

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. Holger Busse –  
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie  
– Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos –

Die Umpolung regenerierbarer retinaler Ganglienzellen  
in ein fremdes Zielgebiet

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Sarah Pfrommer

aus Versmold

2010

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Mitrofanis Pavlidis

Tag der mündlichen Prüfung: 06. August 2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. Holger Busse –  
Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie  
– Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos –  
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Solon Thanos  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Mitrofanis Pavlidis

### **Zusammenfassung**

#### Die Umpolung regenerierbarer retinaler Ganglienzellen in ein fremdes Zielgebiet

Sarah Pfrommer

Basierend auf dem Modell des peripheren Nerven-Transplantates sollte in der vorliegenden Arbeit die Regeneration retinaler Ganglienzellen in ein fremdes Zielgebiet ohne den Kontakt zum anatomischen Zielgewebe ermöglicht werden. Neben einem *kortikalen* und blind endenden Ziel wurde ein besonderes Augenmerk auf die Verbindung zu einem muskulären Zielgebiet, dem *Musculus temporalis*, gelegt. Ein neu entwickeltes Operationsverfahren schuf erstmals einen direkten Kontakt des Sehnervenstumpfes zum Muskel.

Bei der retrograden Färbung zeigte sich wie erwartet ein zielabhängiger, massiver retinaler Zellverlust, der durch das Transplantat sowie durch die direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes mit dem Muskel verringert wurde. Phänotypische Veränderungen, die beim Kontakt zum Muskel durch stark ausgeprägte dendritische Verzweigungen imponierten, korrelierten mit dem Zielgewebe. Das Wachstum anterograd markierter Axone verringerte sich mit zunehmender Distanz vom Transplantat. Eine Resynaptogenese und Penetration konnten lediglich beim Kontakt zum Muskelgewebe vermutet werden. Immunhistochemisch veränderten sich die Expressionsprofile sowohl der neuron- als auch der motoneuronspezifischen Proteine. Retinale Ganglienzellen konnten in ein fremdes Zielgebiet einwachsen, was zu zielabhängigen Veränderungen bezüglich der Quantität und Morphologie retinaler Ganglienzellen sowie des Expressionsmusters bestimmter Markerproteine führte.

Genehmigt durch: Aktenzeichen: 50.0835.1.0 (G14/2004)

Tag der mündlichen Prüfung: 06. August 2010

*Für meine Eltern*

*in tiefer Verbundenheit*

– Abkürzungsverzeichnis –

Ach	<i>acetylcholine</i>
AMPA	<i>alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate</i>
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ -III-Tubulin	beta-III-Tubulin
ChAT	<i>choline acetyltransferase</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CS	<i>Colliculus superior</i>
CSPGs	<i>Chondroitin Sulfate Proteoglykane</i>
DAPI	<i>4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate</i>
4 Di-10Asp	<i>N-4-(4-didecylaminostyryl)-N-methylpyridium iodide</i>
DiIC18 (3)	<i>1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate</i>
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAP 43	<i>growth-associated Protein-43</i>
GCL	<i>ganglion cell layer</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
HBSS	<i>Hanks` balanced salt solution</i>
INL	<i>inner nuclear layer</i>
IPL	<i>inner plexiforme layer</i>
Isl 1	<i>Islet 1</i>
kDa	Kilodalton
LGN	<i>Nucleus geniculatum laterale</i>
LI	<i>lens injury</i>
LHX 3	<i>Lim homebox 3</i>
LHX 5	<i>Lim homebox 5</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
MAP 2	<i>microtubule-associated protein-2</i>

– Abkürzungsverzeichnis –

MMPs	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i>
nm	Nanometer
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
OMgp	Oligodendrozytenmyelin Glycoprotein
OMI 19-FC	Operationsmikroskop
ONL	<i>outer nuclear layer</i>
OPL	<i>outer plexiforme layer</i>
OPN	<i>olivary pretectum nucleus</i>
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PN	peripherer Nerv
PNS	peripheres Nervensystem
RGZ	retinale Ganglienzellen
SMA	spinale Muskelatrophie
SMN	<i>survival of motoneuron</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Hintergrund</b>	<b>4</b>
1.1	Retinale Ganglienzellregeneration im Wandel	4
1.2	Maturation retinaler Ganglienzellen	6
1.3	Die Hebbsche Theorie und die synaptische Plastizität	7
1.4	Unterschiede zwischen peripheren und zentralen Neuronen	9
1.5	Regenerierbarkeit von zentralen Neuronen im peripheren Transplantat	13
1.6	Reinnervation zentraler Gebiete	15
1.7	Reinnervation von Fremdgebieten	16
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Operationen	19
3.1.1	Material	19
3.1.2	Operationstechniken	20
	3.1.2.1 Operationsvorbereitung	20
	3.1.2.2 Operationsgruppen	21
	3.1.2.2.1 Axotomie und Sehnervenquetschung	21
	3.1.2.2.2 Periphere Nerventransplantationen	23
	3.1.2.2.3 Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel	26
	3.1.2.3 Operationszeiten	26
3.2	Retrograde Färbung	27
3.2.1	Enukleation und Präparation des <i>Whole mounts</i>	28
3.2.2	Quantifizierung und Auswertung	29

