
5. Diskussion

5.1 Die Differenzierung von Photorezeptoren in Rosettensphäroiden kann anhand von computergestützten Auswertemethoden quantifiziert werden

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Differenzierung der Photorezeptoren in Rosettensphäroiden. Dieser Prozess wurde sowohl mit bereits etablierten, sowie bislang bislang nicht verwendeten Markern untersucht. Diese Untersuchungen hatten mehrere Ziele. Dazu gehörte u. a. die Entwicklung neuer Methoden für die quantitative Analyse von Antikörperfärbungen, mit deren Hilfe erstmals die räumliche Dimension der Photorezeptorenentwicklung in den dreidimensionalen Reaggregaten untersucht werden sollte. Diese neuen Erkenntnisse sollten dazu genutzt werden, den Einfluss verschiedenster Agenzien wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Toxine auf diesen Differenzierungsprozess, sowie das Überleben von Photorezeptoren in diesem System besser zu erforschen. Tatsächlich sind solche Einflüsse auf diesen Zelltyp bereits seit langer Zeit Gegenstand umfangreicher Nachforschungen, die unter anderem zum Ziel haben, Therapien für Erblindungskrankheiten zu etablieren. Einen großen Teil davon macht dabei die Analyse der Wirkungen von Wachstumsfaktoren auf die Photorezeptoren aus, die sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* mittels zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen erforscht werden (Hicks and Courtois 1992; Tcheng, Oliver et al. 1994; Desire, Courtois et al. 1998; Rothermel and Layer 2003).

Bei den hier angewandten Rosettensphäroiden handelt es sich um ein etabliertes Modellsystem, in dem die Vorgänge während der Retinaentwicklung *in vivo*, in einem vergleichbaren zeitlichen Rahmen unter konstanten Kulturbedingungen rekapituliert werden. (Layer, Rothermel et al. 2001; Layer, Robitzki et al. 2002). Im Hinblick auf die Photorezeptoren konnte anhand dieses Systems gezeigt werden, dass das Verhältnis von Zapfen zu Stäbchen von dem Organisationsgrad des Gewebes abhängig ist (Rothermel and Layer 2001) und durch Applikation von GDNF die Differenzierung von Stäbchen stimuliert wird (Rothermel and Layer 2003; Volpert, Rothermel et al. 2007). Der räumlichen Dimension dieser Differenzierungsvorgänge wurde dagegen bislang keine Aufmerksamkeit geschenkt. Diese Wissenslücke sollte mit Hilfe dieser Arbeit geschlossen werden.

Ein Grund für die fehlenden Untersuchungen der räumlichen Dimension von Differenzierungsvorgängen in Sphäroiden liegt darin, dass diese zum Teil gravierende Unterschiede in

ihrer Form, ihrer Größe und dem Grad der inneren Strukturierung bzw. Organisation aufweisen. Dieser Umstand erschwert die quantitative Analyse von Antikörperfärbungen deutlich. Die für verlässliche Statistiken nötigen Datenmengen konnten deshalb bislang nur bedingt generiert werden.

Diesem Problem wurde im Rahmen dieser Arbeit dadurch begegnet, dass erstmals der Anteil von Signalen, die durch die Markierung bestimmter Proteine mit einem Antikörper entstehen, an der Fläche von Sphäroidschnitten bestimmt wurde. Es muss erwähnt werden, dass die so gewonnenen Resultate stets von der subjektiven Definition allgemein gültiger Schwellenwerte für ein gesamtes Experiment abhängig sind. Andererseits konnten durch die Anwendung dieser Methode deutlich mehr Schnitte ausgewertet werden, als dies in vergleichbaren Studien bislang der Fall gewesen ist. Ein weiterer Vorteil der Analyse von Antikörperfärbungen gegenüber anderen quantitativen Nachweismethoden, wie dem Nachweis von mRNA mittels *RT-* oder *real-time-PCR*, liegt darin, dass hierbei Informationen über die räumliche Verteilung der Signale in den Sphäroiden erhalten bleibt. Um diesen Vorteil auszunutzen, wurde das Scaling2.0 Makro entwickelt, mit dem sich erstmals Unterschiede in der Verteilung von Signalen innerhalb der Sphäroide quantifizieren lassen. Die vorliegenden Resultate zeigen in beeindruckender Weise, dass die so gewonnenen Daten eine detailliertere Analyse der Reaggregate zulassen, als dies bei bloßer subjektiver Betrachtung möglich ist.

Die Untersuchung der Differenzierung von Photorezeptoren in den Sphäroiden erfolgte anhand einer Palette von etablierten Antikörpern. Im Falle von Cern906 und Cern901 ist deren Spezifität für die, in der Entwicklung von Photorezeptoren spät exprimierten, r/g-Opsine (Cern906) und das Protein Rhodopsin (Cern901) nachgewiesen (Rothermel, Willbold et al. 1997). Dadurch sind sie als Marker für Photorezeptoren geeignet, die in ihrer Differenzierung bereits weit vorangeschritten sind. Photorezeptoren, die bereits Opsine exprimieren, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als differenzierende Photorezeptoren bezeichnet.

Für die Markierung frühester Photorezeptor-Stadien wurde ein Antikörper gegen Visinin gewählt. Dabei handelt es sich um ein, dem Recoverin von Säugern homologes, Ca^{2+} bindendes Protein in der Hühnerretina (Yamagata, Goto et al. 1990). Im Huhn wird dieses Protein von allen Photorezeptor-Vorläufern unmittelbar nach ihrer letzten Mitose über die gesamte weitere Lebensdauer hinweg exprimiert (Bruhn and Cepko 1996; Fischer, Foster et al. 2008). Visinin exprimierende Zellen sind erstmals ab dem E5 Stadium nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Sie gehören damit nach der Präparation der Sphäroide im E6-Stadium zu den ersten Zellen, die sich in den Sphäroiden eindeutig einem bestimmten Zelltyp zuordnen lassen.

Die Verwendung eines Antikörpers gegen den lediglich transient exprimierten LIM-

Domänen-Transkriptionsfaktor Islet2 erlaubte die Erfassung eines weiteren Differenzierungsstadiums der Photorezeptoren. Anhand des von Photorezeptoren *in vivo* von E8 - E15 exprimierten Proteins lassen sich Zellen identifizieren, die bereits Visinin, aber noch kein r/g-Opisin bzw. Rhodopsin exprimieren (Fischer, Foster et al. 2008). Erst nach Beendigung der Islet-2-Expression beginnen Photorezeptoren mit der Synthese von Opsinen. (Fischer, Foster et al. 2008). Dass Islet2 *in vivo* zusätzlich zu den Photorezeptoren auch Ganglienzellen markiert (Edqvist, Myers et al. 2006), konnte im Falle des Sphäroidsystems vernachlässigt werden, da hier ab dem zweiten Kulturtag keine Ganglienzellen mehr nachgewiesen werden können (vgl. Gliederungspunkt 4.2.7).

Insgesamt konnte die Differenzierung der Photorezeptoren so in drei Stadien, dem frühen Vorläuferstadium, einem transienten Übergangsstadium und dem späten Differenzierungsstadium unterteilt werden.

5.1.1 Die Differenzierung von Photorezeptoren in Sphäroiden erfolgt in Übereinstimmung mit dem bei der Differenzierung *in vivo* ablaufendem zellulären Programm.

Die Analyse der Differenzierung von Photorezeptoren in den Sphäroiden zeigt, dass dieser Prozess in den Sphäroiden nach einem strikten zeitlichen und räumlichen Muster abläuft. Sie beginnt mit der Differenzierung, also der Opsin-Expression von direkt unter der Sphäroidoberfläche liegenden Zapfen am vierten Tag in Kultur. Am selben Tag noch beginnen in der gleichen Region auch die Stäbchen mit der Expression von Rhodopsin, wobei ihre Zahl jedoch stets geringer als die der bereits differenzierten Zapfen ist, was sich in den niedrigeren Signalanteilen in den Messungen widerspiegelt. Zu diesem Zeitpunkt sind überall im Sphäroid sowohl Visinin, als auch Islet2-exprimierende Photorezeptoren zu finden, wobei auch in diesem System keine Überschneidung zwischen Islet2- und Opsin-Expression in ein und derselben Zelle nachgewiesen werden kann. Mit zunehmender Kulturdauer schiebt sich die Grenze der Opsin-exprimierenden Zellen immer weiter in das Zentrum der Sphäroide hinein. Zur gleichen Zeit ziehen sich die Islet2-positiven Zellen immer weiter in das Zentrum zurück. Die Verteilung der Visinin-positiven Zellen bleibt dagegen weitestgehend unverändert. Nach zehn Tagen ist eine – mit Ausnahme der äußersten Peripherie – nahezu gleiche Verteilung von differenzierten Zellen vorhanden. Gleiches gilt für Visinin-positive Zellen. Islet2-exprimierende Zellen sind in diesem Stadium nicht mehr vorhanden.

Werden Sphäroide aus unterschiedlichen Zonen der Retina präpariert, so führt dies zu einer

unterschiedlich schnell voranschreitenden Differenzierung. Sphäroide aus zentraler Retina zeigen eine raschere Ausbreitung der Opsin-Expression bzw. einen schnelleren Rückzug Islet2-positiver Zellen in Richtung des Sphäroidzentrums, als dies bei Sphäroiden aus der Retina der peripheren Augenbereiche der Fall ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung der Zellen auch nach ihrer Überführung in die *in vitro* Kultur weiterhin einem inneren Programm folgt, das mit dem, welches die Differenzierung *in vivo* steuert, zum Teil übereinstimmt. Diese Übereinstimmungen finden sich im Hinblick auf a) die im Vergleich zu den Stäbchen zeitlich früher einsetzende Opsin-Expression bei den Zapfen, b) die frühere Opsin-Expression in den Zellen aus den zentralen Retinabereichen und das Durchlaufen eines transienten Stadiums, welches durch die Expression von Islet2 gekennzeichnet, und vor dem Einsetzen der Opsin-Expression, beendet ist (Prada, Puga et al. 1991; Bruhn and Cepko 1996; Fischer, Foster et al. 2008). Ein Unterschied findet sich hingegen hinsichtlich des Zeitpunktes an dem die Differenzierung von Zapfen und Stäbchen beginnt. Dieser liegt in den Sphäroiden mit dem vierten Kulturtag deutlich vor dem Zeitpunkt, in dem *in vivo* erstmals eine Expression von Opsinen bzw. Rhodopsin nachweisbar wird (Bruhn and Cepko 1996).

5.1.2 bFGF verringert den Anteil von Photorezeptoren im Sphäroid und verlängert gleichzeitig den Zeitraum, in dem die PRs Islet2 exprimieren.

Eine weitere Erkenntnis, die sich aus den hier vorliegenden Daten ergibt, ist, dass der Zeitpunkt, an dem Photorezeptoren in Sphäroiden mit der Opsin-Expression beginnen, durch ihre Lage im Sphäroid bestimmt wird. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass aufgrund der dreidimensionalen Kultivierung die Beschaffenheit ihres unmittelbaren Milieus ebenfalls von diesem Parameter abhängig ist: Die – im Vergleich zur zweidimensionalen Kultivierung – geringe Oberfläche der Sphäroide führt dazu, dass a) sich im Zentrum der Reaggregate die von den enthaltenen Zellen produzierten Abfallstoffe und Wachstumsfaktoren anhäufen und b) die Zellen im Zentrum über eine geringere Menge an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren verfügen können, als die in der Peripherie angesiedelten Zellen (Thomlinson and Gray 1955; Folkman and Hochberg 1973; Dormann and Deutsch 2002). Im Hinblick auf die Photorezeptoren-Differenzierung lässt dies zwei unterschiedliche Schlüsse zu: Zum einen könnten sich im Sphäroidzentrum angehäufte Faktoren negativ auf die Differenzierung auswirken, zum anderen könnte ein aus dem Medium stammender Faktor für deren Beginn verantwortlich

sein. Für den Fall, dass letzteres zutrifft, sollte sich mittels eines „*gain of function*“-Experiments, bei dem ein entsprechender Wachstumsfaktor in hoher Konzentration in das Reaggregationsmedium zugesetzt wird, die Differenzierung beschleunigen lassen. bFGF erschien insofern als ein aussichtsreicher Kandidat für diese Beschleunigung, als dass für ihn eine differenzierungsfördernde Wirkung auf embryonale Photorezeptoren des Huhns (Tcheng, Oliver et al. 1994; Desire, Courtois et al. 1998), als auch auf die von postnatalen Ratten (Hicks and Courtois 1992) *in vitro* postuliert wurde.

Um die Auswirkungen von bFGF auf die Differenzierung der Photorezeptoren in dem dreidimensionalen Sphäroidmodell zu untersuchen, wurde zunächst die morphologische Entwicklung und anschließend die Expression oben genannter Photorezeptoren-spezifischer Proteine in Kontrollen und bFGF-behandelten Sphäroiden miteinander verglichen. Zusätzlich wurden „*loss of function*“-Experimente durch die Komplexierung von, möglicherweise bereits im Reaggregationsmedium enthaltenen, FGF mittels Suramin durchgeführt. Zuletzt erfolgte eine kombinierte Behandlung mit bFGF und Suramin.

Für die Analyse der gesamten Photorezeptorenpopulation in den Sphäroiden wurde die Quantifizierung der Visinin-Signale in den Sphäroiden an den entsprechenden Kulturstadien herangezogen. Die Zugabe von bFGF führte hierbei zur Abnahme, die Behandlung mit Suramin dagegen – zumindest in den frühen Kulturstadien - zu einer Zunahme der Signalmenge.

Der Versuch, diese Verringerung des Anteils von Photorezeptoren an der gesamten Zellpopulation in einen Kontext zu bereits veröffentlichten Ergebnissen zu stellen, erweist sich als schwierig: Für Versuche mit exogener Zugabe von bFGF wurde sowohl eine Verschiebung zugunsten von Photorezeptoren bei den kultivierten Zellen (Hicks and Courtois 1992; Tcheng, Oliver et al. 1994), als auch ein Ausbleiben von Effekten beschrieben (Fuhrmann, Kirsch et al. 1995). Desire et al. beschreibt einen höheren Anteil von Photorezeptoren im Zuge einer Suppression von bFGF mittels antisense Oligonucleotiden, findet jedoch keine Effekte im Zuge einer exogenen bFGF-Zugabe (Desire, Courtois et al. 1998). Damit stehen die hier präsentierten Daten im Widerspruch zu allen bislang veröffentlichten Resultaten.

Gleiches gilt für die hier vorliegenden Daten zur Differenzierung dieses Zelltyps: „*Gain of function*“-Experimente führten in dieser Arbeit zu einer verzögerten, „*loss of function*“-Experimente im Gegenzug zu einer beschleunigten Expression von r/g-Opsinen bzw. Rhodopsin. Die Suppression von bFGF mittels Oligonucleotiden in zweidimensionaler Kultur führt beim Huhn dagegen zu einer Verminderung der Rhodopsin-positiven Zellen (Desire, Courtois et al. 1998). „*Gain of function*“-Experimente mit bFGF bei Monolayerkulturen der Retinazellen postnataler Ratten resultieren in einer, weder durch zusätzliche Proliferation noch durch ver-

längerte Lebensdauer hervorgerufenen Zunahme Rhodopsin-positiver Zellen (Hicks and Courtois 1992). Für Retinaexplantate der gleichen Spezies konnten dagegen keine Auswirkungen auf die Differenzierung von Stäbchen-Photorezeptoren festgestellt werden (Zhao and Barnstable 1996).

Die beiden letztgenannten Resultate sind an diesem Punkt von besonderer Bedeutung, da sich aus ihnen eine Abhängigkeit der Ergebnisse für ein und dieselbe Spezies von der Art der Kultivierung ableiten lässt: Eine zweidimensionale Kultivierung von Retinazellen als Monolayer kann zu anderen Resultaten führen, als die Kultivierung von sich weiterhin in ihrem dreidimensionalen Zellverband befindlichen Retinaexplantaten. Dies könnte ebenfalls ein Grund für die Abweichungen der hier präsentierten Ergebnisse zu den bereits veröffentlichten Daten sein: Alle hier zitierten Daten wurden auf der Basis von zweidimensionaler Kulturtechnik gewonnen. Die hier angewandte dreidimensionale Kulturtechnik führt zwangsläufig zu drastischen Veränderungen gegenüber der zweidimensionalen Kultivierung: Durch den Zugewinn einer dritten Dimension und der so gewährleisteten Möglichkeit zur Ausbildung histotypischer Strukturen kommt es zur Ausbildung einer, der Retina ähnlichen Strukturierung und Netzwerkbildung zwischen den Zellen, wie es in dieser Form bei Versuchen mit einem Zell-Monolayer niemals der Fall ist. Das „micro-environment“ der Zellen ist damit näher an der *in vivo*-Situation: Zelltypen, die in der Retina dicht beieinander liegen oder Kontakte miteinander herstellen, tun dies in den Sphäroiden ebenfalls. Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zelltypen via Signalkaskaden oder Aktionspotentialen können somit unmittelbarer vollzogen werden. Ein weiterer bedeutender Unterschied zwischen den Kulturtechniken lässt sich auf der molekularen Ebene beobachten: Vergleiche der Chromatinstruktur von zwei- und dreidimensional kultivierten Zellen zeigen deutlich mehr Veränderungen und somit geringere Übereinstimmungen mit der *in vivo*-Situation bei den Zellen der Monolayer (persönliche Mitteilung von Zink, unveröffentlicht). Solche Veränderungen könnten einen Einfluss auf das Zusammenspiel verschiedener Zellen bzw. Zelltypen untereinander haben: Für Photorezeptoren im Speziellen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die trophischen Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren (darunter auch von bFGF) auf einer Aktivierung von Müllerzellen beruhen (Frasson, Sahel et al. 1999; Wahlin, Campochiaro et al. 2000; Hauck, Kinkl et al. 2006). Tatsächlich bleiben Müllerzellen und Photorezeptoren auch bei der Kultivierung von Retinazellen als Monolayer in direkter Verbindung, da die Photorezeptoren auf deren Oberfläche wachsen (Sheffield, Pressman et al. 1980; Li and Sheffield 1984; Tcheng, Oliver et al. 1994; Desire, Courtois et al. 1998). Für Müllerzellen konnte allerdings anhand von Expressionsstudien gezeigt werden, dass sich deren Expressionsmuster im Zuge der Kultivie-

zung drastisch verändert (Hauck, Suppmann et al. 2003). Dies könnte zu Veränderungen der zellulären Antworten auf bestimmte Signale - in diesem Fall Wachstumsfaktoren – führen, wodurch der Effekt auf Photorezeptoren sich ebenfalls verändern könnte.

