The pecten oculi of the chicken: a model system for vascular differentiation and barrier maturation. *Int. Rev. Cytol.* 187: 111-159
- Zack, D.J. (2000):** Neurotrophic rescue of photoreceptors: are Müller cells the mediators of survival? *Neuron* 26: 285-286

Zenker, W. (1994): Feinstruktur des Nervengewebes, 220-266

In: **Drenckhahn, D., Zenker, W.:** Benninghoff Anatomie Band 2, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem lieben Doktorvater Prof. Dr. Hartwig Wolburg danken, der mir nicht nur ein höchstinteressantes Thema überlassen und mich dabei hervorragend betreut, sondern mich auch in zahlreichen Gesprächen über verschiedenste Themen im Verstehen und Bearbeiten wissenschaftlicher Probleme weiter gebracht hat. Ich danke ihm auch dafür, dass er mir dies alles zugetraut und mich mit den notwendigen Mitteln ausgestattet hat, außerdem für seine Unterstützung während des Studiums.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. Gesa Rascher-Eggstein, die mir alle Arbeitstechniken und Geräte erklärte, auch bei auftretenden Problemen immer einen hilfreichen Tip hatte und mir mit viel Geduld, Rat und Tat zur Seite stand. Dr. Holger Gerhardt möchte ich für seine Unterstützung bei der Publikation und Dr. Stefan Liebner für seine Hilfe bei Computer- und anderen technischen Problemen danken, beiden für ihre konstruktiven Anregungen und ihre Stocherkahnkünste.

Dr. Jörg Beiter möchte ich Dank sagen für seine hilfreichen Anmerkungen eines auf einem anderen Gebiet Arbeitenden, für Computer-Tips und für interessante Gespräche.

Des weiteren gilt mein Dank Kristin Möckel für ihre Hilfe auf vielen Gebieten, vor allem beim Erlernen der Injektionstechnik, Marlies Laib für ihre Hilfe bei meinen Rieseneinbettungen, auch bis spät abends, und Ria Knittel für die Einführung in die höhere Kunst der Ultramikrotomie und den Spaß dabei.

Meinen Eltern möchte ich für die uneingeschränkte moralische und finanzielle Unterstützung während der ganzen Zeit danken. Ich weiß, dass ich manchmal nicht einfach war.

Last but not least möchte ich meiner lieben Frau Anke danken, die mich während der ganzen Zeit in jeder Hinsicht unterstützt und motiviert hat, auch wenn ich Sonntags bei bestem Wetter Augen fixieren musste (dieser E 9!), und die dabei genau wie ich ein neues Verhältnis zu Hühneraugen entwickelt hat.

Lebenslauf von Ulrich Siegfried Weigold:

-Geboren am 4. Oktober 1975 in Göppingen

-1982 bis 1986 Grundschule Mähringen

-1986 bis 1995 Wildermuth-Gymnasium Tübingen, Musikzug, Abschluss am 27.06.1995 mit der allgemeinen Hochschulreife

-01.09.1995 bis 30.09.1996 Zivildienst im Pflegedienst der Universitäts-Augenklinik Tübingen

-Wintersemester 1996/97 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

-Ärztliche Vorprüfung am 27.08.1998 in Tübingen

-1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 31.08.1999 in Tübingen

-2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 03.04.2002 in Tübingen

-29.04.2002 bis 02.03.2003 Medizinstudent im Praktischen Jahr an der Kreisklinik Balingen (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)

-Ablegen der Ärztlichen Prüfung am 9. Mai 2003 in Balingen

-Ab 01.07.2003 Arzt im Praktikum in der Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie des Marienhospitals Stuttgart