Untersuchungen zur axialen Musterbildung in der Retina des Hühnchens: Faszikulierung und intraretinale Wegfindung von Ganglienzellaxonen und cDNA-Microarray-Screening nach asymmetrisch exprimierten Genen

Genehmigte Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt am

Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

von

Thomas W. Mühleisen

aus Frankfurt am Main

Erster Referent: Prof. Dr. Thomas W. Holstein

Zweiter Referent: Prof. Dr. Heinz Wässle

Dritter Referent: Prof. Dr. Paul G. Layer

Tag der Einreichung: 05. September 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 2005

Darmstadt 2005

D17

„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben und
das Unerforschliche ruhig zu verehren."

Johann Wolfgang von Goethe

Teile der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

Mühleisen, T.W., Agoston, Z. und Schulte, D. (2006). Retroviral Misexpression of *cVax* Disturbs Retinal Ganglion Cell Axon Fasciculation and Intraretinal Pathfinding in vivo and Guidance of Nasal Ganglion Cell Axons in vitro. Dev. Biol. Manuskript zur Veröffentlichung angenommen.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Neuroanatomie von Herrn Prof. Dr. Heinz Wässle am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt/Main unter Anleitung von Frau Dr. Dorothea Schulte in der Zeit von Januar 2002 bis Juli 2005 angefertigt. Seitens der TU Darmstadt wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. Thomas W. Holstein betreut.

Mein Dank gilt Dorothea Schulte für die Überlassung des sehr interessanten und spannenden Themas sowie für ihre freundschaftliche Art, mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Gleichermaßen danke ich Herrn Prof. Wässle für die Übernahme des Zweitgutachtens und die materielle und finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Holstein danke ich dafür, dass er meine Arbeit auch nach seinem Wechsel an die Universität Heidelberg betreute und das Erstgutachten übernahm. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Paul G. Layer für die Übernahme des Drittgutachtens. Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann und den anderen Hochschullehrern des Graduiertenkollegs danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Genauso danke ich Frau Dr. Gabi Lahner und ihrer Vorgängerin Frau Dr. Barbara Wicht für die Organisation der vielen interessanten Kollegsveranstaltungen. Herrn Prof. Dr. Jörg Soppa danke ich für die Benutzung des cDNA-Microarray-Scanners und Herrn Dr. Alexander Zaigler danke ich für seine Tipps rund um die cDNA-Microarray-Methode.

Anja Badde, Peer Heine, Zsuzsa Agoston und Christa Ziegler danke ich für das kollegiale Arbeitsklima. Christa und Zsuzsa danke ich darüber hinaus für ihre Hilfe im Labor. Meiner ehemaligen Kollegin Dr. Keely Bumsted O'Brien danke ich vor allem für die vielen lustigen Unterhaltungen, die meinen Laboralltag immer wieder auflockerten. Auch meinem Labor- und Büronachbarn Dr. Dieter Engelkamp danke ich für die vielen fachlichen Gespräche und seine Hilfsbereitschaft, insbesondere, wenn es um die Benutzung von Laborgeräten oder das „Ausleihen" von Enzymen ging. Driss Benzaid danke ich für seine Einführung in die Kunst der Bearbeitung von Abbildungen. Allen namentlich nicht erwähnten Kolleginnen und Kollegen der Abteilung sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt.

Ganz besonders danke ich meiner lieben Ulli für ihr offenes Ohr, ihre Geduld und ihren Zuspruch außerhalb des Instituts. Ebenso danke ich Gisela, Rudolf, Klaus, Matthias und Hedi für ihren familiären Beistand.

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG **1**

EINLEITUNG **4**

1. Entwicklung des Wirbeltierauges **4**

2. Axiale Musterbildung in der Retina: Entstehung der temporal-nasalen und dorsal-ventralen Achse **6**

3. Geburt und Differenzierung retinaler Ganglienzellen **10**

4. Faszikulierung und Wegfindung retinaler Ganglienzellaxone **11**

5. Retinotektale Projektion, die topographische Karte des visuellen Systems **16**

6. cDNA-Microarrays als Werkzeug zur Identifizierung potentiell-differentiell exprimierter Gene **19**

ERGEBNISSE **23**

7. Das Faszikelmuster dorsaler und ventraler Ganglienzellaxone unterschied sich in der Hühnchen-, nicht aber in der Mausretina **23**

8. *EphB*- und *Ephrin-B*-Genexpressionsmuster in der embryonalen Hühnchen-retina **25**

9. Retrovirale Fehlexpression von *cVax* ventralisierte das Axonfaszikelmuster und verursachte fehlerhafte intraretinale Axonwegfindung **27**

10. Retrovirale Fehlexpression von *cTbx5* oder *cTbx5^{en}* änderte nicht die retinalen *EphB*- und *Ephrin-B*-Genexpressionsmuster **33**

11. Retrovirale Fehlexpression von *Ephrin-B2* störte das Faszikelmuster und die intraretinale Wegfindung von ventralen Ganglienzellaxonen **36**

12. cDNA-Microarray-Screening nach potentiell-temporal und potentiell-nasal exprimierten Genen **43**

13. Computeranalysen der Aminosäuresequenz von UCH-L1 ..... **50**

14. Effekt der retroviralen Fehlexpression von *UCH-L1* auf das in vitro-Wachstumsverhalten von nasalen und temporalen Ganglienzellaxonen **54**

DISKUSSION **59**

15. Die lokale Expression von cVax, cTbx5 und Ephrin-B2 wird für die Faszikulierung und die intraretinale Wegfindung von Ganglienzellaxonen in der embryonalen Hühnchenretina benötigt **59**

15.1 Die Genexpression von *EphB*-Rezeptoren und *Ephrin-B*-Liganden ist in stabile komplementäre DV-Domänen unterteilt 60

15.2 Der DV-Unterschied des Axonfaszikelmusters ist von der DV-Polarität der Retina abhängig 62

15.3 Die Ephrin-B2-vermittelte in vivo-Stimulation von EphB-Rezeptoren stört Axon-Axon-Kontakte und verursacht Axonwegfindungsfehler in der ventralen Retina 69

15.4 Mögliche Konsequenz des retinalen DV-Axonfaszikelmusters für das visuelle Verhalten des Hühnchens 77

16. Screening nach Genen, die asymmetrisch entlang der temporal-nasalen Achse der embryonalen Hühnchenretina exprimiert werden ... 78
16.1 Etablierung und Anwendung der cDNA-Microarray-Methode ... 78
16.2 UCH-L1 und seine mögliche Rolle bei der Entwicklung des visuellen Systems des Hühnchens ... 84
MATERIAL UND METHODEN ... 90
17. Bakterien- und Tierstämme sowie Zelllinien ... 90
18. Lösungen und Puffer ... 90
19. Enzyme und Proteine ... 90
20. „Kits" und Sonstiges ... 91
21. Mikrobiologische Methoden ... 92
21.1 Nährmedium und Zusätze für die Kultur von *Escherichia coli* ... 92
21.2 Kultur von *Escherichia coli* ... 92
21.3 Herstellung einer Glycerinstammkultur von *Escherichia coli* ... 92
22. Molekulargenetische Methoden ... 92
22.1 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter Zellen von *E. coli* ... 92
22.2 Nucleinsäuren ... 92
22.2.1 DNA- und RNA-Längenstandards ... 92
22.2.2 Oligonucleotide ... 93
22.2.3 Plasmidvektoren ... 93
22.3 Isolierung von Nucleinsäuren ... 94
22.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* ... 94
22.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ... 94
22.3.3 Isolierung von RNA aus Gewebe ... 94
22.3.4 Synthese von cDNA ... 94
22.3.5 Absorptionsmessungen von Nucleinsäuren ... 94
22.4 Modifikationen von DNA ... 95
22.4.1 Enzymatische in vitro-Reaktionen ... 95
22.4.2 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion ... 95
22.4.3 In vitro-Mutagenese mittels PCR ... 95
22.5 Elektrophorese von Nucleinsäuren ... 95
22.5.1 TAE-Agarosegel-Elektrophorese von DNA ... 96
22.5.2 Native TBE-Agarosegel-Elektrophorese von RNA ... 96
22.6 Sequenzierung von DNA ... 96
22.7 Konstruktion von RCASBP-DNA-Vektoren ... 96
23. Präparation und Fixierung von Gewebe ... 97
24. Herstellung von Gefrierschnitten ... 99
25. Immunohistochemische Methoden ... 99
25.1 Primär- und Sekundärantikörper ... 99
25.2 Färbungen mit ganzen Retinae ... 99

26. Zell- und Entwicklungsbiologische Methoden **100**
26.1 Nicht-radioaktive RNA-in situ-Hybridisierung 100
26.1.1 Herstellung von Digoxigenin- und Fluorescein-markierten RNA-Sonden 100
26.1.2 In situ-Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Hühnchenretinae 100
26.1.3 In situ-Hybridisierung auf ganzen Hühnchenretinae 102
26.1.4 In situ-Hybridisierung auf Vibratomschnitten von Hühnchenretinae 103
26.2 Herstellung von infektiösen RCASBP-Viruspartikeln 103
26.3 In ovo-Injektionen von RCASBP-Viruspartikeln 104
26.4 In vitro-Axonstreifenversuch 104
26.5 In vitro-Axonmarkierung mit DiI 109
27. cDNA-Microarray-Methode **109**
27.1 Nachprozessieren von cDNA-Microarrays 110
27.2 Synthese, Amplifizierung, Markierung und Hybridisierung von cDNA-Zielmolekülen 110
27.3 Markierung und Hybridisierung von mRNA-Zielmolekülen 111
27.4 Analyse von cDNA-Microarray-Daten 112
28. Bioinformatische Methoden **114**
28.1 SMA- und LIMMA-Programm 114
28.2 Chromas-Programm 114
28.3 „TIGR *Gallus gallus* Gene Index“-Datenbank 114
28.4 „EMBL Nucleotide Sequence Database“ 114
28.5 Hühnchengenom-Datenbank 114
28.6 Pepstats-Programm 115
28.7 Needle-Programm 115
28.8 Bioedit-Programme 115
28.9 ScanProsite-Programm und Prosite-Datenbank 115
ANHANG **116**
ABKÜRZUNGEN **121**
LITERATUR **122**
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG **134**
LEBENSLAUF **135**

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zielsetzung des ersten Projekts war es, die Rolle von cVax, cTbx5 und Ephrin-B2 bei der Faszikulierung und bei der Wegfindung von Ganglienzellaxonen in der embryonalen Hühnchenretina zu untersuchen. Zu Beginn wurde geklärt, ob und wann ein morphologischer Unterschied in der Axonfaszikelbildung entlang der dorsal-ventralen (DV)-Achse der Retina auftritt (Abschn. 7). Durch Färbung der Axone von retinalen Ganglienzellen (RGCs) mit einem Antikörper gegen Neurofilament und anschließender Laser-Scanning-Mikroskopie wurde festgestellt, dass ein DV-Unterschied des Axonfaszikelmusters bereits am embryonalen Tag (E) 6,5 erkennbar ist. Innerhalb der ventralen Nervenfaserschicht (NFL) faszikulierten die Axone zu dicken Bündeln, die in parallelen Bahnen zunächst zur optischen Fissur, dann zur optischen Papille wanderten. In der dorsalen NFL hingegen erzeugten die Axone auf ihrem Weg zur Papille ein Faszikelmuster, das sich deutlich von dem gröberen ventralen Muster unterschied. Dieser Unterschied wurde auch in der „reifen“ Retina (E18) beobachtet. Folglich muss dieses DV-Faszikelmuster eine Konsequenz der frühen axialen Musterbildung der Retina sein und kann nicht durch Unterschiede in der Myelinisierung von Axonen hervorgerufen werden, da diese erst in einem viel späteren Entwicklungsstadium einsetzt. Um zu untersuchen, ob ein vergleichbares DV-Muster auch in Säugetieren zu beobachten ist, wurden Retinae von Mäusen (CD-1-Stamm) mit dem Neurofilament-Antikörper gefärbt. Es stellte sich heraus, dass weder bei Retinae von embryonalen noch von adulten Mäusen ein solcher DV-Unterschied besteht. Literaturdaten wiesen darauf hin, dass eine Störung der Balance von EphB/Ephrin-B-vermittelten Axon-Axon-Kontakten bestimmte Wegfindungsfehler von RGC-Axonen in der embryonalen Mausretina verursacht. Daher wurden zunächst die mRNA-Expressionsmuster von *EphB2*, *EphB3*, *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* während der frühen Entwicklung der Hühnchenretina mittels nicht-radioaktiver in situ-Hybridisierungen untersucht (Abschn. 8). Es wurde festgestellt, dass sich die *EphB*- und *Ephrin-B*-Genexpression bereits am Tag E2,5 in stabile komplementäre DV-Domänen unterteilt. Hierbei lag der Schwerpunkt der *EphB*-Transkriptverteilung in der ventralen Hälfte der Retina und der von *Ephrin-B*-Transkripten in der dorsalen Hälfte. Weitere Experimente (E3,5- und E6,5-Retinae) und Literaturdaten zeigten, dass diese Transkriptverteilungen mindestens solange erhalten bleiben, bis die Mehrzahl der RGC-Axone die optische Papille erreicht haben, wo sie die die Retina verlassen, um den optischen Nerv zu bilden. Um zu prüfen, ob der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor cVax einen Beitrag zur Axonfaszikulierung entlang der DV-Achse leistet, wurde er über die gesamte Hühnchenretina retroviral fehlexprimiert (Abschn. 9). Durch axon- und virusspezifische Antikörper-Doppelfärbungen infizierter E6,5-Retinae wurde festgestellt, dass die dorsalen RGC-Axone dickere Bündel bildeten, die denen in der ventralen Nervenfaserschicht (NFL) morphologisch sehr ähnlich sahen. Folglich war fehlexprimiertes *cVax* ausreichend, um

das dorsale Axonfaszikelmuster zu ventralisieren. Die in vitro-Markierung von RGC-Axonen mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiI zeigte, dass der cVax-Phänotyp aus mindestens zwei Komponenten bestand. Erstens: Aus einem wellenförmigen, teilweise gestörten Axonfaszikelmuster in der dorsalen NFL. Zweitens: Aus Axonwegfindungsfehlern in unmittelbarer Umgebung der optischen Fissur. Insgesamt belegen die Ergebnisse, dass die Bildung des DV-Axonfaszikelmusters unter Kontrolle des DV-Regionalisierungsfaktors cVax steht. Die retrovirale Fehlexpression des T-Box-Transkriptionsfaktors *cTbx5* war dagegen nicht ausreichend, um den DV-Unterschied des Axonfaszikelmusters aufzuheben (Abschn. 9). Jedoch reichte die retrovirale Fehlexpression des dominant-negativen *cTbx5*^{en}-Allels aus, um das dorsale Axonfaszikelmuster zu ventralisieren. Weiterhin wurde durch in situ-Hybridisierung geprüft, ob die ektopische Expression von *cTbx5* oder *cTbx5*^{en} eine Änderung der Expressionsprofile von *EphB*- und *Ephrin-B*-Transkripten bewirkt (Abschn. 10). Die erwarteten Expressionsänderungen ließen sich jedoch weder nach *cTbx5*- noch nach *cTbx5*^{en}-Fehlexpression beobachten. Um zu prüfen, ob die Balance von EphB/Ephrin-B-vermittelten Axon-Axon-Kontakten in der embryonalen Hühnchenretina durch Hinzufügen eines Ephrin-B-Liganden gestört wird, wurden EphB-Rezeptoren durch retrovirale Fehlexpression von *Ephrin-B2* in vivo stimuliert (Abschn. 11). Die immunohistochemische Analyse infizierter E6,5-Retinae zeigte, dass dies zu unregelmäßig auftretenden Störungen des Faszikelmusters in der gesamten ventralen, aber nicht der dorsalen NFL führt. Um festzustellen, ob EphB/Ephrin-B2-vermittelte Faszikulierungs-störungen auch Axonwegfindungsfehler verursachen, wurden in Explantaten von E6,5-Retinae, die mit RCAS-*Ephrin-B2* infiziert waren, RGC-Axone mit DiI markiert. Während die dorsalen Axone in parallelen Bahnen in Richtung Papille wuchsen, war die intraretinale Wegfindung ventraler Axone massiv gestört: viele Faszikel entbündelten sich, einzelne Axone verließen ihre parallelen Bahnen und wuchsen kreisförmig. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass EphB/Ephrin-B2-vermittelte Axon-Axon-Kontakte an der Bildung des Axonfaszikelmusters – zumindest in der gesamten ventralen Hälfte der embryonalen Hühnchenretina – eine bedeutende Rolle spielen.