Neben den bislang diskutierten Auswirkungen von bFGF auf den Anteil der Photorezeptoren an der gesamten Zellpopulation und deren Opsin-Expression konnte in dieser Arbeit ein weiterer Effekt auf diesen Zelltyp nachgewiesen werden: bFGF zeigt hier einen Einfluss auf den Zeitraum, in denen die Photorezeptoren Islet2 exprimieren. Hieraus lässt sich eine zusätzliche Wirkungsweise von bFGF ableiten: Die geringere Anzahl von Zapfen und Stäbchen, welche in Anwesenheit von bFGF gebildet wird, bleibt über einen längeren Zeitraum in dem Islet2-positiven Stadium, als dies bei den Kontrollen oder der Suramin-Behandlung der Fall ist.

Der bisherigen Diskussion der vorliegenden Ergebnisse liegt durchweg die Annahme zugrunde, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen um einen direkt durch bFGF ausgelösten Effekt handelt. Dieser könnte sowohl in den Photorezeptoren selbst, als auch in einem anderen Zelltyp ausgelöst werden, der daraufhin auf die Photorezeptoren einwirkt. Die Betrachtung der Größenvermessungen von den entsprechend behandelten Sphäroiden zeigt jedoch, dass sich in diesen Experimenten eine positive Korrelation zwischen der Reaggregatgröße und der Differenzierungsgeschwindigkeit von Photorezeptoren zeigt: Die mit bFGF behandelten Proben waren zu allen Zeitpunkten der Kultivierung größer, die mit Suramin behandelten dagegen durchgehend kleiner als die Kontrollen. Sphäroide, die mit bFGF und Suramin kultiviert wurden, sind gegenüber den Kontrollen ebenfalls verkleinert. Die bislang gezogenen Schlussfolgerungen basieren wie oben bereits beschrieben auf der Hypothese, dass die Differenzierung von der – mit der Größe der Sphäroide korrelierenden – Diffusionsgeschwindigkeit eines weiterhin unbekanntem Faktors in den Sphäroid hinein abhängig ist. Dementsprechend lässt sich die eben geschilderte positive Korrelation nicht nur als ein direkter Effekt von bFGF, sondern auch als ein indirekter Effekt interpretieren: Veränderungen in der Reaggregatgröße könnten zu einer verlangsamten bzw. beschleunigten Diffusionsgeschwindigkeit des induzierenden Faktors führen, wodurch es zu zeitliche Abweichungen im Differenzierungsprozess kommt.

Gegen eine derartige Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sprechen die Resultate, die im Zuge der Behandlung von Sphäroiden mit Insulin gewonnen werden konnten: Sie zeigen eine stark beschleunigte Differenzierung von Stäbchen-Photorezeptoren, bei gleichzeitiger Größenzunahme der Sphäroide. Letztere fällt im Vergleich zu den bFGF-behandelten Sphäroiden deutlich stärker aus. Noch stärker wird die These eines direkten Effekts von bFGF durch die Ergebnisse der Kultivierung von Sphäroiden mit Insulin und bFGF zusammen ge-

stützt: In diesem Fall vergrößern sich die Sphäroide noch mehr als nach einer alleinigen Insulin-Behandlung, was auf einen kumulativen Effekt im Hinblick auf das Größenwachstum hindeutet. Im gleichen Moment bremst das bFGF jedoch den differenzierungsfördernden Effekt von Insulin ab.

Zusammengenommen sprechen die hier vorliegenden Ergebnisse für zwei unterschiedliche Wirkungen von bFGF auf, sich in der Entwicklung befindliche Retinazellen in Sphäroiden. Bei den Zellen, die bis zum Zeitpunkt der ersten bFGF-Applikation in ihrem Entwicklungsziel nicht determiniert sind, beeinflusst bFGF die Entwicklungstendenz zugunsten eines Nicht-Photorezeptor-Zelltyps. Dieser Effekt könnte sowohl durch eine direkte Interaktion mit den Photorezeptoren, als auch über die Bindung an einen weiteren Zelltyp erfolgen, die eine Beeinflussung der Photorezeptoren zur Folge hat.

bFGF kommt somit also als eines, der von Adler und Hatlee postulierten Neuron-induzierenden Signale in Frage, welche Vorläuferzellen in Kultur davon abhalten, einen „default-pathway“ in Richtung Photorezeptor-Differenzierung einzuschlagen (Adler and Hatlee 1989). Tatsächlich konnten im Rahmen dieser Arbeit mehrere Hinweise darauf gefunden werden: Analysen von sechs Tage alten Sphäroiden zeigten eine durch bFGF hervorgerufene Zunahme von Proteinen, welche vorwiegend in der inneren Retina exprimiert werden (vgl. Gliederungspunkt 4.3.8). Zusammengenommen weist dies auf eine Verschiebung des Differenzierungsschicksals der Zellen in den Sphäroiden zugunsten von Zelltypen der inneren Retina hin, was mit einem höheren Organisationsniveau der IPL-Bereiche in diesen Sphäroiden einhergeht.

Eine Erklärung für die hier postulierte Verschiebungen des Verhältnisses von Zelltypen der äußeren und inneren Retina durch bFGF findet sich in dem von Cepko postulierten Modell eines fixen Vorläuferpools in der sich entwickelnden Retina. Die Größe dieses Pools nimmt mit zunehmender Anzahl von postmitotischen Zellen immer weiter ab (Cepko 1999). Seine fixe Größe hat zur Folge, dass die vermehrte Produktion eines einzelnen Zelltyps zwangsläufig zu Lasten anderer Zelltypen geht, was sowohl für Retinazellen von Ratten, als auch von *Xenopus* bestätigt werden konnte (Lillien 1995; Dorsky, Chang et al. 1997). Für bFGF im Speziellen konnte gezeigt werden, dass dessen Überexpression in der sich entwickelnden *Xenopus*-Retina zu drastischen Veränderungen in der Zellzusammensetzung zugunsten von Ganglienzellen, bei gleichzeitiger Reduktion des Anteils von Müllerzellen führt (Patel and McFarlane 2000). Die hier gezeigten Daten deuten auf eine ebensolche Verschiebung im Differenzierungsschicksal der embryonalen Retinazellen aufgrund von bFGF hin. Die Tatsache, dass es zu einer erhöhten Anzahl von Müllerzellen kommt, könnte diese Verschiebung sogar

noch weiter vorantreiben, da diese Zellen durch ihre Produktion von CTNF die Zahl der gebildeten Photorezeptoren zugunsten von Zellen der inneren Retina beeinflussen können (Ezzeddine, Yang et al. 1997; Kirsch, Lee et al. 1997).

Die zweite Wirkung von bFGF, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, ist eine Verzögerung des Beginns der Opsin-Expression in den Zellen, die anhand von Visinin- und Islet2-Expression als bereits determinierte Photorezeptoren identifiziert werden können. Der Zeitraum der transienten Islet2-Expression ist gegenüber den Kontrollen deutlich verlängert. Dieser Effekt erscheint insofern stimmig, als dass für die Aufrechterhaltung des Vorläuferstadiums von Zellen der ziliären Marginalzone der Maus *in vitro* eine bFGF-Applikation als notwendig beschrieben wurde (Tropepe, Coles et al. 2000). Darüber hinaus ist bFGF in Kombination mit Insulin in der Lage, die Dedifferenzierung von Retinazellen in die Richtung von Vorläuferzellen einzuleiten (Fischer and Reh 2002; Fischer and Omar 2005). Auf der molekularen Ebene könnte die Ursache für dieses Phänomen in der, durch bFGF hervorgerufenen, Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade begründet sein, die nicht nur für embryonale Retinazellen insgesamt (Bhat and Zhang 1996; Desire, Courtois et al. 2000), sondern auch für postmitotische Photorezeptoren im Speziellen gezeigt werden konnte (Kinkl, Sahel et al. 2001). Eine solche Aktivierung kann Auswirkungen auf die Differenzierung von Zellen haben (Schaeffer and Weber 1999).

5.1.3 bFGF schützt die Photorezeptoren vor Apoptose

Neben den bereits besprochenen Wirkungen von bFGF auf die Differenzierung von Photorezeptoren, zeigt sich im Zuge des „*loss of function*“-Experiments mit Suramin ein weiterer Effekt hinsichtlich der Überlebensrate dieses Zelltyps. Wie unter Gliederungspunkt 4.1.8 beschrieben, kann bei Suramin-behandelten Sphäroiden am sechsten Kulturtag eine deutliche Steigerung der Apoptose-Rate von Photorezeptoren beobachtet werden. Am zehnten Tag sind diese Zellen beinahe komplett verschwunden. Ein Schutz von Photorezeptoren durch die Applikation von bFGF konnte dagegen nicht festgestellt werden. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass in den Kontrollen innerhalb des untersuchten Zeitraums noch keine drastischen apoptotischen Effekte im Hinblick auf diese Zellen beobachtet werden können. Der Schutz von Photorezeptoren vor Apoptose bzw. die Verlängerung ihrer Lebensdauer durch bFGF sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ist ein bekanntes Phänomen (Faktorovich, Steinberg et al. 1990; LaVail, Faktorovich et al. 1991; Fontaine, Kinkl et al. 1998; Kinkl, Sahel et al. 2001; Haynes, Gutierrez et al. 2007). Ein wichtiger Punkt, den es bei der Suche nach der

Ursache für dieses Phänomen zu beachten gilt ist, die oben geschilderte, vorzeitige Opsin-Expression der Photorezeptoren, welche nicht nur in den mit Suramin-, sondern auch den mit Suramin und bFGF zusammen kultivierten Sphäroiden auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität dieser Zellen für unterschiedliche, Apoptose hervorrufende Agenzien sich im Laufe ihrer Entwicklung drastisch verändert (Chiarini, Leal-Ferreira et al. 2003). Während der Migration und der anfänglichen Differenzierung von Zellen sind sie vor der Apoptose geschützt, da in dieser Phase die apoptotische Maschinerie der Zellen durch Suppressorproteine blockiert ist (Rehen, Neves et al. 1999). Eine frühere Differenzierung dieser Zellen würde den vorzeitigen Verlust dieses Schutzes vor Apoptose bedeuten.

Ein weiterer Grund für die vorzeitig eintretende Apoptose könnte sein, dass Photorezeptoren in den Sphäroiden keinerlei äußere Segmente ausbilden. Die gebildeten Opsine können somit nicht in ihren eigentlichen Bestimmungsort transportiert werden und bleiben während der gesamten Lebensdauer über die gesamte Zelle verteilt. Tatsächlich ist eine solche Dislokation von Opsinen in Photorezeptoren ein Symptom bei verschiedenen degenerativen Krankheiten der Retina, wie z. B. Retinitis pigmentosa, die zur Erblindung der Patienten führen (Bowes, van Veen et al. 1988; Portera-Cailliau, Sung et al. 1994; Sung, Makino et al. 1994; Li, Kljavin et al. 1995; Marszalek, Liu et al. 2000). Mit früherer Expression dieser Proteine könnte deren schädliche Wirkung früher zum Tragen kommen und so zu höheren Apoptose-Raten führen.

5.1.4 Insulin beschleunigt die Differenzierung von Photorezeptoren in den Sphäroiden

Auf der Suche nach einem Faktor, welcher die Differenzierung, genauer gesagt den Zeitpunkt der ersten Opsin-Expression von Stäbchen und Zapfen in den Sphäroiden reguliert, hat sich bFGF als ein Kandidat herausgestellt, der diesen Prozess in negativer Form regulieren kann. Ein positiver Effekt konnte dagegen durch die exogene Zugabe von Insulin hervorgerufen werden. Die Antikörperfärbungen mit Cern901 zeigten nicht nur einen erhöhten Signalanteil in den jeweiligen Sektoren, sondern auch ein rascheres Vordringen der Differenzierung in das Zentrum der Sphäroide hinein.

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Erhöhung des Signalanteils könnte in der, für Insulin bereits häufig postulierten Schutzfunktion vor Apoptose bei Retinazellen zu finden sein: Diese Wirkung konnte im Huhn für embryonale Retinazellen des Huhns sowohl für proliferierende als auch für differenzierende Zellen (Diaz, Serna et al. 2000; Chavarria, Valenciano et al. 2007) und an Mäusen speziell für Stäbchen-Photorezeptoren gezeigt werden (Yi,

Schubert et al. 2005; Rajala, Tanito et al. 2008). Tatsächlich ist die frühe Entwicklung der Sphäroide durch eine hohe Apoptose-Rate geprägt (Layer, Rothermel et al. 2001; Layer, Robitzki et al. 2002). Dass es sich bei diesen apoptotischen Zellen auch um Photorezeptoren handelt, zeigt die Tatsache, dass der Anteil von Photorezeptoren an allen TUNEL-positiven Zellen am sechsten Kulturtag auf über 30% beziffert werden konnte. Eine Verringerung dieses Anteils durch die Zugabe von Insulin könnte die Anzahl an differenzierenden Stäbchen im Sphäroid erhöhen, womit sich die z. T. drastische Zunahme des Signalanteils in den Sphäroiden erklären ließe.

Das ebenfalls beobachtete schnellere Vordringen von Opsin-positiven Zellen in das Sphäroid-Innere kann hingegen mit einer differenzierungsfördernden Wirkung von Insulin erklärt werden. Tatsächlich konnte für den Insulin-like-growth factor 1 (IFG-1) eine Vermehrung Rhodopsin-exprimierender Zellen bei der Kultivierung von Zellen der Pinealdrüse des Huhns nachgewiesen werden (Araki, Suzuki et al. 2007).

5.2 Die Vermessung der Zirkularität von Rosettensphäroiden ist ein nützliches Instrument für die Untersuchung der Wirkung verschiedener Agenzien auf die IPL-Bildung in den Reaggregaten

5.2.1 IPL-artige Bereiche und deren INL-artigen Begrenzungen sind für die Veränderungen in der Zirkularität von Sphäroiden im Verlaufe ihrer Kultivierung verantwortlich

Die Betrachtung mikroskopischer Aufnahmen von Rosettensphäroiden unterschiedlicher Kulturstadien macht deutlich, dass die Reaggregate über den Zeitraum ihrer Kultivierung hinweg eine charakteristische morphologische Entwicklung durchlaufen. Im Zuge dieser Entwicklungen kommt es nicht nur zu Veränderungen in der Größe, sondern auch in der Form. Diese Formveränderungen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals durch die Berechnung des Zirkularitätswertes der Sphäroide quantitativ erfasst. Die so gewonnenen Daten wurden zum einen für die Analyse der Sphäroide selbst, zum anderen für den Vergleich der Entwicklung von unterschiedlich behandelten Sphäroiden verwendet.

Die Untersuchung der Kernfärbungen von Kontrollsphäroiden hat gezeigt, dass den IPL-Bereichen bzw. den sie begrenzenden INL-artigen Bereichen eine entscheidende Rolle bei der Gestaltung der Morphologie von Sphäroiden zukommt: Indem sie sich zunächst in der Peripherie ansiedeln, sich anschließend über die Oberfläche der Reaggregate hervorwölben und zuletzt wieder in das Innere der Sphäroide zurückziehen, verändern sie deren Form in entscheidendem Maß. Ohne dieses Phänomen würden sich die Sphäroide im Verlauf der Kultivierung kontinuierlich einer perfekten Kreisform immer weiter annähern. Durch die Verschiebungen der IPL-Bereiche entfernen sich die Sphäroide dagegen vom vierten auf den sechsten Kulturtag wieder von dieser Kreisform.

Die im Anschluss noch diskutierten Daten, die im Rahmen dieser Arbeit über die Entwicklung der IPL-Bereiche gesammelt wurden, machen deutlich, dass die beobachtbaren Veränderungen ihrer Morphologie und ihrer Lage innerhalb der Sphäroide das Resultat zahlreicher Entwicklungsschritte sind. In ihrer Summe führen all diese Schritte jedoch zu einem anhand des Zirkularitätswertes gut zu untersuchenden Phänomen: Der vorhersagbaren Veränderung der Morphologie von Rosettensphäroiden im Verlaufe ihrer Entwicklung. Diese Arbeit er-

bringt den Beweis dafür, dass sich im Zuge einer Behandlung von Sphäroiden mit bestimmten Agenzien deren Morphologie gegenüber den Kontrollen verändern kann. Die daraus resultierenden Abweichungen in der Zirkularität von Sphäroiden weisen dementsprechend auf Veränderungen in ihrem Entwicklungsprozess hin. Damit erfüllt die Zirkularitätsmessung von Rosettensphäroiden ein entscheidendes Kriterium für die Anwendung bei der Charakterisierung von Effekten verschiedenster Agenzien auf die sich darin vollziehende IPL-Bildung.

5.2.2 Zellen innerhalb der INL-artigen Bereiche von Rosettensphäroiden werden frühzeitig einem Sortierungsprozess unterzogen.

Um das Phänomen der sich innerhalb der Sphäroide verschiebenden IPL-Bereiche genauer zu untersuchen, wurde zunächst die Rolle der Proliferation in diesem Prozess untersucht. Die dafür durchgeführten BrdU-Inkorporationsstudien hatten zur Folge, dass eine gesteigerte Teilungsrate der Zellen in den an der Oberfläche der Sphäroide gelegenen INL-artigen Bereichen als mögliche Ursache ausgeschlossen werden konnte. Die Daten zeigen vielmehr das Gegenteil: Die Zellen dieser Bereiche treten im Vergleich zu den restlichen Zellen der INL früher aus dem Proliferationszyklus aus. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Zellen in ein und demselben INL-artigen Bereich nicht gleichmäßig verteilt sind. Eine solche Ungleichverteilung kann unter anderem als Resultat eines Sortierungsprozesses gewertet werden. Tatsächlich wurden solche Sortierungsprozesse für Sphäroide bereits nachgewiesen (Layer, Robitzki et al. 2002). Dementsprechend kann es sich bei den Zellen an der Oberfläche um eine andere Zellpopulation handeln, als bei denen in den tiefer gelegenen INL-artigen Bereichen.

