4.4 Die Herstellung von Rosettensphäroiden in hängenden Tropfen ist möglich

4.4.1 In hängenden Tropfen bilden sich einzelne Sphäroide

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer alternativen, nicht auf dem Prinzip der Rotation basierenden Methode zur Herstellung von Rosettensphäroiden. Dadurch sollte die kontinuierliche mikroskopische Beobachtung eines einzelnen Sphäroids über den Zeitraum von seiner Bildung bis zur Entwicklung der histotypischen Strukturen ermöglicht werden. Dafür wurde die Methode der hängenden Tropfen ausgewählt, bei der Zellen in einem am Deckel einer Kulturschale hängenden Mediumstropfen kultiviert werden. Die Präparation der dafür nötigen Retinazellen erfolgte nach dem für Rosettensphäroide typischen Protokoll. Die hergestellte Zellsuspension enthielt mit 2 x 10^6 Zellen/ml zunächst die gleiche Konzentration an Zellen, wie sie auch für die Rotationskultur angewendet wurde. Von dieser Suspension wurden nun 20µl-Tropfen im Deckel einer Kulturschale hängend für sieben Tage kultiviert, und die darin stattfindende Entwicklung der einzelnen Sphäroide jeden Tag fotografisch dokumentiert. Als Kontrollen wurden jeweils 2 ml derselben Zellsuspension für die entsprechende Zeit als typische Rotationskultur gezüchtet. Um einen Vergleich zwischen den beiden Kultivierungsmethoden zu erhalten, wurden am entsprechenden Tag einzelne Kontrollsphäroide ebenfalls fotografisch festgehalten.

Wie in Abb. 62 zu erkennen ist, kommt es innerhalb eines solchen Tropfens zu einem schrittweisen Reaggregationsprozess, durch den in fast allen Fällen ein einzelner Sphäroid entsteht. Einen Tag nach der Aussaat lassen sich zunächst in der Mitte des Tropfens großflächige Zellklumpen erkennen, die an ihrer Peripherie von kleineren, oftmals noch runden Zellkugeln flankiert werden. Innerhalb der nächsten 1-2 Tage formt sich aus dieser Zellmasse ein einzelner, zusammenhängender Sphäroid. Diese zeigen in ihrer weiteren Entwicklung Übereinstimmungen mit den Sphäroiden in Rotationskultur: nach vier und sechs Tagen in Kultur lassen sich auch hier die für diesen Kultivierungsabschnitt typischen Aufwölbungen von IPL-Bereichen auf der Oberfläche erkennen (vgl. Gliederungspunkt 4.2.3). Der Vergleich mit den Sphäroiden aus der Rotation zeigt allerdings auch, dass die im hängenden Tropfen entstandenen Sphäroide deutlich größer sind als die aus der Rotationskultur.

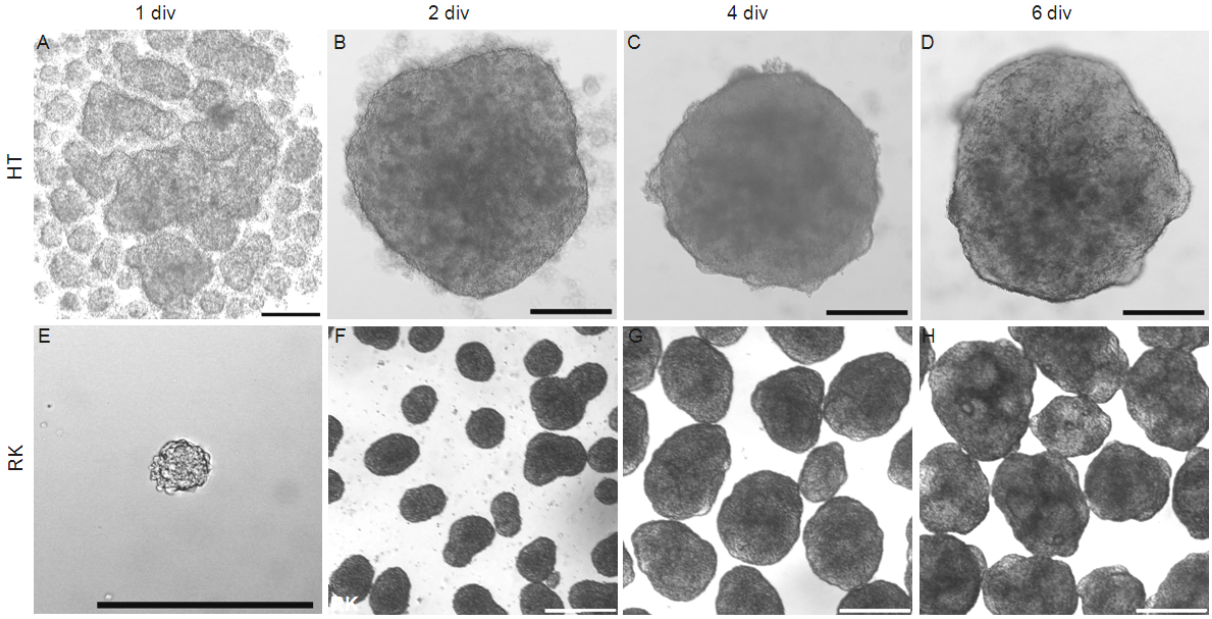

Abbildung 62: In jedem hängenden Tropfen bildet sich ein einzelner Sphäroid, dessen Größe die der Sphäroide aus Rotationskultur deutlich übertrifft. A-D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von ein und demselben in einem hängenden Tropfen kultivierten Sphäroid an den Kulturtagen 1 (A), 2 (B), 4 (C) und 6 (D). Die Konzentration der verwandten Zellsuspension betrug 2 Millionen Zellen/ml. E-H: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Sphäroide aus Rotationskultur an den Kulturtagen 1 (E), 2 (F), 4 (G) und 6 (H). Die Konzentration der verwandten Zellsuspension betrug 2 Millionen Zellen/ml. Die Betrachtung der Färbungen zeigt einen deutlichen Größenunterschied der Reaggregate aus den hängenden Tropfen und der Rotationskultur. Abkürzungen: HT = Hängender Tropfen, RK = Rotationskultur. Balken = 250µm.

4.4.2 Die Dichte der Zellen im Reaggregationsmedium ist ausschlaggebend für die Größe der Sphäroide

Um den Einfluss der Zelldichte innerhalb der Tropfen auf die Größe der gebildeten Sphäroide zu untersuchen, wurden Ansätze mit 40 000, 20 000, 13 000, und 10 000 Zellen pro Tropfen für sieben Tage kultiviert. Die Zelldichte in den Tropfen verringert sich durch diese Verkleinerung der Zellzahl von 2,4 Millionen Zellen/cm^3 (40 000) auf 1,2 Millionen Zellen/cm^3 (20 000) bzw. 800 000 Zellen/cm^3 (13 000). Im Falle von 10 000 Zellen im Tropfen beträgt sie lediglich noch 600 000 Zellen/cm^3. Zusätzlich wurden Kontrollen in der Rotationskultur hergestellt. Dafür wurde sowohl eine Zelldichte in der Kulturschale von 1,7 Millionen Zellen/cm^3 (2 Millionen Zellen/ml) als auch eine Dichte von 0,85 Millionen Zellen/cm^3 (1 Millionen Zellen/ml) gewählt. Nach einem und nach sieben Tagen in Kultur wurden alle im Tropfen kultivierten Sphäroide mikroskopisch dokumentiert. Am siebten Kulturtag erfolgte zusätzlich eine Größenvermessung der Sphäroide aus den Tropfen und der Rotationskultur.