Das zweite Projekt hatte zum Ziel, die Topographie von RGCs entlang der temporal-nasalen (TN)-Achse der embryonalen Hühnchenretina molekular zu charakterisieren. Unter der Annahme, dass Gene, die hierbei eine Rolle spielen, asymmetrisch exprimiert werden, wurde ein Screening mit nicht-kommerziellen Retina-cDNA-Microarrays entlang der TN-Achse durchgeführt. Zunächst wurden hierfür die Microarray-Methode und die Datenanalyse im Labor etabliert (Abschn. 12). Um Gene zu identifizieren, die potentiell nasal oder temporal exprimiert werden, wurden insgesamt 7 direkte Vergleiche zwischen nasalem und temporalem Retinagewebe von E6,5-Hühnchen durchgeführt. Als Zielmoleküle dienten nicht-amplifizierte mRNA-Moleküle, die direkt markiert wurden. Für die Auswertung wurden 4 TN-Vergleiche nach bestimmten

Qualitätskriterien ausgewählt. Die anschließende Datenanalyse gliederte sich in drei Abschnitte. Erstens: Normalisierung der differentiellen Expressionsverhältnisse von cDNA-Klonen innerhalb der Microarrays. Zweitens: Skalierung der normalisierten Expressionsverhältnisse zwischen den Microarrays. Drittens: Auswahl von Kandidatengenen anhand von zwei Gütekriterien. Insgesamt wurden 13 Kandidaten-cDNA-Klone ausgewählt, die durch Sequenzierung und Datenbanksuche identifiziert wurden. Davon wurde der temporale Kandidat *UCH-L1* (Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase L1) und der nasale Kandidat *CA-II* (Carboanhydrase II) durch nicht-radioaktive in situ-Hybridisierungen auf ganzen E6,5-Hühnchenretinae bestätigt. Dabei diente der Microarray-cDNA-Klon von *Visinin* als Kontrolle, da durch in situ-Hybridisierung festgestellt wurde, dass der Verteilungsschwerpunkt von *Visinin*-Transkripten in der temporalen E6,5-Hühnchenretina lag. Das mRNA-Expressionsmuster von *UCH-L1*, das auf RGCs von temporal nach nasal verlief, wurde spätestens gegen E4,5 gebildet, wie in situ-Hybridisierung auf Retina-Kryoschnitten belegten. Die kodierende Sequenz des *UCH-L1*-Gens wurde aus E6,5-Hühnchenretina kloniert und sequenziert (Abschn. 14). Der offene Leserahmen von *UCH-L1* umfasste 675 bp, woraus 224 Aminosäuren translatiert wurden (Abschn. 13). Damit hat das UCH-L1-Protein des Hühnchens eine molekulare Masse von 25,1 kDa. DNA- und Aminosäuresequenz wurden in der „EMBL Nucleotide Sequence Database“ abgelegt (AJ621938). Aus Literaturdaten ergab sich die Frage, ob UCH-L1 möglicherweise am Ubiquitin (Ub)-abhängigen Abbau von Zellmembran-Rezeptor-Proteinen im Axon oder Wachstumskegel von RGCs beteiligt ist und dadurch die Bildung der retinotektalen Projektion beeinflusst. Insbesondere EphA- und EphB-Rezeptoren kamen hierfür als Kandidaten in Frage, da diese Rezeptor-Tyrosinkinasen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der retinotektalen Karte spielen. Daher wurde durch den in vitro-Axonstreifenversuch untersucht, ob die Zielpräferenzen von RGC-Axonen durch retrovirale Fehlexpression von *UCH-L1* gestört werden (Abschn. 14). Dabei wurden TN-Gewebestreifen von infizierten und uninfizierten E6-Hühnchenretinae miteinander verglichen, um die asymmetrische in vivo-Expression von *UCH-L1* entlang der TN-Achse zwischen E4,5 und E6,5 zu berücksichtigen. Der Effekt der *UCH-L1*-Fehlexpression reichte jedoch nicht aus, um die Zielpräferenzen von nasalen RGC-Axonen und/oder temporalen RGC-Axonen zu ändern. Dennoch wurde in seltenen Fällen beobachtet, dass vereinzelte temporale Axone nicht nur auf dem anterioren Tektummembranstreifen wuchsen, sondern auch den direkt angrenzenden posterioren Streifen durchquerten. Diese Ereignisse wurden bei den Kontrollen nicht oder nur sehr selten beobachtet.

EINLEITUNG

1. Entwicklung des Wirbeltierauges

Die Netzhaut (Retina) des Auges ist ein hochspezialisiertes Sinnesorgan, das Lichtinformationen erfasst und in neurale Signale umwandelt. Diese Signale werden entlang von Axonen retinaler Ganglienzellen („retinal ganglion cells“, RGCs) in die visuellen Zentren des Gehirns weiter geleitet. Bei nicht säugenden Wirbeltieren ist das Mittelhirndach (Tectum mesencephali) das wichtigste visuelle Zentrum, bei Säugern der Colliculus superior und das Corpus geniculatum laterale (CGL). Das CGL liegt im hinteren Teil des Thalamus und ist die wichtigste „Umschaltstation“ der Sehbahn auf dem Weg zum visuellen Cortex.

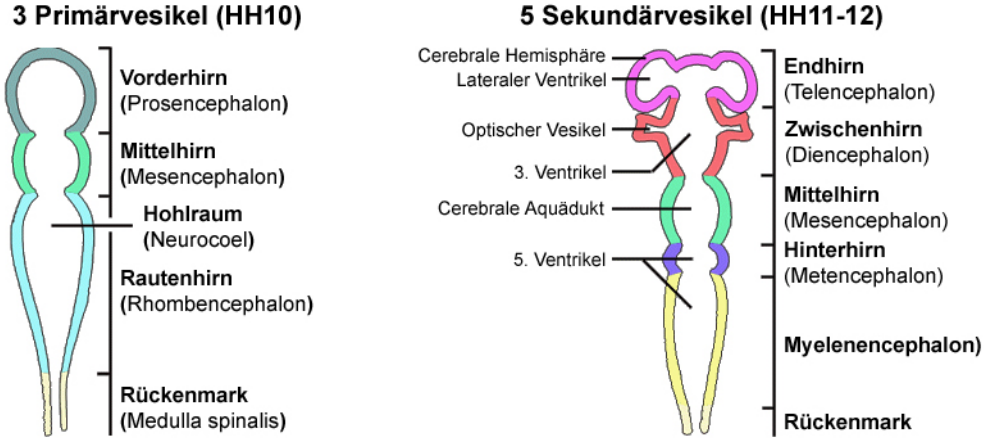


Abb. 1. Bildung der fünf sekundären Hirnvesikel aus den drei Primärvesikeln. Die optischen Vesikel entwickeln sich aus zwei seitlichen Ausstülpungen des Neuralrohrs im Bereich des zukünftigen Zwischenhirns (Diencephalon). Der optische Vesikel ist die Anlage der zukünftigen Retina, des retinalen Pigmentepithels und des zukünftigen optischen Nervs. Die Hamburger und Hamilton (HH)-Stadien 11 bzw. 12 werden 40 bis 49 h nach Beginn der Entwicklung erreicht, während HH10 einem Entwicklungszeitraum von 33 bis 38 h entspricht. Die Zeichnungen stammen von der „Developmental Biology Online“-Netzseite[1].

Die ersten morphologischen Anzeichen der Entwicklung von Retina und Tektum des Hühnchens sind bereits im 3-Hirnvesikel-Stadium des Embryonen (HH10-11; Hamburger and Hamilton, 1951) sichtbar, etwa 33 bis 38 h nach Beginn der Entwicklung (Abb. 1.). Zu diesem Zeitpunkt sind die beiden seitlichen Ausstülpungen des Neuralrohrs, die so genannten optischen Vesikel, im Bereich des zukünftigen Zwischenhirns (Diencephalon) erkennbar. Die Retina ist somit ein Teil des zentralen Nervensystems. Die ebenfalls paarig angelegten Tekta entwickeln sich aus dem zweiten Hirnvesikel, dem zukünftigen Mittelhirn (Mesencephalon). Der optische Vesikel ist Ursprung dreier wichtiger Strukturen des Wirbeltierauges: der neuralen Retina[2], des retinalen Pigmentepithels und des Augenbecherstiels („optic stalk“). Der Augenbecherstiel geht aus der sich verengenden Verbindung zwischen Vesikel und Neuralrohr hervor. Dort, wo sich der

[1] http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/dbindex.htm.
[2] Im Folgenden als Retina bezeichnet.

ausdehnende Vesikel und das darüberliegende Ektoderm berühren, werden wichtige induktive Signale ausgetauscht, die zur koordinierten Einstülpung (Invagination) von Linsenplakode einerseits und optischem Vesikel andererseits führen. Die Linsenplakode ist der Ursprung von Linse und Cornea. Der zweischichtige Augenbecher ist das Ergebnis der Einstülpung des optischen Vesikels. Die innere Schicht des Augenbechers bildet die Retina, während aus der äußeren Schicht des Augenbechers das retinale Pigmentepithel hervorgeht. Die Einstülpung des Augenbechers beginnt an dessen ventraler Seite und lässt eine Rille entstehen, die von der ventralen Retina ausgehend entlang des ventralen Augenbecherstiels bis zum ventralen Neuralrohr verläuft. Diese Rille wird als choroidale oder optische Fissur bezeichnet. Augenbecher und Fissur werden zwischen E2 (HH13) und E3 (HH18) gebildet.

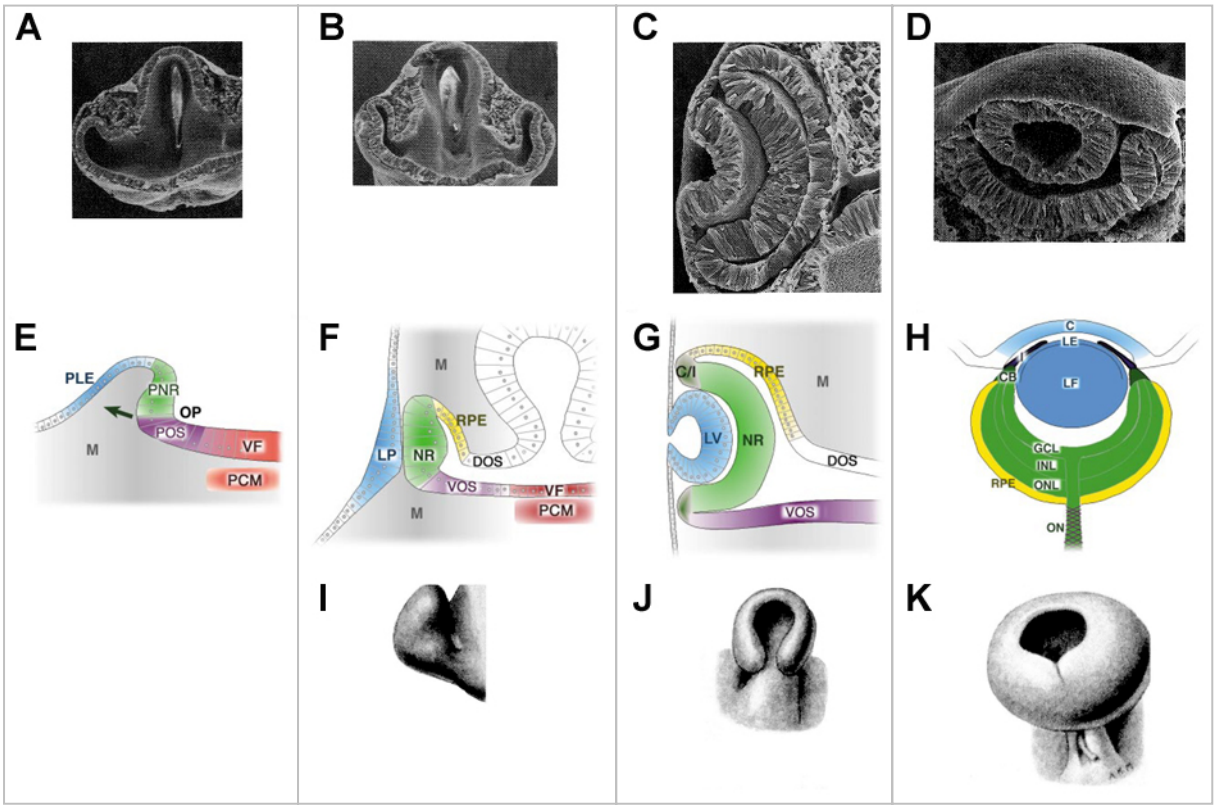


Abb. 2. Entwicklung des Wirbeltierauges. (A-D) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. (E) Die Bildung des optischen Vesikels wird durch Ausstülpung der zukünftigen Vorderhirnregion eingeleitet, wobei die optische Grube (OP, „optic pit“) entsteht. Der optische Vesikel wird in die dorso-distale Region, welche die zukünftige Retina (PNR, „presumptive neural retina“) und Pigmentepithel beinhaltet, und die proximo-ventrale Region, aus welcher der zukünftige ventrale Augenbecherstiel (POS, „presumptive optic stalk“) hervorgeht, unterteilt: zukünftiges Linsenektoderm (PLE, „presumptive lens ectoderm“); Mesenchym (M); ventrales Vorderhirn (VF, „ventral forebrain“); prächordales Mesoderm (PCM). (F) Der optische Vesikel dehnt sich lateral aus, bis sich neurale Retina (NR) und Linsenplakode (LP) berühren. (G) Der Kontakt leitet in beiden Zellschichten induktive Signale ein, wodurch einerseits der Linsenvesikel (LV) und andererseits der zweischichtige Augenbecher gebildet wird. Dabei geht die NR aus der inneren und das retinale Pigmentepithel (RPE) aus der äußeren Zellschicht des Augenbechers hervor. (H) Anatomie des adulten Linsenauges von Wirbeltieren. (I-K) Die Entwicklung vom optischen Vesikel zum Augenbecher. Blau: Linse/Cornea, grün: Retina, gelb: retinales Pigmentepithel, violett: Augenbecherstiel, rot: ventrales Vorderhirn, grau: Mesenchym. (A-C) Hilfer and Yang, 1980. (D) K. Tosney (E-H) Chow and Lang, 2001. (I-K) Hamilton et al., 1972.

Um retinale Arterien zu bilden, wandern mesenchymale Zellen durch diese Öffnung in den Augenbecher ein (Stuermer and Bastmeyer, 2000). Kurz darauf vergrößert sich die Retina auf beiden Seiten der Fissur. In der Folge verschmelzen die beiden Kanten des Augenbechergewebes um die sich bildenden Blutgefässe und auswandernden Ganglienzellaxone herum, so dass eine kreisförmige Struktur, die so genannte optische Papille („optic nerve head"/„optic disc") gebildet wird. RGCs senden ihre Axone in Richtung der Papille, wo sich die Axonbündel der Ganglienzellen aus allen Quadranten der Retina vereinen, um den zukünftigen Sehnerven zu bilden. Da das Gewebe der Papille keine Photorezeptoren beinhaltet, wird es auch als Blinder Fleck bezeichnet. Nach dem dritten embryonalen Tag (E3) verlassen beim Hühnchen die ersten Ganglienzellaxone das Auge und wachsen entlang des Augenbecherstiels. Geburt und Differenzierung der anderen retinalen Zellklassen sowie deren Beitrag zur Schichtung der Retina sollen im Rahmen dieser Einleitung nicht beschrieben werden (Mey and Thanos, 2000). Die vollständige Entwicklung des pseudostratifizierten Neuroepithels bis zur „reifen" Retina dauert etwa 3 Wochen und ist bis zum Schlüpfen des Kücken (E20-21; HH46) abgeschlossen (Bellairs and Osmond, 1998; Mey und Thanos, 2000; Chow and Lang, 2001; Mey and Thanos, 2000).

2. Axiale Musterbildung in der Retina: Entstehung der temporal-nasalen und dorsal-ventralen Achse

Die axiale Musterbildung der Retina ist ein hierarchischer Prozess, der in frühesten Stadien der Augenentwicklung beginnt und der Geburt und Differenzierung retinaler Neurone und Glia vorausgeht. Diese Musterbildung beginnt bereits in der Augenanlage („eye anlage", ab HH8) und regionalisiert die Retina entlang der temporal-nasalen (TN) und der dazu senkrechten dorsal-ventralen (DV) Achse. Die retinale Regionalisierung wird durch asymmetrische Expression von hierarchisch organisierten Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren vermittelt, die daher als Regionalisierungsfaktoren bezeichnet werden. Bekannte Konsequenzen retinaler Musterbildungs-ereignisse sind die unterschiedlichen Zielpräferenzen von Axonen retinaler Ganglienzellen (RGCs) während ihrer Projektion in die visuellen Zentren des Wirbeltiergehirns und die asymmetrische Verteilung von Stäbchenphotorezeptoren (Abschn. 5; Bruhn and Cepko, 1996; Schulte et al., 2005).