3.3	Anterograde Färbung	29
3.3.1	Enukleation und Kryoschnitte	29
3.3.2	Morphometrie und Auswertung	30
3.4	Immunhistochemie	30
3.4.1	Enukleation und Aufbereitung der Kryoschnitte	31
3.4.2	Morphometrie und Auswertung	33
3.5	Statistische Auswertung	33
3.5.1	<i>Student`s t-Test</i>	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
4.1	Retrograde Färbung	34
4.1.1	Axotomie	34
4.1.2	Blind endendes peripheres Nerven­transplantat	36
4.1.3	<i>Retinokortikale</i> Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat	37
4.1.4	<i>Retinomuskuläre</i> Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat	38
4.1.5	Sehnervenquetschung	39
4.1.6	Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel	41
4.2	Anterograde Färbung	46
4.2.1	Axotomie	46
4.2.2	Blind endendes peripheres Nerven­transplantat	47
4.2.3	<i>Retinokortikale</i> Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat	48
4.2.4	<i>Retinomuskuläre</i> Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat	49
4.2.5	Sehnervenquetschung	52

4.2.6	Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel	53
4.3	Immunhistochemie	56
4.3.1	Kontrollretina	56
4.3.2	Axotomie	60
4.3.3	Blind endendes peripheres Nerven­transplantat	61
4.3.4	<i>Retinokortikale</i> Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat	62
4.3.5	<i>Retinomuskuläre</i> Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat	62
4.3.6	Sehnervenquetschung	63
4.3.7	Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel	64
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
5.1	Retrograde Färbung	69
5.2	Anterograde Färbung	79
5.3	Immunhistochemie	89
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>112</b>

## 1 Einleitung und Hintergrund

### 1.1 Retinale Ganglienzellregeneration im Wandel

Zu Beginn dieses Jahrhunderts bestand das Dogma, dass axonale Nervenendigungen im zentralen Nervensystem (ZNS) adulter Säugetiere nicht in der Lage seien, sich nach einer Nervenschädigung zu regenerieren (Cajal 1928). Im Gegensatz dazu ist seit einigen Jahren bekannt, dass fötale zentrale Neurone der Säugetiere (Matthew and Patterson 1983; Carbonetto et al. 1987) sowie Neurone des peripheren Nervensystems (PNS) (Riopelle et al. 1981; Muller et al. 1986) auf eine traumatische Nervenschädigung mit einem intensiven spontanen axonalen Wachstum reagieren.

Die Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Aguayo (So and Aguayo 1985) brachten einen entscheidenden Wandel in der Forschung zentraler Nervenzellen des adulten Säugetieres, wobei adulte retinale Ganglienzellen (RGZ) ein etabliertes Modell bezüglich der Regenerationsbereitschaft zentraler reifer Nervenzellen darstellten. So und Aguayo (So and Aguayo 1985) demonstrierten, dass es auch adulten Axonen zentraler Nervenzellen möglich ist, nach einer traumatischen Sehnervenverletzung ihre Axone zu regenerieren, sofern die axonalen Wachstumskegel in eine regenerationspermissive Umgebung eingebracht werden. Für die Erzeugung einer regenerationspermissiven Umgebung spielte dabei ein peripheres Nerventransplantat, ein *PN-Graft*, eine entscheidende Rolle, um die Axone eines vollständig durchtrennten Sehnervs zu überbrücken (So and Aguayo 1985). Trotz dieser regenerationsstimulierenden Umgebung ist die Elongation der überbrückten Axone gering (Aguayo et al. 1991), da die meisten retinalen Ganglienzellen postnatal an einem substantiellen axonalen Wachstum scheitern (Goldberg et al. 2002).

Ein verlängertes posttraumatisches Überleben und ein verbessertes axonales Wachstum adulter RGZ sind ferner abhängig von der externen Hinzugabe von

neutrophinen Faktoren sowie von dem Einfluss des peripheren Nervenstrangs an der Läsionsstelle des durchtrennten Sehnervs (Mey and Thanos 1996). Um eine zusätzliche Verstärkung der Regeneration zu erzielen, kann eine traumatische Linsenverletzung (LI) während einer Sehnervendurchtrennung mit oder ohne periphere Nervenstrangtransplantation durchgeführt werden. Die Linsenverletzung induziert eine Aktivierung von Makrophagen. Durch diesen inflammatorischen Prozess sezernieren die aktivierten Makrophagen neutrophine Faktoren, die wie bereits erwähnt einen regenerationsfördernden Einfluss auf die RGZ (Leon et al. 2000; Fischer et al. 2001; Yin et al. 2003).