Wie in Abb. 63 zu sehen ist, sind bereits nach einem Tag deutliche Unterschiede in den mit unterschiedlichen Zellmengen beladenen Tropfen zu sehen. Mit abnehmender Zelldichte wird die durchschnittliche Größe der ersten, sich in der Mitte des Tropfens sammelnden, Fusionsprodukte geringer. In den Tropfen mit lediglich 10 000 Zellen bilden sich keine Sphäroide mehr (Ergebnis nicht gezeigt). Dieser Trend spiegelt sich auch nach sieben Kulturtagen in den Ergebnissen der Vermessungen der Sphäroide wider, für die jeweils 15 Sphäroide aus zwei unterschiedlichen Präparationen vermessen wurden (n=30). Es zeigt sich eine direkte Abhängigkeit der gemessenen Fläche von der Zelldichte im Tropfen. Eine Halbierung der Zelldichte bringt auch die Halbierung der gemessenen Fläche mit sich. Die Unterschreitung einer kritischen Dichte führt dazu, dass sich kein Sphäroid mehr im Tropfen bildet. Bezieht man jedoch die Vermessung der Sphäroide aus der Rotationskultur in diesen Vergleich mit ein, zeigt sich ein anderes Bild: im Falle einer Zelldichte von 1,66 Millionen Zellen/cm^3 in der Kulturschale sind die darin entstandenen Sphäroide immer noch weniger als halb so groß als die Sphäroide aus den Tropfen mit einer Zelldichte, die lediglich 1,2 Millionen Zellen/cm^3 beträgt. Trotz der geringeren Dichte sind die Sphäroide aus dem Tropfen also größer als die aus der Rotationskultur. Noch deutlicher stellt sich dieser Unterschied bei der Betrachtung der Sphäroide aus der Rotationskultur dar, bei denen die Zelldichte in der Kulturschale lediglich 850 000 Zellen/cm^3 beträgt. Bei ihnen beträgt die gemessene Fläche lediglich 0,014mm^2 und sie zeigen nicht die für Sphäroide typische morphologische Entwicklung (Ergebnisse nicht gezeigt). Im hängenden Tropfen bilden sich dagegen bei einer Zelldichte von 800 000 Zellen/cm^3 noch Sphäroide aus, die sowohl die für Sphäroide typische morphologische Entwicklung durchlaufen, als auch noch die für sie charakteristischen histotypischen Strukturen ausbilden (vgl. Gliederungspunkt 4.2).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine direkte Abhängigkeit der Größe von Sphäroiden in den Reaggregaten also nur innerhalb eines bestimmten Kultursystems – in diesem Falle dem hängenden Tropfen – feststellbar ist. Für den Vergleich verschiedener Kultursysteme gilt diese Abhängigkeit dagegen nicht mehr. Darüber hinaus zeigt der Vergleich dieser beiden Kulturtechniken, dass im hängenden Tropfen weniger Zellen für die erfolgreiche Ausbildung von Sphäroiden benötigt werden.

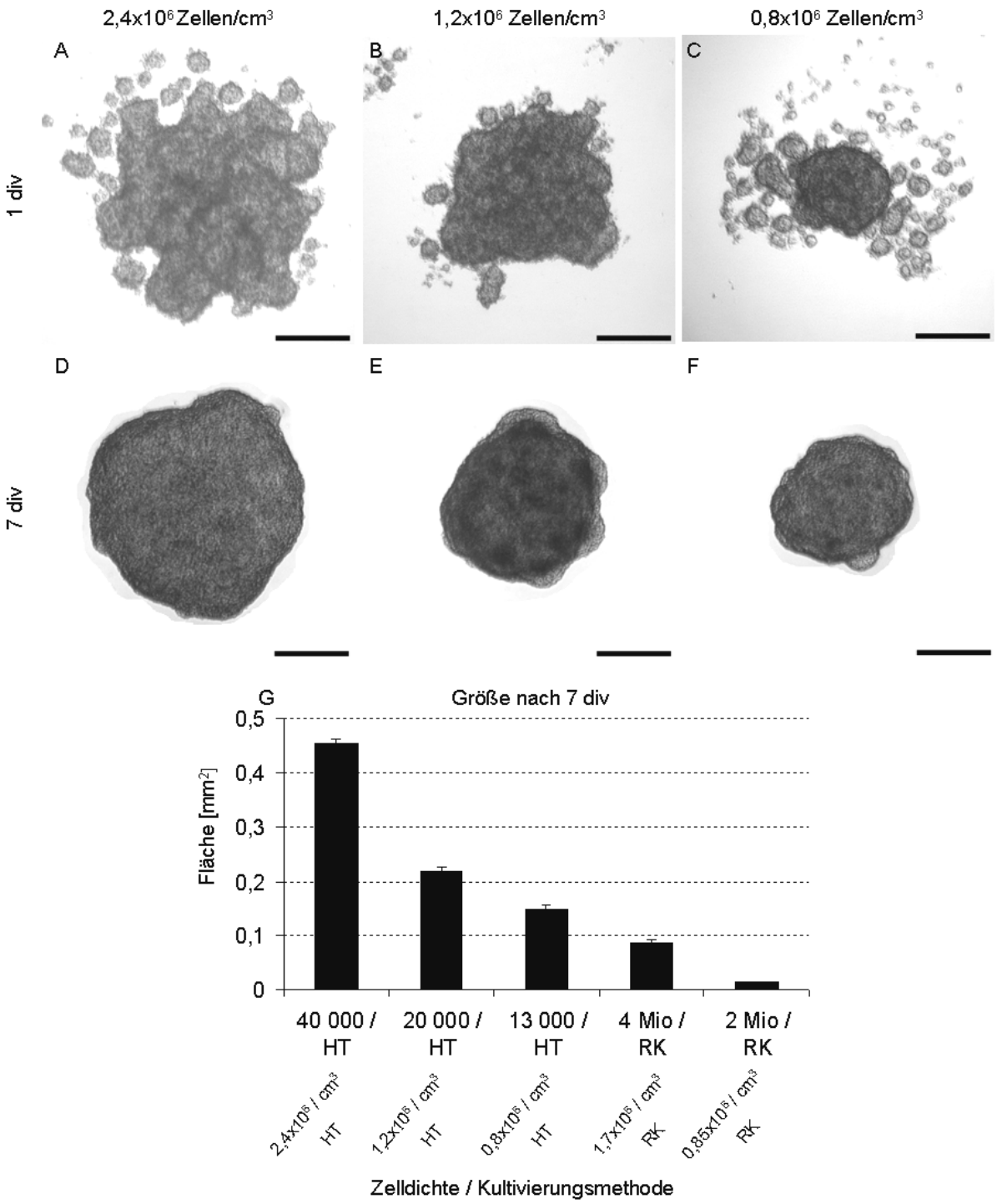

Abbildung 63: Die Größe der gebildeten Sphäroide ist abhängig von der Zelldichte und der Kultivierungsmethode. A-C: Lichtmikroskopische Aufnahmen von im hängenden Tropfen kultivierten Sphäroiden am Kulturtag 1. Die Zelldichte in den Tropfen betrug 2,4 (A), 1,2 (B) und 0,8 Millionen Zellen pro cm^3 (C). **D-F:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von im hängenden Tropfen kultivierten Sphäroiden am Kulturtag 7. Die Zelldichte in den Tropfen betrug 2,4 (D), 1,2 (E) und 0,8 Millionen Zellen pro cm^3 (F). G: Vermessung der Fläche von Sphäroiden aus hängenden Tropfen und Rotationskulturen mit unterschiedlicher Zelldichte nach 7 DIV. Die Werte aller vermessenen Sphäroide wurden gemittelt und mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt (n=30). Abkürzungen: HT = Hängender Tropfen, RK = Rotationskultur. Balken = 200µm.

4.4.3 In Sphäroiden aus hängenden Tropfen bilden sich histotypische Strukturen aus

Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit sich im Inneren der Sphäroide aus den hängenden Tropfen histotypische Strukturen ausbilden, wurden diese nach sieben Tagen in Kultur fixiert, geschnitten und anschließend einer Kernfärbung mit SYTOX orange unterzogen. Abb. 64 zeigt, dass die Form der Sphäroide von der Zahl der in den Tropfen eingesäten Zellen abhängig ist. Bei einer Zellzahl von 40 000 unterscheidet sich diese deutlich von der von Sphäroiden aus Rotationskultur. Im Gegensatz zu der eher runden bis knollenförmigen Form der Kontrollen aus der Rotationskultur bilden sich hier Reaggregate aus, deren Form an einen Diskus erinnert. Je nach Schnittrichtung lässt sich in der Kernfärbung dementsprechend eine Kreisform, oder aber eine Ellipse erkennen. Die Verringerung der Zellzahl auf 13 000 Zellen pro Tropfen führt dagegen zu einer Annäherung an die Form der Kontrollen. Unabhängig von den Unterschieden in der Form lassen sich jedoch unabhängig von der Zellzahl - ähnlich wie bei den Reaggregaten aus der Rotationskultur - kernhaltige und kernfreie Bereiche unterscheiden lassen.