Im optischen Vesikel sind die ersten Anzeichen retinaler Polarität zunächst entlang der TN-Achse (Abb. 3), kurz darauf entlang der DV-Achse zu finden (Abb. 4). Zwischen HH8 bis HH9 beginnt die Genexpression von c*FoxG1* („chicken forkhead-box g 1"), früher als *CBF1* („chicken homologue of brain factor 1") bezeichnet, in der anterioren (nasalen) Hälfte des optischen Vesikels (Yamagata et al., 1999; Yuasa et al., 1996). Gegen HH11 wird *cFoxD1*/*CBF2* in der posterioren (temporalen) Vesikelhälfte exprimiert (Yamagata et al., 1999). Dabei teilt die

c*FoxG1*/*cFoxD1*-Grenze den Augenbecherstiel und die Retina in eine nasale (anteriore) und eine temporale (posteriore) Domäne (Hatini et al., 1994; Yuasa et al., 1996). In *BF1* („brain factor 1“) defizienten Mäusen wird *BF2* in der anterioren Hälfte des optischen Vesikel ektopisch exprimiert (Huh et al., 1999), was darauf hindeutet, dass sich *BF1* und *BF2* gegenseitig regulieren (Chow und Lang, 2001). In Hühnchenembryonen führte retrovirale Fehlexpression von *cFoxG1* bzw. *cFoxD1* zu Störungen der retinotektalen Projektion (Yuasa et al., 1996), was die Bedeutung dieser beiden Transkriptionsfaktoren für die Entstehung der TN-Achse hervorhebt. Bei HH11 beginnt die Genexpression von *SOHo1* („sensory organ homeobox 1“) und *GH6* („Gallus homeobox 6“), zweier Homöobox-Gene der Hmx-Familie, in der nasalen Vesikelhälfte (Deitcher et al., 1994; Schulte and Cepko, 2000; Stadler and Solursh, 1994). Ektopische Expression dieser beiden TN-Regionalisierungsfaktoren in der temporalen Retina unterdrückte dort die Genexpression der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) *EphA3* (Schulte und Cepko, 2000). Im Wildtyp wird EphA3 nur von RGCs der temporalen Retina gebildet und spielt bei der Bildung der retinotektalen Projektion entlang der TN-Achse eine Schlüsselrolle (Nakamoto et al., 1996; Abschn. 5). Entsprechend führte die Unterdrückung der EphA3-Expression, die durch *SOHo1*- oder *GH6*-Fehlexpression hervorgerufen wurde, zu Störungen der retinotektalen Projektion (Schulte und Cepko, 2000). Obwohl die *SOHo1*- und *GH6*-Expression nach Beginn der *cFoxG1*- und *cFoxD1*-Expression einsetzt, wurden weder *SOHo1* noch *GH6* durch retrovirale Fehlexpression von *cFoxG1* oder *cFoxD1* aktiviert oder unterdrückt (Schulte und Cepko, 2000). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde jedoch gezeigt (Takahashi et al., 2003), dass massive *FoxG1*-Fehlexpression in der temporalen Hühnchenretina die Transkription von *SOHo1*, *GH6*, *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5* aktivierte, während die Transkription von *EphA3* und *FoxD1* unterdrückt wurde. Takahashi und Kollegen führten den retroviralen *cFoxG1*-Vektor jedoch durch in ovo-Elektroporation in das Gewebe des Hühnchenembryonen ein. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem ursprünglichen Ergebnis von Yuasa und Kollegen (1996), die zum Gentransfer infektiöse *cFoxG1*-Viruspartikel benutzten, und lässt vermuten, dass die Wirkung von cFoxG1 dosisabhängig ist. Die genaue Regulation der Genexpression von *cFoxG1*, *SOHo1* und *GH6* ist daher noch nicht vollständig geklärt.

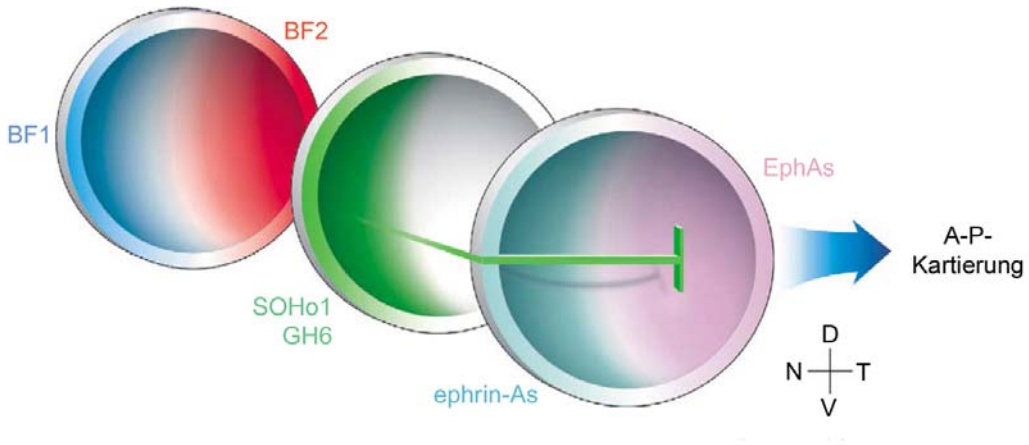


Abb. 3. Regulation der retinalen Regionalisierung entlang der TN-Achse. Dargestellt sind die an der Entstehung der retinalen TN-Achse beteiligten Genexpressionsmuster. Während der frühen Entwicklung (links) markiert die Expression von *BF1* (*cFoxG1*) und *BF2* (*cFoxD1*) die nasale und temporale Retina. Danach werden die beiden nasalen Marker *SOHo1* und *GH6* exprimiert (mitte). Es gibt keinen Beweis einer regulatorischen Wechselwirkung zwischen *BF1*, *BF2*, *SOHo1* und *GH6*. SOHo1 und GH6 können die Expression von *EphA3* unterdrücken (grüner Balken). Später werden *EphAs* und *A-Ephrine* von RGCs in entgegengesetzten Gradienten entlang der TN-Achse exprimiert. Dadurch wird die A-P-Kartierung von RGC-Axonen im Tektum bzw. Colliculus beeinflusst (McLaughlin et al., 2003).

Kurz nach Beginn der Polarisierung entlang der TN-Achse setzt die retinale Musterbildung entlang der DV-Achse ein (Abb. 4). Die Transkripte von *Pax2* (Dressler et al., 1990; Nornes et al., 1990) und *mVax2* („mouse ventral anterior homeobox 2"; Barbieri et al., 1999) bzw. *cVax* („chicken ventral anterior homeobox"; Schulte et al., 1999) werden in der ventralen Hälfte der sich entwickelnden Retina exprimiert, während die mRNA-Expression von *mTbx5* („mouse T box 5") (Sowden et al., 2001) bzw. *cTbx5* („chicken Tbx5") auf die dorsale Hälfte der Augenanlage beschränkt ist (Schulte et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Peters and Cepko, 2002). mVax2 ist eines von zwei Homöobox-Genen der Emx-Familie (Barbieri et al., 1999; Ohsaki et al., 1999; Schulte et al., 1999), die vermutlich aus der Duplikation eines gemeinsamen Ur-Gens hervorgegangen sind (Ohsaki et al., 1999). Auf Proteinebene ist cVax jedoch am engsten mit dem mVax1 („mouse Vax1") verwandt, das im Augenbecherstiel und den ventralen Strukturen des anterioren Neuralrohrs gebildet wird (Schulte et al., 1999). Da das *cVax*-Expressionsprofil annähernd dem von *mVax1* und *mVax2* entspricht, d. h. in der ventralen Augenanlage, im Augenbecherstiel und im anterior-ventralen Neuralrohr exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass *cVax* die Funktion von beiden *mVax*-Genen umfasst (Schulte et al., 1999). Retrovirale Fehlexpression von *cVax* in der dorsalen Hühnchenretina führt zu ektopischer Expression der ventralen Markergene *Pax2*, *EphB2* und *EphB3* und zum Verlust der dorsalen Markergene *cTbx5*, *Ephrin-B1* and *Ephrin-B2* (Schulte et al., 1999). Interessanterweise wurde derselbe Effekt in der embryonalen Hühnchenretina erzielt, wenn *mVax2* der Maus retroviral fehlexprimiert wurde (Schulte et al., 1999). Folglich konnte *mVax2*, genauso wie sein Hühnchen-Ortholog *cVax*, durch ektopische Expression in der dorsalen Retinahälfte Charakteristika einer ventralen Retina

erzeugen. Dieses Ergebnis verdeutlicht sehr schön, dass gewisse Aspekte der retinalen Musterbildung entlang der DV-Achse zwischen Hühnchen und Maus stammesgeschichtlich konserviert sind. Hierfür spricht auch, dass in der embryonalen Retina von *mVax2*-Nullmutanten die Expression von *EphB2*- und *EphB3*-Transkripten vollständig fehlten und die mRNA-Expressionsmuster von *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* dorsalisiert wurden (Mui et al., 2002). Im Gegensatz dazu unterdrückt *cTbx5*-Fehlexpression die Expression von *cVax* und *Pax2* in der ventralen Retina und führt zur ektopischen Expression von *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* (Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Hierbei wurde der retrovirale *cTbx5*-Vektor durch in ovo-Elektroporation in das embryonale Gewebe eingeführt. Demnach scheinen sich *cTbx5* und *cVax* gegenseitig regulieren zu können, wenn sie ektopisch in der Hühnchenretina exprimiert werden. In der Wildtypretina werden beide Regionalisierungsfaktoren jedoch nicht in überlappenden Domänen, sondern in zwei räumlich voneinander getrennten Domänen exprimiert (Peters und Cepko, 2002). Daher kann die gegenseitige Genregulation dieser beiden Transkriptionsfaktoren nicht direkt sein. Möglicherweise wird die regulatorische Wechselwirkung zwischen diesen beiden DV-Regionalisierungsfaktoren durch ein oder mehrere diffusible(s) Molekül(e) indirekt vermittelt, (dessen) deren Expression entweder von cVax oder von cTbx5 reguliert wird. Wie bereits für die TN-Regionalisierungsfaktoren FoxG1, FoxD1, SOHo1 und GH6 erwähnt, verursachte auch die retrovirale Fehlexpression von *cVax* bzw. *cTbx5* fehlerhafte Projektionen dorsaler bzw. ventraler RGC-Axone (Schulte et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000).

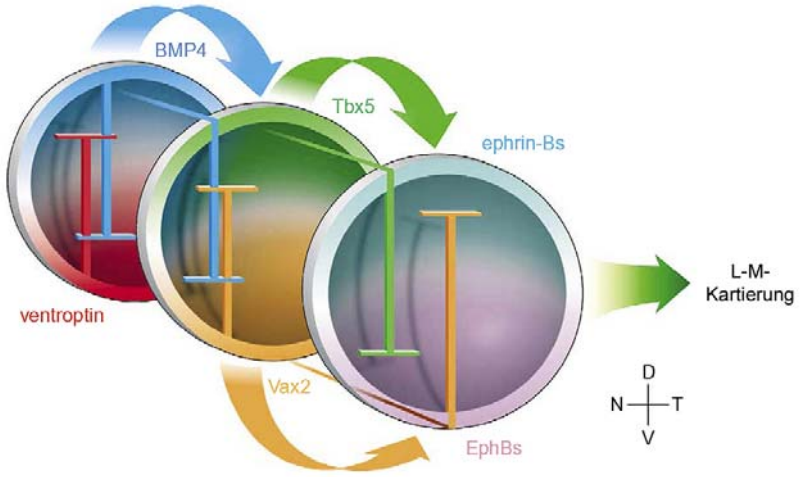


Abb. 4. Regulation der retinalen Regionalisierung entlang der DV-Achse. Während der frühen Retinaentwicklung (links) werden *Ventroptin* und *BMP4* („bone morphogenetic protein 4“) in der ventalen und dorsalen Retina exprimiert. *Ventroptin* und *BMP4* können sich gegenseitig unterdrücken (roter und blauer Balken). *BMP4* (blauer Pfeil) aktiviert *Tbx5* (*cTbx5*) und unterdrückt *Vax2* (cVax) (blauer Balken). *Tbx5* aktiviert *B-Ephrine* (grüner Pfeil) und unterdrückt *EphBs* (grüner Balken). Die Verteilung von *cVax*- und *cTbx5*-mRNA deutet darauf hin, dass *cVax* und *cTbx5* nicht direkt miteinander wechselwirken (Peters und Cepko, 2002). Wenn sie jedoch ektopisch exprimiert werden, können sich *cVax* und *Tbx5* gegenseitig unterdrücken. EphB-Rezeptoren und Ephrin-B-Liganden kontrollieren die LM-Kartierung von RGC-Axonen im Tektum bzw. Colliculus (McLaughlin et al., 2003).

3. Geburt und Differenzierung retinaler Ganglienzellen

Im Hühnchenembryo schließt sich die Fissur des Augenbechers zwischen E2 (HH13) und E3 (HH18). In diesem Zeitraum beginnt die retinale Neurogenese in einer dorsozentralen Region des retinalen Neuroepithels, nahe der zukünftigen Papille (graue Fläche in Abb. 5). Die RGCs und die anderen Zelltypen der Wirbeltierretina sind Abkömmlinge einer Population von multipotenten retinalen Vorläuferzellen („retinal progenitor cells“, RPCs; Holt et al., 1988; Turner et al., 1990; Turner and Cepko, 1987; Wetts and Fraser, 1988). Die verschiedenen Zelltypen der Wirbeltierretina entstehen in einer stereotypen Reihenfolge, deren Phasen sich zeitlich und räumlich teilweise überlappen (Young, 1985; Prada et al., 1991). RGCs sind die ersten Zellen, die aus den RPCs hervorgehen. Geburt und Differenzierung von RGCs verlaufen in konzentrischen Wellen vom Zentrum bis zur Peripherie der Retina (LaVail et al., 1991; Prada et al., 1991; Stiemke and Hollyfield, 1995; McCabe et al., 1999). Am Tag E9 endet die RGC-Neurogenese in der embryonalen Hühnchenretina (äußere gestrichelte Linie in Abb. 5).

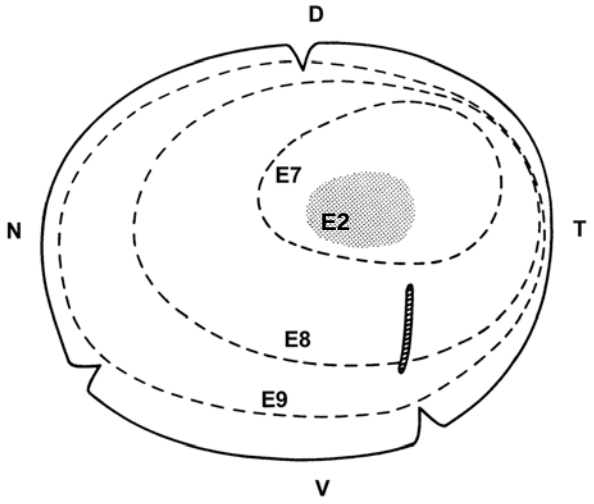


Abb. 5. Zeitlich-räumlicher Verlauf der Ganglienzell-neurogenese in der Hühnchenretina. In einer „Geburtstagsstudie“ wurde [^{3}H]Thymidin zu den angegebenen Zeitpunkten in ovo injiziert (Prada et al., 1991). Mitotisch aktive retinale Vorläuferzellen inkorporieren [^{3}H]Thymidin. RGC-Neuroblasten, die ihren Zellzyklus verlassen haben, nehmen hingegen kein radioaktiv markiertes Thymidin mehr auf. Die Retinae wurden am Tag E14 durch Autoradiographie ausgewertet. Die gestrichelten Linien umfassen die Gewebeflächen, in denen zu den angegebenen Zeitpunkten 100% der Ganglienzellen nicht mehr markiert werden konnten. Somit werden am Tag E2 (HH13) die ersten RGCs in einer dorsozentralen Region des retinalen Neuroepithels geboren (graue Fläche). Ausgehend von dieser Region, die sich nahe der zukünftigen Papille befindet (vertikaler Strich), verläuft die Geburt und Differenzierung in Form vom Zentrum zur Peripherie der Retina.

Die gesamte retinale Neurogenese endet etwa am Tag E12 (Layer and Sporns, 1987; Prada et al., 1991). Das Schichtungsmuster der Hühnchenretina ist gegen E16 im Wesentlichen ausgebildet (Mey und Thanos, 2000). Die Ganglienzellschicht („ganglion cell layer“, GCL) eines adulten Hühnchens beinhaltet etwa 2,4 Millionen Ganglienzellen, bestehend aus mindestens acht verschiedenen morphologischen Typen (Thanos and Mey, 2001). Im Vergleich dazu umfassen die Retina des Menschen circa 1,5 Millionen, die der Ratte 100 Tausend und die der Maus runde 40 bis 80 Tausend Ganglienzellen.