Im ZNS des fetalen Säugetieres ist ein spontanes axonales Wachstum als Antwort auf eine Nervenschädigung möglich (Erskine and Herrera 2007). Die axonale Projektion erfolgt durch Interaktionen der Rezeptoren der axonalen Wachstumskegel mit der extrazellulären Matrix. Im adulten Tier hingegen kommt es zu einer genetischen Umprogrammierung, wobei der adulten Zelle notwendige Faktoren zur Entwicklung und zum Wachstum nicht mehr ausreichend bereitgestellt werden. Die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen steht in diesem neuen Programm im Vordergrund. Das beschädigte neuronale Netzwerk kann aufgrund dieses Remodelings und des veränderten Genexpressionsmusters im Verlauf der Differenzierung nur bedingt repariert werden (Fischer et al. 2004).

Mit Hilfe von Mikroarrays und Real-Time-PCR konnten neue Erkenntnisse auf molekularer Ebene in der Ganglienzellforschung gewonnen werden. Bei der kompletten Sehnervendurchtrennung allein, aber auch in Kombination mit einer traumatischen Linsenverletzung kommt es zu einer Veränderung im Genexpressionsmuster der geschädigten RGZ, was zu einer Umschaltung (*switch*) in ein intensiveres Wachstumsstadium führt. Diese veränderte Genantwort existiert nicht nur in den RGZ, sondern auch in der benachbarten glialen Zellpopulation (Liedtke et al. 2007). Damit unterliegen reife zentrale Nervenzellen einem dramatischen Wechsel des Genexpressionsmusters, das

mit dem genetischen Profil von regenerierenden peripheren Neuronen teilweise übereinstimmt (Fischer et al. 2004).

## **1.2 Maturation retinaler Ganglienzellen**

Die Neuro- und Synaptogenese der Retina beginnt bei den meisten Säugetieren bereits vor der Geburt und wird in der frühen postnatalen Periode fortgesetzt.

Die unterschiedlichen Zelltypen der Retina entstehen aus einer pluripotenten retinalen Vorläuferzelle, dem Neuroblasten (Turner et al. 1990). Sobald der Neuroblast ein entsprechendes Kompetenzstadium erreicht hat, sind nur noch bestimmte Subpopulationen der postmitotischen retinalen Zellen in der Lage, sich weiter zu differenzieren (Belliveau and Cepko 1999). Dieser Prozess wird von intrinsischen sowie extrinsischen Faktoren im Verlauf der Retinogenese determiniert (Cepko et al. 1996). Während der Augenöffnungsphase sind alle retinalen Zelltypen entwickelt und die meisten Synapsen ausgebildet (Marquardt and Gruss 2002).

Retinale Ganglienzellen migrieren in die Ganglienzellschicht und beginnen dort über einen langwierigen Prozess ihre strukturelle und funktionelle Entwicklung. Sie strahlen zuerst mit ihrem Axon in den Sehnerv ein, bevor sie ihre dendritischen Verzweigungen ausbilden (Maslim et al. 1986).

Die Synaptogenese wird noch für mehrere Wochen fortgesetzt. Nach dem Öffnen der Augen steigt die synaptische Dichte bis zu einem Höchstmaß am Tag P21 weiter an. Über diese synaptischen Verbindungen in der inneren plexiformen Schicht (IPL) der Netzhaut nehmen die dendritischen Verzweigungen der RGZ Kontakt mit den amakrinen Zellen auf (Fisher 1979).

Im adulten Säugetier entwickeln sich über elf morphologisch unterschiedliche Subtypen der RGZ (Rockhill et al. 2002). Diese Subtypen unterscheiden sich durch ihre veränderte dendritische Architektur (Wassle and Boycott 1991) und ihr axonales Projektionsmuster (Yamagata and Sanes 1995). Die dendritischen Fortsätze der RGZ gehen nur mit bestimmten bipolaren und amakrinen Zellen

in der inneren plexiformen Schicht eine synaptische Verbindung ein (Tian 2004), was für eine funktionelle und morphologische Spezifität der RGZ der adulten Retina spricht. Während der Entwicklung dendritischer Verzweigungen und synaptischer Verbindungen von RGZ erfolgt ein intensives aktivitätsabhängiges Remodeling (Wong and Wong 2000), das sowohl von intrinsischen wie auch von extrinsischen Faktoren beeinflusst wird (Sernagor et al. 2001).

