

Biologie

Transskriptomische Analyse der postnatalen Entwicklung der Rattenretina
in Bezug auf den kritischen Zeitpunkt der Augenöffnung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Uwe Schröer
aus Bocholt
-2006 -

Dekan:

Prof. Dr. N. Sachser

Erster Gutachter:

Prof. Dr. A. Püschel

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Dr. S. Thanos

Tag der mündlichen Prüfung:

11.09.2006

Tag der Promotion:

20.10.2006

Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RGZ juveniler Ratten (P14 - P24) in der Lage sind, axonale Fortsätze in großem Umfang spontan auszubilden. Die Ergebnisse zeigen, dass neben den bereits beschriebenen embryonalen und postnatalen Entwicklungsphasen auch eine „Augenöffnungsphase“ existiert, die das Auswachsen von Axonen triggert. Die funktionell gesteuerte Wachstumsphase von Axonen hält ca. eine Woche an, nämlich bis kurz nach dem Zeitpunkt der Erlangung einer kompletten Linsentransparenz (P21) und voller visueller Funktion. Danach wird das adulte Muster der Nichtregenerierbarkeit angenommen.

Die Expressionsprofile von GAP-43, Neurofilament und Rhodopsin wurden im Verlauf der postnatalen Maturation immunhistologisch bestimmt. Eine Abhängigkeit der Expression dieser Proteine vom Lichteinfall konnte nachgewiesen werden. Eine vorzeitige Lichtexposition führte zu einer früheren Expression von Neurofilament und Rhodopsin in der juvenilen Retina. Eine Lichtdeprivation führte hingegen zu einer Herunterregulation beider Proteine als Hinweis ihrer funktionsabhängigen Expression.

Um die lichtinduzierbaren Proteinexpressionsprofile zu untersuchen wurde mittels der 2D-Gelelektrophorese und MALDI das Proteom der Retina analysiert. Erstmals in diesem Zusammenhang wurden lichtunabhängig und lichtabhängig exprimierte Proteine identifiziert. Während die Expression von Tolkin und Trax lichtunabhängig zu sein scheint, ist die Expression von Pin1, Recoverin, PEBP sowie poly(A)BP lichtabhängig. Mit Hilfe der Real time PCR konnte gezeigt werden, dass die Expressionen von Pin1 und Trax während der Phase des axonalen Wachstums herunter reguliert sind.

Durch die visuelle Erfahrung erfolgt die Aktivierung der Photorezeptoren und des neuronalen Calcium Sensors Recoverin als Marker der Rezeptoren. Die Membrangestützte Reizerfassung der Photorezeptoren setzt die Expression von Proteinen der Membranbiogenese, wie beispielsweise dem PEBP, voraus. Das poly (A) BP ist in die Translation involviert und könnte somit bezüglich der entwicklungsbedingten Umstellung des Proteoms von Bedeutung sein. Daneben kann auch das Trax in die Translation involviert sein und mit der mRNA interagieren. Die sich entwickelnden Zellen der Retina durchlaufen verschiedene Stadien des Zellzyklus, der auch einer Regulation durch Pin1 unterliegen kann.

Zusammenfassung

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass kritische Phasen der Entwicklung der Retina mit plastischen Vorgängen verbunden sind, die man als *sprouting* oder wie im konkreten Fall als axonale Elongation sehen kann. Begleitet und/oder kontrolliert werden diese Vorgänge von zellulären und molekularen Veränderungen, die durch die hier entdeckten Proteine teilweise gesteuert werden könnten.

Abkürzungsverzeichnis

αacry	αA crystallin
Alst	Altersstufe
ÄNS	äußere nukleäre Schicht
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ÄPS	äußere plexiforme Schicht
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	amakrine Zellen
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
bHLH	basic helix-loop-helix
bp	base pair
BSA	Rinderserumalbumin
BZ	Bipolarzellen
CAM	cellular adhesion molecule
cAMP	zyklische Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	embryonaler Tag
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EtOH	Ethanol
FLE	frühe Lichtexposition
for	forward
g	Erdbeschleunigung
GAP-43	growth associated protein 43
GCL	ganglion cell layer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GZ	Ganglienzellen
GZS	Ganglienzellschicht
h	Stunde
HD	homeodomain
HZ	Horizontalzellen
INS	innere nukleäre Schicht
IPS	innere plexiforme Schicht
kb	kilo bases
kDa	kilo Dalton
KLE	keine Lichtexposition
l	Liter
LB	Luria Broth Medium
LBK	Luria Broth Medium mit Kanamycin
LIF	leukaemia inhibitory factor
M	Mol
MALDI-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
mc	monoclonal
mcs	multi cloning site
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

Abkürzungsverzeichnis

mm	Millimeter
mM	Millimol
MZ	Müller-Zellen
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
OMgp	Oligodendrocyt-Myelin Glycoprotein
P	postnataler Tag
pc	polyclonal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEBP	phosphatidylethanolamine-binding protein
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
Pin1	Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase NIMA-interacting 1
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PNS	peripheres Nervensystem
poly(A)BP	poly (A) binding protein
PPI	Peptidyl-Prolyl Isomerase
RABP	retinoic acid binding protein
rev	reverse
RGZ	retinale Ganglienzellen
RNasp30	RNase P p30
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
shh	sonic hedgehog
Stdaw	Standardabweichung
TAE	Tris/EDTA/Eisessig
TBST	tris-buffered saline-Tween
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
T iv	Tage <i>in vitro</i>
Trax	Translin-assoziiertes Faktor X
Tris	(tris-(Hydroxymethyl)aminomethan)
St	Stäbchen
stand	endogener Standard
U	Units
UV	ultra Violett
V	Volt
Za	Zapfen
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die Reifung der Retina	1
1.1.1. Die Diversifizierung retinaler Neuroblasten.....	1
1.1.2. Die Migration retinaler Vorläuferzellen.....	6
1.1.3. Die Entwicklung synaptischer Verbindungen.....	10
1.2. Die Axogenese der RGZ	12
1.3. Abnahme der Wachstumsfähigkeit von Axonen in der maturen Retina	15
1.3.1. Fehlendes intrinsisches Regenerationspotential der RGZ.....	16
1.3.2. Mangel an neurotrophischen Faktoren.....	19
1.3.3. Inhibitorische Faktoren im adulten ZNS.....	20
1.4. Makrophagen, Maturation und axonales Wachstum	22
1.5. Ziele der Arbeit	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Eingriffe an Versuchstieren	25
2.1.1. Versuchstiere.....	25
2.1.2. Chemikalien und Lösungen.....	25
2.1.3. Geräte und Material	26
2.1.4. Anästhesie, postoperative Beobachtung und Tötung der Versuchstiere.....	27
2.1.5. Axotomie des <i>Nervus opticus</i>	27
2.1.6. Retrograde Färbung und Transfektion retinaler Ganglienzellen.....	28
2.2. Gewebe- und Zellkultur	29
2.2.1. Retinale Gewebekultur.....	29
2.2.1.1. Chemikalien, Kulturmedien und Puffer.....	29
2.2.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterial.....	31
2.2.1.3. Beschichtungen der Petripermschalen.....	31

2.2.1.4.	Explantation der Retinae.....	32
2.2.1.5.	Kultivierung der Retina.....	32
2.2.1.6.	Erstellung dissoziierter retinaler Zellkulturen.....	33
2.2.1.7.	Transfektion von dissoziierten retinalen Zellen und retinalem Gewebe	33
2.2.2.	Zellkultur.....	34
2.2.2.1.	Chemikalien, Medien und Puffer.....	34
2.2.2.2.	Geräte.....	34
2.2.2.3.	Kultivierung von Zellen.....	35
2.2.2.4.	Transfektion der RGC-5 Zellen.....	35
2.3.	Immunhistologische Untersuchungen	36
2.3.1.	Material.....	36
2.3.2.	Erstellen der Kryostatschnitten.....	38
2.3.3.	Immunhistochemische Färbung der Kryostatschnitte.....	38
2.3.4.	Immunhistochemische Färbung von Retina-Gesamtpräparaten.....	39
2.4.	Biochemische Verfahren	39
2.4.1.	Material.....	39
2.4.1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	39
2.4.1.2.	Geräte und Zubehör.....	41
2.4.2.	Proteinbestimmung.....	42
2.4.3.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
2.4.3.1.	Lösungen.....	43
2.4.3.2.	Gießen der Gele.....	44
2.4.3.3.	Probenaufbereitung, Probenauftrag und Elektrophorese- bedingungen.....	45
2.4.3.4.	Coomassie-Färbung der Gele.....	45
2.4.4.	Western Blotting.....	46
2.4.4.1.	Proteintransfer.....	46
2.4.4.2.	Detektion und immunologischer Nachweis.....	47
2.4.5.	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE).....	48
2.4.5.1.	Lösungen.....	49
2.4.5.2.	Probengewinnung.....	50
2.4.5.3.	Probenaufbereitung.....	50
2.4.5.4.	Probenauftrag und Rehydratation der IPG-Streifen.....	50
2.4.5.5.	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension).....	51
2.4.5.6.	Gießen der Gele.....	51
2.4.5.7.	Äquilibrierung der fokussierten IPG-Streifen.....	52

2.4.5.8. Kontinuierliche SDS-Polacrylamid-Gelelektrophorese (2.Dimension),.....	52
2.4.5.9. Färbung der Gele.....	53
2.4.6. Massenspektrometrische Proteinanalyse (MALDI-MS).....	54
2.5. Molekularbiologische Verfahren.....	54
2.5.1. Chemikalien und Lösungen.....	54
2.5.2. <i>E. coli</i> Stamm.....	56
2.5.3. Restriktionsenzyme, Ligase und Polymerase.....	56
2.5.4. Primer und Vektoren.....	57
2.5.5. Real time PCR Assays.....	57
2.5.6. DNA- und RNA-Kits.....	59
2.5.7. Geräte.....	59
2.5.8. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	60
2.5.8.1. Präparation mit Plasmid Mini und Midi Kit.....	60
2.5.8.2. Präparation mit PrestoSpin D Plasmid Midi 100L.....	60
2.5.9. Präparation von RNA aus Retina und Gehirn.....	60
2.5.10. Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	60
2.5.10.1. Bandenextraktion mit dem QIAEX II Gel Extraktion Kit.....	60
2.5.10.2. Bandenextraktion mit dem UltraPrep Gel-Ex Kit.....	61
2.5.10.3. Aufreinigung von DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit.....	61
2.5.11. Auftrennung von gesamt RNA über Harnstoff-Agarose-Gele.....	61
2.5.12. Reverse Transkriptase Reaktion.....	61
2.5.13. Real time PCR.....	62
2.5.14. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	63
2.5.15. Restriktion und Ligation.....	64
2.5.16. Transfektion von <i>E. coli</i> Top10F' Zellen.....	64
3. Ergebnisse.....	65
3.1. Quantifizierung des axonalen Wachstums im Verlauf der postnatalen Augenentwicklung.....	65
3.2. Quantifizierung des axonalen Wachstums nach Verlagerung des Zeitpunktes der Augenöffnung.....	68
3.3. Immunhistologische Untersuchungen an der maturierenden Retina.....	70
3.4. Auswirkungen der experimentellen Veränderung der Augenöffnung	

auf die Retina	73
3.5. Analyse der Proteinprofile mittels 2D-Gelelektrophorese	75
3.5.1. Analyse der Proteinprofile von nicht kultivierten Retinae.....	75
3.5.2. Analyse der Proteinprofile von kultivierten Retinae.....	78
3.5.3. Einfluss des Lichts auf die Proteinprofile.....	80
3.6. Densitometrische Quantifizierung	82
3.7. Expressionsprofile auf mRNA-Ebene	84
3.8. Vektorkonstruktion und Klonierung	85
3.9. <i>In vitro</i> Transfektionen	90
3.9.1. Transfektion der RGC-5 Zellen.....	90
3.9.2. Transfektion dissoziierter retinaler Zellen.....	91
3.9.3. Lipidtransfektion retinaler Explantate.....	92
3.10. <i>In vivo</i> Transfektion	93
4. Diskussion	96
4.1. Quantifizierung des axonalen Wachstums während der postnatalen Entwicklung der Retina	96
4.2. Quantifizierung des axonalen Wachstums nach Verlagerung des Zeitpunktes des Augenöffnens	99
4.3. Immunhistologische Untersuchungen	104
4.4. Immunhistologische Untersuchungen nach Verlagerung des Zeitpunktes der Augenöffnung	108
4.5. Analyse der Proteinprofile mittels 2D-Gelelektrophorese	110
4.5.1. Pin1.....	110
4.5.2. Trax.....	113
4.5.3. tolkin.....	115
4.5.4. Retinoic acid binding protein (RABP).....	118
4.5.5. Phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP).....	118
4.5.6. aA-Crystallin.....	119
4.5.7. Recoverin.....	120
4.5.8. poly (A) binding protein.....	121
4.5.9. RNase P Protein 30.....	121
4.6. Quantifizierung von mRNA mittels Real time PCR.....	122
4.7. Transfizierbarkeit von RGZ.....	123

5. Zusammenfassung	128
6. Anhang	130
6.1. Quantifizierung des axonalen Wachstums	130
6.1.1. Axonales Wachstum nicht-manipulierter Retinae (Kapitel 3.1).....	130
6.1.2. Axonales Wachstum kultivierter Retinae (Kapitel 3.2).....	131
6.2. Rohdaten der Real time PCR (Kapitel 3.7)	131
6.2.1. Regulation des GAP-43 Gens.....	132
6.2.2. Regulation der Pin1 und Trax Gene.....	134
6.3. Rohdaten der Sequenzierung des pEGFP-N2/GAP-43 Konstrukts	136
6.3.1. Sequenzierung mit Forward-Primer (Kapitel 3.8).....	136
6.3.2. Sequenzierung mit Reverse-Primer (Kapitel 3.8).....	138
6.4. Verwendete Längenmarker	140
6.4.1. Längenmarker bei den proteomischen Untersuchungen.....	140
6.4.2. Längenmarker bei den molekularbiologischen Untersuchungen.....	140
7. Literatur	141

1. Einleitung

1.1 Die Reifung der Retina

Die Retina entwickelt sich wie das gesamte neuronale System der Vertebraten aus dem ektodermalen Keimblatt durch primäre und sekundäre Ausstülpung des Neuralrohrs. Die Entwicklung der Retina lässt sich im Wesentlichen auf drei Prozesse reduzieren.

- I) **Diversifizierung:** Zunächst werden die entsprechenden Zelltypen aus dem pluripotenten einschichtigen Neuroepithel gebildet. Noch vor der Migration der Vorläuferzellen exprimieren diese Markerproteine, die spezifisch für den jeweiligen Zelltypus sind (Livesey und Cepko, 2001).
- II) **Migration:** Im Folgenden migrieren die Vorläuferzellen an ihre endgültige Position im retinalen Gefüge.
- III) **Vernetzung:** Nachfolgend werden die notwendigen Kontakte zu anderen Zellen hergestellt (Horsburgh und Sefton, 1987; Galli-Resta, 2002).

1.1.1 Die Diversifizierung retinaler Neuroblasten

Die Diversifizierung der jeweiligen Zelltypen der Retina beginnt mit der Bildung der retinalen Ganglienzellen (RGZ), gefolgt von den Horizontalzellen, den Stäbchen und den amakrinen Zellen. Die Ausbildung von Müller-Zellen, Bipolarzellen und Zapfen schließt die Diversifizierung ab (LaVail et al., 1991; Cepko et al., 1996). Die Entstehungsphasen der einzelnen Zelltypen überschneiden sich (LaVail et al., 1991; Stiemke und Holyfield, 1995), so dass es sich hierbei um teils parallel verlaufende Entwicklungsprozesse handelt. Diese gleichzeitige Entwicklung unterschiedlichster Zellarten kann nur erfolgen, wenn ein exakter Ablauf zu Grunde liegt, der eine korrekte Entwicklung der einzelnen Vorläuferzellen garantiert. Die differenzierten Zellen entwickeln sich aus der Population der undifferenzierten Vorläuferzellen im Neuroepithel des optischen Vesikels, wobei sie einem zentral-peripheren Entwicklungsgradienten von der Insertionsstelle des optischen Nervs folgen (Prada et al., 1991; Hu und Easter, 1999).

Die funktionsspezifische Diversifizierung der sechs unterschiedlichen neuronalen Zelltypen und der Gliazellen der Retina wird durch extrinsische und intrinsische Faktoren

beeinflusst. Hierbei können aus einer pluripotenten retinalen Vorläuferzelle unterschiedliche Zelltypen hervorgehen (Wetts und Fraser, 1988; Turner et al., 1990). Die Kompetenz-Theorie der retinalen Diversifizierung besagt, dass die retinalen Vorläuferzellen eine zeitabhängige Abfolge von determinierten Kompetenzstadien durchlaufen. Das Erreichen der zeitlich aufeinander folgenden Stadien wird durch intrinsische Faktoren beeinflusst. Haben die Vorläuferzellen eine entsprechende Kompetenzstufe erreicht, so können sie nur bestimmte Typen postmitotischer retinaler Zellen ausbilden (Austin et al., 1995; Belliveau und Cepko, 1999). Jedes der aufeinander folgenden Kompetenzstadien zeichnet sich durch die Diversifizierung der Vorläuferzellen zu einer bestimmten Subpopulation retinaler Zelltypen aus, die durch positive oder negative extrinsische Faktoren beeinflusst wird (Cepko et al., 1996).

Retinale Zellen der unterschiedlichen Kompetenzstadien verfügen über unterschiedliche intrinsisch festgelegte Entwicklungsmöglichkeiten. Dies konnte im Rahmen von heterochronischen Transplantationsexperimenten bei der Ratte gezeigt werden. Wurden retinale Vorläuferzellen eines mittleren embryonalen Kompetenzstadiums in ein Auge transplantiert, das sich in einem späten Stadium befand, so formten sich aus den transplantierten Zellen amakrine Zellen und Stäbchen, während die umgebenden Zellen sich zu Zapfen entsprechend ihres späten Kompetenzniveaus differenzierten (Belliveau und Cepko, 1999). Das veränderte retinale Gefüge konnte keinen Einfluss auf die Entwicklung der transplantierten Zellen ausüben.

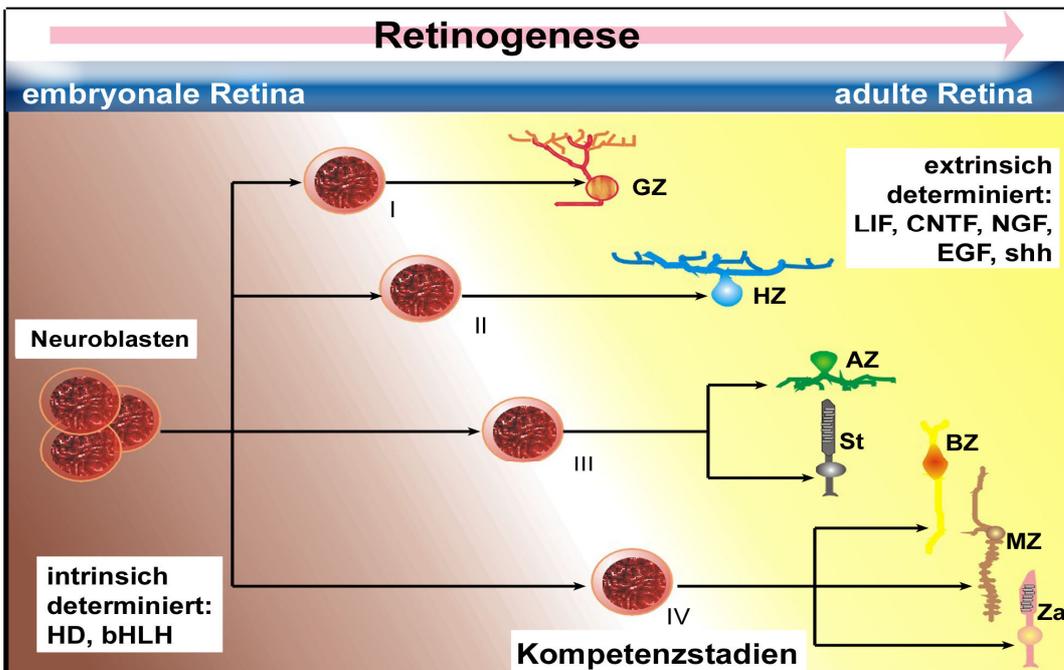


Abb. 1: Graphische Darstellung der Kompetenztheorie

Die einzelnen Kompetenzstadien werden durch intrinsische Faktoren bestimmt. Extrinsische Faktoren führen dann zur weiteren Differenzierung der Vorläuferzellen.

Wie erfolgt nun die Diversifizierung der retinalen Vorläuferzellen eines Kompetenzstadiums? Für die Differenzierung zu bestimmten postmitotischen Zelltypen werden extrinsische Signale diskutiert. Extrinsische Faktoren werden von unterschiedlichen postmitotischen Neuronen sekretiert und führen zu einer Inhibition bestimmter Differenzierungsprozesse der umgebenden retinalen Vorläuferzellen (Livesey und Cepko, 2001). Diese Faktoren können auf zwei unterschiedliche Weisen die anderen Vorläuferzellen inhibieren.

Zum einen wirken diese Faktoren im Fall der amakrinen Zellen bevor die Vorläuferzellen die Metaphase erreicht haben (Belliveau und Cepko, 1999). Zum anderen üben diese Faktoren einen Einfluss auf postmitotische Zellen aus. So kann durch die Applikation von ciliary neurotrophic factor (CNTF) oder von leukaemia inhibitory factor (LIF) die Diversifizierung von bereits postmitotischen, nicht vollständig ausdifferenzierten Vorläuferzellen zur Bildung von Bipolarzellen bzw. Müller-Zellen umgeleitet werden (Ezzeddine et al., 1997). Diese postmitotische Re-Diversifizierung ist jedoch im Rahmen der nativen Entwicklung der Retina eine Ausnahme.

Die nicht manipulierte Diversifizierung der Vorläuferzellen beginnt mit der Ausbildung von RGZ in einer frühen Phase der embryonalen Entwicklung. So wurde gezeigt, dass sonic hedgehog (*shh*) während dieser Phase in der embryonalen Retina zu einer Ausbildung von RGZ führt, die wiederum *shh* sekretieren und somit die Vorläuferzellen in der direkten Umgebung zur Diversifizierung zu RGZ veranlassen (Zhang und Yang; 2001). Dieser Mechanismus steht in Übereinstimmung mit der vom Zentrum zur Peripherie wellenförmig verlaufenden Diversifizierung der retinalen Vorläuferzellen (Marquardt, 2003). Erreichen die gebildeten RGZ ein postmitotisches Stadium, so geht von ihnen eine negative Regulation auf ihre Umgebung hinsichtlich der Bildung weiterer RGZ aus. Der nerve growth factor (NGF) scheint hierin involviert zu sein (McCabe et al., 1999). Weitere extrinsische Faktoren sind der transforming growth factor alpha (TGFA), der epidermal growth factor (EGF) aber auch die Aminosäure Taurin, die eine Diversifizierung von Vorläuferzellen bis zur Ausbildung von Stäbchen lenkt (Reh und Levine, 1998; Cepko, 1999).

Der Theorie der Kompetenzstadien zufolge erfolgt die Diversifizierung der Vorläuferzellen einer Kompetenzstufe überwiegend durch extrinsische Faktoren, während der Eintritt in die jeweiligen Stadien durch intrinsische Faktoren determiniert wird (Livesey und Cepko, 2001). Diese intrinsischen Regulationsmechanismen der Diversifizierung retinaler Vorläuferzellen sind komplex und noch nicht vollends geklärt.

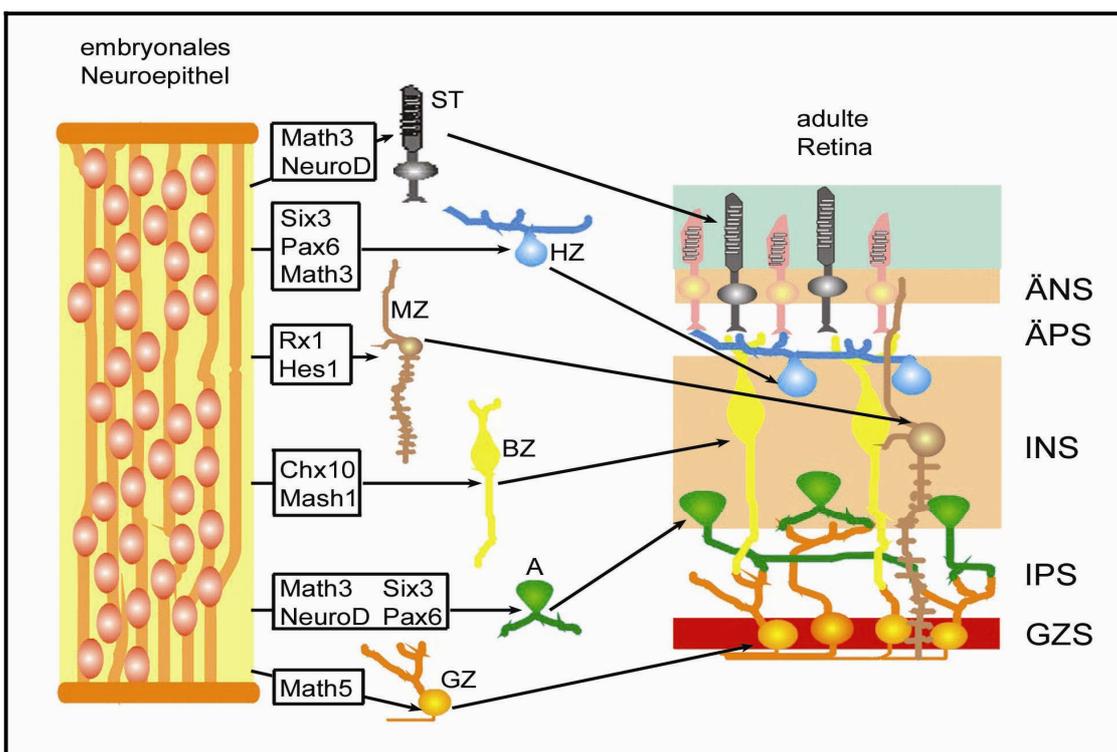
Die Komplexität wird anhand der Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellen im Neuroepithel des optischen Bechers deutlich. Nur ein geringer Anteil dieser Zellen sind reine Stammzellen. Erfolgt eine *in vitro* Kultivierung der Retina im embryonalen Stadium, so lassen sich nur wenige Stammzellen identifizieren, während die Masse der Vorläuferzellen einer direkten Spezialisierung unterliegt (Kelley et al., 1995; Jensen und Raff, 1997). Somit ist die embryonale Retina ein heterogenes Gefüge, das über wenige Stammzellen, jedoch über zahlreiche geprägte Vorläuferzellen verfügt (Anderson, 2001). Diese geprägten Vorläuferzellen exprimieren bereits Syntaxin und VC1.1, Proteine, die charakteristisch für amakrine Zellen und Stäbchen sind (Alexiades und Cepko, 1997). Darüber hinaus konnten drei Systeme identifiziert werden, die einen wesentlichen intrinsischen Einfluss auf die Diversifikation ausüben. Hierbei handelt es sich um das Notch/Delta-System, die homeodomain (HD) Gene, sowie um die basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren (Cepko, 1999; Guillemont, 1999).

In der embryonalen Retina konnten mehrere bHLH Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Gruppen von Vorläuferzellen identifiziert werden, wobei die Expression des jeweiligen Faktors oftmals die Diversifizierung der Vorläuferzellen zu einem bestimmten retinalen Zelltypen impliziert (Wang et al., 2001; Inoue et al., 2002). Des Weiteren kann die Expression von bHLH Faktoren dazu führen, dass neuronale Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus ausgeschieden werden (Guillemot, 1999). Untersuchungen an Mäusen hatten ergeben, dass die Entstehung von amakrinen Zellen die korrekte Expression der bHLH Faktoren Math3 und NeuroD voraussetzt (Inoue et al., 2002). Der bHLH Faktor NeuroD stellt hier einen Sonderfall dar, da abhängig vom Zeitpunkt der Expression dieses Faktors verschiedene Spezialisierungen der jeweiligen retinalen Vorläuferzellen zu unterschiedlichen neuronalen Zellen erfolgen können. Dabei hat die Kinase GSK β offensichtlich großen Einfluss auf diese Entwicklung (Moore et al., 2001; Ohnuma et al., 2002).

Wird die Expression des Math5 Gens unterbunden, so zeichnet sich eine nahezu vollständige Inhibition der RGZ Differenzierung ab (Wang et al., 2001). Math5 führt zu einer Ausbildung von RGZ, indem dieser Faktor die Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors, dem Brn3b Faktor, aktiviert (Liu et al., 2001; Wang et al., 2001). Brn3b als Transkriptionsfaktor ist essentiell für die terminale Differenzierung der RGZ (Gan et al., 1996). Die Expression der bHLH Faktoren erfolgt in bestimmten Zellverbänden, während benachbarte Bereiche des Neuroepithels nicht die gleichen Faktoren exprimieren. Diese lokal begrenzten Expressionsmuster entstehen durch eine laterale Hemmung, die durch das Notch/Delta System hervorgerufen wird (Artavanis-

Tsakonas et al., 1999; Perron und Harris, 2000). bHLH Faktoren bilden Heterodimere aus, die ebenfalls Einfluss auf die Transkription ausüben. Dies ist der Fall bei einem Heterodimer aus Mash1 und dem ubiquitär exprimierten Faktor E47, wobei das gebildete Heterodimer als Transkriptionsaktivator dient (Johnson et al., 1992). Der Effektor Hes1 des Notch-Systems kann als Transkriptionsrepressor dem Mash1/E47 Heterodimer entgegenwirken, indem es zum einen den Promotorbereich des Mash1 Gens und zum anderen essentielle Coaktivatoren blockiert (Sasai et al., 1992). Hes1 kann durch eine Heterodimerisierung mit Hes6 inaktiviert werden, so dass es keine transkriptionell reprimierende Funktion mehr erfüllen kann (Bae et al., 2000) Dadurch wird die Transkription neurogener bHLH Faktoren nicht weiter inhibiert (Koyano-Nakagawa et al., 2000).

Die HD Transkriptionsfaktoren Pax6, Rx1, Six3, Six6, Lhx2 sowie Otx2 konnten in den retinalen Neuroepithelien verschiedenster Vertebraten nachgewiesen werden (Walther und Gruss, 1991; Mathers et al., 1997; Kenyon et al., 2001). So handelt es sich z. B. bei den Faktoren Pax6 und Six3 um stark konservierte Elemente, die einen ausgeprägten Einfluss auf die retinale Entwicklung haben (Gehring und Ikeo, 1999; Ashery-Padan und Gruss, 2002). Verschiedene Tiermodelle zeigten die Relevanz dieser HD Transkriptionsfaktoren auf. Mäuse, die aufgrund einer Deletion keinerlei Rx1, einen weiteren HD Faktor, mehr exprimierten, wiesen keinen sekundären Invaginations-Sulcus auf (Mathers et al., 1997). Mäuse, deren Pax6 und Lhx2 Leserahmen vollständig deletiert worden waren, wiesen primäre optische Vesikel auf, die sich nicht weiter zum sekundären optischen Becher entwickelten (Grindley et al., 1995; Porter et al., 1997).



vorherige Seite:

Abb. 2: Differenzierung retinaler Zellen durch intrinsische Faktoren

Erläuterung siehe Text. (ÄNS: äußere nukleäre Schicht, ÄPS: äußere plexiforme Schicht, INS: innere nukleäre Schicht, IPS: innere plexiforme Schicht, GZS: Ganglienzellschicht)

Im Falle der Maus erfolgt die Expression des Pax6 Gens während der gesamten Entwicklung der Retina, wobei sich das Expressionsmuster dieses Gens im gesamten retinalen Gefüge mit der Zunahme postmitotischer Zellen verändert: In einigen Zellen wird die Expression herunter reguliert, während sie in anderen Zellen konstant bleibt (Marquardt und Gruss; 2002). Darüber hinaus wird Pax6 in adulten amakrinen Zellen exprimiert (Belecky-Adams et al., 1997) Wird eine Deletion des Pax6 Gens im distalen Bereich des optischen Bechers herbeigeführt, so bilden sich aus den retinalen Vorläuferzellen in diesem Bereich fast ausschließlich amakrine Zellen (Marquardt et al., 2001).

Die Gruppen der HD Faktoren und bHLH Transkriptionsfaktoren sollten bezüglich der retinalen Entwicklung nicht ausschließlich getrennt voneinander betrachtet werden, da es im Zuge der Entwicklung zu Interaktionen zwischen den Faktoren beider Gruppen kommt. Die parallele Expression des bHLH Faktors NeuroD, des Faktors Math3, sowie der HD Faktoren Pax6 bzw. Six3 führt zur Ausbildung von amakrine Zellen, während die singuläre Expression der jeweiligen Faktoren nicht zu diesem Ergebnis führt (Inoue et al., 2002). Ein weiterer HD Faktor ist Chx10, dessen Expression relevant für die Differenzierung von Bipolarzellen ist (Burmeister et al., 1996). Die alleinige Expression von Mash1 oder Math3 erwies sich nicht als ausreichend, um aus retinalen Vorläuferzellen Bipolarzellen entstehen zu lassen. Erst die Coexpression eines dieser bHLH Transkriptionsfaktoren mit Chx10 führte zur Entwicklung von Bipolarzellen (Hatekayama et al., 2001).

1.1.2 Die Migration retinaler Vorläuferzellen

Die Migration der retinalen Zellen ist notwendig, da die Positionen der Zellen im embryonalen Neuroepithel nicht mit denen in der adulten Retina übereinstimmen. Die adulte Retina weist eine laminaire Struktur auf, die sich vom Glaskörper in Richtung des Pigmentepithels in die folgenden Zellschichten einteilen lässt:

- I. Nervenfaserschicht bestehend aus den Axonen der RGZ und Astrozyten sowie aus Fortsätzen der Müller-Zellen;

- II. RGZ-Schicht bestehend aus RGZ, amakrinen Zellen und Astrozyten;
- III. innere plexiforme Schicht bestehend aus Fortsätzen der Bipolarzellen, der amakrinen Zellen und der Ganglienzellen,
- IV. innere nukleäre Schicht zusammengesetzt aus amakrinen Zellen, Horizontalzellen, Bipolarzellen und Müller-Zellen,
- V. äußere plexiforme Schicht bestehend aus dendritischen Fortsätzen der Bipolarzellen und Horizontalzellen;
- VI. äußere nukleäre Schicht gebildet aus den Somata der Photorezeptoren;
- VII. Die äußerste Schicht der Retina besteht aus den äußeren Segmenten der Photorezeptoren;

Diese schichtweise Strukturierung der Retina lässt entsprechende laminare Bereiche für neuronale Zellen bestimmter Morphologie erkennen (Wässle und Boycott, 1991; Masland, 1996). Diese strikte Anordnung der neuronalen Zellen in distinkten Schichten fördert die serielle Verarbeitung eingehender optischer Reize, wobei die Anordnung und Vernetzung der retinalen Zellen innerhalb einer Schicht die parallele Signalverarbeitung ermöglicht.

Wie entsteht diese funktionale Strukturierung der Retina? Die frühe postnatale Retina der Ratte lässt ein homogenes Neuroepithel erkennen, das keine laminare Strukturierung aufweist. Die jeweiligen Vorläuferzellen exprimieren Markerproteine, die für den späteren differenzierten Zelltypus spezifisch sind, wobei diese Expression noch vor der Ausbildung der endgültigen laminaren Struktur der Retina erfolgt (Livesey und Cepko, 2001). Diese Expression der zellspezifischen Marker erfolgt unabhängig von der Migration (Neumann, 2001). Vor und während der Migration der retinalen Zellen werden keine Synapsen ausgebildet (Horsburgh und Sefton, 1987).

Die vertikale Migration der retinalen Neurone unterscheidet sich im Wesentlichen von den Migrationsmechanismen anderer Zellen des ZNS, wie beispielsweise der Migration kortikaler Neurone. So sind keine radialen Gliazellen vorhanden, entlang derer die retinalen Vorläuferzellen in die entsprechenden Schichten migrieren könnten (Hatten, 1999). Im Falle der retinalen Migration erfolgt vielmehr eine Positionierung einiger Zelltypen in den entsprechenden laminaren Bereichen im Zuge einer zweistufigen Bewegung. Diese Weise der Migration wurde für Horizontalzellen (Reese et al., 1999), für RGZ (Braekevelt und Hollenberg, 1970), für amakrine Zellen (Rice et al., 2001; Galliresta et al., 2002) sowie für Photorezeptoren (Young, 1984) beschrieben. Die erste Stufe der Migration führt dazu, dass sich Zellen eines bestimmten Typus in einzelnen Schichten der sich entwickelnden Retina ansammeln. Im Zuge der zweiten Migrationsstufe erfolgt

die exakte Positionierung der Zellen im retinalen Gefüge. Welche Faktoren im Einzelnen die erste Stufe der Migration steuern, ist nicht genau bekannt (Galli-Resta, 2002). Es erscheint als unwahrscheinlich, dass diese erste Orientierung aufgrund genau definierter molekularer Gradienten erfolgt. Wahrscheinlicher erscheint eine ungefähre Anordnung der Zellen aufgrund unterschiedlich anziehender oder abstoßender Faktoren der Extrazellulärmatrix, die von den jeweiligen Rezeptoren der Zellen erkannt werden, und so eine differenzierte Migration einzelner Zelltypen bewirken (Steinberg und Takeichi, 1994). Diese These wurde vor dem Hintergrund unterschiedlicher Tiermodelle, die Mutationen in zellulären Adhäsionsproteinen tragen, aufgestellt, da die Tiere weit reichende Veränderung in der laminaren Struktur der Retina aufweisen (Tomasiewicz et al., 1993; Georges-Labusse et al., 1998).

Ein genaueres Bild zeichnet sich im Falle der Migration retinaler Vorläuferzellen vom Hühnchen ab (Mey und Thanos, 2000). Postmitotische retinale Vorläuferzellen sind in Säulen-ähnlichen radialen Formationen angeordnet, die aufgrund der Teilungsprozesse mitotischer Neuroblasten entstanden, aus denen die Neurone hervorgehen. Mit dem Erreichen der vitrealen Basalmembran durch die RGZ erfolgt eine signifikante Neuordnung der Struktur (Meller und Tetzlaff, 1976). Auch die adulte Retina eines Vogels weist die typische laminare Anordnung der jeweiligen Zellarten auf. Die notwendige Migration lässt sich am Wandel der retinalen Struktur erkennen. So bilden sich kurzzeitig innere und äußere Neuroepithelien aus, die durch eine Soma-freie Schicht voneinander getrennt sind (Willbold und Layer, 1992). Die Migration der Neuroblasten wird unter anderem vom Collagen der Basalmembranen sowie von glialen Faktoren beeinflusst (Meller und Tetzlaff, 1976; Willbold und Layer, 1998). Die Adhäsion zwischen Neuroblasten und der extrazellulären Matrix, in diesem Falle der Basalmembran, wird durch membranständige Integrine vermittelt. Bei den von den Neuroblasten exprimierten Integrinen handelt es sich um Heterodimere, die unter anderem Laminin, einen Bestandteil der extrazellulären Matrix, binden können. Werden diese Integrine artifiziell durch Antikörper blockiert, kann eine Migration der retinalen Vorläuferzellen ausbleiben (Cann et al., 1996). Die Migration der Neuroblasten beruht auch auf interzellulären Adhäsionsmechanismen, die auf den so genannten CAMs (cellular adhesion molecules) beruhen. Diese Moleküle gehören zu der Immunglobulin Familie und vermitteln Calcium-unabhängige, homophile Adhäsion. Eine differentielle Expression der unterschiedlichen CAMs in verschiedenen Schichten der Hühnchenretina konnte so für Contactin/F11 und Tenascin-C nachgewiesen werden (Alessandri et al., 1995).

Eine weitere Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle sind die Cadherine. Diese Moleküle vermitteln eine Calcium-abhängige Adhäsion. Das Expressionsmuster der Cadherine

während der Entwicklung des Auges ist komplex. Es erfolgt eine zeitlich versetzte und voneinander unabhängige Expression in den verschiedensten Geweben (Thanos et al., 1984; Schlosshauer und Dütting, 1991). Im retinalen Neuroepithel werden unterschiedliche Cadherine wie das N-Cadherin, das R-Cadherin, das Cadherin-6B sowie das Cadherin-7 in bestimmten Neuroblasten exprimiert, zu denen die Vorläuferzellen der Bipolarzellen, der Horizontalzellen, der amakrinen Zellen so wie die RGZ gehören (Wöhrn et al., 1998). Das N-Cadherin, das auch in den Photorezeptorinnensegmenten der äußeren plexiformen Schicht nachgewiesen wurde (Wöhrn et al., 1998), erscheint von großer Relevanz hinsichtlich früher Segregationsmechanismen neuronaler Vorläuferzellen aus dem Ektoderm, als auch in Bezug auf die Migration der Vorläuferzellen im retinalen Neuroepithel sowie bezüglich der Axonentwicklung (Rhiel et al., 1996).

Es zeigt sich, dass die erste Stufe der Migration, die zu einer laminaren Strukturierung der Retina führt, auf Adhäsionsmechanismen beruht, die über Integrine, CAMs und Cadherine vermittelt werden. Eine Regulation erfolgt über ein komplexes Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle, über Calciumkonzentrationen aber auch wie im Falle des N-Cadherins über transkriptionale und posttranslationale Modifikationen sowie unterschiedliche Phosphorylierungsmuster und Degradationen (Lee et al., 1997). Nach Abschluss der Schichtung der Retina, schließt sich die zweite Stufe der Migration an. Hierbei wird die exakte Positionierung der neuronalen Zellen in Mosaik vorgenommen (Galli-Resta, 2002).

In der Retina der Vertebraten sind Neurone des gleichen Typus in miteinander verbundenen Feldern angeordnet (Wässle und Boycott, 1991), die als Mosaik bezeichnet werden (Wässle und Riemann, 1978; Cook und Chalupa, 2000). Die Ausformung dieser Mosaik erfolgt zu einem frühen Zeitpunkt der retinalen Entwicklung, an dem die Prozesse der ZellGense und der Migration noch nicht vollständig abgeschlossen sind (Bumsted et al., 1997; Galli-Resta et al., 1997). Neue Zellen werden im Zuge der Migration in ein Mosaik spezifischer Zellen eingefügt, wobei die Geometrie des Mosaiks weitestgehend erhalten bleibt (Galli-Resta et al., 1990). Dies ist nur möglich, da die Zellen sich in der tangentialen Ebene bewegen (Reese et al., 1995), wobei ein minimaler Abstand zwischen zwei Zellen eingehalten wird (Rodieck und Marshak, 1992; Galli-Resta, 2000).

Das Einhalten eines Mindestabstandes zwischen zwei Zellen des gleichen Typus wurde des Weiteren bei Horizontalzellen (Ammermuller et al., 1993) und Photorezeptoren (Galli-Resta et al., 1999) nachgewiesen. Hier zeigt sich ein entscheidender Unterschied zur

ersten Migrationsstufe, die von radialen Bewegungen der Neuroblasten gekennzeichnet ist. Die zweite Stufe der Migration basiert primär auf der Ausbildung von dendritischen Verbindungen zur tangentialen Orientierung. Die Gruppierung der Zellen erfolgt in den Mosaiken derart, dass minimale dendritische Überlappungen entstehen (Eglen et al., 2000). Die Dendriten der maturierenden neuronalen Zellen sind überaus flexibel und können variierende Interaktionen mit benachbarten Neuronen eingehen (Scott und Luo, 2001). Die RGZ verteilen sich gleichmäßig über die gesamte Retina, wobei minimale Überlappungen der dendritischen, zellspezifischen Verbindungen vorliegen (Wässle et al., 1983; Lohmann und Wong, 2001). Die Elongation der Dendriten erfolgt bis zu einem bestimmten Grad und wird dann wahrscheinlich durch spezifische Signale der benachbarten RGZ gestoppt (Lohmann und Wong, 2001; Lohmann et al., 2002). Somit erscheint eine Regulation der Ausformung bestimmter Mosaik aufgrund des dendritischen Wachstums als wahrscheinlich (Reese et al., 1999; Galli-Resta et al., 2002).

1.1.3 Die Entwicklung synaptischer Verbindungen

Im Rahmen der Maturation ist der letzte notwendige Schritt die Vernetzung der neuronalen Zelle zu einem parallel und seriell arbeitenden System. Hier wird deutlich, dass die einzelnen Mechanismen retinaler Maturation, die Diversifikation, Migration sowie die Vernetzung, nicht getrennt voneinander betrachtet werden dürfen. Die Ausbildung erster dendritischer Fortsätze dient, wie bereits zuvor beschrieben, einer exakteren Positionierung der Zellen im retinalen Gefüge. Daher sind hier die Übergänge zwischen Migration und Vernetzung sehr fließend.

In der adulten Retina bestehen synaptische Verbindungen zwischen den Photorezeptoren und den Horizontalzellen sowie den Bipolarzellen. Diese dendritischen Verbindungen formen die äußere plexiforme Schicht. In der inneren plexiformen Schicht sind die synaptischen Verbindungen von RGZ zu amakrinen Zellen und bipolaren Interneuronen lokalisiert.

Wie entstehen nun diese Verbindungen und die resultierenden Netzwerke zur Weiterleitung und Verarbeitung der Informationen? Untersuchungen haben gezeigt, dass sich zunächst Verbindungen zwischen RGZ und amakrinen Zellen etablieren (Fisher, 1979). Es folgen Verknüpfungen von Horizontalzellen mit Verbindungen zu den Photorezeptoren (Blanks et al., 1974). Auf diese Weise bildet sich anfangs eine tangentielle Vernetzung der neuronalen Zellen aus. Im Anschluss erfolgt durch die

Ausbildung der Bipolarzellen eine radiale Verknüpfung zwischen den laminaren Netzen (Olney, 1968). Die Etablierung der dendritischen Fortsätze der RGZ wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt im Hinblick auf die exakte Positionierung der Zelle dargestellt. Die Ausbildung der Dendriten wird hierbei sowohl von intrinsischen als auch extrinsischen Faktoren beeinflusst (Sernagor et al., 2001). Ein externer Faktor ist die räumliche Entfernung zur nächsten RGZ. Wurden einzelne RGZ entfernt (Eysel et al., 1985) oder wurde die Größe des Auges verändert und damit auch die Dichte der RGZ (Troilo et al., 1996), so variierten auch stets die ausgebildeten Dendriten. Bei variierenden Dichten RGZ ergaben sich keine Veränderungen in den Verzweigungsmustern dieser Zellen (Lin et al., 2004), was den Einfluss intrinsischer Faktoren vermuten lässt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die Stabilität der Dendriten erhöht (Lohmann et al., 2002). Im Falle des Zebrafisches kam es zu einer Stabilisierung der Dendriten durch sich ausbildende Synapsen (Niell et al., 2004). RGZ projizieren erste dendritische Fortsätze in die innere plexiforme Schicht, wobei im Verlaufe der Maturation das Verzweigungsmuster der Dendriten immer komplexer wird (Bodenarko et al., 1995). Durch die selektive Blockade der cholinergen und glutaminergen Signaltransduktion konnte gezeigt werden, dass die neuronale Aktivität die adulte Form der Dendriten bestimmt (Serangor und Metha, 2001).

Während der frühen embryonalen Entwicklung lassen sich amakrine Zellen als multipolare Zellen in der inneren nukleären Schicht (INS) erkennen. Anfänglich werden Neuriten in unterschiedliche Richtungen ausgebildet, bis erste Fortsätze die innere plexiforme Schicht (IPS) erreichen. Hier findet eine umfangreiche Zunahme der Verzweigungen in laminaren Bereichen der IPS statt (Prada et al., 1987), die als On- und Off-Sublaminae identifiziert werden können (Kay et al., 2004). Dass vorhandene RGZ einen Einfluss auf die Ausbildung dieser Neuriten haben, erscheint fraglich, da Tiermodelle, die keine differenzierten RGZ hervorbringen (*Math5^{-/-}* knockout Mäuse) dennoch intakte amakrine Zellen entwickeln (Brown et al., 2001; Wang et al., 2001).

Bipolarzellen projizieren dendritische bzw. axonale Fortsätze in radialer Orientierung durch die gesamte maturierende Retina und reichen so von der äußeren bis zur inneren Basalmembran (Quesada et al., 1981). Im weiteren Verlauf der retinalen Entwicklung verkürzen sich diese Fortsätze und reichen nunmehr in die äußere plexiforme Schicht (ÄPS) als auch in die INS. Tiermodelle, wie das der reeler Maus, bei dem es zu weit reichenden Veränderungen hinsichtlich der amakrinen Zellen kommt, weisen unzureichende axonale Verzweigungen der Bipolarzellen auf (Rice et al., 2001). Sind keine Ganglienzellen ausgebildet oder durch Apoptose ausgeschaltet worden, so lässt

sich dennoch eine korrekte Strukturierung der Bipolarzellen in On- und Off-Bereich erkennen (Brown et al., 2001; Wang et al. 2001). Bipolarzellen werden somit in ihrer Entwicklung von amakrinen Zellen beeinflusst, nicht aber direkt von Ganglienzellen.

Horizontalzellen lassen in frühen Entwicklungsstadien eine radiale Ausrichtung erkennen, die sich im Verlauf der Maturation grundlegend verändert, bis eine tangentielle Orientierung vorherrscht (Schnitzer und Rusoff, 1984). Diese Entwicklung von einer radialen Neuritenanordnung zu einer laminaren Struktur kann nur bei korrekt differenzierten Stäbchen-Photorezeptoren erfolgen (Donovan und Dryer, 2004). Sind keine Zapfen ausgebildet worden, so bleibt die Entwicklung einer laminaren Struktur zunächst unbeeinflusst, während die spätere Verzweigung der neuronalen Endungen jedoch sehr minimiert wird (Reese et al., 2005). Die Anzahl der Kontakte einer Horizontalzelle zu Photorezeptoren sinkt mit dem Abstand zum Soma. In somanahen Bereichen ist die höchste Anzahl an Verbindungen zu detektieren. In den frühen Phasen der Entwicklung liegt zunächst eine einheitliche Verteilung der Kontakte zwischen Horizontalzellen und Photorezeptoren unabhängig von der räumlichen Ausdehnung vor. Mit fortschreitender Entwicklung wird die Anzahl der Kontakte in der Peripherie der Horizontalzelle verringert und die Anzahl der somanahen Kontakte erhöht.

Sich entwickelnde Photorezeptoren projizieren in großem Umfang Neuriten bis in die innere plexiforme Schicht (IPS). Erst mit der fortschreitenden Entwicklung dieser Zellen erfolgt ein Rückzug der Fortsätze in die ÄPS (Johnson et al., 1999). Werden amakrine Zellen blockiert, so erfolgt eine Projektion der Neuriten der Photorezeptoren in verschiedenen Unterschichten der IPS und in die Schicht der RGZ, was auf Interaktionen zwischen sich entwickelnden Photorezeptoren und amakrinen Zellen schließen lässt (Johnson et al., 2001).

1.2 Die Axogenese der RGZ

Als letzter Schritt der retinalen Entwicklung ist eine räumlich geordnete Projektion der Ganglienzellaxone in zentrale Verarbeitungszentren anzusehen, bekannt als Retinotopie. Die zentrale Struktur in diesem hochkomplexen Prozess ist der Wachstumskegel (growth cone), der das Axon in das spezifische Projektionsgebiet leitet, im Falle der Nagetiere in den Colliculus superior des Mittelhirns. Growth cones verfügen über Filopodien, die fingerartig die direkte Umgebung des Axons explorieren. Ihr Cytoskelett setzt sich aus

filamentösem Actin zusammen, das sich unter ATP Hydrolyse ausbildet (Suter und Forscher, 1998). Die zweite charakteristische Struktur der growth cones sind flächige Lamellipodien, die sich zwischen den Filopodien erstrecken. Rezeptoren an der Oberfläche der growth cones ermöglichen eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix oder mit anderen Zellen. Auf diese Weise erfolgt eine Steuerung der axonalen Projektion, indem verschiedenste Faktoren der Mikroumgebung über die Rezeptoren der growth cones und über nachfolgende intraaxonale Signalkaskaden zu einer Ausrichtung des Cytoskeletts führen und so einen anziehenden oder zurückweisenden Effekt erkennen lassen (Suter und Forscher; 1998). Es wurden unterschiedliche Faktoren identifiziert, die die axonale Navigation beeinflussen. Diese Faktoren können Bestandteil der extrazellulären Matrix sein. Hierbei kann es sich um gelöste Stoffe handeln, die einen Gradienten in der Mikroumgebung entstehen lassen. Auch membranständige Proteine anderer Zellen sind beschrieben worden. Die jeweiligen Faktoren lassen sich aufgrund bestimmter struktureller Eigenschaften in unterschiedliche Familien gruppieren. Vertreter der extrazellulären Matrixproteine sind Laminin und Fibronectin. Netrin und Semaphorin werden in den Interzellularraum sekretiert. Bei Cadherinen und bei Proteinen der Immunglobulinfamilie handelt es sich um membranständige Faktoren (Thanos und Mey, 2001; Yu und Bargmann, 2001). Einige dieser Faktoren wirken auf das axonale Wachstum inhibierend, während andere eine axonale Elongation fördern.

Innerhalb der embryonalen Retina erfolgt das axonale Wachstum gerichtet auf die Papille. Diese Orientierung wird dadurch ermöglicht, dass zunächst RGZ im Zentrum der Retina gebildet werden. Die RGZ der Peripherie entstehen nachfolgend. Die Axone wachsen aufgrund der Faszikulierung in Richtung der Papille. Auf der Oberfläche der Axone wird das zur Familie der Immunglobuline gehörende Adhäsionsmolekül L1 exprimiert. Durch homophile Interaktion mit L1 Molekülen anderer Axone erfolgt die Orientierung der Elongation (Burden-Gulley et al., 1997). Die erst später ausgebildeten Axone der retinalen Peripherie werden somit von bereits bestehenden Axonen zur Papille hin dirigiert. Damit die jeweils zuletzt gebildeten RGZ nicht erste Axone in die Peripherie der Retina projizieren, werden die neu gebildeten RGZ von einer extrazellulären Matrix umschlossen, die in den peripheren Bereichen Chondroitinsulfat enthält. Dieses inhibiert das axonale Wachstum und garantiert eine korrekte Orientierung der Axone, da die vom Zentrum der Retina zur Peripherie wachsenden RGZ stets von einem Ring Chondroitinsulfat-haltiger Matrix umgeben sind (Brittis et al., 1992; Snow und Letourneau, 1992). Haben die Axone die Papille erreicht, ist eine Steuerung des Wachstums in den Nervus opticus notwendig. Hier erscheint das Netrin-1 von großer Relevanz (Deiner et al., 1997). Dieser sekretierte Faktor führt zu einem Tropismus der axonalen Fortsätze. Zellen des Neuroepithels am

optischen Nervenkopf exprimieren das Netrin-1 in großem Maße, wobei *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die Axone der RGZ auf das Netrin-1 positiv reagieren. Tiermodelle, die eine Deletion im Netrin-1 Leserahmen aufwiesen, zeigten eine fehlgeleitete axonale Elongation, die nicht zu einer korrekten Ausbildung des optischen Nervenkopfes führte (Deiner et al., 1997).

Die Sehnerven aus beiden Augen kreuzen sich an der Basis des Zwischenhirns (*Diencephalon*) und bilden das *Chiasma opticum*. Hierbei wird die korrekte Ausbildung des *Chiasmas* unter anderem von inhibitorischen Faktoren, den so genannten *Slits*, gewährleistet (Plump et al., 2002). Im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Slits* das axonale Wachstum unterdrücken (Ringstedt et al., 2000). *Slits* werden im Verlaufe der Entwicklung anterior und posterior des entstehenden *Chiasmas* exprimiert. Bei Mäusen, die kein *Slit* exprimieren, kommt es zur Ausbildung eines zweiten *Chiasmas* (Plump et al., 2002).

Eine überaus erstaunliche Leistung der Steuerung des axonalen Wachstums erfolgt im *Colliculus superior*. Im Anschluss an das *Chiasma* ist dieser bei Nagetieren das direkte Ziel der meisten auswachsenden Axone. Hier erfolgt eine exakte Projektion der Axone derart, dass Nervenendungen benachbarter RGZ auch im *Colliculus superior* in gleicher räumlicher Anordnung Synapsen ausbilden. Somit ist die axonale Projektion im *Colliculus superior* eine spiegelbildliche Kopie der Anordnung der Ganglienzellen in der Retina (Retinotopie). Die molekularen Mechanismen der Bildung einer retinotopen Karte sind noch nicht endgültig geklärt. Man nimmt an, dass im *Colliculus superior* Membranfaktoren in einem Gradienten exprimiert werden und das axonale Wachstum lenken. Diese Faktoren wurden als Ephrine identifiziert (Drescher et al., 1995; O'Leary und Wilkinson, 1999). Unterschiedliche Ephrine sind in einem Gradienten von anterior nach posterior im *Colliculus* angeordnet, während die spezifischen Rezeptoren in den Axonen entsprechend der projizierenden RGZ in einem nasal-temporalen Gradienten exprimiert werden (Wilkinson, 2000). Auf diese Weise können temporale retinale Axone mit hoher Rezeptordichte repulsiv in den anterioren *Colliculusteil* gelenkt werden, während nasale Axone mit einer geringen Rezeptordichte nicht zurückgewiesen werden und bis in den posterioren *Colliculus* wachsen, wo sie entsprechend der retinotopen Karte terminieren und synaptische Verbindungen aufnehmen.