4. Faszikulierung und Wegfindung retinaler Ganglienzellaxone

Im Hühnchenembryo beginnen gegen E3 (HH18) die ersten RGCs ihre Axone auszusenden (Rager, 1976). Im Gegensatz zu den Axonen der zuerst geborenen RGCs, die sich in unmittelbarer Umgebung der Papille befinden, legen Axone später geborener RGCs eine längere Strecke vom Ort ihrer Entstehung zur Papille zurück und müssen daher geeignete Wegfindungsstrategien entwickeln. Die Papille ist das erste Zwischenziel der RGC-Axone während ihrer Projektion in die Zielzonen des Mittelhirns, wo sie mit tektalen bzw. collicularen Neuronen Synapsen bilden.

Im Allgemeinen scheinen Axone von vier prinzipiellen Mechanismen geführt zu werden, die auf die bewegliche Spitze des Axons, den Wachstumskegel, einwirken. Während kürzere Strecken mit Hilfe der Kontaktanziehung oder –abstoßung bewältigt werden, dienen die Chemoanziehung oder –abstoßung zur Überwindung längerer Distanzen. Der Ausgang jeder Wegfindungsentscheidung scheint sich in der Balance zwischen Anziehung und Abstoßung widerzuspiegeln, die an einem Entscheidungspunkt getroffen wird. Solche Entscheidungen liegen bei den meisten Wegfindungen zugrunde, die in geradem Wachstum, scharfen Kurven, Axonbündelung und -entbündelung sowie Auswahl und Eindringen in Zielzonen in Erscheinung treten. Axonfaszikel entstehen schrittweise, indem neu gebildete Axone auf bestehende Axone treffen und an ihnen entlang wandern (Abb. 6A). Wie beispielsweise die Analyse der Axonwegfindung in Grashüpferembryonen ergab, können Axone an Entscheidungspunkten von einem Faszikel zum nächsten wechseln, um ihren vorauseilenden Nachbarn auf einem definierten Weg zu folgen (Bastiani et al., 1984; Raper et al., 1983; Raper et al., 1984). Werden Axone unmittelbar durch Zelloberflächenmoleküle anderer Axone angezogen, spricht man von selektiver Axonfaszikulierung (Abb. 6C; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Möglicherweise dient die Faszikulierung auch den RGC-Axonen innerhalb der Wirbeltierretina als Wegfindungsstrategie.

Innerhalb des Auges ist der Weg des RGC-Wachstumskegels auf die Nervenfaserschicht („nerve fiber layer“, NFL) beschränkt, die an die Endfüße der Müller-Gliazellen grenzt (Abb. 7B). Die Müllerzellen sind radiale Gliazellen, die aus dem retinalen Neuroepithelium entstehen. Innerhalb der NFL navigieren die Wachstumskegel der RGC-Axone zur Papille. In der ventralen Hälfte der Retina werden die RGC-Axone zunächst zur optischen Fissur geleitet, bevor sie die Papille erreichen. An dieser zentralen Struktur treffen die RGC-Axone aus der gesamten Retina zusammen, um in den optischen Nerv einzutreten (Abb. 7A).

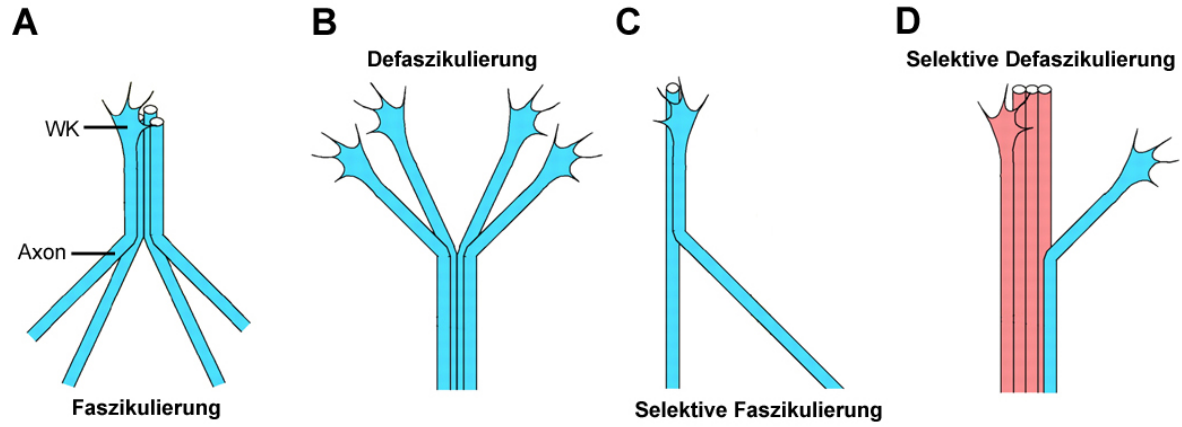


Abb. 6. Faszikulierung und Defaszikulierung von Axonen. Während der axonalen Wegfindung wirken anziehende und abstossende Mechanismen auf die bewegliche Spitze des Axons ein, die als Wachstumskegel (WK) bezeichnet wird. Ob Axone faszikulieren (A) oder defaszikulieren (B), scheint von der Balance zwischen der Anziehung und der Abstossung bestimmt zu werden. An Entscheidungspunkten der Wegfindung können Axone von einem Bündel zum nächsten wechseln, um ihren vorauseilenden Axonnachbarn auf einem definierten Weg folgen. Bei der selektiven Axonfaszikulierung bzw. Defaszikulierung werden Axone direkt durch Wechselwirkung mit Zelloberflächenmolekülen anderer Axone angezogen (C) bzw. abgestossen (D). (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

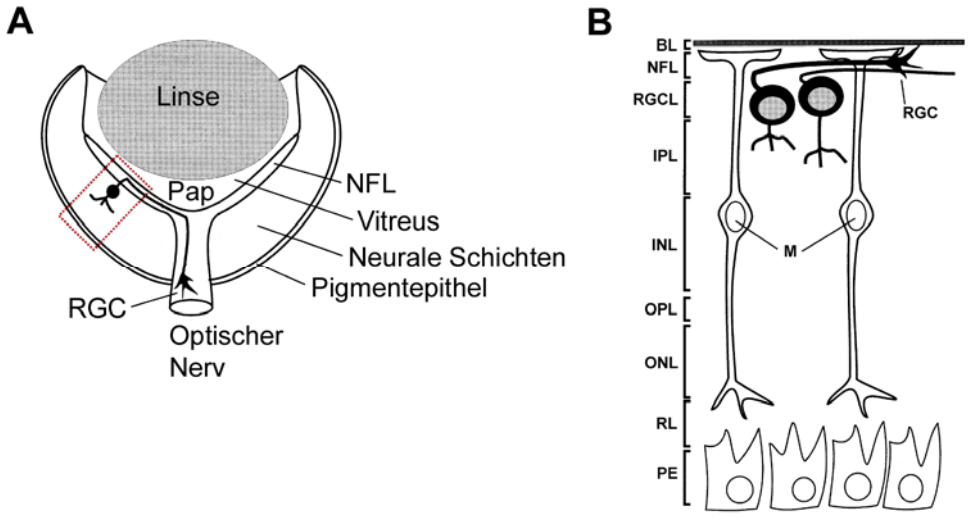


Abb. 7. Der Weg von RGC-Axonwachstumskegeln innerhalb der Retina zur Papille. (A) Während RGC-Axone in der Nervenfaserschicht (NFL) wachsen, die unmittelbar an die Basallamina (BL) grenzt, ist der Dendritenbaum der RGC zur äußeren Retina hin ausgerichtet. Die BL bildet die Grenze zwischen Retina und Glaskörper (Vitreus) des Auges. Bei Berührung mit den Endfüßen von neuroepithelialen Zellen und später der Müller-Gliazellen (siehe B) wächst das RGC-Axon in Richtung zur Papille und verlässt anschließend die Retina über den optischen Nerven. (B) Querschnitt durch die Retina (roter Kasten in A), der die räumliche Beziehung von RGCs, ihren Axonen und Wachstumskegeln zu den Müller-Gliazellen, ihren Endfüßen und der BL zeigt. BL: Basallamina. NFL: Nervenfaserschicht. RGCL: retinale Ganglienzellschicht. IPL: innere plexiforme Schicht. OPL: äußere plexiforme Schicht. ONL: äußere nucleäre Schicht. RL: Rezeptorschicht. PE: Pigmentepithel. (Stuermer und Bastmeyer, 2000).

Dass die Papille möglicherweise eine zentrale Rolle bei der intraretinalen Wegfindung der Ganglienzellaxone spielt, wurde zuerst von Ramón y Cajal (1892) erkannt, der vorschlug, dass diese Struktur chemoattraktive Stoffe mit langer Reichweite erzeugt. Mittels intraretinaler Transplantationsexperimente wurde jedoch gezeigt, dass die Papille des Hühnchens über größere Distanzen keine erkennbare chemotrophe Aktivität auf RGC-Axone ausübt (Halfter, 1996). Zudem wurden in Mausembryonen, denen *Netrin-1*-, *DCC*[3]- oder *EphB*-Gene fehlten, Axonwegfindungsdefekte nur im Bereich der Papille beobachtet (Birgbauer et al., 2000; Deiner et al., 1997). Netrine sind Axonwegfindungsmoleküle, die von neuroepithelialen Zellen an der Papille produziert und sekretiert werden. Die Netrin-Diffusion wird durch die Wechselwirkung mit Molekülen von Zelloberflächen oder der extrazellulären Matrix „gebremst", wodurch die Netrin-Sekretion auf einen ringförmigen Bereich um die Papille beschränkt bleibt. Netrine wirken anziehend auf Zellen, die DCC-Rezeptoren der Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) tragen. An der Papille reagieren DCC tragende RGC-Axone auf Netrin-1 sekretierende neuroepitheliale Zellen und wandern in den optischen Nerv ein (Deiner et al., 1997). In Retinae von Mausmutanten, denen Netrin-1 oder DCC fehlten, wurden viele RGC-Axone beobachtet, die nicht korrekt in den optischen Nerv einwanderten (Deiner et al., 1997). Diese Daten deuten darauf hin, dass Netrin-1-, DCC- und EphB-Moleküle in der Wirbeltierretina in die Axonwegfindung mit kurzer Reichweite verwickelt sind (Stuermer und Bastmeyer, 2000; Oster et al., 2004; Zhang et al., 2004).

Die Eph-Rezeptoren („erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma cell line") sind die größte Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen („receptor tyrosine kinases", RTKs). In Wechselwirkung mit ihren Membran gebundenen Liganden, den Ephrinen („Eph receptor interactin proteins") üben Eph-RTKs bei der Blutgefäßentwicklung, der Bildung von Gewebegrenzen, der Zellwanderung, der axonalen Wegfindung und der synaptischen Plastizität vielfältige biologische Funktionen aus (Himanen and Nikolov, 2003; Kullander et al., 2003). Während der Entwicklung des visuellen Systems von Wirbeltieren spielen Eph-Rezeptoren und ihre Ephrin-Liganden eine wichtige Rolle bei der retinotektalen Projektion von RGC-Axonen (Nakamoto et al., 1996; Brown et al., 2000; Frisen et al., 1998) sowie bei der intraretinalen Wegfindung dorsaler RGC-Axone (Birgbauer et al., 2000; Birgbauer et al., 2000). Eine grundlegende Beteiligung des Eph/Ephrin-Systems an der Axonfaszikulierung wurde bislang nicht nachgewiesen. In Abhängigkeit der Aminosäuresequenz und der Bindungspräferenz können Eph-Rezeptoren und ihre Liganden in die A- und die B-Unterklasse eingeteilt werden (Abb. 8A; Eph Nomenclature Committee, 1997).

[3] „deleted in colorectal cancer".

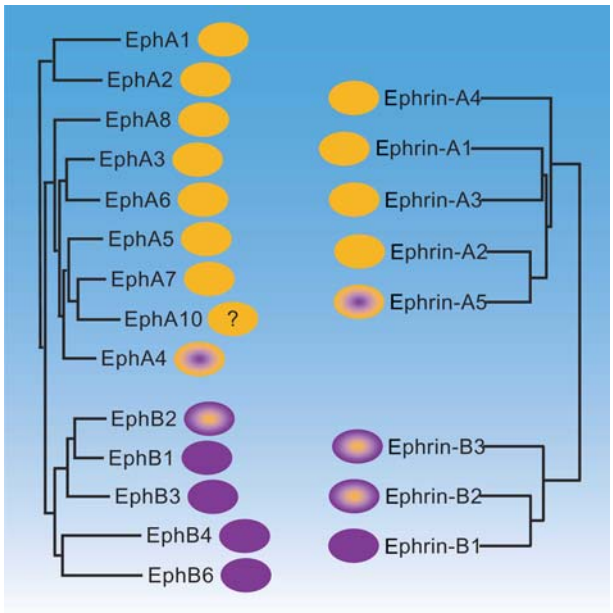


Abb. 8. Bindungswechselwirkungen und Sequenzverwandschaften zwischen Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden. Gelb und lila weisen auf die hohe Bindungsaffinität zwischen Mitgliedern der A- oder B-Unterklasse hin. Gelb mit einem lila Zentrum verdeutlicht die hohe Affinität zwischen Partnern der A-Unterklasse und geringerer Affinität zu Mitgliedern der B-Unterklasse. Lila mit einem gelben Zentrum hingegen weist auf hohe Affinität zwischen Mitgliedern der B-Unterklasse und geringerer Affinität zu Mitgliedern der A-Unterklasse hin. Die Bindungspräferenz des EphA10-Rezeptors ist unbekannt. Die Länge der horizontalen Stammbaumzweige sind proportional zu den Abweichungen zwischen den Aminosäuresequenzen. EphA9, EphB5 und Ephrin-A6 sind nicht aufgeführt (Pasquale, 2004).

Wechselwirkungen zwischen Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden ereignen sich nur bei direktem Kontakt zwischen Rezeptoren und Liganden tragenden Zellen (Himanen und Nikolov, 2003). Infolgedessen mulitimerisieren Rezeptoren- und Liganden-Moleküle innerhalb ihrer Zellmembranen und erzeugen so genannte „Cluster“. Dies führt zur Bildung von Signalzentren („signaling centers“), die räumlich auf den Bereich des Axon-Zell- oder Axon-Axon-Kontakts beschränkt sind (Davis et al., 1994; Henkemeyer et al., 1994). Bevor Signale zwischen faszikulierenden RGC-Axonen mittels Eph/Ephrin-Wechselwirkungen ausgetauscht werden, müssen sich zuerst solche Signalzentren bilden. Zwischen den Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden der A- oder B-Unterklasse gibt es keine strengen Bindungspartnerschaften. Denn die 9 verschiedenen EphA-Kinasen sind fähig, jeden der 6 verschiedenen GPI[4]-Membrananker tragenden A-Ephrine zu binden und dadurch aktiviert zu werden. Andererseits können die 6 bekannten EphB-Kinasen mit jedem der drei transmembranen B-Ephrine wechselwirken (Kullander und Klein, 2003). Bislang sind zwei Ausnahmen dieser Regel bekannt. Erstens kann der EphA4-Rezeptor nicht nur A-Liganden binden und von ihnen aktiviert werden, sondern er kann auch von Ephrin-B2 und Ephrin-B3 stimuliert werden (Bergemann et al., 1998; Gale et al., 1996a; Gale et al., 1996b). Zweitens kann Ephrin-A5 an EphB2 binden und aktiviert diesen B-Unterklasse-Rezeptor ebenso wie es B-Ephrine tun (Himanen et al., 2004).

[4] Glycosyl-phosphatidyl-inositol.