### 1.3 Die Hebbsche Theorie und die synaptische Plastizität

Im Jahre 1949 postulierte der Neuropsychologe Donald O. Hebb eine Regel für das Entstehen von Lernprozessen durch neuronale Netzwerke, die gemeinsame Synapsen bilden. In seinem Buch *The Organization of Behavior* (1949) formuliert er folgende Theorie: *When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B* (Hebb 1949). Viele Autoren fassen diese Theorie folgendermaßen zusammen: Je häufiger ein Neuron A gleichzeitig mit Neuron B aktiv ist, umso bevorzugter werden die beiden Neuronen aufeinander reagieren (*cells that fire together, wire together*) (Hebb 1949).

Durch Hebbs Lerntheorie wurde erstmals über den Mechanismus der synaptischen Plastizität berichtet, der eine aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung beschreibt. Diese Änderungen werden sowohl durch morphologische wie auch durch physiologische Veränderungen der Synapse verursacht. Dabei bezieht sich die Stärke der synaptischen Übertragung auf ein einzelnes Aktionspotential am präsynaptischen Endköpfchen, das im postsynaptischen Neuron eine unterschiedlich starke Änderung des Membranpotentials auslöst. Je größer diese Änderung ist, desto intensiver ist die synaptische Übertragung und umgekehrt.

Die synaptische Plastizität bezieht sich zum einen auf den präsynaptischen Bereich durch Änderungen in der Quantität der Neurotransmitter, die in eine Synapse freigegeben werden. Zum anderen wird die synaptische Plastizität postsynaptisch angeregt, durch die veränderte Leistungsfähigkeit der postsynaptischen Zellen auf diesen Neurotransmitter zu reagieren (Gaiarsa et al. 2002).

Hebbs generelle These lautete, dass zwei Zellen oder Zellsysteme, die wiederholt gleichzeitig aktiv sind, dazu neigen, verbunden zu werden. So vereinfacht die Aktivität in der Zelle die Auslösung eines Aktionspotentials in der anderen Zelle. Sofern eine Zelle diese Aktivierung in der anderen Zelle unterstützt, bildet das Axon der ersten Zelle bei Kontakt zum Zellkörper der zweiten Zelle synaptische Endköpfchen aus oder vergrößert die synaptischen Enden, die bereits existieren (Hebb 1949).

In Anbetracht dieser Theorie zeigte sich, dass spontane Aktionspotentiale in der sich entwickelnden Retina notwendig sind, um eine synaptische Verfeinerung in den *Nucleus geniculatum laterale* (LGN), einer wichtigen Umschaltstelle der Sehbahn, zu ermöglichen. Die synaptischen Verbindungen zwischen retinalen Ganglienzellen und dem LGN können neue Formen erlernen, die von der Latenz zwischen prä- und postsynaptischen Signalabfolgen abhängig sind. Das bedeutet, dass zusammen eintreffende Signale eine langlebige synaptische Verbesserung erzeugen, während sich nicht überlappende Signale zu einer milden synaptischen Schwächung führen (Butts et al. 2007). Diese Erkenntnis stimmt mit der Hebbischen Lerntheorie überein.

Die neuronale Plastizität beschreibt die Fähigkeit eines Neuron, sich an Änderungen der internen und externen Umgebung, an vorhergehende Erfahrungen und an Traumata anzupassen. Während aller Phasen der individuellen Lebenszeitspanne im Nervensystem scheinen Veränderungen einzutreten, die sich auf die Entwicklung, Degeneration und Regeneration beziehen (Gispén 1993).

Erich Kandel kam zu der Erkenntnis, dass, wenn zwei verschaltete Neurone gleichzeitig feuern, sich ihre synaptische Verbindung intensiviert und es bei einem erneuten Stimulus zu einer stärkeren Reaktion im Sinne einer Sensibilisierung kommt (Shi et al. 1999).

Er entdeckte in dem Zusammenhang zwei molekulare Mechanismen für die synaptische Plastizität. Der erste Mechanismus beinhaltet die Modifikation von bereits bestehenden synaptischen Proteinen, typischerweise die Proteinkinasen. Durch diese modifizierten Proteinkinasen wird eine veränderte synaptische Funktion und verbesserte Erregbarkeit ausgelöst (Shi et al. 1999). Diese Veränderungen bleiben aber nur für kurze Zeit bestehen.

Der zweite Mechanismus besteht aus *second messenger* Neurotransmittern, die die genetische Übertragung regulieren und die Expression von Schlüsselproteinen an der Synapse verändern. Dieser Prozess führt zu langlebigen Veränderungen in der Wirksamkeit synaptischer Verbindungen zwischen zwei Neuronen und wird als *long-term potentiation* (LTP) bezeichnet. Die Stärke der Synapse ist von der Anzahl ihrer Ionenkanäle abhängig (Debanne et al. 2003). Die Neurone verändern ihre Rezeptordichte an ihren postsynaptischen Membranen durch die so veränderte Erregbarkeit als Reaktion auf einen Reiz. Bei diesem dynamischen Prozess werden NMDA und AMPA Rezeptoren der Membran bei der Exozytose hinzugefügt und bei der Endozytose entfernt. Diese Prozesse werden entsprechend der synaptischen Aktivität verändert (Shi et al. 1999; Perez-Otano et al. 2005).