Kandidaten für diesen, an die Oberfläche sortierten postmitotischen Zelltyp, sind all jene Zellen, die während der Entwicklung der Retina früh geboren werden, also früh aus dem Proliferationszyklus austreten. Dementsprechend wurden diese Zellen zunächst auf die Expression von Proteinen untersucht, die als spezifische Marker für Ganglienzellen bekannt sind. Ganglienzellen sind die Zellen, die als erste in der Retina geboren werden. Sie verlassen bereits ab dem Ende des E2-Stadiums den Zellzyklus und sind ab dem E7-Stadium zu 100% postmitotisch (Prada, Puga et al. 1991; Snow and Robson 1994; Farah 2006).

Der Nachweis von Ganglienzellen in den Sphäroiden erfolgte zunächst mit einem Antikörper gegen den POU-Domänen-Transkriptionsfaktor Brn3.0. Dieser Faktor wird von über 90% der orthotopen Ganglienzellen, nicht aber von den „displaced“ Ganglienzellen in der proximalen INL exprimiert (Fischer, Dierks et al. 2002). Die Antikörperfärbungen mit diesem Marker

zeigen am zweiten Kulturtag noch einige wenige gefärbte Zellen. In späteren Stadien können jedoch keine solchen Zellen mehr gefunden werden. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Antikörperfärbungen gegen Neurofilament. Die Expression dieses Proteins ist in der Retina auf orthopische und ektopische Ganglienzellen und cholinerge Amakrinzellen beschränkt (Jasoni, Walker et al. 1994; Stanke, Lehman et al. 2008). Sie können in den Sphäroiden nach dem zweiten Kulturtag ebenfalls nur noch in geringsten Mengen nachgewiesen werden. Die geringen Mengen an Neurofilament, die auch nach sechs Tagen noch in und um die IPL-Bereiche herum nachweisbar sind, werden möglicherweise von cholinergen Amakrinzellen exprimiert, die zu den untersuchten Zeitpunkten in diesen Bereichen der Sphäroide vorhanden sind (vgl. Gliederungspunkt 4.2.6).

Zusammengenommen sprechen diese Daten für ein frühzeitiges Absterben von orthopischen und ektopischen Ganglienzellen in dem Sphäroidsystem. Dieses frühe Absterben ist insofern nicht überraschend, da es sowohl für zweidimensional kultivierte Retinazellen des Huhns (Nurcombe and Bennett 1981), als auch für Explantate von embryonalen Hühnerretinae beschrieben wurde (Yamagata and Sanes 1995).

Der Grund für das schnelle Aussterben dieses Zelltyps kann in der durch die Präparation hervorgerufene Trennung der Verbindung der Ganglienzellen mit dem optischen Tektum begründet liegen. Letzteres ist das Ziel, das von den Fortsätzen der Ganglienzellen innerviert wird. Tatsächlich führt die Entfernung des Tektums von Hühnerembryonen *in vivo* zu einer erhöhten Sterberate von Ganglienzellen (Franklin Hughes and La Velle 1975; Hughes and McLoon 1979). Im Gegenzug kann die Überlebensrate von Ganglienzellen des Huhns *in vitro* durch eine Co-Kultivierung mit Tektumzellen sogar noch über die *in vivo* beobachtete Rate gesteigert werden (Nurcombe and Bennett, 2006). Als Mediator dieses trophischen Effekts des Tektums auf Ganglienzellen konnte u. a. BDNF identifiziert werden. Sobald die Ganglienzellen das Tektum innerviert haben, wird ihr Überleben von diesem Faktor abhängig (Rodriguez-Tebar, Jeffrey et al. 1989).

Nachdem es sich bei den, an die Oberfläche sortierten und frühzeitig postmitotischen Zellen offensichtlich nicht um Ganglienzellen handelt, wurden diese auf die Expression von, für Amakrinzellen typische Proteine untersucht. Diese sind ab dem E9-Stadium vollständig postmitotisch und gehören damit ebenfalls zu den früh geborenen Zellen der Retina (Prada, Puga et al. 1991). Allerdings sind sie mit über 30 verschiedenen Subtypen der heterogenste Zelltyp der Retina, was die genauere Charakterisierung dieses Zelltyps erschwert. Einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei dem gesuchten Zelltyp um Amakrinzellen handelt, geben Antikörperfärbungen gegen Pax6. Dieses im Huhn von Horizontal-, Amakrin- und Ganglien-

zellen exprimierte Protein (Fischer, Dierks et al. 2002; Fischer, McGuire et al. 2002) konnte in beinahe allen Zellen des gesuchten Zelltyps nachgewiesen werden. Allerdings trifft dies auch für die restlichen Zellen innerhalb der INL-artigen Bereiche zu. Da Ganglienzellen – wie bereits beschrieben – in den Sphäroiden schnell absterben, bleiben lediglich Amakrin-, Horizontalzellen und Bipolarzellen als mögliche Kandidaten übrig. Bipolarzellen können jedoch aufgrund der Tatsache ausgeschlossen werden, dass ein Großteil dieser Zellen den Neurotransmitter GABA exprimiert (Ergebnisse nicht gezeigt). GABA wird in der Retina lediglich von Horizontal- und Amakrinzellen, nicht jedoch von Bipolarzellen exprimiert (Agardh, Bruun et al. 1986; Araki and Kimura 1991; da Costa Calaza, Hokoc et al. 2000)

Aufgrund der Ähnlichkeit in den Expressionsmustern dieser beiden Zelltypen konnte im Rahmen dieser Arbeit kein gesicherter Beweis dafür erzielt werden, ob es sich bei dem gesuchten Zelltyp um Amakrin- oder Horizontalzellen handelt. Allerdings geben Antikörperfärbungen an Schnitten von Sphäroiden gegen die Proteine Calretinin und Tenascin deutliche Hinweise darauf, dass der fragliche Zelltyp den Amakrinzellen zugeordnet werden kann. Sowohl das Kalzium-bindende Protein Calretinin, als auch extrazelluläre Matrix-Protein Tenascin werden von diesen beiden Zelltypen exprimiert (Ellis, Richards et al. 1991; Bartsch, Husmann et al. 1995): In Analogie zu den Horizontalzellen der Retina finden sich in den Sphäroiden in direkter Nähe zu den, sich an die Rosetten anschließenden OPL-Bereichen gefärbte Zellkörper, die ihre Fortsätze in eben diese plexiformen Bereiche hinein senden. Gleichzeitig finden sich Zellen die innerhalb der INL-artigen Bereiche lokalisiert sind und von dort aus in die IPL-Bereiche hinein projizieren. Diese Übereinstimmungen in Lage und Fortsatzausrichtung mit den Amakrinzellen der Retina können als entscheidender Anhaltspunkt dafür gewertet werden, dass es sich bei den Zellen der INL-artigen Bereiche auf der Oberfläche der Sphäroide tatsächlich um Amakrinzellen handelt. Eine genauere Bestimmung des Typs von Amakrinzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erzielt werden. Antikörperfärbungen gegen ChAT weisen jedoch auf eine heterogene Amakrin-Population hin: Lediglich einige wenige der untersuchten Zellen exprimieren dieses, für cholinerge Amakrinzellen typische Protein (Millar, Ishimoto et al. 1985; Spira, Millar et al. 1987; Prada, Medina et al. 1999; Stanke, Lehman et al. 2008). Andere dagegen sind positiv für das bereits erwähnte Kalzium-bindende Protein Calretinin. In einer homogenen Amakrinzell-Population wären entweder alle, oder aber keine Zellen positiv für dieses Protein.

5.2.3 Die Ausdehnung der IPL-Bereiche in den Sphäroiden fällt

mit der Ausbildung von histotypischen Sublaminae in deren Innerem zusammen

Ein weiterer Schritt auf der Suche nach der Ursache für die Bewegungen der IPL-Bereiche in den Sphäroiden war die Analyse der Strukturbildung im Inneren dieser Bereiche. Vorausgreifend kann gesagt werden, dass im Rahmen dieser Studien eine positive Korrelation des Ausdehnungsgrads der IPL-Bereiche mit dem darin nachweisbaren Organisationsgrad nachgewiesen werden konnte. Tatsächlich geht die zunehmende Ausdehnung der plexiformen Bereiche über die Sphäroidoberfläche hinaus mit zwei Phänomenen einher: bei dem ersten handelt es sich um die Einwanderung von Zellen in die IPL-Bereiche hinein. Dabei verlassen mehrere, häufig ringförmig angeordnete Zellen die INL-artigen Bereiche und bewegen sich von dort aus in das Zentrum der IPL-Bereiche hinein. Bis in hohe Kulturstadien hinein bleiben innerhalb der IPL-Bereiche stets solche Zellen nachweisbar.

Anhand von Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, dass diese einwandernden Zellen ChAT, Islet1, GABA und in geringem Maße Pax6 exprimieren. Sowohl das Migrationsverhalten, als auch das Expressionsmuster dieser Zellen ist übereinstimmend mit dem, welches für cholinerge Amakrinzellen beschrieben ist (Prada, Puelles et al. 1987; Spira, Millar et al. 1987; Stanke, Lehman et al. 2008). Dieser aus einer Population undifferenzierter, postmitotischer Vorläuferzellen hervorgehende Zelltyp wandert im Verlauf der Embryonalentwicklung ebenfalls in die IPL hinein, um dort mit seiner Differenzierung zu beginnen. Dort entwickeln sich diese Zellen letzten Endes zu cholinergen Amakrinzellen des Typs I und II. Die Zellen des Typs I wandern zurück in die INL, während sich die des Typs II in der Ganglienzellschicht platzieren, wodurch letztlich keine Zellen mehr in der IPL zu finden sind (Prada, Puelles et al. 1987; Spira, Millar et al. 1987). An diesem Punkt zeigt sich eine Differenz zu den Sphäroiden, in denen – wie bereits erwähnt – auch in späten Kulturstadien noch Zellen innerhalb der IPL-Bereiche vorhanden sind. Dementsprechend stellt sich die Frage, inwieweit die Zellen in den IPL-Bereichen von Sphäroiden im Anschluss an ihre dort stattfindende Differenzierung noch einmal zu wandern beginnen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten geben Hinweise darauf, dass ein Teil dieser Zellen tatsächlich wieder in die INL-artigen Bereiche zurückwandert, während ein anderer Teil in der IPL verbleibt. Dies zeigt sich bei der Betrachtung von Antikörperfärbungen gegen ChAT, die gleichzeitig das oben bereits angedeutete zweite Phänomen sichtbar machen, welches sich im Zeitrahmen der zunehmenden Ausdehnung der plexiformen Bereiche in den Sphäroiden beobachten lässt: die Ausbildung histotypischer Subbanden innerhalb der IPL-

Bereiche von Sphäroiden.

In der Hühnerretina bilden sich im Laufe der Entwicklung insgesamt fünf solcher Subbanden innerhalb der IPL aus (Millar, Ishimoto et al. 1985; Spira, Millar et al. 1987). Solche Subbanden sind synaptische Zonen, in denen spezielle Zellen miteinander Verbindungen eingehen (Kolb 1997). ChAT-Färbungen an Retinaschnitten des Huhns zeigen, dass sowohl die cholinergen Amakrinzellen vom Typ I, als auch die des Typs II in eine, dieser Subbanden innerhalb der IPL hinein projizieren, wodurch sich zwei voneinander getrennte ChAT-Banden in der Retina beobachten lassen (Millar, Ishimoto et al. 1985; Spira, Millar et al. 1987; Prada, Medina et al. 1999; Stanke, Lehman et al. 2008). Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt schließlich noch ein dritter Typ von cholinergen Amakrinzellen hinzu, deren Zellkörper oberhalb der Typ I-Zellen liegen und die ebenfalls einen Fortsatz in die IPL hineinsenden (Prada, Medina et al. 1999; Stanke, Lehman et al. 2008).

In den Sphäroiden bilden die cholinergen Zellen innerhalb der IPL-Bereiche ein vergleichbares Netzwerk aus. Auch dort lassen sich drei unterschiedliche ChAT-positive Zelltypen unterscheiden. Der erste Zelltyp ist in den INL-artigen Bereichen lokalisiert. Die Zellkörper dieses Typs liegen in der ersten Zellreihe, welche die IPL begrenzen. Sie besitzen kurze Fortsätze, die sich unmittelbar nach dem Eintritt in die IPL verzweigen und so mit den anderen Zellen dieses Typs untereinander eine Subbande ausbilden. Sie verläuft direkt an der Grenze zwischen der INL und der IPL. Der zweite ChAT-positive Zelltyp ist innerhalb der IPL-Bereiche zu finden. Auch diese Zellen scheinen sich untereinander zu vernetzen. Der dritte Zelltyp ist ebenfalls in den INL-artigen Bereichen lokalisiert ist. Er ist im Vergleich zum ersten Zelltyp weiter von der IPL entfernt und besitzt einen langen Fortsatz, der tief in die IPL hineinzieht.

Legt man diesen Ergebnisse die von Prada et al. postulierte Hypothese zugrunde, dass die cholinergen Amakrinzellen vom Typ I und II innerhalb der IPL differenzieren und sich anschließend zu ihren Endpositionen bewegen, lässt sich daraus eine Theorie formulieren, wie sie in Abb. 75 schematisch dargestellt ist. Im Anschluss an die Anlage der IPL-Bereiche wandern aus den sie umgebenden INL-artigen Bereichen Vorläuferzellen in die plexiformen Areale hinein (siehe grau unterlegte Zellen in Abb. 75 A-B). Dort kommt es zu deren weiteren Differenzierung und der sich anschließenden Aufspaltung dieser Zellpopulationen in die cholinergen Amakrinzellen des Typs I (blaue, mit Sternen gekennzeichnete Zellen in Abb. 75 D) und II (grüne, mit Dreiecken gekennzeichnete Zellen in Abb. 75 D). Die Zellen des Typs I wandern anschließend wieder in die INL-artigen Bereiche zurück. Hinweise darauf geben die häufig in direkter Nachbarschaft zu den ringförmig angeordneten Zellgruppen liegenden Zellen innerhalb der IPL-Bereiche (vgl. Gliederungspunkt 4.2.3). Zuletzt positionieren sie sich

innerhalb der INL in unmittelbarer Nachbarschaft zur IPL und bilden miteinander die oben beschriebene Subbande aus (siehe Abb. 75 E). Den ebenfalls miteinander vernetzten Zellen des Typs II fehlt dagegen, aufgrund der im Sphäroid nicht vorhandenen GCL, das Ziel. Dementsprechend verharren sie innerhalb der IPL-Bereiche, was die Anwesenheit von Zellen in diesen Strukturen bis ins hohe Alter von Sphäroiden erklären würde. Schlussendlich bildet sich in den Sphäroiden offensichtlich auch noch der dritte Typ der cholinergen Amakrinzellen heraus. Dabei handelt es sich um die tiefer als die Zellen vom Typ I in den INL-artigen Bereichen liegenden Zellen mit langem Fortsatz (siehe grau unterlegte Zellen in Abb. 75 E).

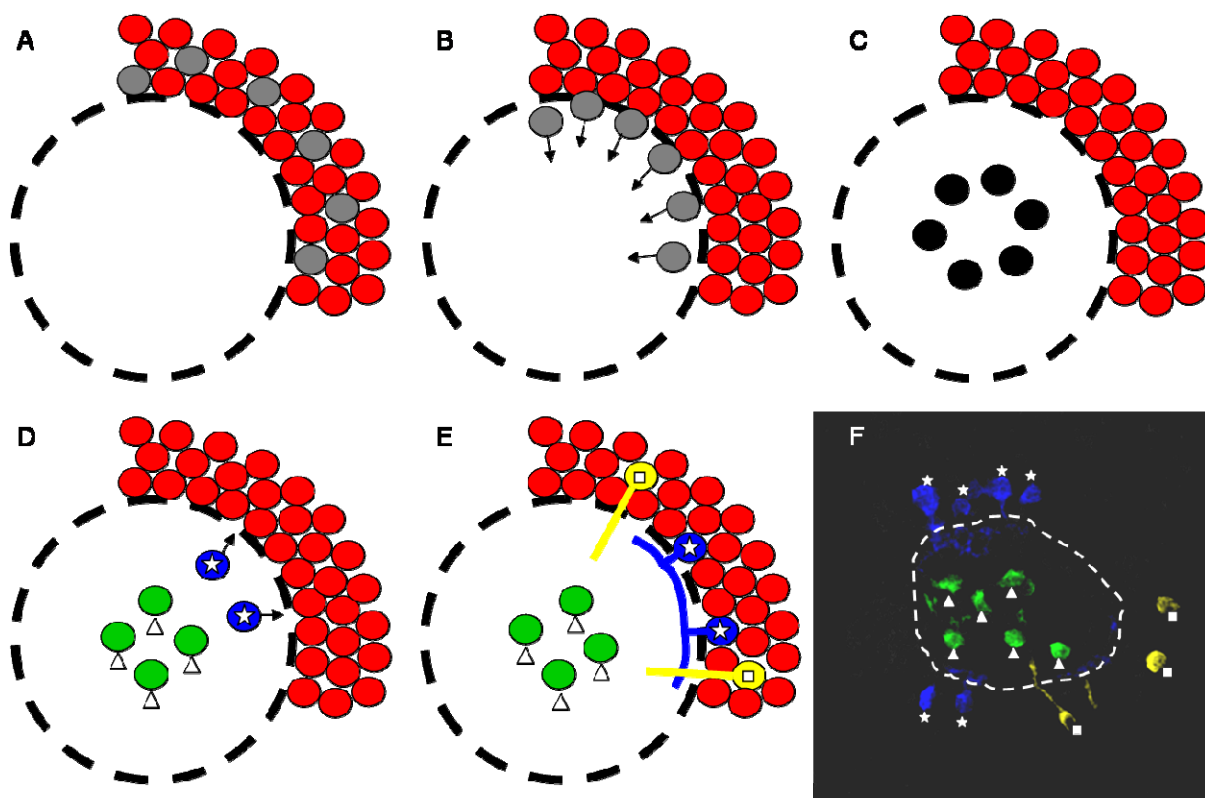


Abbildung 75: Schematische Darstellung des Differenzierungsprozesses cholinerg Amakrinzellen in Rosettensphäroiden. A-E: Die Differenzierung der cholinerg Amakrinzellen in Rosettensphäroiden erfolgt durch die Einwanderung von undifferenzierten Vorläuferzellen (grau) in die Anlagen der IPL-Bereiche (gestrichelte Linie). Im Laufe dieser Wanderung durchqueren sie die, die plexiformen Areale umgebenden INL-artigen Bereichen (rot). Innerhalb der IPL-Bereiche erfolgt zunächst eine weitere Phase der Differenzierung (schwarze Zellen in C), bevor es zur Aufspaltung der Population in cholinerge Zellen des Typs I (blau, Sterne) und II (grün, Dreiecke) kommt. Die Zellen des Typs I bewegen sich in die INL-artigen Bereiche zurück, während der Typ II innerhalb der IPL-Bereiche bleibt. Darüber hinaus differenziert sich noch ein dritter Typ von cholinerg Amakrinzellen (gelb, Rechtecke), welcher sich von den Zellen vom Typ I durch seine längeren Fortsätze und den größeren Abstand seines Zellkörpers von der IPL-Grenze unterscheidet. F: Mit Falschfarben unterlegte Darstellung der unter Gliederungspunkt XY dargestellten Abb. 37. Gezeigt ist ein immunhistochemisch gegen ChAT gefärbter IPL-Bereich eines sechs Tage alten Sphäroids. Die verwendeten Farben und Symbole entsprechen denen, die

auch in A-E verwendet wurden.