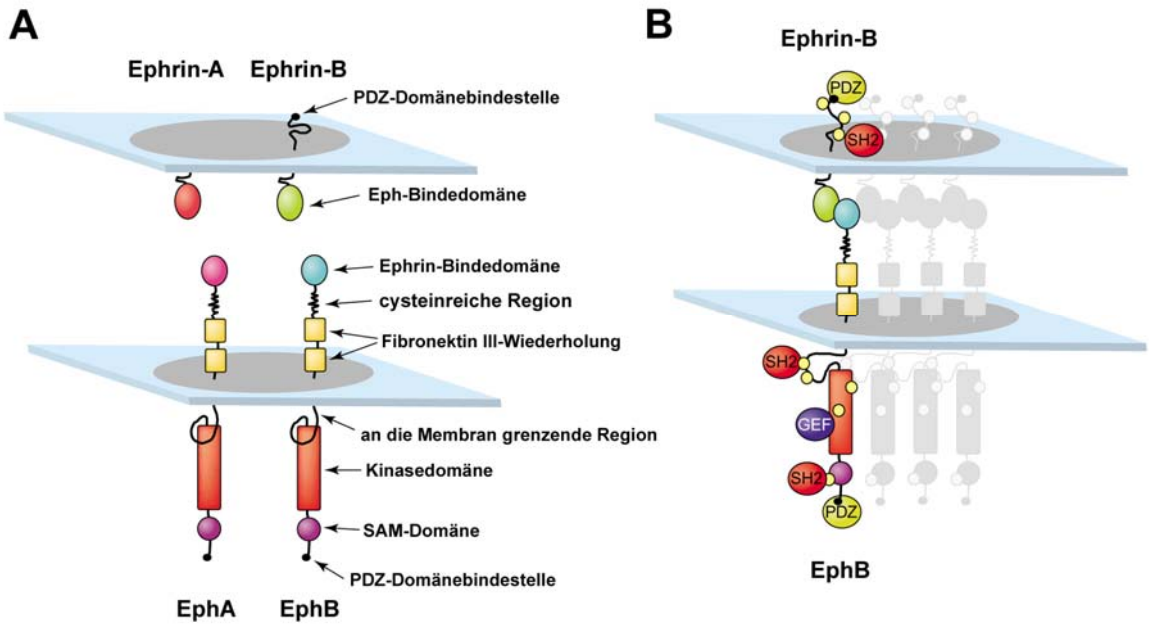


Abb. 9. Zell-Zell-Kontakt erlaubt Eph/Ephrin-Bindungen, Rezeptor-Multimerisierung und Bindung von Signalmolekülen. (A) Domänenstruktur von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden der A- und B-Unterklasse. Die beiden Zellmembranen sind in hellblau dargestellt. (B) Infolge der EphB/Ephrin-B-Bindungen multimerisieren die Rezeptoren- und die Ligandenmoleküle innerhalb ihrer Zellmembranen. Aufgrund dessen bilden sich Signalzentren, die räumlich auf den Bereich des Zell-Zell-Kontakts beschränkt sind. Im Fall von vorwärts gerichteter Signaltransduktion leitet die Rezeptor-Multimerisierung die Autophosphorylierung der Tyrosinkinasen ein. Bei rückwärts gerichteter Signaltransduktion phosphorylieren rekrutierte SFK[5]-Kinasen die cytoplasmatische Ephrin-Domäne. Die phosphorylierten Tyrosinreste (gelbe Kreise) verursachen Konformationsänderungen in den cytoplasmatischen Domänen von Ephrin und Eph-Molekülen, wodurch die Bindung von SH2[6]-Proteinen und PDZ-Proteinen ermöglicht wird. Proteine mit PDZ-Domäne binden an den Carboxy-Terminus von Eph- und Ephrin-Molekülen, während GEF[7] an die Kinasedomäne von Eph-Molekülen bindet (Yamaguchi und Pasquale, 2004).

Ausgehend von Signalzentren, die durch Eph/Ephrin-Wechselwirkung gebildet werden, können drei Formen von Signaltransduktion aktiviert werden. Erstens die konventionelle, in die Rezeptoren tragende Zelle gerichtete Signaltransduktion („forward signaling“), bei der sowohl A- als auch B-Ephrine beteiligt sein können. Im Gegensatz zu den meisten anderen RTKs werden Eph-Rezeptoren nur dann vollständig aktiviert, wenn sie von multimerisierten Ephrin-Liganden gebunden werden, wodurch die Rezeptor-Moleküle ihrerseits innerhalb der Zellmembran multimerisieren (Kullander und Klein, 2003). Die Rezeptor-Multimerisierung leitet dann die Autophosphorylierung der Tyrosinkinasen und die Phosphorylierung verschiedener Adaptorproteine ein, wodurch Signale ins Innere der Rezeptor tragenden Zelle übertragen werden. Die zweite Form ist die reverse Signaltransduktion („reverse signaling“). Hierbei ist die Signalkaskade ins Innere der Liganden tragenden Zelle gerichtet, d. h. hier reagiert die Rezeptor tragende Zelle nicht auf Bindung von Liganden, sondern die Ephrin-Liganden tragende Zelle auf Stimulation durch Eph-Rezeptoren. B-Ephrine besitzen auf ihrer intrazellulären Seite eine hochkonservierte cytoplasmatische Domäne und ein C-terminales PDZ-Bindemotiv. Bei reverser

[5] „Src family kinase“.
[6] „Src homology 2”
[7] „Guanine nucleotide exchange factor“ für Rho-GTPasen.

Signaltransduktion werden Tyrosin-Reste dieser cytoplasmatischen Domäne nach Rezeptoren-Liganden-Bindung durch rekrutierte SFK-Kinasen („Src-family kinases“) phosphoryliert. Dadurch werden so genannte Signaleffektor-Proteine rekrutiert, welche ihrerseits eine intrazelluläre Signalkaskade einleiten (Bruckner et al., 1997; Holland et al., 1996). Das PDZ-Bindemotiv des Ephrin-B-Proteins dient dabei der Protein-Protein-Wechselwirkung (Cowan et al., 2004). Zunächst ging man davon aus, dass nur B-Ephrine reverse Signaltransduktion vermitteln, da nur diese eine intrazelluläre Domäne besitzen, während A-Ephrine durch einen GPI-Rest in der Zellmembran verankert sind. Mittlerweile wurde jedoch auch bei zwei A-Ephrinen, Ephrin-A5 und Ephrin-A2, reverse Signaltransduktion nachgewiesen (Davy et al., 1999; Holmberg et al., 2005). Die dritte Form der Eph/Ephrin vermittelten Signaltransduktion ist die bidirektionale Signaltransduktion („bidirectional signaling“). Hierbei werden nach Eph/Ephrin-Wechselwirkung sowohl in Rezeptoren als auch in der Liganden tragenden Zelle Signalkaskaden aktiviert (Holland et al., 1996).

Eph/Ephrin-Wechselwirkungen sind in dem sich entwickelnden visuellen System von Wirbeltieren streng reguliert und kontextabhängig: Signale können entweder vorwärts oder rückwärts gerichtet sein sowie anziehende oder abstoßende Reaktionen des Axonwachstumskegels verursachen. Obgleich EphB-Rezeptoren innerhalb der Retina als hemmende Axonleitmoleküle („inhibitory axon guidance cues“) fungieren und bei dorsalen Ganglienzellaxonen „reverse signaling“ hervorrufen (Birgbauer et al., 2000; Birgbauer et al., 2001), werden EphB-Proteine von retinalen Axonen im Colliculus (der Maus) bzw. im Tektum (des Krallenfrosches) entweder als Kontakt anziehende, „forward signaling“ vermittelnde Axonwegfindungsrezeptoren (Hindges et al., 2002) oder als Wachstum fördernde, „reverse signaling“ auslösende, Axonleitmoleküle genutzt (Mann et al., 2002).

5. Retinotektale Projektion, die topographische Karte des visuellen Systems

Die Retina und ihre Projektion in das Tektum opticum bzw. den Colliculus superior und das Corpus geniculatum laterale ist ein bekanntes Beispiel einer topographischen Karte des Wirbeltiergehirns. Topographische Karten sind ein grundlegendes Organisationsprinzip axonaler Verbindungen sensorischer Systeme. Bei der retinotektalen bzw. retinocollicularen Projektion wird die Retina verzerrt, jedoch Punkt für Punkt topographisch genau, auf die Tektum- bzw. Colliculus-Oberfläche projiziert. Bestimmte retinale Bereiche, wie etwa das Zentrum schärfsten Sehens[8], können dabei überrepräsentiert sein.

[8] Fovea centralis der Primaten bzw. die Area centralis des Hühnchens.

Die Linse des Auges fokussiert das visuelle Feld[9] auf die Retina, wo ein umgekehrtes Bild entsteht, das von den Photorezeptoren in elektrochemische Signale umgewandelt wird. Diese Signale werden von Interneuronen moduliert und über die retinotektale bzw. retinocolliculare Projektion in die visuellen Zentren des Gehirns übertragen. Die relativen Positionen der RGCs innerhalb der GCL bleiben bei dieser Projektion erhalten, weshalb benachbarte RGCs der Retina benachbarte Zellen des Tektums bzw. Colliculus innervieren. Bei Vögeln, Reptilien (Sauropsiden) und Knochenfischen wird jede Retina ausschließlich, aber vollständig in der kontralateralen[10] Tektumhälfte abgebildet (Abb. 10A). Daher wird das dorsale visuelle Feld im dorsalen (medialen) Tektum dargestellt, während das ventrale visuelle Feld im ventralen (lateralen) Tektum abgebildet wird. Analog dazu wird das nasale visuelle Feld wird auf das anteriore (rostrale) Tektum projiziert, während das temporale visuelle Feld auf das posteriore (caudale) Tektum übertragen wird. Bei Sauropsiden und Knochenfischen kreuzen der linke und der rechte Sehnerv im Chiasma opticum vollständig. Um Sauropsiden und Knochenfischen daher räumliches Sehen zu ermöglichen, kann Information von der ipsilateralen[11] Retina über intercerebrale Kommissuren in die tiefen Tektumschichten vermittelt werden. Bei den meisten Säugern und bei einigen Amphibien hingegen kreuzen bestimmte Teile der Sehbahnen nicht vollständig, sondern projizieren ipsilateral, was ebenfalls räumliches Sehen ermöglicht (Abb. 10B).

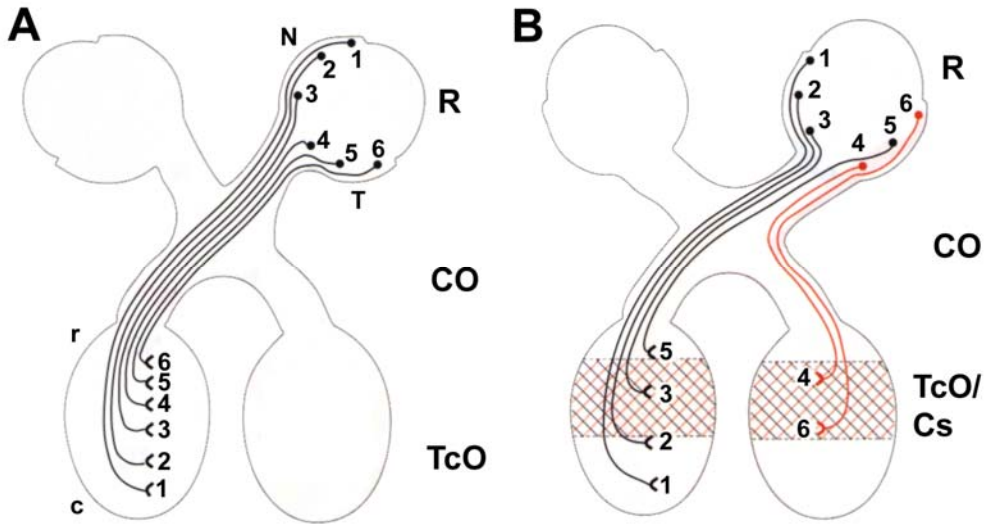


Abb. 10. Retinotektale Projektionsschemata der Wirbeltiere. (A) Vollständige Kreuzung der RGC-Axone bei Vögeln, Reptilien und Knochenfischen. (B) Gekreuzte RGC-Axone aus der ganzen Retina (schwarz), ungekreuzte nur aus der temporalen Retina bei den meisten Säugern und einigen Amphibien. Der schraffierte Bereich im Tektum/Colliculus erhält Axone aus der linken und der rechten Retina (Hoffmann und Wehrhahn, 2001). c: caudal. CO: Chiasma opticum. Cs: Colliculus superior (bei Säugern). N: nasal. R: Retina. r: rostral. TcO: Tectum opticum. T: temporal.

[9] Objekte aus der Umwelt.
[10] Contralateral: auf der gegenüberliegenden Seite.
[11] Ipsilateral: auf der gleichen Seite.

Im Hühnchenembryo erreichen die ersten Ganglienzellaxone nach ihrer Wanderung durch den optischen Nerv, das Chiasma und den optischen Trakt gegen E6 den anterior-ventralen Pol des optischen Tektums (Mey und Thanos, 2000). Zu diesem Zeitpunkt haben Axone, die aus der peripheren Retina stammen, noch nicht mit der Wanderung in ihre Zielzonen begonnen. Die Entwicklung der retinotektalen Topographie ist ein Prozess, der in mehreren Schritten abläuft (Nakamura and O'Leary, 1989). Gegen E10 hat sich eine einfache, jedoch unpräzise, topographische Karte gebildet. Dabei machen vor allem temporale Axone entlang der anterior-posterioren und lateral-medialen Achse des Tektums erhebliche Zielfindungsfehler („axon overshoot"). Zwischen E13 und E16 finden umfangreiche strukturelle Änderungen von RGC-Axonen auf der Tektumoberfläche statt („axon remodeling"). Dabei werden Axone, die in falsche Zielzonen eingewandert sind, zurückgezogen oder abgebaut und neue Axonseitenarme gebildet („interstitial branching"). Ab E16 hat sich eine streng sortierte, „reife" Karte entwickelt.

Um die Kartierungsinformation zur Entwicklung der retinotektalen bzw. retinocollicularen Projektion zu erzeugen, schlägt die Sperry'sche Chemoaffinitätshypothese vor, dass die Spezifität von axonalen Verbindungen der topographischen Karte durch graduell exprimierte Axonleitmoleküle bestimmt wird, die korrespondierende Punkte innerhalb der Retina und des Tektums kennzeichnen (Sperry, 1963). Bei der TN-Kartierung der Retina entlang der anterior-posterioren Achse des Tektums bzw. Colliculus hat das EphA/Ephrin-A-System eine Schlüsselfunktion (Abb. 11). Im Hühnchenembryo *EphA3* in einem TN-Gradienten exprimiert, wobei die höchste Expression in der temporalen Retina und die geringste in der nasalen zu finden ist (Cheng et al., 1995). Die zwei Liganden des EphA3-Rezeptors, *Ephrin-A2* und *Ephrin-A5*, werden in einem PA-Gradienten im Tektum exprimiert, wobei das Expressionsmaximum im posterioren und das Minimum im anterioren Tektum liegt (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995). In vitro üben Ephrin-A-Liganden gegenüber EphA-Rezeptoren tragenden Axonwachstumskegeln Kontaktabstossung („contact repulsion") aus. Dies deutet darauf hin, dass in vivo die Projektion EphA3 tragender temporaler RGC-Axone in falsche, posteriore Zielzonen durch Ephrin-A2 und Ephrin-A5 tragende Zellen des posterioren Tektums verhindert wird. Nasale RGC-Axone, die kein EphA3 tragen, können hingegen in A-Ephrin exprimierende Zielzonen im posterioren Tektum einwandern und dort tektale Zellen innervieren. Mittlerweile wurde ein Modell entwickelt, das die Entwicklung der retinocollicularen Projektion der Maus erklären soll (Brown et al., 2000). Dieses Modell schlägt vor, dass die Zielpräferenzen nicht abhängig von der absoluten Stärke der EphA-vermittelten Signaltransduktion in RGC-Axonen sind, sondern von den relativen Unterschieden zwischen benachbarten RGC-Axonen bestimmt werden.

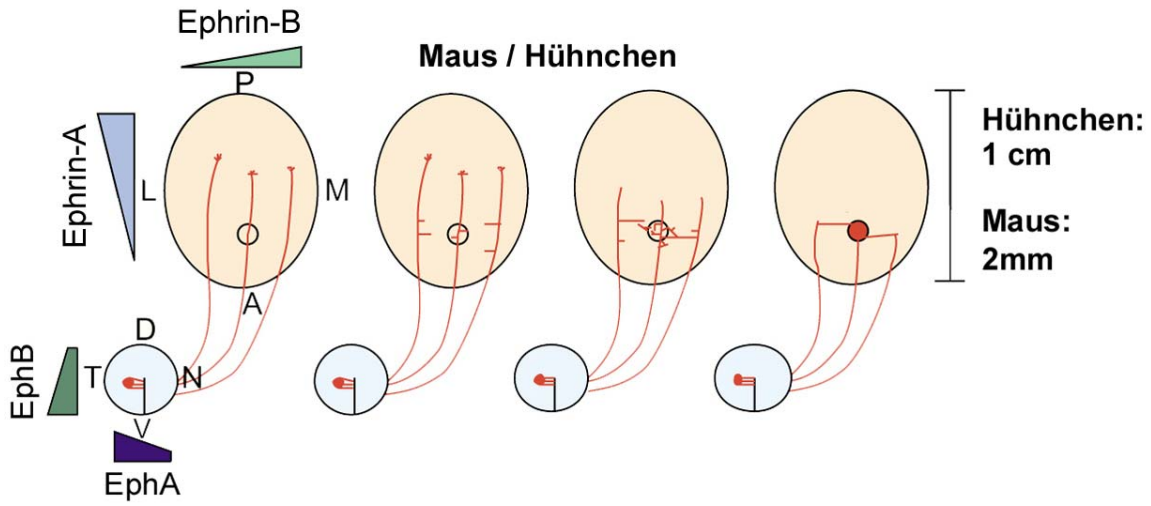


Abb. 11. Entwicklung der retinotektalen bzw. retinocollicularen Projektion am Beispiel von temporalen RGC-Axonen. Die Stadien der Entwicklung verlaufen von links nach rechts. Dargestellt sind die axialen Expressionsgradienten (Dreiecke) von Eph-Rezeptoren in der Retina und von Ephrin-Liganden im Tektum bzw. Colliculus. Zunächst wachsen die RGC-Axone über ihre zukünftige Zielzone (Kreis) hinaus („axon overshoot"). Aufgrund des von anterior nach posterior zunehmenden Gradienten von A-Ephrinen wird das Wachstum der EphA-Rezeptoren tragenden Axone gestoppt. Nachdem die Axone, die in falsche Zonen eingewandert sind, zurückgezogen oder abgebaut sind, werden neue Seitenarme lateral oder medial in Richtung der Zielzone gebildet („interstitial branching"). Die Projektion ist abgeschlossen, wenn sich die Axonseitenarme in der Zielzone „verdichtet" haben (Mc Laughlin et al., 2003).