#### **1.4 Unterschiede zwischen peripheren und zentralen Neuronen**

Ein entscheidender Unterschied des zentralen und des peripheren Nervensystems besteht in der nicht-neuronalen Umgebung.

Während die Gliazellen des ZNS, die Oligodendrozyten, einen Mangel an regenerativen Effekten aufweisen und das axonale Wachstum inhibieren (Schwab and Thoenen 1985), führen Schwann'sche Zellen, die Gliazellen im

PNS, zu einem neuroprotektiven und neurotrophen Reiz (Schwab and Caroni 1988).

Bei einer mechanischen Nervenverletzung eines peripheren Nervs erfolgt die Degeneration des distalen Axons im Sinne einer schnellen anterograden und am proximalen Segment mit einer verzögerten retrograden Waller'schen Degeneration, bei der Schwann'sche Zellen eine Schlüsselrolle spielen (Terenghi 1995). Im proximalen Segment rundet sich das Perikaryon des verletzten Axons ab und schwillt an. Der Zellkern verlagert sich in die Peripherie, die Nissl-Substanz verschwindet größtenteils. Diesen Vorgang bezeichnet man als Chromatolyse. Im Bereich des distalen Segmentes geht das Axonfragment einschließlich seiner Synapse zugrunde. Die markhaltigen Axonscheiden zerfallen in Markballen. Es erfolgt eine massive Invasion von Makrophagen und Lymphozyten, die die Axonfragmente und das degradierte Myelin phagozytieren. Während der darauffolgenden Regeneration formieren sich die Wachstumskegel im Bereich der Läsion, indem die Axone mit Hilfe von Schwann'schen Zellen geschient werden, so dass ein Wachstum in die Peripherie ermöglicht wird (Scarlato et al. 2001). Während des Auswachsens des Axonstumpfes besteht eine vermehrte Proteinsynthese im Perikaryon und die Nissl-Substanz nimmt zu. Der Zellkern gewinnt seine zentrale Lage im Perikaryon zurück. Bei Kontakt des proximalen und distalen Nervenstumpfes sind die Nervenfasern in der Lage, über größere Distanzen zu elongieren und mit ihrem ursprünglichen Zielgebiet wieder eine funktionelle Einheit zu bilden (Schuetz and Thanos 2004). Den Anreiz zum Auswachsen erhalten die Axone durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. *nerve growth factor* (NGF), der von den Schwann'schen Zellen, oder z.B. *fibroblast growth factor* (FGF), der von den umliegenden Bindegewebszellen gebildet wird.

Sofern die auswachsenden Axone durch zwischengelagerte Bindegewebsnarben oder durch zu große Abstände zum distalen Segment daran gehindert werden, den Weg in die Leitschiene zu finden, so bilden sich am proximalen Axonende makroskopisch sichtbare Knoten, die Neurome.

Aufgrund des Effektes der Oligodendrozyten auf die mangelnde axonale Regeneration im adulten ZNS muss eine dem PNS-ähnliche Umgebung geschaffen werden. Bei der Transplantation eines peripheren Nervs werden Schwann`sche Zellen importiert und können so das axonale Wachstum zentraler Nervenzellen nach einer Sehnervenquetschung (*crush*) oder – durchtrennung (Axotomie) stimulieren (Taniuchi et al. 1986). Durch die direkte Transplantation von Schwann`schen Zellen ohne peripheres Nerventransplantat kann ebenfalls eine regenerationspermissive Umgebung für das ZNS geschaffen werden. Die Axone interagieren dabei mit den Schwann`schen Zellen über *tight* und *gap junctions*, über die wachstumsstimulierende Substrate bereitgestellt werden (Dezawa 2002).

Bei der Verletzung adulter zentraler Neurone kommt es durch aktivierte Astrozyten zu einer ausgeprägten Gliose im Bereich der Läsion, die für die aussprossenden Axone unpassierbar wird. Entsprechend der Degeneration demyelinisieren die Neuriten (Bush et al. 1999) und unterliegen der Phagozytose (Thanos et al. 1993). Die komplette Ausbildung einer glialen Narbe dauert nach der Nervenläsion mehrere Wochen an. Somit besteht eine zeitliche Lücke, in der eine neuronale Regeneration im ZNS möglich wäre (Liu and Brady 2004). Im Bereich der Gliose wird durch die *Chondroitin Sulfate Proteoglykane* (CSPGs) das axonale Wachstum unterbunden. Dabei spielen Matrix Metalloproteinasen (MMPs), Nogos und Tenascin-C als wachstumsinhibierende Moleküle eine wesentliche Rolle (Pizzi and Crowe 2007). Im PNS adulter Säugetiere hingegen ist eine axonale Regeneration durch die Wirkung von MMPs möglich (Pizzi and Crowe 2007).