Neben den ChAT-positiven Zellen beteiligen sich noch weitere Zellen an der Ausbildung von Sublaminae in den IPL-Bereichen der Sphäroide. Färbungen gegen Calretinin zeigen ebenfalls Zellen, die vom vierten auf den sechsten Kulturtag Fortsätze in die IPL-Bereiche hinein senden, wo diese sich untereinander vernetzen. Obwohl sich Calretinin in allen neuronalen Zelltypen der Retina nachweisen lässt (Ellis, Richards et al. 1991), lassen die unipolare Morphologie und die Projektion dieser Zellen in die IPL hinein darauf schließen, dass es sich hierbei um Amakrinzellen handelt.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, wie sich die hier beschriebenen Strukturen innerhalb der IPL-Bereiche entwickeln können. In der Hühnerretina führt die Freisetzung von Acetylcholin durch cholinerge Amakrinzellen zu spontanen elektrischen Aktivitäten, welche die Strukturierung der IPL vorantreiben (Sernagor and Grzywacz 1996; Wong, Myhr et al. 2000). Auch im Sphäroidsystem zeigte sich eine frühe Akkumulation cholinergere Zellen in und um die sich entwickelnden IPL-Bereiche herum, was auf einen ähnlichen Input dieses Zelltyps bei deren Strukturierung schließen lässt. Einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Antwort zu dieser Frage geben jedoch auch die unter Gliederungspunkt 4.2.6 und 4.2.8 präsentierten Doppelfärbungen von Sphäroiden gegen Vimentin und Calretinin bzw. gegen Vimentin und ChAT. Am vierten Kulturtag zeigen sie IPL-Bereiche, die bereits ein vollständiges Müllerzellgerüst beinhalten. Zu diesem Zeitpunkt sind sowohl ChAT, als auch Calretinin-positive Zellen bereits in den INL-artigen Bereichen zu erkennen. Ihre Fortsätze projizieren jedoch erst innerhalb der nächsten zwei Kulturtage in die IPL hinein. Ähnliches gilt für die ChAT-positive Zellpopulation innerhalb der IPL-Bereiche. Noch bevor sich diese Zellen in die IPL-Bereiche hinein bewegen, sind bereits zahlreiche Vimentin- bzw. Translin-positive Fasern in diesen Strukturen vorhanden. Dieser Sachverhalt lässt die Hypothese zu, dass Müllerzellen das Gerüst bilden, welches die Ausbildung dieser Strukturen erst ermöglicht. Die Wanderung von Zellen und Zellfortsätzen würde in diesem Fall entlang der Fortsätze von Müllerzellen erfolgen. Dieses Prinzip eines Glia-Gerüsts, auf dem Neurone zu ihren Zielorten wandern, findet sich ebenfalls in anderen Gehirnarealen wie dem Cortex (Rakic 1972; Luskin, Pearlman et al. 1988), dem Rückenmark (Leber, Breedlove et al. 1990) und dem optischen Tektum (Puelles and Bendala 1978; Senut and Alvarado-Mallart 1987; Gray and Sanes 1991). In der Retina gibt es Hinweise darauf, dass das durch Müllerzellen gebildete Radialgerüst die aus einer bestimmten Vorläuferzelle hervorgegangenen Neuronen innerhalb ein und derselben Zellkolumne festhält. Die parallel zu der Ausrichtung von den radial organisierten Müllerzel-

len verlaufenden Wanderungen solcher Zellen im Laufe ihrer Entwicklung, finden dementsprechend innerhalb dieser Zellkolumnen statt (Layer, Alber et al. 1990; Willbold, Reinicke et al. 1995). Auch die, im Zuge von Verletzungen auftretenden, Wanderungen von Neuronen in der Retina des Zebrafischs erfolgen in enger Assoziation mit den Fortsätzen von Müllerzellen (Yurco and Cameron 2005). Das alles gibt Hinweise darauf, dass die in der Retina zu beobachtende Wanderung von cholinergen Amakrinzellen ebenfalls in den, durch Vimentin exprimierenden Zellen gebildeten, radialen Zellkolumnen stattfinden könnte. Solch eine radiale Anordnung von Müllerzellen ist auch in den IPL-Bereichen der Sphäroide erkennbar, was auf eine ähnliche Form der Migration von diesen Zellen *in vitro* schließen lässt. Auch die Ausbildung der Subbanden erscheint vor diesem Hintergrund von Müllerzellen abhängig zu sein. Doppelfärbungen zeigen, dass die Fortsätze von Neuronen dicht mit den Fortsätzen der Gliazellen assoziiert sind. Dementsprechend scheinen auch hier die Müllerzellfortsätze eine Rolle als Wegweiser für Neuronen einzunehmen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen zu den Strukturierungen der IPL-Bereiche anhand von Färbungen gegen Müllerzellen und ChAT-positiven Zellen konnte zusätzlich zu den bislang geschilderten Ergebnissen ein Phänomen beobachtet werden, welches an dieser Stelle noch einmal besonders betont werden soll. Dabei handelt es sich um den Nachweis einer Zellpopulation in den frühen Sphäroiden, die sowohl die Intermediärfilamente Vimentin und Transitin, als auch ChAT exprimieren. Sie sind in nächster Nähe zu den sich entwickelnden IPL-Bereichen zu finden. Obwohl beide Intermediärfilamente während der frühen Retinaentwicklung zunächst in allen Vorläuferzellen vorkommen (Lemmon and Rieser 1983; Fischer and Omar 2005), ist bislang keine solche Colokalisation mit ChAT beschrieben worden. Die Tatsache, dass zu den Zeitpunkten, in denen sich keine solche Colokalisation mehr nachweisen lässt, die Zellkörper einer alleine Transitin- bzw. Vimentin-exprimierenden und einer ChAT-positiven Zelle direkt nebeneinander liegen, lässt folgende Vermutung zu: Müllerzellen und cholinerge Amakrinzellen könnten einen gemeinsamen Vorläufer besitzen, welcher bei der Strukturierung der IPL-Bereiche eine wichtige Rolle einnimmt.

All diese Ergebnisse zeigen, dass sich in den IPL-Bereichen der Sphäroide innerhalb des untersuchten Zeitraums zahlreiche Entwicklungsschritte vollziehen. Inwieweit diese Phänomene in direktem Zusammenhang mit der im gleichen Zeitraum beobachteten Ausdehnung dieser Bereiche in den Sphäroiden zusammenhängt, ist unklar. Allerdings ist es eine mögliche Hypothese, dass sich durch die Einwanderung von Zellen und Zellfortsätzen in den IPL-Bereich und die damit einhergehende Strukturbildung dort ein erhöhter Druck aufbaut, der zu dessen Ausdehnung führt. Auch *in vivo* vergrößert sich die IPL, während sich ihr Organisationsgrad

erhöht.

Für eine solche Ausdehnung der IPL-Bereiche im Sphäroid spricht die Tatsache, dass der Flächenanteil der IPL-Bereiche an den Sphäroiden vom vierten auf den sechsten Tag zunimmt, obwohl sich deren durchschnittliche Anzahl gleichzeitig geringfügig verringert. Die Tatsache, dass diese Ausdehnung stets in Richtung der Sphäroidoberfläche erfolgt, könnte darin begründet liegen, dass dort lediglich ein schmaler INL-artiger Bereich, der wahrscheinlich von Amakrinzellen gebildet wird (vgl. Gliederungspunkt 4.2.4 – 4.2.7), die IPL von dem umgebenden Reaggregationsmedium abgrenzt. In anderen Bereichen schließt sich dagegen in der Regel direkt hinter der INL ein unorganisierter Bereich an, wodurch der Widerstand in diesen Bereichen größer ist, als an der Oberfläche. Dementsprechend führt der Druck genau an den Stellen des Reagregats zu Verformungen, die dem zunehmenden Druck in dem plexiformen Bereich den geringsten Widerstand bieten.

5.2.4 Der Rückzug der plexiformen Bereiche in das Zentrum des Sphäroids wird durch Müllerzellen organisiert.

Bis zu diesem Punkt wurde die zunehmende Ausdehnung von IPL-Bereichen in dem Kontext der sich zur selben Zeit vollziehenden Ausbildung histotypischer Strukturen in diesen Bereichen diskutiert. Im Anschluss soll deren ebenfalls zu beobachtender Rückzug in das Innere der Sphäroide und der parallel auftretende Verlust des vorher erreichten Organisationsgrades besprochen werden. Dieser Rückzug der IPL-Bereiche ist nicht gleichbedeutend mit einer Abnahme des Anteils der plexiformen Schichten an der gesamten Fläche des Sphäroids. Vermessungen von Sphäroidschnitten und den darin enthaltenen IPL-Bereichen zeigen, dass deren Anteil an der Fläche vom sechsten auf den achten Kulturtag nahezu konstant bleibt. Dies deutet darauf hin, dass die Zahl der darin enthaltenen Fortsätze konstant bleibt, obgleich diese nicht mehr in den entsprechenden Strukturen organisiert sind. Damit deutet alles auf eine andere Ursache für den Rückzug der IPL-Bereiche, als den darin stattfindenden Verlust der histotypischen Strukturierung.

An dieser Stelle gilt es, die Ergebnisse der Vimentin- und Transitin-Färbungen zu berücksichtigen: Sie zeigen, dass der Zeitpunkt des Rückzuges der IPL-Bereiche mit einer Zunahme von parallel zur Sphäroidoberfläche verlaufenden Zellfortsätzen zusammenfällt, die positiv für diese beiden Proteine sind. Dies lässt sich besonders gut innerhalb der IPL-Bereiche beobachten. Dort positionieren sich einzelne gefärbte Zellen direkt unter der Sphäroidoberfläche und bilden zwei parallel zur Oberfläche laufende Fortsätze aus. Zu dem Zeitpunkt, zu dem dies

beobachtet werden kann, sollte die Expression dieser beiden Proteine bereits auf die Müllerzellen beschränkt sein (Lemmon and Rieser 1983; Fischer and Omar 2005). Müllerzellen bilden also innerhalb dieses Zeitraums ein direkt unter der Oberfläche verlaufendes Fasernetzwerk aus, dessen Dichte bis zum zehnten Kulturtag stetig zunimmt. Im gleichen Zeitraum nimmt auch die Zirkularität der Sphäroide stetig zu.

Dieser erste Hinweis darauf, dass der Rückzug der IPL-Bereiche in das Innere der Sphäroide mit der Ausbildung dieses Fasernetzwerks zusammenhängt, wird durch die Ergebnisse der bFGF-Behandlung zusätzlich unterstützt: Obwohl in Kontrollen und bFGF-behandelten Sphäroiden die IPL-Bereiche am sechsten Kulturtag nahezu den gleichen Flächenanteil an den Reaggregaten aufweisen, dehnen sich diese zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger über die Oberfläche hinaus aus, als dies in den Kontrollen der Fall ist. Dies zeigt sich in der gesteigerten Zirkularität der bFGF-Sphäroide zu diesem Zeitpunkt. Ein Vergleich der Vimentin- und Transitin-Färbungen von bFGF-behandelten und Kontrollsphäroiden zeigt aber auch, dass bFGF zur gleichen Zeit die Ausbildung des Müllerzell-Fasernetzwerks verstärkt. Grund für die erhöhte Zahl von Fortsätzen könnte eine Vermehrung von Müllerzellen in den bFGF-behandelten Sphäroiden gegenüber den Kontrollen sein. Tatsächlich gibt es deutliche Hinweise darauf, dass bFGF spezifisch die Proliferation dieses Zelltyps in den Sphäroiden erhöht. Die Behandlung von Sphäroiden mit bFGF von Beginn der Kultivierung an führt zu einem verstärkten BrdU-Einbau bis zum fünften Kulturtag. Inwiefern hier ein bestimmter Zelltyp, oder aber alle Zellen gleichermaßen zur vermehrten Teilung angeregt werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nicht jede Steigerung der Proliferation automatisch zu einer gesteigerten Zirkularität führt: die Kultivierung von Sphäroiden in Gegenwart von Insulin steigert die Proliferation in den frühen Kulturstadien der Sphäroide, ohne Veränderungen in deren Zirkularität hervorzurufen. Dies wurde als ein weiterer Hinweis darauf gewertet, dass lediglich die gesteigerte Proliferation eines bestimmten Zelltyps – in diesem Falle also Müllerzellen – die Zirkularität der Sphäroide beeinflussen könnte.

Der nächste Schritt für den Beweis dieser Hypothese war die erstmalige Applikation von bFGF am vierten, bzw. am sechsten Kulturtag. Es zeigt sich, dass diese Behandlung bereits innerhalb von 24 Stunden drastische Steigerungen in der Zirkularität von Sphäroiden hervorzurufen kann. BrdU-Studien zeigen bei der erstmaligen Zugabe von bFGF am vierten Kulturtag eine Zunahme der Proliferation in peripher angesiedelten Zellen innerhalb dieses Zeitraums. Eine Bestimmung dieses Zelltyps konnte nicht vorgenommen werden. Dies gelang jedoch, wenn bFGF zum ersten Mal bei zehn Tage alten Sphäroiden appliziert wurde. Hier zeigen

sich ebenfalls bereits nach 24 Stunden zahlreiche BrdU-positive Zellen in der Peripherie der Sphäroide. Sie konnten anhand von Glutaminsynthetase-Färbungen als Müllerzellen identifiziert werden.

Den letzten Hinweis darauf, dass Müllerzellen für die Veränderungen der Zirkularität, und somit auch für die Regulation der IPL-Entwicklung verantwortlich sind, zeigen die Versuche mit unterschiedlichen bFGF-Konzentrationen. Sphäroide die von Beginn ihrer Kultivierung an mit lediglich 1ng/ml bFGF behandelt wurden, zeigen gegenüber den Kontrollen eine geringere Zunahme in ihrer Zirkularität als die Proben, die mit 10 ng/ml bFGF kultiviert wurden. In Analogie dazu regt 1 ng/ml bFGF bei erstmaliger Applikation am zehnten Kulturtag auch weniger Zellen zur Proliferation an, als dies bei der Zugabe von 10 ng/ml der Fall ist.

Die bFGF-Applikation führte also unabhängig vom Zeitpunkt der erstmaligen Applikation zu a) einer Zunahme in der Zirkularität und b) zu einer verstärkten bzw. neu einsetzenden Proliferation von Zellen in der Peripherie der Sphäroide. Letztere konnte in einem Fall direkt als Müllerzellen identifiziert werden. Zusammen mit der verstärkten Vimentin- und Transitin-Expression in genau diesen peripheren Bereichen spricht dies für einen direkten Einfluss von bFGF auf das Proliferationsverhalten von Müllerzellen. Dabei ist es erstaunlich zu sehen, dass dieser Effekt sowohl in undifferenzierten Müllerzell-Vorläufern der vier Tage alten, als auch in den bereits differenzierten Glutaminsynthetase-positiven Müllerzellen der 10 Tage alten Sphäroide nachweisbar ist.

Hinweise auf eine solche Wirkung von bFGF finden sich allerdings auch in der Literatur: Bei Injektionen in das Auge postnataler Hühner zeigte bFGF alleine zwar keine Effekte, in Kombination mit Insulin verursachte es jedoch den Wiedereintritt differenzierter Müllerzellen in den Zellzyklus (Fischer, McGuire et al. 2002). Dieser scheinbare Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen wird relativiert, wenn man sich die Ergebnisse der Kombination dieser beiden Wirkstoffe im Sphäroidsystem betrachtet: Hier kann erstmals eine kontinuierliche Steigerung der Zirkularität über die gesamte Kulturdauer hinweg beobachtet werden. Die - selbst bei bFGF zu beobachtende - Verminderung der Zirkularität vom vierten auf den sechsten Kulturtag weicht hier einem, in diesem Zeitraum nahezu gleich bleibendem Wert. Eine Kombination von Insulin und bFGF hat also offensichtlich einen noch größeren Effekt auf die Müllerzellen im Sphäroidsystem als bFGF alleine.

Für undifferenzierte Müllerzellen konnte bei neonatalen Ratten ebenfalls eine verstärkte Proliferation im Zuge einer bFGF-Behandlung nachgewiesen werden (Guilarducci-Ferraz, da Silva et al. 2008).