6. cDNA-Microarrays als Werkzeug zur Identifizierung potentiell-differentiell exprimierter Gene

cDNA-Microarrays dienen zur Bestimmung potentiell differentiell exprimierter Gene in Zell- oder Gewebeproben. Die erste cDNA-Microarray-Studie wurde im Jahr 1995 veröffentlicht (Schena et al., 1995). In dieser Studie wurde die potentiell differentielle Genexpression von insgesamt 45 Genen der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) parallel bestimmt. Hierzu wurden bis zu 2 kb lange, doppelsträngige cDNA-Fragmente mit Hilfe eines Roboters als Punkte an definierten Stellen auf einen beschichteten Glasobjektträger gedruckt. Während das Herstellungsprinzip bis heute im Wesentlichen unverändert blieb, können inzwischen auf der Oberfläche eines modernen cDNA-Microarrys 10 bis 20 Tausend Punkte aufgebracht werden. Die cDNA-Fragmente eines cDNA-Microarrays werden mittels PCR aus sequenzverifierten Genen, „expressed sequence tags" (ESTs) oder Klonen einer selbst- bzw. kommerziell hergestellten cDNA-Bank hergestellt.

Mit Hilfe eines cDNA-Microarray-Experiments wird die relative Expressionsstärke von cDNA-Fragmenten (Sondenmoleküle) in zwei DNA- oder RNA-Proben (Zielmoleküle) ermittelt, wobei die Sondenmoleküle als Punkte in zeilen- und spaltenweiser Anordnung („array") fest auf einem Glasobjektträger („glass slide") gedruckt sind („The Chipping Forecast", 1999). Wie in Abb. 12 schematisch dargestellt, geschieht dies, indem die Zielmoleküle der einen Probe mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin-3 (Cy3) und die der anderen mit Cyanin-5 (Cy5) markiert werden.

Anschließend werden gleiche Mengen der Cy3- und der Cy5-markierten Zielmolekülproben gemischt und gegen die unmarkierten Sondenmoleküle des cDNA-Microarrays hybridisiert. Da die Zielmoleküle aus beiden Proben um die Bindung mit einem komplementären cDNA-Moleküle konkurrieren, werden cDNA-Microarray-Hybridisierungen auch als kompetititve Hybridisierungen bezeichnet. Nach der kompetitiven Hybridisierung, werden mittels eines Scanners die Fluoreszenz-Intensitäten, für jeden Cyaninfarbstoff getrennt, an jedem Punkt des Arrays gemessen. Dabei wird die Cy3-Fluoresenz meist als grüner Falschfarbenwert, die Cy5-Fluoreszenz als roter Falschfarbenwert dargestellt. Das Verhältnis der roten und grünen Intensität eines Punktes ist ein Maß für die relative Häufigkeit der cDNA-Sondenmoleküle in den zwei Zielmolekülproben (Yang and Speed, 2002).

Die gescannten cDNA-Microarray-Bilder werden mit Hilfe einer Bildanalysesoftware wie GenePix (Axon Instruments) bearbeitet, um die roten und grünen Vordergrund- und Hintergrundintensitäten jedes Punktes zu bestimmen. Um die Expressionsstärke eines cDNA-Klons zu quantifizieren, wird das differentielle Expressionsverhältnis M zwischen der hintergrundkorrigierten roten (R) bzw. grünen Vordergrundintensität (G) eines Punktes logarithmiert und folgendermaßen dargestellt: $M = \log_2 R - \log_2 G = \log_2 R/G$. Die Gesamthelligkeit eines Punktes A („log-intensity“) wird ebenfalls logarithmiert: $A = (\log R + \log G)/2 = ½ \cdot \log_2 R \cdot G$. Der Logarithmus zur Basis 2 bietet den Vorteil, dass eine M- bzw. A-Einheit einer zweifachen Änderung des differentiellen Expressionsverhältnis bzw. der Verdoppellung der Helligkeit entspricht. Ist M = 0, sind die Expressionsverhältnisse einer bestimmten mRNA-Spezies in beiden Zielmolekülproben gleich. Ist M = +1 bzw. M = -1, dann ist eine bestimmte mRNA-Spezies in der einen bzw. der anderen Zielmolekül-Probe doppelt so häufig vertreten wie in der anderen.

Aufgrund der kompetitiven Hybridisierung von Zielmolekülproben werden bei cDNA-Microarray-Experimenten nicht absolute, sondern relative Expresssionswerte bestimmt. Daher spielt bei der Erzeugung dieser Daten das experimentelle Design eine wichtige Rolle. Das Design eines cDNA-Microarray-Experimentes muss einen Ausgleich zwischen einer aussagekräftigen Datenanalyse, den cDNA-Microarray-Kosten und den verfügbaren RNA-Mengen schaffen. Ein wichtiges Kriterium des Designs ist die Entscheidung, ob zwei Zielmolekülproben direkt auf einem Array oder indirekt über eine dritte Probe, der so genannten gemeinsamen Referenzprobe („common reference sample“) miteinander verglichen werden sollen. Nach Möglichkeit sollte ein direkter Vergleich gewählt werden, da die Varianz des M-Werts bei einem direkten Vergleich geringer ist als bei einem indirekten Vergleich (Yang und Speed, 2002).

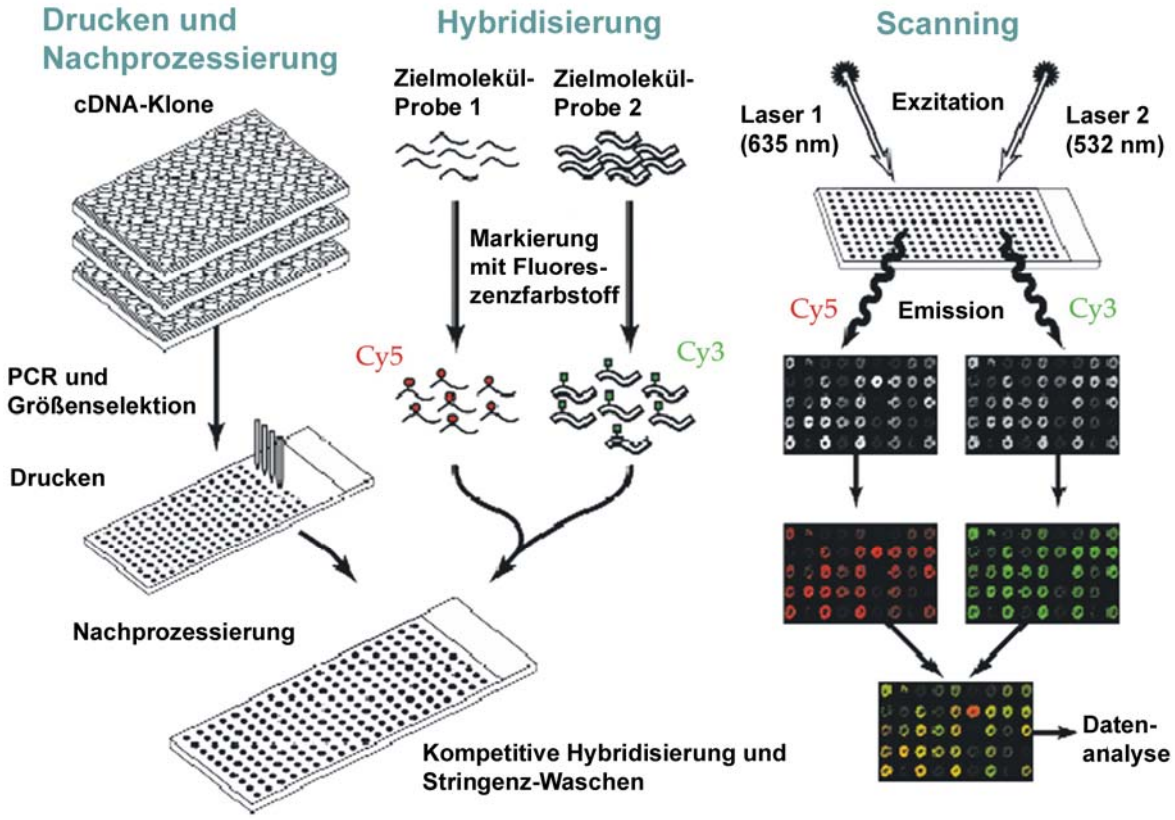


Abb. 12. Prinzip des Druckens, der Hybridisierung und des Scannings von cDNA-Mikroarrays (Duggan et al., 1999). Erklärungen im Text.

Bevor anhand der cDNA-Microarray-Daten potentiell differentiell exprimierte Gene bestimmt werden können, müssen fehlerbehaftete M-Werte normalisiert werden. Der Zweck der Normalisierung ist es, jeden Fehler zu korrigieren, der auf systematische Abweichungen und nicht auf biologische Unterschiede zwischen den Zielmolekülproben und den gedruckten Sondenmolekülen zurückzuführen ist. Solche systematischen Fehler werden in der Statistik als „bias“ bezeichnet. Am häufigsten tritt der Farbstofffehler auf, ders auf Unterschiede zwischen der Markierungseffizienz und den Scannereigenschaften der beiden Fluoreszenzfarbstoffe zurückzuführen ist. Die Effizienz der Markierung von Zielmolekülen hängt von der Markierungsmethode ab. Beim Einbau von Cyaninfarbstoff-markierten dCTPs in Gegenwart von Reverser Transkriptase oder DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym) ist es empfehlenswert, die Zuordnung von Farbstoffen und Zielmolekülproben in Wiederholungsexperimenten auch einmal zu tauschen („dye-swap replication“). Denn diese Enzyme bauen Cy3- und Cy5-dCTPs mit unterschiedlicher Effizienz in den cDNA-Strang ein. Werden die Cyaninfarbstoff-Moleküle hingegen durch eine chemische Reaktion mit den Zielmolekülen verknüpft, wie zum Beispiel bei der ASAP-Methode (Abschn. 27.3) ist ein Farbstofftausch eigentlich nicht notwendig. Darüber hinaus verstärkt der Gebrauch unterschiedlicher Scannereinstellungen diese Verzerrung der Messwerte. Weitere systematische Fehler können aus Abweichungen zwischen den Punktpositionen und den cDNA-Mengen der Punkte innerhalb des Glasträgers oder zwischen den

Glasträgern entstehen. Diese Fehler entstehen durch Unterschiede zwischen den Nadeln des Druckkopfes („print head“) und/oder der Abweichung während eines Drucklaufs. Sie können auch aus uneinheitlicher Hybridisierung zwischen markierten Zielmolekülen und immobilisierten Sondenmolekülen resultieren. Solche Herstellungsmängel machen sich auch bei Wiederholungs-experimenten bemerkbar.

Mittlerweile wurden eine ganze Reihe von Ansätzen zu Design, Normalisierung und statistischer Datenanalyse von cDNA-Microarray-Experimenten entwickelt (Bassett, Jr. et al., 1999; Kerr and Churchill, 2001a; Kerr and Churchill, 2001b; Quackenbush, 2001; Smyth et al., 2002; Churchill, 2002). Hierbei hat sich eine intensitätsabhängige Normalisierungsmethode als besonders praktikabel erwiesen (Yang et al., 2002). Der Vorteil dieser Methode liegt im Ausgleich von systematischen Fehlern, die von der Intensität und räumlichen Lage auf der Trägeroberfläche abhängig sind.

Die Erzeugung aussagekräftiger Microarray-Daten erfordert eine sorgfältige Präparation des Gewebes und Herstellung der Zielmoleküle. Desweiteren sollten mehrfache, unabhängige Wiederholungen des Experimentes („biological replicates“) durchgeführt werden. Biologische Wiederholungen sind statistisch wertvoller als technische Wiederholungen („technical replicates“), da bei letzteren die Zielmoleküle immer von derselben Gewebepräparation hergestellt werden. Deshalb weichen Daten technischer Wiederholungen generell weniger voneinander ab als Daten biologischer Wiederholungen. Aus diesem Grund eignen sich technische Wiederholungen weniger für Mittelwertbildungen, weil systematische Fehler wie Präparationsartefakte und/oder Markierungsfehler viel stärker ins Gewicht fallen (Yang und Speed, 2002). Mit Hilfe von cDNA-Microarray-Experimenten werden potentielle relative Expressionsstärken von Genen ermittelt. Daher müssen die Microarray-Daten immer durch eine unabhängige Methode wie RNA-in situ-Hybridisierung, „Northern blotting“ oder quantitative PCR verifiziert werden (Barlow and Lockhart, 2002; Yang und Speed, 2002). Obwohl die Sensitivität sich zunehmend verbessert, ist eine cDNA-Microarray-Analyse gegenwärtig auf die Detektion von Genen beschränkt, die mit einer relativen Häufigkeit von 1/100.000 mRNA-Molekülen differentiell exprimiert werden (Brown and Botstein, 1999; Lockhart and Winzeler, 2000).

ERGEBNISSE

7. Das Faszikelmuster dorsaler und ventraler Ganglienzellaxone unterschied sich in der Hühnchen-, nicht aber in der Mausretina

Im Gegensatz zu Säugetieren, bei denen myelinisierte RGC-Axone nur im optischen Nerv vorkommen[12], besitzt die retinale Nervenfaserschicht („nerve fiber layer", NFL) von Vögeln nicht nur unmyelinisierte, sondern auch viele myelinisierte RGC-Axone (Nakazawa et al., 1993; Hughes et al., 1972; Imagawa et al., 1999). Im adulten Hühnchen unterscheiden sich Dicke und Myelinisierungsgrad von RGC-Axonen entlang der DV-Achse: die dorsale NFL enthält die größte Zahl von RGC-Axonen, die häuptsächlich dünn und nicht mylinisiert sind; die ventrale NFL umfaßt dagegen eine relativ kleine Zahl dicker RGC-Axone, von denen viele jedoch myelinisiert sind (Imagawa et al.,1999).

Die Myelinisierung von RGC-Axonen beginnt relativ spät in der Entwicklung der Hühnchenretina, d. h. zu einem Zeitpunkt, an dem die axiale Polarität der Retina bereits festgelegt ist. Die Myelinscheide von RGC-Axonen des Hühnchens wird von Oligodendrocyten erzeugt, die im Gegensatz zu Müller-Gliazellen nicht vom retinalen Neuroepithel abstammen. Oligodendrocyten-Vorläuferzellen („precursor cells") wandern gegen E10 aus dem optischen Nerv in die NFL ein (Ono et al., 1998). In diesem Entwicklungsstadium ist die Bildung der RGCs abgeschlossen und die intraretinalen Wanderungen der RGC-Axone zur Papille in vollem Gange. Erst gegen E16, wenn die Schichtung der Retina fast abgeschlossen ist, beginnen die Oligodendrozyten das basische Myelinprotein („myelin basic protein") in der GCL zu exprimieren, das ein Indikator für die Myelinscheidenbildung ist (Ono et al., 1998). Am Tag E18, kurz vor dem Schlüpfen des Kückens, ist das Myelinprotein auch in der NFL vorhanden (Ono et al., 1998).

Um die Morphologie des Axonfaszikelmusters einer reifen Hühnchenretina entlang der DV-Achse zu untersuchen, wurden Präparate ganzer E18-Hühnchenretinae (HH44) mit dem Neurofilament-antikörper RMO270 gefärbt (Dr. Virginia Lee, University of Pennsylvania Medical School; McCabe et al., 1999). Anschließend wurden in der NFL die RGC-Axone mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert (Abb. 13).

[12] Eine Ausnahme bildet das Kaninchen, denn seine Retina besitzt einen gewissen Anteil myelinisierter RGC-Axone (Vaney, 1980).