Drei entscheidende myelin-assoziierte Inhibitoren sind im reifen ZNS vorhanden: Nogo, ein 250-kDa Glykoprotein (Chen et al. 2000), Myelin-assoziiertes Glykoprotein, MAG, ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie (Mukhopadhyay et al. 1994) sowie das Oligodendrozytenmyelin Glykoprotein (OMgp), das zum Kollabieren von Wachstumskegeln und Auswachsen von Axonen führt (Kottis et al. 2002).

Um eine zentrale axonale Regeneration zu etablieren, müssen diese myelin-assoziierten Inhibitoren durch die Applikation von Zellen oder Substraten ersetzt werden, die eine axonale Elongation unterstützen (McDonald et al. 1999; Ramon-Cueto et al. 2000) oder die inhibitorische Wirkung neutralisieren (Caroni and Schwab 1988). Zusätzlich muss die intrinsische Wachstumsbereitschaft der RGZ reaktiviert werden, indem regenerationsfördernde Gene und Neurotrophine appliziert oder überexprimiert werden (Zhang et al. 1998).

Entscheidende limitierende Regenerationskriterien reifer zentraler Neurone bestehen in einem Mangel an wachstumsfördernden Faktoren, der Unfähigkeit, wachstumsleitende Moleküle zu reexprimieren, der nicht passierbaren glialen Vernarbung sowie der Anwesenheit von wachstumshemmenden Faktoren, die mit einer Degeneration assoziiert sind (Bahr 2000).

Periphere Neurone antworten auf eine Verletzung mit einer intensiven chromatolytischen Reaktion, die bei reifen zentralen Neuronen minimal bis gar nicht vorhanden ist (Cragg 1970). Diese komplexe Antwort der peripheren Nervenzellkörper wird durch ein Signal getriggert, das von der Läsion ausgehend retrograd über die Axone transportiert wird (Cragg 1970; Kreutzberg 1996). Das periphere Nervensystem verfügt jedoch nicht nur über wachstumsfördernde Eigenschaften. Regenerationslimitierende Faktoren im PNS beinhalten die langsame Regeneration der Axone über die Läsionsstelle, die abfallende regenerative Kapazität von durchtrennten Neuriten, d.h. eine chronische Axotomie, und den progressiven Mangel denervierter Schwann'scher Zellen, d.h. eine chronische Denervierung (Fenrich and Gordon 2004).

## **1.5 Regenerierbarkeit von zentralen Neuronen im peripheren Transplantat**

Nach einer Sehnervendurchtrennung unterliegen die Axone und Ganglienzellen der retrograden sowie der anterograden Waller'schen Degeneration. Es konnten zwei Perioden während des apoptotischen Zelltodes in verletzten RGZ gezeigt werden: eine frühe Phase während der Neurogenese und der neuronalen Migration sowie eine späte Phase während der Innervation des Zielgebietes (Bahr 2000). Es wurde beobachtet, dass die meisten Neurone dem Zelltod innerhalb der ersten fünf Tage nach ihrer Entstehung mit einem Höchstmaß unterliegen unabhängig von ihrem Alter der Entstehung und ihrem Zelltyp. Dieses führte zu der Vermutung, dass eine zelluläre Uhr existiert, die den neuronalen Zelluntergang während der Entwicklungsphase hervorruft (Galli-Resta and Ensigni 1996). Ferner werden beinahe 50 Prozent der RGZ, die ihr Ziel erreichen, durch einen programmierten Zelltod während der Periode der Innervation eliminiert (Perry et al. 1983).

Ein Teil der RGZ kann durch die Transplantation eines peripheren Nervensegmentes, das eine regenerationspermissive Umgebung schafft, gerettet werden, so dass die ursprüngliche zentrale visuelle Projektion wiederhergestellt werden kann (Bray et al. 1987; Villegas-Perez et al. 1988). Fünf Prozent der überlebenden RGZ elongieren ihre Axone in das Transplantat (Lau et al. 1994). Die Regeneration von RGZ wird durch die Transplantation eines zuvor beschädigten peripheren Nervs noch umfangreicher gefördert als bei der Verwendung eines unbeschädigten Transplantates. Vermutlich sezernieren die durch die Transplantatschädigung aktivierten Gliazellen Faktoren und verändern die extrazelluläre Matrix, um das Überleben sowie die Regeneration der RGZ zu unterstützen (Bahr et al. 1992). Durch die Trennung der glialen Elemente vom peripheren Nerventransplantat werden das Überleben und die Regeneration von RGZ nicht mehr gefördert (Lau et al. 1994).