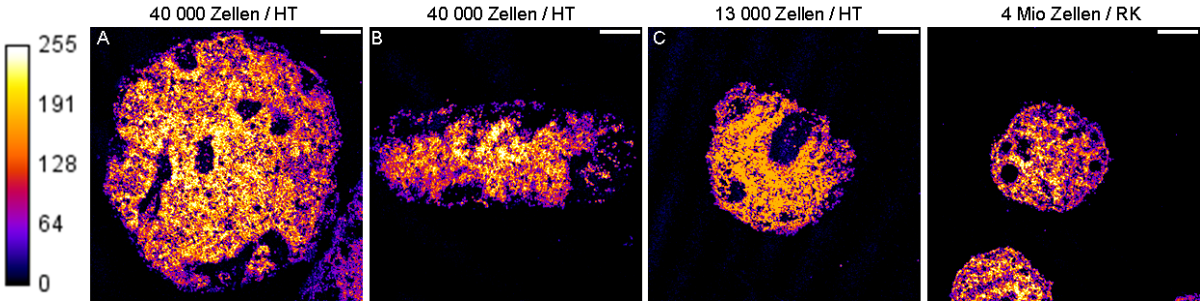

Abbildung 64: Die Zelldichte in den hängenden Tropfen beeinflusst die Form der Reaggregate. A-C: Kernfärbungen mit SYTOX orange an Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden aus hängenden Tropfen, die zu Kulturbeginn 40 000 Zellen (A, B) bzw. 13 000 Zellen (C) enthielten. **D:** Kernfärbungen mit SYTOX orange an Gefrierschnitten von Rosettensphäroiden aus Rotationskulturen mit 4 Millionen Zellen/ml. Die Darstellung aller Färbungen erfolgte in Falschfarben mit dem Fire-Lookup Table von ImageJ. Die Färbungen zeigen, dass sich die Form der Sphäroide aus den Tropfen mit abnehmender Zelldichte an die der Reaggregate aus der Rotationskultur annähert. Abkürzungen: HT = Hängender Tropfen, RK = Rotationskultur. Balken = 50µm.

Um die Histologie der Sphäroide genauer zu charakterisieren, wurden mehrere Antikörperfärbungen durchgeführt. Wie in Abb. 65 dargestellt, bilden sich auch in den hängenden Tropfen die für Rosettensphäroide charakteristischen histotypischen Strukturen aus. Färbungen mit Antikörpern gegen Visinin und Rhodopsin der Stäbchen (Cern901) zeigen ebenfalls das für

Sphäroide aus Rotationskultur typische Färbemuster: Während sich die Visinin positiven postmitotischen Photorezeptoren überall im Sphäroid nachweisen lassen, ist das Cern901-Signal in der Peripherie des Reaggregats konzentriert. Dieses Färbemuster lässt sich bei allen gewählten Zellkonzentrationen erkennen (Ergebnisse nicht dargestellt). Das gleiche gilt für die Bildung von Rosetten, die ebenfalls bei allen Sphäroiden auftraten. In allen von ihnen überwiegt der Anteil an Visinin-positiven Zellen den der Cern901-positiven Photorezeptoren um ein Vielfaches.

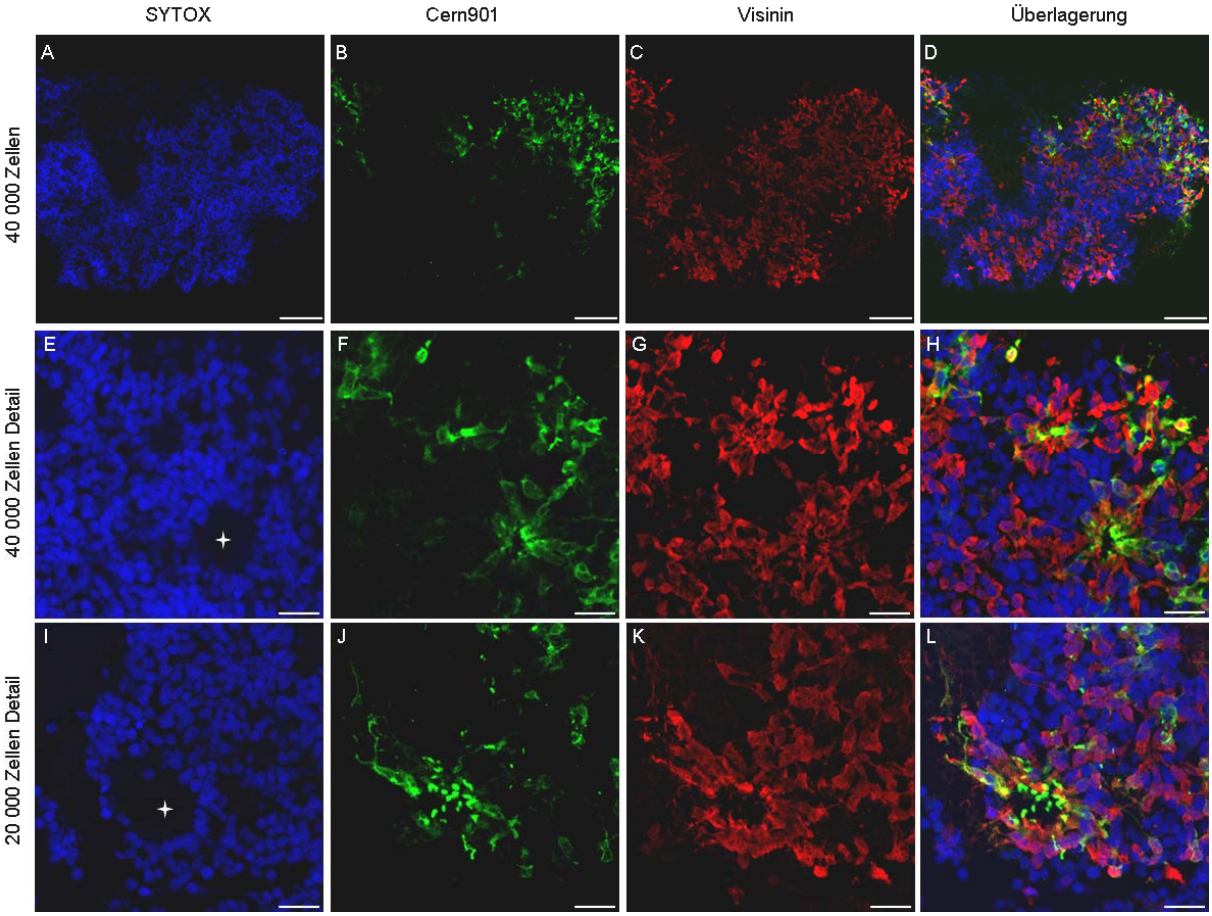

Abbildung 65: Sphäroide aus hängenden Tropfen bilden Photorezeptor-Rosetten aus. A-C: Für den gleichzeitigen Nachweis von Rhodopsin und Visinin in Sphäroiden aus hängenden Tropfen wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange (A) immunhistochemische Färbungen gegen Rhodopsin (Cern901, B) und Visinin (C) an Gefrierschnitten von Reaggregaten nach 7 DIV durchgeführt. Die Zellzahl im Tropfen betrug zu Beginn der Kultivierung 40 000. **D:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus A, B und C. **E-H:** Detailansicht des in A-D dargestellten IPL-Bereichs. **I-K:** Detailansicht einer mit SYTOX orange (I) und immunhistochemisch gegen Rhodopsin (Cern901, J) und Visinin (K) gefärbten Photorezeptor-Rosette von Sphäroiden aus hängenden Tropfen. Die Zellzahl im Tropfen betrug zu Beginn der Kultivierung 20 000. **L:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus I, J und K. Sterne markieren das Lumen der Photorezeptoren-Rosetten. Balken = 50µm in A - D bzw. 15µm in E-L

Neben den Rosetten kann mit den IPL-Bereichen auch die zweite für Rosettensphäroide cha-

rakteristische histotypische Struktur nachgewiesen werden (vgl. Abb. 66). Die nähere Charakterisierung mittels Antikörperfärbungen gegen Calretinin und Vimentin erbringt auch hier keine auffälligen Unterschiede zu den Kontrollen aus der Rotationskultur. Das für die Fortsätze von Müllerzellen spezifische Vimentin kann in allen Bereichen des Sphäroids gefunden werden, wobei das Signal in den IPL-Bereichen stets besonders konzentriert auftritt. Ähnlich zu den Kontrollen aus der Rotation lässt sich auch hier in der Peripherie stets ein stärkeres Signal als im Zentrum erkennen. Bei den Rosetten zeigt sich die charakteristische Vimentin-Färbung zwischen den Kernen der sie bildenden Photorezeptoren, sowie die typische Verbreiterung der Fortsätze innerhalb des Lumens.