Hierbei wurde ein deutlicher Unterschied zwischen der Morphologie des ventralen und dorsalen Axonfaszikelmusters beobachtet (Retinae, n = 4/4): Innerhalb der ventralen NFL faszikulierten die Axone zu dicken Bündeln bzw. Faszikeln, die in parallelen Bahnen zunächst zur optischen Fissur, dann zur Papille wanderten (D). In der dorsalen NFL hingegen erzeugten die Axone auf ihrem Weg zur Papille ein Faszikelmuster, das sich deutlich von dem gröberen ventralen Muster unterschied (C).

Um zu prüfen, ob dieser DV-Unterschied des Axonfaszikelmusters eine Folge der späten differentiellen Myelinscheidenbildung ist oder eine Konsequenz der frühen axialen Musterbildung der Retina bestimmt wird, wurde die NFL von Präparaten ganzer E6,5-Hühnchenretinae (HH30) mit dem Neurofilament-Antikörper RMO270 gefärbt und mit dem Ergebnis der E18-Hühnchenretinae verglichen (Abb. 13). Dabei wurde festgestellt, dass sich bereits am Tag E6,5 ein DV-Axonfaszikelmuster entwickelt hatte, das dem Faszikelmuster-Phänotyp der reifen Hühnchenretina sehr ähnlich war (Retinae, n = 9/9): In der dorsalen NFL waren dünne Axonfaszikel zu erkennen, während in der ventralen NFL dicke Faszikel vorlagen (A-B). Somit bildet sich der DV-Unterschied des Faszikelmusters noch bevor die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aus dem optischen Nerv in die Retina einwanderten. Um zu untersuchen, ob das DV-Axonfaszikelmuster auch in der sich entwickelnden Retina von Säugern zu beobachten ist, wurden Präparate ganzer E18-Mausretinae (CD-1-Stamm; Retinae, n = 4/4) und adulter Mausretinae (CD-1-Stamm; Retinae, n = 4/4) immunohistochemisch analysiert (Abb. 13). Es stellte sich heraus, dass sowohl in embryonalen als auch in adulten Tieren die RGC-Axone in radialen Bahnen von der Periphärie zur zentral gelegenen Papille zogen: Ein Unterschied des Faszikelmusters dorsaler und ventraler RGC-Axone wurde in der Mausretina also nicht gefunden (F-H).

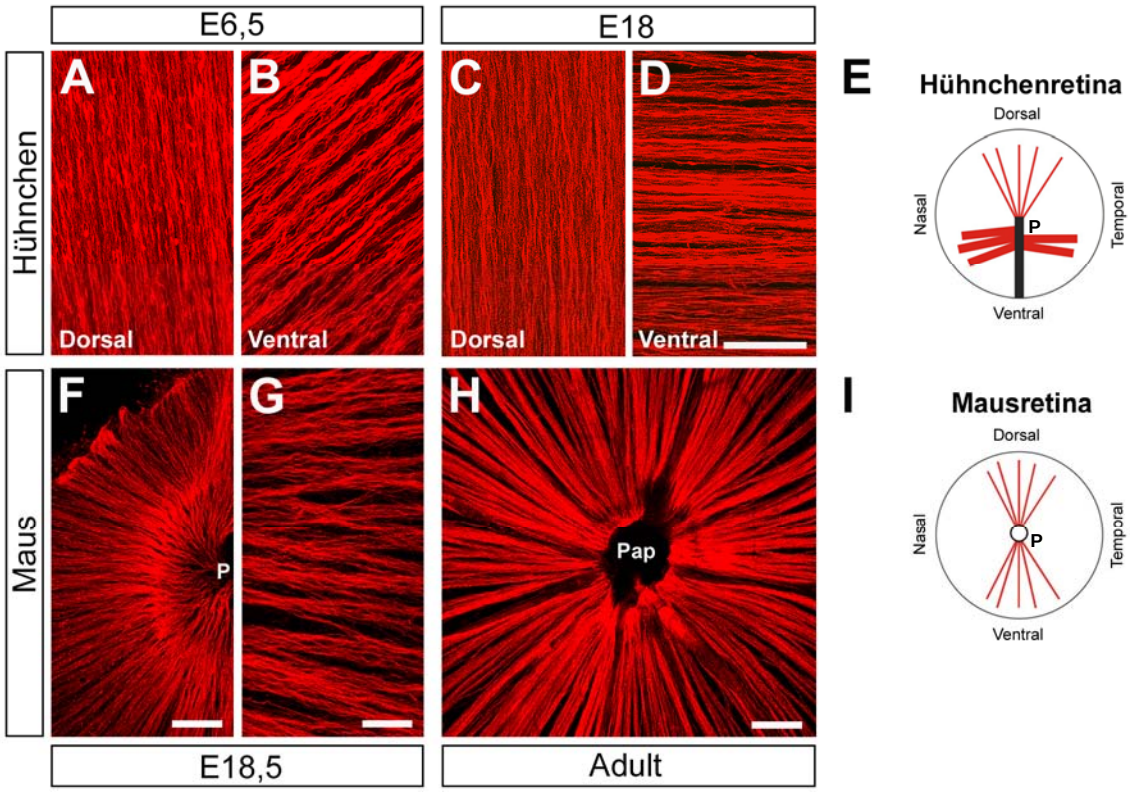
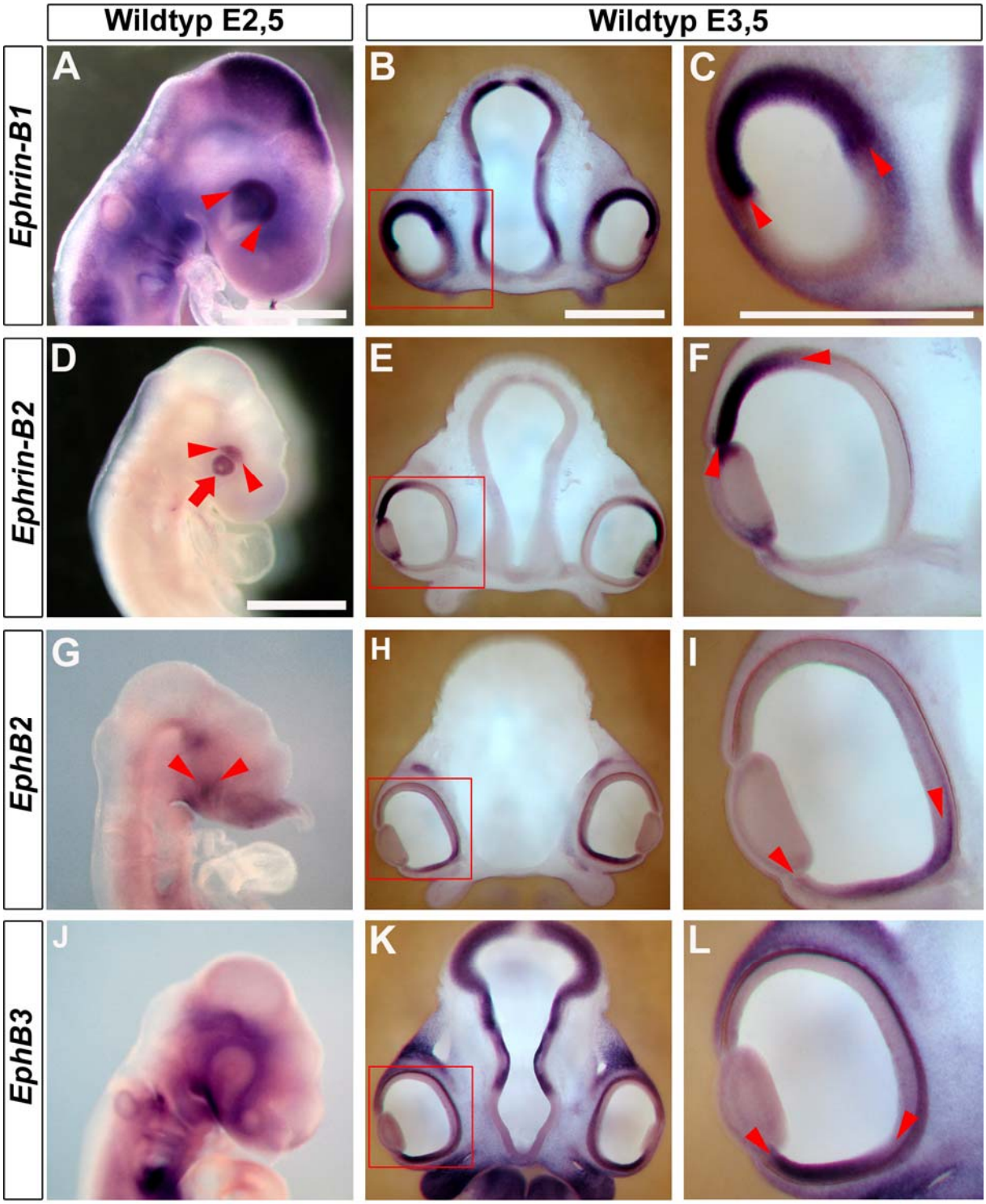


Abb. 13. Morphologische Unterschiede zwischen dem Axonfaszikelmuster entlang der DV-Achse der sich entwickelnden Retina von Hühnchen und Maus. RGC-Axone wurden mit einem Neurofilament-Antikörper gefärbt. (A-B) In der dorsalen NFL der E6,5-Hühnchenretina faszikulieren die Axone auf ihrem Weg zur Papille zu dünnen Bündeln (A), während die Axone in der ventralen NFL dicke Bündel bilden (B). (C-D) In der „reifen" E18-Hühnchenretina bleibt der Unterschied zwischen dem feinen dorsalen (C) und groben ventralen (D) Faszikelmuster erhalten. (F-G, H) Im E18-Mausembryo (F) und der adulten Maus (H) ziehen faszikulierende Axone in radialen Bahnen von der Peripherie zur Papille. Höhere Vergrößerung (G). In der Mausretina sind keine DV-Unterschiede des Axonfaszikelmusters festzustellen. (E) Schema des DV-Axonfaszikelmusters in der Wildtyp-Hühnchenretina (dorsal: dünne rote Linien; ventral: dicke rote Linien; optische Fissur: schwarze Linie) oder des radialsymmetrischen Axonfaszikelmusters in der Wildtyp-Mausretina (I). P bzw. Pap: optische Papille. Maßstab, 50 µm (A-D), 100 µm (F, H), 25 µm (G).

8. *EphB*- und *Ephrin-B*-Genexpressionsmuster in der embryonalen Hühnchenretina

Um zu prüfen, ob ausgewählte *EphB*- und *Ephrin-B*-Gene bereits während der frühen retinalen Neurogenese in DV-Gradienten exprimiert werden, wurden nicht-radioaktive in situ-Hybridisierung auf ganzen E2,5-Hühnchenembryonen und auf Vibratomschnitten von E3,5-Hühnchenköpfen durchgeführt (Abb. 14). Schon am Tag E2,5 (HH15) wurden die *Ephrin-B1* und *Ephrin-B2* in der äußersten dorsalen Region des Augenbechers exprimiert (A, D), während *EphB2* in dessen äußerster ventraler Region exprimiert wurde (G). *EphB3* wurde in der äußersten ventralen Retinaregion erst am Embryonaltag 3,5 (HH19) exprimiert (K-L). Die differentielle Transkriptverteilung von *Ephrin-B1*, *Ephrin-B2* und *EphB2* entlang der retinalen DV-Achse wurde auch am Tag E3,5 nachgewiesen (B-C, E-F, H-I). Dabei wurden *Ephrin-B1*, *Ephrin–B2*, *EphB2* und *EphB3*-Transkripte von undifferenzierten neuroepithelialen Zellen und in der sich bildenden Ganglienzellschicht exprimiert. Somit tragen die ventralen Expressionsmuster von

EphB2- und *EphB3*-Transkripten und die dorsalen Expressionsmuster von *Ephrin-B1*- und *Ephrin-B2*-Transkripten dazu bei, die DV-Achse der embryonalen Hühnchenretina in gegenüberliegende Expressionsdomänen zu unterteilen. Dies geschieht in dem Zeitraum, in welchem die ersten RGC-Axone zur Papille wandern (McCabe et al., 1999).



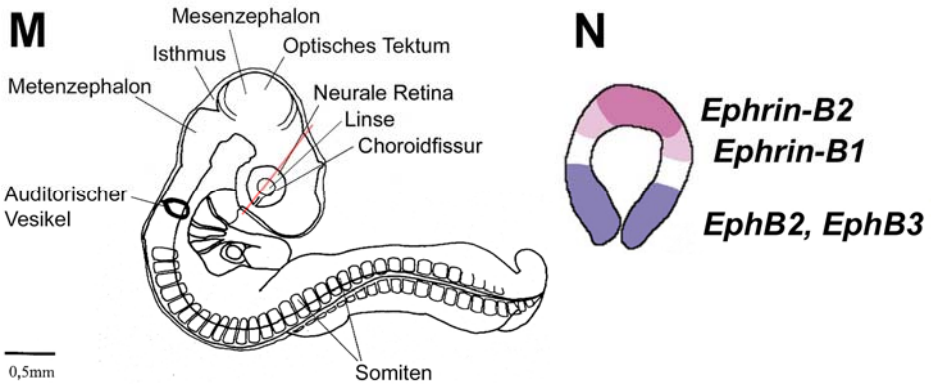


Abb. 14. Differentielle Expression von *EphB2*-, *EphB3*-, *Ephrin-B1*- und *Ephrin-B2*-mRNA entlang der DV-Achse der embryonalen Hühnchenretina. (A, D, G, J) Seitenansichten von E2,5-Hühnchenköpfen (HH14-16). *Ephrin-B1* (A) und *Ephrin-B2* (B) werden im dorsalen Augenbecher exprimiert, während *EphB2* (G) stark in dessen ventralen Hälfte exprimiert wird (Pfeilspitzen). *Ephrin-B2* wird auch in der Linse exprimiert (Pfeil in D). (B-C, E-F, H-I, K-L) E3,5-Hühnchenköpfe, die entlang der retinalen DV-Achse geschnitten wurden. *Ephrin-B1* (B-C) und *Ephrin-B2* (E-F) werden in einem von dorsal nach ventral verlaufenden Gradienten exprimiert, wobei sich die größten Transkriptmengen in der dorsalen Retina befinden (Pfeilspitzen). *EphB2*-Transkripte (H-I) und auch *EphB3*-Transkripte (K-L) werden in einem entgegengesetzt verlaufenden Gradienten exprimiert, dessen Schwerpunkt in der ventralen Retina liegt (Pfeilspitzen). Die *EphB*- und *Ephrin-B*-Gene werden in der sich bildenden Ganglienzellschicht und von undifferenzierten neuroepithelialen Zellen exprimiert. (M) Zeichnung eines E3 (HH18)-Hühnchenembryonen (Mey und Thanos, 2000). Hervorgehoben ist die Schnittebene entlang der DV-Achse (rote Linie). (N) Schema der Genexpressionsdomänen von *Ephrin-B1*, *Ephrin-B2*, *EphB2* und *EphB3* entlang der DV-Achse der frühen Retina. Maßstab, 1 mm (A-L).

9. Retrovirale Fehlexpression von *cVax* ventralisierte das Axonfaszikelmuster und verursachte fehlerhafte intraretinale Axonwegfindung

Das frühe Auftreten des DV-Axonfaszikelmuster-Phänotyps in der embryonalen Hühnchenretina deutete darauf hin, dass die retinale Musterbildung einen fundamentalen Beitrag zu dem beobachteten Unterschied des Faszikelmusters dorsaler und ventraler RGC-Axone leistet. Wichtige Faktoren bei der Etablierung der axialen Polarität sind der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor cVax, der in der ventralen Hälfte der sich entwickelnden Retina exprimiert wird (Schulte et al., 1999) und der T-Box-Transkriptionsfaktor cTbx5, dessen Expression auf die dorsale Hälfte beschränkt ist (Schulte et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Die retrovirale Fehlexpression von *cVax* über die gesamte Retina ventralisiert die mRNA-Expressionsprofile nachgeschalteter *EphB*-Gene und hemmt die mRNA-Expression von *Ephrin-B*-Genen in der dorsalen Retina (Schulte et al., 1999). Retrovirale Fehlexpression von *cVax* verursacht auch eine Fehlverteilung von Stäbchenphotorezeptoren (Schulte et al., 2005) sowie eine fehlerhafte retinotektale Projektion dorsaler Ganglienzellaxone (Schulte et al., 1999).