1.3 Abnahme der Wachstumsfähigkeit von Axonen in der maturen Retina

Nach Beendigung der intraretinalen Zelldifferenzierung, des axonalen Wachstums bis zum Gehirn und der Synaptogenese nimmt die Fähigkeit zum axonalen Wachstum graduell ab und schwindet komplett im adulten visuellen System. Die RGZ stellen demnach ihr gesamtes Programm um. War zuvor noch das axonale Wachstum relevant, so wird nachfolgend ein Programm aktiviert in dessen Mittelpunkt das dendritische Wachstum steht (Goldberg et al., 2002). Als Folge der Unfähigkeit zum axonalen Wachstum führen akzidentelle oder experimentelle Durchtrennungen des Sehnervs zum retrograden Verlust der RGZ, es sei denn, die Regeneration der durchschnittenen Axone wird durch verschiedene Manipulationen ermöglicht (Johnson et al., 1989; Heiduschka und Thanos, 2000). So kann durch die Transplantation peripherer Nervensegmente (Vidal-Sanz et al., 1987; Schütz et al., 2003; Schütz und Thanos, 2004), durch eine Linsenverletzung (Fisher et al., 2000; Leon et al., 2000) oder *in vitro* (Ford-Holevinski et al., 1986; Bähr et al., 1988) eine Regeneration der RGZ induziert werden. Diese Experimente weisen erstens darauf hin, dass die RGZ ihr intrinsisches Potential zum axonalen Wachstum nicht irreversibel verlieren und zweitens, dass die Mikroumgebung der Axone für die fehlende Regeneration der ausgereiften zentralen Bereiche verantwortlich ist (Schwab und Caroni, 1988; Schwab, 1998). Das intrinsische Regenerationspotential beschreibt die Kompetenz der Zelle, Signalkaskaden und regenerationsspezifische Gene zu aktivieren, die es ihr ermöglichen, erneut ein Axon auszubilden.

Die hemmende Wirkung der Umgebung besteht in der Expression inhibierender Proteine, die ein Wachstum von Axonen im reifen ZNS unterbinden sollen (Caroni und Schwab, 1988).

Die vielfältigen Faktoren, die eine effektive axonale Regeneration von adulten Neuronen des ZNS unterbinden, lassen sich in drei größere Gruppen einteilen:

- I. Fehlendes intrinsisches Regenerationspotential der RGZ
- II. Mangelnde neurotrophische Faktoren
- III. Inhibitorische Faktoren im adulten ZNS

1.3.1 Fehlendes intrinsisches Regenerationspotential der RGZ

Mit dem Abschluss der Maturation hat sich die Genexpression in den RGZ grundlegend geändert (Richardson und Verge, 1986; Chong et al., 1996; Anderson und Lieberman, 1999). Die Zelle wurde von einem Programm, das sämtliche notwendigen Faktoren der Entwicklung und des Wachstums beinhaltet, umgestellt auf die Aufrechterhaltung aller notwendigen zellulären Funktionen. Die Informationen für das Wachstum der Zelle sind weiterhin vorhanden, wurden aber nicht mehr umgesetzt. Diese These wird dadurch gestützt, dass diverse Wachstums-relevante Gene im Zuge einer Regeneration erneut exprimiert werden (Skene, 1989). Hierbei ist zu beachten, dass ein Expressionsprofil, wie es für die Regeneration essentiell ist, nicht die selben Voraussetzungen erfüllt wie eines, das während der Maturation aktiv ist (Udavadia et al., 2001).

Ein relevantes Gen in Bezug auf das axonale Wachstum ist das Protooncogen Bcl-2. Verschiedene Versuchsreihen hatten gezeigt, dass dieses Gen während der embryonalen Entwicklung der RGZ stark exprimiert wird. Während im Verlauf der Maturation das intrinsische Wachstumspotential der Axone der RGZ abnimmt, wurde auch die Expression dieses Gens herunter reguliert (Chen et al., 1997). Eine verstärkte Expression dieses Gens *in vitro* verhinderte die Apoptose der neuronalen Zellen (Allsopp et al., 1993; Zhong et al., 1993). In transgenen Mäusen konnte *in vivo* ein neurotrophischer Effekt der Überexpression des bcl-2 Gens nachgewiesen werden (Martinou et al., 1994).

Das growth associated protein-43 (GAP-43) ist während der neuronalen Entwicklung und der Axogenese in ausgeprägtem Maße in den Wachstumskegeln der Axone vorhanden (Skene, 1989, für Übersicht). Das Protein ist stark in die Entwicklung und das Wachstum von Axonen sowie in die Synapsenbildung und die axonale Verzweigung involviert (Skene, 1989; Bisby und Tetzlaff, 1992). GAP-43 unterliegt sowohl während der neuronalen Entwicklung und der axonalen Elongation einer starken Expression, als auch bei einer nachhaltigen Regeneration von Axonen nach erfolgter Transplantation peripheren Nervengewebes in das traumatisierte ZNS (Doster et al., 1991; Reh et al., 1993; Ng et al., 1995). Nicht nur in Hinblick auf die axonale Elongation ist GAP-43 von Bedeutung. Auch die Differenzierung von Neuroblasten zu Neuronen unterliegt dem Einfluss von GAP-43 (Mani et al., 2000, 2001). Die transkriptionelle Expression des GAP-43 Gens wird während dieser Entwicklung durch bHLH Faktoren, wie sie bereits zuvor in dieser Arbeit beschrieben wurden, gesteuert (Chiaramello et al., 1996; Kinney et al., 1996; McCormick et al., 1996). Untersuchungen hatten gezeigt, dass eine Überexpression des GAP-43 Gens in transgenen Mäusen zu einem extensiven axonalen Verzweigungsmuster

führt (Aigner et al., 1995). Die Überexpression *in vitro* in PC12 Zellen führte zu einem vermehrten Auswachsen von Fortsätzen (Yanker et al., 1990). GAP-43 gehört neben CAP-23 zu einer Proteinfamilie, die als MARCKS bezeichnet wird, und die verschiedene Proteine einschließt, die relevant für das axonale Wachstum sind (Maekawa et al., 1993). Das zentrale Kriterium, das die einzelnen Gene dieser Familie auszeichnet, ist nicht eine strukturelle Homologie der Sequenzen, sondern ihre Relevanz bezüglich der axonalen Entwicklung und Elongation. Ein Defekt, der zu einem nicht funktionalen GAP-43 führt, kann durch eine Überexpression von CAP-23 aufgehoben werden (Frey et al., 2000). Eine Fortführung der Expression eines dieser Gene *in vivo* über das Stadium der Maturation hinaus führt zu einer verstärkten Verzweigung der Axone, während eine anhaltende Expression beider Gene zu einer Synergie führt, wodurch verstärkt Axone ausgebildet werden (Aigner et al., 1995). Der weniger konservierte, leicht saure Bereich des GAP-43 nahe des C-Terminus verfügt über die Möglichkeit der Aktin Bindung. Daraus ergibt sich ein Modell, in dem GAP-43 die Polymerisierung des Aktins zu F-Aktin fördert und steuert (Skene, 1989).

Das GAP-43 Protein ist in ein dichtes Netz verschiedenster Regulationsmechanismen und Interaktionspartner involviert (Skene, 1989). So interagiert dieses Protein unter anderem mit drei unterschiedlichen Signalmolekülen (siehe Abb. 3). Hierbei handelt es sich um das GTP bindende Protein G_0 , die Proteinkinase C (PKC) und das Calmodulin (Strittmatter et al., 1990, 1991). Im N-terminalen Bereich des GAP-43 kann eine Palmitoylierung an zwei Cysteinen erfolgen. Über diese Hexadecanate erfolgt eine Verankerung des Proteins mit der intrazellulären Membran (Zuber et al., 1989). *in vivo* wurde eine dynamische Palmitoylierung des GAP-43 beobachtet (Milligan et al., 1995; Ross, 1995). Palmitoyliertes GAP-43 ist nicht in der Lage, das G_0 Protein *in vitro* zu aktivieren (Sudo et al., 1992), so dass eine Regulation durch einen Wechsel zwischen palmitoylierter und nicht palmitoylierter Form erfolgt. Somit erscheint GAP-43 als G_0 Protein-gekoppeltes Element der Signaltransduktion, das durch Palmitoylierung oder Phosphorylierung gesteuert werden kann (Nakamura et al., 1998).

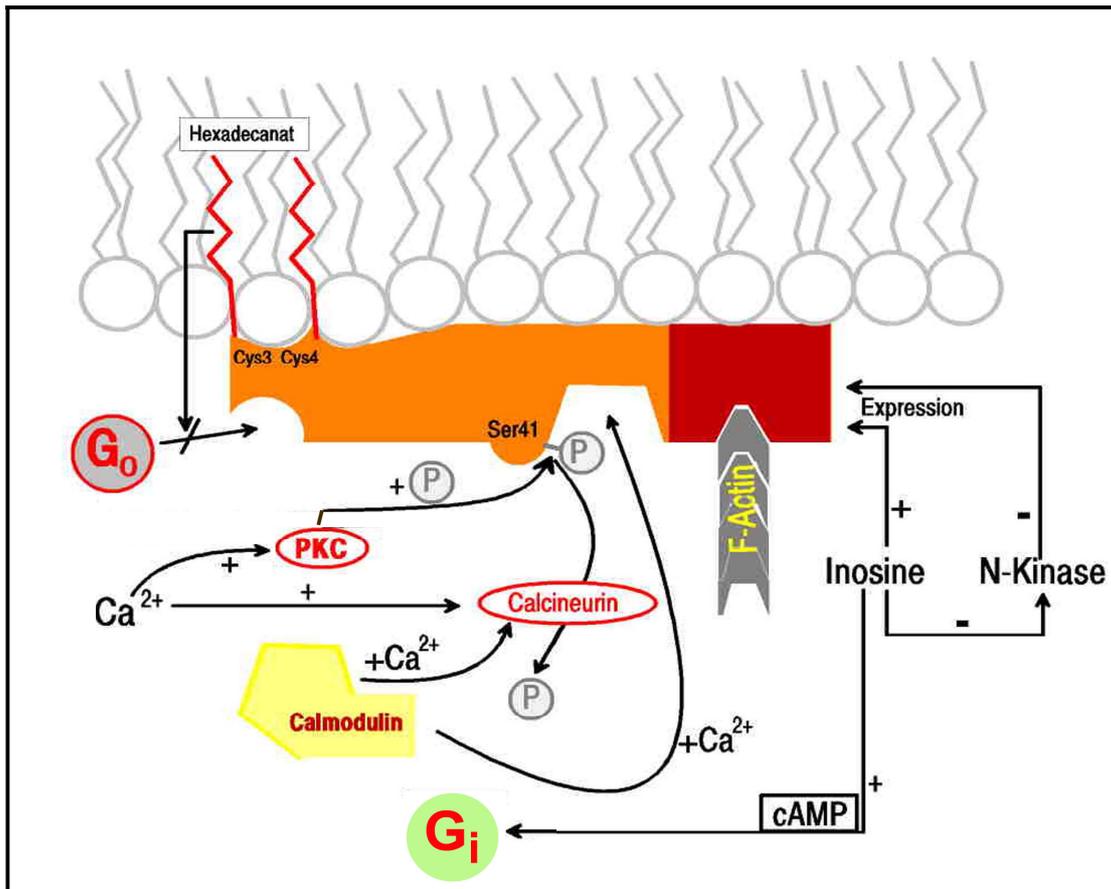


Abb. 3: Graphische Darstellung verschiedener Interaktionen des GAP-43

In dieser Darstellung sind Prozesse und Reaktionswege zusammengefasst, in die das Gap-43 *in vivo* bzw. *in vitro* involviert scheint.

Die Bindung von Calmodulin durch GAP-43 wird in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration gesteuert (Alexander et al., 1987; Gamby et al., 1996). Des Weiteren kann eine Phosphorylierung des GAP-43 durch die PKC eine Bindung des Calmodulin inhibieren (Apel et al., 1990). GAP-43 konzentriert auf diese Weise das Calmodulin in Bereichen des Neurons, wo es für die Zelle in Hinblick auf das Wachstum relevant ist (Masure et al., 1986; Alexander et al., 1988). Das Calcineurin ist in der Lage, eine Dephosphorylierung des GAP-43 herbei zu führen. Eine Erhöhung der Calmodulinkonzentration führt zu einer Aktivierung des Calcineurin, das wiederum durch die Dephosphorylierung des GAP-43 eine Bindung zwischen Calmodulin und GAP-43 ermöglicht und so eine Feedback-Inhibition ausführt (Liu und Storm, 1989).

Das Nukleosid Inosin vermag die Expression von GAP-43 zu steigern und so axonales Wachstum zu fördern, während es parallel die N-Kinase inhibiert, die unter anderen Umständen zu einer Blockade der GAP-43 Expression führt. Neben der vermehrten GAP-43 Expression wurde eine erhöhte cAMP Konzentration in den Zellen festgestellt

(Benowitz et al., 2002). Die durch Nogo-A oder MAG vermittelte Inhibition axonalen Wachstums kann durch erhöhte cAMP Konzentrationen überwunden werden (Bandtlow, 2003). In der Funktion des *second messengers* führt cAMP zu einer Aktivierung des G_i Proteins, das zu einer weiteren Förderung des axonalen Wachstums führt (Cai et al., 1999).

1.3.2 Mangel an neurotrophischen Faktoren

Neurotrophische Faktoren sind in der adulten Retina nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden, die nicht ausreichen, um eine Regeneration von Axonen nach einer Axotomie zu ermöglichen (Zhang et al., 1998; Brandbury et al., 1999). Zu den neurotrophischen Faktoren, die ein Überleben traumatisierter Ganglienzellen ermöglichen und so noch vor einer etwaigen Regeneration von Bedeutung sind, gehören Mitglieder der Familie der Neurotrophine (NT). Die Interaktion von NT mit den membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptoren der Neurone aktiviert Signalkaskaden, die zu einer Steigerung der zellerhaltenden Stoffwechselprozesse bei einer gleichzeitigen Unterbindung apoptotisch relevanter Vorgänge führen (Jacobson et al., 1997). Durch eine Axotomie verliert das Neuron essentielle neurotrophische Faktoren, die unter nativen Bedingungen vom Projektionsgebiet zum Soma retrograd transportiert wurden (Snider et al., 1994; Thoenen, 1995). Als Folge der Unterbrechung des retrograden NT-Transports erfolgt eine retrograde Apoptose der RGZ. In diesem Falle verhilft die Applikation von Neurotrophinen zu einem Überleben der RGZ. Eine Vielzahl unterschiedlichster Neurotrophine konnte bislang beschrieben werden, die *in vitro* aber auch *in vivo* das Überleben der RGZ beeinflussen. Zu diesen Faktoren gehört der nerve growth factor (NGF) (Cramignoto et al., 1989; Rabacchi et al., 1994), der brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Johnson et al., 1986; Thanos et al., 1989), das Neurotrophin-3 (NT-3) (de la Rosa et al., 1994), der ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Meyer-Franke et al., 1995), der insulin-like growth factor (Meyer-Franke et al., 1995) und der basic fibroblast growth factor (bFGF) (Meyer-Franke et al., 1995). Das NT-4 führte zu einer höheren Rate überlebender RGZ juveniler und adulter Ratten *in vitro* (Ary-Pires et al., 1997). Darüber hinaus konnte die Anzahl Maturations-bedingter Apoptosen unter den RGZ durch die Applikation von NT-4 verringert werden (Cui und Harvey, 1994). Eine Kombination von BDNF und NT-4 führte zu einer Steigerung des neurotrophischen Effektes, so dass sich nach einer Traumatisierung des optischen Tectums die Anzahl überlebender RGZ erhöhte (Cui und Harvey, 1995). Eine weitere Kombination von BDNF und CNTF führte zu einer Elongation

von Axonen *in vitro* und zur Erhöhung von GAP-43 um das Drei- bis Vierfache (Jo et al., 1999).

Ein weiterer Faktor mit neurotrophischen Effekten ist das cAMP. Durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration konnte in verschiedenen Studien ein Anstieg des Regenerationspotentials von RGZ nachgewiesen werden (Meyer-Franke et al., 1995). Eine erhöhte intrazelluläre cAMP Konzentration in RGZ befähigt die Zellen zu einem axonalen Wachstum sogar in Gegenwart von inhibitorischen Molekülen wie MAG oder Myelin (Cai et al., 1999, Domeniconi und Filbin, 2005). Die neurotrophische Wirkung des cAMP ist wahrscheinlich die Folge der Wirkung auf eine Proteinkinase A-abhängige Signaltransduktion, in die das cAMP involviert ist (Cai et al., 1999).

1.3.3 Inhibitorische Faktoren im adulten ZNS

Als dritter Grund für die fehlende Regenerationsfähigkeit im ZNS wurde eine aktive Hemmung des axonalen Wachstums durch extraaxonal exprimierte Faktoren angenommen (Berry, 1982). Tatsächlich konnten Schwab und Thoenen (1985) nachweisen, dass das ZNS-Myelin einen hemmenden Effekt auf kultivierte Zellen hatte und postulierten, dass myelin-assoziierte Faktoren auch die Regeneration von Axonen hemmen. Caroni und Schwab (1988) identifizierten die so genannten Neuriteninhibitoren (NI), die später als Nogo-Proteine bezeichnet wurden (GrandPre et al., 2000). Drei Faktoren mit ausgeprägtem inhibitorischen Potential bezüglich der axonalen Regeneration sind das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) (Mukhopadhyay et al., 1994), das Oligodendrocyten-Myelin Glycoprotein (OMgp) (Kottis et al., 2002) sowie das Nogo-A Protein (GrandPre et al., 2000).

In verschiedenen Versuchsreihen zeigte sich, dass sowohl Myelinscheiden als auch Oligodendrozyten eine Regeneration von Axonen unterbinden (Schwab und Caroni, 1988). Weitere Analysen führten zu der Isolation von zwei Proteinen, die als NI-35 und NI-250 bezeichnet wurden (Caroni und Schwab, 1988). Verschiedene Homologe wurden identifiziert, die aufgrund differenzierter Splicevorgänge aus einem Gen entstammten, das als Nogo bezeichnet wurde (GrandPre et al., 2000). Durch unterschiedliches Splicen entstehen hieraus die Isoformen Nogo-A, -B und -C, die zur Reticulonfamilie gehören (Grandpre et al., 2000). Das Protein Nogo-A ist identisch mit dem Reticulon 4-A Protein (von de Velde et al. 1994). Proteine der Reticulon-Familie verfügen über eine Lokalisationssequenz, die dazu führt, dass die Proteine im ER zurückgehalten werden

(GrandPre et al., 2000). In immunohistologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Nogo-A auch in den Membranen von Oligodendrozyten zu finden ist (Huber et al., 2002). Zudem werden bei einer Traumatisierung der Axone zwangsläufig auch Myelinscheiden verletzt werden, so dass Nogo-A aus dem ER in die neuronale Umgebung gelangen kann, was unter anderem die Beobachtungen von Caroni und Schwab bezüglich der Unterbindung der axonalen Regeneration erklären kann. Nogo-A bindet an den Nogo-Rezeptor (Fournier et al., 2001), der jedoch über keine Transmembrandomäne verfügt. Die Signaltransduktion erfolgt in diesem Falle über den p75^{NTR} Co-Rezeptor, der eine Transmembrandomäne besitzt (Wong et al., 2002).

Das OMpg wurde im Myelin des ZNS lokalisiert und erwies sich in Untersuchungen als ein Inhibitor der axonalen Regeneration (Kottis et al., 2002;). Ähnlich dem Nogo-A (Hunt et al., 2002) konnte auch eine Expression des OMpg in Neuronen nachgewiesen werden (Habib et al., 1998). Das OMpg bindet ebenfalls an den Nogo-Rezeptor. Über den p75^{NTR} Rezeptor wird nachfolgend eine Signaltransduktion initiiert, die über das Rho-System fortgeführt wird (Domeniconi et al., 2002).

Bei dem Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG) handelt es sich um ein bifunktionales Protein, da es zum einen die Axogenese juveniler Neurone fördert (Johnson et al., 1989; Filbin, 1996) und zum anderen auch die axonale Regeneration im adulten ZNS unterbindet (Tang et al., 1997). Darüber hinaus konnte MAG sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem (PNS) in Myelinscheiden lokalisiert werden (Filbin, 1995), wo es die Formation und die strukturelle Integrität der Myelinscheiden gewährleistet (Marcus et al., 2002). MAG interagiert wie die inhibitorischen Moleküle ebenfalls mit dem Nogo Rezeptor und im weiteren Verlauf mit dem p75^{NTR} Rezeptor (Domeniconi et al., 2002; Wong et al., 2002). Erste Versuchsreihen lassen eine Abhängigkeit der MAG bedingten neuronalen Reaktion von der intrazellulären cAMP Konzentration vermuten (Cai et al., 2001). Neurone wiesen eine ausgeprägte Sensitivität bezüglich des MAG bei intrazellulär verringerter cAMP Konzentration auf. Die Präsenz des Regenerationsinhibitors MAG in den Myelinscheiden des PNS sollte eigentlich eine axonale Regeneration verhindern. Dennoch kommt es hier zum erneuten Auswachsen der Axone. Grund hierfür ist zum einen eine rasche Phagozytose des Debris durch Makrophagen, zum anderen wird in den Schwann'schen Zellen im Zuge einer Traumatisierung die Expression von Myelin-Proteinen (Filbin, 1995) sowie die Expression des p75^{NTR} Rezeptors (Allchrone et al., 2003) herunter reguliert. Darüber hinaus wird kein Nogo Rezeptor exprimiert (Hunt et al., 2002).

Weitere Inhibitoren des axonalen Wachstums im ZNS, die von den Oligodendrozyten exprimiert werden, sind das Versican $V_{2/3}$ (LeBaron, 1996; Schmalfeldt et al., 2000), das Brevican (Seidenbecher et al., 1998) sowie das Tenascin-R (Angelov et al., 1998; Probstmeier et al., 2000a). Die Expression des Tenascin-R unterliegt einer Regulation durch Cytokine und Wachstumsfaktoren (Jung et al., 1993; Probstmeier et al., 1999). Auch bezüglich Tenascin-R liegt eine Bifunktionalität vor, da es die Fibronectin-basierte Adhäsion axonaler Fortsätze sowohl inhibieren als auch fördern kann (Goodman, 1996; Probstmeier et al., 2000b).

1.4 Makrophagen, Maturation und axonales Wachstum

Makrophagen besitzen sowohl in Bezug auf die retinale Maturation als auch bezüglich des artifiziell induzierten axonalen Wachstums eine beachtenswerte Relevanz.

In frühen Stadien der Entwicklung des visuellen Systems bildet sich eine große Zahl neuronaler Zellen, die im Verlauf der Maturation wieder untergehen. Die Anzahl neuronaler Zellen in der embryonalen Entwicklung ist somit höher als die im adulten Stadium. Es wurden zwei Perioden des Zellsterbens im Verlaufe der Maturation des Auges beschrieben. Die erste Periode der maturationsbedingten Apoptose erfolgt während der Invagination des optischen Vesikels (Martin-Partido et al., 1988) im Verlauf der Entwicklung der Neuroblasten sowie während der anschließenden Migration (Frade et al., 1997) und Ausbildung erster axonaler Fortsätze (Mayordomo et al., 2003). Die zweite apoptotische Periode unter den neuronalen Zellen erfolgt während der Innervation der postsynaptischen Zellen durch die RGZ (Perry und Cowey, 1982; Perry et al., 1983; Marin-Teva et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2004). Der programmierte Zelltod konnte auch während der frühen Entwicklung des Sehnervs bei der Ratte nachgewiesen werden (Horsburgh und Sefton, 1986). Es zeigte sich, dass die Apoptose in der maturierenden Retina und dem Sehnerven räumlich wie auch zeitlich direkt vor dem axonalen Wachstum einsetzte. Der im Zuge dieser apoptotischen Prozesse entstehende Zelldebris wird in frühen Entwicklungsstadien von nicht spezialisierten Neuroepithelzellen phagozytiert (Marin-Partido et al., 1988; Navascues et al., 1988). Erst in nachfolgenden Stadien konnten Zellen mesenchymalen Ursprungs mit spezifischen Makrophagenmerkmalen detektiert werden (Marin-Teva et al., 1999). Durch die Apoptose wird eine Migration mesenchymaler Makrophagen in Richtung des Neuroepithels ausgelöst (Rodriguez-Gallardo et al., 2005). Direkt nach der Migration der Makrophagen verringert sich die Anzahl apoptotischer Prozesse. Darüber hinaus zeigte sich, dass in

den Bereichen, in denen sich zuvor noch Makrophagen erstreckten, später oftmals Axone zu erkennen waren (Rodriguez-Gallardo et al., 2005). Die Makrophagen, die während der Entwicklung der Retina in Erscheinung treten, sezernieren NGF, während die Expression von Trk-A und p75^{NTR} Rezeptoren, die NGF binden, in den Axonen nachgewiesen werden konnte (Rodriguez-Gallardo et al., 2005). Da NGF in der Lage ist, über die Interaktion mit diesen Rezeptoren das Wachstum, die Entwicklung wie auch das Überleben neuronaler Zellen zu steuern (Patapoutian und Reichardt, 2001), erscheint es als durchaus möglich, dass Makrophagen von entscheidender Relevanz bezüglich der Entwicklung des Auges sind.

Auch im Hinblick auf die axonale Regeneration adulter RGZ sind Makrophagen von wesentlicher Bedeutung für eine anhaltende axonale Elongation. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Verletzung der Linse eine umfangreiche Regeneration der Axone folgt (Leon et al., 2000; Fischer et al., 2001). Mit der Verletzung der Linse wurde eine ausgeprägte Migration von Makrophagen in das Auge beschrieben (Leon et al., 2000). Durch Aktivierung intravitrealer Makrophagen wurde ein rasches Auswachsen von Ganglienzellaxonen in ein Transplantat aus peripherem Nervengewebe herbeigeführt (Fischer et al., 2000). Es zeigte sich, dass Makrophagen eine Reihe neurotrophischer Faktoren exprimieren und sezernieren (Dougherty et al., 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch Makrophagen die Expression des Entwicklungs- und Wachstums-relevanten Gens GAP-43 herauf reguliert wurde (Yin et al., 2003).

1.5 Ziele der Arbeit

Die Retina der Ratte ist durch zwei Entwicklungsphasen gekennzeichnet. Die embryonale Phase folgt weitestgehend den erwähnten Prinzipien. Die postnatale Phase, die zwischen der Geburt (P0) und dem Augenöffnen am Tag 14 (P14) abläuft zeigt Besonderheiten, die einerseits mit der Synaptogenese und intraretinalen Differenzierung und andererseits mit der Abnahme der embryonalen Wachstumsfähigkeit korrelierten. Es sollte aus diesem Grunde die postnatale Entwicklung der Rattenretina untersucht werden, und folgende Fragen beantwortet werden.

- I) Wie verhält sich das axonale Wachstum während der postnatalen Entwicklung?
- II) Welche Rolle spielt das Augenöffnen?

- III) Welche Proteine werden während der Augenöffnung reguliert?
- IV) Wie beeinflusst die Augenöffnung die Regenerationsfähigkeit von Axonen?

Als erstes Ziel sollte eine genaue Analyse der ersten postnatalen Wochen der Rattenretina erfolgen. Mit Hilfe immunhistologischer Methoden sollte zunächst das Expressionsprofil von Markerproteinen überprüft werden, von denen man weiß, dass sie bei der Retinaentwicklung beteiligt sind. Neben den Expressionsprofilen bekannter Markerproteine sollten die Expressionsmuster noch unbekannter Proteine, die bei der postnatalen Entwicklung der Retina eine Rolle spielen, bestimmt werden. Unterliegen diese oder weitere Proteine einer bestimmten Veränderung im Verlauf der Entwicklung? In wie weit lassen sich Zusammenhänge zwischen bestimmten Ereignissen, wie sie zuvor in der *in vitro* Kultur gemacht worden sind, und den Expressionsprofilen einzelner Proteine erkennen? Diese Fragestellungen sollten mit Hilfe der erwähnten immunhistologischen Untersuchungen, der 2D-Gelelektrophorese sowie der Real time PCR geklärt werden.

Auf methodischer Ebene sollte als zweites Ziel eine Methode zur Transfektion von RGZ etabliert werden. Eine Transfektion und nachfolgende Expression exogener Leserahmen in Zellen des retinalen Gewebes war oftmals nur unter Verwendung viraler Partikel möglich. Häufig kamen bei diesen Versuchsreihen Adenoviren zum Einsatz, die mit Risiken verbunden sind. Auch die Verwendung anderer Viren, wie dem *Herpes simplex* Virus ist sicherheitstechnisch nicht unproblematisch. Darüber hinaus kann eine spezifische Transduktion von RGZ nicht gewährleistet werden. Durch die bevorzugte intravitreale Applikation der viralen Partikel kommt es zu einer unspezifischen Transduktion unterschiedlicher Zelltypen in der direkten vitrealen Umgebung. Es sollte deshalb untersucht werden, ob eine Möglichkeit der überaus spezifischen Transfektion RGZ mit einem gleichzeitig geringeren Sicherheitsrisiko etabliert werden kann. Dazu wurde die Retrofektion von RGZ entwickelt, nämlich die Applikation von DNA-Fragmenten in den Colliculus superior oder in den Sehnerven, und der retrograde Transport in die RGZ.

Eine Beantwortung sämtlicher Fragestellungen sollte am Beispiel der Retina juveniler und adulter Ratten erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Eingriffe an Versuchstieren

2.1.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden im Einklang mit den geltenden rechtlichen Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Ratten (*Rattus norvegicus*) des Sprague-Dawley Stammes. Die Versuchstiere entstammten entweder der eigenen Zucht oder wurden von der Firma Charles River (Sulzbach) bezogen. Die Versuchstiere wurden maximal zu dritt in Makrolonkäfigen des Typs III bei einem natürlichen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Operierte Tiere wurden im Anschluss an die Operation einzeln in neue Makrolonkäfige gesetzt und für die verbliebene Zeit der Narkose unter einer Wärmelampe positioniert. Die Ernährung der Tiere wurde durch Alleinfutter und Wasser *ad libitum* gewährleistet. Sämtliche genehmigungspflichtigen Versuche sind mit der Zulassung des Regierungspräsidiums Münster unter der Versuchsnummer G14/2004 durchgeführt worden. Die Protokollierung der jeweiligen Operationen erfolgte gemäß §9a (1) des Tierschutzgesetzes.

Im Verlauf des Projektes wurden insgesamt 211 Tiere eingesetzt. Hierbei wurden für nachfolgende Teilprojekte folgende Anzahlen an Tieren eingesetzt:

Quantifizierung des postnatalen axonalen Wachstums	62 Tiere
Immunhistochemische Analyse juveniler Retinae	21 Tiere
Analyse der Proteinprofile im Zuge der postnatalen Maturation	56 Tiere
Analyse von Genexpressionen mittels Real time PCR	38 Tiere
Transfektion retinaler Ganglienzellen	34 Tiere

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Farbstoff:

DilC18(3)	(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)	Molecular Probes
-----------	--	------------------

Weitere Operations-relevante Substanzen:

Antibiotische Salbe	Gentamytrex	Dr. Mann Pharma
Lipophiles Agenz	Freund's Adjuvant	Sigma
Anästhetikum	Xylazin (2%) Ketanest (10%)	Sanofi Sanofi
Chirurgischer Kleber	Dermabond	Ethicon
Augentropfen	Vidisic-Gel	Dr. Mann Pharma

Hank's buffered salt solution, pH 7,5 (HBSS, Gibco):

NaCl	8000 mg/l	Glucose	1000 mg/l
KCl	400 mg/l	NaHCO ₃	350 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l	Phenolrot	10 mg/l
Na ₂ HPO ₄	48 mg/l		

2.1.3 Geräte und MaterialGeräte:

Bohrer mit Fräsaufsatz		Dremel
Mikroskop	Axiophot mit Epifluoreszenz	Zeiss
Operationsbesteck	Skalpell-Griff	Hermle
	Skalpell-Klingen, rund	Feather
	Skalpell-Klingen, spitz	Feather
	Nadelhalter	French
	Augenschere, gerade	Hermle
	Kapsulotomieschere	Gills-Welsh
	Vannas-Schere, gerade	Hermle
	Mikro-Pinzette	Hermle
	Uhrmacherpinzette Nr.4 & 5	Hermle
Operationsmikroskop	OMI 19-FC	Zeiss

Material:

Füllmaterial	Gelfoam	Pharmacia & Upjohn
Klebeband	Gewebeband	Hartmann

Nahtmaterial	4-0 & 7-0	Ethicon
Tupfer	2 bis 5 mm	Zelluvit

2.1.4 Anästhesie, postoperative Beobachtung und Tötung der Versuchstiere

Die Narkotisierung der Ratten vor jedem operativen Eingriff erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von 2 mg Xylazin (Xylazin 2%, Sanofi) und 12,5 mg Ketaminsulfat (Ketanest 10%, Sanofi) auf je 100 g Körpergewicht des Tieres. Mit Hilfe des Zehenreflexes wurde festgestellt, ob eine ausreichende Anästhesie des Tieres vorlag. War dies der Fall wurde, der Kopf zur Vorbereitung des Operationsfelds geschoren. Vor dem eigentlichen Eingriff wurde der Kopf der Ratten mit einer Maulklemme fixiert, während die Extremitäten mit Klebestreifen auf der Operationsunterlage arretiert wurden. Einem Austrocknen der Corneae während der operativen Eingriffe wurde durch die Applikation einer Augensalbe vorgebeugt. Zur Prävention bakterieller Entzündungen im Augen- und vor allem im Nahtbereich wurden nach der Operation die entsprechenden Areale mit einer antibiotikahaltigen Salbe (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) versehen. Um ein Auskühlen der operierten und noch narkotisierten Tiere zu vermeiden, wurden diese für durchschnittlich 45 Minuten unter eine Wärmelampe gelegt. Während der nachfolgenden Tage wurden die Tiere regelmäßig kontrolliert. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die Tiere keine Beeinträchtigungen als Folge der Operation davon getragen hatten. Zu dem konnte so direkt auf etwaige Infektionen reagiert werden. Die Tötung der jeweiligen Versuchstiere wurde mit Kohlendioxid erreicht.

2.1.5 Axotomie des *Nervus opticus*

Die Axotomie des Sehnervs löst, bedingt durch retrograde Signale von der Läsion ausgehend, die Apoptose der retinalen Ganglienzellen aus. Im Rahmen dieser apoptotischen Vorgänge kommt es zu einer temporären Regenerationsfähigkeit der RGZ nach Explantation und Kultivierung der Retina *in vitro*. Dieses etablierte Modell wurde eingesetzt, um Referenzdaten zu der spontan regenerierenden juvenilen Retina zu erhalten. Die Axotomie des Sehnervs wurde darüber hinaus zur Markierung der RGZ sowie für Transfektionsversuche eingesetzt. Hierbei sollte der positive Einfluss der geringeren Distanz von Applikationsort und Zielgewebe genutzt werden. Durch die nähere Platzierung von Markierungsstoffen oder Transfektionsgemischen wurde ein rascherer und effektiverer Transport zu den Ganglienzellen gewährleistet.

Entlang der Medianlinie wurde durch eine 2 cm lange, sagittale Schnittführung die Kopfhaut der narkotisierten Ratte eröffnet. Mit dem Skalpell wurde die linke Hautpartie von der Schädelkalotte getrennt. Die nunmehr freie Haut wurde mit einem chirurgischen Faden (4.0, Ethicon) über das Auge hinweg aufgespannt. Um zur *Orbita* zu gelangen wurde ein Schnitt entlang der *Os frontale* durch das Bindegewebe oberhalb des *Bulbus* durchgeführt. Da in diesem Gewebe zahlreiche Gefäße verlaufen, wurde darauf geachtet, dass eine möglichst minimale Schnittführung erfolgte. Das Gewebe der Tränendrüse, die einen direkten Zugriff auf den *Nervus Opticus* verhindert wurde teilweise entfernt. Nach dem Durchtrennen der extraokulären Muskelfasern konnte mit einem weiteren chirurgischen Faden (7.0, Ethicon) das Auge so fixiert werden, dass der Zugang zum Sehnerv im retrobulbären Raum ermöglicht wurde. Der auf diese Weise freigelegte Nerv wurde mit Gelfoam gestützt. Die den Nerven umgebenden Meningen wurden mit der Kapselotomieschere lateral eröffnet. Bei diesem Schnitt sowie bei der folgenden Axotomie des Nervs wurde darauf geachtet, dass die in den Meningen verlaufende *Arteria centralis retinae* nicht verletzt wurde. Eine Verletzung dieses Gefäßes führt nämlich zu einer ischämischen Schädigung und Nekrotisierung des retinalen Gewebes. Im Falle einer RGZ-Markierung mit Dil wurde ein einzelner Kristall des Farbstoffes auf das distale Nervenende platziert. Der Einsatz von Freund's Adjuvant (Sigma) verbesserte die Resorption des Farbstoffes.

Auf ähnliche Weise wurde bei Transfektionen verfahren. Bei der angewandten Transfektionsmethodik handelt es sich um die Lipidtransfektion mit Hilfe von Transfektionsagenzien. Zum Einsatz kam hierbei Lipofectamine 2000®. Die durch die Resektion der Tränendrüse entstandene Kavität wurde mit Gelfoam gefüllt und die Schnitte genäht.

Im Anschluss an den Eingriff folgte die Kontrolle des Augenhintergrundes. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob ein intaktes Gefäßsystem vorlag. Das vom Eingriff betroffene Auge wurde dazu mit Augentropfen angefeuchtet, so dass im Anschluss mit Hilfe eines auf die Cornea gehaltenen Objektträgers eine Kontrolle der retinalen Gefäßversorgung erfolgen konnte. Die Explantation der Retina erfolgt nach 5, 7 und 10 Tagen.

2.1.6 Retrograde Färbung und Transfektion retinaler Ganglienzellen

Nach dem Einleiten der Narkose wurde anhand des Zehenreflexes überprüft, ob das Tier ausreichend anästhesiert war. Zeigte sich kein Reflex mehr, konnte durch sagittale Schnittführung mit dem Skalpell die Kopfhaut auf einer Länge von 2 bis 3 cm geöffnet

werden. Ausgehend von diesem zentralen Schnitt wurde die Kopfhaut zu beiden Seiten vorsichtig mit dem Skalpell von der Schädelkalotte getrennt. Mit Hilfe von chirurgischen Fäden (4.0, Ethicon) wurde das Operationsfeld aufgespannt, indem die Kopfhaut mit diesen Fäden zu beiden Seiten fixiert wurde. Mit Hilfe einer kleinen Bohrfräse konnte die Schädelkalotte direkt in dem Bereich über dem *Colliculus superior* geöffnet werden. Die herausgetrennten Knochenfragmente wurden entfernt. Nachfolgend wurde der *Colliculus superior* mit Hilfe einer Glaskapillare mit Saugvorrichtung freigelegt. Auf diese Weise konnte das über dem Colliculus befindliche Gewebe schonend entfernt werden. Über den freigelegten *Colliculus superior* konnte nun entweder eine retrograde Markierung der RGZ oder eine retrograde Transfektion eben dieser Zellen durchgeführt werden. Im Rahmen einer Markierung der Zellen im retinalen Gewebe wurde der Colliculus mehrmals mit einer Kanüle oder einer Uhrmacherpinzette Nr.5 punktiert. Kleine Kristalle des Farbstoffes wurden in dem so präparierten Areal platziert. Zur Erhöhung der Aufnahme rate des Farbstoffes durch die neuronalen Fasern wurde Freund's Adjuvant auf den Colliculus appliziert. Die entstandene Kavität wurde anschließend mit Gelfoam aufgefüllt und mit Gentamytrex Antibiotikasalbe versehen.

Auf gleiche Weise wurde der *Colliculus superior* für eine retrograde Transfektion der RGZ freigelegt. Nachdem auch hier der Colliculus punktiert worden war, erfolgte die Applikation der DNA/Lipidsuspension. Bei dem verwendeten Transfektionsagens handelte es sich um Lipofectamine2000®.

2.2 Gewebe- und Zellkultur

2.2.1 Retinale Gewebekultur

2.2.1.1 Chemikalien, Kulturmedien und Puffer

Enzyme:

DNase I	Sigma
Papain (12 U/mg)	Fluka

S4-Medium:

Bei diesem Medium handelt es sich um ein serumfreies Medium auf Basis des DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), welches von der Firma Promocell als „Astrocyte Microglia Growth Medium Formulation“ vertrieben wird.

Hank's buffered salt solution, pH 7,5 ; HBSS, Gibco:

NaCl	8000 mg/l	Glucose	1000 mg/l
KCl	400 mg/l	NaHCO ₃	350 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l	Phenolrot	10 mg/l
Na ₂ HPO ₄	48 mg/l		

Dulbecco's Modified Eagle Medium, (DMEM):

DMEM mit L-Glutamin und Glucose (4,5 g/l) PAA

Substrate zum Beschichten der Kulturschalen:

Poly-D-Lysin, 200 - 400 kDa Sigma
Laminin-1 Roche

Dissoziationsansatz I:

PBS 750 µL
Artelac 750 µL
Papain gelöst in PBS (12 U/ml) 200 µL
BSA 0,3%
DNase I 0,1%

Dissoziationsansatz II:

PBS 750 µL
Artelac 750 µL
BSA 0,3%
DNase I 0,1%

Weitere Puffer und Lösungen:

Phosphat-Buffered Saline, (PBS) Gibco
Bovine serum albumin, (BSA) Sigma
Artelac Dr. Mann Pharma

Zur Transfektion wurde Lipofectamine 2000® (Invitrogen) eingesetzt.

2.2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte:

Brutschrank	Modell BB 6060; mit individueller Gaszufuhr von O ₂ und CO ₂	Heraeus
Kaltlichtquelle	KL 1500 electronic	Schott
Gewebeschneider	Tissue Chopper Mickle	Mcllwain
Mikroskop	Axiophot mit Epifluoreszenz	Zeiss
Operationsbesteck	Augenschere, gerade Kapsulotomieschere Skalpell-Griff Skalpell-Klingen, spitz Uhrmacherpinzette Nr.4 & 5 Vannas-Schere, gerade	Hermle Gills-Welsh Hermle Feather Hermle Hermle
Pipetten	10, 100, 1000 µl	Eppendorf
Stereomikroskop	STEMI-SR	Zeiss
Sterilbank	Biohit	Helios
Zentrifuge	6K15	Sigma

Verbrauchsmaterial:

Nitrozellulosefilter	Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm	Sartorius
Filterpapier	steril	Whatman
Petripermschalen	hydrophil, steril, Durchmesser 60 mm	Vivascience
Petrischalen	steril, Durchmesser 35 mm	Greiner

2.2.1.3 Beschichtungen der Petripermschalen

Die Kultivierung der Retinaexplantate erfolgte in Petripermschalen, die aufgrund des Membranbodens einen optimalen Gasaustausch für die Präparate gewährleisten können. Durch die Kombination von Poly-D-Lysin und Laminin konnte die Adhäsion des Gewebes am Substrat erhöht werden und führte so zu einer Steigerung des axonalen Wachstums. Zur sterilen Doppelbeschichtung der Petripermschalen wurden diese zunächst mit 1,5 ml

Poly-D-Lysin in HBSS-Puffer (ca. 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschickt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Abnehmen der Lysinlösung und dreimaligem Waschen mit HBSS-Puffer erfolgte die Beschichtung mit 1,5 ml Laminin in HBSS-Puffer (ca. 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 3 bis 4 h bei 37°C. Erst kurz vor dem Aufbringen der explantierten Retina auf den beschichteten Membranboden der Petripermschale wurde die Lamininlösung entfernt.

2.2.1.4 Explantation der Retinae

Die zur Eukleation vorgesehenen Ratten (Sprague Dawley) wurden mittels Kohlendioxid eingeschläfert. Die Entnahme des Bulbus wurde mit einer gebogenen Augenschere durchgeführt. Nach dem Durchtrennen des Sehnervs wurde das Auge in HBSS bis zur anschließenden Präparation überführt. Die gesamte Präparation der Retina erfolgte in HBSS-Puffer, der zuvor mit Sauerstoff angereichert und auf 4°C gekühlt wurde. Die Öffnung des Bulbus erfolgte unter Verwendung einer Kapsulotomieschere mit einem äquatorialen Schnitt entlang des Limbus. Zur weiteren Präparation wurde der hintere Augenabschnitt in frischen HBSS-Puffer überführt. Mehrmaliges Wechseln des Puffers verringerte die Möglichkeit einer Kontamination durch Keime, die dem Auge anhafteten. Die Sklera wurde mit vier Papillen-zentrierten Schnitten in eine flache Form überführt. Das Ablösen der Sklera von der Choroidae und der Retina wurde mit zwei Uhrmacherpinzetten Nr. 4 und Nr. 5 durchgeführt. Nach dem Durchtrennen des optischen Nerven konnten die Gewebsschichten vollständig voneinander getrennt werden. Die isolierte Retina wurde auf einem Nitrozellulosefilter fixiert. Retina und Filter wurden mehrmals aus dem Puffer entnommen und kurz auf Whatmanpapier gelegt. Auf diese Weise wurde die Haftung der Retina auf dem Filter verbessert. Nachfolgend wurde mit einer Pinzette der Glaskörper von der Retina entfernt. Mit einem Gewebehacker wurden die Retinaexplantate in Viertel getrennt.

2.2.1.5 Kultivierung der Retina

Die Kultivierung der Retina erfolgte in Petriperm Kulturschalen, wobei die Retina mit der Ganglienzellschicht der Membran zugewandt kultiviert wurde. Die Kulturschale ist zuvor mit poly-d-Lysin über Nacht und anschließend mit Laminin für maximal 3 Stunden beschichtet worden. Um eine Verbesserung der Adhärenz der einzelnen Retinaexplantate zu erreichen, ist das vollständige Kulturvolumen von 3,5 ml erst nach einstündiger Vorinkubation mit 50 bis 100 μl Medium hinzugefügt worden. Zuvor sind die Explantate

nur mit ein bis zwei Tropfen des S4 Mediums inkubiert worden. Die *in vitro* Kultivierung des retinalen Gewebes erfolgte bei 37°C, 5% Kohlendioxid, 50% Sauerstoffgehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100%. Eine Auswertung erfolgte nach 24, 50 und 74 Stunden.

2.2.1.6 Erstellung dissoziierter retinaler Zellkulturen

Im Anschluss an die Explantation, wie sie oben beschrieben wurde, wurde die Retina mit Hilfe von unterschiedlichen Pipetten weiter zerkleinert. Die so fragmentierte Retina wurde im Dissoziationsansatz I für 11 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zentrifugation des Gemisches bei 600 g und 15°C für 2 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde im Dissoziationsansatz II resuspendiert. Nach erneuter Inkubation bei 37°C für 11 Minuten wurde erneut zentrifugiert. Die zweite Zentrifugation erfolgte unter gleichen Bedingungen wie die vorangegangene. Das entstandene Pellet wurde dreimal mit 5 ml PBS gewaschen. Die nunmehr dissoziierten retinalen Zellen wurden sowohl in entsprechend beschichteten Petripermschalen, als auch in 6-Well Kulturplatten kultiviert. Als Medium wurde das S4 Medium verwendet. Das Kulturvolumen in den Petripermschalen betrug 3,5 ml, das in den 6-Well Platten jeweils 1,5 ml. Die Inkubation erfolgte für 48 bis 148 h bei 37°C, 50% O₂, 5% CO₂ sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100%.

2.2.1.7 Transfektion von dissoziierten retinalen Zellen und retinalem Gewebe

Die Transfektion der dissoziierten retinalen Zellen erfolgte mit Lipofectamine 2000® (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Transfektion des explantierten retinalen Gewebes erfolgte auf die Weise, dass die zu transfizierende Retina mit der Ganglienzellschicht nach oben in die Vertiefung einer 6-Well Platte gelegt wurde. Direkt auf die Retina wurden 200 µl DMEM Medium als auch das Transfektionsgemisch mit einem Volumen von 50 µl geben. Die Zusammensetzung des Transfektionsgemisches erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die jeweils eingebrachte DNA Menge lag zwischen 1 und 20 µg. Lipofectamine 2000® wurde mit 5 bis 20 µg eingesetzt. Die Dauer der Inkubation des Transfektionsansatzes lag zwischen 1 und 24 h. Nachfolgend wurde das Transfektionsmedium entfernt und die Kultur mit 1,5 ml

S4 Medium aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 24 bis 72 h bei 37°C, 50% O₂, 5% CO₂ sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100%.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Chemikalien, Medien und Puffer

Serum und Lösungen:

Föetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA

Dulbecco's Modified Eagle Medium, (DMEM, PAA):

DMEM mit L-Glutamin und Glucose (4,5 g/l)

Hank's buffered salt solution, pH 7,5 (HBSS, Gibco):

NaCl	8000 mg/l	Glucose	1000 mg/l
KCl	400 mg/l	NaHCO ₃	350 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l	Phenolrot	10 mg/l
Na ₂ HPO ₄	48 mg/l		

2.2.2.2 Geräte

Einwegpipetten	1, 5, 10, 15 ml	Falcon
Inkubator	Function line	Heraeus
Kulturflaschen	T25, T75 Cellstar	Greiner
Kulturröhrchen	15, 25 ml	Greiner
Kulturplatten	TC-Plate, 6 Well	Greiner
Mikroskop	Axiophot mit Epifluoreszenz	Zeiss
Wasserbad	1083	GFL
Werkbank	Hera safe	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge	6K15	Sigma

2.2.2.3 Kultivierung von Zellen

Es handelt sich bei den hier untersuchten Zellen um immortalisierte Ganglienzellen mit der Bezeichnung RGC-5. Die Zellen wurden von Prof. Dr. N. Agarwal (Fort Worth, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Temperatur:	37°C
P (CO ₂):	5%
Rel. Luftfeuchtigkeit:	100%

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Kulturflaschen des Typs T25 und T75. Als Kulturmedium wurde DMEM mit den Zusätzen FCS (10%) und Penicillin/Streptomycin (1%) eingesetzt. Die im Zuge des Umsetzens der Zellen verwendeten Lösungen sind sämtlich auf 37°C temperiert worden. Das Umsetzen der Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- I. Den Kulturüberstand absaugen.
- II. Die Zellen mit 5 ml HBBS waschen.
- III. Durch die Zugabe von 2 ml Trypsin / EDTA Zellen ablösen.
- IV. Nachfolgend den Trypsinierungsansatz bei 37°C für maximal 2 min. inkubieren.
- V. Regelmäßig das Fortschreiten der Trypsinierung kontrollieren.
- VI. Die Zellsuspension abnehmen und mit 8 ml Medium in einem 15 ml Falcon für 5 min bei 400g zentrifugieren.
- VII. Den Überstand verwerfen.
- VIII. Das Zellpellet in 2 ml supplementierten Medium resuspendieren.
- IX. Jeweils 1 ml der Zellsuspension in eine, mit 9 ml supplementierten DMEM beschickte Kulturflasche (T75), füllen.
- X. Die umgesetzten Zellen bei 37°C inkubieren.

2.2.2.4 Transfektion der RGC-5 Zellen

Die Transfektionen der RGC-5 Zellen wurden mit Lipofectamine 2000® (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3 Immunhistologische Untersuchungen

Immunhistologische Untersuchungen wurden sowohl an ganzen Retinae als auch an Kryostatschnitten der Retina durchgeführt.

Die verwendeten Antikörper sind in der Lage, mit spezifischen Antigenen eine Bindung einzugehen. Hierbei kann es sich sowohl um membranständige Strukturen handeln, die von der Zelle exprimiert werden, als auch um einzelne Zielproteine.

Nachdem die Bindung zwischen Antigen und primären Antikörper erfolgt ist, kann mit dem sekundären Antikörper der Farbstoff in das Präparat eingebracht werden. Der zweite Antikörper ist mit einem fluoreszenzaktiven Ringsystem gekoppelt, das bei Anregung durch die entsprechende Wellenlänge eine Fluoreszenz erzeugt, die mit den jeweiligen Filtern im Mikroskop detektiert werden kann. Der sekundäre Antikörper erkennt sehr spezifisch den primären Antikörper und bindet an ihn. So kann indirekt das eigentliche Ziel markiert werden.

2.3.1 Material

Einbettungsmedium für Kryostatschnitte:

Tissue-Tek	Sakura
------------	--------

Blockierungslösung:

Fötales Kälberserum (10%)	Seromed
---------------------------	---------

Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4 (PBS):

NaCl	9 g
Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,42 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Fixierlösung:

Paraformaldehyd (PFA)	40 g
PBS	ad 1000 ml

Die Suspension wurde unter Erwärmen (max. 56°C) gerührt, bis sich der Feststoff gelöst hat. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

Eindeckelmedium:

Mowiol 4-88

Hoechst

12 g Mowiol wurden zunächst in 30 g fluoreszenzfreiem Glycerol gelöst und mit 30 ml Aqua dest. versetzt. Im Anschluss wurden weitere 60 ml einer 0,2 M Tris/HCl Lösung (pH 8,5) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 56°C für 10 min leicht gerührt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 5000 g für 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Aufgetaute Aliquots wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33258 (Sigma) in einer Konzentration von 10 µg/ml versetzt.

Beschichtung der Objektträger:

Die Objektträger (Engelbrecht, Edermünde) wurden mit absolutem Alkohol gereinigt. Es folgte eine Behandlung mit filtrierter Beschichtungslösung [0,5% Gelantine (Sigma) und 0,05% $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck)]. Nachfolgend wurden die Objektträger für ca. 2 h in staubfreier Umgebung getrocknet.

Erstantikörper (alle IgG, mc, mouse):

Anit-GAP-43	Verdünnung 1:500	Sigma
Anit-Neurofilament	Verdünnung 1:100	Sigma
Anti-Rhodopsin	Verdünnung 1:100	Chemicon

Fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper (alle IgG, goat):

Anti-Mouse-Cy-2	Verdünnung 1:200	Jackson Immuno Research
Anti-Mouse-TRITC	Verdünnung 1:300	Sigma

Geräte und weitere Materialien:

Dokumentation	Axiovision	Zeiss
Filterpapier		Whatman
Fluoreszenzfilter	395 bis 440 nm	Zeiss
	450 bis 490 nm	
	510 bis 560 nm	
Kryostat	2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Mikroskop	Axiophot mit Epifluoreszenz	Zeiss
Nitrozellulosefilter	Porengröße 0,45 µm	Sartorius
Objektträger		Engelbrecht
Petrischalen	Durchmesser 35 mm	Greiner

2.3.2 Erstellen der Kryostatschnitten

Für die Erstellung von Kryostatschnitten wurden Retinaexplantate wie bereits beschrieben explantiert. Es folgte eine Fixierung für ca. 1 h in PFA-Lösung (4%) und eine Inkubation in Saccharose-Lösung (30%) über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurden die Retinae auf plan-geschnittene Tissue-Tek-Blöcken aufgebracht und eingefroren. Die erstellten Schnitte wiesen in der Regel eine Schichtdicke von 10 µm auf.

2.3.3 Immunhistochemische Färbung der Kryostatschnitte

Das folgende immunhistologische Protokoll kam zur Anwendung:

- I. In -20°C kaltem Methanol (Merck) wurden die Kryostatschnitte für 10 min fixiert.
- II. Mit PBS pH 7,4 wurden die Präparate dreimal für 5 min gewaschen.
- III. Die Schnitte wurden nachfolgend in 10%iger FCS Lösung für 30 min geblockt.
- IV. Im Anschluss an das Blocken wurde das Präparat für 5 min mit PBS pH 7,4 gewaschen.
- V. Es folgte die Applikation des Erstantikörpers in der entsprechenden Verdünnung und die Inkubation in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 4°C über Nacht.
- VI. Im Anschluss an die Inkubation wurde dreimal mit PBS pH 7,4 für je 5 min gewaschen.
- VII. Es folgte die Applikation des Zweitantikörpers und die anschließende Inkubation in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei Raumtemperatur für eine Stunde ohne Lichtexposition.
- VIII. Nachfolgend wurden die Präparate mit PBS pH 7,4 dreimal für je 5 min gewaschen.
- IX. Das Einbetten der Schnitte erfolgte in Mowiol (DAPI-Zusatz: 5µ/mL).
- X. Nach der mikroskopischen Auswertung wurden die Präparate bei -20 °C gelagert.

Die entsprechenden Negativkontrollen wurden bei sonst identischer Versuchsdurchführung mit FCS (10%) ohne Erstantikörper durchgeführt. Bei Doppelfärbungen wurden die entsprechenden Erst- bzw. Zweitantikörper parallel eingesetzt.

2.3.4 Immunhistochemische Färbung von Retina-Gesamtpräparaten

Zur Unterscheidung des glialen oder neuronalen Ursprungs von ausgewachsenen Fortsätzen kultivierter Retinaexplantate wurde eine immunhistochemische Färbung des gesamten Explantats gegen das 200 kDa Neurofilament durchgeführt.

Die zu untersuchenden Explantate wurde ca. 2 h in PFA-Lösung (4%) bei Raumtemperatur fixiert. Das Fixativ wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 20 min entfernt. Die nachfolgende Immunfärbung der Explantate erfolgte analog des oben beschriebenen Protokolls. Zum Abschluss der Färbung wurde die jeweilige Retina samt des Membranbodens der Petriperm Kulturschale ausgeschnitten und auf einem Objektträger mit Mowiol (DAPI-Zusatz: 5µ/mL) eingebettet.