Die Verteilung des Calretinin-Signals entspricht ebenfalls dem aus den Rotationskulturen bekannten Muster. Zahlreiche Zellen sind in den INL-artigen Begrenzungen der IPL-Bereiche lokalisiert. Die Färbung beschränkt sich jedoch – wie auch bei den Kontrollen aus der Rotationskultur - überwiegend auf die Zellkörper. Neben zahlreichen positiven Zellen in den unorganisierten Bereichen können allerdings auch Calretinin-exprimierende Zellen in den Kernringen der Rosetten nachgewiesen werden.

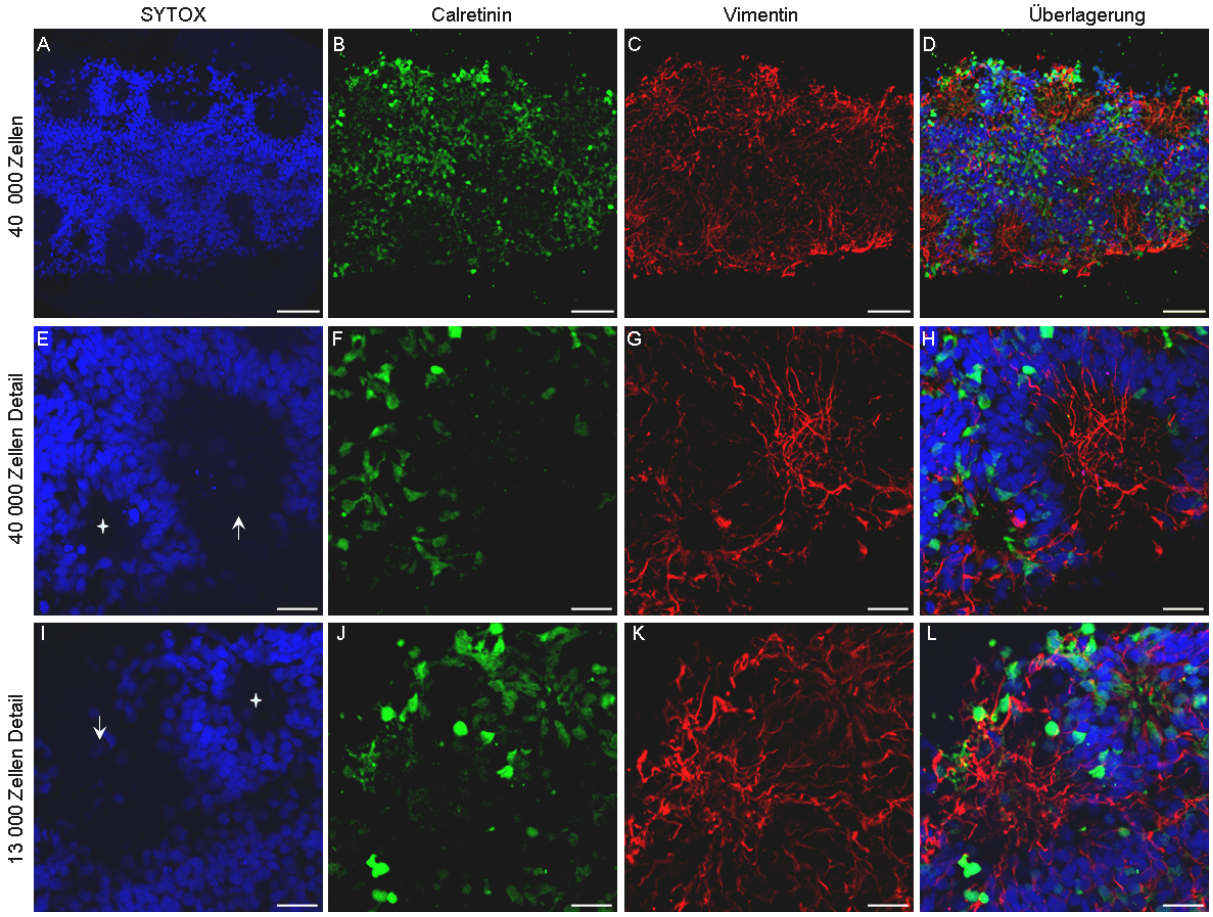

Abbildung 66: Die Expression von Calretinin und Vimentin in hängenden Tropfen entspricht den aus Rotationskultur bekannten Mustern. A-C: Für den gleichzeitigen Nachweis von Calretinin und Vimentin in

Sphäroiden aus hängenden Tropfen wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange (A) immunhistochemische Färbungen gegen Calretinin (B) und Vimentin (C) an Gefrierschnitten von Reaggregaten nach 7 DIV durchgeführt. Die Zellzahl im Tropfen betrug zu Beginn der Kultivierung 40 000. **D:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus A, B und C. **E-H:** Detailansicht des in A-D dargestellten IPL-Bereichs. **I-K:** Detailansicht eines mit SYTOX orange (I) und immunhistochemisch gegen Calretinin (J) und Vimentin (K) gefärbten IPL-Bereichs von Sphäroiden aus hängenden Tropfen. Die Zellzahl im Tropfen betrug zu Beginn der Kultivierung 20 000. **L:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus I, J und K. Sterne markieren das Lumen der Photorezeptoren-Rosetten. Pfeile markieren die IPL-Bereiche. Balken = 50µm in A - D bzw. 15µm in E – L.

Der in Abb. 67 gezeigt Nachweis von synaptischen Vesikeln mit dem entsprechenden Antikörper SV2 zeigt ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Sphäroiden aus der Rotationskultur und denen aus den hängenden Tropfen. Das Signal ist in beiden Fällen innerhalb der unorganisierten kernhaltigen Bereiche, sowie den IPL-Bereichen am deutlichsten. Die um sie herum liegenden INL-artigen Bereiche werden dagegen nur geringfügig gefärbt. Die Zellkörper der in Rosetten organisierten Photorezeptoren werden von dem SV2-Antikörper deutlich markiert, wobei die stärkste Färbung in dem, dem Lumen der Rosette zugewandten Teil der Zellen auftritt.

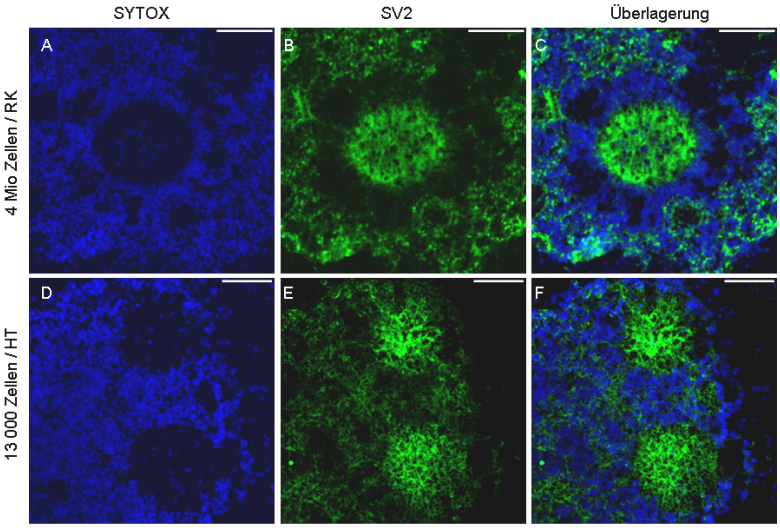

Abbildung 67: In den Rosettensphäroiden aus hängenden Tropfen erfolgt die Ausbildung eines synaptischen Netzwerks. A-B: Für Nachweis von synaptischen Vesikeln in den Sphäroiden aus Rotationskultur wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange (A) immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper SV2 an Gefrierschnitten von Sphäroiden nach 7 DIV(B) durchgeführt. **C:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus A und B. **D-E:** Für Nachweis von synaptischen Vesikeln in den Sphäroiden aus hängenden Tropfen wurden neben Kernfärbungen mit SYTOX orange (D) immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper SV2 an Gefrierschnitten von Sphäroiden nach 7 DIV(E) durchgeführt. **F:** Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus D und E. Balken = 15µm.