Durch eine Verletzung des peripheren Nervenstranges werden sowohl Faktoren, die einen direkten als auch Faktoren, die einen indirekten neurotrophen Effekt auf zentrale Neurone ausüben, produziert. Die neurotrophe Aktivität erfordert aber nur bedingt eine axonale Regeneration im peripheren Nerven. Für diesen Effekt könnten teilweise Neurotrophine wie FGF und TGF $\beta$  verantwortlich sein (Mey and Thanos 1996). Die axonale Wachstumsrate unterscheidet sich nicht signifikant, sofern die Regeneration mit einem frischen (direkt nach der Entnahme aus dem Umfeld) oder mit einem predegenerierten (Aufbewahrung für 3 Tage in Saline bei + 8 Grad) peripheren Nervenstrang überbrückt wird (Decherchi and Gauthier 1996). Die nicht-neuronalen Komponenten wie Schwann'sche Zellen, die für die axonale Regeneration im adulten ZNS notwendig sind, können somit für weitere drei Tage nach der *In-vitro*-Degeneration des peripheren Nerven ohne spezielle Aufbereitung (z.B. Oxygenierung, Medium mit ATP-Synthese) wirken.

RGZ-Populationen, die Axone in das periphere Nervenstrang elongieren, bleiben für mehr als drei Monate nach der Axotomie stabil (Vidal-Sanz et al. 1988). Dadurch kann eine Wiederherstellung der visuellen Funktion ermöglicht werden (Watanabe and Fukuda 2002). Die erste Voraussetzung ist, dass die RGZ die Axotomie überleben, indem sie ihre Axone regenerieren (Goldberg and Barres 2000; Watanabe and Fukuda 2002). Die Wachstumsrate der retinalen Axone wird auf 1,5 bis 2 mm pro Tag entlang des peripheren Nervenstranges geschätzt. Es besteht jedoch eine Latenzzeit von vier bis sechs Tagen, bevor die ersten Fasern mit dem initialen Einwachsen beginnen (Vanselow et al. 1990). Selbst in späteren postoperativen Phasen bleibt ein gewisser Anteil der überlebenden RGZ nach der peripheren Nervenstrangtransplantation bestehen. Dieser Effekt könnte durch Interaktionen mit dem Zielgebiet über stabile synaptische Verbindungen ausgelöst werden und ein andauerndes Überleben der regenerierenden Neurone ermöglichen (Villegas-Perez et al. 1988).

## 1.6 Reinnervation zentraler Gebiete

In embryonalen Netzhäuten zeigt sich, dass das Wachstum und die Verzweigungstendenz der retinalen Dendriten unabhängig von dem zentralen visuellen Zielgebiet sind. Wenn der ursprüngliche *Optikusvorsprung* und dessen angrenzende Bereiche entfernt werden (*target reduced embryos*), überlebt nur eine kleine Population der Ganglienzellen, die sich zu den verbleibenden zentralen Bereichen projizieren. Bei der kompletten Unterbrechung zum zentralen Zielgebiet (*target deprived embryos*) durch eine Durchtrennung des Sehnervs kommt es zu einer Degeneration fast aller Ganglienzellen (Vanselow et al. 1990).

In den Studien von Wizenmann und Bahr (1997) konnten verschiedene potente Führungsmoleküle im Zielgewebe retinaler Axone während ihrer Entwicklungsphase identifiziert werden. Demnach sind adulte Netzhäute von Ratten befähigt, ihre Zielzellen zu erkennen und funktionelle Kontakte *in vivo* und *in vitro* auszubilden. Diese Vorgänge der Expression von axonalen Führungsmolekülen sowie der selektiven Erkennung des Zielgewebes scheinen im Säugetier sowie bei Vögeln auf die Periode der Embryogenese limitiert zu sein. Durch die Deafferenzierung des *Colliculus superior* der adulten Ratte kann die Zielinformation aber wiederhergestellt werden, wie es in fetalen Netzhäuten und deren RGZ zu erkennen (Wizenmann and Bahr 1997).

Netrin- und Eph/ephrin-Moleküle gehören zu diesen Führungsmolekülen, die eine entscheidende Rolle in der akkuraten Entwicklung der visuellen Projektion spielen (Mann et al. 2004).