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate wurde mit dem Mikroskop Axiophot (Zeiss) vorgenommen.

2.4 Biochemische Verfahren

2.4.1. Material

2.4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien:

Acrylamid-Stammlösung (0,8% Bisacrylamid, 30% Acrylamid)	Roth
Agarose	Merck
Ammoniumsulfat p.A.	Merck
Ampholine® 3,5 - 9,5	Pharmacia
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
BenchMark® pre-stained	Invitrogen
Benzonase	Merck
β-Mercaptoethanol, p.A.	Sigma
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromphenol-sulphonaphtalein)	Sigma
BSA (Rinderserumalbumin), Standard für Proteinbestimmung	Sigma
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
<i>DryStrip</i> Cover Fluid	Amersham

DTT (Dithiothreitol)	Roche
ECL („Enhanced Chemoluminescence“)	Amersham
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma
Essigsäure (96%)	Roth
Ethanol (absol.)	J.T. Baker
Formaldehydlösung (37%)	Sigma
Glycerin (87%)	Roth
Glycin	Merck
Harnstoff, ultra pure	Merck
Iodoacetamid	Sigma
Isobutylalkohol (2-Methyl-1-propanol)	Sigma
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Magermilchpulver (Laboranwendung)	Merck
Methanol	Sigma
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck
Natriumdihydrogensulfat-Dihydrat	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Phosphorsäure (85%)	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Ponceau-S	Sigma
Rainbow-Marker® (10-250 kDa)	Amersham
Saccharose	Merck
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Sigma
TEMED (N, N, N',N'-Teramethylendiamin)	Sigma
Thioharnstoff	Merck
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Fluka

Alle weiteren Chemikalien wurden in von den Firmen Merck oder Sigma bezogen.

Verbrauchsmaterial:

Halbmikroküvetten	Sarstedt
IPG-Streifen (pH 4-7, 18 cm)	Amersham
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham
Röntgenfilme Chronix	Agfa

Whatmann Filterpapier dick und dünn 3 MM

2.4.1.2 Geräte und Zubehör

Gelgießapparatur für Polyacrylamid-Minigele und Zubehör:

7 Sets Glasscheiben, Spacer 0,75mm, Trennscheiben aus Plexiglas, Probenkämme;

Elektrophoreseapparatur für PAGE	Harnischmacher
Reswelling Tray	Amersham
EttanDALT Six Gel Caster für 2D-Polyacrylamid-Gele	Amersham
Multiphor II und Zubehör für die isoelektronische Fokussierung	Amersham
EttanDALT Six Electrophoresis Unit	Amersham
Biologische Testschalen (25 x 25 cm)	Nunc

Stromversorgung:

EPS 3501 XL	Amersham
Power Pac 3000	BioRad
Power Supply Modell 200/2.0	BioRad

Relevante Peripheriegeräte:

pH-Elektrode	pH-Meter 766 Calimetric	Knick
Tischzentrifuge	5415 C	Eppendorf
Zentrifuge	6K15	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator	UW 70	Bandelin
Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia
Blockthermostat	BT 200	Kleinfeld
Kühlung	ProfiCool	Ominlab
Schüttler	Vibrax VXR	IKA
Automatischer Röntgenfilmentwickler		Agfa

Dokumentation:

Scanner	Perfection 1660 Photo	Epson
Software	Smart Panel	Epson
Densitometrie-Programm	AlphaEaseFC 4.0	

2.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels der Methode nach Bradford (1976). Im Rahmen dieser Bestimmung wird Brilliant Blue G 250 selektiv von den zu bestimmenden Proteinen gebunden, so dass sich bei der photometrischen Analyse das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Da der Extinktionskoeffizient über einen weiten Konzentrationsbereich konstant bleibt, kann die Proteinkonzentration bei geeigneter Probenverdünnung unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes photometrisch bestimmt werden.

Bradford-Reagenz: 0,01% Coomassie Brilliant Blue G 250
 8,5% Phosphorsäure
 4,7% Ethanol

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein definiertes Volumen der entsprechenden Probenlösung mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt und nach Applikation von 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde ein Aliquot des Ansatzes in eine Halbmikroküvette überführt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Die Ermittlung einer Standardkurve erfolgte mit Hilfe definierter Mengen BSA (2 bis 10 µg) in gleicher Weise. Hierbei wurde derselbe Lysepuffer zum Auffüllen auf das endgültige Probenvolumen verwendet, um Harnstoff- und Detergenzien-bedingte Verschiebungen in der Absorption auszugleichen.

2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE dient zur Auftrennung komplexer Proteingemische. Hierzu erfolgt zunächst eine Denaturierung der Proteine durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS zu den jeweiligen Proben, wodurch die Proteine eine gleiche Ladungsdichte entwickeln. In der sich nun anschließenden elektrophoretischen Auftrennung wandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe in Richtung der Anode, wobei sie durch die Dichte der porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das diskontinuierliche Puffersystem bei unterschiedlich dichtem Trenn- und Sammelgel führt dabei zur Erhöhung der Auflösung der Auftrennung.

Dieses Verfahren fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit Anwendung zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen sowie zur Auftrennung von Proteinen für

Western Blots als auch als zweiter Teilschritt im Anschluss an eine isoelektronische Fokussierung.

2.4.3.1 Lösungen

Zur Durchführung wurden nachfolgende Stammlösungen angesetzt, die bis zur jeweiligen Verwendung im Kühlschrank bei 4 bis 7°C gelagert wurden.

Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
0,4% SDS

Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,4% SDS

Laufpuffer (10x): 250 mM Tris
1,92 M Glycin
0,1% SDS

Lysepuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
300 mM Saccharose
0,1 mM EDTA
1% Triton
0,1% β -Mercaptoethanol
0,1 mM PMSF, Zugabe kurz vor Anwendung

Probenpuffer: 130 mM Tris/HCl, pH 6,8
10% SDS
10% β -Mercaptoethanol
20% Glycerin
0,06% Bromphenolblau

Lyse- und Probenpuffer wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Sammelgel-, Trenngel- sowie Laufpuffer wurden zur Verlängerung der Anwendbarkeit 0,02% NaN_3 zugesetzt.

2.4.3.2 Gießen der Gele

Die Gele wurden im Miniformat gegossen. Hierzu wurde eine kleine Glasscheibe mit entsprechenden Aussparungen durch Spacer getrennt auf eine große Glasscheibe platziert. Mehrere so zusammengesetzte Gelformen wurden nachfolgend in den Gelgießstand eingefügt, wobei der verbleibende Platz im Gießstand mit Plexiglasplatten aufgefüllt wurde. Durch den abschließenden Einsatz einer großen Platte und entsprechender Klammern wurde der gesamte Block, der nun mehrere Gelformen beinhaltet, abgedichtet. Es wurden in der Regel 5 Gele mit den Dimensionen 85 x 100 x 0,75 mm (L x B x T) parallel gegossen. Zunächst wurde das Trenngel eingefüllt, das einen Trennbereich von 12% abdecken sollte. Zu diesem Zwecke wurden folgende Lösungen mit entsprechenden Volumina eingesetzt:

Acrylamid-Stammlösung (30%)	24 ml
Trenngelpuffer (4x)	15 ml
Aqua dest.	21 ml

Die Polymerisation dieses Gemisches wurde durch die Zugabe von 50 µl Temed und 100 µl APS (20%) ausgelöst. Nach der Zugabe wurde die Trenngelmischung rasch in den Gelgießstand eingefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass ca. 3 cm Abstand zum oberen Plattenrand eingehalten wurden, um später das Sammelgel aufzufüllen. Die frisch gegossenen Gele wurden jeweils mit 1 ml Isobutylalkohol überschichtet, um Reaktionen mit dem Luftsauerstoff auszuschließen und einen gleichmäßigen Abschluss der Trenngele gewährleisten zu können. Nach Beendigung der Polymerisation (ca. 1 Stunde) wurde der Alkohol entfernt und die Geloberfläche mit Aqua dest. gereinigt. Es folgte das Einsetzen der Probenkämme und das Gießen der Sammelgele unter Verwendung folgender Lösungen mit entsprechenden Volumina:

Acrylamid-Stammlösung (30%)	3 ml
Sammelgelpuffer (4x)	5 ml
Aqua dest.	12 ml

Zur Induktion der Polymerisationsreaktion wurden 30 µl Temed und 60 µl APS (20%) hinzugefügt. Die noch flüssigen Sammelgele wurden sodann mit einer Pasteurpipette aufgetragen. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels, was nach ca. 0,5 h bei Raumtemperatur der Fall war, wurden die Gele aus dem Gießstand entnommen und zum

Schutz vor Austrocknung in Cellophanfolie verpackt, sofern diese Gele nicht direkt zum Einsatz kamen. Gegossene Gele wurden spätestens innerhalb von 14 Tagen verwendet.

2.4.3.3 Probenaufbereitung, Probenauftrag und Elektrophoresebedingungen

Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde zum einen die Expression des GAP-43 im Verlauf der postnatalen Maturation verfolgt, zum anderen wurde die Expression des GAP-43/GFP-Fusionsproteins verifiziert. Für die Analysen bezüglich des GAP-43 wurden jeweils 4 bis 6 Retinaexplantate in 100 bis 200 µl Lysepuffer aufgenommen und mit einem Micropistil (Eppendorf) mechanisch zerkleinert. Das Proteingemisch zur Bestimmung der GAP-43/GFP-Expression wurde auf ähnliche Weise aus konfluenten RGC-5 gewonnen. Hierzu wurden die Kulturen aus 2 bis 3 Vertiefungen einer 6-Well Platte mit 100 bis 200 µl Lysepuffer herausgespült und mechanisch aufgeschlossen. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer feinen Kanüle sowie Sonifizierung der Proben (3 x 3 Stöße, 50% Intensität) wurden diese weiter aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (15000 g, 20 min, 4°C, Sigma Zentrifuge) abgetrennt. Der Überstand mit dem löslichen Proteinanteil wurde abgenommen, so dass nachfolgend der Proteingehalt mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt werden konnte. Die jeweiligen Probenlösungen wurden mit Probenpuffer versetzt (Verdünnung: 3 + 1). In einem Thermoblock wurden nachfolgend die Proben zur vollständigen Denaturierung erhitzt (5 min, 95°C) und im weiteren Verlauf kurz gemischt und herunter zentrifugiert.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Im Anschluss wurde das obere als auch das untere Pufferreservoir mit 150 ml Laufpuffer beschickt. Nach der Entnahme der Probenkämme aus den Gelen, wurden die vorbereiteten Proben mittels einer Pipette in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde durch das Anlegen einer Spannung von 100 V gestartet und nach Übergang der Lauffront in das Trenngel bei 250 V fortgeführt. Hatte die Bromphenolblaufront das Ende des Geles erreicht, wurde die Auftrennung gestoppt.

2.4.3.4 Coomassie-Färbung der Gele

Um die Auftrennung der Proteine nach abgeschlossener Elektrophorese, sowie die Homogenität der Probenauftragsmenge und der nach dem Blotten im Gel verbliebenen Proteinmengen zu kontrollieren, wurden die Gele mit Coomassie gefärbt.

Die Coomassie-Färbung beruht auf der selektiven Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue 250 G an Proteine. Sie ist einfach und schnell durchführbar, kann jedoch Protein nur bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 100 ng pro Bande detektieren.

Die Polyacrylamidgele wurden zur Fixierung und Färbung unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für ca. 20 min in der Färbelösung inkubiert. Nach dem Abgießen der Färbelösung und dem Abspülen von Färberesten mit Wasser wurden die Gele wiederholt mit der Entfärbelösung gewaschen. Waren die Proteinbanden deutlich sichtbar, wurde der Entfärber gegen Aqua dest. und Essigsäure ausgetauscht. Eine vollständige Entfärbung zur Beseitigung des Hintergrundes wurde das Gel bei 4°C über Nacht in dieser Lösung belassen.

Coomassie-Färbelösung: 0,2% Coomassie Brilliant Blue G 250
 10% Essigsäure
 50% Methanol

Die Coomassie-Färbelösung wurde nach dem Ansetzen filtriert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Lösung konnte wiederholt eingesetzt werden.

Entfärbelösung: 7,5% Essigsäure
 30% Ethanol

2.4.4 Western Blotting

2.4.4.1 Proteintransfer

Beim Western Blot werden Proteine aus einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nachfolgend werden Antikörper auf die Membran gegeben, so dass spezifische Proteine detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Semidry-Blotting-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Im Rahmen dieser Versuchsdurchführung wurde folgender Transferpuffer verwendet:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20%

Das Polyacrylamidgel sowie entsprechend dimensioniertes Whatmanpapier als auch die Nitrozellulosemembran wurden für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Danach wurden auf der Anode des Semidry-Blotting-Gerätes zunächst 3 Lagen Whatmanpapier, gefolgt von der Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel sowie 3 weiteren Lagen Whatmanpapier aufgebracht. Um etwaige Luftblasen zu entfernen, wurde mit einem Glasstab mehrmals über die Anordnung aus verschiedenen Schichten gerollt. Im Anschluss wurde die Kathode aufgesetzt und der Proteintransfer durch das Anlegen einer Spannung von 10 V für 1 h gestartet.

Der quantitative Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch eine Coomassie-Färbung des Gels sowie einer Ponceau-Färbung der Membran überprüft. Letztere diente gleichzeitig zur besseren Fixierung der Proteine auf der Membran und zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge. Die Membran wurde hierzu nach dem Semidry-Blotting für 5 min in der Ponceau-S-Färbelösung inkubiert und nachfolgend mit Aqua dest. bis zur Differenzierung der Banden vom Hintergrund gewaschen. Die vollständige Entfärbung erfolgte durch einen Waschvorgang mit TBST.

Ponceau-S-Färbelösung: 0,2% Ponceau
 3% Tricholressigsäure

2.4.4.2 Detektion und immunologischer Nachweis

Für die nachfolgend beschriebene immunochemische Detektion der aufgetrennten Proteine auf der Membran wurden folgende Puffer und Antikörper verwendet:

Tris-buffered saline-Tween (TBS-T): 10 mM Tris/HCl, pH 7,6
 150 mM NaCl
 0,1% Tween-20

Erstantikörper (alle IgG, mc, mouse):

Anti-GAP-43	Verdünnung 1 : 2000	Sigma
Anti-GFP	Verdünnung 1 : 2000	BD Biosciences

Peroxidase-konjugierte-Zweitantikörper:

Anti-mouse IgG (goat)	Verdünnung 1: 5000	Sigma
-----------------------	--------------------	-------

Für den immunologischen Nachweis bestimmter Antigene in den aufgetrennten Proben wurde das folgende Protokoll verwendet:

- I. Blocken unspezifischer Bindungen durch die Inkubation der Nitrozellulosemembran in einer Magermilchpulversuspension (5% in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur
- II. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T
- III. Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper: in TBS-T verdünnt, über Nacht bei 4°C
- IV. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T
- V. Inkubation mit dem Zweitantikörper: in TBS-T verdünnt, 1 h bei Raumtemperatur
- VI. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T
- VII. Nachweisreaktion:

Die Detektion erfolgte aufgrund der Chemilumineszenz als Folge der Reaktion der an den Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase mit ECL: Dazu wurde der Blot in einer im Verhältnis 1 : 1 angesetzten Mischung aus ECL-Lösung 1 und 2 für 1 min inkubiert, mit der Rückseite auf eine trockene Glasplatte gelegt und mit Cellophanfolie überzogen. Durch Auflegen und Belichten eines Röntgenfilms sowie dessen nachfolgender Entwicklung konnten die entsprechenden Banden sichtbar gemacht werden.

Parallel zu den Western Blots wurden entsprechende Negativkontrollen durchgeführt, bei denen auf eine Inkubation mit dem Erstantikörper verzichtet wurde. Ein gleich stark konzentrierter Proteinauftrag wurde durch Coomassie-Färbung gewährleistet.

2.4.5 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese handelt es sich um eine hoch auflösende Technik zur Analyse komplexer Proteingemische. Dabei werden die Proteine in zwei aufeinander folgenden Schritten aufgetrennt:

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, werden die gelösten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Gel, das einen immobilisierten pH-Gradienten aufweist, entsprechend ihrer Molekülladung getrennt. Die amphoteren Proteine wandern dabei im elektrischen Feld, bis sie den pH-Wert erreicht haben, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist, dem so genannten isoelektrischen Punkt (IP). Dieser resultiert aus dem Anteil basischer und acider Aminosäuren eines Proteins.

In der nachfolgenden zweiten Dimension werden die isoelektrisch fokussierten Proteine mit der bereits beschriebenen SDS-PAGE aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt. Es resultiert ein zweidimensionales Verteilungsmuster verschiedenster Proteine, das eine quantitative und qualitative Proteomanalyse der Proben erlaubt.

2.4.5.1 Lösungen

Zur Durchführung wurden nachfolgende Lösungen angesetzt und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C aufbewahrt:

Einzellösungen:

- 5,3 M DTT
- 10% SDS
- 100 mM PMSF (gelöst in Isopropanol)
- 1% Bromphenolblau

Lysepuffer:

- 7 M Harnstoff
- 2 M Thioharnstoff
- 4% Chaps
- 2% Pharmalyte 3 - 10

Rehydratisierungslösung:

- 8 M Harnstoff
- 0,2% Chaps
- 0,002% Bromphenolblau

Äquilibrierungslösung:

- 50 mM Tris/HCl, pH 8,8
- 6 M Harnstoff
- 30% Glycerol
- 2% SDS
- 0,002% Bromphenolblau

Des Weiteren wurden für die zweite Dimension die unter „diskontinuierliche SDS-PAGE“ aufgeführten Lösungen verwendet.

2.4.5.2 Probengewinnung

Zur Gewinnung des Probenmaterials für die proteinbiochemischen Untersuchungen wurden die Retinaexplantate nach erfolgter Kultivierung und Quantifizierung der axonalen Fortsätze mit kalter isotonischer Saccharose-Lösung (8,5%) gewaschen und in einem Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt. Die gesammelten Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Auf gleiche Weise wurde mit retinalen Explantaten verfahren, die zuvor nicht kultiviert worden waren.

2.4.5.3 Probenaufbereitung

4 bis 6 Retinaexplantate wurden zunächst mit 20 µl SDS (1%), 2 µl PMSF (10 mM) und 0,5 µl DTT (5,3 M) versetzt und für 5 min bei 95°C zur Inaktivierung der Proteasen und Denaturierung erhitzt. Nach erneuter Zugabe von 1 µl PMSF sowie 5 µl MgCl₂ (10 mM) und 2 x 1 µl Benzonase (zeitversetzt nach 15 min) erfolgte eine Inkubation der Proben für 30 min bei 37°C, um vorhandene DNA als auch RNA zu degradieren. Im Anschluss wurden die Proben mit 170 µl Lysepuffer versetzt und mit einem Micropistil mechanisch zerkleinert. Zur weiteren Homogenisierung des Ansatzes wurde dieser auf Eis sonifiziert (3 x 3 Stöße, 50% Intensität). Dabei galt es, eine Erhitzung der Probe zu vermeiden, um einen Zerfall des Harnstoffes und einer Carbamoylierung der Proteine entgegen zu wirken. Zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile wurden die Ansätze zentrifugiert (15000 g, 40 min, 4°C, Sigma Zentrifuge). Der Überstand wurde im Anschluss mit einer Pipette abgenommen und der bereits beschriebenen Probenbestimmung zugeführt.

2.4.5.4 Probenauftrag und Rehydratation der IPG-Streifen

Die IPG-Streifen (pH 4 - 7, 18 cm) wurden mit 1200 µg Protein beladen. Dazu wurde das entsprechende Probenvolumen mit Rehydratationslösung und unter Zusatz von jeweils 2% DTT und Ampholinen auf 350 µl ergänzt, gemischt und in je eine Vertiefung des *DryStrip Reswelling Trays* überführt. Die dehydratisierten IPG-Streifen wurden so dann mit der Gelseite der Probe zugewandt in den Vertiefungen platziert. Etwaige Luftblasen unter dem IPG-Streifen wurden mit einer Pinzette entfernt und die Gelstreifen zum Schutz vor Luftsauerstoff und dem Ausfallen des Harnstoffes mit *Cover Fluid* überschichtet. Die

Rehydratation der IPG-Streifen und die Aufnahme der Proteine erfolgten über Nacht bei Raumtemperatur.

2.4.5.5 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Mit Hilfe des auf 18°C eingestellten Multiphor II Gerätes wurde die isoelektronische Fokussierung durchgeführt. Nachdem die Kühlplatte des Gerätes mit Aqua dest. gefüllt worden war, wurde der *DryStrip Tray* aufgelegt und an die Stromversorgung angeschlossen. Bei diesem Vorgang war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen der Kühlplatte und dem *Tray* bildeten. Nachfolgend wurde das *DryStrip Tray* mit *Cover Fluid* bedeckt. Letztendlich wurde noch der eigentliche Träger der IPG-Streifen, der *Dry Strip Aligners* in das *Cover Fluid* unter Vermeidung von Luftblasen eingefügt. Die rehydratisierten IPG-Streifen wurden mit einer Pinzette dem *Reswelling Tray* entnommen und durch das kurzzeitige Eintauchen in Aqua dest. von restlichen Lösungsrückständen befreit. Die IPG-Streifen wurden nachfolgend so in den *Dry Strip Aligner* eingefügt, dass das Gel nach oben und die acide Seite des Streifens zur Anode ausgerichtet waren. Danach wurde mit Aqua dest. befeuchtetes Filterpapier zur besseren Stromweiterleitung quer über die Enden der IPG-Streifen gelegt und mit Steckeletroden auf den schmalen Gelen fixiert. Nachdem die Streifen mit *Cover Fluid* überschichtet worden waren, wurde folgendes Fokussierungsprogramm gestartet:

- | | |
|----------------------|-------------------------|
| I. 150 V für 1 h | VI. 1800 V für 15 min |
| II. 300 V für 1 h | VII. 2300 V für 15 min |
| III. 600 V für 1 h | VIII. 2800 V für 15 min |
| IV. 800 V für 30 min | IX. 3500 V für 20 h |
| V. 1300 V für 15 min | |

Die stufenweise Anhebung der Spannung führte zu einer Entfernung der Salzionen aus den Gelstreifen, bevor die eigentliche Fokussierung bei einer hohen Spannung erfolgte. Durch die Lauffront des zugegebenen Bromphenolblau, konnte der korrekte Ablauf der Fokussierung kontrolliert werden.

2.4.5.6 Gießen der Gele

Die Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension erfolgte über 12,5%ige SDS-Gele. Der Gießstand wurde abwechselnd mit Glasformen für die Gele und Plexiglasplatten bestückt.

Der verbleibende Freiraum im Gießstand, der je nach Anzahl der zu gießenden Gele variiert, wurde mit weiteren Plexiglasplatten aufgefüllt. Der Gießstand wurde nun mit einer stärkeren Plexiglasscheibe geschlossen, die mit Hilfe von Klammern fixiert wurde. Es wurden in der Regel 6 Gele mit den Abmessungen 85 x 100 x 1 mm (L x B x T) unter Verwendung der nachfolgenden Komponenten mit den entsprechenden Volumina gegossen:

Acrylamid	187,5 ml
Trenngelpuffer (4x)	112,5 ml
Aqua dest.	150,0 ml

Vor dem Einfüllen der Lösung in den Gelgießstand wurde die Polymerisationsreaktion durch die Zugabe von 300 µl Temed und 750 µl APS (20%) gestartet. Dabei wurden ca. 2 cm bis zum oberen Rand der Glasplatten frei gelassen und jedes Gel mit 1 ml Isopropanol überschichtet, das nach vollständiger Polymerisation wieder von den Gelen entfernt wurde. Der verbleibende Freiraum über den Gelen in den Glasformen wurde mit Aqua dest. gefüllt und die Gele bis zu 3 Tagen bei 4°C gelagert. Das Gießen eines Sammelgels erübrigte sich hier durch die Verwendung der IPG-Streifen.

2.4.5.7 Äquilibration der fokussierten IPG-Streifen

Zur Vorbereitung der nachfolgenden SDS-PAGE wurden die fokussierten IPG-Streifen zweimal für je 15 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Zu diesem Zweck wurden jeweils 8 ml Äquilibrationlösung mit 80 µl β-Mercaptoethanol im ersten Äquilibrationsschritt und 200 mg Iodoacetamid im zweiten Schritt versetzt. Die Lösungen der entsprechenden Äquilibrationsschritte wurden in den *Reswelling Tray* gefüllt, in dem dann unter leichter Bewegung mit einer Pinzette die Äquilibration der IPG-Streifen erfolgte. Im Zuge des ersten Schrittes kommt es zu einer vollständigen Reduktion der Proteine und zur Ausbildung gleicher negativer Ladungsverhältnisse. Im Rahmen des zweiten Schrittes wird überschüssiges Reduktionsmittel entfernt. Des Weiteren werden Thiolgruppen der Proteine alkyliert um Reoxidationen während der Elektrophorese zu vermeiden.

2.4.5.8 Kontinuierliche SDS-Polacrylamid-Gelelektrophorese (2.Dimension)

Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden kurz mit Laufpuffer gewaschen, bevor sie dann auf den SDS-Gelen positioniert und durch Zugabe von Agarose (0,5%) fixiert wurden. Nachfolgend wurde die untere Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt und die

Kühlung des gesamten Systems auf 10°C eingestellt. Nach dem Einsetzen der Gele in die Laufkammer wurde das obere Laufpufferreservoir gefüllt, wobei der hier verwendete Laufpuffer nun die 2x Konzentration an SDS aufwies (0,2%). Anschließend wurde die Elektrophorese zunächst mit 15 W für 30 min und nachfolgend mit 100 W für ca. 4 h gestartet. Sobald das Bromphenolblau den unteren Rand der Gele erreicht hatte, wurden die Auftrennung gestoppt und das Gel entnommen. Es folgte eine Nachbehandlung der Gele mit entsprechender Fixierlösung.

2.4.5.9 Färbung der Gele

Die Färbung der Gele erfolgte unter der Verwendung von Coomassie. Es handelt sich bei dieser Methodik um eine Endpunktfärbung mit kolloidal gelöstem Coomassie, die auch eine spätere MALDI-MS Analyse der Proteine zulässt.

Die Gele wurden zunächst über Nacht fixiert und im Anschluss an einen Waschschrift mit Aqua dest. (3 x 30 min) für 1 h in die Inkubationslösung gegeben. Diese wurde nachfolgend durch die Färbelösung ersetzt. Die Gele wurden 2 bis 5 Tage in dieser Lösung auf einem Schüttler gefärbt.

<u>Fixierlösung:</u>	50% Ethanol 2% H ₃ PO ₄
<u>Inkubationslösung:</u>	34% Methanol 2% H ₃ PO ₄ 17% (NH ₄) ₂ SO ₄
<u>Färbelösung:</u>	34% Methanol 2% H ₃ PO ₄ 17% (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,066% Coomassie G-250

Die weitere Lagerung der Gele erfolgte nach der Färbung in Inkubationslösung bei 4°C.

2.4.6 Massenspektrometrische Proteinanalyse (MALDI-MS)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinidentifizierungen in Zusammenarbeit mit der Proteomikarbeitsgruppe der „Integrierten Funktionellen Genomik (IFG)“ (IZKF, Münster) unter Leitung von PD. Dr. Simone König durchgeführt. Auf diese Weise wurden mit Hilfe der MALDI-Analytik verschiedene Proteine identifiziert. Hierzu wurden Proteinspots, die als geeignet erschienen, aus den 2D-Gelen herausgetrennt. Die weiteren Untersuchungen wurden von der IFG durchgeführt. In der Regel haben hier zunächst die Arbeiten mit einem tryptischen Verdau der Proben begonnen. Durch diese enzymatische Behandlung wurde die Trennung des Analyten von der Gelmatrix bewirkt, aber auch eine bessere Aussagekraft der analytischen Ergebnisse gefördert. Die Molekulargewichte der Peptide konnten sehr genau bestimmt werden, und waren in ihrer Gesamtheit charakteristisch für ein bestimmtes Protein. Bioinformatische Suchalgorithmen erlaubten die Abfrage von Datenbanken mit solchen MS-Daten.

2.5 Molekularbiologische Verfahren

2.5.1 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien:

Acrylamid-Stammlösung (0,8% Bisacrylamid, 30% Acrylamid)	Roth
Agar	Fluka
Agarose	Seakem
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
β -Mercaptoethanol, p.A.	Merck
Borsäure	Roth
Bromphenolblau (3', 3'', 5', 5'''-Tetrabromphenol-sulphophtalein)	Sigma
BSA (für Restriktionen)	New England BioLabs
dNTP Mix	Eppendorf
DTT (Dithiothreitol)	Promega
EDTA (Ethylenediamintetraessigsäure)	Merck
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Fluka
Ethanol	Baker

Ethidiumbromid	Pharmacia Biotech
Formamid (CH ₃ NO)	Sigma
Ficoll ® (60%) [C ₅ H ₁₁ NS ₃ · C ₂ H ₂ O ₄]	Sigma
Harnstoff	Roth
Kanamycin B Sulfat	Sigma
Luria Broth (Miller´s Modification)	Sigma
RNase freies Wasser	Promega
Salzsäure (HCl)	Roth
Smart Ladder	Eurogentec
Taq Man Universal PCR Master Mix (2x)	Roche
TEMED (N, N, N', N'-Teramethylendiamin)	Sigma
Tris (tris-(Hydroxymethyl)aminomethan)	Roth
Xylencyanol	Fluka

DNA-Auftragspuffer:

Ficoll (60%)	100 µl
Bromphenolblau	100 µl
Aqua dest.	200 µl

LBK-Medium / LBK-Agar:

Luria Broth (Miller´s Modification)	15,5 g
Kanamycin	30 mg
Agar (nicht bei LBK-Medium)	15 g
Aqua dest.	ad. 1000 ml

RNA-Auftragspuffer:

Formamid	80%
Tris (pH 7,6)	10 mM
Xylencyanol	0,25%
Bromphenolblau	0,25%

RNA-Laufpuffer:

Tris	193,8 g
NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O	198,7 g
EDTA	23,38 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH 7,0	

TAE-Puffer (10 x):

Tris/HCl	400 mM
EDTA	10 mM

Mit Essigsäure (Fluka) den pH Wert auf 8,0 eingestellt.

TBE-Puffer (10 x):

Tris/HCl	121,14 g
EDTA	3,72 g
Borsäure	51,32 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

TE-Puffer (10 : 1) / 5 x TE:

Tris/HCl	10 / 50 mM
EDTA	1 / 5 mM

pH 7,5

2.5.2 *E. coli* Stamm

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde der *E. coli* Stamm TOP10F' von Invitrogen eingesetzt. Dieser Stamm weist eine Überexpression des Lac Repressors auf und gilt als biologische Sicherheitsmaßnahme.

2.5.3 Restriktionsenzyme, Ligase und PolymeraseRestriktionsenzyme:

Bam HI, *Xho* I New England BioLabs

Ligase:

T4 DNA Ligase New England BioLabs

DNA Polymerasen:

Expand High Fidelity PCR System	Roche
Pfu-Polymerase	Stratagene
Pwo-Polymerase	Roche
Taq-Polymerase	Promega

Reverse Transkriptase:

M-MLV Reverse Transkriptase

Promega

2.5.4 Primer und Vektoren

Die nachfolgenden Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Primer zur Amplifikation des GAP-43:

GAP for: 5´- CAG GGG AAG ACT CGA GCA TGC TGT GCT GTA -3´

GAP rev: 5´- GTT TCT TAG GAT CCC GGC ATG TTC TTG GTC AGC -3´

Die Primer beinhalten Restriktionssequenzen der Enzyme *Bam HI* und *Xho I* für die Klonierung in den Vektor pEGFP-N2.

Primer zur Sequenzierung des Inserts im Vektor pEGFP-N2:

N2for: 5´- GAGTCGAGCATGCTGTGCTGTAT -3´

N2rev: 5´- TCTTAGGATCCCGGCATGTTC -3´

Expressionsvektor:

pEGFP-N2

BD Biosciences

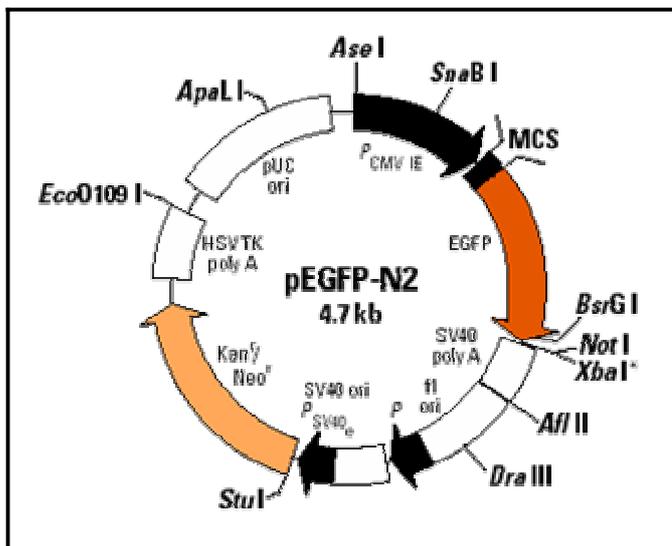


Abb. 1: Vektorkarte pEGFP-N2
(Quelle: BD Biosciences)

Der Vektor trägt die Gen-Bank Nr. U57608.

2.5.5 Real time PCR Assays

Die entsprechenden Real time PCR Assays wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen. Die genauen Sequenzen der Primer und Sonden waren aus den Angaben des

Unternehmens nicht ersichtlich. Eine Ausnahme bildeten hierbei jedoch die so genannten *Customer Assays*. Hier wurden Primer sowie Sonden nach den Angaben des Kunden angefertigt. Um einen solchen Assay handelte es sich bei dem Pin1 Assay.

Zur endogenen Kontrolle wurde die Expression der 18S rRNA herangezogen.

Folgende Assays wurden verwendet:

18S rRNA:

Produkt-Nr.	Hs99999901_s1
Gen-Symbol	18S
Gen-Name	Eukaryotic 18S rRNA
Gen-Bank-Nr. mRNA	X03205.1

GAP-43:

Produkt-Nr.	Rn00567901_m1
Gen-Symbol	Gap43
Gen-Name	growth associated protein 43
alternative Bezeichnung	Basp2, RGD:62071
NCBI Datenbankeintrag	Chromosom Chr. 11 - 59989085 - 60038130
Referenz-Nr.	NM_017195.1 NP_058891.1 1 - 2 251 -
Gen-Bank-Nr. mRNA	M16228.1 M16736.1 X06338.1

Trax:

Produkt-Nr.	Rn00821040_g1
Gen-Symbol	Tsnax
Gen Name	translin-associated factor X
alternative Bezeichnung	MGC93125, RGD:621574, Trax
NCBI Datenbankeintrag	Chromosom Chr. 19_NW_047542 - 148311 - 148959
Referenz-Nr.	NM_022262.3 NP_071598.1 2 - 3 207 -
GenBank-Nr. mRNA	AF262357.1 BC081715.1

Pin1:

Produktbezeichnung	PIN1SIM-PINC
Produkt-Nr.	298094
Chargen-Nr.	0030478746

Sequenz des Forward-Primers:

PIN1SIM-PINCF		CGTCCAATTGGCGTCTCGAT
Sequenz des Reverse-Primers:		
PIN1SIM-PINCR		CCTCCGCGGCTCTGA
Sequenz der Sonde:		
PIN1SIM-PINCM2	FAM	CCGCTGTTGATTGGCTC

2.5.6 DNA- und RNA-Kits

Folgende Kits der Firma Qiagen (Hilden) wurden verwendet:

- Plasmid Mini und Midi Kit
- QIAquick PCR Purification Kit
- QIAEX II Gel Extraktion Kit
- RNeasy Mini Kit
- RNase-free DNase Set (50)

Folgende Kits der Firma Molzym (Bremen) kamen zum Einsatz:

- PrestoSpin D Plasmid Midi 100L
- UltraPrep Gel-Ex

2.5.7 Geräte

Brutschrank	WTB	Binder
Gellaufkammer	Midi	Harnischmacher
Heizblock	Digital Heatblock	VWR
Inkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific
Küvetten	UVette	Eppendorf
PCR-Cycler	Gene Amp PCR System 9700	Perkin Elmer
PCR-Cycler	TRIO-Thermoblock	Biometra
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf
Power supply	Power Pac	Bio Rad
Reaktionsgefäße	Eppi Cup 0,2; 0,5; 1,5	Eppendorf
Real time PCR Cycler	HT7900	Applied biosystems
Wasserbad	1083	GFL

Werkbank	Hera safe	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge	Galaxy 16 DH	VWR

Aufnahme- und Bildanalysesysteme:

Kamera	Minerva	Grundig
Lichttisch	TFX-35M	Vilber Lourmat
Software zur Geldokumentation	Diskus	Zeiss

2.5.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach folgenden Methoden durchgeführt:

2.5.8.1 Präparation mit Plasmid Mini und Midi Kit

Die Präparation wurde den Angaben des Herstellers (QIAGEN, Hilden) entsprechend durchgeführt.

2.5.8.2 Präparation mit PrestoSpin D Plasmid Midi 100L

Die Durchführung der Isolation der Plasmid-DNA erfolgte gemäß den Versuchsvorschriften des Herstellers (Molzym, Bremen).

2.5.9 Präparation von RNA aus Retina und Gehirn

Die Präparation von RNA aus Retina als auch aus dem Gehirn der Ratte wurde mit dem RNeasy Mini Kit und dem RNase-free DNase Set (50) von Quiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.10 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.5.10.1 Bandenextraktion mit dem QIAEX II Gel Extraktion Kit

Die Bandenextraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers (QIAGEN, Hilden).

2.5.10.2 Bandenextraktion mit dem UltraPrep Gel-Ex Kit

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Molzym, Bremen).

2.5.10.3 Aufreinigung von DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit

Die Aufreinigung orientiert sich an dem Ablaufprotokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden).

2.5.11 Auftrennung von gesamt RNA über Harnstoff-Agarose-Gele

Die in Ethanol gelöste RNA aus den Präparationen wurde bei 15 000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA Pellets in der Werkbank getrocknet. Die getrockneten Pellets bestanden aus maximal 10 µg RNA, die nun in 20 µl RNA-Auftragspuffer bei 4°C für ca. eine Stunde gelöst wurden.

Für das Spacer-Gel wurden in einem sterilen Kolben 5 ml Acrylamid (30%) / Bisacrylamid (0,8%)-Lösung, 0,5 ml RNA-Laufpuffer (20x), 4,5 ml steriles Aqua dest., 5 µl TEMED sowie 50 µl APS (10 mg/100µl) gemischt. Diese Mischung wurde zwischen zwei horizontalen Glasplatten gefüllt und für einen ersten Härtungsvorgang für 15 Minuten bei 60°C inkubiert. 0,9 g Agarose wurden durch Erhitzen mit 21,6 g Harnstoff in 28 ml RNA-Laufpuffer (2x) gelöst. Das noch flüssige Agarose-Gel wurde auf den Spacer geschichtet. Das Gel polymerisiert über Nacht bei 4°C aus.

Das ausgehärtete Gel wurde in eine Laufvorrichtung eingespannt, die mit ca. 1 l RNA-Laufpuffer (1x) zuvor beschickt worden war. Vor dem Befüllen der Geltaschen sind diese mit Laufpuffer gespült worden. Die Auftrennung erfolgte zunächst für 30 Minuten bei 75 V, bevor für weitere 4 Stunden die Spannung auf 150 V erhöht wurde. Nach dem Lauf wurde das Gel aus der Apparatur entnommen. Die Geltaschen sowie das Spacergel werden abgetrennt. Für eine spätere Orientierung wurde eine Ecke des Gels abgetrennt. 400 ml RNA-Laufpuffer wurden zum Färben des Gels mit 30 µl Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt. Das Gel wurde in dieser Lösung für zwei Minuten gefärbt und nachfolgend für 15 Minuten gewässert. Anschließend erfolgte die photographische Dokumentation.

2.5.12 Reverse Transkriptase Reaktion

Die zuvor unter Verwendung der beschriebenen Kits aus den Geweben isolierte RNA wurde, nach einer initialen Denaturierung bei 65°C für 10 min, mit Hilfe der M-MLV reversen Transkriptase nach den Angaben des Herstellers als Template für die reverse

Transkriptasereaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Biometra TRIO-Thermoblock nach dem folgenden Programm durchgeführt:

41°C für 1h	reverse Transkription
95°C für 2 min	Denaturierung
4°C	Kühlung

2.5.13 Real time PCR

Die Real time Versuche zur Analyse der Expressionsdaten der Gene GAP-43, Pin1 und Trax sowie der endogenen Kontrolle 18S rRNA wurden mit einem Real time PCR Cycler HT7900 der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen der cDNA wurden aus den reverse Transkriptase Reaktionen extrapoliert, da eine photometrische Quantifizierung von einzelsträngiger cDNA nicht möglich ist. Jede cDNA Probe wurde in einer Doppel- bzw. Dreifachbestimmung untersucht. Die spätere Auswertung der Daten erfolgte in Relation zu der verwendeten endogenen Kontrolle 18S rRNA. Die einzelnen Ansätze wiesen bei einem Probenvolumen von 20 µl folgende Zusammensetzung auf:

Taq Man Universal PCR Master Mix (20x)	1 µl
Real time Assay (2x)	10 µl
cDNA	ca. 50 ng
RNase freies Wasser	ad 20 µl

Folgendes Temperaturprofil lag der Real time PCR zu Grunde:

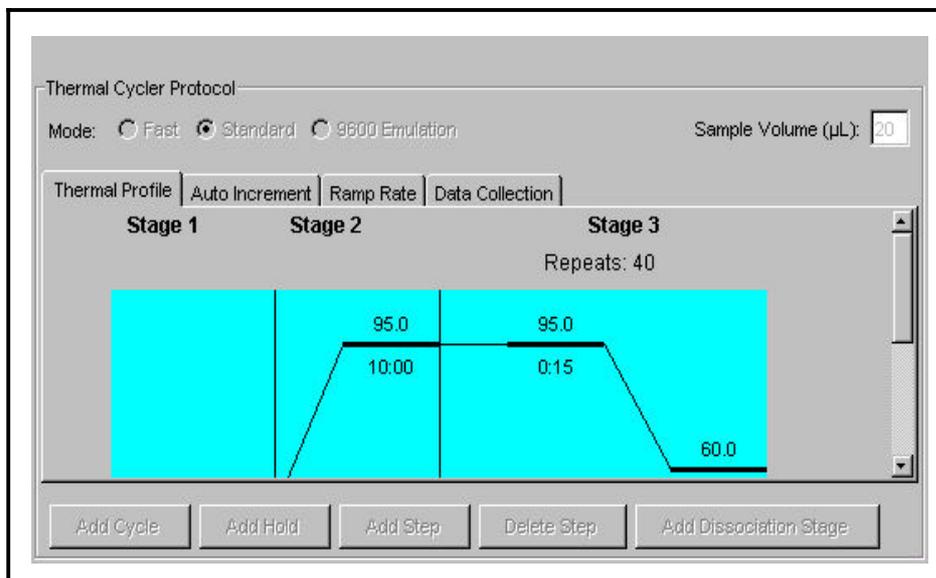


Abb. 2:
Temperaturprofil
der Real time PCR
(Quelle: SDS 2.2.2
Software [Applied
Biosystems])

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der SDS 2.2.2 Software nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode.

2.5.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In den einzelnen PCR-Ansätzen wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt. Es handelte sich hierbei um die Taq-Polymerase (Promega, USA), die Pfu-Polymerase (Stratagene, USA), die Pwo-Polymerase (Roche, Mannheim) sowie das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim).

Die thermostabile Taq DNA Polymerase repliziert DNA bei einer Temperatur bis zu 74°C und verfügt über eine Halbwertszeit bei 95°C von 40 Minuten. Die katalysierte DNA-Synthese verläuft von 5' nach 3' und ist abhängig von der Magnesiumkonzentration, die je nach Enzym bei ca. 5 mM liegt.

Die verwendete Pfu-Polymerase ist thermostabiler, da nach einer Stunde Temperatureinwirkung von 95°C noch 94-99% der ursprünglichen Aktivität erhalten sind. Die Fehlerrate dieser Polymerase beträgt $1,3 \times 10^{-6}$. Im Gegensatz zu der Taq-Polymerase ist die Extinktionszeit mit 2 min/kBp doppelt so lang.

Die ursprünglich aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* isolierte Pwo-Polymerase verfügt über eine Halbwertszeit oberhalb von zwei Stunden bei 100°C. Das Enzym besitzt neben der 5' → 3' Syntheseaktivität eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität, wodurch die Fehlerrate um ein Zehnfaches geringer ist als bei der Taq-Polymerase ($2,6 \times 10^{-5}$).

Das ebenfalls eingesetzte Expand High Fidelity PCR System synthetisiert DNA mit einer Fehlerrate von $8,5 \times 10^{-6}$. Die letzteren drei Polymerasen kamen primär zum Einsatz, da sie sich für die Amplifikation längerer Fragmente mit ausgeprägten Sekundärstrukturen eignen. Zu dem erschien die 3' → 5' Exonukleasefunktion bezüglich der Klonierung von Vorteil. Die Anwendung der Polymerasen erfolgte nach dem Standard-PCR-Protokoll der Taq-Polymerase, mit jeweils Enzym-spezifischen Abänderungen in der Elongationszeit. Die Polymerasen, die eine Exonukleaseaktivität aufweisen, wurden nach dem Prinzip des hot-starts eingesetzt. Die Enzyme wurden erst im Anschluss an die initiale Denaturierung zu den einzelnen Ansätzen gegeben. Auf diese Weise wurde einer möglichen Degenerierung des Templates und der Primer entgegengewirkt.

Es wurde das folgende PCR-Grundprogramm mit Enzym-bedingten Variationen (nach Angaben des jeweiligen Herstellers) verwendet:

I)	initiale Denaturierung	94°C	2-4 min
II)	Denaturierung	94°C	20-45 sec
III)	Primer Anlagerung	55-60°C	30-60 sec
IV)	Primer Elongation	72°C	30-60 sec
V)	terminale Elongation	72°C	4-7 min

Die Schritte II)-IV) wurden bis zu 35-mal wiederholt.

2.5.15 Restriktion und Ligation

Die der Restriktion zu unterziehende DNA-Lösung wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und dem zugehörigen Restriktionspuffer versetzt. Der Puffer wird mit 10% des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes eingesetzt. Die verwendete Enzymkonzentration entsprach den Angaben des Herstellers. Die Restriktionsansätze wurden Enzym-abhängig 2-3 Stunden bzw. über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Erwärmen der Ansätze auf 65°C für 10 Minuten, wurden die Restriktionsenzyme inaktiviert. Je nach Art der weiteren Verwendung schlossen sich Fällungs- und Aufreinigungsschritte mit Ammoniumacetat (0,3 M) in Ethanol an.

Die Kontrolle der Restriktionen erfolgte über die gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1%igen TAE-Agarose Gel. Hierzu wurden Aliquots der geschnittenen DNA mit Bromphenolblau-Puffer (¼ des Volumens des jeweiligen Aliquots) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard diente die *Smart ladder* (Eurogentec, Brüssel). Es wurden 5 µl dieses Längenmarkers eingesetzt. Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe von EB-Lösung und einer UV-Lichtquelle.

Die zu ligierende Vektor- und Insert-DNA sollten in einem Verhältnis von 1:3 stehen. Die Ligation mit der T4 Ligase (New England BioLabs) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.16 Transfektion von *E. coli* Top10F' Zellen

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* Top10F' Zellen (Invitrogen) verwendet. Die Transfektion dieser Zellen erfolgte nach dem Prinzip des heat-shock Verfahrens nach den Angaben des Herstellers. Jeweils ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde mit einem Ligationsansatz, der 1 µg DNA enthielt, gemischt und 20 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss an die Regeneration der transformierten Zellen bei 37°C wurden Aliquots von 100, 200 und 500 µl auf LBK-Agar ausplattiert. Es folgte eine Inkubation von maximal 16 Stunden bei 37°C und 5% Kohlendioxidgehalt. Die Selektion der Transformanten erfolgte über die Antibiotikaresistenz.

3. Ergebnisse

3.1 Quantifizierung des axonalen Wachstums im Verlauf der postnatalen Augenentwicklung

Morphologisch waren frühe postnatale Retinae dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Tagen P0 und P10 ein ausgeprägtes gliales Wachstum sichtbar war (Abb. 6 A, B). Spätere Stadien waren hingegen von einem deutlichen axonalen Saum umgeben (Abb. 6 C, D).

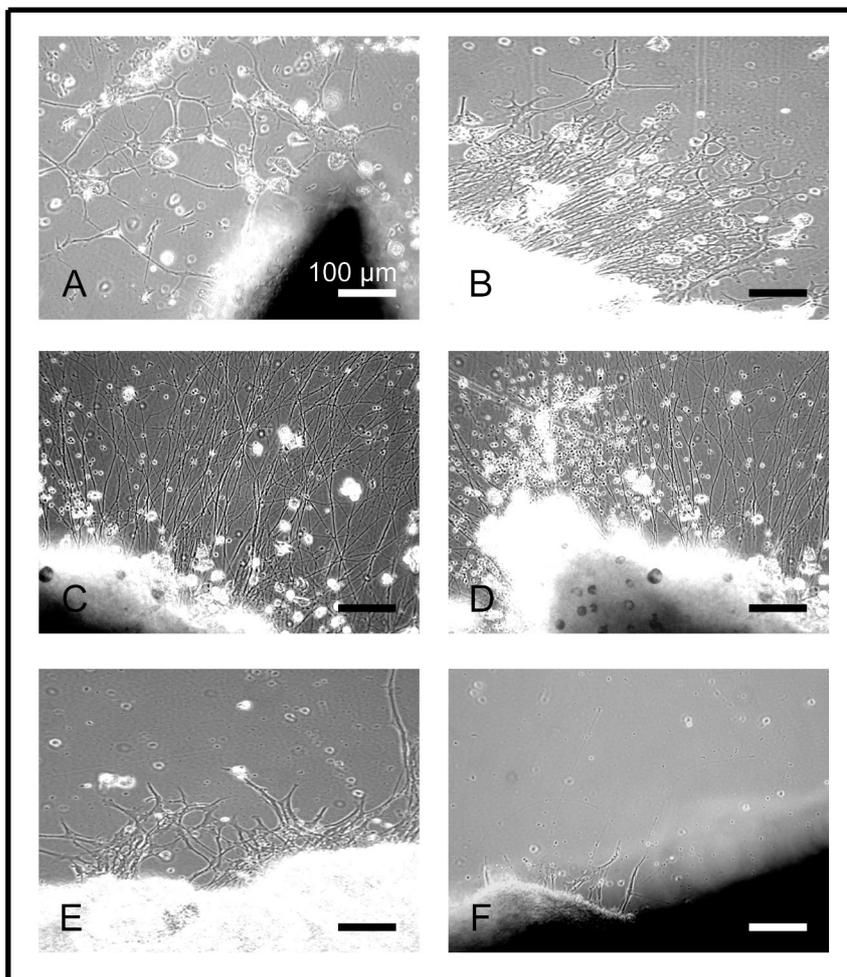


Abb. 6: Axonales Wachstum juveniler Retinae

A, B) Ausgeprägtes gliales Wachstum und Migration von Astrozyten aus der Retina am Tag P0 und P8. C, D) Am Tag P14 und P21 wachsen fast nur Axone aus den Explantaten aus. E, F) Nahezu axonlose Explantate mit deutlicher Zunahme von Astrozyten am Tag P30 (E) und faserigen glialen Fortsätzen am Tag P60 (F). Maßstab: 100 µm

Nach der Abnahme des axonalen Wachstums tauchten in älteren Stadien wieder gliale Fortsätze auf (Abb. 6 E, F), die aufgrund ihrer spindelförmigen Silhouetten und ihrer kurzen, plumpen Protrusionen identifizierbar waren. Gliale Zellen zeigten bezüglich der

Form, aber auch in Bezug auf die räumliche Ausdehnung eine Anpassung an begleitendes Axonwachstum. So waren gliale Fortsätze zwischen den Tagen P14 und P20, d.h. in der Phase stärksten axonalen Wachstums, ebenfalls entlang von Axonen elongiert (Abb. 6 C, D), während sie vor der axonalen Wachstumsphase (Abb. 6 A, B) und nach dem Einstellen des axonalen Wachstums eher multidirektional und astrozytär angeordnet waren (Abb. 6 E, F). Diese Formanpassung der glialen Fortsätze auf die benachbarten Axone weist auf Interaktionen zwischen Gliazellen und axonalen Fortsätzen hin.

Mit fortschreitender Entwicklung und der Öffnung der Augen am Tag P14 zeigte sich ein verändertes Bild bezüglich der kultivierten Retinae. Ließ sich nach einem Tag Kultivierung noch kein signifikanter Unterschied zwischen Explantaten jüngerer und älterer Tiere erkennen, so zeigten sich nach ca. zwei Tagen der *in vitro* Kultivierung die Unterschiede deutlich (Abb. 6). Größere gliale Zellverbände waren nicht mehr präsent. Einzelne kleinere runde Gliazellen fanden sich zwischen den Axonen. Im direkten Anschluss an das retinale Gewebe war ein Großteil der Gliazellen zu finden. Hier bildeten diese Zellen einen zellulären Rasen um das Explantat. Lag am Tag P14 die durchschnittliche Anzahl der ausgewachsenen Axone nach ca. 48 h *in vitro* noch bei ca. 30 Axone je Retinaviertel, so waren es bei den P15 Retina-Explantaten schon ca. 40 Axone. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation waren die Axone zahlreicher ausgewachsen, so dass eine exakte Quantifizierung nur schwer zu realisieren war. Nach dreitägiger Inkubation wurden bei Explantaten der Altersstufen P16 bis P22 zwischen 280 und 390 Axone je Retinaviertel gezählt.

Nach dem einschneidenden Ereignis der Augenöffnung am Tag P14 vollzieht sich am Tag P20 bis zum P21 die vollständige Linsentransparenz. Auch dieses Ereignis scheint einen Einfluss auf dieses Wachstumsverhalten zu haben. Axone wachsen nämlich weiterhin bis zum Tag P24 aus (Abb. 6). Am Tag P25 ist die Fähigkeit zur Axonausbildung auf durchschnittlich 5 Axone je Retinaviertel gesunken, was ungefähr dem Wert entspricht, der bei adulten Retinae ohne eine weitere Manipulation des Auges bestimmt wurde.

Zur Verifizierung der These, dass es sich bei den Fasern um Axone handelt, wurden immunhistologische Untersuchungen mit den kultivierten Präparaten durchgeführt. Der primäre Antikörper Neuf200 zielt gegen das Neurofilament als spezifischer Bestandteil der Axone (Abb. 7).

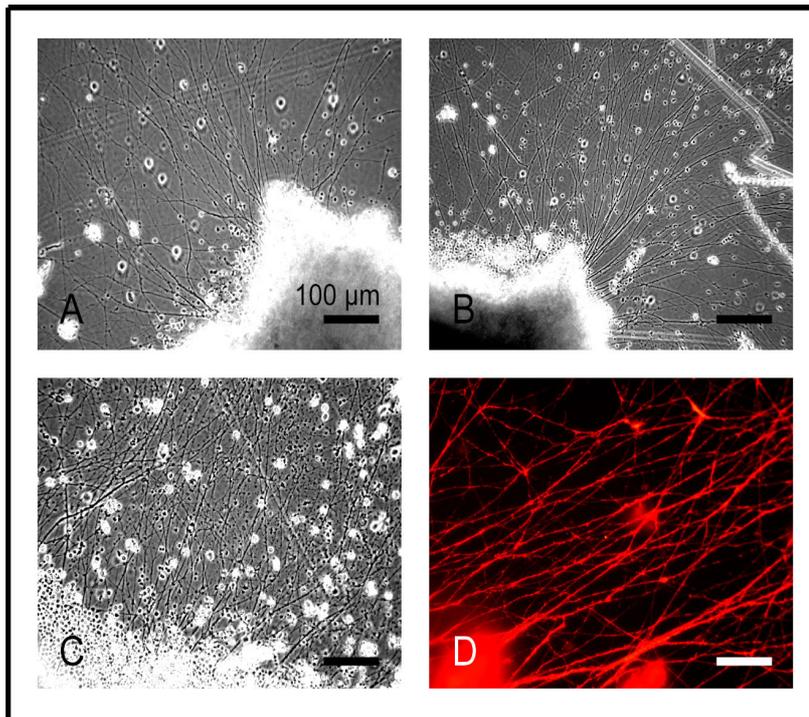


Abb. 7: P21 Retina *in vitro*.

A: P21 Retina nach 48 h Inkubation. B: P21 Retina nach 72 h Inkubation. C: P21 Retina nach ca. 100 h Inkubation. D: Die immunhistochemische Färbung gegen die Untereinheit 200 des Neurofilaments weist die auswachsenden Fasern als Axone nach. Der zweite Antikörper war mit TRITC markiert. Maßstab: 100 µm

Zum Nachweis des axonalen Wachstums im Zuge der Maturation des Auges wurden Retinae verschiedener Entwicklungsstadien explantiert und in Kultur genommen (Abb. 8).