Ein letzter Punkt, welcher im Rahmen dieses Effekts von bFGF auf die Müllerzellen diskutiert

werden muss, ist dessen Reversibilität. Wird die bFGF-Zufuhr für die Sphäroide gestoppt, führt das zu einem Absinken der Zirkularität auf Kontrollniveau. Dies zeigt, dass die auf die Behandlung reagierenden Zellen von einer konstanten Zufuhr von bFGF abhängig sind, um die gesteigerte Zirkularität aufrechtzuerhalten. An diesem Punkt stellt sich die Frage, um was es sich dabei für eine Aktivität handelt. Offensichtlich handelt es sich hierbei um schnelle Veränderungen in der Struktur des Fortsatzgeflechts der IPL-Bereiche. Die Reversibilität dieses Vorgangs lässt dabei auf eine aktive, gerichtete Bewegung von Zellfortsätzen schließen, die rückgängig gemacht werden kann bzw. rückgängig gemacht wird, wenn die bFGF-Konzentration unter einen kritischen Wert fällt. An diesem Punkt fällt jedoch auf, dass diese Bewegung offensichtlich auch zu einem späteren Zeitpunkt in den Kontrollen durchgeführt wird, da auch sie zum Ende der Kultur hohe Zirkularitätswerte erreichen. Offensichtlich reicht das im Kontrollmedium enthaltene bFGF also ebenfalls aus, um diesen Prozess in Gang zu setzen. Dies führt zu der Frage, warum das nach dem Stopp der bFGF-Applikation weiterhin im Medium enthaltene bFGF nicht ausreicht, um die Zirkularität-erhöhende Aktivität nicht zumindest auf dem gleichen Niveau zu halten. Die Antwort auf diese Frage liegt in einer möglichen Verringerung der Expression von bFGF-Rezeptoren in Anwesenheit hoher bFGF-Konzentrationen, wie es in ähnlicher Form für Photorezeptoren der Ratte postuliert wurde (Hicks and Courtois 1992; Fontaine, Kinkl et al. 1998). Durch diesen Prozess ist das bFGF-Konzentrationsniveau des Kontrollmediums nicht mehr ausreichend um die Zirkularität-erhöhende Aktivität aufrecht zu erhalten. Die Folge ist ein Rückfall auf das Zirkularitätsniveau der Kontrollen.

Zusammengenommen resultiert aus den hier geschilderten Phänomenen ein klarer Hinweis auf eine entscheidende Rolle von Müllerzellen bei der Regulation der IPL-Entwicklung in den Sphäroiden. Dafür spricht auch die Tatsache, dass diese Entwicklung durch die Zugabe von Alpha-Aminoadipinsäure (AAA) in das Reaggregationsmedium beeinflusst werden kann. Diese ausschließlich auf die Müllerzellen wirkende Behandlung führt dazu, dass die IPL-Bereiche sich zwar über die Oberfläche hinaus ausdehnen, aber anschließend deutlich langsamer wieder zurückziehen, als dies in den Kontrollen der Fall ist (Tangaraj, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus konnte die ausschlaggebende Rolle von Müllerzellen für die histotypische Organisation von Sphäroiden bereits mehrfach nachgewiesen werden: Sie sind nicht nur für die Stabilisierung von Zellkolumnen in Stratosphäroiden, sondern auch für die korrekte Laminierung von Stratoiden verantwortlich (Layer, Alber et al. 1990; Willbold, Reinicke et al. 1995; Willbold, Rothermel et al. 2000).

5.2.5 Müllerzellen ermöglichen die Fusion einzelner IPL-Bereiche miteinander und führen somit zu der Ausbildung einer vollständigen laminaren Struktur in Rosettensphäroiden

Wie unter Gliederungspunkt 5.2.4 bereits dargestellt wurde, gibt es mehrere Hinweise darauf, dass Müllerzellen eine Rolle bei der Regulation von Bewegungen der IPL-Bereiche in den Sphäroiden spielen und dieser Zelltyp gleichzeitig durch die Behandlung mit bFGF zu zusätzlicher Proliferation angeregt wird. Vor dem Hintergrund der tragenden Rolle von Müllerzellen bei der Strukturierung von Sphäroiden werfen diese Ergebnisse folgende Frage auf: Hat eine erhöhte Anzahl von Müllerzellen eine Auswirkung auf den Organisationsgrad der Rosettensphäroide? Für den Fall, dass sich dies bestätigen sollte, stellte sich außerdem die Frage, inwiefern sich ein höherer Organisationsgrad in den Sphäroiden bemerkbar macht und wie dieser quantitativ ausgewertet werden könnte. Bislang wurden zwei unterschiedliche Effekte auf den Organisationsgrad von Sphäroiden beschrieben. Beim ersten handelt es sich um die Etablierung einer korrekten Stratifizierung in den Sphäroiden bei der Herstellung von Stratoiden mit Hilfe der Überstände von kultivierten RPE- und Müllerzellen (Rothermel, Willbold et al. 1997; Willbold, Rothermel et al. 2000), oder aber durch den Einbau Wnt2b-überexprimierender Zellen in die Sphäroide (Nakagawa, Takada et al. 2003). Der zweite – ebenfalls durch den Überstand von RPE-Zellen hervorgerufene – Effekt wurde für Sphäroide aus den postnatalen Retinae von Gerbils beschrieben. Hierbei kommt es zu der verstärkten Fusion von mehreren, zuvor voneinander getrennten IPL-Bereichen. Diese Fusion führt zur Ausbildung einer durchgängigen, direkt unter der Sphäroidoberfläche verlaufenden plexiformen Schicht, auf deren äußerer Seite Zellen der Ganglienzellschicht Amakrinzellen der INL auf der inneren Seite gegenüberliegen (Bytyqi, Bachmann et al. 2007).

Die unter Gliederungspunkt 4.3.8 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die Behandlung der Sphäroide mit bFGF einen ähnlichen Effekt hervorruft, wie die Behandlung der Retinosphäroide des Gerbils mit Überständen von RPE-Zellen. Auch hier kommt es zunächst zur Ausbildung mehrerer, vornehmlich in der Peripherie der Sphäroide lokalisierter IPL-Bereiche. Ihre Entstehung und die Entwicklung innerhalb der ersten Tage in Kultur erfolgt vermutlich unabhängig voneinander. Eine Verbindung zwischen ihnen besteht zunächst nicht, weshalb sie von nun an als IPL-Inseln bezeichnet werden. Von ihnen geht im weiteren Verlauf der Kultivierung eine Entwicklung aus, die zu der Vernetzung einzelner IPL-Inseln zu einer nahezu durchgehenden IPL in der Peripherie der Sphäroide führen kann. Dieser Prozess erfolgt durch die Ausbildung eines schmalen, kernfreien Kanals, der die plexiformen Bereiche mitei-

einander verbindet. In den meisten Fällen beginnt sich dieser Kanal genau in den Bereichen zu bilden, in denen die INL-artigen Begrenzungen einer IPL an die Sphäroidoberfläche stoßen und so selbst die Oberfläche des Sphäroids bilden. Von diesen Punkten aus entwickelt sich der Kanal parallel zur Oberfläche der Sphäroide, bis er auf die nächste IPL trifft und so zwei vorher voneinander getrennte Bereiche zu einer durchgehenden IPL verbindet.

Diese, in den Kontrollen lediglich in Ansätzen zu beobachtende, Entwicklung wird durch die Behandlung der Sphäroide mit bFGF soweit verstärkt, dass dieser schmale Kanal sich beinahe komplett um den gesamten Sphäroid herum ausbildet und somit sämtliche IPL-Inseln eines Sphäroids miteinander verbindet.

Dass sich dieser verstärkte Effekt in dem Großteil der Sphäroide nachweisen lässt, konnte anhand von Scaling-Daten der Kernfärbungen erstmals quantitativ belegt werden: Der nahezu vollständig kernfreie Bereiche unter der Sphäroidoberfläche spiegelt sich in der drastischen Abnahme des SYTOX-Signals in der äußeren Peripherie wider, die bei den bFGF-Sphäroiden nachgewiesen werden konnte.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, welche Wirkungen von bFGF dafür verantwortlich sind, dass die damit behandelten Sphäroide auf ein höheres Organisationsniveau gehoben werden. Wie bereits erwähnt wurde konnten mehrere Hinweise dafür gefunden werden, dass die - durch bFGF offensichtlich vermehrt proliferierenden Müllerzellen - eine wichtige Rolle bei der Strukturierung von Sphäroiden spielen (Willbold, Reinicke et al. 1995; Willbold, Rothmel et al. 2000). Diese Arbeit zeigt anhand von Antikörperfärbungen gegen Müllerzell-spezifische Proteine die vermehrte Ansammlung von parallel zur Oberfläche ausgerichteten Müllerzellen in der äußeren Peripherie, noch bevor sich zwei Tage später genau in diesem Bereich der entsprechende kernfreie Kanal ausbildet. Diese Resultate lassen jedoch weiterhin zwei Interpretationen zu: Zum einen könnten die vermehrt auftretenden Müllerzellen selbst für diese zusätzliche Strukturierung verantwortlich sein. Zum anderen könnte sie jedoch auch durch andere Zellen, welche ebenfalls durch bFGF stimuliert werden, vorgenommen werden. In diesem Fall würden die Müllerzellen erst nachträglich, in die durch die bFGF-Behandlung bereits vorstrukturierte plexiforme Struktur hineinwachsen. Mögliche Kandidaten für diese letztgenannte Form der IPL-Bildung wären Ganglien- und Amakrinzellen. Im Huhn beginnt die IPL-Bildung zeitgleich mit der Ausbildung der Dendriten von Ganglienzellen (Nishimura 1980; Rager 1980). Kurz darauf erscheinen die ersten Fortsätze von Amakrinzellen in dieser Struktur (Prada, Puelles et al. 1987). Die gleiche Reihenfolge zeigt sich bei der IPL-Bildung im Zebrafisch. Auch hier konnten Ganglienzellen als Initiatoren der IPL-Bildung identifiziert werden, wobei dieser Prozess – wenn auch verzögert – auch ohne Ganglienzellen noch erfolg-

reich verläuft. In diesem Fall sind es Amakrinzellen, welche die Ausbildung einer IPL bewerkstelligen (Kay, Link et al. 2005). Interessanterweise beginnen sowohl Ganglien-, als auch Amakrinzellen noch vor der Geburt von Müllerzellen mit der IPL-Bildung, weshalb letztere offensichtlich keinen Einfluss auf diesen Prozess haben (Peterson, Fadool et al. 2001; Kay, Link et al. 2005).

Für den Fall, dass die hier beschriebene laminäre Strukturierung der Sphäroide in der Peripherie – in Analogie zu der Entwicklung beim Zebrafisch – nicht auf die Aktivitäten von Müllerzellen, sondern auf die von Amakrin- und Ganglienzellen zurückzuführen ist, sollten sich im Zuge der bFGF-Behandlung Unterschiede hinsichtlich Anordnung und Häufigkeit von Amakrin- und Ganglienzellen zu den Kontrollen erkennen lassen. Diese Zelltypen sollten sich vermehrt in jenen Bereichen nachweisen lassen, in denen sich die zusätzliche plexiforme Schicht ausbildet. Erste Untersuchungen der Entwicklung dieser beiden Zelltypen in bFGF-behandelten und Kontrollsphäroiden haben jedoch gezeigt, dass es in diesem Modellsystem keine Hinweise auf eine Vorstrukturierung der peripheren plexiformen Schicht durch Ganglien- und Amakrinzellen gibt: sowohl in den Kontrollen, als auch in den bFGF-behandelten Sphäroiden können am sechsten Kulturtag keine Ganglienzellen mehr nachgewiesen werden. Die für die Analyse der Entwicklung von Amakrinzellen herangezogenen ChAT-Färbungen zeigen ebenfalls keinen Einfluss von bFGF auf diesen speziellen Zelltyp (Ergebnisse nicht gezeigt).

Damit bleiben Müllerzellen die wahrscheinlichsten Kandidaten für die verstärkte Strukturierung in den Sphäroiden. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass bFGF - wie bereits unter Gliederungspunkt 4.3.5 geschildert – sowohl im Sphäroid-System als auch *in vivo* einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Müllerzellen zeigt. Das bedeutet, dass die Müllerzellen im Zuge der bFGF-Behandlung gliotisch werden (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Sowohl an Ratten, als auch an Menschen konnte gezeigt werden, dass es im Zuge einer solchen Gliose zur Reorganisation von Müllerzellfortsätzen kommen kann, die zur Ausbildung neuer Strukturen führt (Lewis and Fisher 2000; Sullivan, Penfold et al. 2003).

In dem Zusammenhang, dass bFGF in den Sphäroiden die Ausbildung einer Struktur der inneren Retina fördert, muss an dieser Stelle noch die unter Gliederungspunkt 4.3.8 geschilderte Zunahme von Pax6-positiven Zellen in den Sphäroiden erwähnt werden. Eine genauere Analyse der gewonnenen Daten zeigt, dass der Hauptanteil an der Zunahme dieses Zelltyps auf einen gesteigerten Anteil Pax6-exprimierender Zellen in der äußeren Peripherie zurückgeht. Die Scaling-Daten zeigen in diesem Bereich einen nahezu gleich großen Anteil von SYTOX- und Pax6-Signalen, während letzterer in den Kontrollen den von Pax6 um ein vielfaches über-

steigt. Da sich sowohl die Pax6-, als auch die SYTOX-Färbung auf den Zellkern beschränken, bedeutet dies, dass nahezu alle Zellen in diesem Bereich das Pax6-Protein exprimieren. Das Pax6-Protein ist ein Marker für nahezu alle Zellen der inneren Retina (Fischer and Reh 2000; Fischer, Dierks et al. 2002) Es ist bemerkenswert, dass bFGF genau in dem Bereich der Sphäroide den Anteil von Zellen der inneren Retina steigert, in dem es gleichzeitig a) die Ausbildung einer der inneren plexiformen Schicht analogen Struktur vorantreibt und b) seinen stärksten negativen Einfluss auf die Differenzierung von Photorezeptoren zeigt. Tatsächlich verringert sich der Signalanteil von Visinin in der äußeren Peripherie im Zuge der bFGF-Behandlung um das 7,5-fache, während er sich in den inneren Sektoren lediglich halbiert. Die hier geschilderten Verschiebungen der „cell lineage“ zugunsten von Zellen der inneren Retina ist zusammen mit den unter Gliederungspunkt 5.1 dargestellten Auswirkungen von bFGF auf die Differenzierung der Photorezeptoren in Abb. 76 noch einmal schematisch dargestellt. In dieser Abbildung ist jedoch die beinahe vollständige Ausbildung einer durchgängigen plexiformen Schicht in der äußeren Peripherie der Sphäroide nicht berücksichtigt. Zusammengefasst weisen all diese Ergebnisse darauf hin, dass die bFGF-Behandlung die Entwicklung der äußeren Peripherie von Sphäroiden, hin zu einer der inneren *in vivo* Retina analogen Struktur fördert.

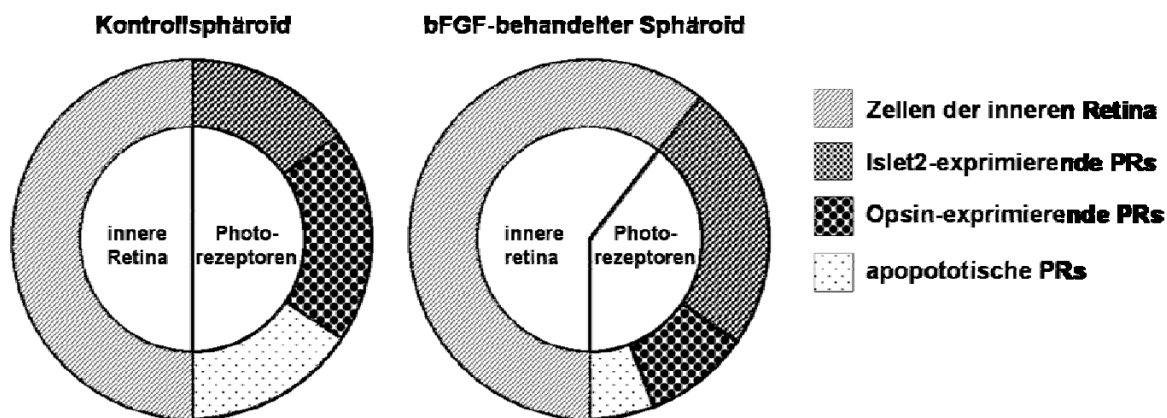


Abbildung 76: Schematische Darstellung der relativen Verteilung von verschiedenen Zelltypen in unbehandelten und mit bFGF kultivierten Sphäroiden nach sechs Tagen *in vitro*. bFGF induziert eine Verschiebung im dem Entwicklungsschicksal von Vorläuferzellen zugunsten von Zellen der inneren Retina, wodurch die Zahl der Photorezeptoren reduziert wird. Gleichzeitig verzögert bFGF die Reifung der Photorezeptoren. Für die Photorezeptoren im Speziellen ist das relative Verhältnis von Islet2-exprimierenden Vorläuferzellen zu den ausdifferenzierten, Opsin-exprimierenden sowie den apoptotischen Zellen dargestellt.