4.5 Ausplattierte Sphäroide zeigen die für Rosetten-sphäroide charakteristische Entwicklungen

4.5.1 Sphäroide, die nach einem Tag in Rotationskultur ausgebildet wurden, bilden lediglich Rosetten aus

In diesem Teil der Arbeit sollten die Auswirkungen eines Wechsels der Kulturbedingungen von beständiger Rotation zu einer Standkultur auf die Entwicklung von Sphäroiden untersucht werden. Dies sollte zunächst am Beispiel von Sphäroiden getestet werden, die lediglich einen Tag in Rotationskultur gehalten wurden. Im Anschluss an diesen ersten Tag wurden sie deshalb in die Kavitäten einer 24-well-Platte ausgesät. In den darauf folgenden Tagen wurde ihre Entwicklung fotografisch dokumentiert. Die mikroskopischen Beobachtungen zeigen, dass diese Sphäroide einen Tag nach der Aussaat weiterhin ihre kugelige Form besitzen. Der Zellverband ist weiterhin klar erkennbar und deutlich von der Umgebung abgegrenzt. Vereinzelt sind allerdings ganze Zellen, oder aber Zellfortsätze sichtbar, die den kompakten Zellverband verlassen. Um Unterschiede zwischen den ausgesäten und den weiterhin unter Rotation kultivierten Sphäroiden zu visualisieren, wurden Antikörperfärbungen gegen Neurofilament, Vimentin und Visinin durchgeführt.

Abb. 68 zeigt die für ausplattierte und in Rotationskultur gehaltene Sphäroide typischen Färbemuster nach einer Antikörperfärbung gegen Neurofilament. In der Retina ist Neurofilament in den zum Tektum ziehenden Fortsätzen von Ganglienzellen zu finden. In ausplattierten Sphäroiden (Abb. 68 A-C) werden durch die Färbung lang gezogene Fortsätze markiert, die sich in deren Peripherie z. T. mehrfach um das Reaggregat herum winden. Gleichzeitig ziehen sich zahlreiche Fortsätze ohne erkennbare Ordnung durch den Zellverband. Dieses Färbemuster stimmt mit dem aus den Schnitten der Kontrollsphäroide überein. Auch dort ist das stärkste Signal ebenfalls unter der, durch die weiße Linie gekennzeichnete, Oberfläche lokalisiert. Aber auch das Innere der Sphäroide ist von Fortsätzen durchzogen. In den Standkulturen verlassen allerdings einige Fortsätze ihre ursprüngliche Bahn und wachsen auf dem Untergrund aus dem Zellverband heraus (siehe Pfeile in Abb. 68 B). An den Stellen, wo mehrere Sphäroide dicht nebeneinander zu liegen gekommen sind, wechseln einzelne Fasern von einem auf das andere Reaggregat über und umwickeln somit zwei, oder sogar mehrere Sphäroide zugleich (vgl. Abb. 68 C, Pfeil).

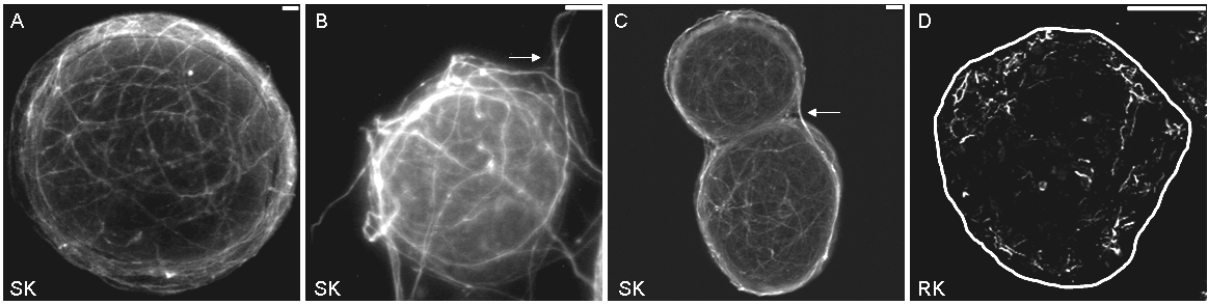

Abbildung 68: Neurofilament-positive Zellfortsätze sind sowohl in ausplattierten, als auch in den und unter Rotation kultivierten Sphäroiden vermehrt in der Peripherie der Reaggregate lokalisiert. A-C: Für den Nachweis von Neurofilament in den ausplattierten Sphäroiden wurden einen Tag nach der Aussaat immunhistochemische Färbungen gegen dieses Protein durchgeführt. **D:** Für den immunhistochemischen Nachweis von Neurofilament in Sphäroiden aus Rotationskultur wurden immunhistochemische Färbungen gegen dieses Protein an Gefrierschnitten von Reaggregaten nach 2 DIV durchgeführt. Pfeile markieren einzelne, sich aus dem Zellverband lösende Fortsätze. Abkürzungen: RK = Rotationskultur, SK = Standkultur. Balken = 50µm.

Für die Darstellung der Vimentin-Färbung in Abb. 69 A sind die Grenzen des ausplattierten Sphäroids mit einer durchgezogenen Linie markiert. Die Vimentin-Färbung macht deutlich, dass sich die Vimentin-positiven Zellen stets bis an diese Grenzen erstrecken. Innerhalb des Zellverbandes weisen sie keine erkennbare Anordnung auf. Eine genauere Betrachtung der Färbungen zeigt außerdem, dass viele der markierten Zellen in den äußeren Bereichen eine großflächige Morphologie aufweisen und direkt dem Untergrund anliegen. Zusätzlich sind einige der Zellen, die den Zellverband verlassen, positiv für Vimentin. Der Vergleich mit den Färbungen der Sphäroide aus Rotationskultur (Abb. 69 B) zeigt, dass es keine Unterschiede in der Anordnung und der Verteilung Vimentin-positiver Zellen zu verzeichnen gibt. Auch in den Sphäroiden aus Rotationskultur sind sie über den gesamten Sphäroid verteilt, reichen bis dicht unter die, durch die weiße Linie gekennzeichnete, Oberfläche heran und weisen keine erkennbare Anordnung auf.

Färbungen der ausplattierten Sphäroide gegen Visinin (Abb. 69 C) zeigen, dass die Photorezeptoren zu diesem Zeitpunkt, im Vergleich zu den Vimentin-positiven Zellen, verstärkt im Zentrum des Zellverbandes lokalisiert sind. Nur wenige Zellen liegen in direkter Nachbarschaft zu dessen Grenze. Einige der Photorezeptor-Vorläufer sind in Rosetten angeordnet, während der Rest unorganisiert erscheint. Unterschiede zu den Photorezeptoren in den Sphäroidschnitten (Abb. 69 D) bezüglich Anordnung und Morphologie sind nicht auszumachen. Auch hier liegen die Visinin-positiven Zellen mehr im Sphäroidzentrum als in der Peripherie. Lange, Visinin-positive Fortsätze, wie sie in der Retina acht Tage alter Embryonen zu finden

sind, lassen sich weder in den Schnitten, noch in den Standkulturen erkennen.

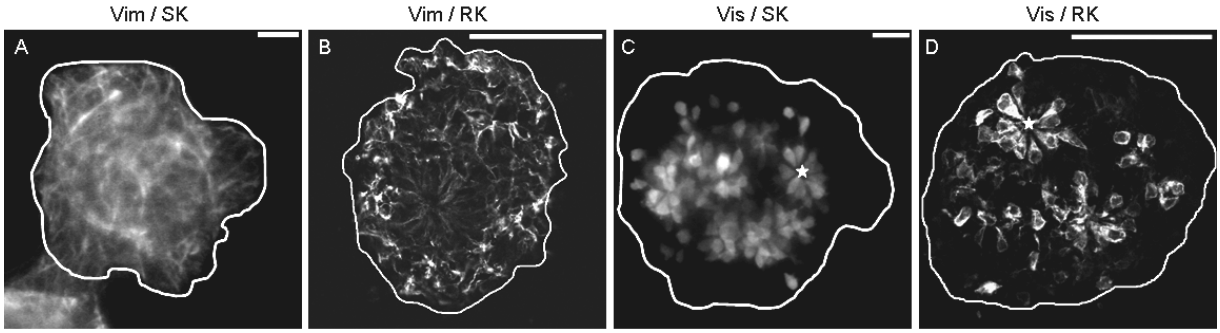

Abbildung 69: Antikörperfärbungen gegen Vimentin und Visinin zeigen keine Unterschiede zwischen ausplattierten und unter Rotation kultivierten Sphäroiden. A: Für den Nachweis von Vimentin in den ausplattierten Sphäroiden wurden einen Tag nach der Aussaat immunhistochemische Färbungen gegen dieses Protein durchgeführt. **B:** Für den immunhistochemischen Nachweis von Vimentin in Sphäroiden aus Rotationskultur wurden immunhistochemische Färbungen gegen dieses Protein an Gefrierschnitten von Reaggregaten nach 2 DIV durchgeführt. **C:** Für den Nachweis von Visinin in den ausplattierten Sphäroiden wurden einen Tag nach der Aussaat immunhistochemische Färbungen gegen dieses Protein durchgeführt. **D:** Für den immunhistochemischen Nachweis von Visinin in Sphäroiden aus Rotationskultur wurden immunhistochemische Färbungen gegen dieses Protein an Gefrierschnitten von Reaggregaten nach 2 DIV durchgeführt. Abkürzungen: RK = Rotationskultur, SK = Standkultur, Vim = Vimentin, Vis = Visinin. Balken = 50µm.