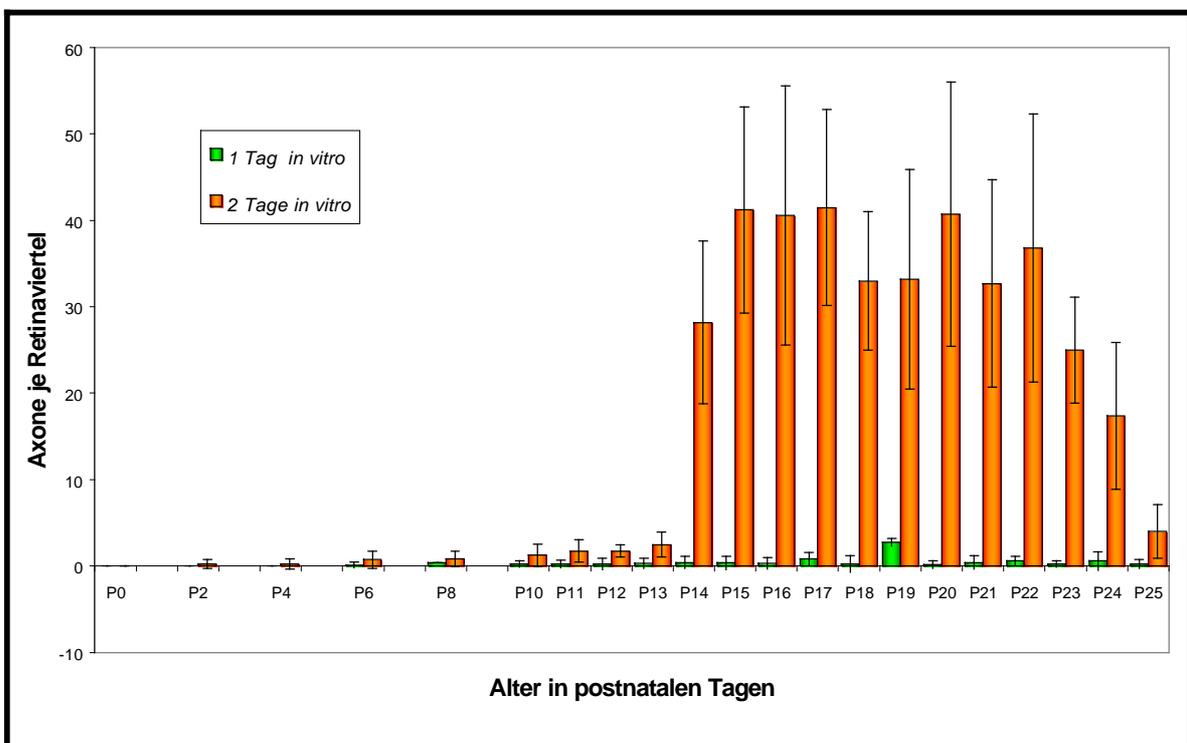


Abb. 8: Quantifizierung des axonalen Wachstums zwischen P0 und P25.

Die Anzahl ausgewachsener Axone mit einer Länge über 200 µm je Retinaviertel wurden aus jeweils 16 retinalen Streifen pro Altersstufe gemittelt. Der Abweichungsbalken stellt die

Standardabweichung dar. Man beobachtet weit weniger als 5 Fasern je Explantat bis zum Tag P13, um dann einen sprunghaften Anstieg auf ca. 40 Axone je Explantat ab dem Tag P14 zu verzeichnen, der sich in ein Plateau bis zum Tag P22 entwickelt, um dann bis zum Tag P25 auf weniger als 10 Axone je Explantat abzufallen. (Wertetabelle Anhang: 6.1.1)

Die frühen postnatalen Tage wurden zweitägig dokumentiert und zeigen kaum axonales Wachstum. Der Altersbereich vom Tag P10 bis einschließlich P25 ist täglich dokumentiert. Zwischen P10 und P13 wurde ein tendenzieller Anstieg der Zahl auswachsender Axone beobachtet. Am Tag P14 war ein sprunghafter Faseranstieg sichtbar (Abb. 8). Jenseits des Tages P25 wurden Retinae einzelner Altersstufen explantiert. Insbesondere konnten am P28, P30 und P60 keine Fasern gezählt werden und die Explantate entsprachen der adulten Retina.

3.2 Quantifizierung des axonalen Wachstums nach Verlagerung des Zeitpunktes der Augenöffnung

Die beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Entwicklung und des axonalen Wachstums lassen ein Zeitfenster erhöhter Wachstumsaktivität zwischen den Tagen P14 und P24 erkennen (Abb. 8). Der Beginn dieser Wachstumsphase koinzidiert mit dem Öffnen der Augen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auswachsen der Axone und der Augenöffnung gibt. Wird durch den Reiz der ersten Lichtexposition der Retina gegenüber dem Licht das Auswachsen der Axone ausgelöst?

Um dieser Frage nach zu gehen, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der der Zeitpunkt der Augenöffnung vorverlegt bzw. verzögert wurde. Die Versuchstiere der einen Gruppe wurden früher dem Licht ausgesetzt, indem die Augen mit einer Kapsulotomieschere am Tag P7 geöffnet wurden. Diese Versuchstiere wurden der Gruppe der frühen Lichtexposition (FLE) zugeordnet. Einer zweiten Reihe von Versuchstieren wurden die Augen mit chirurgischem Klebstoff noch vor dem ersten Öffnen verschlossen und diese als keine Lichtexpositionen (KLE) Gruppe bezeichnet. Die Explantation der Augen dieser Tiere erfolgte ab dem postnatalen Tag P21. Die Explantate der jeweiligen Gruppen wurden für zwei Tage *in vitro* kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Quantifizierung der ausgewachsenen Axone (Abb. 9). Der Vergleich der Daten von manipulierten und nicht manipulierten Retinae brachte keine signifikanten Wachstumsunterschiede. Sowohl die FLE-Gruppe als auch die KLE-Gruppe

wichen bezüglich der Anzahl ausgewachsener Axone nicht wesentlich von der Kontrollgruppe ab.

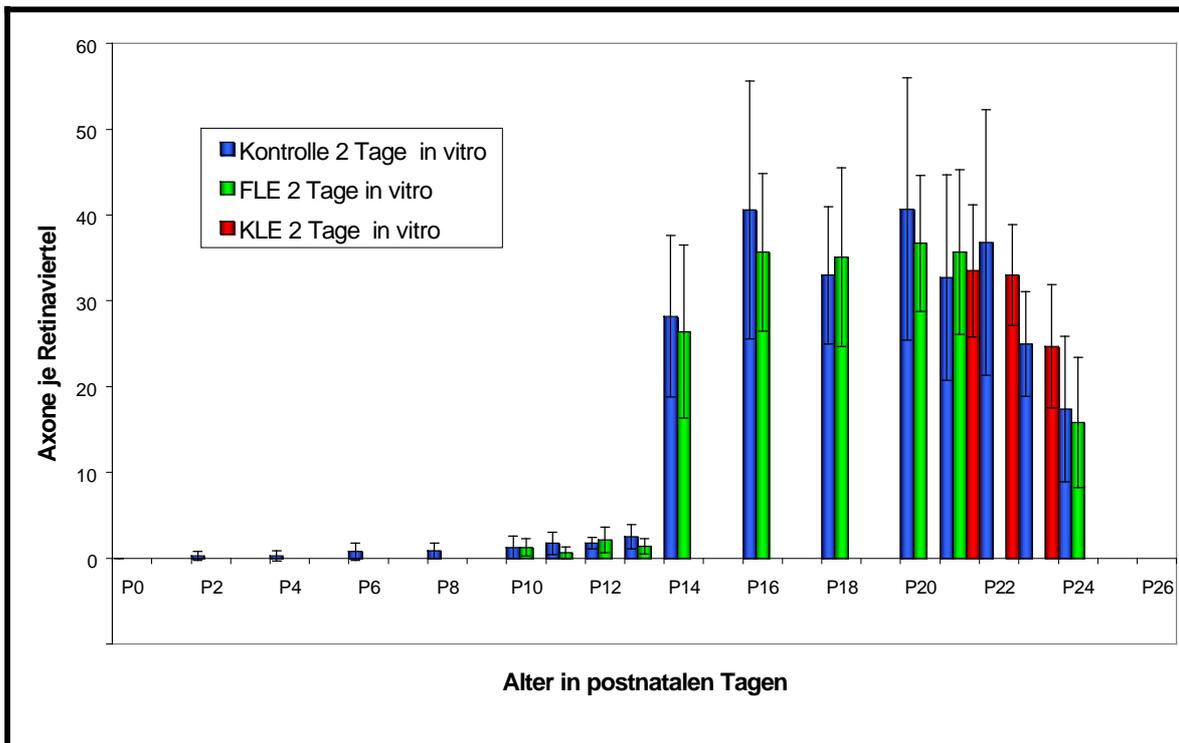


Abb. 9: Quantifizierung des axonalen Wachstums bei unterschiedlicher Lichtexposition

Der Probenumfang je Altersstufe und Expositionsgruppe betrug $n = 16$ Retinaviertel. Es wurden nur Axone gewertet, die eine Länge von mindestens $200 \mu\text{m}$ aufwiesen. Der Abweichungsbalken stellt die Standardabweichung dar. Am Tag P14 wurden bei der Kontrollgruppe 28 Axone je Retinaviertel und bei der FLE-Gruppe 26 Fasern je Retinaviertel gezählt. Bei der Kontrollretina wurden am Tag P21 32 Axone je Viertel gezählt, während es bei der FLE-Gruppe 35 und bei der KLE-Gruppe 33 waren. (Wertetabelle: Anhang 6.1.2)

Demnach sind intrinsische Faktoren für das Wachstum der Axone ab dem P14 verantwortlich. Wäre eine Lichtabhängigkeit der Wachstumsfähigkeit gegeben, so hätten Unterschiede im Wachstumsverhalten der Retinae der jeweiligen Gruppen auftreten müssen. Demnach hätte die FLE Gruppe eine Umstellung des Maturationsstadiums erfahren müssen, mit der Folge, dass Axone schon vor dem postnatalen Tag P14 über die Fähigkeit des Wachstums verfügt hätten. Dies war hier jedoch nicht der Fall. Die Retinae der Versuchstiere dieser Gruppe ließen ebenfalls erst ab dem Tag P14 axonale Fortsätze erkennen. Vor diesem Zeitpunkt gab es jedoch kein erhöhtes axonales Wachstum. Hier konnte durch das vorzeitige Öffnen der Augen kein Auswachsen der Axone induziert werden.

Ist die Lichtdeprivation unter Umständen ausreichend, um axonales Wachstum zu reprimieren? Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Daten der Versuchsgruppe KLE herangezogen. Die Retinae dieser Tiere wurden nicht dem Licht ausgesetzt. Wenn nun das Licht kein hinreichender Faktor für die Induktion des axonalen Wachstums ist, so ist eventuell der Entzug desselben hinreichend, um das Wachstum zu unterdrücken. Die Daten dieser Versuchsgruppe wiesen jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu denen der Kontrollgruppe auf (Abb. 9).

Somit ist auf der gegebenen Ebene der Quantifizierung von Axonen nicht nachgewiesen, dass die Augenöffnung und der direkte Lichteinfall das Wachstum von Axonen direkt beeinflussen. Die Reifung der Retina scheint in Bezug auf diesen Prozess programmiert abzulaufen, und ist nicht durch einen früheren oder späteren Lichteinfall umprogrammierbar.

3.3 Immunhistologische Untersuchungen an der maturierenden Retina

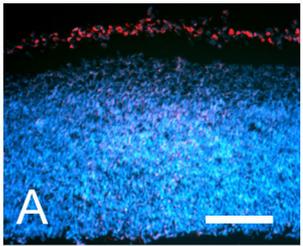
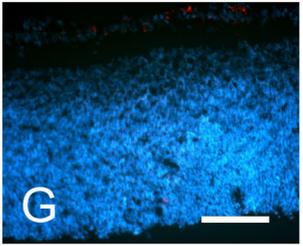
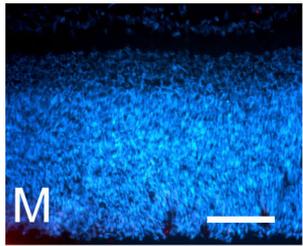
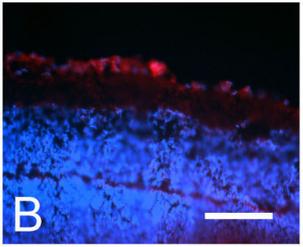
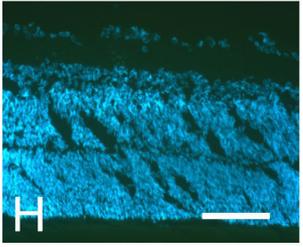
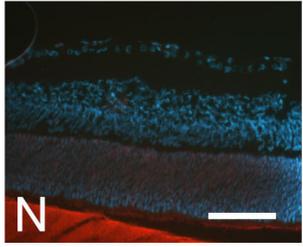
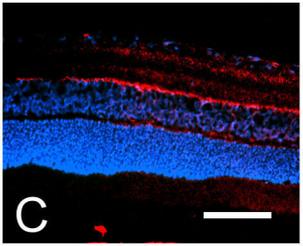
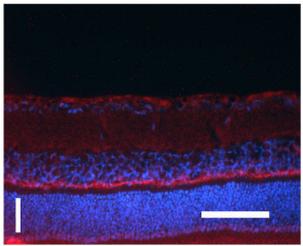
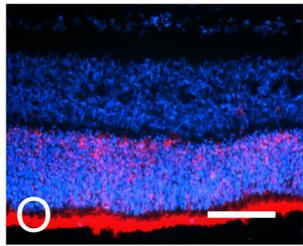
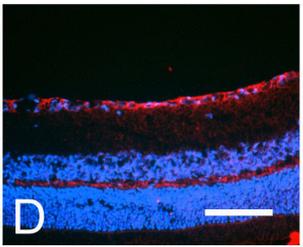
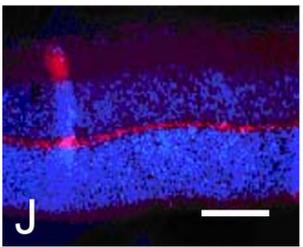
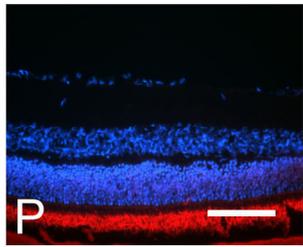
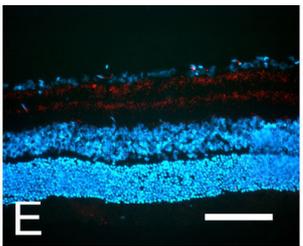
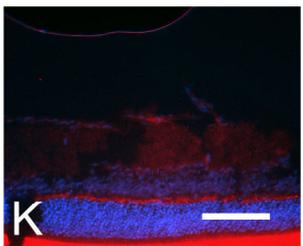
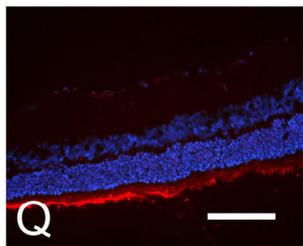
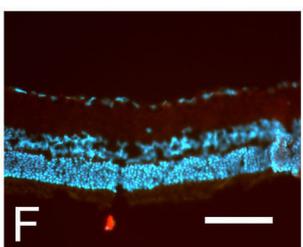
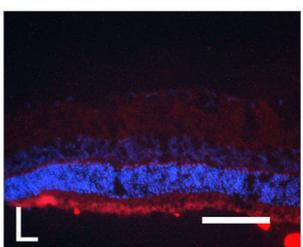
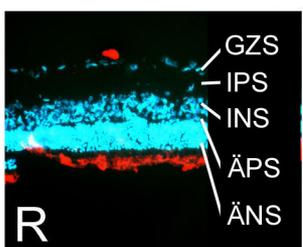
Die morphologischen und quantitativen Studien schließen nicht aus, dass auf zellulärer und/oder molekularer Ebene Veränderungen stattfinden, die auf den veränderten Augenöffnungszeitpunkt zurückzuführen sind.

Eine immunhistologische Untersuchung der Retinae einzelner Altersstufen diene der genaueren zeitlichen und zellulären Charakterisierung sowie der Quantifizierung verschiedener Marker-Proteine. Als ganglienzellspezifischer primärer Antikörper wurde GAP-43 eingesetzt. Zur Visualisierung der neuronalen Verbindungen und Axone wurde ein Antikörper gegen Neurofilament eingesetzt. Zur spezifischen Markierung der Photorezeptorzellen, der Stäbchen und Zapfen, kam Rhodopsin zum Einsatz.

nachfolgende Seite:

Abb. 10: Immunhistochemische Analyse von Retinae unterschiedlicher Entwicklungsstadien

Maßstab: 50 µm

GAP-43	Neurofilament	Rhodopsin	
 <p>A</p>	 <p>G</p>	 <p>M</p>	P0
 <p>B</p>	 <p>H</p>	 <p>N</p>	P8
 <p>C</p>	 <p>I</p>	 <p>O</p>	P16
 <p>D</p>	 <p>J</p>	 <p>P</p>	P21
 <p>E</p>	 <p>K</p>	 <p>Q</p>	P30
 <p>F</p>	 <p>L</p>	 <p>R</p> <ul style="list-style-type: none"> — GZS — IPS — INS — APS — ANS 	P60

GAP-43 wird verstärkt in Neuronen während des Wachstums exprimiert. Bereits am Tag P0 lässt sich eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der RGZ erkennen, die auf eine spezifische Bindung des GAP-43 Antikörpers zurückzuführen ist (Abb. 10). Während der frühen Entwicklungsphase, einschließlich des Zeitraumes bis zum Tag P8, ist immunhistologisch überwiegend eine Lokalisation von GAP-43 in den RGZ zu erkennen. Ab dem Tag P16 ist eine Fluoreszenz auch in der IPS und der ÄPS der Retina zu erkennen. Eine Konzentration der GAP-43-positiven Färbung findet sich in der IPS und der INS. Am Tag P21 tritt eine GAP-43-positive Färbung in der ÄPS und in den RGZ auf. Die Retina der Alterstufe P30 lässt nur eine schwache GAP-43-Expression in der IPS erkennen, während am Tag P60 die Expression herunterreguliert ist.

Der verwendete Antikörper gegen das Neurofilament dient zur Markierung von Axonen. Neurofilament wurde zwischen den Tagen P0 und P8 nicht exprimiert (Abb. 10 G, H). Eine deutliche positive Färbung war am Tag P16 sichtbar (Abb. 10 I), wobei das Protein in beiden plexiformen Schichten lokalisiert war. Dieses Expressionsmuster blieb in den nachfolgenden untersuchten Stadien (P21, P30, P60) konstant (Abb. 10 J, K, L), wobei eine tendenzielle Abnahme der Färbung in der ÄPS am P60 sichtbar war (Abb. 10 L). Die Öffnung der Augen am Tag P14 schien einen regulatorischen Effekt auf die Reifung der Retina in Bezug auf die Expression von Neurofilament zu haben.

Nach der Öffnung der Augen und spätestens am Tag P16 konnte Neurofilament immunhistologisch in verschiedenen Bereichen der Retina nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt lagen Neurofilamentproteine in der Schicht der RGZ, der IPS und ÄPS sowie in der Schicht der Photorezeptoren vor. Im weiteren Verlauf der Maturation konzentrierte sich das Vorkommen an Neurofilament auf die ÄPS. In der adulten Retina ließen sich noch Neurofilament-positive Bereiche in der Schicht der Photorezeptoren erkennen.

Die Immunreaktivität von Rhodopsin wurde als Marker für die Reifung der Photorezeptorschicht eingesetzt. Auf diese Weise sollten auch erste Rückschlüsse bezüglich der Funktionalität dieses Bereiches ermöglicht werden. Auch hier ließ sich während der frühen postnatalen Stadien (P0, P8) kein Rhodopsin in der Retina nachweisen (Abb. 10 M, N). Nach der Öffnung der Augen am Tag P14 wurde am Tag P16 die Färbung in der Photorezeptorschicht positiv (Abb. 10 O). Wie erwartet waren restliche Strukturen der Retina immunonegativ. Auch in den Altersstufen P21, P30 sowie P60 wurde Rhodopsin in der Schicht der Photorezeptoren exprimiert.

3.4 Auswirkungen der experimentellen Veränderung der Augenöffnung auf die Retina

Als nächstes wurde untersucht, ob in den experimentellen Gruppen FLE und KLE die Expressionsmuster der o. g. Moleküle verändert waren.

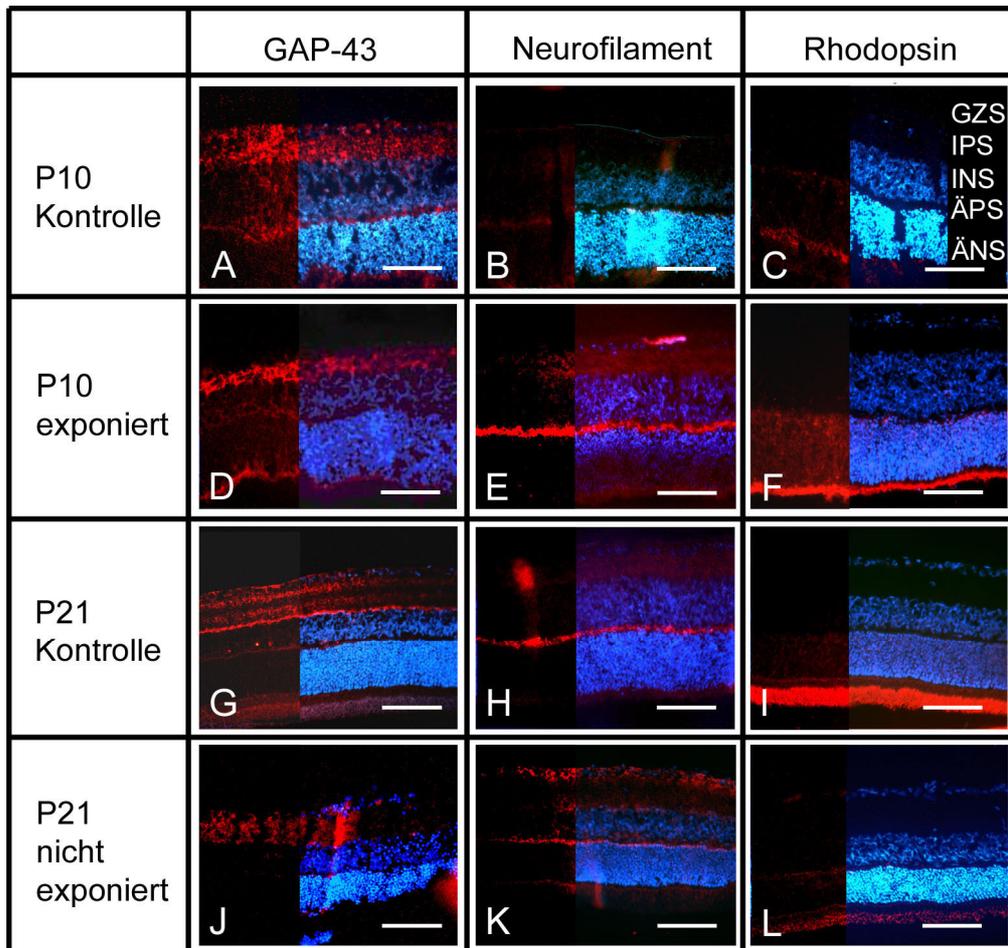


Abb. 11: Immunhistochemische Untersuchung an Retinae nach unterschiedlicher Lichtexposition

Maßstab: 50 µm

Die Analyse beider Gruppen erfolgte am Tag P10 für die FLE- und am Tag P21 für die KLE-Gruppe (Abb. 11). Das GAP-43 zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie in den Kontrollgruppen (Abb. 11 A-J). In der KLE-Gruppe war das GAP-43 bezüglich der Lokalisation ähnlich verteilt wie in der Kontrolle. Die Färbungsintensität war jedoch etwas geringer (Abb. 11 G, J), was als Hinweis einer Lichtdeprivation gedeutet werden kann.

Die Situation bezüglich des Neurofilaments erschien wesentlich eindeutiger. Das nicht manipulierte retinale Gewebe, das zum Tag P10 noch nicht dem Licht ausgesetzt war, war immunonegativ (Abb. 11 B).

Ein anderes Bild zeigte sich bei der Betrachtung der Retina aus der FLE-Gruppe. Eine positive Neurofilament-Färbung zeigte sich in der ÄPS (Abb. 11 E). Damit wurde nachgewiesen, dass ein vorgezogener Lichteinfall durch die Öffnung der Lider am Tag P7 zu einer früheren Neurofilament-Expression und dadurch zu einer früheren dendritischen Differenzierung führte. In der KLE-Gruppe, die am Tag P21 analysiert wurde, war das Muster der Neurofilament-Färbung sehr ähnlich wie bei der Kontrolle (Abb. 11 H, K).

In ähnlicher Weise verhält es sich, wenn die Ergebnisse der immunhistologischen Färbung gegen Rhodopsin betrachtet wurden. Das retinale Gewebe von Augen aus der FLE-Gruppe, die zum Tag P10 noch nicht dem Licht ausgesetzt waren, wies nur eine schwach ausgeprägte Fluoreszenz von Rhodopsin auf (Abb. 11 C). Die Retina eines vorzeitig geöffneten Auges der gleichen Altersstufe wies dagegen in der Schicht der Photorezeptoren eine stark ausgeprägte Fluoreszenz auf. Somit wurde Rhodopsin früher im Bereich der Photorezeptoren exprimiert. Dieser Bereich zeigte sich bezüglich seiner Morphologie, soweit erkennbar, jedoch unverändert. Wurden die Proportionen von nukleären Schichten und Photorezeptorschicht miteinander verglichen, so zeigte sich in frühen Stadien der Entwicklung, wie hier am Tag P10, eine schmalere Photorezeptorschicht als bei einer Retina aus einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium. Das Licht schien demnach keinen Einfluss auf die Schichtdicke und Morphologie, wohl aber auf die Expression von Rhodopsin zu haben.

Ein weiterer signifikanter Expressionsunterschied war im Falle des Rhodopsins zu beobachten. In den Retinae der Altersstufe P21 war Rhodopsin innerhalb der Schicht der Photorezeptoren nachzuweisen (Abb. 11 I). In den Retinae aus der KLE-Gruppe war das Rhodopsin deutlich herunterreguliert (Abb. 11 L). Auch die Färbung in der ÄPS war schwächer (Abb. 11 L). Damit wurde nachgewiesen, dass die Deprivation von Lichteinfall einen deutlichen Effekt auf die Rhodopsinexpression hat.

Es zeigte sich also, dass durch das Vorenthalten des Lichtes weit reichende Veränderungen in der Retina ausgelöst wurden. Die Proteine GAP-43, Neurofilament und Rhodopsin waren deutlich schwächer exprimiert, als es in einer Kontrollretina nach Lichtexposition der Fall war. Die Entwicklung schien hier beeinflusst worden zu sein. Morphologisch war anhand der mikroskopischen Bilder zunächst kein Unterschied zu

erkennen. Im Gegensatz zu der Beeinflussung des Expressionsmusters der hier genannten Marker, war die Schichtenbildung der Retina in beiden experimentellen Gruppen normal.

3.5 Analyse der Proteinprofile mittels 2D-Gelelektrophorese

Immunhistochemische Methoden wie hier für die drei Markerproteine angewandt, sind sehr aufschlussreich, haben aber den Nachteil, dass nur bekannte Proteine nachgewiesen werden. Neuere proteomische Verfahren der 2-D-Gelelektrophorese und der anschließenden MALDI-MS-Sequenzierung boten sich deshalb als Alternativen an, um neue Proteine zu erfassen, deren Expressionsmuster sich eventuell im Rahmen der Reifung der Retina oder der experimentellen Manipulationen ändern könnten.

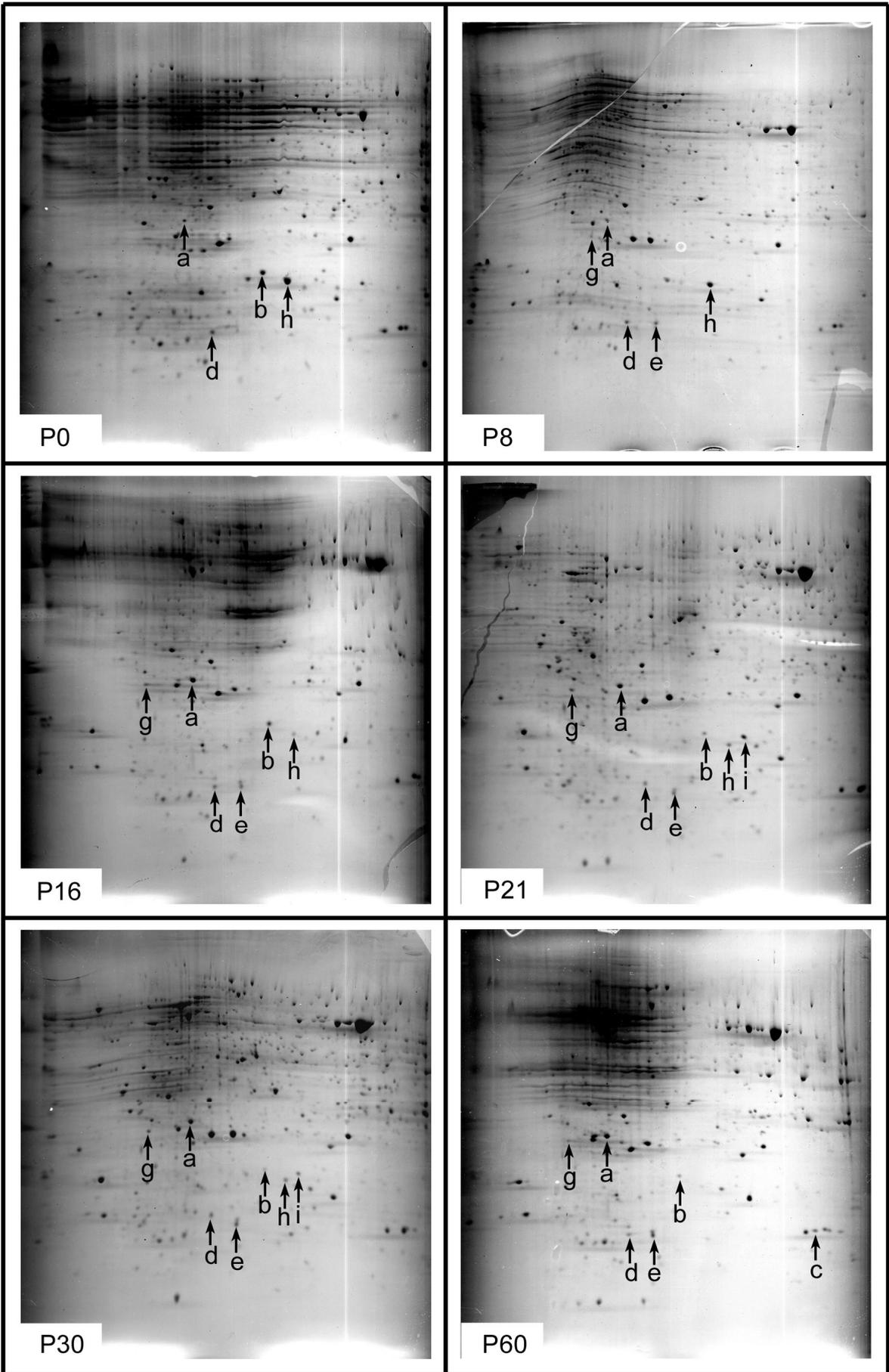
3.5.1 Analyse der Proteinprofile von nicht kultivierten Retinae

Im Folgenden wurde zunächst das gesamte proteomische Profil der Retina zwischen den Tagen P0 und P60 analysiert (Abb. 12). Die Gele zeigten reproduzierbare Protein-Spots aber auch Spots, die im Verlauf der Differenzierung der Retina hoch- oder herunterreguliert wurden. Beispiele sind der Legende der Abb. 14 zu entnehmen.

nachfolgende Seite:

Abb. 12: 2D-Gele von Proteingemischen aus nicht kultivierten Retinae verschiedener Altersstufen

2D-Gele (pH 4-7) von Retinae verschiedener Altersstufen nach Coomassie-Färbung. Markiert sind Spots verschiedener Proteine, die im Verlauf der Entwicklung einer Regulation unterliegen. (a: Recoverin, b: Phosphatidylethanolamin binding Protein, c: Tolkin, d: poly (A) binding protein, e: retinoic acid binding protein, g: Trax, h: Pin1, i: aA Crystallin)



	P0	P8	P16	P21	P30	P60
Recoverin	+	+	+++	+++	+++	+++
PEBP	+++	-	++	+	++	+/-
Tolkin	-	-	-	-	-	+
poly(A)BP	++	++	+	+	+	+
RABP	-	+	+	+	++	++
Trax	-	+	+	++	++	+
Pin1	+++	+++	+	+	+	-
aacry	-	-	-	+	+	-

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Präsenz einzelner Proteine in 2D-Gelen aus Retinae unterschiedlicher Altersstufen (Bezug zu Abb. 12)

Erläuterung der Zeichen: +++: sehr stark präsent; ++: stark präsent; +: präsent; +/-: schwach präsent; -: nicht detektiert

I. Proteine, die im Verlauf der Reifung stärker exprimiert wurden.

Zu dieser Gruppe gehören das Recoverin, das Protein Tolkin sowie das RABP. Das Recoverin wurde ab dem Tag P16 verstärkt exprimiert. Die ausgeprägte Präsenz dieses Proteins blieb bis zum Tag P60 erhalten. Das Protein Tolkin wurde erst am Tag P60 detektiert. Die Expression des RABP nahm kontinuierlich über den gesamten Zeitraum zu, wobei es am Tag P0 noch nicht detektiert werden konnte.

II. Proteine, deren Expression im Verlauf der Entwicklung abnahm.

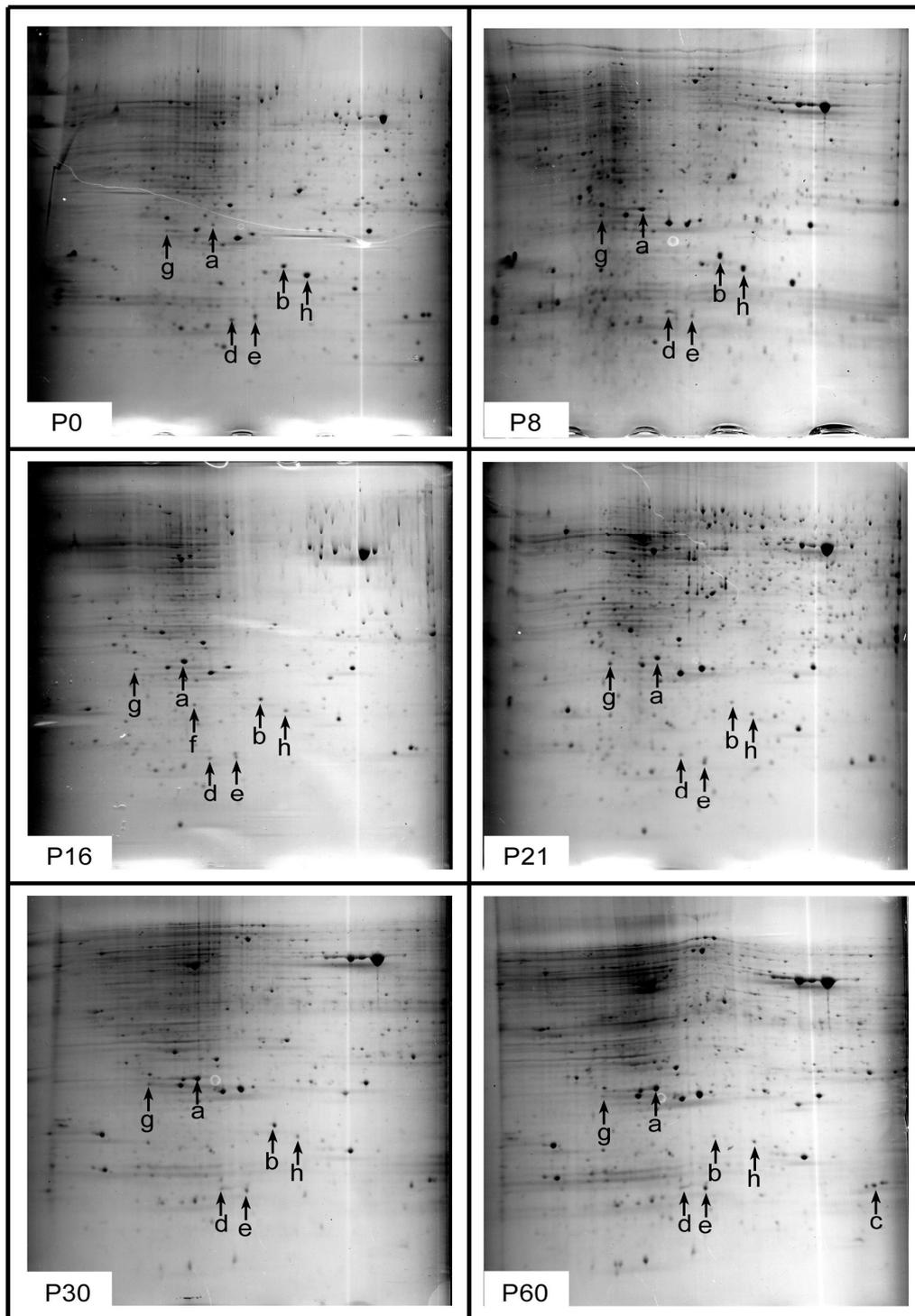
Zu der Gruppe von Proteinen, deren Präsenz im Verlauf des Beobachtungszeitraumes abnahm, gehören das Protein poly(A)BP und das Pin1 Protein. Bei diesen Proteinen war zu beobachten, dass die Abnahme ab dem Tag P16 erfolgte. Pin1 konnte am Tag P60 nicht mehr nachgewiesen werden.

III. Proteine, die während der Entwicklung Expressions-Schwankungen unterlagen.

Zu dieser Gruppe gehören die Proteine aacry, PEBP sowie das Trax. Das Protein aacry konnte an den Tagen P21 und P30 nachgewiesen werden. Das Protein PEBP war am Tag P0 stark präsent. Am Tag P8 konnte es nicht detektiert werden, während es weitere acht Tage später und am Tag P30 wieder stärker exprimiert wurde. Ab dem Tag P8 wurde das Protein Trax detektiert. Eine starke Präsenz dieses Proteins konnte an den Tagen P21 und P30 nachgewiesen werden.

3.5.2 Analyse der Proteinprofile von kultivierten Retinae

Um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss die Kultivierung der Retinae auf die Protein-Expression hat, wurden 2D-Gele von kultivierten Retinae erstellt. Es wurden die gleichen Altersstufen wie zuvor untersucht. So konnten die Proteinprofile während des axonalen Wachstums untersucht werden (Abb. 13).



vorherige Seite:

Abb. 13: 2D-Gele von Proteingemischen aus kultivierten Retinae verschiedener Altersstufen
2D-Gele (pH 4-7) von kultivierten Retinae verschiedener Altersstufen nach Coomassie-Färbung. Markiert sind Spots verschiedener Proteine, die im Verlauf der Entwicklung einer Regulation unterliegen. (a: Recoverin, b: Phosphatidylethanolamin binding Protein, c: Tolkin, d: poly (A) binding protein, e: retinoic acid binding protein, f: RNaseP protein p30, g: Trax, h: Pin1)

	P0	P8	P16	P21	P30	P60
Recoverin	+	+++	+++	+++	+++	+++
PEBP	+++	+++	++	+	+	+
Tolkin	-	-	-	-	-	+
poly(A)BP	++	++	+	+	-	-
RABP	++	+	+	+	+	++
RNasp30	-	-	+	+	-	-
Trax	-	+/-	+/-	+	+	-
Pin1	+++	+++	+	+	+	+

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Präsenz einzelner Proteine in 2D-Gelen aus kultivierten Retinae unterschiedlicher Altersstufen (Bezug zu Abb. 13)

Erläuterung der Zeichen: +++: sehr stark präsent; ++: stark präsent; +: präsent; +/-: schwach präsent; -: nicht detektiert

I. Proteine, die im Verlauf der Entwicklung stärker expremiert wurden.

Hierunter fällt das Recoverin, das ab dem Tag P8 sehr stark präsent war. Der Anstieg in der Expression erfolgte hier 8 Tage vor dem in der nicht kultivierten Retina. Das Protein Tolkin wurde erstmals am Tag P60 detektiert.

II. Proteine, deren Expression im Verlauf der Reifung abnahm.

Zu dieser Gruppe gehören das Protein PEBP, poly(A)BP sowie das Pin1 Protein. Eine Abnahme der Proteine war ab dem Tag P16 zu beobachten. Diese Abnahme erfolgte mit dem Einsetzen der axonalen Wachstumsphase und setzte sich kontinuierlich fort. Das Protein poly(A)BP war bereits am Tag P30 nicht mehr zu detektieren.

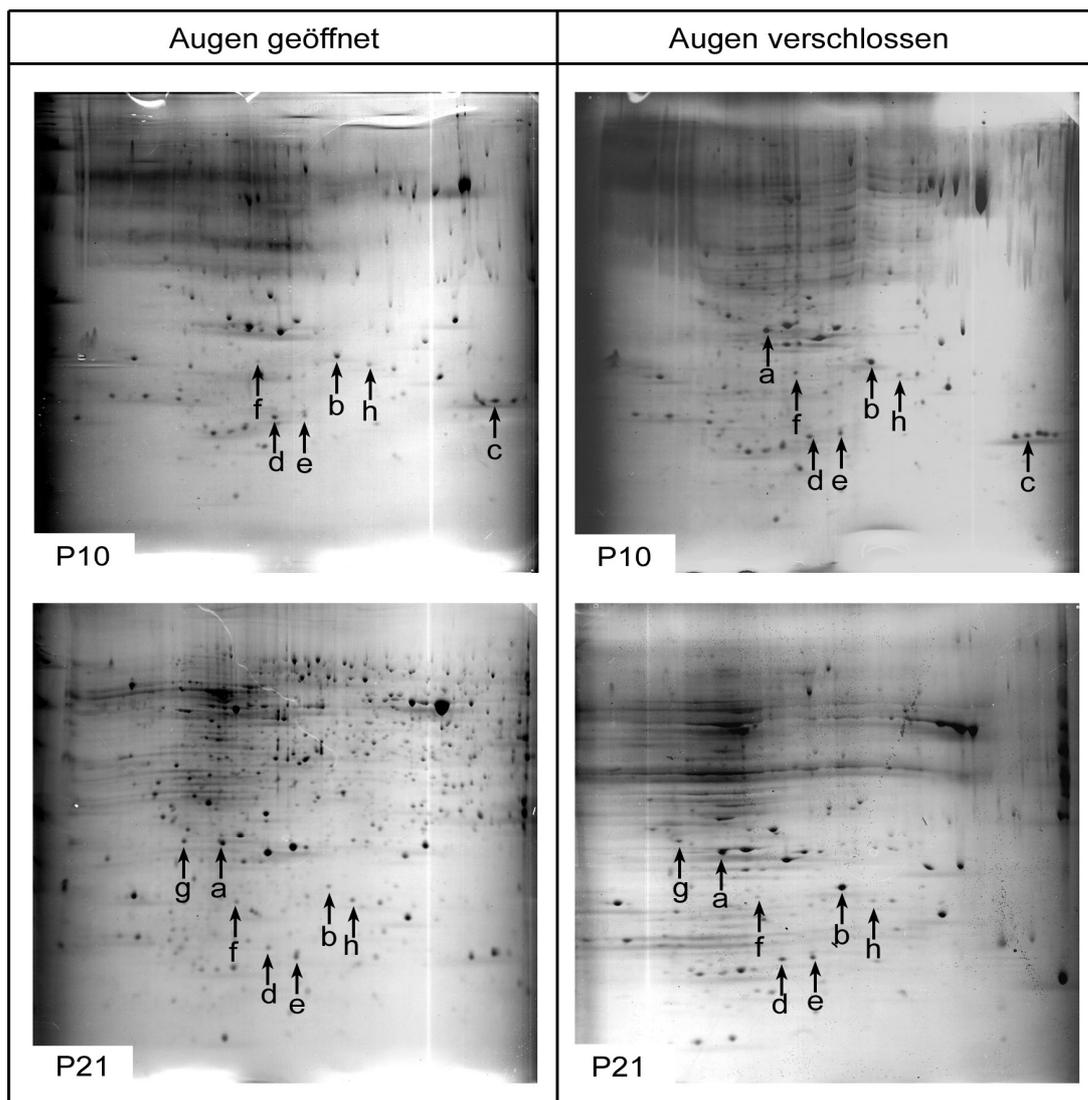
III. Proteine, die während der Reifung Expressions-Schwankungen unterlagen.

Variierende Expressions-Profile wiesen RABP, RNasp30 und Trax auf. Das Protein RABP wurde in allen Altersstufen detektiert und war an den Tagen P0 und P60 stark präsent. RNasp30 konnte während der Phase des axonalen Wachstums an den Tagen P16 und

P21 nachgewiesen werden. Das Protein Trax war an den Tagen P8 und P16 nur schwach präsent. Eine stärkere Expression zeigte sich während der beiden nachfolgenden Altersstufen.

3.5.3 Einfluss des Lichts auf die Proteinprofile

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen von GAP-43, Neurofilament als auch Rhodopsin hatten ergeben, dass ein Einfluss des Lichtes besteht (Abb. 11). Durch das Ausbleiben des Einfalls von Licht sowie die vorzeitige Exposition gegenüber dem Licht kam es zu Veränderungen der Expression mit der Folge unterschiedlicher Proteinkonzentrationen sowie Verteilungen in der Retina. Da diese immunohistochemischen Analysen nur auf die oben genannten Proteine beschränkt waren, erschien es als notwendig, mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese ein möglichst großes Spektrum verschiedener Proteine untersuchen zu können (siehe Abb. 14).



vorherige Seite:

Abb. 14: 2D-Gele (pH 4-7) zweier Maturationsstadien (P10, P21) nicht kultivierter Retinae nach unterschiedlicher Lichtexposition

Hier wurde wie bereits zuvor eine Einteilung in Gruppen vorgenommen. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Gruppe von Tieren der Altersstufe P10, denen die Augen artifiziell geöffnet wurden. Eine zweite Gruppe umfasst Tiere der Altersstufe P21. Hier wurden die Augen der Tiere verschlossen. Als Kontrollen wurden die Ergebnisse nicht behandelter Tiere der jeweiligen Altersstufe herangezogen. (a: Recoverin, b: Phosphatidylethanolamin binding Protein, c: Tolkin, d: poly (A) binding protein, e: retinoic acid binding protein, f: RNaseP protein p30, g: Trax, h: Pin1)

	P10	P21	
Recoverin	-	+++	Augen geöffnet
	+++	+++	Augen geschlossen
PEBP	++	+	Augen geöffnet
	+++	+++	Augen geschlossen
Tolkin	++	-	Augen geöffnet
	++	-	Augen geschlossen
poly(A)BP	++	+	Augen geöffnet
	++	++	Augen geschlossen
RABP	+	+	Augen geöffnet
	+	+	Augen geschlossen
RNasp30	+/-	+/-	Augen geöffnet
	+	+/-	Augen geschlossen
Trax	-	+	Augen geöffnet
	-	+	Augen geschlossen
Pin1	+	+	Augen geöffnet
	+	+/-	Augen geschlossen
aacry	-	-	Augen geöffnet
	-	-	Augen geschlossen

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Präsenz einzelner Proteine nach unterschiedlicher Lichtexposition (Bezug zu Abb. 14)

Erläuterung der Zeichen: +++: sehr stark präsent; ++: stark präsent; +: präsent; +/-: schwach präsent; -: nicht detektiert

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass ein Teil der untersuchten Proteine keinen direkten Expressions-Schwankungen unterlag, wenn die Lichtexposition ausblieb oder vorzeitig erfolgte (Tabelle 3). Zu diesen Proteinen gehören das Protein Tolkin, das RABP, der Faktor Trax als auch das aacry (Abb. 14 und Tabelle 3). Hier ließen sich keine Änderungen der Proteinpräsenz nach unterschiedlichen Lichtexpositionen erkennen.

Die Proteine Recoverin, PEBP, poly(A)BP, RNasp30 sowie Pin1 ließen leichte Veränderungen erkennen. Im Falle einer vorzeitigen Öffnung der Augen konnte am Tag P10 kein Recoverin detektiert werden. Das PEBP unterlag durch das Licht bedingt einer Reduktion der Expression, da eine Lichtdeprivation zu einer erhöhten Präsenz des Proteins am Tag P21 führte. Bei den weiteren Proteinen waren die beobachteten Veränderungen weniger stark ausgeprägt. Bezüglich des poly(A)BP war nach dem Ausbleiben des Lichts die Präsenz am Tag P21 stärker als nach einer regulären Lichtexposition. Durch die vorzeitige Öffnung der Augen am Tag P10 erfolgte eine marginale Herunterregulation der Expression des RNasp30. Das Protein Pin1 wies nach Lichtdeprivation am Tag P21 eine schwächere Präsenz auf (Abb. 14 und Tabelle 3).

3.6 Densitometrische Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Proteinmengen von Pin1, Trax und Tolkin wurden densitometrische Analysen durchgeführt (Abb. 15 und 16). Diese Analyse, die anhand der 2D-Gele kultivierter Retinae erstellt wurde, lässt deutlich erkennen, dass das Protein Pin1 während des verstärkten axonalen Wachstums nicht so stark in den Retinae präsent war, wie vor und nach dieser Phase. Der Faktor Trax scheint primär in den ersten postnatalen Wochen von Relevanz zu sein, da dieser Faktor in der adulten Retina (P60) kaum noch zu detektieren ist (Abb. 15 und 16). Offensichtlich handelt es sich hierbei um einen für die postnatale Maturation wichtigen Faktor. Das Protein Tolkin erscheint hinsichtlich dieser Entwicklungsphase des Auges ohne große Bedeutung zu sein. Erst im adulten Stadium konnte dieses Protein in der Retina nachgewiesen werden.

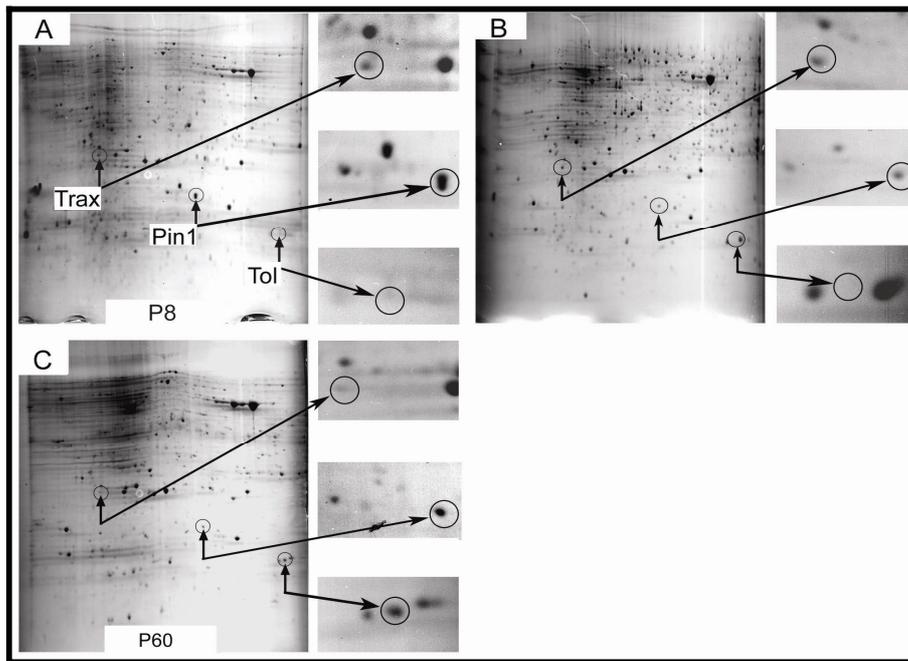


Abb. 15: 2D-Gele von kultivierten Retinae der Altersstufen P8, P21 und P60 mit Vergrößerung der Proteinspots

Diese Proteinspots der Proteine Pin1, Tolkin und Trax sind für die densitometrische Auswertung herangezogen worden. A: P8 Retina, B: P21 Retina, C: P60 Retina

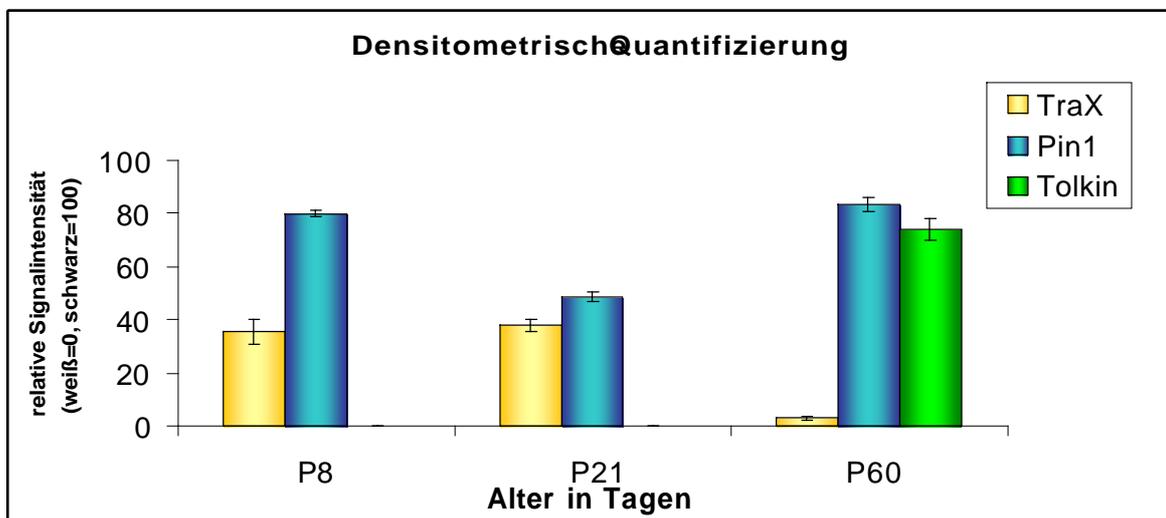


Abb. 16: Graphische Darstellung der densitometrischen Analyse der Proteinspots von Pin1, Tolkin und Trax

(Die densitometrischen Untersuchungen wurden mit dem Programm AlphaEaseFC 4.0 durchgeführt.)

3.7 Expressionsprofile auf mRNA-Ebene

Die Expressionsprofile auf Proteinebene korrelieren nicht immer mit der Genaktivität zum gegebenen Zeitpunkt. Um eine Verifizierung dieser Profile vorzunehmen, war es deshalb notwendig, mittels real time PCR die Genregulation auf RNA-Ebene zu untersuchen. Diese Untersuchung erfolgte zunächst mit dem bekannten GAP-43-Gen, sowie mit den hier neuentdeckten Genen für Trax und Pin1. Die quantitativen Daten sind in Abb. 17 gezeigt.

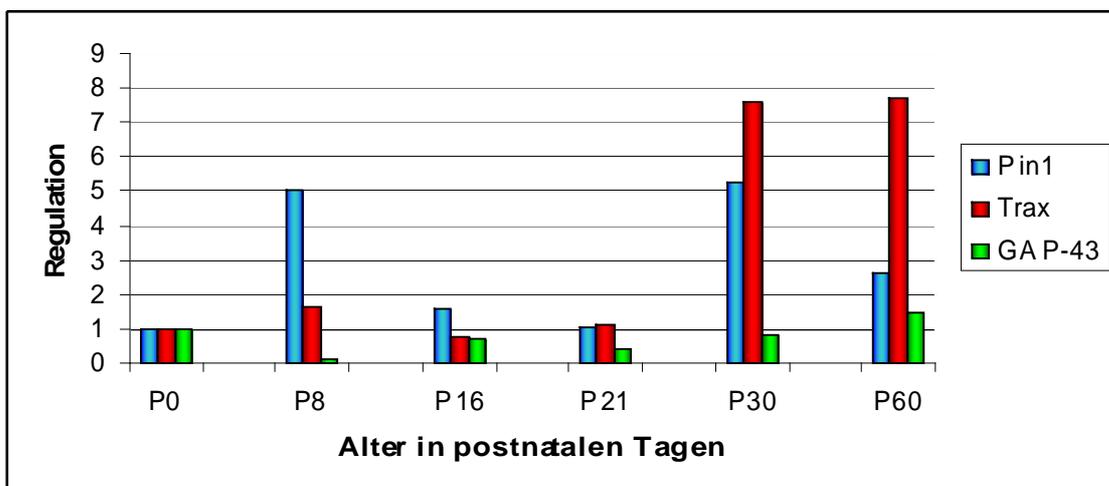


Abb. 17: Graphische Darstellung der Real time Ergebnisse

Analyse der Expressionen von GAP-43, Pin1 und Trax bei unterschiedlichen Altersstufen. Am Tag P8 und am Tag P30 wurde die Expression von Pin1 auf das 5fache herauf reguliert. Während der Phase der axonalen Elongation ist die Expression von Pin1 auf einen Wert unterhalb von 2 herunter reguliert. Die Expression von Trax steigt erst nach der Phase des axonalen Wachstums auf mehr als das 7fache an.

(Daten siehe Anhang 6.2)

Die Retina der Altersstufe P60 soll die Situation im adulten Stadium veranschaulichen. Als interner Kalibrator wurde in dieser Versuchsreihe die Expression der Zielgene am Tag P0 eingesetzt. Es ist zunächst auffällig, dass die drei Zielgene eine geringe Expressionsrate aufweisen. Eine Regulation herunter in den negativen Bereich liegt nicht vor. GAP-43 war in vielen Phasen der postnatalen Differenzierung der Retina fast unverändert exprimiert. Trax war bis zum Tag P21 detektierbar ohne eine Tendenz zur Regulation zu zeigen. Am Tag P30 und P60 war Trax um das 7-fache hoch reguliert (Abb. 17). Pin1 zeigte eine biphasische Hochregulation um das 5-fache am Tag P8 und am Tag P30.