5.3 Die erfolgreiche Kultivierung von Rosettensphäroiden ist nicht von beständiger Rotation abhängig

Die Kultivierung von Retinazellen in einem dreidimensionalen Gewebeszusammenhang ist eine weit verbreitete Methode. Um die dafür notwendige Reaggregation der Zellen zu ermöglichen wurden bisher unterschiedliche Methoden angewandt. Für die Herstellung von Rosettensphäroiden aus Zellen der Hühnerretina ist die – auch in dieser Arbeit angewandte – Kultivierung auf einem Rotationsschüttler eine gut untersuchte Technik (Layer, Rothermel et al. 2001; Layer, Robitzki et al. 2002). Für die Bildung von Reaggregaten aus den Retinae von Säugern wurden sowohl Ratten, Mäuse als auch Gerbils als Modellsysteme verwendet. Die dabei angewandten Methoden umfassten ebenfalls die Rotationskultur (Akagawa, Hicks et al. 1987; Bytyqi, Bachmann et al. 2007), sowie die durch Zentrifugation dissoziierter Retinazellen herbeigeführte Reaggregation mit anschließender Kultivierung der Zellpellets (Watanabe, Voyvodic et al. 1997). Eine neuere Form der Kultivierung von Sphäroiden stellt die Aussaat der vereinzelt Zellen in Mikrocontainern dar, bei der sich innerhalb jedes einzelnen Containers ein einzelner Sphäroid bildet (Rieke, Gottwald et al. 2008). Sowohl im Falle der Rotationskultur, als auch bei den nach der Reaggregation frei im Medium schwimmenden Zellpellets, ist weder der Reaggregationsprozess an sich, noch das Schicksal eines einzelnen Sphäroids im weiteren Verlauf der Kultivierung anhand mikroskopischer Methoden analysierbar. Dies wird erst mit der Anwendung der Sphäroidkultur in Mikrocontainern möglich, die jedoch einen hohen technischen und materiellen Aufwand voraussetzt.

Zuletzt ist anzumerken, dass mit Ausnahme der technisch aufwendigen Kultivierung von Sphäroiden in Mikrocontainern keine der bislang angeführten Methoden eine Untersuchung der Sphäroide mittels invasiver Techniken, wie z. B. der Patch-Clamp Technik, die ein unbewegliches Untersuchungsobjekt voraussetzen, zulassen.

5.3.1 Die Kultivierung dissoziierter Retinazellen in hängenden Tropfen ist eine geeignete Methode für die Herstellung von Rosettensphäroiden

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die herkömmlichen Kultivierungsmethoden um zusätzliche Techniken zu erweitern, die die eben geschilderten Lücken an experimentellen Möglichkeiten

schließen sollten. Der erste Schritt dahin sollte die Entwicklung einer Methode zur Sphäroidherstellung sein, die den Prozess der Reaggregation und die sich anschließende Entwicklung, mit möglichst geringem technischem und materiellem Aufwand kontinuierlich erfassbar macht. Dafür wurde die Methode der hängenden Tropfen ausgewählt, bei der die Aussaat der Retinazellen in, an den Deckeln von Kulturschalen hängenden, Tropfen aus Reaggregationsmedium erfolgt. Die unter Gliederungspunkt 5.3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es auch in diesem System zu einer erfolgreichen Zusammenführung von Retinazellen zu Sphäroiden kommt. Allerdings zeigen sich im Hinblick auf die entstehenden Reaggregate deutliche Unterschiede zwischen den Tropfen und der Rotation. Wird in beiden Systemen die gleiche Zellzahl eingesetzt, übersteigt die Größe der Sphäroide aus Tropfen die, der aus Rotation um das fünffache. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der unterschiedlichen Zelldichte, die mit 2,4 Millionen Zellen/cm³ im Tropfen deutlich höher ist als mit 1,7 Zellen/cm³ in der Rotationskultur. Allerdings ist diese Erklärung nur bedingt zulässig. Denn selbst nach der Reduktion der Zellzahl auf 20 000 pro Tropfen, durch die die Zelldichte auf 1,2 Millionen Zellen/cm³, und damit unter die in der Rotation herrschende Dichte gesenkt wird, sind die entstehenden Reaggregate immer noch größer als die aus der Rotationskultur. Die Ursachen hierfür lassen sich in einem weiteren Unterschied zwischen der Kultur unter Rotation und der im hängenden Tropfen vermuten. In der Rotationskultur können Scher- und Zentrifugalkräfte, die auf die gebildeten Primäraggregate wirken. So wird eine mögliche Fusion zwischen zwei oder mehreren Sphäroiden zwar nicht verhindert, aber zumindest offensichtlich begrenzt (vgl. Gliederungspunkt 4.2.1 und Abb. 29). Im Tropfen sind diese Kräfte nicht vorhanden und die sich bildenden Primäraggregate auf engem Raum zusammengedrängt. Dementsprechend kann es hier zu deren ungehinderter Fusion zu einem einzigen Sphäroide kommen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sowohl der begrenzte Raum innerhalb des Tropfens, als auch das Fehlen von Zentrifugal- und Scherkräften für die Zunahme in der Größe der Reaggregate gegenüber denen aus der Rotation verantwortlich ist.

Der nächste Schritt dieser Arbeit war, die Sphäroide aus den Tropfen auf das Vorkommen von histotypischen Strukturen zu untersuchen. Der Vergleich verschiedenster Antikörperfärbungen zwischen den Reagregaten aus hängenden Tropfen und aus Rotationskultur zeigt zweifelsfrei, dass es sowohl zur Bildung von Rosetten, als auch von IPL-Bereichen kommt. Keiner der getesteten Marker brachte nennenswerte Unterschiede zwischen den beiden Systemen zum Vorschein. Damit hat sich gezeigt, dass die Kultivierung von Rosettensphäroiden in hängenden Tropfen ein probates Mittel ist, um sowohl den Prozess der Reaggregation als auch sich anschließende Vorgänge wie z. B. Sortierungs- und Migrationsprozesse zu untersu-

chen. Darüber hinaus hat diese Technik den Vorteil, dass hier weniger Zellen für eine erfolgreiche Reaggregation und damit für eine erfolgreiche Gewebsbildung eingesetzt werden müssen. Mit Hinblick auf den Wunsch, solche Sphäroide oder aber auch einmal Retinagewebe *in vitro* aus evtl. wenigen potenten Stammzellen zu züchten, ist dieser Aspekt für die zukünftige dreidimensionale Kulturtechnik von großer Bedeutung.

5.3.2 Die Überführung von Sphäroiden aus der Rotations- in die Standkultur ist eine geeignete Methode für deren anschließende Untersuchung mittels invasiver Methoden

Der letzte Ansatz dieses Teils der Arbeit beschäftigte sich mit den Auswirkungen, die ein plötzlicher Wechsel von einer Kultivierung unter beständiger Rotation zur Standkultur auf die Sphäroide hat. Damit sollten Möglichkeiten zu deren Untersuchung mittels invasiver Methoden, wie z. B. der Patch-Clamp-Technik, geschaffen werden, die eines am Untergrund haftenden Objekts bedürfen.

Ein erster Vergleich wurde anhand von Antikörperfärbungen gegen Neurofilament, Vimentin und Visinin durchgeführt, mit denen sowohl das Auftreten, als auch die Anordnung von Ganglien- und Müllerzellen, sowie Photorezeptor-Vorläufern in beiden Systemen analysiert werden konnten. In allen Fällen konnten sowohl in Sphäroiden aus Rotationskultur, als auch in denen aus der Standkultur die entsprechenden Zellen nachgewiesen, und klare Übereinstimmungen in deren Anordnung festgestellt werden. Ganglienzellen sind dabei stets verstärkt in der Peripherie vertreten, Müllerzellen dagegen ohne erkennbare Ordnung gleichmäßig in allen Bereichen der Sphäroide verteilt. Die Photorezeptoren-Vorläufer können dagegen verstärkt im Zentrum der Reaggregate gefunden werden. Die Morphologie der Photorezeptoren verändert sich darüber hinaus in einer Art, die mit den bekannten Veränderungen aus den Rotationskulturen übereinstimmt. Zu frühen Zeitpunkten der Kultivierung besitzen sie keinerlei lang gezogene Fortsätze. Dieses Phänomen tritt in beiden Systemen erst nach längerer Kultivierungsdauer auf.

Neben dem bloßen Vergleich vom Auftreten bestimmter Zelltypen und deren Morphologie, wurde in diesem Teil der Arbeit folgender Frage besondere Aufmerksamkeit gewidmet: Inwieweit bilden sich nach dem Ausplattieren der Sphäroide jene histotypischen Strukturen aus, wie sie in herkömmlich kultivierten Sphäroiden typisch sind?

Tatsächlich stellte sich im Rahmen dieser Untersuchungen heraus, dass im Falle von einen Tag in Rotationskultur gehaltenen Sphäroiden sich nur noch Rosetten, aber keine IPL-

Bereiche nach dem Ausplattieren in den Reaggregaten entwickeln. Die Rosetten lassen sich hierbei allein mittels Durchlichtmikroskopie zwei bis drei Tage nach dem Wechsel in die Standkultur (was dem dritten Tag *in vitro* entspricht) erstmals eindeutig auf der Oberfläche des Reaggregats erkennen. Die Identifizierung von Rosetten nur anhand von Durchlichtmikroskopie ist auch in den Gefrierschnitten von Sphäroiden aus der Rotationskultur erst ab dem dritten Kulturtag möglich, da deren Flüssigkeitsgefülltes Lumen erst ab diesem Zeitpunkt ausgebildet ist. Auch die anhand von DAPI-Färbungen nachweisbare Ausbildung von OPL-artigen Bereichen um die Kerne der Photorezeptoren herum, tritt in beiden Systemen erstmals ab dem dritten Kulturtag auf. Neben dieser Synchronität zeigt sich auch im Hinblick auf die, in diesen Strukturen vorhandenen Zellen und deren Organisation eine klare Homologie. Es sind sowohl die kreisförmig angeordneten, für Visinin positiven Photorezeptoren, sowie die zwischen deren Kernen hindurch ziehenden Fortsätze von Müllerzellen nachweisbar. Neben all diesen Gemeinsamkeiten findet sich allerdings auch ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den Rosetten in Sphäroiden aus der Stand- und der Rotationskultur. Bei Sphäroiden aus Rotationskultur finden sich Rosetten ausschließlich im Inneren der Sphäroide, während sie in ausplattierten Sphäroiden häufig auf der Sphäroidoberfläche erscheinen. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass sich die Sphäroide im Zuge der Ausplattierung abflachen. Damit haben die Rosetten weniger Raum, weshalb sie an der Oberfläche sichtbar werden.

Ein weiterer drastischer Unterschied der sich nach der Aussaat von jungen Sphäroiden zeigt, ist die bereits angesprochene fehlende Ausbildung von IPL-Bereichen. Eine mögliche Erklärung für das Auftauchen von Rosetten und die Abwesenheit der IPL-Bereiche liegt in der Entstehung von Sphäroiden in der Rotationskultur begründet. Deren Bildung wird durch die Zusammenlagerung von stark füreinander adhäsiven Photorezeptoren zu Rosetten erst initiiert. Im weiteren Kulturverlauf lagern sich weitere Zellen an die Peripherie dieser Hohlkugel an (Steinberg 1970; Ben-Shaul and Moscona 1975). Die Anlagen für die IPL-Bereiche bilden sich dagegen erst später aus (vgl. Gliederungspunkt 4.2.5). Die starke Adhäsion der Photorezeptoren in den Rosetten könnte verantwortlich dafür sein, dass die Rosetten nach dem Ausplattieren weiter bestehen bleiben. Die weniger adhäsiven Zellen, welche dagegen in Rotationskultur die IPL-Bereiche bilden, scheinen dagegen nach der Ausplattierung dazu nicht mehr in der Lage zu sein. Ein weiterer Punkt welcher die fehlende Ausbildung von IPL-Bereichen erklären könnte, ist die geschilderte Ausbildung von Randbereichen. Diese setzen sich aus zwei unterschiedlichen Zelltypen zusammen. Bei den einen handelt es sich um flach am Boden anliegende Zellen, während der zweite Zelltyp einen kugeligen Zellkörper mit einem oder mehreren langgestreckten Fortsätzen aufweist und dem erstgenannten Zelltyp oben aufsitzt. In

Analogie zu vorangegangenen Studien konnten die flach am Boden liegenden Zellen anhand ihrer Morphologie und von Antikörperfärbungen gegen Vimentin als eine Zellpopulation identifiziert werden, die von Li et al. als „flache Zellen“ bezeichnet werden. Dabei handelt es sich den Autoren zu folge um Müllerzellen bzw. um Vorläuferzellen, aus denen sich später Müllerzellen entwickeln (Lemmon and Rieser 1983; Li and Sheffield 1986). Wie unter den Gliederungspunkten 4.2 - 4.3 bereits dargestellt wurde, gibt es zahlreiche Hinweise auf eine wichtige Rolle von Müllerzellen bzw. deren Vorläufern bei der Ausbildung von IPL-Bereichen, wozu auch die Anhäufung von Vimentin-positiven Zellfortsätzen in den früh erkennbaren IPL-Anlagen gehört (vgl. Abb. 34). In den ausplattierten Sphäroiden verlassen viele dieser Vimentin-positiven Zellen nun den Sphäroid, wodurch sich ihre Anzahl im verbleibenden Gewebeverband reduziert. Dass sich im Zuge der Reduktion keine IPL-Bereiche in den Sphäroiden bilden, kann als weiterer Hinweis für die große Bedeutung dieses Zelltyps bei der Entwicklung und Strukturierung von IPL-Bereichen gewertet werden.

Nach der Ausplattierung älterer Sphäroide, bleiben dagegen die bereits in Rotationskultur angelegten IPL-Bereiche bestehen und entwickeln sich darüber hinaus noch in vergleichbarem Maß weiter, wie dies auch in Rotationskultur der Fall ist. Die Ausplattierung von drei und fünf Tage alten Sphäroiden zeigt, dass sich im Anschluss daran nach drei bzw. einem weiteren Tag Ausbuchtungen auf deren Oberfläche entwickeln. Diese Entwicklung fällt also in beiden Fällen mit dem insgesamt sechsten Tag *in vitro* zusammen. Zu diesem Zeitpunkt weisen die IPL-Bereiche von Sphäroiden aus Rotationskultur ebenfalls ihre größte räumliche Ausdehnung über die Sphäroidoberfläche hinaus, als auch ihren höchsten Organisationsgrad, auf (vgl. Gliederungspunkt 4.2.3). Werden dagegen Sphäroide ausgesät, die länger als sechs Tage unter Rotation kultiviert wurden, lassen sich kaum noch Ausbuchtungen auf deren Oberfläche beobachten. Vielmehr kugeln sie sich mit zunehmender Kulturdauer verstärkt ab. In den Rotationskulturen ziehen sich die IPL-Bereiche nach dem sechsten Tag in den Zellverband zurück, wodurch sich die Zirkularität der Reaggregate deutlich erhöht. All diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die Entwicklung der Sphäroide einem festgelegten zeitlichen Ablauf unterliegt, der sich auch nach dem Ausplattieren nicht verändert.

Zusammengenommen zeigen all diese Ergebnisse, dass die Ausplattierung von Sphäroiden eine geeignete Möglichkeit darstellt, die Entwicklung bestimmter histotypischer Strukturen kontinuierlich zu untersuchen. Im Falle von früh ausplattierten Sphäroiden handelt es sich dabei um die Rosetten. Für die Untersuchung der Entwicklung von IPL-Bereichen ist dagegen die Aussaat älterer Sphäroidstadien nötig. Hier hat sich gezeigt, dass solche Sphäroide nach ihrem nach dem Wechsel in die Standkultur eine Entwicklung durchlaufen, die sowohl mor-

phologisch als auch zeitlich mit der von permanent unter Rotation kultivierten Reaggregaten übereinstimmt.

Eine Besonderheit bei den ausplattierten Sphäroiden stellen die bereits erwähnten, durch Migration von Zellen aus dem zentralen Zellverband entstehenden, Randbereiche dar. Darüber hinaus, dass diese wie bereits erwähnt evtl. der Grund für die fehlende Ausbildung der IPL-Bereiche nach der Aussaat junger Sphäroide sind, ergibt sich aus ihrer Untersuchung ein weiterer wichtiger Aspekt für die Beurteilung der Tauglichkeit der hier getesteten Kulturtechnik. Dieser Aspekt bezieht sich auf die unter Gliederungspunkt 4.5.2 dargestellte Abhängigkeit der Vimentin- und Glutaminsynthetase-Expression von der Lokalisation der Zellen (siehe Abb. 73). Beide Proteine sollten zu den Zeitpunkten in denen diese Abhängigkeit festgestellt werden kann bereits auf Müllerzellen beschränkt sein (Lemmon and Rieser 1983; Li and Sheffield 1986). In den ausplattierten Sphäroiden ist die Expression von Glutaminsynthetase jedoch auf Zellen innerhalb des Gewebeverbandes beschränkt, während Vimentin sowohl von den Zellen im Gewebeverband, als auch von den flachen Zellen in den Randbereichen exprimiert wird. Dies kann als ein Hinweis auf eine einsetzende Dedifferenzierung der Müllerzellen in den Randbereichen interpretiert werden. Grund für diese Dedifferenzierung könnte der Verlust des dreidimensionalen Gewebezusammenhangs durch das Auswandern aus dem Sphäroid sein. Tatsächlich haben Vergleiche zwischen zweidimensional kultivierten Retinazellen mit der *in vivo* Situation gezeigt, dass eine zweidimensionale Kulturmethode zu Veränderungen in der Chromatinstruktur im Zellkern führt (persönliche Mitteilung von D. Zink). Für Müllerzellen wurde darüber hinaus gezeigt, dass diese im Zuge einer zweidimensionalen *in vitro* Kultivierung ihr Expressionsmuster gegenüber der *in vivo* Situation verändern. Im Zuge dieser Veränderung kommt es u. a. zu Variationen in der Zusammensetzung der Glycoproteine auf ihrer Oberfläche (Li and Sheffield 1984), sowie einer stark verminderten Expression von Glutaminsynthetase (Hauck, Suppmann et al. 2003). Die Tatsache, dass nach dem Ausplattieren der Sphäroide nur die sich in den Randbereichen befindlichen Müllerzellen die Expression von Glutaminsynthetase herunter regulieren, lässt folgende Schlüsse zu: Zum einen führt die Ausplattierung der Sphäroide bei den Müllerzellen bzw. deren Vorläufern, die in direkten Kontakt zu der Oberfläche des Kulturgefäßes kommen und schließlich die flachen Zellen der Randbereiche bilden, zu einer Dedifferenzierung. In deren Folge könnte sich das Expressionsmuster dieser Zellen verändern und die Expression der Glutaminsynthetase herunterreguliert werden. Müllerzellen und deren Vorläufer, die ohne direkten Kontakt zum Kulturgefäß im zentralen Bereich der ausplattierten Sphäroide lokalisiert sind, unterliegen dagegen keiner Dedifferenzierung. Dieser Aspekt ist für die Interpretation von Daten, die anhand

von ausplattierten Sphäroiden gewonnen werden könnten, von großer Bedeutung.