Um zu untersuchen, ob der DV-Regionalisierungsfaktor cVax möglicherweise auch zur Bildung des DV-Axonfaszikelmusters in der Hühnchenretina beiträgt, wurde cVax mit Hilfe des replikationskompetenten Retrovirus RCASBP(B) („replication-competent avian virus with splice acceptor"; Morgan and Fekete, 1996; Petropoulos and Hughes, 1991) über die gesamte Retina ektopisch exprimiert. Präparate ganzer E6,5-Hühnchenretinae wurden mit dem Neurofilament-Antikörper RMO270 und mit dem virusspezifischen Antikörper p27 gefärbt (Retinae, n = 8/8). Anschließend wurden die Faszikelmuster in der dorsalen und ventralen NFL mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops untersucht (Abb. 15). Aufgrund der erzwungenen Expression von cVax bildeten die dorsalen RGC-Axone dickere Bündel (A), welche denen in der ventralen NFL morphologisch sehr ähnlich waren (B). Somit war die retrovirale Fehlexpression von cVax ausreichend, um das Axonfaszikelmuster der dorsalen NFL zu ventralisieren.

Auch die Retinapolarisierung entlang der TN-Achse steht unter der Kontrolle hierarchisch organisierter Moleküle. Die Transkriptionsfaktoren cFoxG1, SOHo1 und GH6, die gleichzeitig mit cVax und cTbx5 exprimiert werden, bestimmen maßgeblich die Regionalisierung der Augenanlage entlang der TN-Achse. Um zu prüfen, ob ein TN-Regionalisierungsfaktor die Bildung der DV-Axonfaszikelmuster beeinflußt und um auszuschließen, dass die Methode der retroviralen Fehlexpression von Regionalisierungsfaktoren an sich zu Änderungen des Faszikelmusters führt, wurde RCASBP(B)-*cFoxG1* in der sich entwickelnden Retina fehlexprimiert (Abb. 15). Diese Manipulation verursachte keine Änderung des beschriebenen DV-Unterschieds der retinalen Axonfaszikelmuster (D, E; Retinae, n = 3/3). Die Ventralisierung des Axonfaszikelmusters in der dorsalen NFL ist daher allein auf die Wirkung des fehlexprimierten cVax-Proteins zurückzuführen. Somit haben die retrovirale Fehlexpression und cFoxG1-Protein keinen Einfluß auf die Bildung des DV-Axonfaszikelmusters.

Die immunohistochemische Färbung von Präparaten ganzer Retinae mit dem Neurofilament-Antikörper markierte alle bestehenden RGC-Axone. Um die Bildung von Axonfaszikeln im Detail analysieren zu können, wurden in Explantaten von RCASBP(B)-*cVax*-infizierten E6,5-Hühnchenretinae kleinere Gruppen von RGC-Axonen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI markiert und anschließend mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht (Abb. 16). In uninfizierten Kontrollembryonen zogen dorsale und ventrale Axonfaszikel in parallellen Bahnen zur Papille (A, C; Retinae, n = 5/5). Obwohl dorsale Axone nach *cVax*-Fehlexpression auch zur Papille zogen, wuchsen sie in wellenförmigen Bahnen, die den Faszikeln eine „zopfförmige" Morphologie verliehen (B; Retinae, n = 6/6). Bei höherer Auflösung wurde ein periodisches Muster faszikulierender und defaszikulierender Axone in der dorsalen NFL beobachtet (B').

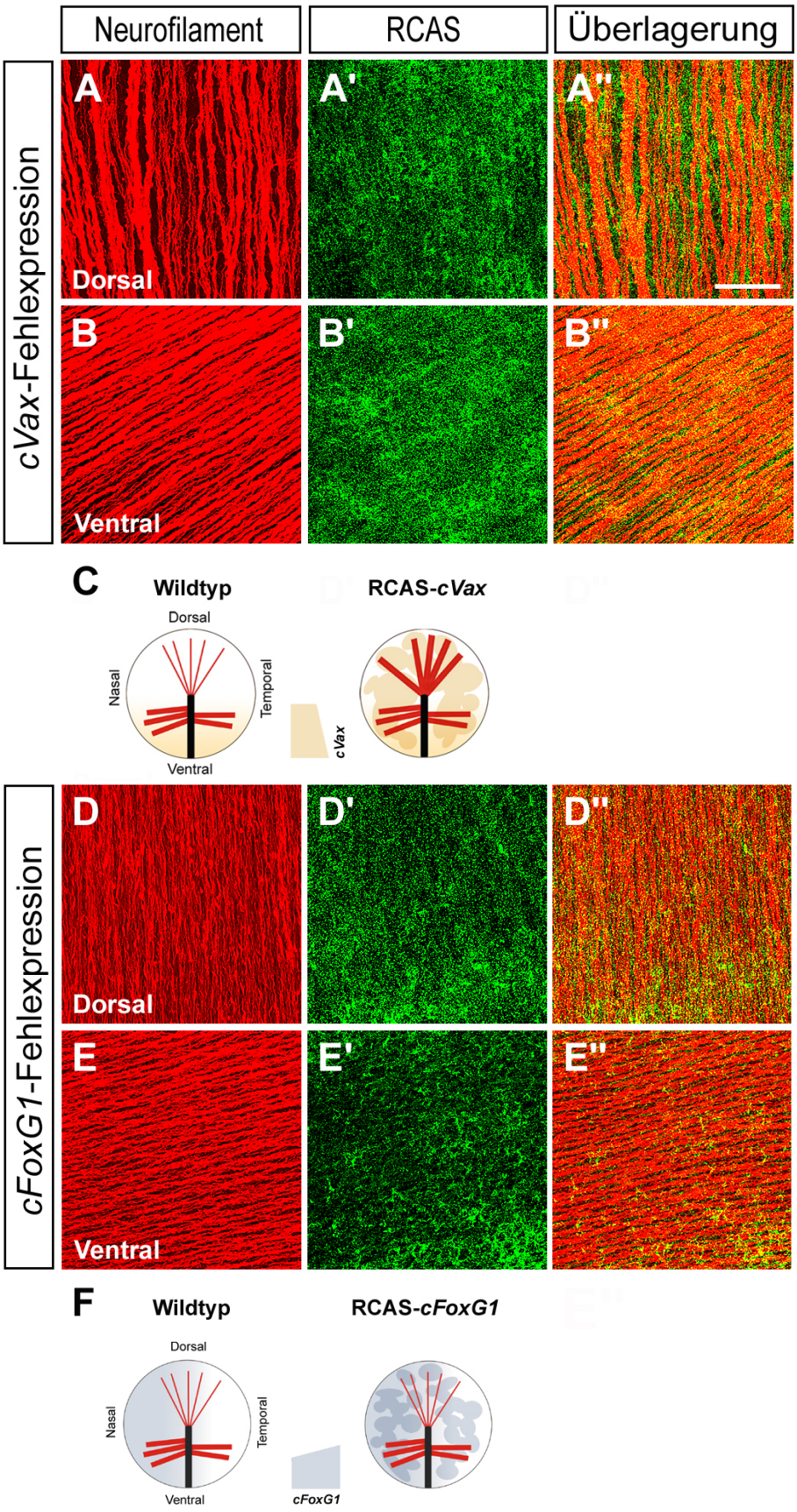


Abb. 15. Effekt der retroviralen Fehlexpression von *cVax* oder *cFoxG1* auf den DV-Unterschied der Axonfaszikelmuster in der embryonalen Hühnchenretina. *Fortsetzung auf der nächsten Seite*.

Abb. 15. RGC-Axone wurden mit einem Neurofilament-Antikörper gefärbt und RCAS mit einem virusspezifischen Antikörper nachgewiesen. (A-A''; B-B'') Phänotyp nach Fehlexpression von RCASBP(A)-*cVax*: in der dorsalen NFL bilden die Axone dickere Faszikel (A, A''), die den Bündeln in der ventralen NFL morphologisch sehr ähnlich sind (B, B''). (C) Schema des DV-Axonfaszikelmusters und *cVax*-Expressionsmusters in der Wildtyp-Retina (dorsal: dünne rote Linien, ventral: dicke rote Linien) und in der infizierten RCASBP(A)-*cVax* Retina (dorsal: dicke rote Linien, ventral: dicke rote Linien). (D-D'', E-E'') Phänotyp nach Fehlexpression von RCASBP(B)-*cFoxG1*: dorsale Axone bilden ein feines Faszikelmuster (D, D''), während ventrale Axone ein grobes Muster formen (E, E''). (F) Schema des DV-Axonfaszikelmusters und *cFoxG1*-Expressionsmusters in der Wildtyp-Retina (dorsal: dünne rote Linien, ventral: dicke rote Linien) und in der RCASBP(B)-*cFoxG1* infizierten Retina (dorsal: dünne rote Linien, ventral: dicke rote Linien). Maßstab, 50 µm (A-A''; B-B''; D-D'', E-E'').

Beispiele von RGC-Axonen, die nach *cVax*-Fehlexpression intraretinale Wegfindungsfehler zeigten, wurden in der Nähe der optischen Fissur gefunden (Retinae, n = 5/5). Anstatt auf ihrem Weg zur Papille in die Fissur einzuwandern, defaszikulierten viele der ventralen RGC-Axone und schlugen Wanderungsrichtungen ein, die sie von der Fissur wegführten (D). Bei höherer Auflösung wurden sogar einzelne Axone beobachtet, die ihre Bahn schätzungsweise um bis zu 160 Winkelgrad änderten (D').

Während der axialen Polarisierung der Retina ist das mRNA-Expressionsmuster von *cTbx5* räumlich auf eine dorsale Domäne beschränkt, die der mRNA-Expressionsdomäne von *cVax* gegenüberliegt (Schulte et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Peters und Cepko, 2002). *cVax* und *cTbx5* können sich gegenseitig unterdrücken, wenn sie ektopisch in der Hühnchenretina exprimiert werden (Schulte et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Die retrovirale Fehlexpression von *cVax* führte zur Ventralisierung der *EphB*-mRNA-Expressionsprofile, wobei die dorsale Expression der *Ephrin-B*-Gene unterdrückt wurde (Schulte et al., 1999). Im Gegensatz dazu führte retrovirale Fehlexpression von *cTbx5* durch in ovo-Elektroporation zur Dorsalisierung der *Ephrin-B*-mRNA-Expressionsprofile und zur Unterdrückung der Expression von *EphB*-Transkripten (Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Daher wurde auch der Effekt der retroviralen Fehlexpression von *cTbx5* oder $cTbx5^{en}$, einer Fusion der cTbx5-DNA-Bindedomäne und der Engrailed (en)-Repressor-Domäne von *Drosophila* (Rallis et al., 2003), auf die Bildung der retinalen Axonfaszikelmuster untersucht (Abb. 17). $cTbx5^{en}$ diente als dominant-negatives *cTbx5*-Allel, weil die Engrailed-Repressor-Domäne nach Bindung der T-Box-Domäne an regulatorische DNA-Elemente von cTbx5-Zielgenen die Expression dieser Zielgene unterdrückte (Rallis et al., 2003). Die $cTbx5^{en}$-Fehlexpression ventralisierte das Axonfaszikelmuster innerhalb der dorsalen NFL, ähnlich dem Phänotyp, der nach *cVax*-Fehlexpression beobachtet wurde (E; Retinae, n = 6/6). Überraschenderweise bewirkte die Fehlexpression von *cTbx5* jedoch keine Änderung des Faszikelmusters dorsaler RGC-Axone (B; Retinae, n = 4/4).

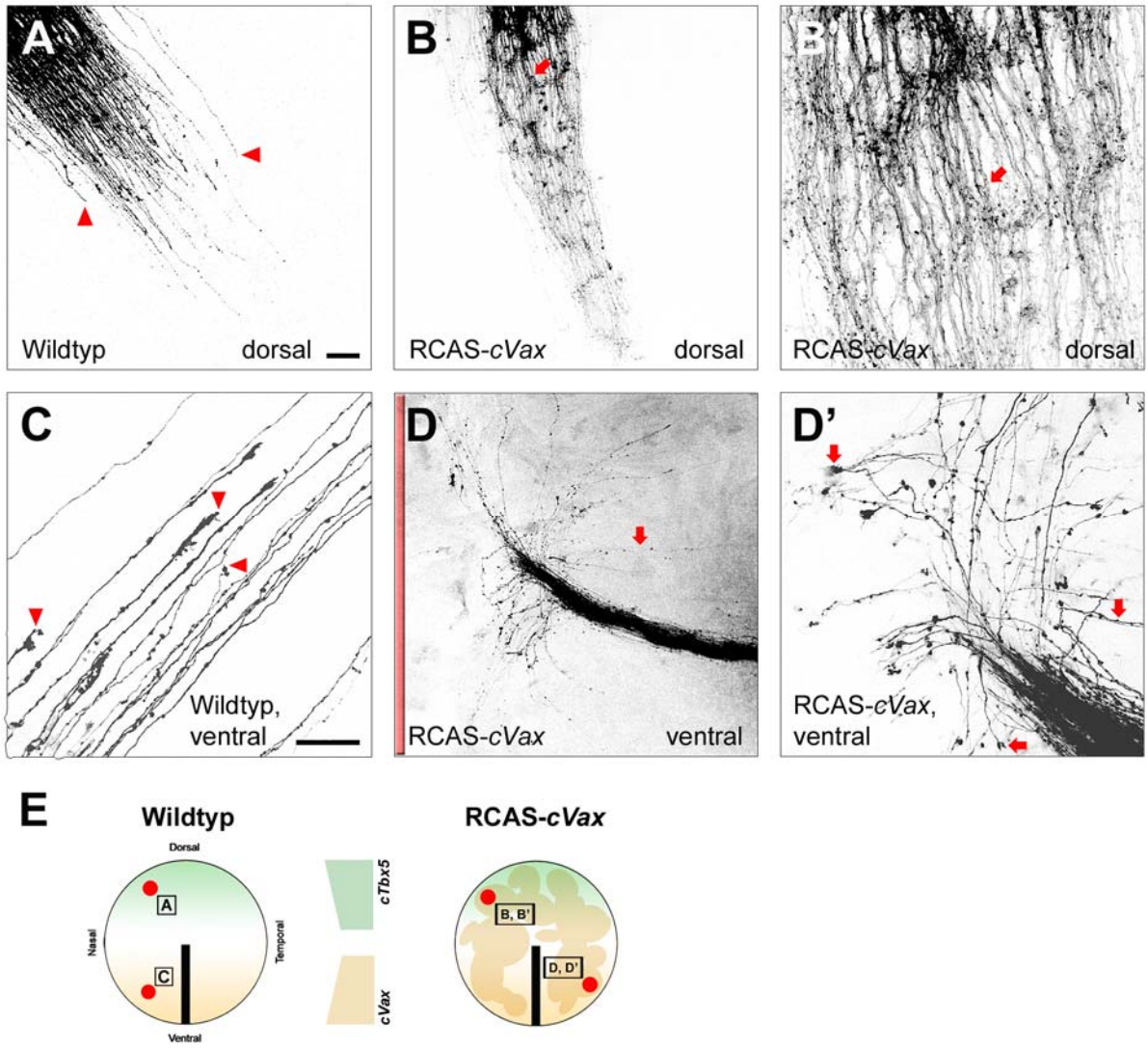


Abb. 16. Effekt der Fehlexpression von *cVax* auf die intraretinale Axonwegfindung in der embryonalen Hühnchenretina. (A-D') In Explantaten uninfizierter Kontrollretinae und RCASBP(B)-*cVax* infizierter E6,5-Hühnchenretinae wurden kleinere Gruppen von RGC-Axonen mit DiI markiert. (A, C) In der Wildtyp-Hühnchenretina ziehen die Axonfaszikel in der dorsalen (A) und ventralen NFL (D) in parallelen Bahnen zur Papille. (B-B') Unter erzwungener *cVax*-Expression ziehen dorsale Axonfaszikel (B) zwar auch in Richtung der Papille, wachsen jedoch in wellenförmigen Bahnen, die den Faszikeln eine „zopfförmige" Morphologie verleihen. Bei höherer Auflösung (B') wurde ein periodisches Muster faszikulierender und defaszikulierender dorsaler Axone sichtbar (die beiden rote Pfeile kennzeichnen dieselbe Position im Faszikelmuster). (D-D') Beispiel ventraler Axone mit fehlerhafter Wegfindung in der Nähe der optischen Fissur (der rote Balken zeigt die ungefähre Position der Fissur an). Anstatt in die Fissur einzuwandern, defaszikulierten viele der Axone und schlugen Wanderungsrichtungen ein, die sie von der Fissur wegführten (Pfeil in D). Manche Axone änderten ihre Bahn schätzungsweise um bis zu 160 Winkelgrad (Pfeile in D'). (E) Schema der Expressionsmusters von *cVax* und *cTbx5* in der Wildtyp-Retina und in der RCASBP(A)-*cVax* infizierten Retina (die schwarzen Rahmen kennzeichnen die ungefähren Positionen der mikroskopischen Aufnahmen). Maßstab, 100 µm (A, B, D), 50 µm (B', C, D').