3.8 Vektorkonstruktion und Klonierung

GAP-43 ist ein Protein mit überaus hoher Relevanz für Wachstum und Regeneration neuronaler Zellen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde seine funktionale Rolle in den RGZ charakterisiert. Aus diesem Grunde wurde das GAP-43-Gen in den RGZ mit Hilfe eines GFP-Vektors überexprimiert. Zunächst musste der Leserahmen des Genes isoliert und vervielfacht werden. Um den vollständigen Leserahmen des GAP-43 ohne Exons und Introns zu erhalten, wurde RNA aus dem Gehirn einer neugeborenen Ratte am Tag P0 isoliert. Nach einer entsprechenden Aufreinigung der RNA erfolgte eine erste Kontrolle der RNA-Qualität. Auf Harnstoff-Agarose-Gelen ließen sich zwei distinkte Banden der RNA erkennen, wodurch eine weit reichende Degradation ausgeschlossen werden kann (Abb. 18).

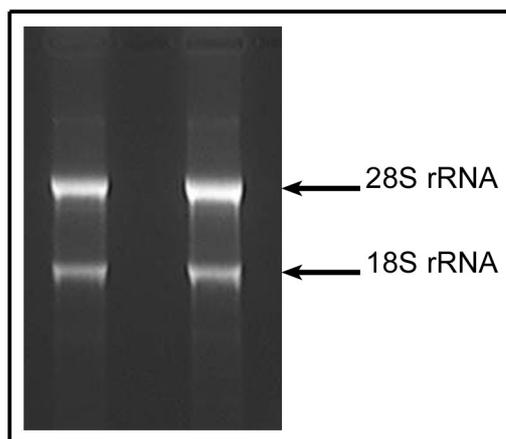


Abb. 18: isolierte RNA (Gehirn, Ratte, P0) in einem Harnstoff-Agarose-Gel

Es sind jeweils die distinkten Banden der 18S - sowie die 28S - Untereinheit der ribosomalen RNA zu erkennen

Diese Gesamt-RNA enthielt also neben maturer mRNA auch unprozessierte Vorläufer-RNA, so genannte precursor RNA, in den unterschiedlichsten Maturationsstadien. Zur Selektion der reifen mRNA, wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt. Im Rahmen dieser Variante der PCR wurde ein einsträngiger cDNA Strang mit Hilfe von oligo-dT Primern synthetisiert. Die Reife mRNA verfügt downstream des Stop-Codons über eine poly-A Sequenz. Hier binden die oligo dT-Primer. Dieser kurze doppelsträngige Bereich wird von der reversen Transkriptase erkannt und es kommt nach Anlagerung des Enzyms zur Elongation. Nach wiederholter Elongation erhält man ein Gemisch aus unterschiedlichen einzelsträngigen cDNA Formen. Um nun das GAP-43-Gen zu isolieren, wurde eine PCR mit spezifischen Primern für das GAP-43 Gen durchgeführt. Als Matrize wurde die zuvor amplifizierte cDNA eingesetzt. Die spezifischen Primer für das GAP-43-Gen überspannen eine DNA Sequenz von 681 bp, die den Leserahmen des Genes ausgehend vom Startcodon bis zum Stopcodon umfasst. Zur Optimierung des PCR Protokolls wurden

verschiedene Temperaturprofile getestet. Zudem wurden unterschiedliche Polymerasen eingesetzt (Abb. 19, A). Das beste Ergebnis zeigt die Reaktion unter Verwendung der Pfu-Polymerase (Abb. 19, A und B). In anderen Versuchsreihen wurde mit ähnlichen Ergebnissen das Expand High Fidelity System von Roche eingesetzt. Der Vorteil dieser beiden Polymerasen liegt in ihren 3' → 5' Exonukleaseaktivitäten. Durch diese Funktion wird die Fehlerrate im Rahmen einer PCR Reaktion um das Zehnfache herabgesetzt, im Vergleich zur Taq-Polymerase, die nicht über diese Fehlerkorrekturmöglichkeit verfügt.

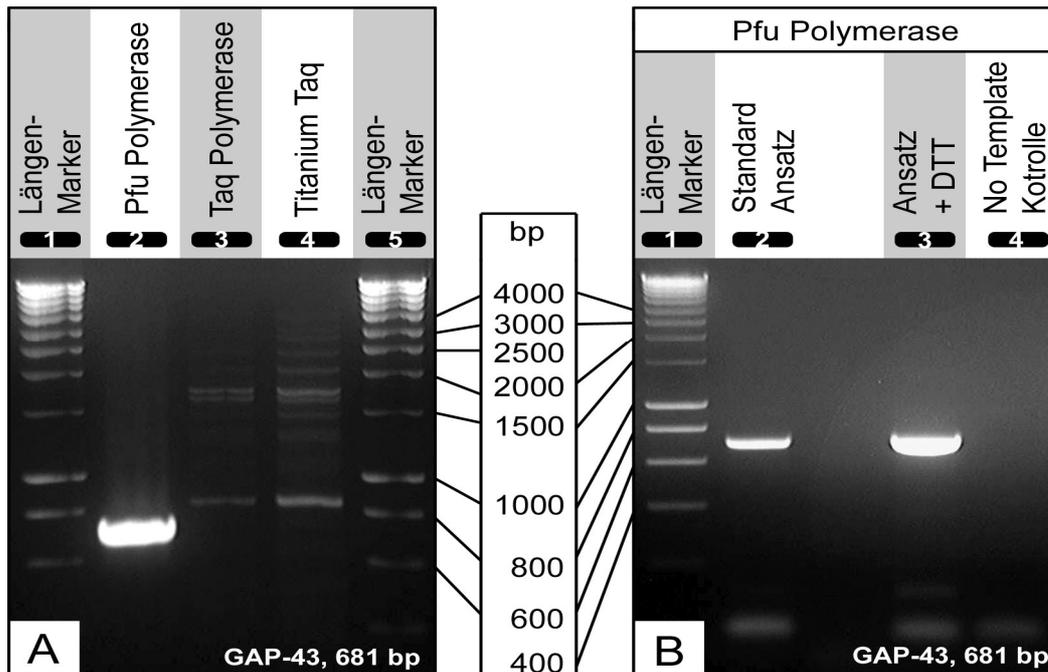


Abb. 19: Optimierung der PCR

A) Bestimmung der effektivsten Polymerase. B) Optimierung der PCR Bedingungen für die Pfu-Polymerase.

Weiterhin lieferte die Taq-Polymerase unspezifische Nebenprodukte mit Sequenzlängen von ca. 1000 bp bis 2500 bp. Dadurch lag die Konzentration des gewünschten DNA Amplifikats weit unter der Konzentration, die mit der Pfu-Polymerase erzielt werden konnte. Durch den Einsatz von DTT konnte zusätzlich eine Steigerung des spezifischen Produktes erzielt werden.

Der Leserahmen des GAP-43 Genes musste im Zuge der nachfolgenden Klonierung in dem identischen Raster eingefügt werden, in dem auch das C-terminale GFP gelesen wurde. Um dieses zu gewährleisten, wurden Primer eingesetzt, die keine vollkommene Homologien zum Template aufwiesen. Im 5'-Bereich der Primer wurden jeweils so viele Basen angefügt, dass eine spezifische Restriktionssequenz für ein bestimmtes Enzym

erzeugt wurde (Abb. 20). Darüber hinaus wurde das Stopcodon des GAP-43 so verändert, dass ein Glycin codiert wurde. Mit diesen Veränderungen konnte das GAP-43 in demselben Leseraster wie die GFP-Sequenz in den Expressionsvektor eingefügt werden.

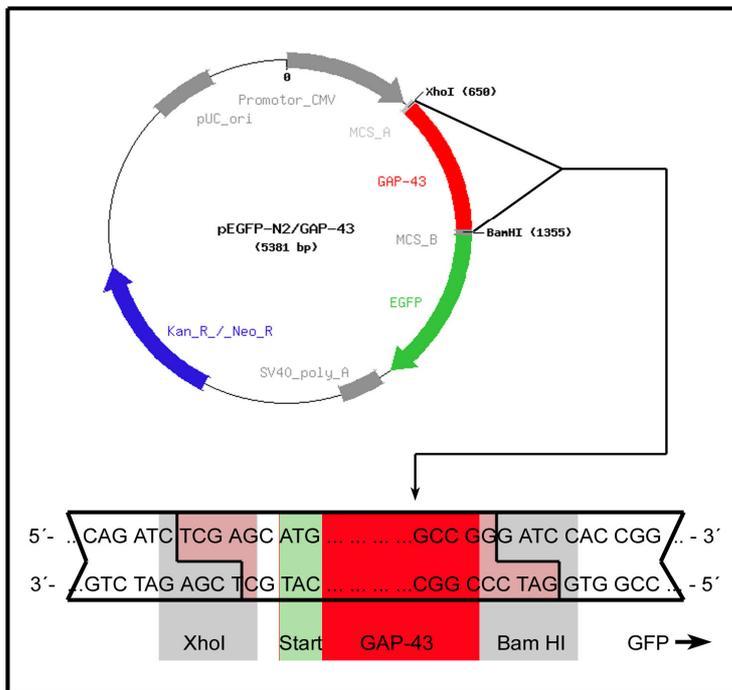


Abb. 20: Vektorkarte des Konstruktes pEGFP-N2 / GAP-43 mit detaillierter Darstellung der multi cloning site und der verwendeten Restriktionssequenzen

Nach erfolgter Amplifikation des Zielgenes mit den Klonierungsprimern sowie nach Aufreinigung und Restriktion des PCR-Produktes, konnte die Ligation und Klonierung des Leserahmens durchgeführt werden.

Erfolgreich transformierte *E. coli* erwarben eine Kanamycinresistenz, worüber die Selektion auf entsprechendem Medium erfolgen konnte. Etwaige Transformanten wurden kultiviert und einer Plasmidisolierung unterzogen. Die Präparate wurden einer Kontrollrestriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen *Bam HI* und *Xho I* unterzogen. Nach erfolgreicher Ligation wurde durch Restriktion das GAP-43 Insert wieder aus dem Vektor herausgeschnitten. Dies war der Fall bei den Klonen A, D, E, F, G und H (Abb. 21). Neben vektorieller DNA mit einer Länge von ca. 4,7 kb, ist auch der eingefügte GAP-43 Leserahmen mit einer Länge von 681 bp zu erkennen. Die drei Klone A, D und F wurden erneut kultiviert und nachfolgend einer weiteren Plasmidpräparation unterzogen.

Seq-rev	-----GCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTAGTGAACCG
GAP-43_rat_	GTGAGCAAGCGAGCAGAAAAGAGGTGGAGAGGGGGGAATAAGGAAGAGAGGAGGAAAGG
Seq-for	-----
Seq-rev	TCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCATGCTGTGCTGTATGAGAAGAAC
GAP-43_rat_	AGAGAAGGCAGGAAGAAGGCAGGGGAAGATACC-ACCATGCTGTGCTGTATGAGAAGAAC
Seq-for	-----
Seq-rev	CAAACAGGTTGAAAAGAATGATGAGGACCAAAGATTGAACAAGATGGTGTCAAACCGGA
GAP-43_rat_	CAAACAGGTTGAAAAGAATGATGAGGACCAAAGATTGAACAAGATGGTGTCAAACCGGA
Seq-for	----- ---AAAAGATTGAACAAGATGGTGTCAAACCGGA
Seq-rev	GG-TAAGGCTCATAAGGCTGCAACCAAATTCAGGCTAGCTTCCGTGGACACATAACAAG
GAP-43_rat_	GGATAAGGCTCATAAGGCTGCAACCAAATTCAGGCTAGCTTCCGTGGACACATAACAAG
Seq-for	GGATAAGGCTCATAAGGCTGCAACCAAATTCAGGCTAGCTTCCGTGGACACATAACAAG
Seq-rev	GAAAAAGCTCAAAGACGAGAAGAAGGGTGATGCACCAGCTGCTGAGGCCGAGGCCAAGGA
GAP-43_rat_	GAAAAAGCTCAAAGACGAGAAGAAGGGTGATGCACCAGCTGCTGAGGCCGAGGCCAAGGA
Seq-for	GAAAAAGCTCAAAGACGAGAAGAAGGGTGATGCACCAGCTGCTGAGGCCGAGGCCAAGGA
Seq	
-rev	GA-GGATGATGCTCCCGTTGCTGATGGTGTGGAGAAGAAGGAGGGAGATGGCTCTGCTAC
GAP-43_rat_	GAAGGATGATGCTCCCGTTGCTGATGGTGTGGAGAAGAAGGAGGGAGATGGCTCTGCTAC
Seq-for	GAAGGATGATGCTCCCGTTGCTGATGGTGTGGAGAAGAAGGAGGGAGATGGCTCTGCTAC
Seq-rev	TACCGATGCAGCCCCAGCCACCAGCCCTAAGGCTGAGGAGCCCAGCAAGGCAGGAGATGC
GAP-43_rat_	TACCGATGCAGCCCCAGCCACCAGCCCTAAGGCTGAGGAGCCCAGCAAGGCAGGAGATGC
Seq-for	TACCGATGCAGCCCCAGCCACCAGCCCTAAGGCTGAGGAGCCCAGCAAGGCAGGAGATGC
Seq-rev	ACCTTCTGAGGAGAAGAAGGGCGAAGGGGATGCGGCCCTTCAGAGGAAAAGGCCGGCTC
GAP-43_rat_	ACCTTCTGAGGAGAAGAAGGGCGAAGGGGATGCGGCCCTTCAGAGGAAAAGGCCGGCTC
Seq-for	ACCTTCTGAGGAGAAGAAGGGCGAAGGGGATGCGGCCCTTCAGAGGAAAAGGCCGGCTC
Seq-rev	AG-TGAGACAGAAAGTGCTGCTAAAGCTACCACTGATAACTCGCCGTCTCCAAGGCCGA
GAP-43_rat_	AGCTGAGACAGAAAGTGCTGCTAAAGCTACCACTGATAACTCGCCGTCTCCAAGGCCGA
Seq-for	AGCTGAGACAGAAAGTGCTGCTAAAGCTACCACTGATAACTCGCCGTCTCCAAGGCCGA
Seq-rev	AGATGGCCCAGCCAAGGAGGAGCCTAAACAAGCCGATGTGCCTGCTGCTGTCACTGATGC
GAP-43_rat_	AGATGGCCCAGCCAAGGAGGAGCCTAAACAAGCCGATGTGCCTGCTGCTGTCACTGATGC
Seq-for	AGATGGCCCAGCCAAGGAGGAGCCTAAACAAGCCGATGTGCCTGCTGCTGTCACTGATGC
Seq-rev	TGCTGCCACCACCCCTGCTGCAGAGGATGCTGCCAAGGCAGCGCAGCCTCCAACGGAGAC
GAP-43_rat_	TGCTGCCACCACCCCTGCTGCAGAGGATGCTGCCAAGGCAGCGCAGCCTCCAACGGAGAC
Seq-for	TGCTGCCACCACCCCTGCTGCAGAGGATGCTGCCAAGGCAGCGCAGCCTCCAACGGAGAC
Seq-rev	TGCAGAAAGCAGCCAAGCTGAGGAGGAGAAAGAAGCTGTAGATGAAGCCAAACCTAAGGA
GAP-43_rat_	TGCAGAAAGCAGCCAAGCTGAGGAGGAGAAAGAAGCTGTAGATGAAGCCAAACCTAAGGA
Seq-for	TGCAGAAAGCAGCCAAGCTGAGGAGGAGAAAGAAGCTGTAGATGAAGCCAAACCTAAGGA
Seq-rev	AAT-----
GAP-43_rat_	AAGTGCCCCGACAGGATGAGGGTAAAGAAGACCCCGAGGCTGACCAAGAACATGCC TGAAC
Seq-for	AAGTGCCCCGACAGGATGAGGGTAAAGAAGACCCCGAGGCTGACCAAGAACATGCC GGGAT
Seq-rev	-----
GAP-43_rat_	TTTAAGAAACGGCTTTCCACGTTGCCCCACCTGAACCCCTGTCTCTCCTGCCCTTTCTCA
Seq-for	CCACCGGCCGGTCGCCACC ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCC
Seq-rev	-----
GAP-43_rat_	GATCCACTCTGAAGTTTCTCTCTCTGCTCACGTGTGTGAGCCTGTCTCTCTCTAC
Seq-for	CATCCTGGTCGAGCTGGACG -----

3.9 *In vitro* Transfektionen

3.9.1 Transfektion der RGC-5 Zellen

Durch die Transfektion mit Lipofectamine wurden in den RGC-5 Zellkulturen ca. 15 % der Zellen erfolgreich transfiziert. Eine deutliche GFP-Fluoreszenz ist primär im perinukleären Raum zu erkennen (Abb. 23). Wenige Signale erschienen im intrazellulären Raum in direkter Nähe zur Zellmembran. Morphologisch wiesen die transfizierten Zellen keine signifikanten Unterschiede zu den nicht transfizierten Zellen auf.

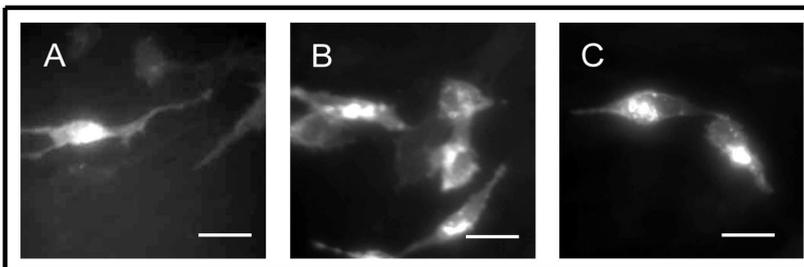


Abb. 23: Aufnahmen von RGC-5 Zellen nach Transfektion mit dem Vektor pEGFP-N2

A) Detektion der Fluoreszenz 24 h nach der Transfektion. B) RGC-5

Zellen nach 48 h Inkubation nach erfolgter Transfektion. C) Aufnahme erfolgte 72 h nach der Transfektion. (Maßstabsbalken: 10 µm).

In wie weit nun das volle Konstrukt expremiert wurde, oder ob die Fluoreszenz nur von GFP-Fragmenten herrührte sollte in einer nachfolgenden Western Blot Analyse geklärt werden (Abb. 24).

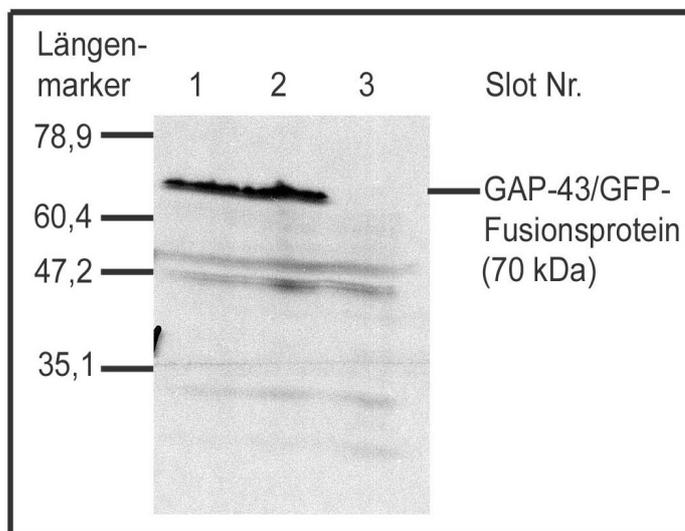


Abb. 24: Western Blot Analyse mit primärem Antikörper gegen GFP.

Auf Position 1 und 2 wurde Proteingemisch transfizierter RGC-5 Zellen aufgetragen. Auf Position 3 wurde zur Kontrolle das Lysat nicht transfizierter Zelle aufgetragen. Das GFP / GAP-43 Fusionsprotein weist ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa auf.

Die Geltaschen 1 und 2 wurden mit dem Lysat transfizierter

Zellen beschickt (Abb. 24). In Spur 3 wurde zur Kontrolle das Proteingemisch nicht transfizierter Zellen aufgetragen. Das durch den Vektor pEGFP-N2 / GAP-43 zur Expression gelangte Fusionsprotein besteht N-terminal aus dem GAP-43 Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa und C-terminal aus dem GFP mit einem Molekulargewicht von 27 kDa. Somit müsste das Fusionsprotein ein ungefähres Molekulargewicht von 70kDa aufweisen. Dies lässt sich im dargestellten Western Blot erkennen. Die aus diesem Fusionsprotein zu erwartende Fraktion von rund 70 kDa ist nur in den Proteingemischen der transfizierten Zellen detektiert worden. Kein entsprechendes Signal ist in dem Gelbereich zu erkennen, in dem sich die Proteine der nicht transfizierten Zellen befinden. Demnach expremiert der konstruierte Vektor das volle Fusionsprotein. Eine episomale Expression dieses Proteins in RGC-5 Zellen führt zu keiner augenscheinlichen morphologischen Veränderung dieser Zellen.

3.9.2 Transfektion dissoziierter retinaler Zellen

Die Konstruktion des GAP-43 / GFP - Vektors ermöglicht eine weitgehend exakte Lokalisation des Genproduktes GAP-43. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen, die eine Überexpression des GAP-43-Gens bewirkt, eingehender charakterisiert werden.

Durch eine Optimierung der Methodik konnten vitale Kulturen retinaler Zellen erstellt werden. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von Agenzien zur Lipidtransfektion. Es zeigten sich jeweils einzelne Zellen mit deutlicher GFP-Fluoreszenz (Abb. 25).

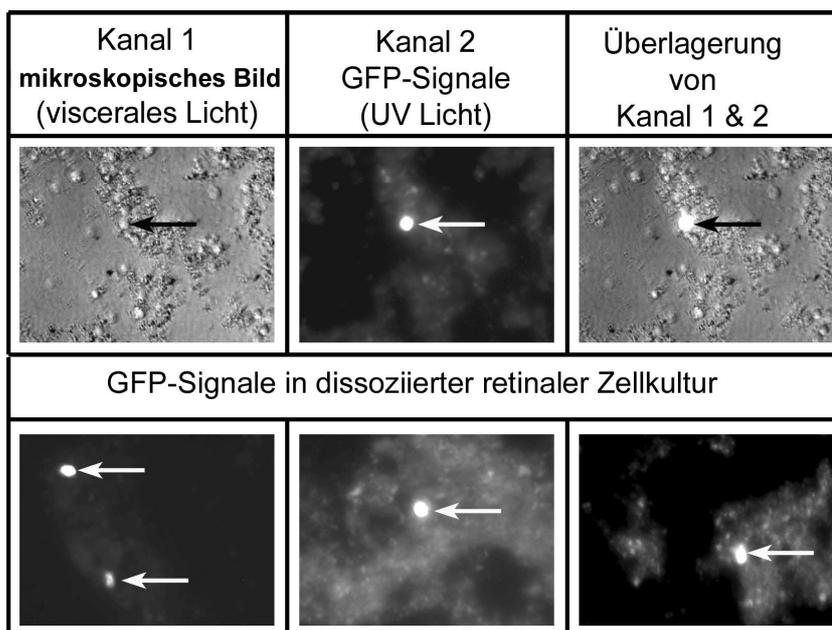


Abb. 25: Dissoziierte retinale Zellkultur nach Transfektion mit dem Vektor pEGFP-N2

Darstellung der Durchlichtaufnahme, des Fluoreszenzbildes so wie die Überlagerung beider Bilder. (Vergrößerung: 20 x Objektiv, 10 x Okular)

3.9.3 Lipidtransfektion retinaler Explantate

Nach der Behandlung der Explantate mit Papain zeigte sich eine gesteigerte Transfektionsrate. Es zeigten sich nun einzelne Bereiche im retinalen Verbund, die eine deutliche GFP-Fluoreszenz aufwiesen, obwohl es wenige Zellen waren, die fluoreszierten. Bei juvenilen Retinae stieg die Anzahl der transfizierten Zellen unwesentlich. Eine quantitative Transfektion war also nicht möglich. Dementsprechend konnte kein quantitativer Unterschied im Regenerationsverhalten nach GAP-43-Transfektion beobachtet werden, obwohl der GAP-43-GFP Vektor erfolgreich in die Ganglienzellen gelangte (Abb. 26).

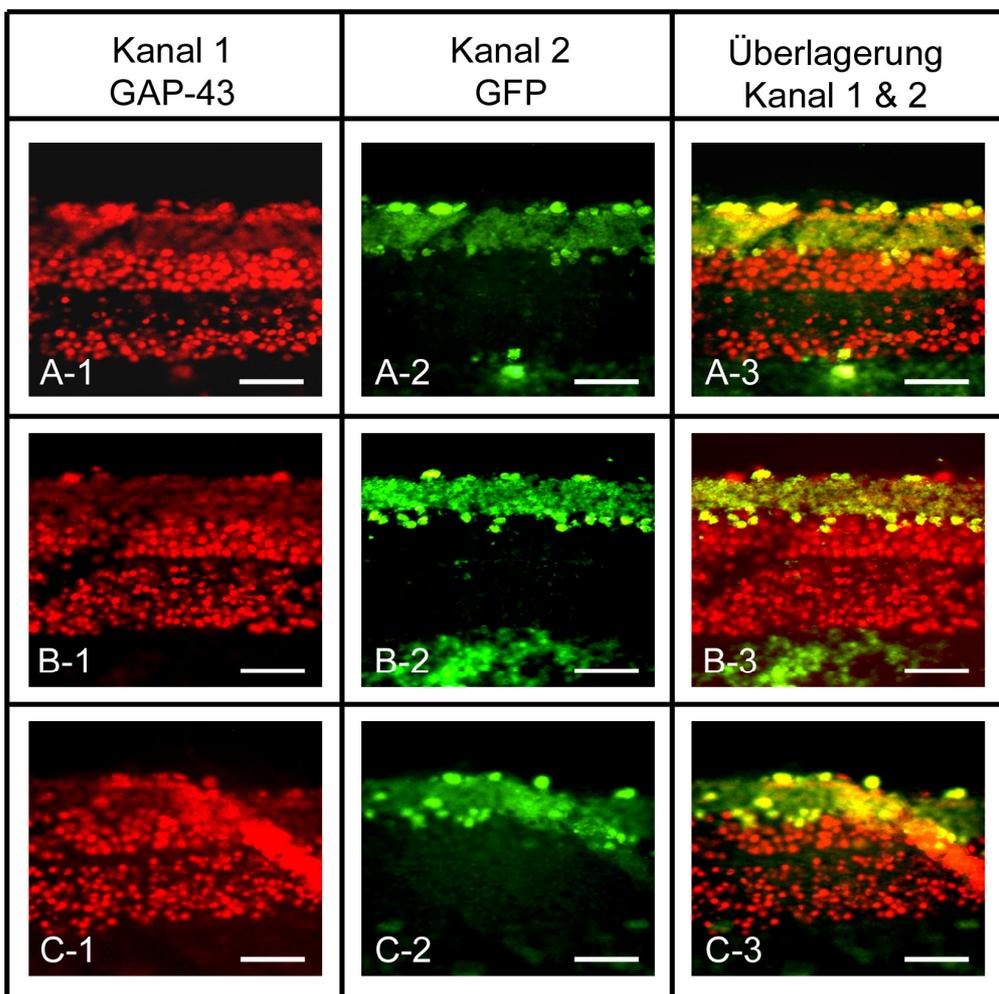


Abb. 26: Kryostatschnitte retinaler Explantate nach Transfektion mit dem Vektor pEGFP-N2 und immunhistochemischer Detektion von GAP-43

A-1), B-1), C-1): Immunhistologische Markierung mit einem primären Antikörper gegen Gap-43 gekoppelt mit TRITC. A-2), B-2), C-2): Im UV-Spektrum detektierte GFP-Fluoreszenz. A-3), B-3), C-3): Überlagerung der beiden vorangegangenen Aufnahmen der jeweils selben Retina. (Maßstabsbalken: 50 µm)

3.10 *In vivo* Transfektion

Die vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass der Zellverbund prinzipiell kein Hindernis für eine erfolgreiche Transfektion darstellt. Der Gentransfer ist jedoch erschwert. Nach einem enzymatischen Verdau mit Papain konnte eine teilweise Transfektion erfolgen. Der Nachteil war jedoch, dass die so behandelten Retinae nicht mehr die Fähigkeit der Adhäsion besaßen, wodurch eine Quantifizierung etwaiger axonaler Fortsätze nach erfolgter Transfektion nicht möglich war.

Um diese Problematik zu vermeiden, wurde eine Methodik der *in vivo* Transfektion entwickelt. Ein Gemisch aus vektorieller DNA und Dil wurde in eine Kavität im Colliculus superior appliziert. Das Gemisch wurde über die synaptischen Endungen oder die axonale Termination aufgenommen und über den axonalen Transport in die Ganglienzellen der Retina transportiert. In der retinalen Ganglienzelle kam es dann zur Expression der episomalen DNA. Das Dil diente dabei als Träger für die DNA, damit sie mit dem lipophilen Farbstoff internalisiert werden konnte.

Während der Entwicklungsphase dieser Methode wurden verschiedene Varianten hinsichtlich ihrer Effektivität untersucht. Die eingesetzten DNA Mengen variierten zwischen 1 µg und 500 µg, wobei die Applikation der hohen DNA Mengen in Form von DNA-Pellets erfolgte. Das Volumen der eingebrachten Lösungen, betrug zwischen 10 µl und 50 µl. Durch die Verwendung von Lipofectamine konnte keine Steigerung der Transfektionsrate erzielt werden.

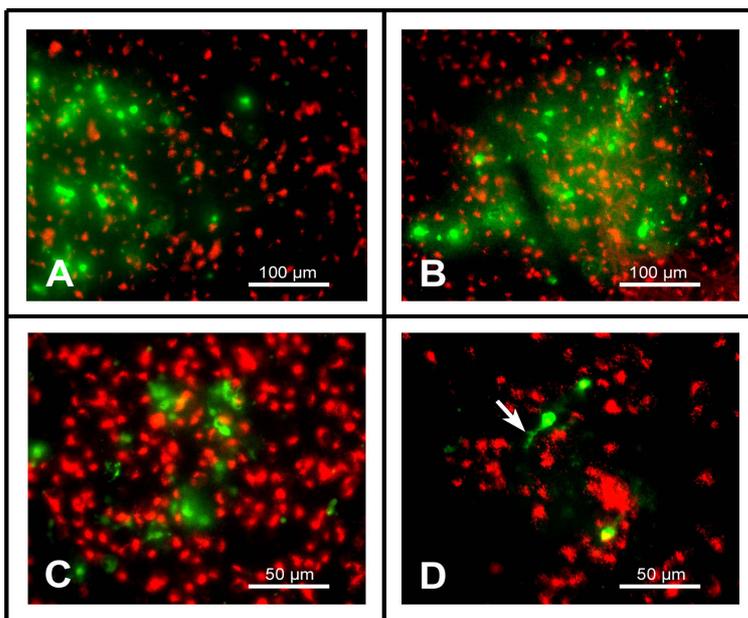


Abb. 27: Mikroskopische Aufnahmen retinaler Explantate nach retrograder Transfektion mit pEGFP-N2 und retrograder Färbung mit dem Farbstoff Dil

A), B): Überlagerte Fluoreszenzaufnahmen von Retinae.

C), D): Überlagerte Fluoreszenzaufnahmen von Retinae. RGZ emittieren rote (Dil) und grüne (GFP) Fluoreszenz.

Diese Aufnahmen (Abb. 27) lassen erkennen, dass eine *in vivo* Transfektion neuronaler Zellen möglich ist ohne die Verwendung viraler Transfektionsagenzien. Der axonale Transport kann demnach für die Transfektion neuronaler Zellen verwendet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Methodik in der Praxis durchführbar ist. Mittels des kombinierten Einsatzes von Dil und DNA konnte zudem eine Methode entwickelt werden, durch die das eigentliche Ziel in der Retina, die Ganglienzellen, transfiziert werden konnten. Dil unterstützt offensichtlich mit seinen stark lipophilen Eigenschaften die Aufnahme der DNA. Gleichzeitig werden durch die Verwendung des Farbstoffes die RGZ markiert. Die Inkubationszeit nach der Operation betrug zwischen 10 und 14 Tagen. Nach erfolgter Inkubation und Explantation der Retina zeigte sich eine ausgeprägte Färbung der RGZ (Abb. 27 und 28). Der rote Farbstoff Dil war in den überwiegenden Anteil der Ganglienzellen transportiert worden. In einigen Bereichen des retinalen Gewebes konnten darüber hinaus GFP in RGZ lokalisiert werden. Einige Zellen wiesen eine GFP Fluoreszenz in den axonalen und dendritischen Fortsätzen auf (Abb. 27).

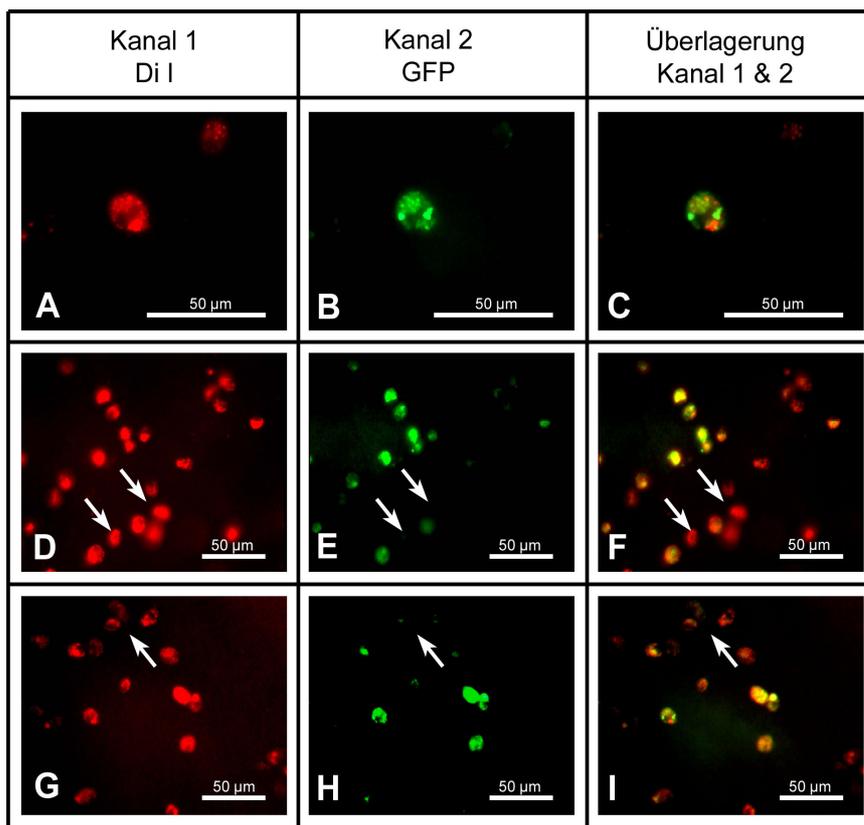


Abb. 28: Retrograd transfizierte und markierte RGZ

A) - C): Einzelne RGZ emittiert Dil und GFP-Fluoreszenzsignale in unterschiedlichen Kompartimenten des intrazellulären Raumes. D) - I): Aufnahmen mehrerer fluoreszierender RGZ zur Differenzierung der Häufigkeiten von Dil und GFP Signalen. Pfeile markieren nur Dil-Fluoreszenz emittierende RGZ.

Wurden transfizierte Retinae im Anschluss an die Explantation *in vitro* kultiviert, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu nicht transfiziertem Gewebe. Die Anzahl der GAP-43 episomal exprimierenden Zellen war gering, so dass kein deutlicher Anstieg des

axonalen Wachstums bzw. eine Zunahme der Axonverzweigungen detektierbar wären (Abb. 29).

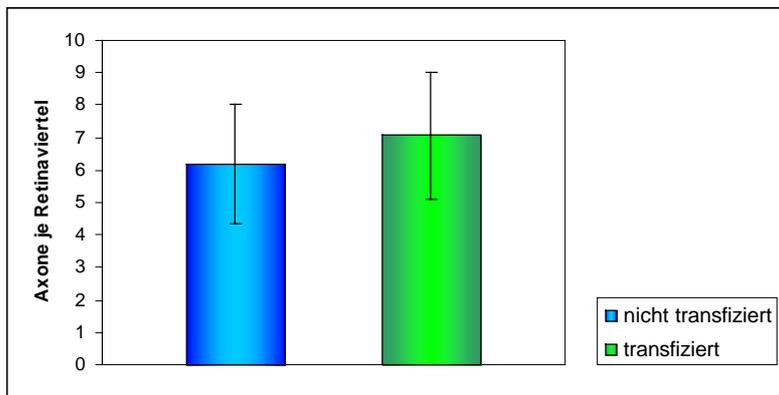


Abb. 29: Quantifizierung des axonalen Wachstums retrograd transfizierter Retinae und Kontroll-Retinae

Der Probenumfang je Gruppe beträgt n=16. Nicht transfizierte Retina: Mittelwert beträgt rund 6

Axone je Retinaviertel bei einer Standardabweichung von 1,8. Transfizierte Retina: Mittelwert beträgt rund 7 Fasern je Retinaviertel bei einer Standardabweichung von 1,9.

Andere Versuchsreihen, im Zuge derer Freund's Adjuvant verwendet wurde, führten zu Ergebnissen, bei denen sehr wohl eine GFP-Fluoreszenz zu erkennen war, diese jedoch nicht in den retinalen Ganglienzellen lokalisiert war. So wurden im Rahmen einer Versuchsreihe Areale des Cortex transfiziert, die auch in den Colliculus projizieren (siehe Abb. 30).

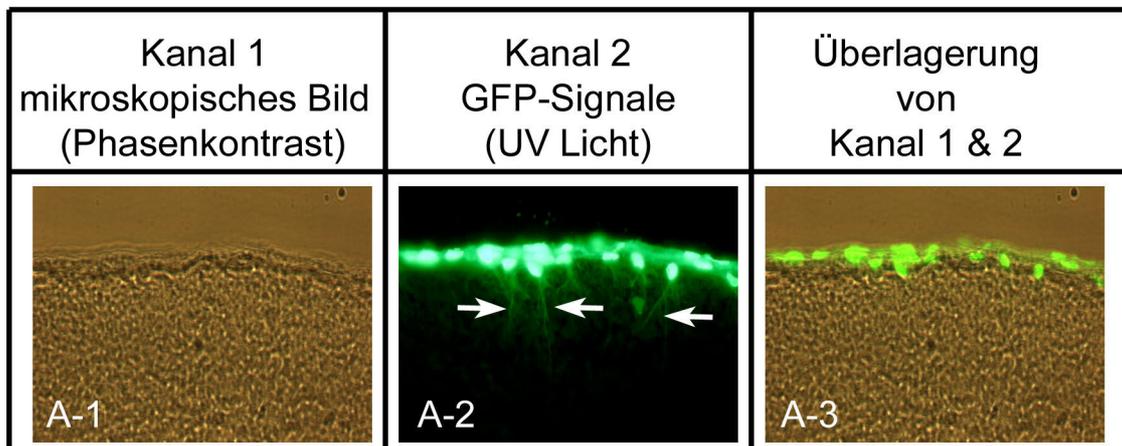


Abb. 30: GFP Fluoreszenz in corticalen Zellen nach Applikation von vektorieller DNA in den Colliculus Superior

Vereinzelt sind deutliche GFP-Signale zu erkennen, wie sie von den Zellen des Cortex ausgestrahlt werden. Die Abbildungen A-1, A-2 und A-3 zeigen einen Microtomschnitt eines solchen Areals. Im Bild A-1 ist die mikroskopische Aufnahme dieses Bereiches begrenzt durch die corticale Rinde im Durchlicht zu erkennen. Die Aufnahme A-2 zeigt die GFP Signale, wobei Axone und dendritische Fortsätze ebenfalls durch Fluoreszenz markiert sind. Die Überlagerung beider Aufnahmen in A-3 zeigt deutlich, dass einzelnen Zellen des Cortex GFP exprimieren.

4. Diskussion

4.1 Quantifizierung des axonalen Wachstums während der postnatalen Entwicklung der Retina

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe des beschriebenen Modells der Kultivierung juveniler Retina aus *Rattus norvegicus* gezeigt werden, dass RGZ zwischen dem Tag P14 und dem Tag P24 axonale Fortsätze in großem Umfang *in vitro* ausbilden. Häufig sind pränatale retinale Zellen kultiviert worden und für unterschiedlichste Untersuchungen herangezogen worden. Oftmals wurden dissoziierte und selektierte RGZ eingesetzt. Andere Arbeiten wiederum beschreiben das Wachstum von Axonen am Tag der Geburt. Die Retinae von neugeborenen Ratten wurde explantiert und die RGZ von der Retina isoliert. Die Kultivierung erfolgte in einer dreidimensionalen Matrix (Parton et al., 1992).

Zwischen den Tagen P0 und P13 regeneriert die Retina keine axonalen Fasern *in vivo*. Zum Zeitpunkt P0 besteht die Retina aus zwei Schichten. In der germinativen Schicht erfolgt die Proliferation der Vorläuferzellen. In der nicht-germinativen Schicht befinden sich die RGZ, deren Axone bereits in den *Colliculus superior* projizieren.

Am Tag P8 sind nukleäre und plexiforme Schichten ausgebildet. Die laminare Struktur gleicht bereits der adulten Form. Neurofilament und Rhodopsin können immunhistologisch noch nicht nachgewiesen werden. Das Augenlid ist zu diesem Zeitpunkt noch geschlossen.

Einen Tag vor der Öffnung der Augen, an P13, ist die Entwicklung der Retina abgeschlossen. Die Reifung retinaler Zellen sowie apoptotische Prozesse sind abgeschlossen. Amakrinzellen haben in der inneren plexiformen Schicht Synapsen ausgebildet. Die Myelinisierung der in den *Colliculus superior* projizierenden Axone hat eingesetzt.

Im Falle einer Verletzung der Axone verhindern die Astrocyten und Oligodendrozyten, wie sie im ZNS vorkommen, eine Regeneration (Moon et al., 2001). Neben den Gliazellen, die eine Regeneration unterdrücken, besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass die

neuronalen Zellen im Verlauf ihrer Reifung die Fähigkeit zur Regeneration verlieren (Bandtlow et al., 1997; Fawcett et al., 1997).

Während der Maturation der Retina formen sich nicht nur Zellen aus bzw unterliegen zu gewissen Teilen der Apoptose. Parallel zu dieser Entwicklung werden erste Neurotrophine gebildet. Diffundierbare Faktoren, wie die Familie der Neurotrophine, zu denen auch der nerve growth factor (NGF) (Levi-Montalcini und Angeletti, 1968), der brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Barde et al., 1982), das Neurotrophin 3 (NT-3) (Hohn et al., 1990) als auch das Neurotrophin 4/5 (Ip et al., 1992) gehören, haben einen weit reichenden Einfluss auf die Maturation der RGZ. Neurotrophine fördern das Wachstum und die Differentiation der neuronalen Zellen. Aber auch nach Abschluss der Entwicklung gewährleisten Trophine einen Fortbestand der ausdifferenzierten neuronalen Zellen (Kawasaki et al., 2000). Die mRNA des BDNF ist sowohl zum Zeitpunkt der Geburt (Rickmann et al., 1992) als auch in dem adulten visuellen System der Ratte im *Colliculus superior* zu finden (Gall et al., 1992). Aber nicht nur im Colliculus superior konnten Neurotrophine detektiert werden. In dem sich entwickelnden retinalen Gewebe sind diese Faktoren ebenfalls zu finden. Die jeweiligen Trophine lassen sich in bestimmten Schichten der Retina nachweisen. So wurden BDNF und NGF in der Ganglienzellschicht lokalisiert (Perez et al., 1995).

Diese Neurotrophine binden an spezifische Rezeptoren und wirken auf diese Weise auf die jeweiligen neuronalen Zellen. Es handelt sich hierbei um die p75, TrkA, TrkB und TrkC Rezeptoren (Chao et al., 1994; Barbacid et al., 1994). Der p75, der TrkA Rezeptor als auch der TrkB Rezeptor wurden in juvenilen und adulten RGZ nachgewiesen (Rickmann et al., 1995; Ugolini et al., 1995). Die mRNA des TrkC Rezeptors, der NT-3 bindet, wurde in retinalem Gewebe detektiert (Allendorfer et al., 1994). Die einzelnen Rezeptoren binden nur spezifische Neurotrophine. NGF wird von dem TrkA Rezeptor erkannt, während TrkB BDNF als auch NT-4 bindet (Barbacid et al., 1994; Windisch et al., 1995). Lediglich an den Neurotrophinrezeptor p75 (p75NTR) binden die oben genannten Trophine auf ähnliche Weise. Die für die Bindung zu Grunde liegende Affinität ist nicht stark ausgeprägt. Durch die Bindung ausgelöst erfolgt eine Aktivierung der Trk Rezeptoren (Greene et al., 1995).

Die Rezeptoren für Neurotrophine sind in der Retina vorhanden. Auch konnte ihre Funktionalität *in vivo* und *in vitro* belegt werden. So zeigten RGZ in einer Cokultur mit BDNF sekretierenden Fibroblasten ein verstärktes axonales Wachstum (Atkinson et al., 1999). BDNF war in der Lage, das Wachstum von sich entwickelnden aber auch von

verletzten RGZ *in vivo* und *in vitro* zu fördern (Johnsons et al., 1986). Nun stellt sich die Frage, in wie weit die Neurotrophine und die Neurothrophinrezeptoren befähigt sind, ein Auswachsen der Axone zu bewirken. Die in dieser Arbeit eingesetzten Retinae sind postnatalen Ursprungs, aber auch mit einem Alter von 14 bis 24 Tagen noch nicht vollständig differenziert. Damit die Neurotrophine ein derart starkes axonales Wachstum auslösen könnten, müsste die Maturation zu diesem Zeitpunkt ein Stadium erreicht haben, in dem die Retina für die Neurotrophine sensibilisiert ist. Voraus gesetzt, die retinalen Ganglienzellen sind während dieser Zeitspanne befähigt, den von Neurotrophinen herbeigeführten Effekt des axonalen Wachstums optimal umzusetzen, so stellt sich immer noch die Frage, ob ausreichend dieser Substanzen im retinalen Gewebe vorhanden sind. Hier wäre eine Begründung eines etwaig erhöhten Neurotrophinspiegels in der eigentlichen Methodik der Kultivierung zu finden. Diese Kultivierung der explantierten Retinae erfolgt in einem Glutamat-haltigen Medium. Da die Retina als Gewebeverbund kultiviert wurde, sind in der Kultur auch Müllerzellen enthalten. Diese reagieren auf spezifische Weise auf die Präsenz von Glutamat. Müllerzellen der Altersstufen P8 bis P10 reagieren mit der Produktion von Neurotrophinen auf das Glutamat im Medium (Taylor et al., 2003). Wäre dies jedoch der Grund für das hier beobachtete axonale Wachstum, so hätte sich ein ausgeprägtes axonales Wachstum schon um den Tag P10 einstellen müssen. Zu berücksichtigen bleibt hierbei, dass die Untersuchungen von Taylor et al auf homogenen Kulturen von Müllerzellen beruhen. Auch hier wurde keine Retina als gesamter Gewebeverbund untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen ein aktives Wachstum von Axonen bei retinalen Kulturen ab einem Alter vom postnatalen Tag P14 bis zum Tag P24. Die postmitotischen RGZ sind zu diesem Zeitpunkt ausdifferenziert und bezüglich ihrer Funktion festgelegt. Rezeptoren für Neurotrophine, die die Entwicklung von neuronalen Zellen fördern, sind in der Retina vorhanden. Durch die Art der Kultivierung kann es auch zur Bildung bestimmter Neurotrophine durch Müllerzellen kommen. Dies allein erscheint jedoch nicht als hinreichend, um ein ausgeprägtes axonales Wachstum begründen zu können. Es sind hier sicherlich mehrere Faktoren zu berücksichtigen, die einen neurotrophen Effekt herbeiführen können und so ein Auswachsen der Axone fördern. Die Methodik der Kultivierung und das verwendete Medium spielen sicherlich eine Rolle. Da die RGZ in der Retina eingeschlossen kultiviert wurden, sind sicherlich auch verschiedene Einflüsse unterschiedlichster retinaler Zellen zu beachten. Auf der einen Seite gibt es Zellen, die ein axonales Wachstum zu diesem Zeitpunkt inhibieren, wie es bei den Amakrinzellen der Fall zu sein scheint (Goldberg et al., 2002). Auf der anderen Seite sind die Müllerzellen zu nennen, die neurotrophe Faktoren unter den hier angewendeten

Kulturbedingungen exprimieren. Es konnte jedoch bis zu diesem Zeitpunkt kein definitiver Grund für das postnatale axonale Wachstum aufgezeigt werden. Es bleibt der Umstand, dass das Wachstum der Axone, wie es beobachtet worden war, sich nach dem Öffnen der Augen einstellt. Daher ergibt sich die Frage, ob dieser erste Reiz des auf die Retina auftreffenden Lichtes der Auslöser für das Wachstum ist oder ob intrinsische Faktoren maßgebend sind?

4.2 Quantifizierung des axonalen Wachstums nach Verlagerung des Zeitpunktes des Augenöffnens

Das Öffnen der Augen stellt einen wichtigen Punkt in der Entwicklung des visuellen Systems dar. Zum Zeitpunkt der Geburt sind die Neuronen des visuellen Cortex noch nicht vollends entwickelt. Dieser letzte Entwicklungsschritt folgt in den ersten postnatalen Wochen, der kritischen Periode (Hubel und Wiesel, 1970; Fagiolini et al., 1994). In eben dieser kritischen Periode erfolgt das Öffnen der Augen. Der dabei entstehende visuelle Reiz ist von entscheidender Bedeutung für die Maturation der Neuronen des visuellen Cortex (Goodman und Shatz, 1993). Bleibt diese erste visuelle Erfahrung aus, beispielsweise in einer Versuchsdurchführung in Rahmen derer die Tiere in permanenter Dunkelheit gehalten werden, so verlangsamt sich die Entwicklung der Neurone im visuellen Cortex (Gabbott et al., 1986). Es besteht demnach eine Relation zwischen visueller Erfahrung und der Entwicklung der Neurone. Kann nun das Ausbleiben dieser ersten visuellen Erfahrung auch einen Einfluss auf das hier beobachtete Wachstum der Axone der RGZ haben?

In wie weit nun das Licht als ein Reiz dient, der zu einem Wachstum der Axone führt, wurde überprüft, indem drei Gruppen von Versuchstieren unterschiedlich dem Licht exponiert wurden. Eine erste Gruppe von Tieren wurde dem Licht vorzeitig exponiert. Einer anderen Gruppe wurde das Licht gänzlich vorenthalten, während eine dritte Gruppe von Versuchstieren, ohne jegliche Manipulation, als Kontrollgruppe diente. Bei den Retinae aller drei Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im axonalen Wachstum. Demnach ist das Licht nicht der Schlüsselreiz, der zu einem verstärkten Auswachsen der Axone führte. Aus welchen Gründen erschien es jedoch als möglich, dass Licht einen derartigen Effekt ausüben könnte?

Zunächst ist aus den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen der Umstand ersichtlich geworden, dass sich das Wachstum der Axone bei nicht manipulierten Tieren

nach dem Öffnen der Augen am postnatalen Tag P14 einstellte. Dies ließ einen Einfluss des Lichtes, das nach dem Öffnen der Augen zum ersten Mal auf die Retina trifft, vermuten. Es sind in der Literatur unterschiedliche Beobachtungen beschrieben worden, die auf einen weit reichenden Effekt des Lichtes hinwiesen. Die Vielzahl der Untersuchungen richtete das Augenmerk auf den visuellen Cortex. Fagiolini et al. 1994 zeigte, dass der visuelle Cortex der Ratte sehr rasch nach dem Öffnen der Augen, um die postnatalen Tage P14 - 15, die Funktionalität sowie Zuordnung der visuellen Felder erreicht, wie sie auch in der adulten Ratte zu finden sind. Der zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollends entwickelte visuelle Cortex der Säuger entwickelt sich erst während eines genau definierten zeitlichen Abschnitts im Laufe der ersten postnatalen Wochen (Hubel und Wiesel, 1973). Während dieses Zeitraumes der Entwicklung ist der visuelle Reiz von wesentlicher Bedeutung für die Maturation des visuellen Cortex. Dieses gilt sowohl für Ratten (Fagiolini et al., 1994) als auch für andere Spezies (Timney et al., 1978; Wiesel, 1982). Es konnte nachgewiesen werden, dass beispielsweise die Expression der Untereinheit NR2A des NMDA Rezeptors in corticalen Neuronen abhängig von der Lichtexposition ist (Nase et al., 1999; Quinlan et al., 1999). Diese auch für die Plastizität der Neuronen relevante Untereinheit NR2A wird in ihrer Expression von Neuronen selber reguliert, die entsprechend der Verarbeitung visueller Reize offenbar eine regulierende Funktion bezüglich der Expression dieses Genes ausüben können (Katz und Schatz, 1996). Wird den neugeborenen Ratten der Reiz des Lichtes über den Zeitpunkt des Augenöffnens hinaus vorenthalten, so verringert sich die Expression von NR2A in den corticalen Neuronen (Corvetti et al., 2003). Es gibt demnach Regulationsmechanismen im visuellen System, die durch den Reiz des Lichtes und die Verarbeitung dieses Reizes erfolgen.

Ein weiteres Beispiel für eine lichtbedingte Regulation liegt im Falle des *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) vor. Dieser neurotrophe Faktor wird vorrangig in den Neuronen des zentralen als auch des peripheren Nervensystems exprimiert. BDNF fördert die Differenzierung, die Maturation sowie das Überleben der Neurone (Lewin und Barde, 1996). Vor allem in der Retina ist BDNF hinsichtlich des Erhaltes der RGZ *in vitro* als auch *in vivo* von Bedeutung (Johnson et al., 1986; Mey und Thanos, 1993). Darüber hinaus führt dieser Faktor in der Retina von Ratten zu einer vermehrten Ausbildung dopaminerger Synapsen (Cellerino et al., 1998). Es wird vermutet, dass das in der Ganglienzellschicht und in der inneren nukleären Schicht nachgewiesene BDNF (Vecino et al., 1998) einer Regulation hinsichtlich seiner Expression unterliegt, die durch die neuronale Aktivität gesteuert wird (Zafra et al., 1990). Es wäre im Gegensatz zum NR2A eine Regulation, die bereits in der Retina und nicht erst im visuellen Cortex erfolgen

würde. Seki et al. konnten 2003 zeigen, dass die Konzentration an BDNF in der retinalen Ganglienzellschicht nach Entzug des Lichtes abgesunken war. In Vergleichstieren wurde ein Anstieg der Konzentration an BDNF in der Ganglienzellschicht nach dem Öffnen der Augen nachgewiesen. Wurde den Tieren einseitig im Zuge eines chirurgischen Eingriffes ein Auge verschlossen, so dass es sich nicht am Tag P14 öffnete, so zeigt sich hier eine geringere Konzentration an BDNF. In den Müllerzellen der inneren nukleären Schicht konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen lassen für das im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Modell folgenden Schluss zu: Da BDNF in der retinalen Ganglienzellschicht offenbar einer Licht-induzierten Regulation bezüglich seiner Expression unterliegt, kann davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte Konzentration von BDNF kein alleiniger Grund für axonales Wachstum in dem hier verwendeten Retina-Modell sein kann. Aufgrund der Beobachtungen von Seki et al. erscheint es als durchaus möglich, dass die Konzentration an BDNF in der Ganglienzellschicht der Versuchstiere, die vorzeitig dem Licht exponiert waren, erhöht sein muss. Gleichzeitig ist die Menge an BDNF in den Fällen in der retinalen Ganglienzellschicht geringer, in denen die Augen über den Tag des eigentlichen Öffnens hinaus geschlossen blieben. Dies hätte zur Folge, dass in den jeweiligen Retinae der unterschiedlichen Versuchsgruppen auch unterschiedliche Konzentrationen an BDNF vorlägen. Dies schien jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der Axone der Ganglienzellen zu haben. Demnach ist hinsichtlich des axonalen Wachstums BDNF in dem hier vorgestellten Modell nicht von hinreichender Bedeutung.

Ein weiteres Beispiel für eine Regulation aufgrund des Lichtes ist das *candidate plasticity gene 15* (cpg15). Im Gegensatz zum BDNF erscheint eine Licht-induzierte Regulation im visuellen Cortex als wahrscheinlich. Da die Expression des cpg15 Gens im Cortex statt findet und nicht in der Retina, müsste eine retrograde Signaltransduktion über das Axon erfolgen, damit eine Steuerung des axonalen Wachstums in der Retina erfolgen könnte. Die Expression des cpg15 Gens im visuellen Cortex von adulten Ratten unterliegt einer Licht determinierten Regulation (Nedivi et al., 1996). Cantalops et al. zeigten 2000, dass eine Überexpression von cpg15 im optischen Tectum des Krallenfrosches *Xenopus* zu einem verstärkten Wachstum axonaler Verzweigungen sowie der Bildung von Synapsen führte. Hinsichtlich verschiedener Versuchsreihen an Ratten hatten Nedivi et al. 1996 nachweisen können, dass die Expression von cpg15 mit dem Öffnen der Augen ansteigt, und diese erhöhte Expressionsrate im visuellen Cortex bis zum postnatalen Tag P28 erhalten bleibt. Diese erste Regulation der Expression ist unabhängig von jeglichem visuellen Reiz. Erst nach dem Tag P28 bleibt die hohe Expressionsrate von cpg15 im

visuellen Cortex bei Tieren erhalten, wenn diese nicht dem Licht ausgesetzt waren. Die Expression dieses Genes im Colliculus superior unterliegt nicht diesem Einfluss. Interessant bei der Regulation des *cpg15* Genes ist die Tatsache, dass eine Abhängigkeit hinsichtlich der Lichtexposition erst nach dem postnatalen Tag P28 auftritt. Vor diesem Tag erfolgt eine verstärkte Expression des Gens, die nicht durch etwaige visuelle Reize beeinflusst scheint.