Ein weiterhin ungeklärter Sachverhalt ist die Veränderung, die sich in der Zusammensetzung der Randbereiche bei den ausplattierten Sphäroiden beobachten lässt. Diese bestehen zunächst sowohl aus am Boden anliegenden flachen Zellen, als auch aus ihnen aufsitzenden Neuronen. Letztere bilden oftmals ein dichtes Fasernetzwerk. Mit zunehmendem Alter der ausplattierten Sphäroide beschränken sich die Randbereiche dagegen nur noch auf die flach am Boden liegenden Zellen. Der Grund für diese Veränderung kann eine Veränderung in der Proliferationsrate der Neurone sein. In jungen Rosettensphäroiden lässt sich eine hohe Proliferationsrate nachweisen (vgl. Gliederungspunkt 4.3.2). Im Zuge der Zellteilungen könnten Neurone bzw. neuronale Vorläuferzellen nach dem Ausplattieren aus dem ursprünglichen Zellverband herausgedrückt werden. Da sie weiterhin den flachen Zellen aufsitzen, die sich im Laufe der weiteren Kultivierung ebenfalls fortlaufend teilen (Li and Sheffield 1986), kommt es daraufhin zu der Bildung des beschriebenen Netzwerkes aus Zellfortsätzen. Sie erfolgt sowohl durch die aktive Ausbildung von Zellfortsätzen von den Neuronen, als auch durch die Proliferation hervorgerufene Bewegung der am Untergrund haftenden flachen Zellen. Letztere führt durch das Auseinanderziehen der Zellkörper der Neurone zur Bildung von Fortsätzen und damit zur Netzwerkbildung.

Werden Sphäroide ausplattiert, in denen keine Proliferation mehr stattfindet, verlassen keine Neurone mehr den Zellverband. Die dedifferenzierenden flachen Zellen proliferieren dagegen weiterhin, wodurch auch hier ein Randbereich entsteht. Für die oben beschriebene Netzwerkbildung fehlen jedoch die nach außen hin abgegebenen Neurone.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Großteil der hier geschilderten Ergebnisse Argumente für die Verwendung von ausplattierten Sphäroiden als Modellsystem für invasive Untersuchungsmethoden sind. Die teilweise deutlichen Übereinstimmungen in der Entwicklung von Sphäroiden aus Rotations- und Standkultur sprechen dafür, dass sich so gewonnene Ergebnisse auf Sphäroide übertragen lassen, die ausschließlich unter Rotation kultiviert wurden. Damit eröffnen sich sowohl für Patch-Clamp-Untersuchungen, als auch für Lebendzell-Mikroskopie zusätzliche Möglichkeiten für die Untersuchung der Ausbildung von histotypischen Strukturen *in vitro*.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Methoden für die Kultivierung und die Auswertung von Sphäroidkulturen. Den ersten Schritt auf diesem Weg stellen die in dieser Arbeit erstmals angewandten Verfahren für die Verarbeitung von Informationen aus immunhistochemischen Färbungen der Sphäroidschnitte dar, welche bis heute für die Analyse von Sphäroiden unersetzlich sind. Bisher hatten solche Färbungen jedoch den Nachteil, dass die in ihnen enthaltenen Informationen – wenn überhaupt - nur schlecht quantifizierbar waren, da der Auswertungsprozess stets mit einem sehr hohen Zeitaufwand verbunden und zudem fehleranfällig war. Dementsprechend basierten die bisherigen statistischen Analysen, die anhand von Sphäroidkulturen gewonnen wurden, lediglich auf einer begrenzten Datenmenge.

Diese Mängel konnten anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden weitgehend beseitigt werden. Die hier angewandte computergestützte Analyse von Färbungen an Sphäroidschnitten ermöglichte erstmals die statistische Auswertung des Einflusses eines Wachstumsfaktors auf die Sphäroidentwicklung auf der Basis umfangreicher mikroskopischer Datensätze. Zusätzlich konnte die Quantifizierung der Unterschiede zwischen unterschiedlich behandelten Sphäroiden um einen neuen Aspekt erweitert werden. Während bislang lediglich gesicherte Aussagen über Veränderungen in der Anzahl bestimmter Zelltypen in den Sphäroiden getroffen werden konnten, steht nun mit dem Scaling2.0-Makro ein Instrument für die Quantifizierung struktureller Differenzen zur Verfügung.

Aber nicht nur die Auswertung der Färbungen von Sphäroidschnitten, auch die Analyse von sich noch in der Kultur befindenden whole-mount-Sphäroiden konnte im Rahmen dieser Arbeit auf ein neues Niveau gehoben werden. Erstmals wurde nicht nur die Größe, sondern auch die Form von Sphäroiden anhand ihres Zirkularitätswerts quantifiziert.

Diese Neuerungen eröffneten die Möglichkeit, die Analyse der Einflüsse von bFGF auf die Entwicklung von Rosettensphäroiden auf eine breite Auswahl unterschiedlicher Marker auszuweiten, ohne dadurch die Menge an ausgewertetem Material zu reduzieren.

Die Resultate dieser Untersuchungen haben gezeigt, dass bFGF eine Vielzahl von biologischen Funktionen in dem sich entwickelnden Verband von Retinazellen ausübt. Zu den Funktionen, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten, gehört unter anderem die Regulation des Differenzierungsprozesses von Photorezeptoren. Dies erfolgt durch die Verlängerung der transienten Islet2-Expressionsphase. Dadurch wird der Eintritt der Zellen in den letzten Abschnitt der Photorezeptorenreifung, welcher durch die Expression von Opsinen gekennzeichnet ist, verzögert. Im ausdifferenzierten Zustand übernimmt bFGF darüber hinaus

eine Schutzfunktion vor Apoptose für die Photorezeptoren. bFGF wirkt jedoch nicht nur direkt auf bereits geborene Photorezeptoren und deren Vorläufer. Vielmehr reguliert es auch den Anteil dieses Zelltyps an der Gesamtpopulation von Retinazellen in den Sphäroiden. Dies wird offenbar dadurch erreicht, dass bFGF die Differenzierung von nicht determinierten Vorläuferzellen in Richtung der inneren Retina verschiebt. Diese Verschiebung hat zur Folge, dass sich der Organisationsgrad der IPL-Bereiche in den Reaggregaten erhöht.

An diesem Punkt ist es wichtig zu erwähnen, dass diesen histotypischen Bereichen der Sphäroide in vorangegangenen Arbeiten bislang wenig Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Dabei hat die Vermessung der Zirkularität von Sphäroiden an den unterschiedlichen Kulturtagen gezeigt, dass ihnen u. a. eine entscheidende Rolle bei der morphologischen Entwicklung der Sphäroide zukommt. Somit kann auch diese neue Methode als ein Erfolg angesehen werden. Durch bestimmte Stoffe induzierte Veränderungen der IPL-Bereiche können mit ihrer Hilfe bereits vor der Analyse von Antikörperfärbungen festgestellt werden. Aber nicht nur über die Rolle der IPL-Bereiche bei der morphologischen Entwicklung, auch über ihre innere Strukturierung konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse erlangt werden. Tatsächlich weisen diese histotypischen Strukturen deutlich größere Übereinstimmungen mit der *in vivo* Situation auf, als bislang angenommen wurde. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit unter anderem an der erstmals gezeigten Entwicklung der für die Vogelretina charakteristischen drei Typen von cholinergen Amakrinzellen gezeigt werden.

All diese Ergebnisse machen erneut deutlich, dass es sich bei Rosettensphäroiden um ein Kultursystem handelt, mit dem sich sowohl die Entwicklung der Retina als Ganzes, als auch der Einfluss von einzelnen Zytokinen auf diesen Prozess nachvollziehen lässt. Dass sich im Hinblick auf den letzten Punkt teilweise deutliche Abweichungen zu bereits publizierten Daten aus zweidimensionaler Kulturtechnik zeigen, unterstreicht die Bedeutung der dreidimensionalen Kultivierung von Zellen und deren fortlaufende Weiterentwicklung bezüglich Methodik und Auswertung noch einmal zusätzlich. Vor diesem Hintergrund sind die Resultate des letzten Teils dieser Arbeit als wichtige methodische Fortschritte in der Sphäroid-Technologie zu werten. Hier wurde gezeigt, dass die Kultivierung von dissoziierten Retinazellen eine geeignete Technik ist, um die Bildung von Rosettensphäroiden mit den für sie charakteristischen histotypischen Strukturen herbeizuführen. Somit ist von nun an eine Methode verfügbar, die eine kontinuierliche mikroskopische Betrachtung des Reaggregationsprozesses und der sich anschließenden Entwicklung von histotypischen Strukturen möglich macht. Auch die hier ebenfalls vorgestellte Variante, bei der vorher in Rotationskultur gebildete Sphäroide ausplattiert werden, ist dafür geeignet.

Die Kombination aller in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse eröffnet den Ausblick auf vielfältige Möglichkeiten für die Nutzung von Sphäroidkulturen in der Zukunft. Zu den verbesserten Methoden zur Auswertung der Einflüsse von Wachstumsfaktoren und anderen biologisch wirksamen Substanzen auf die Retinogenese *in vitro*, kommt nun zusätzlich ein verbessertes Verständnis der Bildungen von IPL-Bereichen in Sphäroiden hinzu. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch bFGF innerhalb von 24 Stunden Aktivitäten in einer regional begrenzten Zellpopulation eines bestimmten Zelltyps induziert werden, wodurch die laminäre Strukturierung der Sphäroide deutlich gefördert wird. Durch die Kombination dieser Ergebnisse mit denen aus den hängenden Tropfen, rückt die mikroskopische *real-time*-Analyse der Bildung und Strukturierung von IPL-Bereichen *in vitro* in greifbare Nähe. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten sich nicht nur für das Verständnis der Entwicklung ebendieser Struktur *in vivo*, sondern auch für die Züchtung von Retinagewebe *in vitro* als hilfreich erweisen.

7. Literaturverzeichnis

- Adler, R. (1993). "Plasticity and differentiation of retinal precursor cells." Int Rev Cytol **146**: 145-90.
- Adler, R. (2000). "A model of retinal cell differentiation in the chick embryo." Prog Retin Eye Res **19**(5): 529-57.
- Adler, R. and M. Hatlee (1989). "Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis." Science **243**(4889): 391-3.
- Agardh, E., A. Bruun, et al. (1986). "GABA immunoreactivity in the retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **27**(5): 674-8.
- Akagawa, K., D. Hicks, et al. (1987). "Histiotypic organization and cell differentiation in rat retinal reaggregate cultures." Brain Res **437**(2): 298-308.
- Araki, M. and H. Kimura (1991). "GABA-like immunoreactivity in the developing chick retina: differentiation of GABAergic horizontal cell and its possible contacts with photoreceptors." J Neurocytol **20**(5): 345-55.
- Araki, M., H. Suzuki, et al. (2007). "Differential enhancement of neural and photoreceptor cell differentiation of cultured pineal cells by FGF-1, IGF-1, and EGF." Dev Neurobiol **67**(12): 1641-54.
- Bartsch, S., K. Husmann, et al. (1995). "The extracellular matrix molecule tenascin: expression in the developing chick retinotectal system and substrate properties for retinal ganglion cell neurites in vitro." Eur J Neurosci **7**(5): 907-16.
- Belecky-Adams, T., B. Cook, et al. (1996). "Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the "window-labeling" technique." Dev Biol **178**(2): 304-15.
- Ben-Shaul, Y. and A. A. Moscona (1975). "Scanning electron microscopy of aggregating embryonic neural retina cells." Exp Cell Res **95**(1): 191-204.
- Bhat, N. R. and P. Zhang (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinases in oligodendrocytes." J Neurochem **66**(5): 1986-94.
- Boucher, S. E. and P. F. Hitchcock (1998). "Insulin-related growth factors stimulate proliferation of retinal progenitors in the goldfish." J Comp Neurol **394**(3): 386-94.
- Bowes, C., T. van Veen, et al. (1988). "Opsin, G-protein and 48-kDa protein in normal and rd mouse retinas: developmental expression of mRNAs and proteins and light/dark cycling of mRNAs." Exp Eye Res **47**(3): 369-90.
- Brecha, N., H. J. Karten, et al. (1979). "Enkephalin-containing amacrine cells in the avian

- retina: immunohistochemical localization." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(6): 3010-4.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.
- Bruhn, S. L. and C. L. Cepko (1996). "Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina." J Neurosci **16**(4): 1430-9.
- Bytyqi, A. H., G. Bachmann, et al. (2007). "Cell-by-cell reconstruction in reaggregates from neonatal gerbil retina begins from the inner retina and is promoted by retinal pigmented epithelium." Eur J Neurosci **26**(6): 1560-74.
- Catsicas, M. and P. Mobbs (2001). "GABA_B receptors regulate chick retinal calcium waves." J Neurosci **21**(3): 897-910.
- Cepko, C. L. (1996). "The patterning and onset of opsin expression in vertebrate retinae." Curr Opin Neurobiol **6**(4): 542-6.
- Cepko, C. L. (1999). "The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates." Curr Opin Neurobiol **9**(1): 37-46.
- Chang, Z., K. Meyer, et al. (2000). "Differential ability of heparan sulfate proteoglycans to assemble the fibroblast growth factor receptor complex in situ." Faseb J **14**(1): 137-44.
- Chavarria, T., A. I. Valenciano, et al. (2007). "Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development." Dev Neurobiol **67**(13): 1777-88.
- Chiarini, L. B., M. L. Leal-Ferreira, et al. (2003). "Changing sensitivity to cell death during development of retinal photoreceptors." J Neurosci Res **74**(6): 875-83.
- Consigli, S. A., K. M. Lyser, et al. (1993). "The temporal and spatial expression of basic fibroblast growth factor during ocular development in the chicken." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(3): 559-66.
- da Costa Calaza, K., J. N. Hokoc, et al. (2000). "Neurogenesis of GABAergic cells in the chick retina." Int J Dev Neurosci **18**(8): 721-6.
- Desire, L., Y. Courtois, et al. (1998). "Suppression of fibroblast growth factors 1 and 2 by antisense oligonucleotides in embryonic chick retinal cells in vitro inhibits neuronal differentiation and survival." Exp Cell Res **241**(1): 210-21.
- Desire, L., Y. Courtois, et al. (2000). "Endogenous and exogenous fibroblast growth factor 2 support survival of chick retinal neurons by control of neuronal neuronal bcl-x(L) and bcl-2 expression through a fibroblast growth factor receptor 1- and ERK-dependent pathway." J Neurochem **75**(1): 151-63.
- Diaz, B., J. Serna, et al. (2000). "In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin

- and the insulin receptor during early retinal neurogenesis." Development **127**(8): 1641-9.
- Dionne, C. A., M. Jaye, et al. (1991). "Structural diversity and binding of FGF receptors." Ann N Y Acad Sci **638**: 161-6.
- Dormann, S. and A. Deutsch (2002). "Modeling of self-organized avascular tumor growth with a hybrid cellular automaton." In Silico Biol **2**(3): 393-406.
- Dorsky, R. I., W. S. Chang, et al. (1997). "Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling." Nature **385**(6611): 67-70.
- Eckenstein, F. and H. Thoenen (1982). "Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons." Embo J **1**(3): 363-8.
- Edqvist, P. H., S. M. Myers, et al. (2006). "Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10." Eur J Histochem **50**(2): 147-54.
- Ellis, J. H., D. E. Richards, et al. (1991). "Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick." Cell Tissue Res **264**(2): 197-208.
- Ezzeddine, Z. D., X. Yang, et al. (1997). "Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina." Development **124**(5): 1055-67.
- Faktorovich, E. G., R. H. Steinberg, et al. (1990). "Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor." Nature **347**(6288): 83-6.
- Faktorovich, E. G., R. H. Steinberg, et al. (1992). "Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat." J Neurosci **12**(9): 3554-67.
- Famiglietti, E. V., Jr. (1983). "'Starburst' amacrine cells and cholinergic neurons: mirror-symmetric on and off amacrine cells of rabbit retina." Brain Res **261**(1): 138-44.
- Farah, M. H. (2006). "Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina." Brain Res Rev **52**(2): 264-74.
- Fischer, A. J., B. D. Dierks, et al. (2002). "Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin." Development **129**(9): 2283-91.
- Fischer, A. J., S. Foster, et al. (2008). "Transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina." J Comp Neurol **506**(4): 584-603.
- Fischer, A. J., C. R. McGuire, et al. (2002). "Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina." J Neurosci **22**(21): 9387-98.