Die in Abb. 70 dargestellte mikroskopische Betrachtung der Sphäroide macht deutlich, dass sich zwei Tage nach der Aussaat zwei Phänotypen unterschieden lassen: beim Ersten ist der Sphäroid als solcher weiterhin zu erkennen (vgl. Abb 70 B), während beim zweiten die ursprüngliche Form des Reaggregats nicht mehr zu sehen ist (vgl. Abb. 70 A). Letztere wurden für die weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

In den Fällen, bei denen die ursprüngliche Form des Sphäroids weiterhin erkennbar ist, hat sich das gesamte Reaggregat zu einem mehrschichtigen Zellrasen abgeflacht. Der Zellverband erscheint jedoch weiterhin sehr kompakt. Dieser, an einen flachen Sphäroid erinnernde, Bereich wird im Anschluss stets als zentraler Bereich bezeichnet. Der sich in der Peripherie anschließende, aus flach am Boden anliegenden Zellen bestehende Bereich, wird dagegen als Randbereich definiert.

Auf der Oberfläche des zentralen Bereiches sind häufig kreisrunde Strukturen sichtbar (siehe Pfeile in Abb. 70 B), die eine Vertiefung auf der Oberfläche darstellen. Im Inneren dieser Strukturen lassen sich mit dem Lichtmikroskop zahlreiche Öltröpfchen von Zapfen-Photorezeptoren erkennen (vgl. Abb. 70 C). Kernfärbungen mit DAPI zeigen, dass im Bereich dieser Strukturen kreisförmig angeordnete Zellkerne zu erkennen sind, die an die Rosetten in Sphäroiden erinnern (vgl. Abb. 70 D).

Zur Bestätigung, dass es sich bei diesen Strukturen um Rosetten handelt, wurden zusätzlich Antikörperfärbungen mit Visinin und Vimentin durchgerührt. Wie in Abb. 70 E-F zu sehen ist, zeigen sie, dass sich sowohl die Visinin- als auch Vimentin-positiven Zellen in diesen Bereichen so anordnen, wie dies auch in den Rosetten der Kontrollsphäroide der Fall ist. Viele der in den Zellkernringen angeordneten Zellen sind positiv für Visinin. Sie besitzen nach vorne hin spitz zulaufende Fortsätze, die in das kernfreie Lumen hineinreichen. Zwischen diesen Zellen ziehen Vimentin-positive Zellen hindurch. Neben diesen Ähnlichkeiten auf histologischer Ebene, zeigt sich auch auf der zeitlichen Ebene eine Analogie. Lichtmikroskopisch lassen sich Rosetten sowohl in den Gefrierschnitten von Sphäroiden aus der Rotationskultur, als auch bei ausplattierten Sphäroiden erstmals am dritten Tag *in vitro* nachweisen.

Neben dieser deutlichen Analogie zu den Sphäroiden aus Rotationskultur in der Ausbildung von Rosetten zeigt sich jedoch auch eine drastische Abweichung von den Reaggregaten, die permanent in Rotationskultur gehalten werden: in den ausplattierten Sphäroiden lassen sich keine Anlagen für IPL-Bereiche finden. Diese lassen sich in der Rotationskultur etwa ab dem dritten Kulturtag anhand von Kern- und Vimentin-Färbungen identifizieren. Im Falle der ausplattierten Sphäroide ist dies nicht der Fall.

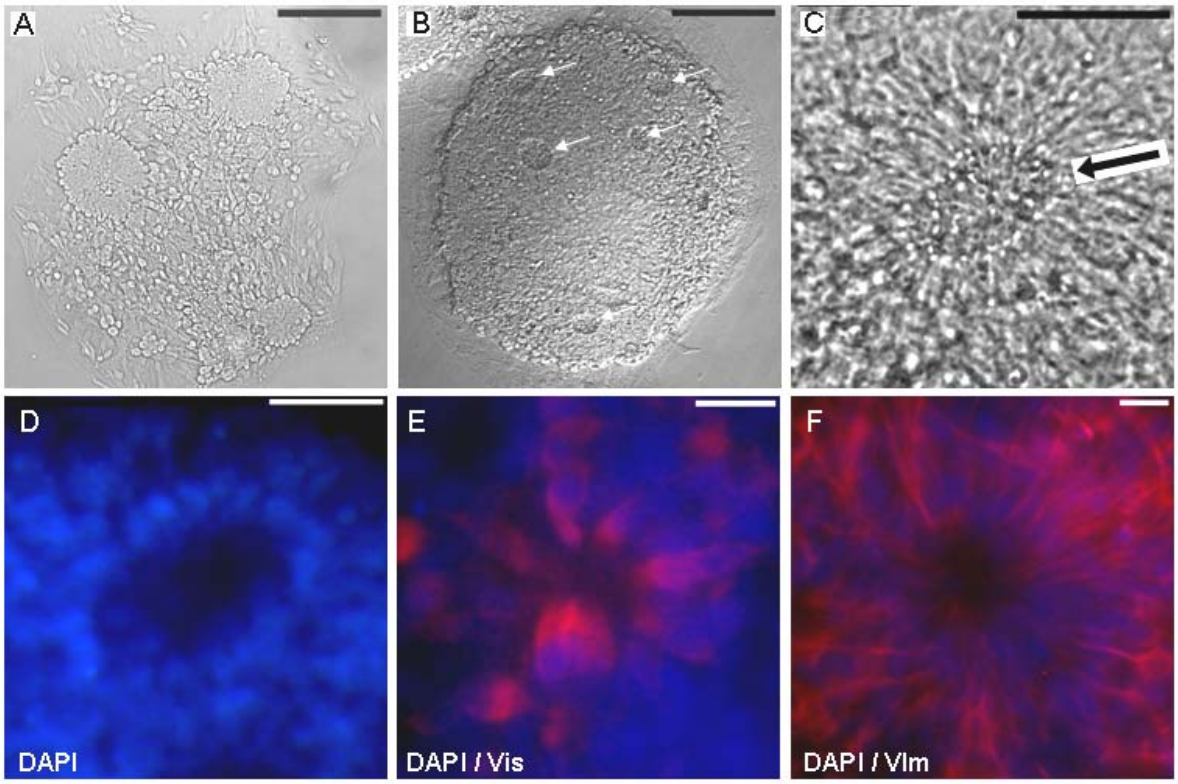

Abbildung 70: Auf der Oberfläche ausplattierter Sphäroide bilden sich Rosetten aus. A-B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von ausplattierten Sphäroiden die für einen Tag in Rotationskultur und für einen weiteren Tag in Standkultur gehalten wurden. C: Lichtmikroskopishe Detailaufnahme einer Rosette auf der Oberfläche der ausplattierten Sphäroide. D-F: Kern- und immunhistochemische Färbungen von ausplattierten mit SYOTX

orange (D) und Antikörpern gegen Visinin (E) und Vimentin (F). Für die Darstellung von E und F wurden Kern- und Antikörperfärbungen übereinandergelegt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Ausbildung zwei unterschiedlicher Phänotypen von Sphäroiden nach dem Ausplattieren. Darüber hinaus zeigen sich Strukturen auf deren Oberfläche, die anhand der Antikörperfärbungen als Rosetten identifiziert werden können. Abkürzungen: Vim = Vimentin, Vis = Visinin, Balken in A+B = 100µm / Balken in C-F = 50µm.