Das axonale Wachstum, wie es in der hier vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, erscheint unabhängig von der Lichtexposition. Die Tiere der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die vorzeitig bzw. nicht dem Licht exponiert wurden, zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des axonalen Wachstums. Hinzu kommt, dass das Wachstum vom postnatalen Tag P14 bis P24 auftritt. Dies ist der Bereich, in dem das *cpg15* Gen noch keiner Licht-induzierten Regulation unterliegt. Erst ab dem Tag P28, wenn das axonale Wachstum schon nicht mehr verstärkt auftritt, kann eine anhaltend hohe Expression des *cpg15* Genes durch den Entzug visueller Reize auftreten. Die überaus relevante Funktion, die das *cpg15* in Bezug auf die retinale Maturation einnimmt und seine Unabhängigkeit von visuellen Reizen bis zum Tag P28, lassen es als möglich erscheinen, dass das Genprodukt *cpg15* auch in dem hier vorgestellten Modell von Relevanz ist. Am Tag des Öffnens der Augen wurde verstärktes axonales Wachstum detektiert. Zum gleichen Zeitpunkt steigt die Expression des *cpg15* Genes. Das auftretende axonale Wachstum ist nicht reguliert durch visuelle Reize. Gleiches gilt auch für die Expression des *cpg15* Genes bis zum Tag P28. Das verstärkte Wachstum der Axone wurde bis zum Tag P24 beschrieben. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Expression des *cpg15* noch unverändert. Demnach erscheint ein Eingriff anderer Faktoren als wahrscheinlich, die das axonale Wachstum schon zu diesem Zeitpunkt inhibieren, obgleich *cpg15* noch vorhanden ist. Auch bleibt zu beachten, dass die Expression dieses Genes im visuellen Cortex erfolgt. Dies macht eine retrograde Signaltransduktion notwendig, damit ein Einfluss des Genproduktes auf die RGZ erfolgen kann. In wie weit das *cpg15* Gen in die hier beschriebenen Beobachtungen involviert ist, ließe sich nur durch den knock out dieses Genes untersuchen. Fraglich hierbei ist, ob eine etwaige Mutante das notwendige Alter erreicht, oder ob der Eingriff so weit reichende Folgen hat, dass ein vitaler Phänotyp nicht entstehen kann.

Bei dem *cpg15* handelt es sich nicht um das einzige Gen, das einer derartigen Regulation unterliegt. Das Wachstums-assoziierte Protein (GAP-43), die α Untereinheit der Typ II Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinkinase (CaM Kinase II) so wie die Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) können in ihrer Expression durch Licht reguliert werden (Neve und

Bear, 1989). Bei dem Pro GAP-43 handelt es sich um ein Neuron-spezifisches Phosphoprotein, das in Wachstumskegeln und einigen adulten Axonen zu finden ist. Darüber hinaus scheint es eine relevante Funktion hinsichtlich der Entwicklung synaptischer Verschaltungen zu haben (Benowitz und Routtenberg, 1997). CaM Kinase II ist in hohem Maße im postsynaptischen Bereich excitatorischer Synapsen zu finden (Kennedy et al., 1983, Kelly et al., 1984). Bei GAD handelt es sich um ein Enzym, das in Verbindung mit der γ -Aminobutylsäure (GABA) in Verbindung steht. GAD liegt in hohen Konzentrationen in den axonalen Endungen von inhibitorischen Interneuronen im Cortex striatum vor (Bear et al., 1985). Es zeigt sich, dass alle drei Proteine durchaus eine relevante Funktion hinsichtlich der Maturation, Plastizität wie auch der synaptischen Formation einnehmen. Neve und Bear konnten 1989 bereits nachweisen, dass diese Proteine durch Licht eine Regulation ihrer Expression erfahren. Werden die Augen über den eigentlichen Tag des Öffnens hinaus künstlich geschlossen gehalten oder werden die Jungtiere unter Lichtentzug herangezogen, so zeigte sich, dass die drei oben genannten Proteine in stärkerem Maße in verschiedenen Bereichen des visuellen Systems vorhanden sind, als dies bei Tieren einer Kontrollgruppe der Fall ist, die dem Licht exponiert waren.

In Bezug auf die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lässt sich somit vermuten, dass die Proteine GAP-43, CaMKII so wie GAD nicht von ausreichender Relevanz sind, um ein verstärktes axonales Wachstum auszulösen. Wären diese drei Proteine alleinig hinreichend, um ein verstärktes Wachstum der Axone hervorzurufen, so hätten sich im Zuge der Versuchsdurchführung andere Ergebnisse einstellen müssen. Die Gruppe der Versuchstiere, deren Augen geschlossen waren, zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des axonalen Wachstums im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Aufgrund der Ergebnisse von Neve und Bear kann angenommen werden, dass die Tiere der Versuchsreihe, die keinen visuellen Reiz aufgenommen haben, eine höhere Konzentration an GAP-43, CaMKII und GAD im visuellen System aufwiesen. Die Tiere der Kontrollgruppe, aber auch die der Versuchsgruppe, deren Augen schon vorzeitig geöffnet worden waren, müssen demnach über eine wesentlich geringere Menge der entsprechenden Proteine verfügt haben. Erfolgte nun die Explantation der Retinae der jeweiligen Tiere der unterschiedlichen Versuchsgruppen, so lagen auch unterschiedliche Konzentrationen der drei Proteine in den jeweiligen visuellen Cortices vor. Demnach lagen beispielsweise an dem postnatalen Tag P24 höhere Proteinkonzentrationen in den visuellen Systemen der Tiere vor, die keinem visuellen Reiz ausgesetzt, als in den Cortices der Tiere, die dem Licht exponiert gewesen waren. Entgegen dieser unterschiedlichen Regulation der Expression dieser drei Proteine zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Wachstums der Axone. Demnach kann eine

alleinige Erhöhung der Konzentration der Proteine GAP-43, CaMKII sowie GAD im visuellen Cortex eines Versuchstieres nicht zu einem verstärkten Wachstum der Axone der RGZ führen. Wäre dies der Fall, so würden die RGZ der Tiere ohne jeglichen visuellen Reiz auch am Tag P24 ein axonales Wachstum aufweisen, das vergleichbar stark ausgeprägt ist, wie das Wachstum der RGZ der Tiere mit visueller Erfahrung zu einem früheren Zeitpunkt während der postnatalen Tage P14 bis P22. Ein etwas stärker axonales Wachstum zeigen die RGZ der Tiere ohne visuellen Reiz am Tag P24 dennoch, auch wenn dieses nicht signifikant stärker ist als das der anderen Versuchsgruppen. Auch wenn die Proteine GAP-43, CaMKII und GAD nicht alleinig verantwortlich scheinen für das axonales Wachstum, so scheint es dennoch als möglich, dass sie bis zu einem bestimmten Grade doch Einfluss nehmen können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Retinae von Ratten der ersten postnatalen Wochen in einem Zeitfenster, das vom Tag P14 bis zum Tag P24 reicht, ein verstärktes axonales Wachstum aufweisen. In Versuchsreihen, bei denen einzelnen Tieren der visuelle Reiz vorenthalten wurde, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Wachstums der Axone im Vergleich zu nicht manipulierten Tieren. Ein etwaiger geringerer Einfluss der visuellen Erfahrung kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da eine Vielzahl unterschiedlichster Gene, die eine relevante Funktion bei der Maturation des visuellen Systems ausüben, in ihrer Transkription unterschiedlichen Regulationssystemen unterliegen, die auf verschiedenste Weise von visueller Erfahrung beeinflusst werden können. Die Expression von Genen mit hoher Relevanz bezüglich Maturation, Differentiation und Plastizität kann durch den Entzug des visuellen Reizes auch nach der kritischen Periode auf einem hohen Niveau gehalten werden. Beispiele hierfür sind GAP-43, CaMKII, GAD (Neve und Bear, 1989) aber auch *cpg15* (Lee und Nedivi, 2002). Eine Reduktion der Expression ist hingegen von *junB*, *zif/268* und BDNF bekannt (Rosen et al., 1992).

4.3 Immunhistologische Untersuchungen

Die immunhistologischen Untersuchungen der Retina hatten gezeigt, dass GAP-43 bereits am Tag der Geburt (P0) in den RGZ exprimiert wurde, wo es auch noch am postnatalen Tag P8 detektiert werden konnte. Am Tag P16 konnte GAP-43 in drei distinkten Banden in der IPS nachgewiesen werden. Am postnatalen Tag P21 zeigte sich eine stärkere Expression von GAP-43 im Bereich der RGZ sowie in der ÄPS. Am Tag P30 ließ sich nur noch eine schwache Expression in der INS erkennen. Am Tag P60 erscheint

eine GAP-43 Expression kaum noch als detektierbar. Das sich stark während der postnatalen kritischen Periode verändernde Expressionsprofil des GAP-43 lässt auf eine gewisse Diversität der Funktionen dieses Proteins im Zuge der Maturation schließen (Kapfhammer et al., 1994).

Untersuchungen zeigten die hohe Relevanz des GAP-43 Proteins hinsichtlich der neuronalen Entwicklung. GAP-43 wurde in höheren Konzentrationen in neuronalen Wachstumskegeln detektiert (Dent und Meiri, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression dieses Proteins im Rahmen der Entwicklung des ZNS hinsichtlich der Projektion der Axone, aber auch im Zuge der Regeneration des PNS wesentlich erhöht war (De Graan et al., 1985; Skene et al., 1986). Während der Maturation des visuellen Systems erfolgt eine Interaktion zwischen Zellen des lateralen Diencephalons mit retinalen Axonen auch aufgrund des GAP-43 (Zhang et al., 2001).

Offensichtlich nimmt dieses Protein eine Schlüsselrolle in Bezug auf die neuronale Maturation hinsichtlich des axonalen Wachstums und der Formation von Synapsen ein und reguliert das axonale Wachstum *in vitro* (Yankner et al., 1990; Shea et al., 1991). Die massive Überexpression von GAP-43 führte in transgenen Mäusen zu einer unverhältnismäßigen Ausbildung von Synapsen. Die axonale Projektion im ZNS dieser Tiere unterlag einer Fehlleitung, so dass Kontakte zu Zielbereichen nicht korrekt entstanden (Aigner und Caroni, 1995). Eine Überexpression in primären olfaktorischen Neuronen führte zu vergrößerten Nervenendigungen (Holtmaat et al., 1995).

In Versuchsreihen mit PC12- bzw. Neuroblastom-Zelllinien konnte nach Transfektion mit GAP-43 und Stimulation durch NGF oder cAMP ein ausgeprägtes Wachstum von Neuriten nachgewiesen werden (Yankner et al., 1990; Morton et al., 1992). Auch bei Versuchsreihen mit Zellen nicht neuronalen Ursprungs wurde durch eine episomale Überexpression von GAP-43 eine Umstrukturierung des Cytoskeletts sowie verstärktes Wachstum beschrieben (Zuber et al., 1989; Verhaagen et al., 1994). Erfolgte hingegen eine Inhibierung des GAP-43, wie zum Beispiel mit Hilfe von antisense Oligonukleotiden in primären sensorischen Neuronen von Hühnchen, so war ein stark gestörtes axonales Wachstum nachweisbar. Abhängig vom Substrat der *in vitro* Kultur zeigten sich auf L-Lysin keine Neuriten, während auf Laminin nur wenige erkennbar waren (Aigner und Caroni, 1995). Untersuchungen in der Zellkultur zeigten, dass bei Inhibierung von GAP-43 in Neuroblastomzellen ein cAMP induziertes axonales Wachstum ausblieb (Shea et al., 1991). Auch Untersuchungen an PC12 Zellen zeigten nach der Inaktivierung von GAP-43 eine Verminderung des Wachstums (Ivins et al., 1993). Transgene Mäuse, die ein nicht

funktionales GAP-43 exprimierten, wiesen eine inkorrekte axonale Projektion auf und verstarben oftmals kurz nach der Geburt (Strittmatter et al., 1995).

Diese Ergebnisse zeigen, dass GAP-43 eine zentrale Funktion während der Maturation übernimmt. Aus diesem Grunde wurde auch in dieser Arbeit im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen eine Lokalisation des GAP-43 vorgenommen.

Am Tag P0 lässt sich GAP-43 noch in größerem Umfang in der Schicht der RGZ detektieren. Offensichtlich wird GAP-43 um den Tag P0 hier stark exprimiert. In den nachfolgenden Tagen wurde das GAP-43 in der IPS detektiert. Während zu einem späteren Zeitpunkt GAP-43 auch in der ÄPS und wieder im Bereich der RGZ nachgewiesen wurde.

Die Präsenz des GAP-43 in den plexiformen Schichten lässt vermuten, dass es hier zur Ausbildung synaptischer Kontakte beiträgt. Während der postnatalen, kritischen Periode erscheint GAP-43 eine zentrale Funktion zu übernehmen, in dem es die Formation von Synapsen fördert und Verbindungen zwischen Amakrinzellen, Biopolarzellen und Müllerzellen herstellt. Auch ist GAP-43 in den plexiformen Schichten lokalisiert, da es der axonalen Projektion dient und im Bereich der Wachstumskegel unter anderem zur Formation von f-Actin beiträgt (Aigner und Caroni, 1995). Die Organisation des Cytoskeletts ist in diesen Bereichen für ein gerichtetes Wachstum der axonalen und dendritischen Fortsätze von großer Relevanz.

Somit scheint eine wichtige Aufgabe des GAP-43 die Erstellung der korrekten Vernetzungen der einzelnen Zellen in den plexiformen Schichten zu diesem Zeitpunkt der Maturation zu sein. Als Marker für axonale Verbindungen und Neurone wurde die große Untereinheit des Neurofilamentes (NF-H) gewählt. Neurofilamente gehören zu der Familie der Intermediärfilamente, da sie aufgrund ihres Durchmessers zwischen den Actinfilamenten und den Mikrotubuli eingeordnet werden. Diese Strukturproteine, erstmals von Hoffman und Lasek (1975) genauer charakterisiert, werden ausschließlich in Neuronen exprimiert und verfügen somit über optimale Eigenschaften als Erkennungsmerkmal neuronaler Zellen (Shaw et al., 1981; Yen und Fields, 1981).

Bei den Neurofilamenten handelt es sich um Bestandteile des Cytoskeletts in somatischen wie auch axonalen Kompartimenten, die im Axon zwischen 3 bis 10 mal stärker vertreten sind als die Mikrotubuli, über die auch der schnelle axonale Transport verläuft. Die ca. 10 nm im Durchmesser umfassenden Strukturproteine sind in der Regel völlig polymerisiert und stabiler als Mikrotubuli (Schmitt, 1968).

Es sind drei Untereinheiten des Neurofilaments bekannt, die aufgrund ihrer Größe wie folgt unterschieden werden: NF-L (66 kDa) (Julien et al., 1987; Chin und Liem, 1989), NF-M (95-100 kDa) (Napolitano et al., 1987) und das NF-H (110-115 kDa) (Dautigny et al., 1988; Chin und Liem, 1990).

Im Zuge der Alzheimer Pathogenese kommt es zur Ausbildung von intrazellulären Agglomeraten von Neurofilamenten, den so genannten *neurofibrillary tangles*. Hierbei handelt es sich, neben den interzellulären Plaques aus inkorrekt prozessiertem APP, um eines der relevanten Merkmale der Alzheimer Krankheit auf zellulärer Ebene.

Die immunhistologische Untersuchung der Präsenz des Neurofilamentes zeigte, dass dieses erst nach dem Öffnen der Augen in der Retina nachgewiesen werden konnte. Eine ausgeprägte Signaldichte fand sich in der ÄPS. Geringfügigere Signale waren am postnatalen Tag P16 auch im Bereich der RGZ sowie in der IPS detektiert worden. Diese Lokalisation des Neurofilamentes ist dahingehend interessant, als dass eine Detektion des Neurofilamentes in den inneren Bereichen der Retina bereits am embryonalen Tag E15,5 von Shaw und Weber (1983) beschrieben wurde. Weiterhin haben Shaw und Weber Neurofilamentformen in den Axonen der RGZ zu diesem Zeitpunkt detektiert. Die immunhistologische Arbeit erfolgte in diesem Falle unter Anwendung von drei verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Neurofilamentformen und zwar gegen das 68 K, das 145 K und 200 K Protein. Diese ersten embryonalen Neurofilamente waren jedoch negativ gegen den 200 K Antikörper. Es zeigte sich, dass das Neurofilament 200 K erst ab dem postnatalen Tag P13 in der IPS sowie in stärkerer Ausprägung in den Fortsätzen der Horizontalzellen detektiert wurde. Diese positive Reaktion, wie sie von Shaw und Weber in Bezug auf die Fortsätze der Horizontalzellen gemacht wurde, konnte in unseren Befunden (siehe Kapitel 3.3) hinsichtlich der Signaldichte in der ÄPS bestätigt werden. Auch die Detektion des 200 K Neurofilamentes in der zweiten postnatalen Woche stimmt mit den hier gemachten Beobachtungen überein.

Für die Bestimmung des Maturationsstadiums der Photorezeptorschicht wurden immunhistologische Untersuchungen zu den entsprechenden Zeitpunkten mit einem Antikörper gegen Rhodopsin durchgeführt. Bei dem Rhodopsinmolekül handelt es sich um den eigentlichen Sehfärbstoff, der in den Membranstapeln der Photorezeptoren integriert ist. Das Rhodopsin besteht aus dem Opsin-Anteil, der sich durch sieben transmembran α -Helices auszeichnet. In diese helicalen Bereiche eingebettet ist das Retinal. Hierbei handelt es sich um das Aldehyd des Vitamin A1. Durch die Absorption von Lichtquanten erfährt dieses Molekül eine Stereoisomerisation, womit der eigentliche

Wahrnehmungsmechanismus im Auge beginnt. Das Rhodopsin ist somit der essentielle Bestandteil der Photorezeptoren. Lässt sich kein Rhodopsin in den Photorezeptoren detektieren, sind diese nicht funktional. Im Hinblick auf die Maturation könnte somit auf eine noch nicht vollendete Differenzierung und Reifung dieser Zellen geschlossen werden.

Die immunhistologischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigten (siehe Kapitel 3.3), dass erste schwache Signale bedingt durch die Bindung des Antikörpers in der Photorezeptorschicht am postnatalen Tag P8 detektiert werden konnten. Ab dem postnatalen Tag P16 ergaben diese Untersuchungen eine permanente intensive Signaldichte im Bereich der Photorezeptoren. Dies lässt die Annahme zu, dass im Fall der neonatalen Ratte die Photorezeptoren noch nicht vollständig entwickelt und somit funktionsbereit sind. Erst nach Abschluss der ersten postnatalen Woche erfolgt eine ausgeprägte Expression des Rhodopsins. Somit steht dieses essentielle Protein bereits ca. eine Woche vor dem eigentlichen Öffnen der Augen am Tag P14 zur Verfügung.

4.4 Immunhistologische Untersuchungen nach Verlagerung des Zeitpunktes der Augenöffnung

In wie weit eine Beeinflussung der Expression der drei Proteine GAP-43, Neurofilament und Rhodopsin durch den visuellen Reiz erfolgen kann, sollte im Rahmen dieser Versuchsreihe bestimmt werden. Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben unterschiedliche Regulationen dieser Proteine in der Retina nach vorzeitiger Lichtexposition bzw. nach einem Ausbleiben des visuellen Reizes.

Wurde die juvenile Retina vorzeitig, also am Tag P10, dem Lichtreiz ausgesetzt, so zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von GAP-43. Zu diesem Zeitpunkt wird die Expression dieses Proteins offensichtlich von einem intrinsischen Maturationsprogramm gesteuert, das weitgehend unabhängig von exogenen Einflüssen scheint.

Anders stellt sich die Situation in Bezug auf das GAP-43 bei vollständigem Lichtentzug dar. Hier erscheint die Expression leicht vermindert. Die innere plexiforme Schicht weist eine geringere Signaldichte auf, wobei die distinkten Signale im Bereich der Amakrinzellen kaum noch detektierbar sind. GAP-43, dessen Expression eng mit dem Wachstum und der Funktion neuronaler Zellen korreliert, ist hier offensichtlich nicht so

ausgeprägt präsent. Demnach könnte es sich hier um erste Veränderungen im neuronalen Gefüge der Retina, bedingt durch das Ausbleiben des Lichtreizes, handeln. Da das Auge geschlossen blieb, konnte keine Informationsverarbeitung und -weiterleitung visueller Reize erfolgen. Denkbar wäre eine beginnende Degeneration der Zellen aufgrund der fehlenden Aktivität. Dies würde bedeuten, dass anhand des Ausbleibens distinkter Signale im Bereich der IPS, die Amakrinzellen eine erste degenerative Veränderung erfahren.

Wurde die Retina vorzeitig dem Licht exponiert, so wurde NF-H in den Horizontalzellen detektiert, was bei dem geschlossenen Auge nicht der Fall war. Nach Shaw und Weber (1983) wäre die große Untereinheit NF-H oder auch NF200 erst ab dem Tag P13 in der Retina zu finden. Offensichtlich handelt es sich bei dieser Untereinheit des Neurofilaments um eine Form, die erst ab einem bestimmten Maturationsstadium zur Expression gelangt. Dieses Stadium ist offenbar erreicht, wenn die erste visuelle Erfahrung direkt bevorsteht. Wird der Retina der visuelle Reiz bis zum Tag P21 vorenthalten, so zeichnen sich Unterschiede in der Expression und der Lokalisation des Neurofilamentes ab. Offensichtlich wird durch das Ausbleiben des visuellen Reizes die Expression verringert und die Verteilung dieser Untereinheit gestört. Dadurch ist ein weniger distinktes Signalmuster detektierbar, das nun auch in der IPS präsent ist. Offensichtlich handelt es sich bei NF-H um ein Strukturprotein, das durch den visuellen Reiz beeinflusst werden kann. Dieses Protein kann offensichtlich nur in korrekter Weise exprimiert werden, wenn ein voll funktionsfähiges retinales Gefüge zu Grunde liegt, das visuelle Reize aufnimmt und verarbeitet.

Auch die Expression des Rhodopsins lässt eine Abhängigkeit vom visuellen Stimulus erkennen. Wurde das Auge vorzeitig dem Licht exponiert, so liegt eine verstärkte Expression des Rhodopsins vor. Fand keine visuelle Stimulation statt, erscheint die Expression vermindert. Da hier die zentrale Funktion die Umsetzung visueller Reize in elektrische Signale ist, kann durch die Variation des Stimulus eine Veränderung in der Expression erfolgen.

Die hier durchgeführten Versuche zeigten, dass zentrale Elemente im retinales Gefüge einer Regulation unterliegen, die durch den Stimulus Licht beeinflusst wird. Sowohl strukturelle Elemente, wie das NF-H, als auch Elemente mit physiologischer Funktion wie das Rhodopsin sind durch den Stimulus Licht beeinflussbar.

4.5 Analyse der Proteinprofile mittels 2D-Gelelektrophorese

Im Rahmen der 2D-Gelelektrophorese und der angeschlossenen MALDI Untersuchung wurden neun Proteine identifiziert, die im Verlauf der Entwicklung reguliert wurden. Zunächst wurden drei Proteine genannt, die im Zusammenhang mit der retinalen Reifung noch nicht beschrieben wurden. Dies sind zum einen die Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase (Pin1), zum anderen der Translin-assoziierte Faktor X (TraX), sowie Tolkin, ein orthologes der bone morphogenetic protein (BMP) Gruppe.

4.5.1 Pin1

Die Isomerase Pin1 wurde mit Hilfe eines Hybridsystems aufgrund der Interaktion mit dem Protein NIMA aus *Aspergillus nidulans* identifiziert. Pin1 weist eine weitgehende Homologie zu dem Protein Ess1p aus *Saccharomyces cerevisiae* auf und ist in der Lage, dieses Homolog hinsichtlich seiner Funktion zu ersetzen (Lu et al., 1996). Die ausgeprägte Homologie zwischen Proteinen verschiedener Spezies lassen auf eine weit verbreitete Isomerase mit stark konservierten Sequenzen schließen. Darüber hinaus lassen stark konservierte, ausgedehnte Bereiche in einem Protein auf eine Vielzahl von Interaktionspartnern und auf eine zentrale Rolle im Organismus schließen.

Pin1 gehört zu der Gruppe der Prolyl cis/trans Isomerasen, die sich in drei Familien gliedern. Bei den Cyclophilinen und den FK506 bindenden Proteinen (FKBP) handelt es sich um zwei große Gruppierungen dieser Isomerasen, die aufgrund ihrer klinischen Relevanz hinsichtlich der Anwendung von immunsuppressiven Substanzen weitgehend charakterisiert wurden (Hunter, 1998). Die dritte Familie der Peptidyl-Prolyl Isomerasen (PPlasen), der auch Pin1 zugeordnet wird, wurde nach dem bakteriellen Parvulin, als Parvulin-ähnliche PPlasen bezeichnet (Lu et al., 1996). Im Gegensatz zu den anderen Parvulin-ähnlichen PPlasen weisen die Pin1-ähnlichen PPlasen einheitliche Proteinstruktur und Substratspezifität auf (Zhou et al., 2000). Pin1-ähnliche PPlasen katalysieren ausschließlich die Isomerisation von phosphorylierten Serin/Threonin-Prolin Motiven, wodurch die Prolyl cis/trans Isomerisation wesentlich verlangsamt wird (Schutkowski et al., 1998).

Das Protein weist N-terminal eine Protein-Protein Interaktionsdomäne und C-terminal eine Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Domäne auf. Die Isomerase Domäne ist Phosphorylierungs-abhängig und interagiert mit Phospho-Serin/Threonin-Prolin Motiven

anderer Proteine (Lu et al., 1999). Die Isomerasefunktion des Pin1 Proteins erfüllt eine relevante Rolle in Bezug auf den Zellzyklus.

Auf eine Inhibierung des Proteins in humanen Tumorzellen folgte ein stabiles mitotisches Stadium der Zellen (Wu et al., 2000). Eine Überexpression des Pin1 Proteins in HeLa Zellen führte zu einem dauerhaften G2 Stadium (Lu et al., 1996). Unter anderem wurden als Interaktionspartner des Pin1 das Protein Wee1 (Shen et al., 1998) wie auch das Protein Cdc25C (Shen et al., 1998) identifiziert. Beide sind Bestandteile einer Proteingruppe zur Steuerung des Zellzyklus. Cdc25C kann durch Pin1 hinsichtlich seiner Aktivität reguliert werden, wobei die jeweilige Phosphorylierung des Cdc25C entscheidend ist (Stukenberg und Kirschner, 2001). So zeigt sich, dass Pin1 unter anderem wesentliche Vorgänge des Zellzyklus reguliert und dabei auch Einfluss auf eine etwaige Transformation der Zellen hat.

Das proto-Onkogen c-Myc unterliegt einem Mechanismus der Stabilisierung und Destabilisierung aufgrund verschiedener Phosphorylierungen. Eine Überexpression von c-Myc in Zelllinien oder in transgenen Tieren führte zu einem vorzeitigen Ende der Differenzierung gefolgt von einer tumorösen Transformation (Evan et al., 1992). Wurde hingegen das *c-myc* Gen ausgeschaltet, so zeigte sich eine 100 %ige Letalität der Embryonen ((Davis et al., 1993)). Das am Serin 62 phosphorylierte c-Myc wird nach Aktivierung des Ras Systems stabilisiert (Sears et al., 1999). Eine Phosphorylierung am Threonin 58 hingegen führt nach Ubiquitinierung zur Degradation des c-Myc Proteins. Wurde das Threonin an dieser Position durch ein Alanin ersetzt, kam es zur Akkumulation des c-Myc (Gregory und Hann, 2000; Sears et al., 2000). Die Prolyl-Isomerase Pin1 reguliert nun über die Proteinphosphatase 2A (PP2A) die Menge an c-Myc in der Zelle und kann somit zu einer Transformation der Zelle führen (Yeh et al., 2004).

Im Cytoplasma sowie im Nucleus neuronaler Zellen konnte ebenfalls Pin1 nachgewiesen werden (Liou et al., 2003). Verschiedene Versuchsreihen lassen eine pathogene Relevanz von Pin1 in Bezug auf neuronale Degeneration vermuten (Zhou et al., 2000). Die Alzheimer Krankheit lässt sich auf zellulärer Ebene unter anderem an zwei pathogenen Veränderungen, den interzellulären Plaques und den intrazellulären Agglomeraten helicaler Filamente den so genannten neurofibrillären Tangles (Lee et al., 2001), identifizieren. Diese neurofibrillären Tangles setzen sich aus hyperphosphoryliertem Tau zusammen, wobei die Phosphorylierung an verschiedenen Serin/Threonin-Prolin Motiven erfolgte, wodurch das Tau seine eigentliche physiologische Aufgabe, die Stabilisierung der Mikrotubuli, nicht mehr erfüllen kann (Vincent et al., 1998; Husseman et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Pin1 Einfluss auf die

Konformation, Phosphorylierung und Funktion verschiedener Gruppen von Proteinen hat. Eine Gruppe dieser Interaktionspartner von Pin1 scheint von großer Relevanz hinsichtlich der Alzheimer Pathogenese zu sein (Zhou et al., 2000; Lu et al., 2002). Pin1 ist direkt sowie indirekt in der Lage, die Konformation und Funktion von hyperphosphoryliertem Tau durch dessen Dephosphorylierung mit Hilfe der PP2A wieder herzustellen (Lu et al., 1999; Zhou et al., 2000).

Auch konnte gezeigt werden, dass im Falle von Alzheimer Patienten oftmals die Expression von Pin1 reduziert war (Lu et al., 1999). Diese Arbeiten vermuten eine neuroprotektive Wirkung des Pin1. Andere Untersuchungen lassen auf einen neurodegenerativen Einfluss des Pin1 schließen. Auch im Rahmen der Alzheimer Krankheit wurden so genannte Pin1 Granulae in Neuronen beschrieben (Holzer et al., 2002). Diese hippocampalen Neurone wiesen keine neurofibrillären Tangles auf. Vielmehr wurde vermutet, dass es sich bei den Pin1 Granulae um das Ergebnis eines noch unbekanntes Mechanismus im Rahmen der neuronalen Degeneration der Alzheimer Krankheit handelt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde Pin1 mittels 2D-Gelelektrophorese in Retinae unterschiedlicher Maturationsstadien nachgewiesen. Es zeigte sich, dass mit fortschreitender Maturation der nachgewiesene Umfang an Pin1 geringer wurde. Erfolgte keine Kultivierung der Retina, so war kein Pin1 am postnatalen Tag P60 zu detektieren. Eine derartige Abnahme des Pin1 Proteins in der Retina erscheint als möglich, da Pin1 eine bedeutende Rolle bezüglich des Zellzyklus einnimmt. Befindet sich die Retina noch in den postnatalen Maturationsstadien und der kritischen Periode, so ist eine große Anzahl der Zellen des retinalen Gewebes noch in mitotischen Stadien. Eine Regulation des Zellzyklus erfolgt zu diesen Zeitpunkten noch, wodurch das Vorhandensein regulierender Faktoren notwendig ist. Zu einem gewissen Grad hat sicherlich auch die Kultivierung der Retinae Einfluss auf Pin1, da auch am postnatalen Tag P60 in der kultivierten Retinae das Pin1 Protein nachgewiesen wurde, was bei der nicht kultivierten Retina dieser Altersstufe nicht der Fall war. Es ist anzunehmen, dass durch die Kultivierung des Gewebes verschiedene nicht neuronale Zellen proliferieren, während andere Zellen aufgrund spezifisch repressiver Kulturbedingungen ein apoptotisches Stadium erreichen. Diese Vorgänge bedürfen ebenfalls einer Regulation, die durch Pin1 erfolgen könnte.

4.5.2 Trax

Der Translin-assoziierte Faktor X (Trax) wurde erstmals im Rahmen eines Hefe-Hybridsystems als Interaktionspartner des Translins identifiziert (Aoki et al., 1997). Unter Einbeziehung des nukleären Matrixprotein C1D soll Trax defekte DNA Fragmente wieder herstellen können (Erdemir et al., 2002). In weiteren Versuchsreihen wurde Trax als Bestandteil eines „gel shift complex 1“ (GS1) identifiziert, wobei es sich um ein Heteromer aus Trax und Translin mit der Fähigkeit zur Bindung von RNA und einzelsträngiger DNA handelt (Finkenstadt et al., 2000). Dieser Komplex wurde in verstärktem Maße in neuronalem Gewebe nachgewiesen. Durch Behandlung des Komplexes mit einer Proteinphosphatase wurde die Bindungsstärke zur DNA erhöht. Die Bindung erfolgt in Sequenzbereichen mit hohem Guanin-Anteil (Taira et al., 1997).

Im Gehirn von Versuchstieren konnte ebenfalls ein Translin enthaltender Komplex nachgewiesen werden (Han et al., 1995). Dem RNA bindenden Komplex wurde eine regulatorische Funktion bei der Translation zugeschrieben. Die Funktion des Komplexes ist vermutlich die Suppression verschiedenster mRNAs während der frühen Spermatogenese (Kwon und Hecht, 1993; Wu et al., 1997). Aufgrund der massiven Präsenz des GS1 Komplexes in neuronalem Gewebe wird eine ähnliche Aufgabe bei der translationalen Regulation vermutet. Ein Hinweis hierfür ist der Umstand, dass Translin auch als Bestandteil eines Ribonucleoproteins identifiziert wurde, das wiederum mit BC1 assoziiert ist. Hierbei handelt es sich um ein tRNA-ähnliches Transkript, von dem eine Lokalisation in neuronalen Dendriten angenommen wird (Tiedge et al., 1991; Muramatsu et al., 1998). In weiteren Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass der gesamte Komplex aus Translin und Trax im Bereich des 5' - Endes der BC1 RNA bindet (Li und Baraban, 2004). In diesem Bereich der RNA erfolgt die Bindung an eine guaninreiche Sequenz.

Verschiedene Funktionen des Translin/Trax Komplexes erschienen möglich, wie beispielsweise eine regulatorische Funktion hinsichtlich des Zellzyklus (Ishida et al., 2002). Die These der DNA Reparatur wurde bereits dargestellt (Erdemir et al., 2002). In Bezug auf postmitotische neuronale Zellen, die relativ zum Organismus eine ausgeprägt lange Funktionszeit aufweisen müssen, erscheint ein effektives Reparatursystem als sinnvoll. Wird DNA im Zuge eines pathogenen Prozesses beschädigt und liegt als Einzelstrang vor, so soll ein DNA-Reparaturmechanismus eingreifen, an dem auch das Trax im GS1 Komplex beteiligt sei (Didier et al., 1996).

Eine interessante Annahme beschreibt die Beteiligung des Trax Proteins am Transport spezifischer mRNA Transkripte in dendritische Bereiche neuronaler Zellen (Kobayashi et al., 1998). Im Rahmen der Untersuchung von unter anderem Protamin-2 mRNA in Spermatozyten konnte gezeigt werden, dass Translin bzw. der GS1 Komplex aus Translin und Trax an mindestens zwei unterschiedliche mRNA-Transkripte *in vivo* bindet (Morales et al., 2002; Yang et al., 2003). Eine immunhistologische Untersuchung von Hirngewebe zeigt eine somatische und dendritische Lokalisation des Translins in neuronalen Zellen. Es wurde eine Assoziation von Translin und RNA im dendritischen Kompartiment vermutet (Finkenstadt et al., 2000). Andere immunhistologische Untersuchungen zeigten neben der somatodendritischen Lokalisation des Komplexes in maturierenden Corticalneuronen auch eine Lokalisation in den Kernen von Gliazellen (Kobayashi et al., 1998). Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine ausgeprägte Präsenz des Translin/Trax Komplexes in neuronalen Zellen vorliegt, aber auch, dass dieser Komplex in einer Vielzahl unterschiedlichster Gewebe zu finden ist (Finkenstadt et al., 2001). Demnach scheinen die stark konservierten Proteine Translin und Trax weit verbreitet. Ihre exakte Funktion im somatodendritischen Kompartiment neuronaler Zellen ist nicht aufgeklärt. Die Konzentration der mRNA in einer Zelle ist nur selten gleichmäßig. Oftmals bestehen Gradienten innerhalb der Zelle mit Bereichen höherer mRNA Konzentration. In den verschiedensten Zellen wurde gezeigt, dass die mRNA ungleichmäßig verteilt ist. So wurde eine entsprechende Verteilung in Epithelzellen, Oozyten, Oligodendrozyten oder auch Neuronen nachgewiesen (Johnston et al., 1995; Hesketh et al., 1996). In stark differenzierten Zellen mit einer ausgeprägten polaren Form ist die zielgerichtete Verteilung der mRNA ein eleganter Weg, um spätere Proteine in den Bereichen der Zellen exprimieren zu können, in denen diese benötigt werden. In sich entwickelnden Neuronen sind so mRNAs, die Actin, Tubulin oder Isoformen des Tropomyosins codieren, in bestimmten Bereichen lokalisiert (Steward et al., 1995). Im Falle der mRNAs der a Calmodulin-abhängigen Kinase II (Burgin et al., 1990) oder auch des Ligatins konnte gezeigt werden, dass diese in dendritischen Bereichen mit den jeweiligen Mikrotubuli assoziiert sind (Steward et al., 1995).

Voraussetzung für eine zielgerichtete Lokalisation verschiedenster mRNAs in den entsprechenden Kompartimenten der Zelle sind Proteine, die in der Lage sind, spezifische Bindungen mit den jeweiligen mRNAs einzugehen und die darüber hinaus auch Bindungen mit den einzelnen Elementen des Cytoskeletts eingehen können (Bassell et al., 1994). Bestimmte RNA bindende Proteine erreichen eine zielgerichtete Lokalisation der mRNA durch die Interaktion mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli (Elisha et al., 1995). Bei der Kultivierung von Neuronen zeigte sich, dass ca. 50 % der gesamten mRNA mit

den Mikrotubuli assoziiert waren (Bassell et al., 1994). Diese axonale Lokalisation der mRNA erwies sich als abhängig von der Möglichkeit der Bindung an die Mikrotubuli.

Diese Funktion der Lokalisation spezifischer mRNAs könnte durch das Trax bzw. durch den Komplex aus Translin und Trax erfüllt werden. Wie bereits beschrieben, besteht die Möglichkeit der RNA Bindung. Auch wurde eine hohe Konzentration des Komplexes in dendritischen Kompartimenten der Neuronen lokalisiert. Während der postnatalen kritischen Periode zeigte sich anhand der hier durchgeführten 2D-Gelelektrophorese die Präsenz des Trax Proteins ab dem postnatalen Tag P8, deutlicher noch ab dem Tag P21. Im Falle der *in vitro* Kulturen schien die Expression des Trax vermindert, konnte aber auch in diesem Zeitraum detektiert werden. Am Tag der Geburt hatte noch keine Expression des Trax Genes statt gefunden. Es wäre somit durchaus denkbar, dass das Trax Protein im Komplex mit dem Translin die korrekte Lokalisation bestimmter mRNAs während der kritischen Periode ermöglicht. Eventuell erfolgt mit diesem System die Umsetzung der abschließenden Phase der Maturation der Retina. *In vivo* zeigt sich eine stärkere Präsenz des Trax als *in vitro*. Unter nativen Bedingungen wird mit Hilfe des Translin/Trax Systems ein Proteinprofil in den retinalen Zellen aufgebaut das notwendig ist, um den Abschluss der Maturation herbei zu führen. *In vitro* scheint die Expression des Trax Proteins vermindert. Dies hätte zur Folge, dass keine exakte Erstellung einer bestimmten Proteinverteilung erfolgen kann, die den Abschluss der Maturation darstellt. Durch die Störung dieses Prozesses könnte auch ein postnatales axonales Wachstum im Verlauf der kritischen Periode gefördert werden. Der Translin/Trax Komplex würde somit unter nativen Bedingungen *in vivo* zu einer Verteilung von Proteinen führen, die im Zuge der programmierten Maturation direkt oder indirekt ein axonales Wachstum verhindern. *In vitro* hingegen scheint dieses System gestört, da die Expression des Trax Proteins verringert ist. Somit könnte keine vollständige Lokalisation von Proteinen erfolgen, die zum Ende der Maturation führen und ein axonales Wachstum inhibieren.

4.5.3 tolkin

Das tolkin Gen wurde erstmals im Rahmen einer Versuchsreihe mit *Drosophila melanogaster* entdeckt. Im Verlauf von Klonierungen des tolloid Gens wurde rund 700 bp vom tolloid Leserahmen entfernt das tolkin Gen identifiziert (Finelli et al., 1995). Aufgrund der Anordnung von charakteristischen Sequenzen, wie den „epidermal growth factor“ (EGF) Bereichen erfolgte eine Einordnung in die tolloid/BMP-1 Subfamilie. Diese gehören zu einer größeren Familie von Proteasen, zu der Astacin Familie. Hierbei handelt es sich

um eine der fünf Familien von strukturell leicht variierenden Zink-bindenden Metalloproteasen (Jiang und Bond, 1992). Neben den EGF Domänen sind so genannte CUB Domänen charakteristische Merkmale der Vertreter der Astacin Familie. Über diese Domänen kommt es zu Interaktionen mit anderen Proteinen und vermutlich auch zur Komplexbildung (Busby und Ingham, 1990). Ein Modell für eine derartige Interaktion ist die Regulation der Aktivität des *dpp* (*decapentalegic*) von *Drosophila melanogaster* durch das *tolloid* (Finelli et al., 1994; Childs und O'Connor, 1994).

Drosophila Larven mit einem *tolkin* null Allel sind nicht überlebensfähig, während Mutationen im *tolkin* Gen unter anderem zu einem nicht vollständig ausgebildeten Gehirn führen (Finelli et al., 1995). Hier wurde eine zentrale Rolle in der frühen Entwicklung des neuronalen Systems angenommen. Als mögliche Funktionen wurden Interaktionen mit anderen Proteasen diskutiert. Unter Ausbildung von Heteromeren könnten Komplexe entstehen, die durch proteolytische Prozesse verschiedene Wachstumsfaktoren aktivieren (Finelli et al., 1995).

Auch in anderen Organismen sind Homologe der *tolloid* / BMP-1 Familie vertreten. So wurde ein BMP-1 Gen beim Krallenfrosch *Xenopus* beschrieben (Maeno et al., 1993). Auch in der Maus und im Menschen (Wozney et al., 1988) konnten BMP-1 Homologe identifiziert werden. Im Falle des im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Proteins *Tolkin* bleibt eine mögliche Funktion unklar. Die späte Expression dieses Proteins um den postnatalen Tag P60 lässt zunächst eine Aktivierung von Wachstumsfaktoren als unwahrscheinlich erscheinen. Da aus anderen Untersuchungen eine proteolytische Interaktion der jeweiligen Orthologe dieses Proteins mit Wachstumsfaktoren als möglich erschien, wäre eine Inaktivierung von Wachstumsfaktoren in diesem Falle über einen proteolytischen Prozess denkbar. Die Proteolyse des Laminin-5 durch das Homologe BMP-1 konnte nachgewiesen werden (Amano et al., 2000). Laminin-5 fördert die Adhäsion und Migration von Epithelzellen (Baker et al., 1996). Laminin wurde auch im Rahmen dieser Arbeit als Beschichtung für die Kulturschalen eingesetzt. Jedoch erfolgte auch die *Tolkin* Expression in Retinae, die nicht kultiviert wurden, und somit nicht Laminin *in vitro* exponiert waren.

Somit erscheint ein direkter Zusammenhang zwischen der Verwendung von Laminin und der Expression von *Tolkin* als unwahrscheinlich, da die Retinae früherer Altersstufen ebenfalls auf Laminin kultiviert wurden, wobei jedoch keine Expression des *Tolkins* erfolgt war.

Von wesentlich größerem Interesse erscheint die Funktion anderer Vertreter der Astacin Familie in Hinblick auf die Entwicklung des Auges. Verschiedene BMPs üben zentrale Funktionen hinsichtlich der Entwicklung des neuronalen Systems, der Steigerung der Proliferationsfähigkeit, des Überlebens neuronaler Zellen sowie der Förderung des dendritischen Wachstums aus (Altmann und Brivanlou, 2001; Liu et al., 2003). Auch bezüglich des gerichteten axonalen Wachstums und der Bildung und Formation von Synapsen erscheinen BMPs während der frühen Entwicklung von großer Relevanz (Lein et al., 2002). In der frühen embryonalen Entwicklung erfolgt eine ausgeprägte Expression von BMP4 und BMP7 im optischen Vesikel von Hühnchen und Maus (Belecky-Adams und Adler, 2001; Trousse et al., 2001). Im Verlauf der retinalen Maturation konnten BMP2, -4, -5, -6 und -7 sowie die entsprechenden Rezeptoren in der Retina nachgewiesen werden (Belecky-Adams und Adler, 2001).

Die Funktionen, die von den jeweiligen BMPs während der Maturation erfüllt werden, sind sehr divers (Solrush et al., 1996). Wurde retinales Gewebe, das noch in der Maturation begriffen war, einer Applikation von entsprechenden BMPs unterzogen, so konnte die Induktion der Apoptose folgen (Hung et al., 2002). BMP7 knock-out Mäuse wiesen schwere Defekte in der frühen Augenentwicklung auf, wobei auch ein vollständiges Ausbleiben der Augenanlage auftreten konnte (Luo et al., 1995). Eine Versuchsreihe zur Inhibierung der BMP4 Expression zeigte, dass dieses Protein von großer Relevanz hinsichtlich der Linsenentwicklung ist (Furuta und Hogan, 1998).

Die Funktionsweise der jeweiligen BMPs scheint bis dato noch ungeklärt. Eine episodale BMP4 Expression im embryonalen Hühnchen führte zu einer Erhöhung des dorsalen Transkriptionsfaktors *Tbx5* und zu einer Verringerung der ventralen Marker *Vax* und *Pax2* (Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Welche Veränderungen durch die Expression des ebenfalls zur Astacin Familie gehörenden Tolkin im retinalen Gewebe der Ratte hervorgerufen wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden. Eine ähnliche Funktion, wie sie die anderen Metalloproteasen im Verlaufe der retinalen Maturation erfüllen, erscheint aber als unwahrscheinlich. Das hier identifizierte Tolkin wird erst ab dem postnatalen Tag P60 exprimiert und greift daher nicht in die Entwicklung während der postnatalen kritischen Periode des Auges ein.

Die weiteren Proteine, wie sie mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und der MALDI Untersuchung identifiziert wurden, werden im Folgenden nur diskutiert, da diese Proteine bereits Gegenstand einer vorherigen Dissertation (Rose, 2004) dieser Abteilung waren oder als nicht von zentraler Bedeutung für das axonale Wachstum erscheinen.

4.5.4 Retinoic acid binding protein (RABP)

Bei dem retinoic acid binding protein handelt es sich um ein weit verbreitetes, 15,5 kDa großes Protein, das in zwei Ausprägungen, den so genannten cellular retinoic acid binding proteins I und II (CRABPI und II) in verschiedenen Säugerzellen lokalisiert ist (Noy, 2000). Eine vollständige Charakterisierung der Funktion dieser Proteine konnte bis dato nicht erfolgen. CRABPI weist eine starke Bindungsaffinität zur Retinolsäure auf (Fiorella et al., 1993) und soll zu einer Förderung des Retinolsäure Metabolismus führen (Fiorella und Napoli, 1994). Darüber hinaus wurde vermutet, dass CRABPI und II die Retinolsäure aus dem cytoplasmatischen Kompartiment zu den Rezeptoren des Nucleus transportieren (Ong, 1994). Auch wenn es zu einer genauen Lokalisation dieser Proteine unterschiedliche Hinweise gibt, wie zum Beispiel Hinweise auf eine cytoplasmatische (Ong, 1994; Zheng et al., 1996), auf eine Mitochondrien assoziierte (Ruff und Ong, 2000) oder auch auf eine nukleäre (Gaub et al., 1998) Lokalisation, so erscheint doch die Bindung von Retinolsäure während der embryonalen Entwicklung als Transkriptions-regulierendes Element umso eindeutiger (Ross et al., 2000).

Die Retinolsäure ist in Bezug auf die neuronale Entwicklung gut untersucht. Während der Entwicklung des Hirnes reguliert die Retinolsäure die Differentiation der Oligodendrocyten (Noll und Miller, 1994), der Astrocyten (Wuarin et al., 1990) und der Neuronen (Henion und Weston, 1994). Verschiedene *in vitro* Versuchsreihen zeigten einen synergistischen Effekt von Retinolsäure und Neurotrophinen auf. In Untersuchungen mit embryonalem Gewebe konnte so das axonale Wachstum induziert werden (Chandrasekaran et al., 2000). Die Kombination von Retinolsäure und Neurotrophinen führte zu einer axonalen Regeneration bei differenzierten Ganglienzellen (Mey und Rombach, 1999). Es zeigte sich in Bezug auf die Retina des Weiteren, dass RABP befähigt ist, mit dem GABA_A Rezeptor zu interagieren (Song et al., 2005).

4.5.5 Phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP)

Das zwischen 21 und 23 kDa große, basische phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP) wurde erstmals aus dem Gehirn von Kälbern isoliert (Bernier und Jolles, 1984). Im Rahmen von *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass dieses Protein eine ausgeprägte Affinität zu einer Komponente der Zellmembran, dem Phosphatidylethanolamin, aufweist (Bernier et al., 1986). Wesentliche Konzentrationen von PEBP konnten in Oligodendrozyten (Moore et al., 1996; Roussel et al., 1988) sowie in

Schwann'schen Zellen (Moore et al., 1996) nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass PEBP eine zentrale Funktion hinsichtlich der Membranbiogenese oder des Lipidtransportes erfüllt (Moore et al., 1996).

Eine starke Präsenz des PEBP im cytoplasmatischen Kompartiment ließ auch eine Funktion im Bereich der Signaltransduktion zwischen Membran und Cytoplasma als möglich erscheinen (Schoentgen et al., 1993). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das *hippocampale cholinerge neurostimulierende Peptid* (HCNP) bei Ratten identisch ist mit einem Bereich des PEBP, der durch entsprechende Enzyme prozessiert wird (Ojika et al., 1996). Demnach wäre PEBP auch Präkursor des HCNP. PEBP konnte in embryonalen und adulten Ratten im Gehirn nachgewiesen werden. Eine alleinige Funktion im Zusammenhang mit der Myelinisierung erscheint unwahrscheinlich, da PEBP bereits vor der Ausbildung der Myelinscheiden exprimiert wird und auch in späteren Stadien noch präsent ist (Frayne et al., 1999). Die stark konservierte Form des PEBP und seine weite Verbreitung in verschiedensten Mammalia lässt eine größere Relevanz dieses Proteins und zahlreiche Interaktionspartner vermuten. Auch scheint dieses Protein eine wichtige Funktion bezüglich der neuronalen Maturation sowie der Signaltransduktion zu erfüllen. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass PEBP in die Pathogenese der Alzheimer Krankheit involviert ist (Maki et al., 2002).

4.5.6 α A-Crystallin

Das α A-Crystallin gehört zur Familie der heat shock Proteine. Es handelt sich um ein Protein mit der Funktion von Chaperonen, die die Zelle vor Hitzestress, Oxidation und Aggregation teilweise denaturierter Proteine bewahren (Horwitz, 1992).

Zunächst wurde dieses Protein in der Linse identifiziert, wo es in großem Umfang exprimiert wird (Overbeek et al., 1985). In nachfolgenden Versuchsreihen stellte sich heraus, dass die Expression des α A-Crystallin auch in anderen Geweben wie Herz, Gehirn, Leber, Milz, Thymus und Retina stattfindet (Deretic et al., 1994).

Das ca. 20 kDa große α A-Crystallin ist in der Lage, mit dem zu 55 % homologen α B-Crystallin polymere Komplexe mit einer Größe von bis zu 800 kDa zu formen (Derham und Harding, 1999). Das α A-Crystallin weist distinkte, nach Funktionen gegliederte Domänen auf. So dient der hydrophile C-terminale Bereich zur Bindung geladener Proteine, die einer beginnenden Denaturierung unterliegen (Kuehn et al., 1993). Im N-

terminalen Bereich kommt es zur Bindung hydrophober Proteinabschnitte, die aufgrund des voranschreitenden Strukturverlustes dem umgebenden Solvens exponiert sind (Derham und Harding, 1999). Die Aminosäuren 70-88 formen eine Domäne, die zur Bindung teildenaturierter Proteine befähigt ist, so dass diese keine Aggregate mehr ausbilden können (Sharma et al., 2000).

Crystalline unterliegen einer ausgeprägten post-translationalen Modifikation (Derham und Harding, 1999). Mit fortschreitendem Alter nehmen diese Modifikationen immer größeren Umfang an. So kommt es zu Acetylierungen, Oxidationen, Methionierungen, Phosphorylierungen sowie zur Abspaltung eines N- bzw. C-terminalen Bereiches (Hanson et al., 2000; Colvis und Garland, 2002).

Im Rahmen von Untersuchungen neurologischer Erkrankungen konnte ebenso eine erhöhte Expression des Crystallins nachgewiesen werden (Messing et al., 1998; van Noort et al., 2000) wie auch im Falle der Degeneration der Photorezeptoren (Cavusoglu et al., 2003; Sakaguchi et al., 2003). Neben der protektiven Funktion und der erhöhten Expression während unterschiedlicher Pathogenesen sind Crystalline des Weiteren in die Signaltransduktion involviert (Hoover et al., 2000; Kantorow und Piatigorsky, 1994) und vermögen eine Bindung mit der Membran sowie mit Intermediärfilamenten zu etablieren (Cobb und Petrash, 2002). Eine anti-apoptotische Wirkungsweise der Crystalline ist ein Verhindern der Aktivierung der Caspase-3 durch Bindung von Bax und Bcl-Xs (Mao et al., 2004).

4.5.7 Recoverin

Bei Recoverin handelt es sich um ein 23 kDa großes, Calcium-bindendes Protein, das erstmals aus der Photorezeptorschicht von Kälbern isoliert worden ist (Lambrecht und Koch, 1992). Recoverin wird in sich entwickelnder Retina als Markerprotein zur Analyse des Maturationsstadiums verwendet. Der entsprechende Antikörper bindet an die Stäbchen und Zapfen der Photorezeptorschicht (Johnson et al., 1999) sowie an On und Off Bipolarzellen (Miller et al., 1999; Gunhan et al., 2002). Die Entwicklung der Photorezeptoren im Auge der Ratte beginnt am embryonalen Tag E16 und dauert bis zum postnatalen Tag P5 an, wobei die Mehrheit der Stäbchen sich postnatal ausbildet (Hinds und Hinds, 1979).

4.5.8 poly (A) binding protein

Die eukaryotische mRNA verfügt in den meisten Fällen über eine poly-Adenylierung, dem so genannten poly (A) Schwanz, am 3' Terminus. In Zusammenhang mit dieser poly (A) Sequenz steht das poly (A) binding protein (PABP). Dieses in eukaryotischen Zellen ubiquitäre Protein wurde erstmals 1973 (Blobel) beschrieben. Es werden zwei Arten dieses Proteins aufgrund von Lokalisation und Funktion in der Zelle unterschieden. Zum einen das cytoplasmatische PABP (Sachs et al., 1986) und zum anderen das nukleäre PABP (Wahle, 1991; Nemeth et al., 1995). Das cytoplasmatische PABP beschleunigt mittels 5' seitiger CAP-Struktur, sofern diese vorhanden ist, die Translation (Preiss und Hentze, 1998). Darüber hinaus ist dieses PABP an der Degradation der poly (A) Sequenz und der gesamten mRNA beteiligt (Caponigro und Parker, 1996; Parker und Song, 2004).

Das nukleäre PABP fördert die Elongation der poly (A) Sequenz an mRNA Präkursoren im Nucleus (Wahle, 1991). Interessant aus ophthalmologischer Sicht ist das nukleäre PABP in Hinblick auf die genetisch bedingte Pathogenese der oculopharyngealen Muskeldystrophie, die sich durch die intranukleäre Akkumulation von nukleärem PABP in Form von Filamenten auszeichnet (Calado et al., 2000). Der zu Grunde liegende genetische Defekt führt zur Expression eines nukleären PABP mit einer poly-Alanin-Sequenz, wodurch die Aggregation der Proteine ermöglicht wird und die zum Zelltod führt (Fan et al., 2001). Diese pathogenen Veränderungen treten häufig im Pharynx aber primär auch in Augenlidern auf. Filamentöses PABP konnte auch in Neuronen nachgewiesen werden, ohne dass eine genetische Veränderung vorlag (Berciano et al., 2004).