- Fischer, A. J. and G. Omar (2005). "Transitin, a nestin-related intermediate filament, is expressed by neural progenitors and can be induced in Muller glia in the chicken retina." J Comp Neurol **484**(1): 1-14.
- Fischer, A. J., G. Omar, et al. (2005). "Glucagon-expressing neurons within the retina regulate the proliferation of neural progenitors in the circumferential marginal zone of the avian eye." J Neurosci **25**(44): 10157-66.
- Fischer, A. J. and T. A. Reh (2000). "Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens." Dev Biol **220**(2): 197-210.
- Fischer, A. J. and T. A. Reh (2001). "Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina." Nat Neurosci **4**(3): 247-52.
- Fischer, A. J. and T. A. Reh (2002). "Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina." Dev Biol **251**(2): 367-79.
- Fischer, A. J., R. L. Seltner, et al. (1998). "Immunocytochemical characterization of quisqualic acid- and N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in the retina of chicks." J Comp Neurol **393**(1): 1-15.
- Folkman, J. and M. Hochberg (1973). "Self-regulation of growth in three dimensions." J Exp Med **138**(4): 745-53.
- Fontaine, V., N. Kinkl, et al. (1998). "Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2." J Neurosci **18**(23): 9662-72.
- Franklin Hughes, W. and A. La Velle (1975). "The effects of early tectal lesions on development in the retinal ganglion cell layer of chick embryos." J Comp Neurol **163**(3): 265-83.
- Frasson, M., J. A. Sahel, et al. (1999). "Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse." Nat Med **5**(10): 1183-7.
- Fuhrmann, S., M. Kirsch, et al. (1995). "Ciliary neurotrophic factor promotes chick photoreceptor development in vitro." Development **121**(8): 2695-706.
- Gan, L., M. Xiang, et al. (1996). "POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3920-5.
- Gray, G. E. and J. R. Sanes (1991). "Migratory paths and phenotypic choices of clonally related cells in the avian optic tectum." Neuron **6**(2): 211-25.
- Guilarducci-Ferraz, C. V., G. M. da Silva, et al. (2008). "The increase in retinal cells proliferation induced by FGF2 is mediated by tyrosine and PI3 kinases." Neurochem Res **33**(5): 754-64.
- Guillemot, F. and C. L. Cepko (1992). "Retinal fate and ganglion cell differentiation are po-

- tentiated by acidic FGF in an in vitro assay of early retinal development." Development **114**(3): 743-54.
- Hauck, S. M., N. Kinkl, et al. (2006). "GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells." Mol Cell Biol **26**(7): 2746-57.
- Hauck, S. M., S. Suppmann, et al. (2003). "Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions." Glia **44**(3): 251-63.
- Haynes, T., C. Gutierrez, et al. (2007). "BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Heuer, J. G., C. S. von Bartheld, et al. (1990). "Alternating phases of FGF receptor and NGF receptor expression in the developing chicken nervous system." Neuron **5**(3): 283-96.
- Hicks, D. and Y. Courtois (1992). "Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro." J Neurosci **12**(6): 2022-33.
- Holt, C. E., T. W. Bertsch, et al. (1988). "Cellular determination in the Xenopus retina is independent of lineage and birth date." Neuron **1**(1): 15-26.
- Hughes, W. F. and S. C. McLoon (1979). "Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destruction." Exp Neurol **66**(3): 587-601.
- Ibanez, C. F. (1998). "Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors." Trends Neurosci **21**(10): 438-44.
- Jasoni, C. L., M. B. Walker, et al. (1994). "A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system." Development **120**(4): 769-83.
- Karten, H. J. and N. Brecha (1980). "Localisation of substance P immunoreactivity in amacrine cells of the retina." Nature **283**(5742): 87-8.
- Kay, J. N., B. A. Link, et al. (2005). "Staggered cell-intrinsic timing of ath5 expression underlies the wave of ganglion cell neurogenesis in the zebrafish retina." Development **132**(11): 2573-85.
- Keyser, K. T., T. E. Hughes, et al. (1988). "Cholinoceptive neurons in the retina of the chick: an immunohistochemical study of the nicotinic acetylcholine receptors." Vis Neurosci **1**(4): 349-66.
- Kilpatrick, T. J. and P. F. Bartlett (1995). "Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3653-61.

- Kinkl, N., J. Sahel, et al. (2001). "Alternate FGF2-ERK1/2 signaling pathways in retinal photoreceptor and glial cells in vitro." *J Biol Chem* **276**(47): 43871-8.
- Kirsch, M., M. Y. Lee, et al. (1997). "Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells." *J Neurochem* **68**(3): 979-90.
- Kolb, H. (1997). "Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles." *Eye* **11 (Pt 6)**: 904-23.
- LaVail, M. M., E. G. Faktorovich, et al. (1991). "Basic fibroblast growth factor protects photoreceptors from light-induced degeneration in albino rats." *Ann N Y Acad Sci* **638**: 341-7.
- Layer, P. G., R. Alber, et al. (1990). "Regeneration of a chimeric retina from single cells in vitro: cell-lineage-dependent formation of radial cell columns by segregated chick and quail cells." *Cell Tissue Res* **259**(2): 187-98.
- Layer, P. G., A. Robitzki, et al. (2002). "Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering." *Trends Neurosci* **25**(3): 131-4.
- Layer, P. G., A. Rothermel, et al. (1997). "Pigmented epithelium sustains cell proliferation and decreases expression of opsins and acetylcholinesterase in reaggregated chicken retinospheroids." *Eur J Neurosci* **9**(9): 1795-803.
- Layer, P. G., A. Rothermel, et al. (2001). "From stem cells towards neural layers: a lesson from re-aggregated embryonic retinal cells." *Neuroreport* **12**(7): A39-46.
- Leber, S. M., S. M. Breedlove, et al. (1990). "Lineage, arrangement, and death of clonally related motoneurons in chick spinal cord." *J Neurosci* **10**(7): 2451-62.
- Lee, P. L., D. E. Johnson, et al. (1989). "Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor." *Science* **245**(4913): 57-60.
- Lemmon, V. and G. Rieser (1983). "The development distribution of vimentin in the chick retina." *Brain Res* **313**(2): 191-7.
- Lewis, G. P. and S. K. Fisher (2000). "Muller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(6): 1542-5.
- Li, H. P. and J. B. Sheffield (1984). "Isolation and characterization of flat cells, a subpopulation of the embryonic chick retina." *Tissue Cell* **16**(6): 843-57.
- Li, H. P. and J. B. Sheffield (1986). "Retinal flat cells are a substrate that facilitates retinal neuron growth and fiber formation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**(3): 296-306.
- Li, Z. Y., I. J. Kljavin, et al. (1995). "Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa." *J Neurosci* **15**(8): 5429-38.

- Lillien, L. (1995). "Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor." Nature **377**(6545): 158-62.
- Luskin, M. B., A. L. Pearlman, et al. (1988). "Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus." Neuron **1**(8): 635-47.
- Mao, J., S. Liu, et al. (2006). "Basic fibroblast growth factor suppresses retinal neuronal apoptosis in form-deprivation myopia in chicks." Curr Eye Res **31**(11): 983-7.
- Marszalek, J. R., X. Liu, et al. (2000). "Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors." Cell **102**(2): 175-87.
- Mascarelli, F., D. Raulais, et al. (1987). "Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina and vitreous chick embryo." Biochem Biophys Res Commun **146**(2): 478-86.
- McCabe, K. L., E. C. Gunther, et al. (1999). "The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation." Development **126**(24): 5713-24.
- McFarlane, S., M. E. Zuber, et al. (1998). "A role for the fibroblast growth factor receptor in cell fate decisions in the developing vertebrate retina." Development **125**(20): 3967-75.
- Mey, J. and S. Thanos (2000). "Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis." Brain Res Brain Res Rev **32**(2-3): 343-79.
- Millar, T., I. Ishimoto, et al. (1985). "Cholinergic and acetylcholinesterase-containing neurons of the chicken retina." Neurosci Lett **61**(3): 311-6.
- Millar, T. J., I. Ishimoto, et al. (1987). "Cholinergic amacrine cells of the chicken retina: a light and electron microscope immunocytochemical study." Neuroscience **21**(3): 725-43.
- Nakagawa, S., S. Takada, et al. (2003). "Identification of the laminar-inducing factor: Wnt-signal from the anterior rim induces correct laminar formation of the neural retina in vitro." Dev Biol **260**(2): 414-25.
- Nishimura, Y. (1980). "Determination of the developmental pattern of retinal ganglion cells in chick embryos by Golgi impregnation and other methods." Anat Embryol (Berl) **158**(3): 329-47.
- Nurcombe, V. and M. R. Bennett (1981). "Embryonic chick retinal ganglion cells identified "in vitro". Their survival is dependent on a factor from the optic tectum." Exp Brain Res **44**(3): 249-58.
- Ogilvie, J. M., J. D. Speck, et al. (2000). "Growth factors in combination, but not individu-

- ally, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture." Exp Neurol **161**(2): 676-85.
- Ohuchi, H., S. Noji, et al. (1992). "Expression pattern of the activin receptor type IIA gene during differentiation of chick neural tissues, muscle and skin." FEBS Lett **303**(2-3): 185-9.
- Pasquale, E. B. (1990). "A distinctive family of embryonic protein-tyrosine kinase receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5812-6.
- Pasquale, E. B. and S. J. Singer (1989). "Identification of a developmentally regulated protein-tyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5449-53.
- Patel, A. and S. McFarlane (2000). "Overexpression of FGF-2 alters cell fate specification in the developing retina of *Xenopus laevis*." Dev Biol **222**(1): 170-80.
- Pellegrini, L. (2001). "Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view." Curr Opin Struct Biol **11**(5): 629-34.
- Perraud, F., G. Labourdette, et al. (1988). "Comparison of the morphological effects of acidic and basic fibroblast growth factors on rat astroblasts in culture." J Neurosci Res **20**(1): 1-11.
- Peterson, R. E., J. M. Fadool, et al. (2001). "Muller cell differentiation in the zebrafish neural retina: evidence of distinct early and late stages in cell maturation." J Comp Neurol **429**(4): 530-40.
- Pittack, C., G. B. Grunwald, et al. (1997). "Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos." Development **124**(4): 805-16.
- Portera-Cailliau, C., C. H. Sung, et al. (1994). "Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 974-8.
- Prada, C., L. Puelles, et al. (1987). "Two modes of free migration of amacrine cell neuroblasts in the chick retina." Anat Embryol (Berl) **175**(3): 281-7.
- Prada, C., J. Puga, et al. (1991). "Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina." Eur J Neurosci **3**(11): 1187.
- Prada, C., J. Puga, et al. (1991). "Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina." Eur J Neurosci **3**(6): 559-569.
- Prada, F., J. I. Medina, et al. (1999). "Spatiotemporal gradients of differentiation of chick retina types I and II cholinergic cells: identification of a common postmitotic cell population." J Comp Neurol **410**(3): 457-66.
- Puelles, L. and M. C. Bendala (1978). "Differentiation of neuroblasts in the chick optic tec-

- tum up to eight days of incubation: a Golgi study." Neuroscience **3**(3): 307-25.
- Rager, G. H. (1980). "Development of the retinotectal projection in the chicken." Adv Anat Embryol Cell Biol **63**: I-VIII, 1-90.
- Rajala, A., M. Tanito, et al. (2008). "Loss of neuroprotective survival signal in mice lacking insulin receptor gene in rod photoreceptor cells." J Biol Chem **283**(28): 19781-92.
- Rakic, P. (1972). "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex." J Comp Neurol **145**(1): 61-83.
- Rehen, S. K., D. D. Neves, et al. (1999). "Selective sensitivity of early postmitotic retinal cells to apoptosis induced by inhibition of protein synthesis." Eur J Neurosci **11**(12): 4349-56.
- Rieke, M., E. Gottwald, et al. (2008). "Tissue reconstruction in 3D-spheroids from rodent retina in a motion-free, bioreactor-based microstructure." Lab Chip **8**(12): 2206-13.
- Rodriguez-Tebar, A., P. L. Jeffrey, et al. (1989). "The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age." Dev Biol **136**(2): 296-303.
- Rothermel, A. and P. G. Layer (2001). "Photoreceptor plasticity in reagggregates of embryonic chick retina: rods depend on proximal cones and on tissue organization." Eur J Neurosci **13**(5): 949-58.
- Rothermel, A. and P. G. Layer (2003). "GDNF regulates chicken rod photoreceptor development and survival in reagggregated histotypic retinal spheres." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(5): 2221-8.
- Rothermel, A., E. Willbold, et al. (1997). "Pigmented epithelium induces complete retinal reconstitution from dispersed embryonic chick retinae in reaggregation culture." Proc Biol Sci **264**(1386): 1293-302.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol **19**(4): 2435-44.
- Sensenbrenner, M., G. Labourdette, et al. (1987). "Neuronal-derived factors regulating glial cell proliferation and maturation." J Physiol (Paris) **82**(4): 288-90.
- Senut, M. C. and R. M. Alvarado-Mallart (1987). "Cytodifferentiation of quail tectal primordium transplanted homotopically into the chick embryo." Brain Res **429**(2): 187-205.
- Sernagor, E., S. J. Eglén, et al. (2000). "Differential effects of acetylcholine and glutamate blockade on the spatiotemporal dynamics of retinal waves." J Neurosci **20**(2): RC56.
- Sernagor, E. and N. M. Grzywacz (1996). "Influence of spontaneous activity and visual experience on developing retinal receptive fields." Curr Biol **6**(11): 1503-8.

- Sheffield, J. B., D. Pressman, et al. (1980). "Cells isolated from the embryonic neural retina differ in behavior in vitro and membrane structure." Science **209**(4460): 1043-5.
- Snow, R. L. and J. A. Robson (1994). "Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina." Neuroscience **58**(2): 399-409.
- Spira, A. W., T. J. Millar, et al. (1987). "Localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the embryonic chick retina." J Comp Neurol **260**(4): 526-38.
- Stanke, J. J., B. Lehman, et al. (2008). "Muscarinic signaling influences the patterning and phenotype of cholinergic amacrine cells in the developing chick retina." BMC Dev Biol **8**: 13.
- Steinberg, M. S. (1970). "Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells." J Exp Zool **173**(4): 395-433.
- Steinberg, R. H. (1994). "Survival factors in retinal degenerations." Curr Opin Neurobiol **4**(4): 515-24.
- Stier, H. and B. Schlosshauer (1998). "Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth." Eur J Neurosci **10**(3): 1000-10.
- Sullivan, R., P. Penfold, et al. (2003). "Neuronal migration and glial remodeling in degenerating retinas of aged rats and in nonneovascular AMD." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(2): 856-65.
- Sung, C. H., C. Makino, et al. (1994). "A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment." J Neurosci **14**(10): 5818-33.
- Tcheng, M., G. Fuhrmann, et al. (1994). "Spatial and temporal expression patterns of FGF receptor genes type 1 and type 2 in the developing chick retina." Exp Eye Res **58**(3): 351-8.
- Tcheng, M., L. Oliver, et al. (1994). "Effects of exogenous FGFs on growth, differentiation, and survival of chick neural retina cells." Exp Cell Res **212**(1): 30-5.
- Tesoriere, G., R. Vento, et al. (1995). "Chick embryo retina development in vitro: the effect of insulin." Neurochem Res **20**(7): 803-13.
- Thomlinson, R. H. and L. H. Gray (1955). "The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy." Br J Cancer **9**(4): 539-49.
- Tropepe, V., B. L. Coles, et al. (2000). "Retinal stem cells in the adult mammalian eye." Science **287**(5460): 2032-6.
- Turner, D. L. and C. L. Cepko (1987). "A common progenitor for neurons and glia persists in

- rat retina late in development." Nature **328**(6126): 131-6.
- Vescovi, A. L., B. A. Reynolds, et al. (1993). "bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells." Neuron **11**(5): 951-66.
- Volpert, K. N., A. Rothermel, et al. (2007). "GDNF stimulates rod photoreceptors and dopaminergic amacrine cells in chicken retinal reaggregates." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(11): 5306-14.
- Wahlin, K. J., P. A. Campochiaro, et al. (2000). "Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(3): 927-36.
- Watanabe, T., J. T. Voyvodic, et al. (1997). "Differentiation and morphogenesis in pellet cultures of developing rat retinal cells." J Comp Neurol **377**(3): 341-50.
- Wetts, R. and S. E. Fraser (1988). "Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina." Science **239**(4844): 1142-5.
- Willbold, E., J. Berger, et al. (1997). "On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns." J Hirnforsch **38**(3): 383-96.
- Willbold, E., M. Reinicke, et al. (1995). "Muller glia stabilizes cell columns during retinal development: lateral cell migration but not neuropil growth is inhibited in mixed chick-quail retinospheroids." Eur J Neurosci **7**(11): 2277-84.
- Willbold, E., A. Rothermel, et al. (2000). "Muller glia cells reorganize reaggregating chicken retinal cells into correctly laminated in vitro retinae." Glia **29**(1): 45-57.
- Wong, W. T., K. L. Myhr, et al. (2000). "Developmental changes in the neurotransmitter regulation of correlated spontaneous retinal activity." J Neurosci **20**(1): 351-60.
- Wong, W. T., J. R. Sanes, et al. (1998). "Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina." J Neurosci **18**(21): 8839-52.
- Xiang, M., L. Gan, et al. (1996). "Targeted deletion of the mouse POU domain gene Brn-3a causes selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11950-5.
- Yamagata, K., K. Goto, et al. (1990). "Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells." Neuron **4**(3): 469-76.
- Yamagata, M. and J. R. Sanes (1995). "Target-independent diversification and target-specific projection of chemically defined retinal ganglion cell subsets." Development **121**(11):

3763-76.

- Yi, X., M. Schubert, et al. (2005). "Insulin receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells." J Neurosci **25**(5): 1240-8.
- Yurco, P. and D. A. Cameron (2005). "Responses of Muller glia to retinal injury in adult zebrafish." Vision Res **45**(8): 991-1002.
- Zhao, S. and C. J. Barnstable (1996). "Differential effects of bFGF on development of the rat retina." Brain Res **723**(1-2): 169-76.
- Zhou, Z. J. (1998). "Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina." J Neurosci **18**(11): 4155-65.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Frohns
geboren: 16.11.1978
in: Langen (Hessen)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1985 - 1989 Ludwig-Erk-Grundschule, Dreieich
1989 - 1995 Gesamtschule Weibelfeldschule, Dreieich
1995 - 1998 Gymnasiale Oberstufe der Weibelfeldschule, Dreieich
06/ 1998 Abitur

Zivildienst

09/1998 – 09/1999 Diakonie, Dreieich

Universitätsausbildung

10/1999 – 11/2004 Lehramtsstudium für Gymnasien mit den Fächern Biologie und Politik an der Technischen Universität Darmstadt

01/2004 – 03/2004 Anfertigung der Examensarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Gerhard Thiel am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt.

Titel: „Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Infektion von Chlorella NC64A Zellen durch Varianten des Paramecium bursaria Chlorella Virus (PBCV1) gegenüber Cäsium“

11/2004 Abschluss des Studiums mit dem 1. Staatsexamen

03/2005-02/2009 Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Paul G. Layer am Institut für Zoologie der Technischen Universität Darmstadt

Titel: „Untersuchungen zum Einfluss von bFGF auf die Retinogenese des Huhns in einem dreidimensionalen *in vitro* Zellkultursystem“

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Darmstadt, den 31.12.2008

Florian Frohns