Zusätzlich zu den Rosetten wurden außerdem die bereits beschriebenen Randbereiche, die sich in der Peripherie der Zellverbände bilden, ebenfalls weitergehend untersucht. Die in Abb. 71 A dargestellte lichtmikroskopische Aufnahme macht deutlich, dass sie sich aus zwei unterschiedlichen Zelltypen zusammensetzen, die beide den kompakten Zellverband verlassen. Bei ersten handelt es sich um großflächige, direkt dem Boden anliegende Zellen (siehe Sterne in Abb. 71 A). Der zweite Zelltyp sitzt ausschließlich auf der Oberfläche des ersten Zelltyps (siehe Pfeile in Abb. 71 A). Die Morphologie letzterer Zellen kann stark variieren. Es sind sowohl kugelige, als auch lang gestreckte Zellen dabei. Häufig besitzen sie einen oder mehrere Fortsätze, wodurch sich mit fortlaufender Kulturdauer z. T. ein dichtes Fasernetzwerk auf der Oberfläche der unten liegenden Zellen bildet. Kernfärbungen mit DAPI zeigen, dass sich die Zellkerne dieser beiden Zelltypen deutlich voneinander unterscheiden. Wie aus Abb. 71 B hervorgeht, besitzen die dem Untergrund anliegenden Zellen größere Zellkerne, als die oben aufsitzenden Zellen. Gleichzeitig sind ihre Kerne deutlich schwächer gefärbt. Die großflächigen Zellen mit den dunklen Zellkernen exprimieren durchgehend das Intermediärfilament Vimentin (vgl. Abb 71 C). Eine Expression Neuron-spezifischer Marker kann bei ihnen dagegen nicht nachgewiesen werden. Die ihnen aufsitzenden Zellen konnten dagegen anhand diverser Markerfärbungen als Neurone identifiziert werden. Getestet wurden Antikörper gegen Visinin (vgl Abb. 71 D), Tenascin, Calretinin und Pax6, wodurch Photorezeptoren, Amakrin- und Ganglienzellen sowie Horizontalzellen zu dieser Neuronenpopulation gezählt werden können (Ergebnisse nicht gezeigt).

Im Falle der Photorezeptoren ist es auffällig, dass diese teilweise lange Fortsätze ausbilden. Einen Tag nach der Aussaat konnten noch keine Photorzeptor-Vorläufer mit solcher Morphologie nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Ausplattierung von einen Tag in Rotationskultur gehaltenen Sphäroiden keine Auswirkung auf die Rosettenbildung hat, während die Bildung der IPL-Bereiche unterbleibt. Dafür bilden sich durch die Auswanderung Vimentin-positiver Zellen Randbereiche aus, auf denen es teilweise durch ihnen aufsitzenden Zellen zu Netzwerkbildung kommt.

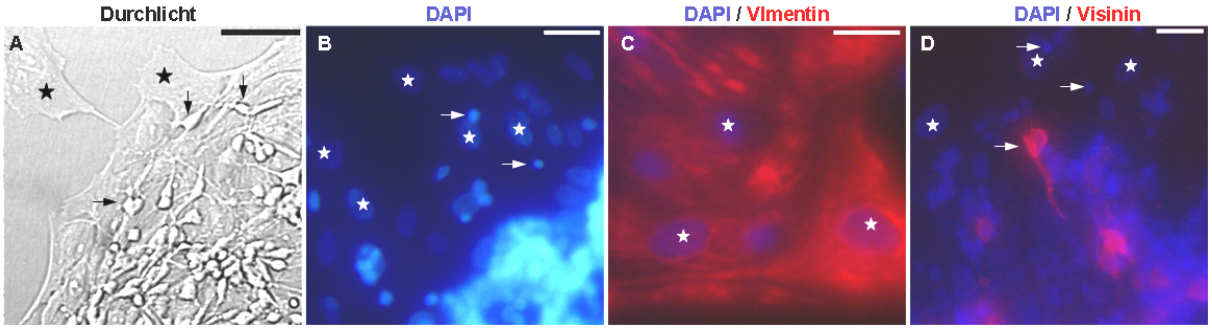

Abbildung 71: Die Randbereiche ausplattierter Sphäroide setzen sich aus mehreren Zelltypen zusammen. A: Lichtmikroskopishe Aufnahme des Randbereichs eines ausplattierten Sphäroids. **B:** Zellkernfärbung mit DAPI des Randbereichs eines zwei Tage lang ausplattierten Sphäroids. C: Kern- und immunhistochemische Färbung mit DAPI (blau) und einem Antikörper gegen Vimentin (rot) des Randbereichs eines zwei Tage lang ausplattierten Sphäroids. C: Kern- und immunhistochemische Färbung mit DAPI (blau) und einem Antikörper gegen Visinin (rot) des Randbereichs eines zwei Tage lang ausplattierten Sphäroids. Die Ergebnisse zeigen die Anwesenheit von flachen, am Boden anliegenden Zellen mit großen Zellkernen die Vimentin exprimieren und von ihnen aufsitzenden Zellen mit kleinen Zellkernen, die positiv für neuronale Marker (Visinin) sind. Sterne markieren die großen, dunkel gefärbten Zellkerne der direkt am Boden anliegenden Vimentin-positiven Zellen. Pfeile markieren die kleinen, hell gefärbten Zellkerne der Neuronen. Balken = 25µm

4.5.2 Sphäroide, die für mehrere Tage in Rotationskultur gehalten wurden, zeigen nach ihrem Ausplattieren die für Rosetten-sphäroide typische morphologische Entwicklung

Nach drei Tagen in Rotationskultur zeigen die Sphäroide im Anschluss an ihre Ausplattierung ein verändertes Verhalten. In den ersten Tagen bleibt der dreidimensionale Gewebsverband erhalten. Die ursprüngliche Form der Reaggregate ist dadurch weiterhin deutlich erkennbar. Die Abflachung des Gewebeverbandes, welche bei nur für einen Tag in Rotationskultur gehaltenen Sphäroiden beobachtet werden kann, tritt hier nicht ein. Einen Tag nach der Aussaat ist die Oberfläche der Sphäroide im lichtmikroskopischen Bild als gleichmäßig ebene Fläche zu sehen. Zwei bis drei Tage später sind darauf dunklere und hellere Bereiche erkennbar. Die hellen Bereiche sind dabei häufig als Ausbuchtungen auf der Oberfläche des Reaggregats erkennbar (siehe große Pfeile in Abb. 72 B). Bei Sphäroiden, die für fünf Tage in Rotationskultur gezüchtet wurden, zeigt sich dieses Phänomen bereits einen Tag nach dem Ausplattieren.

In dieser Entwicklung zeigt sich eine Parallele zu den weiterhin unter Rotation kultivierten Sphäroiden. Bei letzteren kommt es zwischen dem fünften bis sechsten Tag *in vitro* ebenfalls zu Aufwölbungen über die Oberfläche der Sphäroide. Diese erscheinen in der lichtmikrosko-

pischen Aufnahme ebenfalls heller als der restliche Sphäroid. Es handelt sich hierbei um IPL-Bereiche (vgl. Gliederungspunkt 4.2.3).

Zusätzlich zu den IPL-Bereichen lassen sich außerdem vereinzelt Rosetten auf der Oberfläche der ausplattierten Sphäroide erkennen (siehe kleine Pfeile in Abb. 72 B).

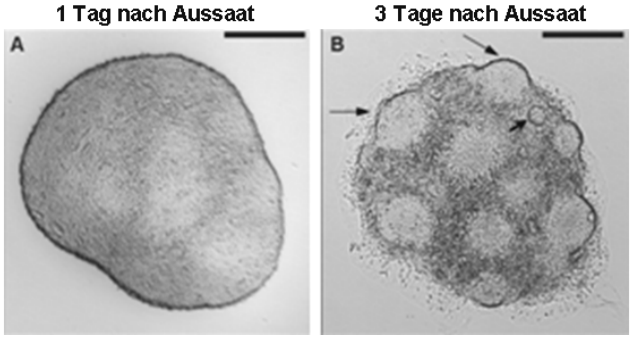

Abbildung 72: Die Ausbildung plexiformer Bereiche erfolgt in Sphäroiden unabhängig von der Kultivierungsform. A-B: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Rosetten-sphäroiden am ersten (A) und dritten Tag (B) nach dem Ausplattieren. Die Aufnahmen zeigen die nach der Ausplattierung stattfindende Ausbildung von plexiformen Bereichen, die sich über die Oberfläche der Reaggregate hinauswölben. Große Pfeile markieren helle IPL-Bereiche auf der Sphäroidoberfläche. Kleine Pfeile markieren Rosetten auf der Sphäroidoberfläche. Balken = 200µm.