4.5.9 RNase P Protein 30

Das RNase P Protein stellt die Proteinkomponente der Ribonuklease P dar. Dieses Ribonukleoprotein entfernt enzymatisch die 5'-seitige Leadersequenz von tRNA Präkursoren (Pace und Brown, 1995). Im Verlauf der hier durchgeführten Untersuchungen wurde dieses Protein in kultivierten Retinae während der Phase des axonalen Wachstums identifiziert. Aufgrund der erhöhten Präsenz dieses Proteins erscheint ein höherer Umsatz der mRNA möglich, da die Zelle Prozesse aktivieren muss, die für ein axonales Wachstum notwendig sind.

4.6 Quantifizierung von mRNA mittels Real time PCR

Die Untersuchung der Retinae verschiedener Altersstufen mit Hilfe des real time PCR Verfahrens ermöglicht eine direkte Beschreibung der Vorgänge im juvenilen Gewebe. Vor allem im Zuge einer Untersuchung, die wie in diesem Falle die Maturationsstadien im Verlaufe der Zeit beobachtet, erscheint die real time PCR Methodik geeignet, da eine etwaige zeitliche Verschiebung aufgrund von zellulären Prozessen, wie Translation oder posttranslationalem Processing, hier nicht relevant ist. Werden Proteine in der Untersuchung nachgewiesen, lässt sich oftmals nur schwer bestimmen, ob die gefundenen Moleküle eben erst translatiert wurden oder ob es sich hierbei um persistente Proteine handelt, die eine ausgeprägte Halbwertszeit aufweisen. Man kann lediglich feststellen, dass die Zielproteine vorhanden sind.

Die real time PCR liefert hier direktere Daten. Die Antwort einer Zelle auf bestimmte Umstände kann präzise anhand der veränderten Expression abgelesen werden. Dieser Vorteil des Verfahrens hat jedoch auch einen Nachteil. So werden die aus proteomischen Untersuchungen gewonnenen Daten nicht in jedem Falle durch real time PCR Ergebnisse bestätigt. Proteine verfügen über unterschiedliche Persistenzen in der Zelle, die unter anderem auch funktionsbedingt sind. Als Beispiel sollen Proteine dienen, die Bestandteile des Cytoskeletts sind, und über die immunhistologische Untersuchung detektiert werden. Die Präsenz der jeweiligen Proteine über eine gewisse Zeitspanne wird bestätigt. Es ist jedoch nicht erkennbar, welchem Umsatz bzw. Kreislauf aus Degradation und Neusynthese diese Proteine unterliegen. Erst im Vergleich mit Daten der real time PCR kann eine genauere Aussage getroffen werden. Ergibt eine immunhistologische Untersuchung, dass ein bestimmtes Zielprotein über einen längeren Zeitraum präsent ist, kann dies zum einen bedeuten, dass das Protein über eine lange Halbwertszeit verfügt. In diesem Falle würden die Ergebnisse der real time PCR eine einmalige verstärkte Expression des entsprechenden Genes anzeigen. Würden die Daten der PCR jedoch ein alternierendes Expressionsmuster aufzeigen, so würde dies zum anderen bedeuten, dass das Zielprotein einem ausgeprägten Umsatz unterläge.

Die PCR Daten bezüglich des GAP-43 Gens lassen eine geringe Expression erkennen. Erst am Tag P60 steigt die Expression um den Faktor ca. 0,5. Dies lässt vermuten, dass das GAP-43 Protein in geringen Konzentrationen auch nach der Maturation für die Zellen der Retina relevant ist.

Die Expression der Proteine Pin1 und Trax ist während der Phase des axonalen Wachstums stark verringert. Die Transkription dieser Gene scheint während der frühen Elongationsphase (ca. P14-P16) nicht von wesentlicher Relevanz zu sein. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese konnte das Protein Trax bereits am Tag P21 nachgewiesen werden. Demnach müsste eine Transkription dieses Genes nach dem Tag P16 und vor dem Tag P21 erfolgt sein. Dieser Zeitraum konnte aufgrund der gewählten Probenzeiten nicht im Zuge der real time PCR Untersuchungen erfasst werden. Offensichtlich findet eine stärkere Expression des Trax Genes während der Tage P17 bis P20 sowie zu den Tagen P30 und P60 statt. Die Zellen des retinalen Gewebes benötigen offenbar höhere Konzentrationen dieses Proteins. Zu dieser späten Phase der Maturation des Auges erfolgt eine Umstellung der Zellaktivität von Maturationsprozessen hin zu Erhaltungsprozessen. Die für die Entwicklung verantwortlichen Gene werden herunterreguliert, während so genannte *house keeping* Gene auf ein gleichmäßig anhaltendes Expressionsniveau angehoben werden. In diesem Umschalten der verschiedenen Prozesse könnte die hohe Expression des Trax begründet sein. Dieses Protein verfügt als Teil des Translin/Trax-Komplexes über Nukleinsäure - bindende Eigenschaften sowohl für DNA als auch für RNA. Unter Umständen ist Trax somit Bestandteil eines Regulationsmechanismus, der diese Umstellung durchführt.

4.7 Transfizierbarkeit von RGZ

Die Expression episomaler Gene in RGZ *in vivo* erscheint in Hinblick auf Pathogenesen und Regeneration als ein sinnvolles therapeutisches Mittel für die Zukunft. Durch die Expression exogener, Regenerations-relevanter Gene wie zum Beispiel des GAP-43 könnte möglicherweise eine Elongation bzw. Verzweigung retinaler Ganglienzellaxone induziert werden. Es erscheint noch als umstritten, welcher Weg des DNA Transfers hier bestmöglich genutzt werden kann. In zahlreichen Untersuchungen, die einen effektiven Gentransfer in die retinalen Zellen aufzeigen sollten, wurden unterschiedlichste Methodiken angewandt. Das Spektrum der Verfahren reicht von viralen Transduktionen (Yang et al., 2002) über Elektroporation (Dezawa et al., 2002) *in vivo* bis hin zu Lipidtransfektionen (Masuda et al., 1996) und Axon-basiertem Gentransfer (Garcia-Valenzuela et al., 1997).

Die Verwendung von viralen Partikeln für den Gentransfer ist eine effektive, wenn auch nicht optimale Verfahrensweise. Die virale Transfektion bringt Nachteile mit sich, die in der therapeutischen Anwendung nicht außer Acht gelassen werden sollten. Werden

Retroviren verwendet, so dürfen sich die Zellen nicht in einem postmitotischen Stadium befinden, wie es bei den RGZ der Fall ist, da die Proliferation der Zielzellen eine Voraussetzung für die erfolgreiche Integration des viralen Genoms ist (Turner et al., 1990; Mulligan, 1993). Werden jedoch DNA Viren verwendet, so können auch postmitotische Zellen transduziert werden.

Auf diese Weise wurden Untersuchungen in Bezug auf den Gentransfer mit Adenoviren und Herpes simplex an adulten Neuronen von Säugern durchgeführt (Wood et al., 1994; Jomary et al., 1994). Die Ausgangsformen dieser Viren verfügen über ein pathogenes Potential, das sie für die therapeutische Anwendung als ungeeignet erscheinen lässt. Adenoviren sind als Auslöser der Konjunktivitis in der ophthalmologischen Therapie nicht akzeptabel.

Die Entwicklung von so genannten Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektoren verspricht eine nahe zu vollständig aus zu schließende Pathogenität bei fortwährender Expression exogener Leserahmen in den Zellen (Guy et al., 1999). Die AAV Vektoren zeigten eine effektive Transfektion auch von RGZ (Guy et al., 1999). Wird auch ein pathogenes Potential durch AVV Vektoren in naher Zukunft unter Umständen völlig ausgeschlossen sein, so besteht weiterhin das Problem der Kapazität. Da die zur Transfektion verwendeten viralen Partikel notwendige genomische Information für Integration und Replikation mitführen müssen, ist das Ausmaß exogener Leserahmen begrenzt, die transferiert werden können. Im Falle des murinen Leukämie Virus (MLV) sind dies insgesamt immer noch bis zu 7 kb (Matsuda und Cepko, 2004). Konstrukte von 5,1 bis 5,3 kb können mit AVV Vektoren erfolgreich transduziert werden (Dong et al., 1996; Hermonat et al., 1997). Eine Therapie, die mehrere Gene umfasst, würde hier rasch durch die Verwendung dieser Vektoren begrenzt.

Neben dieser Problematik sollte auch die Genauigkeit einer viralen Transfektion hinsichtlich der Lokalisation exogener Leserahmen berücksichtigt werden. Durch die intravitreale Injektion von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren konnte eine effektive Transfektion adulter RGZ nachgewiesen werden (Cheng et al., 2002). Die intravitreale Injektion führt zu einer Transfektion der gesamten inneren Retina, die an den Vitreus grenzt. So werden neben Zellen von retina-fernen Strukturen die verschiedensten Zellen der inneren Retina erreicht wie auch die Müller Zellen (Liang et al., 2001; Martin et al., 2002). Die etwaige Pathogenität der viralen Partikel und die Transfektion von unterschiedlichen Zellen, die nicht das eigentliche Ziel darstellen, ließen diese Methode jedoch als ungeeignet erscheinen.

Die Elektroporation wurde häufig als effektives Mittel zum Transfer exogener DNA in unterschiedlichste Gewebe wie Leber oder Muskeln beschrieben (Rols et al., 1998). Auch für den Transfer von DNA in die RGZ wurde ein auf den Prinzipien der Elektroporation basierendes Verfahren entwickelt. Hierbei wurde mit so genannten Löffelelektroden das jeweilige Auge *in vivo* einem elektrischen Feld mit fest definierten Parametern ausgesetzt (Dezawa et al., 2002; Matsuda und Cepko, 2004). Bei einer intravitrealen Injektion der jeweiligen DNA-Lösung wird durch die Elektroporation eine Transfektion der RGZ herbeigeführt (Dezawa et al., 2002). Bei neonatalen Ratten und Mäusen wurde im Vorfeld der Elektroporation eine DNA-Lösung in den subretinalen Raum injiziert. Im Rahmen dieser Versuchsdurchführungen wurden überwiegend Zellen der äußeren aber auch der inneren nukleären Schicht transfiziert (Matsuda und Cepko, 2004). Diese Variation der Elektroporation zur Transfektion von RGZ wurde auch im Rahmen dieser Arbeit getestet. Es ergaben sich jedoch keine zufrieden stellenden Ergebnisse im Rahmen dieser Versuchsdurchführungen. Als Reporter gen wurde ein EGFP Konstrukt verwendet. Nach erfolgter Elektroporation war keine episomale Expression des entsprechenden Vektors pEGFP-N2 zu detektieren. Darüber hinaus barg die eigentliche Elektroporation ein derartiges Stresspotential, dass Retinae der regenerativen Altersstadien (P14 - P24) keinerlei axonale Elongation *in vitro* nach erfolgter Explantation und Elektroporation mehr aufwiesen. Aus diesen Gründen erschien diese Methodik für die hier angestrebten Untersuchungen als ungeeignet.

Der Transfer von Genen mit positiv geladenen Liposomen hatte sich als effektiv erwiesen, da die negativ geladene DNA in größerem Ausmaß von diesen Liposomen aufgenommen werden konnte (Pinnaduwage et al., 1989; Smith et al., 1993). Unter Verwendung dieser positiv geladenen Liposomen wurden auch etwaige Transfektionen von RGZ in der Ratte untersucht (Masuda et al., 1996). Wurde die Lipid-DNA-Suspension in den Vitreus injiziert, so führte dies zu einer episomalen Expression des exogenen Reportergens β -Galactosidase in den verschiedensten Gewebsbereichen wie den Epithelzellen der Cornea, den Stromazellen der Iris sowie auch den RGZ (Masuda et al., 1996). Eine derart ausgeprägte Transfektion nach einer intravitrealen Injektion einer Lipid-DNA-Suspension konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es konnte keine episomale Expression des Reportergens EGFP in den RGZ detektiert werden. Ein etwaiger Grund für das Ausbleiben einer erfolgreichen Transfektion könnten die physikalischen Barrieren sein, die von den Liposomen auf dem Weg zu den RGZ überwunden werden müssen. Zunächst wurde die Lipid-DNA-Suspension in den hoch viskosen Vitreus injiziert. Aus dieser Gel-artigen Struktur muss eine Diffusion der Liposomen in Richtung der Retina erfolgen. Diese wird zur vitrealen Seite hin von der

Basalmembran umschlossen, die ebenfalls von den Liposomen durchdrungen werden muss. Erst nach dieser Barriere kann ein direkter Kontakt von Liposomen und RGZ erfolgen. Neben der überaus geringen Transfektionsrate erschien auch die geringe Spezifität der Lipidtransfektion hinsichtlich der Zellart als ein entscheidender Faktor, der diese Verfahrensweise als nicht geeignet erscheinen ließ.

Ein nicht zu unterschätzendes Problem verschiedener Transfektionsmethoden, die eine Expression exogener Leserahmen in RGZ zum Ziel haben, ist die geringe Spezifität in Bezug auf die zu transfizierenden Zellen. Oftmals werden neben den RGZ auch Zellen der inneren retinalen Schichten transfiziert. Dieses Problem der geringen Zell-Spezifität ist bei der Axon-basierten Transfektion völlig ausgeschlossen. Im Zuge dieser Transfektionsmethodik, wird die exogene DNA operativ auf dem *Colliculus superior* appliziert und retrograd über den axonalen Transport in die RGZ gebracht (Garcia-Valenzuela et al., 1997). Die Aufnahme von Makromolekülen über die Nervenendungen erfolgt über Endozytose (Parton et al., 1992). Befinden sich die Makromoleküle im intrazellulären Raum, so können sie über den Mikrotubuli-gestützten retrograden axonalen Transport in das Soma des Neurons gelangen (Broadwell und Balin, 1985). Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Komplexierung von DNA mit poly-L-Lysin keine Steigerung der Transfektionsrate erbrachte, wohl aber eine Verlängerung der episomalen Expression in den RGZ zur Folge hatte (Garcia-Valenzuela et al., 1997). Ein möglicher Grund für diese verlängerte episomale Expression könnte darin begründet sein, dass poly-L-Lysin als nukleäres Importsignal dient (Douglas und Quinlan, 1995), wodurch ein Schutz vor Nukleasen gegeben wäre.

Diese Vorgehensweise der retrograden Axon-basierten Transfektion wurde auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Es wurde auf eine Komplexierung der DNA mit poly-L-Lysine verzichtet. Auch wurden Untersuchungen durchgeführt, im Zuge derer eine Suspension aus DNA und Lipiden auf den *Colliculus superior* appliziert wurde, ähnlich wie es von Sahnek et al. (1993) bei Untersuchungen an Motoneuronen beschrieben worden war. Zum anderen wurde ein Gemisch aus DNA und dem Farbstoff Dil in den *Colliculus superior* eingebracht.

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit zeigten eine hochgradig spezifische Transfektion einzelner RGZ. Die Transfektionsrate war jedoch so gering, dass die Zellen, die erfolgreich transfiziert worden waren, im Rahmen einer etwaigen therapeutischen Anwendung zu keiner ausreichenden Regeneration des Sehnervs geführt hätten. Die etwaigen Ursachen für diese geringen Transfektionsraten können vielfältig sein. Zum einen muss eine ausreichende Aufnahme der DNA über die Nervenendungen

gewährleistet sein. Eine starke endozytotische Aktivität ist in den Nervenendungen vorhanden, da auch der parallel applizierte Farbstoff Dil in großem Umfang in die RGZ gelangte. In Bezug auf diese endozytotischen Vorgänge könnte die negative Ladung der DNA ein gewisses Hindernis darstellen. Wäre dies aber der Fall, so hätte sich jedoch im Rahmen der Untersuchungen von Garcia-Valenzuela et al. (1997) mit komplexierter DNA eine erhöhte Transfektionsrate abzeichnen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall. Zu dem hatte die Verwendung von Transfektionsagenzien auf Lipidbasis zu keiner detektierbaren Transfektionsrate geführt. Entscheidend scheint hier die Stabilität der DNA im intrazellulären Kompartiment zu sein. Eine umfangreiche Degradation der exogenen DNA durch Nukleasen erscheint durchaus als möglich.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RGZ juveniler Ratten (P14 - P24) in der Lage sind, axonale Fortsätze in großem Umfang spontan auszubilden. Die Ergebnisse zeigen, dass neben den bereits beschriebenen embryonalen und postnatalen Entwicklungsphasen auch eine „Augenöffnungsphase“ existiert, die das Auswachsen von Axonen triggert. Die funktionell gesteuerte Wachstumsphase von Axonen hält ca. eine Woche an, nämlich bis kurz nach dem Zeitpunkt der Erlangung einer kompletten Linsentransparenz (P21) und voller visueller Funktion. Danach wird das adulte Muster der Nichtregenerierbarkeit angenommen.

Die Expressionsprofile von GAP-43, Neurofilament und Rhodopsin wurden im Verlauf der postnatalen Maturation immunhistologisch bestimmt. Eine Abhängigkeit der Expression dieser Proteine vom Lichteinfall konnte nachgewiesen werden. Eine vorzeitige Lichtexposition führte zu einer früheren Expression von Neurofilament und Rhodopsin in der juvenilen Retina. Eine Lichtdeprivation führte hingegen zu einer Herunterregulation beider Proteine als Hinweis ihrer funktionsabhängigen Expression.

Um die lichtinduzierbaren Proteinexpressionsprofile zu untersuchen wurde mittels der 2D-Gelelektrophorese und MALDI das Proteom der Retina analysiert. Erstmals in diesem Zusammenhang wurden lichtunabhängig und lichtabhängig exprimierte Proteine identifiziert. Während die Expression von Tolkin und Trax lichtunabhängig zu sein scheint, ist die Expression von Pin1, Recoverin, PEBP sowie poly(A)BP lichtabhängig. Mit Hilfe der Real time PCR konnte gezeigt werden, dass die Expressionen von Pin1 und Trax während der Phase des axonalen Wachstums herunter reguliert sind.

Durch die visuelle Erfahrung erfolgt die Aktivierung der Photorezeptoren und des neuronalen Calcium Sensors Recoverin als Marker der Rezeptoren. Die Membrangestützte Reizerfassung der Photorezeptoren setzt die Expression von Proteinen der Membranbiogenese, wie beispielsweise dem PEBP, voraus. Das poly (A) BP ist in die Translation involviert und könnte somit bezüglich der entwicklungsbedingten Umstellung des Proteoms von Bedeutung sein. Daneben kann auch das Trax in die Translation involviert sein und mit der mRNA interagieren. Die sich entwickelnden Zellen der Retina durchlaufen verschiedene Stadien des Zellzyklus, der auch einer Regulation durch Pin1 unterliegen kann.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass kritische Phasen der Entwicklung der Retina mit plastischen Vorgängen verbunden sind, die man als *sprouting* oder wie im konkreten Fall als axonale Elongation sehen kann. Begleitet und/oder kontrolliert werden diese Vorgänge von zellulären und molekularen Veränderungen, die durch die hier entdeckten Proteine teilweise gesteuert werden könnten.

6. Anhang

6.1 Quantifizierung des axonalen Wachstums

6.1.1 Axonales Wachstum nicht-manipulierter Retinae (Kapitel 3.1)

Alter in Tagen	Mittelwert der Axonanzahl nach 1 Tag Inkubation	Stdaw. nach 1 Tag Inkubation	Mittelwert der Axonanzahl nach 2 Tagen Inkubation	Stdaw. nach 2 Tagen Inkubation
P0	0	0	0	0
P2	0	0	0	0
P4	0	0	0	0
P6	0	0	1	1
P8	0	0	1	0
P10	0	0	1	1
P11	0	0	2	1
P12	0	0	2	0
P13	0	0	2	1
P14	0	0	28	9
P15	0	0	41	12
P16	0	0	40	15
P17	1	1	41	11
P18	0	0	33	8
P19	3	0	33	13
P20	0	0	40	14
P21	0	0	32	12
P22	1	0	36	15
P22	0	0	25	6
P24	1	1	17	8
P25	0	0	4	3

Tabelle 4: Dargestellt ist die jeweilige Anzahl axonaler Fasern mit einer minimalen Länge von 200 μm je Retinaviertel. (Tabelle enthält gerundete Werte)

6.1.2 Axonales Wachstum kultivierter Retinae (Kapitel 3.2)

Alter in Tagen	Mittelwert Kontroll-Retinae,	Stdaw. Kontroll-Retinae	Mittelwert FLE-Retinae	Stdaw. FLE-Retinae	Mittelwert KLE-Retinae	Stdaw. KLE-Retinae
P2	0	0				
P4	0	0				
P6	1	1				
P8	1	1				
P10	1	1	1	1		
P11	2	1	1	1		
P12	2	1	2	1		
P13	2	1	1	1		
P14	28	9	26	10		
P16	40	15	35	9		
P18	33	8	35	10		
P20	40	15	36	7		
P21	32	12	35	9	33	7
P22	36	15			33	5
P23	25	6			24	7
P24	17	8	15	7		

Tabelle 5: Dargestellt ist die jeweilige Anzahl axonaler Fasern mit einer minimalen Länge von 200 µm je Retinaviertel nach entsprechender Lichtexposition. (Tabelle enthält gerundete Werte)

6.2 Rohdaten der Real time PCR (Kapitel 3.7)

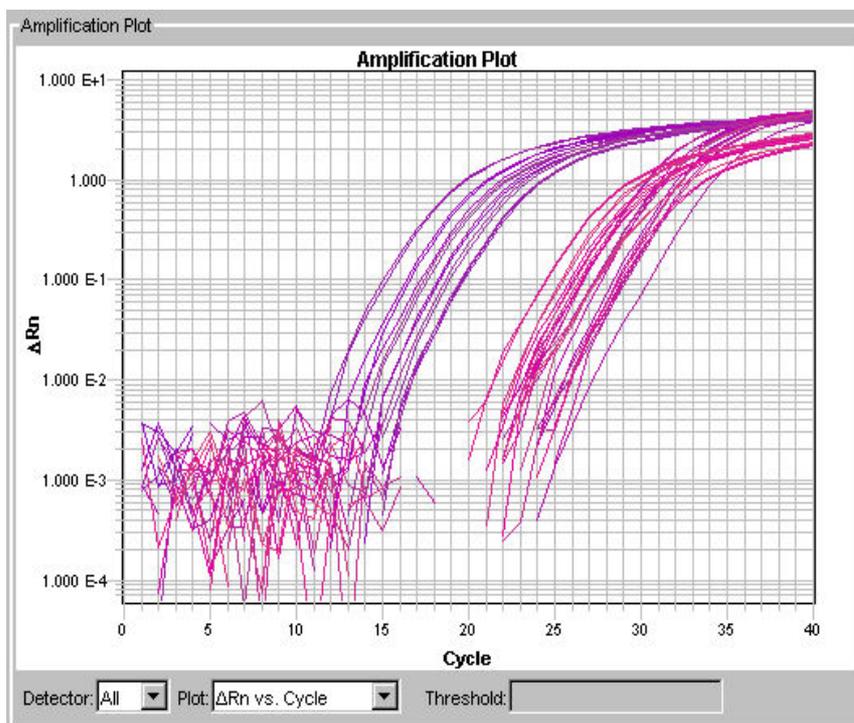


Abb. 31 Graphische Darstellung der Rohdaten der Expressionsanalyse bezüglich der Gene Pin1 und Trax (erstellt mit: SDS 2.2.2 Software [Applied Biosystems])

6.2.1 Regulation des GAP-43 Gens

Gen	Alst	ct-Wert	Delta	MW	ct(t)-ct(e)	Kalibrator	Regulation
18sr RNA	P0	17,143467	0,18396	17,051487	0	0	stand
18sr RNA	P0	16,959507					
18sr RNA	P8	18,04552	0,075621	18,0833305	0	0	stand
18sr RNA	P8	18,121141					
18sr RNA	P16	18,396975	0,073433	18,3602585	0	0	stand
18sr RNA	P16	18,323542					
18sr RNA	P21	15,820583	0,014157	15,8276615	0	0	stand
18sr RNA	P21	15,83474					
18sr RNA	P30	19,944178	0,013198	19,950777	0	0	stand
18sr RNA	P30	19,957376					
18sr RNA	P60	18,98115	0,053141	18,9545795	0	0	stand
18sr RNA	P60	18,928009					
GAP-43	P0	27,741537	0,380594	27,55124	10,499753	0	1
GAP-43	P0	27,360943					
GAP-43	P8	29,990257	0,172106	30,07631	11,9929795	1,4932265	0,355217238
GAP-43	P8	30,162363					
GAP-43	P16	30,289856	0,022316	30,301014	11,9407555	1,4410025	0,368311283
GAP-43	P16	30,312172					
GAP-43	P21	28,825937	0,227089	28,7123925	12,884731	2,384978	0,191447669
GAP-43	P21	28,598848					
GAP-43	P30	30,53987	0,01674	30,54824	10,597463	0,09771	0,934515177
GAP-43	P30	30,55661					
GAP-43	P60	29,205408	0,835785	28,7875155	9,832936	-0,666817	1,587566473
GAP-43	P60	28,369623					

Tabelle 6: Rohdaten der ersten GAP-43 Expressionsanalyse

Gen	Alst	ct-Wert	Delta	MW	ct(t)-ct(e)	Kalibrator	Regulation
18sr RNA	P0	19,209776	0,533131	18,9432105	0	0	stand
18sr RNA	P0	18,676645					
18sr RNA	P8	17,118073	0,100853	17,0676465	0	0	stand
18sr RNA	P8	17,01722					
18sr RNA	P16	19,968939	0,105395	19,9162415	0	0	stand
18sr RNA	P16	19,863544					
18sr RNA	P21	19,766741	0,028941	19,7522705	0	0	stand
18sr RNA	P21	19,7378					
18sr RNA	P30	20,288078	0,033814	20,271171	0	0	stand
18sr RNA	P30	20,254264					
18sr RNA	P60	21,345331	0,058611	21,3160255	0	0	stand
18sr RNA	P60	21,28672					
GAP-43	P0	21,29932	0,082703	21,2579685	2,314758	0	1
GAP-43	P0	21,216617					
GAP-43	P8	22,152946	0,023598	22,164745	5,0970985	2,7823405	0,145355695
GAP-43	P8	22,176544					
GAP-43	P16	22,481913	0,512054	22,73794	2,8216985	0,5069405	0,70371321
GAP-43	P16	22,993967					
GAP-43	P21	23,245426	0,100444	23,295648	3,5433775	1,2286195	0,42672558
GAP-43	P21	23,34587					
GAP-43	P30	22,931087	0,070507	22,8958335	2,6246625	0,3099045	0,806695157
GAP-43	P30	22,86058					
GAP-43	P60	23,164644	0,104002	23,112643	1,7966175	-0,5181405	1,432108203
GAP-43	P60	23,060642					

Tab. 7: Rohdaten der zweiten GAP-43 Expressionsanalyse

6.2.2 Regulation der Pin1 und Trax Gene

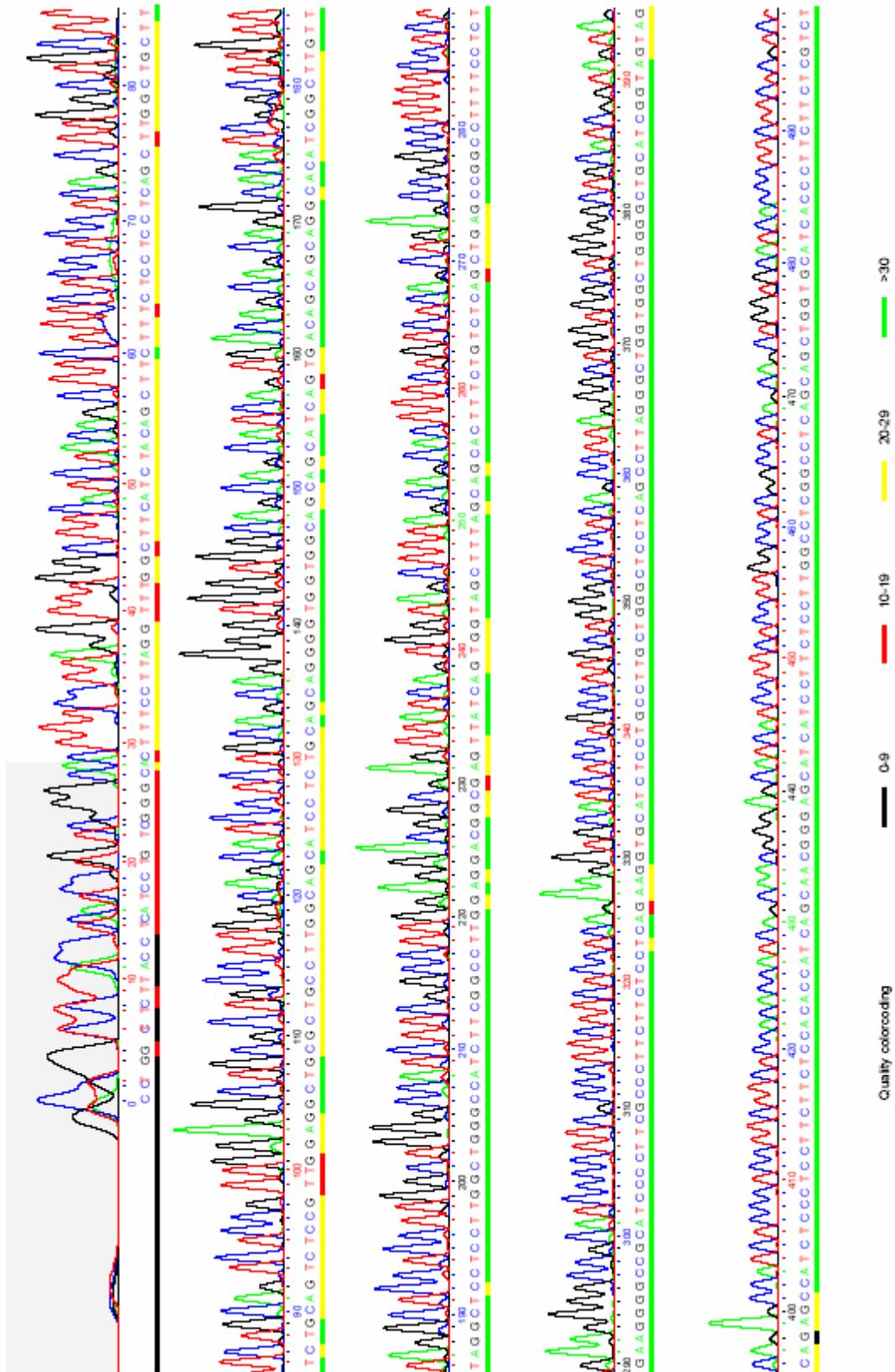
Gen	Alst	ct-Wert	Delta	MW	ct(t)-ct(e)	Kalibrator	Regulation
18sr RNA	P0	15,26421	0,118014	15,323217	0	0	stand
18sr RNA	P0	15,382224					
18sr RNA	P8	15,982721	0,933439	16,4494405	0	0	stand
18sr RNA	P8	16,91616					
18sr RNA	P16	16,831522	1,474699	17,5688715	0	0	stand
18sr RNA	P16	18,306221					
18sr RNA	P21	14,247793	0,171656	14,333621	0	0	stand
18sr RNA	P21	14,419449					
18sr RNA	P30	18,207138	0,082933	18,2486045	0	0	stand
18sr RNA	P30	18,290071					
18sr RNA	P60	17,451971	0,100391	17,5021665	0	0	stand
18sr RNA	P60	17,552362					
Pin1	P0	29,521025	0,762108	29,139971	13,816754	0	1
Pin1	P0	28,758917					
Pin1	P8	28,399652	0,703081	28,0481115	11,598671	-2,218083	4,652747837
Pin1	P8	27,696571					
Pin1	P16	31,539639	1,364832	30,857223	13,2883515	-0,5284025	1,442331214
Pin1	P16	30,174807					
Pin1	P21	27,64892	0,082888	27,690364	13,356743	-0,460011	1,375552306
Pin1	P21	27,731808					
Pin1	P30	30,0694	0,43436	29,85222	11,6036155	-2,2131385	4,636828926
Pin1	P30	29,63504					
Pin1	P60	30,26964	0,49828	30,0205	12,5183335	-1,2984205	2,459594524
Pin1	P60	29,77136					
TraX	P0	27,09392	0,152745	27,0175475	11,6943305	0	1
TraX	P0	26,941175					
TraX	P8	27,679684	0,035008	27,66218	11,2127395	-0,481591	1,396282634
TraX	P8	27,644676					
TraX	P16	29,954556	0,18011	29,864501	12,2956295	0,601299	0,659160181
TraX	P16	29,774446					
TraX	P21	25,578629	0,085392	25,535933	11,202312	-0,4920185	1,406411235
TraX	P21	25,493237					
TraX	P30	27,424067	0,229264	27,309435	9,0608305	-2,6335	6,20529587
TraX	P30	27,194803					
TraX	P60	26,54315	0,156572	26,464864	8,9626975	-2,731633	6,642070335
TraX	P60	26,386578					

Tab. 8: Rohdaten der ersten Pin1 und Trax Expressionsanalyse

Gen	Alst	ct-Wert	Delta	MW	ct(t)-ct(e)	Kalibrator	Rgulation
18sr RNA	P0	18,76557	0,18016	18,67549	0	0	stand
18sr RNA	P0	18,58541					
18sr RNA	P8	20,527487	1,094025	19,9804745	0	0	stand
18sr RNA	P8	19,433462					
18sr RNA	P16	21,832905	1,490608	21,087601	0	0	stand
18sr RNA	P16	20,342297					
18sr RNA	P21	17,444948	0,164997	17,3624495	0	0	stand
18sr RNA	P21	17,279951					
18sr RNA	P30	21,970966	0,200514	21,870709	0	0	stand
18sr RNA	P30	21,770452					
18sr RNA	P60	21,116463	0,239416	20,996755	0	0	stand
18sr RNA	P60	20,877047					
Pin1	P0	31,644644	0,767979	31,2606545	12,5851645	0	1
Pin1	P0	30,876665					
Pin1	P8	30,619537	0,756723	30,2411755	10,260701	-2,3244635	5,00879477
Pin1	P8	29,862814					
Pin1	P16	33,765476	1,487262	33,021845	11,934244	-0,6509205	1,57016971
Pin1	P16	32,278214					
Pin1	P21	29,926966	0,025866	29,914033	12,5515835	-0,033581	1,02354959
Pin1	P21	29,9011					
Pin1	P30	32,300323	0,463703	32,0684715	10,1977625	-2,387402	5,2321431
Pin1	P30	31,83662					
Pin1	P60	32,440628	0,51235	32,184453	11,187698	-1,3974665	2,63438554
Pin1	P60	31,928278					
TraX	P0	27,9327	0,226539	27,8194305	9,1439405	0	1
TraX	P0	27,706161					
TraX	P8	28,467587	0,069609	28,4327825	8,452308	-0,6916325	1,61511008
TraX	P8	28,397978					
TraX	P16	30,564682	0,181438	30,655401	9,5678	0,4238595	0,74542778
TraX	P16	30,74612					
TraX	P21	26,400322	0,097849	26,3513975	8,988948	-0,1549925	1,11341583
TraX	P21	26,302473					
TraX	P30	28,21526	0,256766	28,086877	6,216168	-2,9277725	7,60934619
TraX	P30	27,958494					
TraX	P60	27,280071	0,163658	27,198242	6,201487	-2,9424535	7,68717494
TraX	P60	27,116413					

Tab. 9: Rohdaten der zweiten Pin1 und Trax Expressionsanalyse

6.2.1 Sequenzierung mit Reverse-Primer (Kapitel 3.8)



6.3 Verwendete Längenmarker

6.3.1 Längenmarker bei den proteomischen Untersuchungen

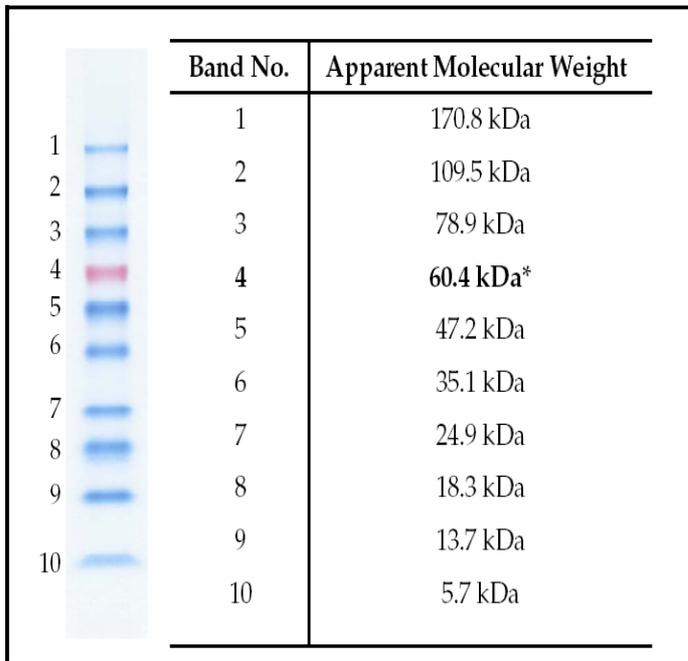


Abb. 32 BenchMark® pre-stained (Kapitel 2.4.1.1)

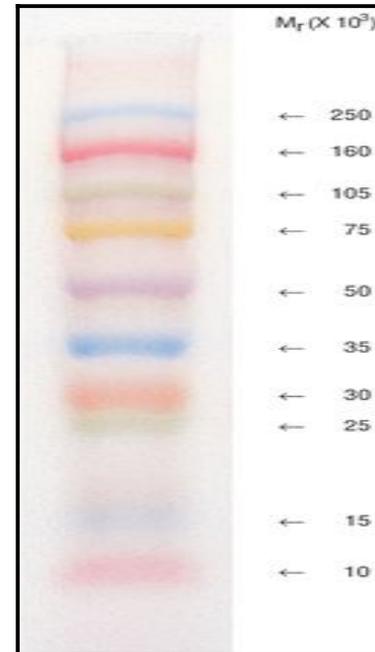


Abb. 33 Rainbow-Marker® (Kapitel 2.4.1.1)

6.3.2 Längenmarker bei den molekularbiologischen Untersuchungen

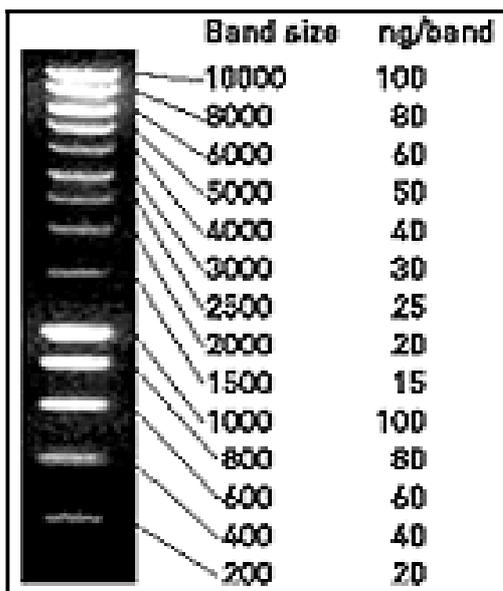


Abb. 34: Smart Ladder® (Kapitel 2.5.1)

7. Literatur

- Aigner, L., Arber, S., Kapfhammer, J.P., Laux, T., Schneider, C., Botteri, F., Brenner, H.R. & Caroni, P. 1995, "Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice", *Cell*, vol. 83, no. 2, pp. 269-278.
- Aigner, L. & Caroni, P. 1995, "Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43-depleted growth cones", *The Journal of cell biology*, vol. 128, no. 4, pp. 647-660.
- Alexander, K.A., Cimler, B.M., Meier, K.E. & Storm, D.R. 1987, "Regulation of calmodulin binding to P-57. A neurospecific calmodulin binding protein", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 13, pp. 6108-6113.
- Alexiades, M.R. & Cepko, C.L. 1997, "Subsets of retinal progenitors display temporally regulated and distinct biases in the fates of their progeny", *Development*, vol. 124, no. 6, pp. 1119-1131.
- Allendoerfer, K.L., Cabelli, R.J., Escandon, E., Kaplan, D.R., Nikolics, K. & Shatz, C.J. 1994, "Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 14, no. 3 Pt 2, pp. 1795-1811.
- Altmann, C.R. & Brivanlou, A.H. 2001, "Neural patterning in the vertebrate embryo", *International review of cytology*, vol. 203, pp. 447-482.
- Amano, S., Scott, I.C., Takahara, K., Koch, M., Champliand, M.F., Gerecke, D.R., Keene, D.R., Hudson, D.L., Nishiyama, T., Lee, S., Greenspan, D.S. & Burgeson, R.E. 2000, "Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma 2 chain", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 30, pp. 22728-22735.
- Ammermuller, J., Mockel, W. & Rujan, P. 1993, "A geometrical description of horizontal cell networks in the turtle retina", *Brain Research*, vol. 616, no. 1-2, pp. 351-356.
- Aoki, K., Ishida, R. & Kasai, M. 1997, "Isolation and characterization of a cDNA encoding a Translin-like protein, TRAX", *FEBS letters*, vol. 401, no. 2-3, pp. 109-112.
- Apel, E.D., Byford, M.F., Au, D., Walsh, K.A. & Storm, D.R. 1990, "Identification of the protein kinase C phosphorylation site in neuromodulin", *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, vol. 29, no. 9, pp. 2330-2335.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J. 1999, "Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development", *Science*, vol. 284, no. 5415, pp. 770-776.
- Ary-Pires, R., Nakatani, M., Rehen, S.K. & Linden, R. 1997, "Developmentally regulated release of intraretinal neurotrophic factors in vitro", *International journal of developmental*

- neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, vol. 15, no. 2, pp. 239-255.
- Ashery-Padan, R. & Gruss, P. 2001, "Pax6 lights-up the way for eye development", *Current opinion in cell biology*, vol. 13, no. 6, pp. 706-714.
- Atkinson, J., Panni, M.K. & Lund, R.D. 1999, "Effects of neurotrophins on embryonic retinal outgrowth", *Brain research. Developmental brain research*, vol. 112, no. 2, pp. 173-180.
- Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M. & Kageyama, R. 2000, "The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation", *Development (Cambridge, England)*, vol. 127, no. 13, pp. 2933-2943.
- Bahr, M., Vanselow, J. & Thanos, S. 1988, "In vitro regeneration of adult rat ganglion cell axons from retinal explants", *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, vol. 73, no. 2, pp. 393-401.
- Baker, S.E., Hopkinson, S.B., Fitchmun, M., Andreason, G.L., Frasier, F., Plopper, G., Quaranta, V. & Jones, J.C. 1996, "Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly", *Journal of cell science*, vol. 109 (Pt 10), no. Pt 10, pp. 2509-2520.
- Bandtlow, C.E. 2003, "Regeneration in the central nervous system", *Experimental gerontology*, vol. 38, no. 1-2, pp. 79-86.
- Bandtlow, C.E. & Loschinger, J. 1997, "Developmental changes in neuronal responsiveness to the CNS myelin-associated neurite growth inhibitor NI-35/250", *The European journal of neuroscience*, vol. 9, no. 12, pp. 2743-2752.
- Barbacid, M. 1994, "The Trk family of neurotrophin receptors", *Journal of neurobiology*, vol. 25, no. 11, pp. 1386-1403.
- Barde, Y.A., Edgar, D. & Thoenen, H. 1982, "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain", *The EMBO journal*, vol. 1, no. 5, pp. 549-553.
- Bassell, G.J., Powers, C.M., Taneja, K.L. & Singer, R.H. 1994, "Single mRNAs visualized by ultrastructural in situ hybridization are principally localized at actin filament intersections in fibroblasts", *The Journal of cell biology*, vol. 126, no. 4, pp. 863-876.
- Bear, M.F., Schmechel, D.E. & Ebner, F.F. 1985, "Glutamic acid decarboxylase in the striate cortex of normal and monocularly deprived kittens", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 5, no. 5, pp. 1262-1275.
- Belecky-Adams, T. & Adler, R. 2001, "Developmental expression patterns of bone morphogenetic proteins, receptors, and binding proteins in the chick retina", *The Journal of comparative neurology*, vol. 430, no. 4, pp. 562-572.
- Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.-., Ploder, L., McInnes, R.R., Sundin, O. & Adler, R. 1997, "Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 38, no. 7, pp. 1293-1303.

- Belliveau, M.J. & Cepko, C.L. 1999, "Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina", *Development (Cambridge, England)*, vol. 126, no. 3, pp. 555-566.
- Benowitz, L.I., Goldberg, D.E. & Irwin, N. 2002, "Inosine stimulates axon growth in vitro and in the adult CNS", *Progress in brain research*, vol. 137, pp. 389-399.
- Benowitz, L.I. & Routtenberg, A. 1997, "GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity", *Trends in neurosciences*, vol. 20, no. 2, pp. 84-91.
- Berciano, M.T., Villagra, N.T., Ojeda, J.L., Navascues, J., Gomes, A., Lafarga, M. & Carmo-Fonseca, M. 2004, "Oculopharyngeal muscular dystrophy-like nuclear inclusions are present in normal magnocellular neurosecretory neurons of the hypothalamus", *Human molecular genetics*, vol. 13, no. 8, pp. 829-838.
- Berkelaar, M. et al. 1994. "Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14/7, 4368-4374.
- Bernier, I. & Jolles, P. 1984, "Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 790, no. 2, pp. 174-181.
- Bernier, I., Tresca, J.P. & Jolles, P. 1986, "Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 871, no. 1, pp. 19-23.
- Berry, M. 1982, "Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: an hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian central nervous system", *Bibliotheca anatomica*, vol. (23), no. 23, pp. 1-11.
- Bisby, M.A. & Tetzlaff, W. 1992, "Changes in cytoskeletal protein synthesis following axon injury and during axon regeneration", *Molecular neurobiology*, vol. 6, no. 2-3, pp. 107-123.
- Blanks, J.C., Adinolfi, A.M. & Lolley, R.N. 1974, "Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina", *The Journal of comparative neurology*, vol. 156, no. 1, pp. 81-93.
- Blobel, G. 1973, "A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 70, no. 3, pp. 924-928.
- Bodnarenko, S.R., Jeyarasasingam, G. & Chalupa, L.M. 1995, "Development and regulation of dendritic stratification in retinal ganglion cells by glutamate-mediated afferent activity", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 15, no. 11, pp. 7037-7045.
- Bradford, M.M. 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254.
- Braekevelt, C.R. & Hollenberg, M.J. 1970, "The development of the retina of the albino rat", *The American Journal of Anatomy*, vol. 127, no. 3, pp. 281-301.
- Brittis, P.A., Canning, D.R. & Silver, J. 1992, "Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina", *Science*, vol. 255, no. 5045, pp. 733-736.

- Broadwell, R.D. & Balin, B.J. 1985, "Endocytic and exocytic pathways of the neuronal secretory process and trans-synaptic transfer of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase in vivo", *The Journal of comparative neurology*, vol. 242, no. 4, pp. 632-650.
- Brown, N.L., Patel, S., Brzezinski, J. & Glaser, T. 2001, "Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation", *Development (Cambridge, England)*, vol. 128, no. 13, pp. 2497-2508.
- Bumsted, K., Jasoni, C., Szél, A. & Hendrickson, A. 1997, "Spatial and temporal expression of cone opsins during monkey retinal development", *Journal of Comparative Neurology*, vol. 378, no. 1, pp. 117-134.
- Burden-Gulley, S.M., Pendergast, M. & Lemmon, V. 1997, "The role of cell adhesion molecule L1 in axonal extension, growth cone motility, and signal transduction", *Cell and tissue research*, vol. 290, no. 2, pp. 415-422.
- Burgin, K.E., Waxham, M.N., Rickling, S., Westgate, S.A., Mobley, W.C. & Kelly, P.T. 1990, "In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 10, no. 6, pp. 1788-1798.
- Burmeister, M., Novak, J., Liang, M.-., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N.L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V.I., Roderick, T.H., Taylor, B.A., Hankin, M.H. & McInnes, R.R. 1996, "Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: Impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation", *Nature Genetics*, vol. 12, no. 4, pp. 376-384.
- Busby, T.F. & Ingham, K.C. 1990, "NH₂-terminal calcium-binding domain of human complement C1s- mediates the interaction of C1r- with C1q", *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, vol. 29, no. 19, pp. 4613-4618.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B.S. & Filbin, M.T. 2001, "Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 21, no. 13, pp. 4731-4739.
- Cai, D., Yingjing, S., De Bellard, M.E., Tang, S. & Filbin, M.T. 1999, "Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism", *Neuron*, vol. 22, no. 1, pp. 89-101.
- Calado, A., Tome, F.M., Brais, B., Rouleau, G.A., Kuhn, U., Wahle, E. & Carmo-Fonseca, M. 2000, "Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA", *Human molecular genetics*, vol. 9, no. 15, pp. 2321-2328.
- Cann, G.M., Bradshaw, A.D., Gervin, D.B., Hunter, A.W. & Clegg, D.O. 1996, "Widespread expression of beta1 integrins in the developing chick retina: evidence for a role in migration of retinal ganglion cells", *Developmental biology*, vol. 180, no. 1, pp. 82-96.
- Cantalops, I., Haas, K. & Cline, H.T. 2000, "Postsynaptic CPG15 promotes synaptic maturation and presynaptic axon arbor elaboration in vivo", *Nature neuroscience*, vol. 3, no. 10, pp. 1004-1011.
- Caponigro, G. & Parker, R. 1996, "Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiological reviews*, vol. 60, no. 1, pp. 233-249.

- Carmignoto, G., Maffei, L., Candeo, P., Canella, R. & Comelli, C. 1989, "Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 9, no. 4, pp. 1263-1272.
- Caroni, P. & Schwab, M.E. 1988, "Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading", *The Journal of cell biology*, vol. 106, no. 4, pp. 1281-1288.
- Cavusoglu, N., Thierse, D., Mohand-Said, S., Chalmel, F., Poch, O., Van-Dorsseleer, A., Sahel, J.A. & Leveillard, T. 2003, "Differential proteomic analysis of the mouse retina: the induction of crystallin proteins by retinal degeneration in the rd1 mouse", *Mol.Cell.Proteomics*, vol. 2, no. 8, pp. 494-505.
- Cellerino, A., Pinzon-Duarte, G., Carroll, P. & Kohler, K. 1998, "Brain-derived neurotrophic factor modulates the development of the dopaminergic network in the rodent retina", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 18, no. 9, pp. 3351-3362.
- Cepko, C.L. 1999, "The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates", *Current opinion in neurobiology*, vol. 9, no. 1, pp. 37-46.
- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M. & Ezzeddine, D. 1996, "Cell fate determination in the vertebrate retina", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 2, pp. 589-595.
- Chandrasekaran, V., Zhai, Y., Wagner, M., Kaplan, P.L., Napoli, J.L. & Higgins, D. 2000, "Retinoic acid regulates the morphological development of sympathetic neurons", *Journal of neurobiology*, vol. 42, no. 4, pp. 383-393.
- Chao, M.V. 1994, "The p75 neurotrophin receptor", *Journal of neurobiology*, vol. 25, no. 11, pp. 1373-1385.
- Chen, D.F., Schneider, G.E., Martinou, J.C. & Tonegawa, S. 1997, "Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS", *Nature*, vol. 385, no. 6615, pp. 434-439.
- Cheng, L., Sapienza, P., Kittlerova, P., Hauswirth, W.W. & Di Polo, A. 2002, "TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 10, pp. 3977-3986.
- Chiaromello, A., Neuman, T., Peavy, D.R. & Zuber, M.X. 1996, "The GAP-43 gene is a direct downstream target of the basic helix-loop-helix transcription factors", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 36, pp. 22035-22043.
- Childs, S.R. & O'Connor, M.B. 1994, "Two domains of the tolloid protein contribute to its unusual genetic interaction with decapentaplegic", *Developmental biology*, vol. 162, no. 1, pp. 209-220.
- Chin, S.S. & Liem, R.K. 1990, "Transfected rat high-molecular-weight neurofilament (NF-H) coassembles with vimentin in a predominantly nonphosphorylated form", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 10, no. 11, pp. 3714-3726.

- Chin, S.S. & Liem, R.K. 1989, "Expression of rat neurofilament proteins NF-L and NF-M in transfected non-neuronal cells", *European journal of cell biology*, vol. 50, no. 2, pp. 475-490.
- Cobb, B.A. & Petrash, J.M. 2002, "alpha-Crystallin chaperone-like activity and membrane binding in age-related cataracts", *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, vol. 41, no. 2, pp. 483-490.
- Cook, J.E. & Chalupa, L.M. 2000/1/1, "Retinal mosaics: new insights into an old concept", *Trends in Neurosciences*, vol. 23, no. 1, pp. 26-34.
- Corvetti, L., Capsoni, S., Cattaneo, A. & Domenici, L. 2003, "Postnatal development of GFAP in mouse visual cortex is not affected by light deprivation", *Glia*, vol. 41, no. 4, pp. 404-414.
- Cui, Q. & Harvey, A.R. 1995, "At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 15, no. 12, pp. 8143-8155.
- D'Alessandri, L., Ranscht, B., Winterhalter, K.H. & Vaughan, L. 1995, "Contactin/F11 and tenascin-C co-expression in the chick retina correlates with formation of the synaptic plexiform layers", *Current eye research*, vol. 14, no. 10, pp. 911-926.
- Dautigny, A., Pham-Dinh, D., Roussel, C., Felix, J.M., Nussbaum, J.L. & Jolles, P. 1988, "The large neurofilament subunit (NF-H) of the rat: cDNA cloning and in situ detection", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 154, no. 3, pp. 1099-1106.
- Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R. & Bradley, A. 1993, "A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice", *Genes & development*, vol. 7, no. 4, pp. 671-682.
- de Graan, P.N., van Hooff, C.O., Tilly, B.C., Oestreicher, A.B., Schotman, P. & Gispen, W.H. 1985, "Phosphoprotein B-50 in nerve growth cones from fetal rat brain", *Neuroscience letters*, vol. 61, no. 3, pp. 235-241.
- de la Rosa, E.J., Arribas, A., Frade, J.M. & Rodriguez-Tebar, A. 1994, "Role of neurotrophins in the control of neural development: neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells", *Neuroscience*, vol. 58, no. 2, pp. 347-352.
- Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M. & Sretavan, D.W. 1997, "Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia", *Neuron*, vol. 19, no. 3, pp. 575-589.
- Dent, E. W.; K. F. Meiri. 1998. "Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior." *Journal of neurobiology* 35/3, 287-299.
- Deretic, D., Aebersold, R.H., Morrison, H.D. & Papermaster, D.S. 1994, "Alpha A- and alpha B-crystallin in the retina. Association with the post-Golgi compartment of frog retinal photoreceptors", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 24, pp. 16853-16861.
- Derham, B.K. & Harding, J.J. 1999, "Alpha-crystallin as a molecular chaperone", *Progress in retinal and eye research*, vol. 18, no. 4, pp. 463-509.

- Dezawa, M., Takano, M., Negishi, H., Mo, X., Oshitari, T. & Sawada, H. 2002, "Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: A new approach", *Micron*, vol. 33, no. 1, pp. 1-6.
- Didier, M., Bursztajn, S., Adamec, E., Passani, L., Nixon, R.A., Coyle, J.T., Wei, J.Y. & Berman, S.A. 1996, "DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal cultures", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 16, no. 7, pp. 2238-2250.
- Domeniconi, M., Cao, Z., Spencer, T., Sivasankaran, R., Wang, K., Nikulina, E., Kimura, N., Cai, H., Deng, K., Gao, Y., He, Z. & Filbin, M. 2002, "Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth", *Neuron*, vol. 35, no. 2, pp. 283-290.
- Domeniconi, M. & Filbin, M.T. 2005, "Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration", *Journal of the neurological sciences*, vol. 233, no. 1-2, pp. 43-47.
- Dong, J.-., Fan, P.-. & Frizzell, R.A. 1996, "Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus", *Human Gene Therapy*, vol. 7, no. 17, pp. 2101-2112.
- Donovan, S.L. & Dyer, M.A. 2004, "Developmental defects in Rb-deficient retinæ", *Vision research*, vol. 44, no. 28, pp. 3323-3333.
- Doster, S.K., Lozano, A.M., Aguayo, A.J. & Willard, M.B. 1991, "Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury", *Neuron*, vol. 6, no. 4, pp. 635-647.
- Dougherty, K.D., Dreyfus, C.F. & Black, I.B. 2000, "Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury", *Neurobiology of disease*, vol. 7, no. 6 Pt B, pp. 574-585.
- Douglas, J.L. & Quinlan, M.P. 1995, "Efficient nuclear localization and immortalizing ability, two functions dependent on the adenovirus type 5 (Ad5) E1A second exon, are necessary for cotransformation with Ad5 E1B but not with T24ras", *Journal of virology*, vol. 69, no. 12, pp. 8061-8065.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M. & Bonhoeffer, F. 1995, "In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases", *Cell*, vol. 82, no. 3, pp. 359-370.
- Eglen, S.J., van Ooyen, A. & Willshaw, D.J. 2000, "Lateral cell movement driven by dendritic interactions is sufficient to form retinal mosaics.", *Network (Bristol, England)*, vol. 11, no. 1, pp. 103-118.
- Elisha, Z., Havin, L., Ringel, I. & Yisraeli, J.K. 1995, "Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes", *The EMBO journal*, vol. 14, no. 20, pp. 5109-5114.
- Erdemir, T., Bilican, B., Oncel, D., Goding, C.R. & Yavuzer, U. 2002, "DNA damage-dependent interaction of the nuclear matrix protein C1D with Translin-associated factor X (TRAX)", *Journal of cell science*, vol. 115, no. Pt 1, pp. 207-216.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. & Hancock, D.C. 1992, "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein", *Cell*, vol. 69, no. 1, pp. 119-128.

- Eysel, U.T., Peichl, L. & Wassle, H. 1985, "Dendritic plasticity in the early postnatal feline retina: quantitative characteristics and sensitive period", *The Journal of comparative neurology*, vol. 242, no. 1, pp. 134-145.
- Ezzeddine, Z.D., Yang, X., DeChiara, T., Yancopoulos, G. & Cepko, C.L. 1997, "Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina", *Development (Cambridge, England)*, vol. 124, no. 5, pp. 1055-1067.
- Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N., Domenici, L. & Maffei, L. 1994, "Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation", *Vision research*, vol. 34, no. 6, pp. 709-720.
- Fan, X., Dion, P., Laganieri, J., Brais, B. & Rouleau, G.A. 2001, "Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death", *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 21, pp. 2341-2351.
- Fawcett, J.W. 1997, "Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system", *Cell and tissue research*, vol. 290, no. 2, pp. 371-377.
- Filbin, M.T. 1995, "Myelin-associated glycoprotein: a role in myelination and in the inhibition of axonal regeneration?", *Current opinion in neurobiology*, vol. 5, no. 5, pp. 588-595.
- Finelli, A.L., Bossie, C.A., Xie, T. & Padgett, R.W. 1994, "Mutational analysis of the Drosophila tolloid gene, a human BMP-1 homolog", *Development (Cambridge, England)*, vol. 120, no. 4, pp. 861-870.
- Finelli, A.L., Xie, T., Bossie, C.A., Blackman, R.K. & Padgett, R.W. 1995, "The tolkin gene is a tolloid/BMP-1 homologue that is essential for Drosophila development", *Genetics*, vol. 141, no. 1, pp. 271-281.
- Finkenstadt, P.M., Jeon, M. & Baraban, J.M. 2001, "Masking of the Translin/Trax complex by endogenous RNA", *FEBS letters*, vol. 498, no. 1, pp. 6-10.
- Finkenstadt, P.M., Kang, W.S., Jeon, M., Taira, E., Tang, W. & Baraban, J.M. 2000, "Somatodendritic localization of Translin, a component of the Translin/Trax RNA binding complex", *Journal of neurochemistry*, vol. 75, no. 4, pp. 1754-1762.
- Fiorella, P.D., Giguere, V. & Napoli, J.L. 1993, "Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in Escherichia coli. Characterization and comparison to cellular retinoic acid-binding protein (type I)", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 29, pp. 21545-21552.
- Fiorella, P.D. & Napoli, J.L. 1994, "Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 14, pp. 10538-10544.
- Fischer, D., Heiduschka, P. & Thanos, S. 2001, "Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats", *Experimental neurology*, vol. 172, no. 2, pp. 257-272.
- Fischer, D., Pavlidis, M. & Thanos, S. 2000, "Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture", *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 41, no. 12, pp. 3943-3954.

- Fisher, L.J. 1979, "Development of synaptic arrays in the inner plexiform layer of neonatal mouse retina", *The Journal of comparative neurology*, vol. 187, no. 2, pp. 359-372.
- Ford-Holevinski, T.S., Hopkins, J.M., McCoy, J.P. & Agranoff, B.W. 1986, "Laminin supports neurite outgrowth from explants of axotomized adult rat retinal neurons", *Brain research*, vol. 393, no. 1, pp. 121-126.
- Fournier, A.E., GrandPre, T. & Strittmatter, S.M. 2001, "Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration", *Nature*, vol. 409, no. 6818, pp. 341-346.
- Frade, J.M., Bovolenta, P., Martinez-Morales, J.R., Arribas, A., Barbas, J.A. & Rodriguez-Tebar, A. 1997, "Control of early cell death by BDNF in the chick retina", *Development (Cambridge, England)*, vol. 124, no. 17, pp. 3313-3320.
- Francisco-Morcillo, J., Hidalgo-Sanchez, M. & Martin-Partido, G. 2004, "Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle", *Anatomy and Embryology*, vol. 208, no. 4, pp. 289-299.
- Frayne, J., Ingram, C., Love, S. & Hall, L. 1999, "Localisation of phosphatidylethanolamine-binding protein in the brain and other tissues of the rat", *Cell and tissue research*, vol. 298, no. 3, pp. 415-423.
- Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C. & Caroni, P. 2000, "Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity", *The Journal of cell biology*, vol. 149, no. 7, pp. 1443-1454.
- Furuta, Y. & Hogan, B.L. 1998, "BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo", *Genes & development*, vol. 12, no. 23, pp. 3764-3775.
- Gabbott, P.L., Stewart, M.G. & Rose, S.P. 1986, "The quantitative effects of dark-rearing and light exposure on the laminar composition and depth distribution of neurons and glia in the visual cortex (area 17) of the rat", *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, vol. 64, no. 1, pp. 225-232.
- Gall CM, Gold SJ, Isackson PJ, Seroogy KB (1992) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs are expressed in the ventral midbrain regions containing dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 3: 56-63
- Galli-Resta, L. 2000, "Local, possibly contact-mediated signalling restricted to homotypic neurons controls the regular spacing of cells within the cholinergic arrays in the developing rodent retina", *Development (Cambridge, England)*, vol. 127, no. 7, pp. 1509-1516.
- Galli-Resta, L., Novelli, E., Kryger, Z., Jacobs, G.H. & Reese, B.E. 1999, "Modelling the mosaic organization of rod and cone photoreceptors with a minimal-spacing rule", *The European journal of neuroscience*, vol. 11, no. 4, pp. 1461-1469.
- Galli-Resta, L., Novelli, E. & Viegi, A. 2002, "Dynamic microtubule-dependent interactions position homotypic neurones in regular monolayered arrays during retinal development", *Development*, vol. 129, no. 16, pp. 3803-3814.
- Galli-Resta, L., Resta, G., Tan, S.-. & Reese, B.E. 1997, "Mosaics of Islet-1-expressing amacrine cells assembled by short-range cellular interactions", *Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 20, pp. 7831-7838.

- Gamby, C., Waage, M.C., Allen, R.G. & Baizer, L. 1996, "Analysis of the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 43, pp. 26698-26705.
- Gan, L., Xiang, M., Zhou, L., Wagner, D.S., Klein, W.H. & Nathans, J. 1996, "POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 9, pp. 3920-3925.
- Garcia-Valenzuela, E., Rayanade, R., Perales, J.C., Davidson, C.A., Hanson, R.W. & Sharma, S.C. 1997, "Axon-mediated gene transfer of retinal ganglion cells in vivo", *Journal of neurobiology*, vol. 32, no. 1, pp. 111-122.
- Gaub, M.-., Lutz, Y., Ghyselinck, N.B., Scheuer, I., Pfister, V., Chambon, P. & Rochette-Egly, C. 1998, "Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies", *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 46, no. 10, pp. 1103-1111.
- Gehring, W.J. & Ikeo, K. 1999, "Pax 6: Mastering eye morphogenesis and eye evolution", *Trends in Genetics*, vol. 15, no. 9, pp. 371-377.
- Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N. & Gansmüller, A. 1998, "Essential role of $\alpha 6$ integrins in cortical and retinal lamination", *Current Biology*, vol. 8, no. 17, pp. 983-986.
- Goldberg, J.L., Klassen, M.P., Hua, Y. & Barres, B.A. 2002, "Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells", *Science*, vol. 296, no. 5574, pp. 1860-1864.
- Goodman, C.S. 1996, "Mechanisms and molecules that control growth cone guidance", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 19, pp. 341-377.
- Goodman, C.S. & Shatz, C.J. 1993, "Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity", *Cell*, vol. 72 Suppl, pp. 77-98.
- GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T. & Strittmatter, S.M. 2000, "Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein", *Nature*, vol. 403, no. 6768, pp. 439-444.
- Greene, L.A. & Kaplan, D.R. 1995, "Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors", *Current opinion in neurobiology*, vol. 5, no. 5, pp. 579-587.
- Gregory, M.A. & Hann, S.R. 2000, "c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells", *Molecular and cellular biology*, vol. 20, no. 7, pp. 2423-2435.
- Grindley, J.C., Davidson, D.R. & Hill, R.E. 1995, "The role of Pax-6 in eye and nasal development", *Development*, vol. 121, no. 5, pp. 1433-1442.
- Guillemot, F. 1999, "Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates", *Experimental Cell Research*, vol. 253, no. 2, pp. 357-364.
- Gunhan, E., Choudary, P.V., Landerholm, T.E. & Chalupa, L.M. 2002, "Depletion of cholinergic amacrine cells by a novel immunotoxin does not perturb the formation of segregated on and off cone bipolar cell projections", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 6, pp. 2265-2273.

- Guy, J., Qi, X., Muzyczka, N. & Hauswirth, W.W. 1999, "Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve", *Archives of Ophthalmology*, vol. 117, no. 7, pp. 929-937.
- Habib, A.A., Marton, L.S., Allwardt, B., Gulcher, J.R., Mikol, D.D., Hognason, T., Chattopadhyay, N. & Stefansson, K. 1998, "Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system", *Journal of neurochemistry*, vol. 70, no. 4, pp. 1704-1711.
- Han, J.R., Gu, W. & Hecht, N.B. 1995, "Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs", *Biology of reproduction*, vol. 53, no. 3, pp. 707-717.
- Hanson, S.R., Hasan, A., Smith, D.L. & Smith, J.B. 2000, "The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage", *Experimental eye research*, vol. 71, no. 2, pp. 195-207.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. & Kageyama, R. 2001, "Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type", *Development*, vol. 128, no. 8, pp. 1313-1322.
- Hatten, M.E. 1999, "Central nervous system neuronal migration", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 22, pp. 511-539.
- Henion, P.D. & Weston, J.A. 1994, "Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations", *Developmental biology*, vol. 161, no. 1, pp. 243-250.
- Hermonat, P.L., Quirk, J.G., Bishop, B.M. & Han, L. 1997, "The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors", *FEBS Letters*, vol. 407, no. 1, pp. 78-84.
- Hesketh, J.E. 1996, "Sorting of messenger RNAs in the cytoplasm: mRNA localization and the cytoskeleton", *Experimental cell research*, vol. 225, no. 2, pp. 219-236.
- Hinds, J.W. & Hinds, P.L. 1979, "Differentiation of photoreceptors and horizontal cells in the embryonic mouse retina: an electron microscopic, serial section analysis", *The Journal of comparative neurology*, vol. 187, no. 3, pp. 495-511.
- Hoffman, P.N. & Lasek, R.J. 1975, "The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons", *The Journal of cell biology*, vol. 66, no. 2, pp. 351-366.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K. & Barde, Y.A. 1990, "Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family", *Nature*, vol. 344, no. 6264, pp. 339-341.
- Holtmaat, A.J., Dijkhuizen, P.A., Oestreicher, A.B., Romijn, H.J., Van der Lugt, N.M., Berns, A., Margolis, F.L., Gispén, W.H. & Verhaagen, J. 1995, "Directed expression of the growth-associated protein B-50/GAP-43 to olfactory neurons in transgenic mice results in changes in axon morphology and extraglomerular fiber growth", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 15, no. 12, pp. 7953-7965.

- Holzer, M., Gartner, U., Stobe, A., Hartig, W., Gruschka, H., Bruckner, M.K. & Arendt, T. 2002, "Inverse association of Pin1 and tau accumulation in Alzheimer's disease hippocampus", *Acta Neuropathologica*, vol. 104, no. 5, pp. 471-481.
- Horsburgh, G.M. & Sefton, A.J. 1987, "Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat", *Journal of Comparative Neurology*, vol. 263, no. 4, pp. 553-566.
- Horsburgh, G.M. & Sefton, A.J. 1986, "The early development of the optic nerve and chiasm in embryonic rat", *The Journal of comparative neurology*, vol. 243, no. 4, pp. 547-560.
- Horwitz, J. 1992, "Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 21, pp. 10449-10453.
- Hu, M. & Easter S.S., J. 1999, "Retinal neurogenesis: The formation of the initial central patch of postmitotic cells", *Developmental Biology*, vol. 207, no. 2, pp. 309-321.
- Hubel, D.H. & Wiesel, T.N. 1973, "A re-examination of stereoscopic mechanisms in area 17 of the cat", *The Journal of physiology*, vol. 232, no. 1, pp. 29P-30P.
- Hubel, D.H. & Wiesel, T.N. 1970, "The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens", *The Journal of physiology*, vol. 206, no. 2, pp. 419-436.
- Huber, A.B., Weinmann, O., Brosamle, C., Oertle, T. & Schwab, M.E. 2002, "Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 9, pp. 3553-3567.
- Hung, F.C., Zhao, S., Chen, Q. & Overbeek, P.A. 2002, "Retinal ablation and altered lens differentiation induced by ocular overexpression of BMP7", *Vision research*, vol. 42, no. 4, pp. 427-438.
- Hunt, D., Mason, M.R., Campbell, G., Coffin, R. & Anderson, P.N. 2002, "Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 20, no. 4, pp. 537-552.
- Hunter, T. 1998, "Prolyl isomerases and nuclear function", *Cell*, vol. 92, no. 2, pp. 141-143.
- Husseman, J.W., Nochlin, D. & Vincent, I. 2000, "Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases", *Neurobiology of aging*, vol. 21, no. 6, pp. 815-828.
- Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J.E. & Kageyama, R. 2002, "Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina", *Development*, vol. 129, no. 4, pp. 831-842.
- Ip, N.Y., Ibanez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., 3rd & Squinto, S.P. 1992, "Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 7, pp. 3060-3064.

- Ishida, R., Okado, H., Sato, H., Shionoiri, C., Aoki, K. & Kasai, M. 2002, "A role for the octameric ring protein, Translin, in mitotic cell division", *FEBS letters*, vol. 525, no. 1-3, pp. 105-110.
- Ivins, K.J., Neve, K.A., Feller, D.J., Fidel, S.A. & Neve, R.L. 1993, "Antisense GAP-43 inhibits the evoked release of dopamine from PC12 cells", *Journal of neurochemistry*, vol. 60, no. 2, pp. 626-633.
- Jacobson, M. D.; M. Weil; M. C. Raff. 1997. "Programmed cell death in animal development." *Cell* 88/3, 347-354.
- Jensen, A.M. & Raff, M.C. 1997, "Continuous observation of multipotential retinal progenitor cells in clonal density culture", *Developmental Biology*, vol. 188, no. 2, pp. 267-279.
- Jiang, W. & Bond, J.S. 1992, "Families of metalloendopeptidases and their relationships", *FEBS letters*, vol. 312, no. 2-3, pp. 110-114.
- Jo, S.A., Wang, E. & Benowitz, L.I. 1999, "Ciliary neurotrophic factor is and axogenesis factor for retinal ganglion cells", *Neuroscience*, vol. 89, no. 2, pp. 579-591.
- Johnson, J.E., Barde, Y.A., Schwab, M. & Thoenen, H. 1986, "Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 6, no. 10, pp. 3031-3038.
- Johnson, A.R., Gregson, N.A., Wigley, C.B. & Berry, M. 1989, "The conditioning effect of optic nerve injury upon axonal regrowth from adult rat retinal ganglion cells explanted in vitro", *Neuroscience letters*, vol. 97, no. 1-2, pp. 63-68.
- Johnson, P.T., Raven, M.A. & Reese, B.E. 2001, "Disruption of transient photoreceptor targeting within the inner plexiform layer following early ablation of cholinergic amacrine cells in the ferret", *Visual neuroscience*, vol. 18, no. 5, pp. 741-751.
- Johnson, P.T., Williams, R.R., Cusato, K. & Reese, B.E. 1999, "Rods and cones project to the inner plexiform layer during development", *The Journal of comparative neurology*, vol. 414, no. 1, pp. 1-12.
- Jomary, C., Piper, T.A., Dickson, G., Couture, L.A., Smith, A.E., Neal, M.J. & Jones, S.E. 1994, "Adenovirus-mediated gene transfer to murine retinal cells in vitro and in vivo", *FEBS letters*, vol. 347, no. 2-3, pp. 117-122.
- Julien, J.P., Grosveld, F., Yazdanbaksh, K., Flavell, D., Meijer, D. & Mushynski, W. 1987, "The structure of a human neurofilament gene (NF-L): a unique exon-intron organization in the intermediate filament gene family", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 909, no. 1, pp. 10-20.
- Jung, M., Pesheva, P., Schachner, M. & Trotter, J. 1993, "Astrocytes and neurons regulate the expression of the neural recognition molecule janusin by cultured oligodendrocytes", *Glia*, vol. 9, no. 3, pp. 163-175.
- Kantorow, M. & Piatigorsky, J. 1994, "Alpha-crystallin/small heat shock protein has autokinase activity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 8, pp. 3112-3116.

- Kapfhammer, J.P., Christ, F. & Schwab, M.E. 1994, "The expression of GAP-43 and synaptophysin in the developing rat retina", *Brain research. Developmental brain research*, vol. 80, no. 1-2, pp. 251-260.
- Katz, L.C. & Shatz, C.J. 1996, "Synaptic activity and the construction of cortical circuits", *Science*, vol. 274, no. 5290, pp. 1133-1138.
- Kawasaki, A., Otori, Y. & Barnstable, C.J. 2000, "Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity", *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 41, no. 11, pp. 3444-3450.
- Kay, J.N., Roeser, T., Mumm, J.S., Godinho, L., Mrejeru, A., Wong, R.O. & Baier, H. 2004, "Transient requirement for ganglion cells during assembly of retinal synaptic layers", *Development (Cambridge, England)*, vol. 131, no. 6, pp. 1331-1342.
- Kelley, M.W., Turner, J.K. & Reh, T.A. 1995, "Regulation of proliferation and photoreceptor differentiation in fetal human retinal cell cultures", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 36, no. 7, pp. 1280-1289.
- Kelly, P.T., McGuinness, T.L. & Greengard, P. 1984, "Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, no. 3, pp. 945-949.
- Kennedy, M.B., Bennett, M.K. & Erondy, N.E. 1983, "Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, no. 23, pp. 7357-7361.
- Kobayashi, S., Takashima, A. & Anzai, K. 1998, "The dendritic translocation of translin protein in the form of BC1 RNA protein particles in developing rat hippocampal neurons in primary culture", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 253, no. 2, pp. 448-453.
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J.K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K. & Ogura, T. 2000, "Tbx5 and the retinotectum projection", *Science*, vol. 287, no. 5450, pp. 134-137.
- Kottis, V., Thibault, P., Mikol, D., Xiao, Z.C., Zhang, R., Dergham, P. & Braun, P.E. 2002, "Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth", *Journal of neurochemistry*, vol. 82, no. 6, pp. 1566-1569.
- Koyano-Nakagawa, N., Kim, J., Anderson, D. & Kintner, C. 2000, "Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation", *Development*, vol. 127, no. 19, pp. 4203-4216.
- Kuehn, M.J., Ogg, D.J., Kihlberg, J., Slonim, L.N., Flemmer, K., Bergfors, T. & Hultgren, S.J. 1993, "Structural basis of pilus subunit recognition by the PapD chaperone", *Science*, vol. 262, no. 5137, pp. 1234-1241.
- Kwon, Y.K. & Hecht, N.B. 1993, "Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation", *Molecular and cellular biology*, vol. 13, no. 10, pp. 6547-6557.

- La Vail, M.M., Rapaport, D.H. & Rakic, P. 1991, "Cytogenesis in the monkey retina", *The Journal of comparative neurology*, vol. 309, no. 1, pp. 86-114.
- Lambrecht, H.G. & Koch, K.W. 1992, "Recoverin, a novel calcium-binding protein from vertebrate photoreceptors", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1160, no. 1, pp. 63-66.
- Lee, M.M., Fink, B.D. & Grunwald, G.B. 1997, "Evidence that tyrosine phosphorylation regulates N-cadherin turnover during retinal development", *Developmental genetics*, vol. 20, no. 3, pp. 224-234.
- Lee, V.M., Goedert, M. & Trojanowski, J.Q. 2001, "Neurodegenerative tauopathies", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 24, pp. 1121-1159.
- Lee, W.C. & Nedivi, E. 2002, "Extended plasticity of visual cortex in dark-reared animals may result from prolonged expression of cpg15-like genes", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 5, pp. 1807-1815.
- Lein P, Drahusuk K, Higgins D (2002) Effects of bone morphogenetic proteins on neural tissues. In Vukicevic S & Sampath DT (eds), Bone Morphogenetic Proteins. Birkhauser-Verlag, Basel, pp. 289-319
- Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N. & Benowitz, L.I. 2000, "Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 12, pp. 4615-4626.
- Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P.U. 1968, "Nerve growth factor", *Physiological Reviews*, vol. 48, no. 3, pp. 534-569.
- Lewin, G.R. & Barde, Y.A. 1996, "Physiology of the neurotrophins", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 19, pp. 289-317.
- Li, Z. & Baraban, J.M. 2004, "High affinity binding of the Translin/Trax complex to RNA does not require the presence of Y or H elements", *Brain research. Molecular brain research*, vol. 120, no. 2, pp. 123-129.
- Liang, F.-., Aleman, T.S., Dejneka, N.S., Dudus, L., Fisher, K.J., Maguire, A.M., Jacobson, S.G. & Bennett, J. 2001, "Long-term protection of retinal structure but not function using rAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa", *Molecular Therapy*, vol. 4, no. 5, pp. 461-472.
- Lin, B., Wang, S.W. & Masland, R.H. 2004, "Retinal ganglion cell type, size, and spacing can be specified independent of homotypic dendritic contacts", *Neuron*, vol. 43, no. 4, pp. 475-485.
- Liou, Y.C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.X., Huang, H.K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T. & Lu, K.P. 2003, "Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration", *Nature*, vol. 424, no. 6948, pp. 556-561.
- Liu, J., Wilson, S. & Reh, T. 2003, "BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina", *Developmental biology*, vol. 256, no. 1, pp. 34-48.
- Liu, W., Mo, Z. & Xiang, M. 2001, "The Ath5 proneural genes function upstream of Brn3 POU domain transcription factor genes to promote retinal ganglion cell development", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 4, pp. 1649-1654.

- Liu, Y.C. & Storm, D.R. 1989, "Dephosphorylation of neuromodulin by calcineurin", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 22, pp. 12800-12804.
- Livesey, F.J. & Cepko, C.L. 2001, "Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina", *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 2, no. 2, pp. 109-118.
- Lohmann, C., Myhr, K.L. & Wong, R.O. 2002, "Transmitter-evoked local calcium release stabilizes developing dendrites", *Nature*, vol. 418, no. 6894, pp. 177-181.
- Lohmann, C. & Wong, R.O.L. 2001, "Cell-type specific dendritic contacts between retinal ganglion cells during development", *Journal of Neurobiology*, vol. 48, no. 2, pp. 150-162.
- Lu, K.P., Liou, Y.C. & Zhou, X.Z. 2002, "Pinning down proline-directed phosphorylation signaling", *Trends in cell biology*, vol. 12, no. 4, pp. 164-172.
- Lu, K.P., Hanes, S.D. & Hunter, T. 1996, "A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis", *Nature*, vol. 380, no. 6574, pp. 544-547.
- Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P. & Lu, K.P. 1999, "The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein", *Nature*, vol. 399, no. 6738, pp. 784-788.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A. & Karsenty, G. 1995, "BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning", *Genes & development*, vol. 9, no. 22, pp. 2808-2820.
- Maekawa, S., Maekawa, M., Hattori, S. & Nakamura, S. 1993, "Purification and molecular cloning of a novel acidic calmodulin binding protein from rat brain", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 18, pp. 13703-13709.
- Maeno, M., Xue, Y., Wood, T.I., Ong, R.C. & Kung, H.F. 1993, "Cloning and expression of cDNA encoding *Xenopus laevis* bone morphogenetic protein-1 during early embryonic development", *Gene*, vol. 134, no. 2, pp. 257-261.
- Maffei, A., Nelson, S.B. & Turrigiano, G.G. 2004, "Selective reconfiguration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation", *Nature neuroscience*, vol. 7, no. 12, pp. 1353-1359.
- Maki, M. et al. 2002. "Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease." *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61/2, 176-185.
- Mani, S., Schaefer, J. & Meiri, K.F. 2000, "Targeted disruption of GAP-43 in P19 embryonal carcinoma cells inhibits neuronal differentiation. As well as acquisition of the morphological phenotype", *Brain research*, vol. 853, no. 2, pp. 384-395.
- Mani, S., Shen, Y., Schaefer, J. & Meiri, K.F. 2001, "Failure to express GAP-43 during neurogenesis affects cell cycle regulation and differentiation of neural precursors and stimulates apoptosis of neurons", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 17, no. 1, pp. 54-66.
- Mao, Y.W., Liu, J.P., Xiang, H. & Li, D.W. 2004, "Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis", *Cell death and differentiation*, vol. 11, no. 5, pp. 512-526.

- Marcus, J., Dupree, J.L. & Popko, B. 2002, "Myelin-associated glycoprotein and myelin galactolipids stabilize developing axo-glial interactions", *The Journal of cell biology*, vol. 156, no. 3, pp. 567-577.
- Marin-Teva, J.L., Cuadros, M.A., Calvente, R., Almendros, A. & Navascues, J. 1999, "Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development", *The Journal of comparative neurology*, vol. 412, no. 2, pp. 255-275.
- Marquardt, T. 2003, "Transcriptional control of neuronal diversification in the retina", *Progress in retinal and eye research*, vol. 22, no. 5, pp. 567-577.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. & Gruss, P. 2001, "Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells", *Cell*, vol. 105, no. 1, pp. 43-55.
- Marquardt, T. & Gruss, P. 2002, "Generating neuronal diversity in the retina: One for nearly all", *Trends in Neurosciences*, vol. 25, no. 1, pp. 32-38.
- Martin, K.R.G., Klein, R.L. & Quigley, H.A. 2002, "Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors", *Methods*, vol. 28, no. 2, pp. 267-275.
- Martinou, J.C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J.K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S. & Pietra, C. 1994, "Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia", *Neuron*, vol. 13, no. 4, pp. 1017-1030.
- Martin-Partido, G., Rodriguez-Gallardo, L., Alvarez, I.S. & Navascues, J. 1988, "Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye", *The Anatomical Record*, vol. 222, no. 3, pp. 272-281.
- Masland, R.H. 1996, "Processing and encoding of visual information in the retina", *Current opinion in neurobiology*, vol. 6, no. 4, pp. 467-474.
- Masuda, I., Matsuo, T., Yasuda, T. & Matsuo, N. 1996, "Gene transfer with liposomes to the intraocular tissues by different routes of administration", *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 37, no. 9, pp. 1914-1920.
- Mathers, P.H., Grinberg, A., Mahon, K.A. & Jamrich, M. 1997, "The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development", *Nature*, vol. 387, no. 6633, pp. 603-607.
- Matsuda, T. & Cepko, C.L. 2004, "Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 1, pp. 16-22.
- Mayordomo, R., Valenciano, A.I., de la Rosa, E.J. & Hallbook, F. 2003, "Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death", *The European journal of neuroscience*, vol. 18, no. 7, pp. 1744-1750.
- McCabe, K.L., Gunther, E.C. & Reh, T.A. 1999, "The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: Mechanisms that control differentiation", *Development*, vol. 126, no. 24, pp. 5713-5724.
- Meller, K. & Tetzlaff, W. 1976, "Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina", *Cell and tissue research*, vol. 170, no. 2, pp. 145-159.

- Messing, A., Head, M.W., Galles, K., Galbreath, E.J., Goldman, J.E. & Brenner, M. 1998, "Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice", *American Journal of Pathology*, vol. 152, no. 2, pp. 391-398.
- Mey, J. & Rombach, N. 1999, "Retinoic acid increases BDNF-dependent regeneration of chick retinal ganglion cells in vitro", *Neuroreport*, vol. 10, no. 17, pp. 3573-3577.
- Mey, J. & Thanos, S. 2000, "Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis", *Brain research. Brain research reviews*, vol. 32, no. 2-3, pp. 343-379.
- Mey, J. & Thanos, S. 1993, "Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo", *Brain research*, vol. 602, no. 2, pp. 304-317.
- Meyer-Franke, A., Kaplan, M.R., Pfrieder, F.W. & Barres, B.A. 1995, "Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture", *Neuron*, vol. 15, no. 4, pp. 805-819.
- Miller, E.D., Tran, M.N., Wong, G.K., Oakley, D.M. & Wong, R.O. 1999, "Morphological differentiation of bipolar cells in the ferret retina", *Visual neuroscience*, vol. 16, no. 6, pp. 1133-1144.
- Milligan, G., Parenti, M. & Magee, A.I. 1995, "The dynamic role of palmitoylation in signal transduction", *Trends in biochemical sciences*, vol. 20, no. 5, pp. 181-187.
- Moon, L.D., Asher, R.A., Rhodes, K.E. & Fawcett, J.W. 2001, "Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC", *Nature neuroscience*, vol. 4, no. 5, pp. 465-466.
- Moore, C., Perry, A.C., Love, S. & Hall, L. 1996, "Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue", *Brain research. Molecular brain research*, vol. 37, no. 1-2, pp. 74-78.
- Moore, K.B., Schneider, M.L. & Vetter, M.L. 2002, "Posttranslational mechanisms control the timing of bHLH function and regulate retinal cell fate", *Neuron*, vol. 34, no. 2, pp. 183-195.
- Morales, C.R., Lefrancois, S., Chennathukuzhi, V., El-Alfy, M., Wu, X., Yang, J., Gerton, G.L. & Hecht, N.B. 2002, "A TB-RBP and Ter ATPase complex accompanies specific mRNAs from nuclei through the nuclear pores and into intercellular bridges in mouse male germ cells", *Developmental biology*, vol. 246, no. 2, pp. 480-494.
- Morton, A.J. & Buss, T.N. 1992, "Accelerated Differentiation in Response to Retinoic Acid After Retrovirally Mediated Gene Transfer of GAP-43 into Mouse Neuroblastoma Cells", *The European journal of neuroscience*, vol. 4, no. 10, pp. 910-916.
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R. & Filbin, M.T. 1994, "A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration", *Neuron*, vol. 13, no. 3, pp. 757-767.
- Muramatsu, T., Ohmae, A. & Anzai, K. 1998, "BC1 RNA protein particles in mouse brain contain two γ -h-element-binding proteins, translin and a 37 kDa protein", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 247, no. 1, pp. 7-11.

- Nakamura, F., Strittmatter, P. & Strittmatter, S.M. 1998, "GAP-43 augmentation of G protein-mediated signal transduction is regulated by both phosphorylation and palmitoylation", *Journal of neurochemistry*, vol. 70, no. 3, pp. 983-992.
- Napolitano, E.W., Chin, S.S., Colman, D.R. & Liem, R.K. 1987, "Complete amino acid sequence and in vitro expression of rat NF-M, the middle molecular weight neurofilament protein", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 7, no. 8, pp. 2590-2599.
- Nase, G., Weishaupt, J., Stern, P., Singer, W. & Monyer, H. 1999, "Genetic and epigenetic regulation of NMDA receptor expression in the rat visual cortex", *The European journal of neuroscience*, vol. 11, no. 12, pp. 4320-4326.
- Nedivi, E., Fieldust, S., Theill, L.E. & Hevron, D. 1996, "A set of genes expressed in response to light in the adult cerebral cortex and regulated during development", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 5, pp. 2048-2053.
- Neumann, C.J. 2001, "Pattern formation in the zebrafish retina", *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 12, no. 6, pp. 485-490.
- Neve, R. L.; M. F. Bear. 1989. "Visual experience regulates gene expression in the developing striate cortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86/12, 4781-4784.
- Ng, T.F., So, K.F. & Chung, S.K. 1995, "Influence of peripheral nerve grafts on the expression of GAP-43 in regenerating retinal ganglion cells in adult hamsters", *Journal of neurocytology*, vol. 24, no. 7, pp. 487-496.
- Niell, C.M., Meyer, M.P. & Smith, S.J. 2004, "In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor", *Nature neuroscience*, vol. 7, no. 3, pp. 254-260.
- Noll, E. & Miller, R.H. 1994, "Regulation of oligodendrocyte differentiation: a role for retinoic acid in the spinal cord", *Development (Cambridge, England)*, vol. 120, no. 3, pp. 649-660.
- Noy, N. 2000, "Retinoid-binding proteins: Mediators of retinoid action", *Biochemical Journal*, vol. 348, no. 3, pp. 481-495.
- Ojika, K., Ueki, Y., Mitake, S., Tsugu, Y., Otsuka, Y. & Katada, E. 1996, "Demonstration of the biological activity of peptide fragments related to human and rat hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)", *Neuroscience letters*, vol. 215, no. 2, pp. 127-130.
- Olney, J.W. 1968, "An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina", *Investigative ophthalmology*, vol. 7, no. 3, pp. 250-268.
- Ong, D.E. 1994, "Cellular transport and metabolism of vitamin A: Roles of the cellular retinoid-binding proteins", *Nutrition Reviews*, vol. 52, no. 2 II.
- Overbeek, P.A., Chepelinsky, A.B., Khillan, J.S., Piatigorsky, J. & Westphal, H. 1985, "Lens-specific expression and developmental regulation of the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene driven by the murine alpha A-crystallin promoter in transgenic mice", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 23, pp. 7815-7819.

- Pace, N.R. & Brown, J.W. 1995, "Evolutionary perspective on the structure and function of ribonuclease P, a ribozyme", *Journal of Bacteriology*, vol. 177, no. 8, pp. 1919-1928.
- Parker, R. & Song, H. 2004, "The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover", *Nat.Struct.Mol.Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 121-127.
- Parton, R.G., Simons, K. & Dotti, C.G. 1992, "Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons", *The Journal of cell biology*, vol. 119, no. 1, pp. 123-137.
- Patapoutian, A. & Reichardt, L.F. 2001, "Trk receptors: mediators of neurotrophin action", *Current opinion in neurobiology*, vol. 11, no. 3, pp. 272-280.
- Perez, M.T. & Caminos, E. 1995, "Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina", *Neuroscience letters*, vol. 183, no. 1-2, pp. 96-99.
- Perry, V.H. & Cowey, A. 1982, "A sensitive period for ganglion cell degeneration and the formation of aberrant retino-fugal connections following tectal lesions in rats", *Neuroscience*, vol. 7, no. 3, pp. 583-594.
- Perry, V.H., Henderson, Z. & Linden, R. 1983, "Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat", *The Journal of comparative neurology*, vol. 219, no. 3, pp. 356-368.
- Pinnaduwa, P., Schmitt, L. & Huang, L. 1989, "Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 985, no. 1, pp. 33-37.
- Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A. & Tessier-Lavigne, M. 2002, "Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system", *Neuron*, vol. 33, no. 2, pp. 219-232.
- Porter, F.D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S.S., Wassif, C., Huang, S.-., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J.S., Bodine, D., Alt, F. & Westphal, H. 1997, "Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development", *Development*, vol. 124, no. 15, pp. 2935-2944.
- Prada, C., Puelles, L., Genis-Galvez, J.M. & Ramirez, G. 1987, "Two modes of free migration of amacrine cell neuroblasts in the chick retina", *Anatomy and Embryology*, vol. 175, no. 3, pp. 281-287.
- Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, R. & Ramirez, G. 1991, "Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina", *European Journal of Neuroscience*, vol. 3, no. 6, pp. 559-569.
- Preiss, T. & Hentze, M.W. 1998, "Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast", *Nature*, vol. 392, no. 6675, pp. 516-520.
- Probstmeier, R., Braunewell, K. & Pesheva, P. 2000, "Involvement of chondroitin sulfates on brain-derived tenascin-R in carbohydrate-dependent interactions with fibronectin and tenascin-C", *Brain research*, vol. 863, no. 1-2, pp. 42-51.

- Quesada, A., Prada, F., Armengol, J.A. & Genis-Galvez, J.M. 1981, "Early morphological differentiation of the bipolar neurons in the chick retina. A Golgi analysis", *Anatomia, Histologia, Embryologia*, vol. 10, no. 4, pp. 328-341.
- Quinlan, E.M., Olstein, D.H. & Bear, M.F. 1999, "Bidirectional, experience-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in the rat visual cortex during postnatal development", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 22, pp. 12876-12880.
- Rabacchi, S.A., Ensini, M., Bonfanti, L., Gravina, A. & Maffei, L. 1994, "Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat", *Neuroscience*, vol. 63, no. 4, pp. 969-973.
- Reese, B.E., Harvey, A.R. & Tan, S.-. 1995, "Radial and tangential dispersion patterns in the mouse retina are cell- class specific", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 7, pp. 2494-2498.
- Reese, B.E., Necessary, B.D., Tam, P.P.L., Faulkner-Jones, B. & Tan, S.-. 1999, "Clonal expansion and cell dispersion in the developing mouse retina", *European Journal of Neuroscience*, vol. 11, no. 8, pp. 2965-2978.
- Reh, T.A. & Levine, E.M. 1998, "Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina", *Journal of Neurobiology*, vol. 36, no. 2, pp. 206-220.
- Rice, D.S., Nusinowitz, S., Azimi, A.M., Martínez, A., Soriano, E. & Curran, T. 2001, "The Reelin Pathway modulates the structure and of retinal synaptic circuitry", *Neuron*, vol. 31, no. 6, pp. 929-941.
- Richardson, P.M. & Verge, V.M. 1986, "The induction of a regenerative propensity in sensory neurons following peripheral axonal injury", *Journal of neurocytology*, vol. 15, no. 5, pp. 585-594.
- Rickman, D.W. & Brecha, N.C. 1995, "Expression of the proto-oncogene, *trk*, receptors in the developing rat retina", *Visual neuroscience*, vol. 12, no. 2, pp. 215-222.
- Rickmann DW, Lauterborn J, Brecha NC, Gall C (1992) Expression of low-affinity NGF-receptor immunoreactivity and BDNF and NT3s mRNAs in developing rat retina and superior colliculus. *Soc Neurosci Abstr* 12: 225
- Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G.B., Cornel, E., Lilienbaum, A. & Holt, C.E. 1996, "Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo", *Neuron*, vol. 17, no. 5, pp. 837-848.
- Ringstedt, T., Braisted, J.E., Brose, K., Kidd, T., Goodman, C., Tessier-Lavigne, M. & O'Leary, D.D. 2000, "Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 13, pp. 4983-4991.
- Rodriguez-Gallardo, L., Lineros-Dominguez Mdel, C., Francisco-Morcillo, J. & Martin-Partido, G. 2005, "Macrophages during retina and optic nerve development in the mouse embryo: relationship to cell death and optic fibres", *Anatomy and Embryology*, vol. 210, no. 4, pp. 303-316.

- Rols, M.-., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S. & Teissie, J. 1998, "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma", *Nature Biotechnology*, vol. 16, no. 2, pp. 168-171.
- Rose, K. 2004; "Spezifische proteomische Aspekte der axonalen Regeneration retinaler Ganglienzellen am Beispiel der Ratte (*Rattus norvegicus*) und des Affen (*Callithrix jacchus*)", Fachbereich Pharmazie, Philipps-Universität Marburg
- Rosen, K.M., McCormack, M.A., Villa-Komaroff, L. & Mower, G.D. 1992, "Brief visual experience induces immediate early gene expression in the cat visual cortex", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 12, pp. 5437-5441.
- Ross, E.M. 1995, "Protein modification. Palmitoylation in G-protein signaling pathways", *Current biology : CB*, vol. 5, no. 2, pp. 107-109.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C. & De Luca, L.M. 2000, "Retinoids in embryonal development", *Physiological Reviews*, vol. 80, no. 3, pp. 1021-1054.
- Roussel, G., Nussbaum, F., Schoentgen, F., Jolles, P. & Nussbaum, J.L. 1988, "Immunological investigation of a 21-kilodalton cytosolic basic protein in rat brain", *Developmental neuroscience*, vol. 10, no. 2, pp. 65-74.
- Ruff, S.J. & Ong, D.E. 2000, "Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria", *FEBS Letters*, vol. 487, no. 2, pp. 282-286.
- Sachs, A.B., Bond, M.W. & Kornberg, R.D. 1986, "A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression", *Cell*, vol. 45, no. 6, pp. 827-835.
- Sahenk, Z., Seharaseyon, J., Mendell, J.R. & Burghes, A.H. 1993, "Gene delivery to spinal motor neurons", *Brain research*, vol. 606, no. 1, pp. 126-129.
- Sakaguchi, H., Miyagi, M., Darrow, R.M., Crabb, J.S., Hollyfield, J.G., Organisciak, D.T. & Crabb, J.W. 2003, "Intense light exposure changes the crystallin content in retina", *Experimental eye research*, vol. 76, no. 1, pp. 131-133.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. & Nakanishi, S. 1992, "Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split", *Genes and Development*, vol. 6, no. 12 B, pp. 2620-2634.
- Schlosshauer, B. & Dütting, D. 1991, "Intraretinal pathfinding of ganglion cell axons is perturbed by a monoclonal antibody specific for a G4/Ng-CAM-like cell adhesion molecule", *Brain research. Developmental brain research*, vol. 63, no. 1-2, pp. 181-190.
- Schmalfeldt, M., Bandtlow, C.E., Dours-Zimmermann, M.T., Winterhalter, K.H. & Zimmermann, D.R. 2000, "Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth", *Journal of cell science*, vol. 113 (Pt 5), no. Pt 5, pp. 807-816.
- Schmitt, F.O. 1968, "Fibrous proteins--neuronal organelles", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 60, no. 4, pp. 1092-1101.
- Schnitzer, J. & Rusoff, A.C. 1984, "Horizontal cells of the mouse retina contain glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity during early developmental stages", *The Journal of*

- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 4, no. 12, pp. 2948-2955.
- Schoentgen, F., Bucquoy, S., Seddiqi, N. & Jolles, P. 1993, "Two cytosolic protein families implicated in lipid-binding: main structural and functional features", *The International journal of biochemistry*, vol. 25, no. 12, pp. 1699-1704.
- Schuetz, E. & Thanos, S. 2004, "Neuro-glial interactions in the adult rat retina after reaxotomy of ganglion cells: examination of neuron survival and phagocytic microglia using fluorescent tracers", *Brain research bulletin*, vol. 62, no. 5, pp. 391-396.
- Schutkowski, M., Bernhardt, A., Zhou, X.Z., Shen, M., Reimer, U., Rahfeld, J.U., Lu, K.P. & Fischer, G. 1998, "Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition", *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, vol. 37, no. 16, pp. 5566-5575.
- Schwab, M.E. & Caroni, P. 1988, "Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 8, no. 7, pp. 2381-2393.
- Schwab, M.E. & Thoenen, H. 1985, "Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 5, no. 9, pp. 2415-2423.
- Scott, E.K. & Luo, L. 2001, "How do dendrites take their shape?", *Nature Neuroscience*, vol. 4, no. 4, pp. 359-365.
- Sears, R., Leone, G., DeGregori, J. & Nevins, J.R. 1999, "Ras enhances Myc protein stability", *Molecular cell*, vol. 3, no. 2, pp. 169-179.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K. & Nevins, J.R. 2000, "Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability", *Genes & development*, vol. 14, no. 19, pp. 2501-2514.
- Seidenbecher, C.I., Gundelfinger, E.D., Bockers, T.M., Trotter, J. & Kreutz, M.R. 1998, "Transcripts for secreted and GPI-anchored brevicin are differentially distributed in rat brain", *The European journal of neuroscience*, vol. 10, no. 5, pp. 1621-1630.
- Seki, M., Nawa, H., Fukuchi, T., Abe, H. & Takei, N. 2003, "BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina", *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 44, no. 7, pp. 3211-3218.
- Sernagor, E., Eglén, S.J. & Wong, R.O. 2001, "Development of retinal ganglion cell structure and function", *Progress in retinal and eye research*, vol. 20, no. 2, pp. 139-174.
- Sernagor, E. & Mehta, V. 2001, "The role of early neural activity in the maturation of turtle retinal function", *Journal of anatomy*, vol. 199, no. Pt 4, pp. 375-383.
- Severt, W.L., Biber, T.U., Wu, X., Hecht, N.B., DeLorenzo, R.J. & Jakoi, E.R. 1999, "The suppression of testis-brain RNA binding protein and kinesin heavy chain disrupts mRNA sorting in dendrites", *Journal of cell science*, vol. 112 (Pt 21), no. Pt 21, pp. 3691-3702.

- Sharma, K.K., Kumar, R.S., Kumar, G.S. & Quinn, P.T. 2000, "Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in alphaA-crystallin", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 6, pp. 3767-3771.
- Shaw, G., Osborn, M. & Weber, K. 1981, "Arrangement of neurofilaments, microtubules and microfilament-associated proteins in cultured dorsal root ganglia cells", *European journal of cell biology*, vol. 24, no. 1, pp. 20-27.
- Shaw, G. & Weber, K. 1983, "The structure and development of the rat retina: an immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins", *European journal of cell biology*, vol. 30, no. 2, pp. 219-232.
- Shea, T.B., Perrone-Bizzozero, N.I., Beermann, M.L. & Benowitz, L.I. 1991, "Phospholipid-mediated delivery of anti-GAP-43 antibodies into neuroblastoma cells prevents neuritogenesis", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 11, no. 6, pp. 1685-1690.
- Shen, M., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W. & Lu, K.P. 1998, "The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins", *Genes & development*, vol. 12, no. 5, pp. 706-720.
- Skene, J.H. 1989, "Axonal growth-associated proteins", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 12, pp. 127-156.
- Skene, J.H., Jacobson, R.D., Snipes, G.J., McGuire, C.B., Norden, J.J. & Freeman, J.A. 1986, "A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes", *Science*, vol. 233, no. 4765, pp. 783-786.
- Smith, J.G., Walzem, R.L. & German, J.B. 1993, "Liposomes as agents of DNA transfer", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1154, no. 3-4, pp. 327-340.
- Snider, W.D. 1994, "Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us", *Cell*, vol. 77, no. 5, pp. 627-638.
- Solursh, M., Langille, R.M., Wood, J. & Sampath, T.K. 1996, "Osteogenic protein-1 is required for mammalian eye development", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 218, no. 2, pp. 438-443.
- Song, X.Q., Meng, F., Ramsey, D.J., Ripps, H. & Qian, H. 2005, "The GABA rho1 subunit interacts with a cellular retinoic acid binding protein in mammalian retina", *Neuroscience*, vol. 136, no. 2, pp. 467-475.
- Johnston, D. 1995, "The intracellular localization of messenger RNAs", *Cell*, vol. 81, no. 2, pp. 161-170.
- Steinberg, M.S. & Takeichi, M. 1994, "Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 1, pp. 206-209.
- Steward, O. 1995, "Targeting of mRNAs to subsynaptic microdomains in dendrites", *Current opinion in neurobiology*, vol. 5, no. 1, pp. 55-61.
- Stiemke, M.M. & Hollyfield, J.G. 1995, "Cell birthdays in *Xenopus laevis* retina", *Differentiation; research in biological diversity*, vol. 58, no. 3, pp. 189-193.

- Strittmatter, S.M., Fankhauser, C., Huang, P.L., Mashimo, H. & Fishman, M.C. 1995, "Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43", *Cell*, vol. 80, no. 3, pp. 445-452.
- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Sudo, Y., Linder, M.E. & Fishman, M.C. 1991, "An intracellular guanine nucleotide release protein for G0. GAP-43 stimulates isolated alpha subunits by a novel mechanism", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 33, pp. 22465-22471.
- Stukenberg, P.T. & Kirschner, M.W. 2001, "Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25", *Molecular cell*, vol. 7, no. 5, pp. 1071-1083.
- Sudo, Y., Valenzuela, D., Beck-Sickinger, A.G., Fishman, M.C. & Strittmatter, S.M. 1992, "Palmitoylation alters protein activity: blockade of G(o) stimulation by GAP-43", *The EMBO journal*, vol. 11, no. 6, pp. 2095-2102.
- Suter, D.M. & Forscher, P. 1998, "An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance", *Current opinion in neurobiology*, vol. 8, no. 1, pp. 106-116.
- Taira, E. & Baraban, J.M. 1997, "Identification of a strand-specific Egr response element binding complex enriched in rat brain", *Journal of neurochemistry*, vol. 68, no. 6, pp. 2255-2262.
- Tang, S., Woodhall, R.W., Shen, Y.J., deBellard, M.E., Saffell, J.L., Doherty, P., Walsh, F.S. & Filbin, M.T. 1997, "Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 9, no. 5-6, pp. 333-346.
- Taylor, S., Srinivasan, B., Wordinger, R.J. & Roque, R.S. 2003, "Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells", *Brain research. Molecular brain research*, vol. 111, no. 1-2, pp. 189-197.
- Thanos, S., Bahr, M., Barde, Y.A. & Vanselow, J. 1989, "Survival and Axonal Elongation of Adult Rat Retinal Ganglion Cells", *The European journal of neuroscience*, vol. 1, no. 1, pp. 19-26.
- Thanos, S., Bonhoeffer, F. & Rutishauser, U. 1984, "Fiber-fiber interaction and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, no. 6, pp. 1906-1910.
- Thanos, S. & Mey, J. 2001, "Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance", *Brain research. Brain research reviews*, vol. 35, no. 3, pp. 205-245.
- Tiedge, H., Freneau, R.T., Jr, Weinstock, P.H., Arancio, O. & Brosius, J. 1991, "Dendritic location of neural BC1 RNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 6, pp. 2093-2097.
- Timney, B., Mitchell, D.E. & Giffin, F. 1978, "The development of vision in cats after extended periods of dark-rearing", *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, vol. 31, no. 4, pp. 547-560.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goriadis, C., Rutishauser, U. & Magnuson, T. 1993, "Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system", *Neuron*, vol. 11, no. 6, pp. 1163-1174.

- Troilo, D., Xiong, M., Crowley, J.C. & Finlay, B.L. 1996, "Factors controlling the dendritic arborization of retinal ganglion cells", *Visual neuroscience*, vol. 13, no. 4, pp. 721-733.
- Trousse, F., Esteve, P. & Bovolenta, P. 2001, "Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 21, no. 4, pp. 1292-1301.
- Turner, D.L., Snyder, E.Y. & Cepko, C.L. 1990, "Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina", *Neuron*, vol. 4, no. 6, pp. 833-845.
- Udvardi, A. J.; R. W. Koster; J. H. Skene. 2001. "GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration." *Development (Cambridge, England)* 128/7, 1175-1182.
- Ugolini, G., Cremisi, F. & Maffei, L. 1995, "TrkA, TrkB and p75 mRNA expression is developmentally regulated in the rat retina", *Brain research*, vol. 704, no. 1, pp. 121-124.
- van de Velde, H.J., Roebroek, A.J., Senden, N.H., Ramaekers, F.C. & Van de Ven, W.J. 1994, "NSP-encoded reticulons, neuroendocrine proteins of a novel gene family associated with membranes of the endoplasmic reticulum", *Journal of cell science*, vol. 107 (Pt 9), no. Pt 9, pp. 2403-2416.
- van Noort, J.M., Bajramovic, J.J., Plomp, A.C. & van Stipdonk, M.J. 2000, "Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis", *Journal of neuroimmunology*, vol. 105, no. 1, pp. 46-57.
- Vecino, E., Caminos, E., Ugarte, M., Martin-Zanca, D. & Osborne, N.N. 1998, "Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion", *General pharmacology*, vol. 30, no. 3, pp. 305-314.
- Verhaagen, J., Hermens, W.T., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H., Rabkin, S.D., Pfaff, D.W. & Kaplitt, M.G. 1994, "Expression of the growth-associated protein B-50/GAP43 via a defective herpes-simplex virus vector results in profound morphological changes in non-neuronal cells", *Brain research. Molecular brain research*, vol. 26, no. 1-2, pp. 26-36.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G.M., Villegas-Perez, M.P., Thanos, S. & Aguayo, A.J. 1987, "Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 7, no. 9, pp. 2894-2909.
- Vincent, I., Zheng, J.H., Dickson, D.W., Kress, Y. & Davies, P. 1998, "Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease", *Neurobiology of aging*, vol. 19, no. 4, pp. 287-296.
- Wahle, E. 1991, "A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation", *Cell*, vol. 66, no. 4, pp. 759-768.
- Walther, C. & Gruss, P. 1991/12, "Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS", *Development (Cambridge, England)*, vol. 113, no. 4, pp. 1435-1449.
- Wang, S.W., Kim, B.S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R.L., Klein, W.H. & Gan, L. 2001, "Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells", *Genes & development*, vol. 15, no. 1, pp. 24-29.

- Wassle, H. & Boycott, B.B. 1991/4, "Functional architecture of the mammalian retina", *Physiological Reviews*, vol. 71, no. 2, pp. 447-480.
- Wassle, H., Peichl, L. & Boycott, B.B. 1983, "A spatial analysis of on- and off-ganglion cells in the cat retina", *Vision Research*, vol. 23, no. 10, pp. 1151-1160.
- Wassle, H. & Riemann, H.J. 1978/3/22, "The mosaic of nerve cells in the mammalian retina", *Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B, Containing Papers Of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)*, vol. 200, no. 1141, pp. 441-461.
- Wetts, R. & Fraser, S.E. 1988, "Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina", *Science*, vol. 239, no. 4844, pp. 1142-1145.
- Wiesel, T.N. 1982, "Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment", *Nature*, vol. 299, no. 5884, pp. 583-591.
- Wilkinson, D.G. 2000, "Topographic mapping: organising by repulsion and competition?", *Current biology : CB*, vol. 10, no. 12, pp. R447-51.
- Willbold, E. & Layer, P.G. 1998, "Muller glia cells and their possible roles during retina differentiation in vivo and in vitro", *Histology and histopathology*, vol. 13, no. 2, pp. 531-552.
- Willbold, E. & Layer, P.G. 1992, "Formation of neuroblastic layers in chicken retinospheroids: the fibre layer of Chievitz secludes AChE-positive cells from mitotic cells", *Cell and tissue research*, vol. 268, no. 3, pp. 401-408.
- Wohrn, J.C., Puelles, L., Nakagawa, S., Takeichi, M. & Redies, C. 1998, "Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo", *The Journal of comparative neurology*, vol. 396, no. 1, pp. 20-38.
- Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K.H., Bothwell, M. & Poo, M.M. 2002, "A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein", *Nature neuroscience*, vol. 5, no. 12, pp. 1302-1308.
- Wood, M.J., Byrnes, A.P., Kaplitt, M.G., Pfaff, D.W., Rabkin, S.D. & Charlton, H.M. 1994, "Specific patterns of defective HSV-1 gene transfer in the adult central nervous system: implications for gene targeting", *Experimental neurology*, vol. 130, no. 1, pp. 127-140.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. & Wang, E.A. 1988, "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities", *Science*, vol. 242, no. 4885, pp. 1528-1534.
- Wu, X., Wilcox, C.B., Devasahayam, G., Hackett, R.L., Arevalo-Rodriguez, M., Cardenas, M.E., Heitman, J. & Hanes, S.D. 2000, "The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery", *The EMBO journal*, vol. 19, no. 14, pp. 3727-3738.
- Wu, X.Q., Gu, W., Meng, X. & Hecht, N.B. 1997, "The RNA-binding protein, TB-RBP, is the mouse homologue of translin, a recombination protein associated with chromosomal translocations", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 11, pp. 5640-5645.
- Wuarin, L., Sidell, N. & de Vellis, J. 1990, "Retinoids increase perinatal spinal cord neuronal survival and astroglial differentiation", *International journal of developmental neuroscience* :

- the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, vol. 8, no. 3, pp. 317-326.
- Yang, G. S. et al. 2002. "Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size." *Journal of virology* 76/15, 7651-7660.
- Yang, J., Chennathukuzhi, V., Miki, K., O'Brien, D.A. & Hecht, N.B. 2003, "Mouse testis brain RNA-binding protein/translin selectively binds to the messenger RNA of the fibrous sheath protein glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S and suppresses its translation in vitro", *Biology of reproduction*, vol. 68, no. 3, pp. 853-859.
- Yankner, B.A., Benowitz, L.I., Villa-Komaroff, L. & Neve, R.L. 1990, "Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration", *Brain research. Molecular brain research*, vol. 7, no. 1, pp. 39-44.
- Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C.M., Nevins, J.R., Means, A.R. & Sears, R. 2004, "A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells", *Nature cell biology*, vol. 6, no. 4, pp. 308-318.
- Yen, S.H. & Fields, K.L. 1981, "Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system", *The Journal of cell biology*, vol. 88, no. 1, pp. 115-126.
- Yin, Y., Cui, Q., Li, Y., Irwin, N., Fischer, D., Harvey, A.R. & Benowitz, L.I. 2003, "Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 23, no. 6, pp. 2284-2293.
- Young, R.W. 1984, "Cell death during differentiation of the retina in the mouse", *Journal of Comparative Neurology*, vol. 229, no. 3, pp. 362-373.
- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H. & Lindholm, D. 1990, "Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors", *The EMBO journal*, vol. 9, no. 11, pp. 3545-3550.
- Zhang, X.M. & Yang, X.J. 2001, "Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog", *Development (Cambridge, England)*, vol. 128, no. 6, pp. 943-957.
- Zheng, W.L.I., Bucco, R.A., Christine Schmitt, M., Wardlaw, S.A. & Ong, D.E. 1996, "Localization of cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) II and CRABP in developing rat testis", *Endocrinology*, vol. 137, no. 11, pp. 5028-5035.
- Zhong, L.T., Sarafian, T., Kane, D.J., Charles, A.C., Mah, S.P., Edwards, R.H. & Bredesen, D.E. 1993, "bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 10, pp. 4533-4537.
- Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G. & Lu, K.P. 2000, "Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins", *Molecular cell*, vol. 6, no. 4, pp. 873-883.
- Zuber, M.X., Goodman, D.W., Karns, L.R. & Fishman, M.C. 1989, "The neuronal growth-associated protein GAP-43 induces filopodia in non-neuronal cells", *Science*, vol. 244, no. 4909, pp. 1193-1195.