Sowohl bei Sphäroiden, die für drei, als auch bei denen die für fünf Tage unter Rotation kultiviert wurden, kommt es nach dem Ausplattieren zur Bildung von Randbereichen. Auch hier beginnt ihre Bildung durch die Migration einer flach am Untergrund anliegenden Zellpopulation. Die in Abb. 73 dargestellte Antikörperfärbung gegen Vimentin, die zehn Tage nach dem Ausplattieren angefertigt wurde, zeigt, dass es sich hierbei erneut um Vimentin-positive Zellen handelt. Das Vimentin-Signal ist allerdings nicht auf die Randbereiche beschränkt, sondern ist auch weiterhin in den zentralen Bereichen zu finden. Letztere sind in Abb. 73 durch die gestrichelte Linie umrandet.

Die Expression von Vimentin in der *in vivo* Retina ist ab dem zehnten Tag nach der Befruchtung auf Müllerzellen beschränkt (Lemmon, 1983). Deshalb wurden für die weitere Charakterisierung dieser auswandernden Vimentin-exprimierenden Zellen Antikörper-färbungen gegen Glutaminsynthetase durchgeführt. Dabei handelt es sich um ebenfalls ein Protein, das ausschließlich von Müllerzellen exprimiert wird, die in ihrer Differenzierung weit vorangeschritten sind (Linser, 1979). Gleichzeitig wird seine Expression nach längerer Kultivierung *in vitro* wieder herunter reguliert (Hauck, 2003). Wie in Abb. 73 B dargestellt, kann zehn Tage nach der Aussaat von fünf Tage in Rotationskultur gehaltenen Sphäroiden Glutaminsynthetase fast ausschließlich in den zentralen Bereichen nachgewiesen werden. Die in den Randbereichen angesiedelten Vimentin-positiven Zellen exprimieren dieses Protein dagegen nicht.

Etwa sieben Tage nach der Aussaat geht die ursprüngliche Sphäroid-Form sowohl bei drei, als auch bei fünf Tage in Rotationskultur verbliebenen Reaggregaten zunehmend verloren. Dafür dehnen sich die Randbereiche immer weiter aus.

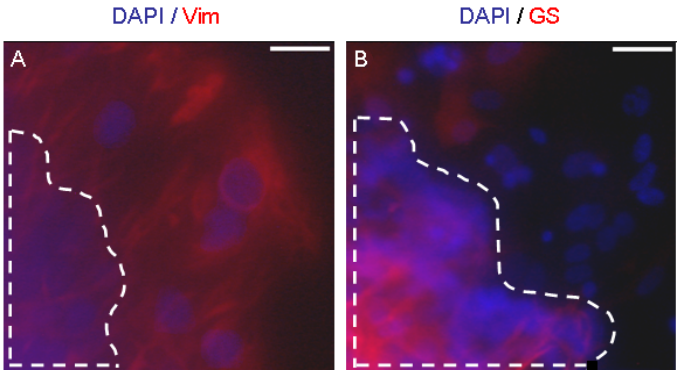

Abbildung 73: Zellen in den Randbereichen der ausplattierten Sphäroiden sind positiv für Vimentin und negativ für Glutaminsynthetase. A-B: Für den Nachweis von Vimentin und Glutaminsynthetase in den Randbereichen ausplattierter Sphäroide wurden nach 10 Tagen in Standkultur neben Kernfärbungen mit DAPI (blau) Antikörperfärbungen gegen Vimentin (A, rot) und Glutaminsynthetase (B, rot) durchgeführt. Die Färbungen zeigen eine ausgeprägte Expression von Vimentin in dem zentralen und dem Randbereich, während die Expression von Glutaminsynthetase auf den zentralen Bereich beschränkt ist. Gestrichelte Linien markieren die zentralen Bereiche des Sphäroids in denen die ursprüngliche Sphäroidform weiterhin erkennbar ist. Abkürzungen: GS = Glutaminsynthetase, Vim = Vimentin. Balken in A = 25µm, in B = 50µm.

Nach der Aussaat von sieben, neun und elf Tage alten Sphäroiden kann innerhalb der der ersten Tage bei der Mehrheit der Sphäroide keine Veränderung in der Morphologie dokumentiert werden. Der dreidimensionale Zusammenhang des Gewebes bleibt erhalten. Das bei jüngeren Sphäroiden beobachtete Auftreten von hellen und dunklen Bereichen in den Sphäroiden kann nur noch bei wenigen Sphäroiden, und dann auch nur im geringen Maße festgestellt werden. Ab einer Kultivierungsdauer von neun Tagen unter beständiger Rotation ergibt sich ein weiterer Unterschied zu den zu früheren Zeitpunkten ausplattierten Sphäroiden. Wie in Abb. 74 dargestellt, beinhalten die ursprünglich noch aus zwei unterschiedlichen Zelltypen bestehenden Randbereiche (Abb. 74 A), in diesem Fall lediglich noch den flach am Boden liegenden Zelltyp (Abb 74 B). Anhand von Antikörperfärbungen kann gezeigt werden, dass es sich dabei weiterhin um Vimentin-exprimierende Zellen handelt (Abb. 74 C). Das gleiche gilt für 11 und 13 Tage alte Sphäroide.

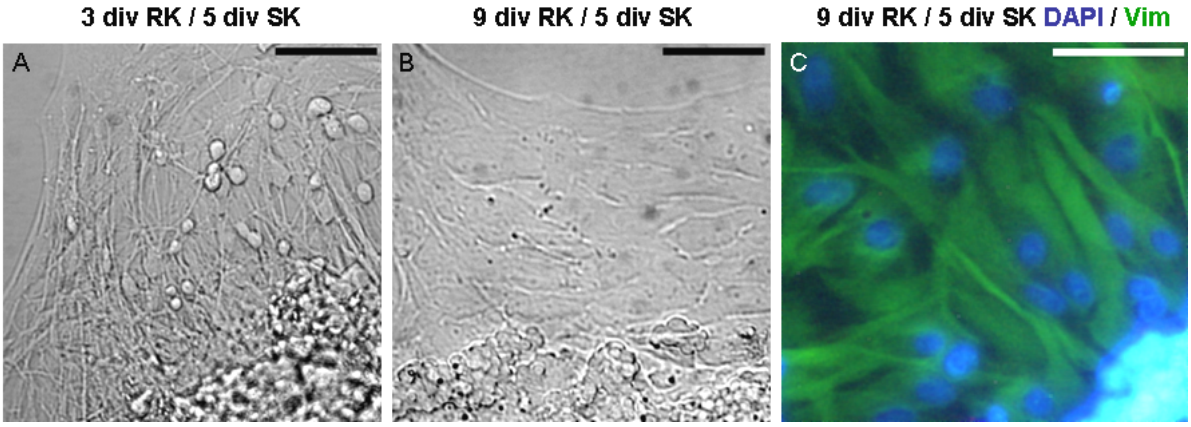

Abbildung 74: Mit zunehmendem Alter verlassen keine Neurone mehr den Zellverband der ausplattierten Sphäroide. A-B: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Randbereiche von Sphäroiden die nach 3 (A) und 9 Tagen (B) in Rotationskultur für weitere fünf Tage in Standkultur gehalten wurden. C: Kern- und immunhistochemische Färbung mit DAPI (blau) und einem Antikörper gegen Vimentin (grün) des Randbereichs eines für neun Tage in Rotations- und weitere fünf Tage in Standkultur gehaltenen Sphäroids. Für die Darstellung wurden beide Färbungen überlagert. Abkürzungen: RK = Rotationskultur, SK = Standkultur, Vim = Vimentin. Balken = 50µm

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Verhalten der Sphäroide nach der Aussaat von ihrem Alter abhängig ist. Erfolgt die Aussaat der Sphäroide nach einer kurzen Zeit in Rotationskultur, verlieren diese in vielen Fällen sehr schnell ihre dreidimensionale Gewebsstruktur und wachsen zu einem flachen Zellrasen aus. Ältere Sphäroide behalten dagegen im zentralen Bereich für eine gewisse Zeit ihre typische Sphäroid-Form. Die nach dem Ausplattieren lichtmikroskopisch sichtbare Ausbildung von histotypischen Strukturen in Form von Rosetten und IPL-Bereichen auf der Sphäroidoberfläche ist lediglich bei Sphäroiden zu beobachten, die nicht länger als sieben Tage in Rotationskultur gehalten wurden. Bei älteren Sphäroiden können diese Vorgänge nicht mehr beobachtet werden. Die Randbereiche, die sich bei früh ausplattierten Sphäroiden aus Vimentin-positiven Zellen und verschiedenen Neuronen zusammensetzen, bestehen bei Sphäroiden die länger als eine Woche in Rotationskultur gehalten wurden, lediglich noch aus Vimentin-exprimierenden Zellen.