In den letzten Jahren konnte in vielen Studien demonstriert werden, dass die RGZ einer adulten Ratte eine vollständige Sehnervendurchtrennung überleben. Die Fasern wachsen sogar über längere Strecken in ein peripheres Nervenplantat ein (So and Aguayo 1985; Villegas-Perez et al. 1988). Die regenerierenden Axone navigieren in ihr ursprüngliches Zielgebiet, den *Colliculus superior* (CS), in einer bemerkenswerten stereotypen, fehlerfreien

Weise. Die Reinnervation erfolgt im Sinne der natürlichen Sehbahn, indem die Axone in den CS elongieren und funktionelle Synapsen bilden. Diese neugebildeten Synapsen sind gut differenziert und reinnervieren selektiv die graue Substanz des CS. Die Axone können über eine Strecke von 500 µm ausgehend vom proximalen peripheren Nerventransplantat elongieren (Carter et al. 1989). Morphologisch unterscheiden sich die neugebildeten Synapsen von den ursprünglichen *retinocolliculären* synaptischen Verbindungen durch ihre sehr viel größer ausgebildeten Endigungen und ihre ausgeprägte Kontaktfläche zu den Dendriten. Aufgrund des ähnlichen *retinocolliculären* Projektionsmusters müssen bei der Reinnervation bestimmte Führungsmoleküle der ursprünglichen anatomischen Verbindung bestehen bleiben oder neu produziert werden. Die spezifischen, vom Zielgebiet abhängigen neuronalen Kontakte sind an der morphologischen Stabilisierung und dem besseren Überleben von regenerierenden Neuronen beteiligt (Thanos 1997).

### **1.7 Reinnervation von Fremdgebieten**

Die Reinnervation retinaler Ganglienzellen in ein fremdes Zielgebiet wurde in der bisher vorliegenden Literatur eher stiefmütterlich behandelt, so dass wenige Arbeiten bezüglich dieser Thematik bekannt sind.

In den Studien von Tan et al. (1990, 1999) wurde das periphere Nerventransplantat mit einem fetalen *tektalen* Implantat verbunden, um das Verhalten der regenerierenden adulten retinalen Axone bezüglich ihrer Spezifität und Selektivität für deren Zielregion zu studieren (Tan et al. 1990; Tan and Harvey 1999). Diese fetalen Transplantate zeigten ähnliche anatomische und chemische Muster wie das *Stratum griseum superficiale* des normalen CS (Harvey and Lund 1981). Bei dieser Transplantation zeigte sich, dass die regenerierenden Axone eine limitierte Penetration in das fetale Neuropil ausbildeten. Es gab aber keinen Hinweis auf eine selektive Innervation von bevorzugten *retinorecipienten* Zielregionen im *tektalen Graft* (Tan et al. 1990).

In anderen Arbeiten konnte ein axonales Einwachsen in fetales *tektales* Gewebe beobachtet werden (Vanselow et al. 1990).

In einer Studie von Harvey et al. (1995) wurde das distale Transplantatende mit fetalem *Tektumgewebe* verbunden, das zuvor in den *frontalen Kortex* implantiert wurde. Die aus dem Transplantat austretenden regenerierenden Axone konnten ihre Zielregion, das *tektale* Implantat, nicht selektiv erkennen (Harvey et al. 1995).

Bei einer *retinocerebellaren* Verbindung, d.h. ein unübliches Zielgebiet für den Sehnerv, regenerierten die RGZ ihre Axone mit einer Länge von mehr als 650 µm in den *cerebellaren Kortex*. Dabei zeigte sich eine Präferenz in die granuläre Zellschicht nach einer Verweildauer von zwei bis neun Monaten. Es bildeten sich dabei persistierende synaptische Endigungen in das neue Zielgebiet aus, wobei diese *retinocerebellaren* im Vergleich zu den *retinocolliculären* Endigungen größer und zahlreicher waren (Zwimpfer et al. 1992).

Bei Kontakt zum Muskelgewebe kam es zu einem retinalen Auswuchs der Axone in das Fremdgewebe. Die Länge der Axone betrug dabei am Beginn des peripheren Nerven-Transplantates 300 bis 465 µm. Eine Penetration des Muskelgewebes und ein Einwachsen der Axone konnte nicht sichergestellt werden (Tan and Harvey 1999).

In den bisherigen Studien wurde das Modell des peripheren Nerven-Transplantates erfolgreich angewandt, um das Überleben von retinalen Ganglienzellen und das Wachstum sowie die Regeneration der Axone im adulten zentralen Nervensystem zu fördern. Bislang wurde vor allem durch diesen *Bypass* eine Wiederherstellung der anatomischen Sehbahn angestrebt. Eher stiefmütterlich wurde jedoch die Regeneration dieser zentralen Neurone in ein nicht anatomisches Zielgebiet behandelt.

## 2 Fragestellung

Die Arbeiten der derzeitigen retinalen Ganglienzellforschung legen ihren Schwerpunkt auf die Regenerationsfähigkeit adulter retinaler Ganglienzellen in ihr natürliches Zielgebiet. In der hier vorliegenden Arbeit soll besonders auf die retinale Regenerationsbereitschaft in ein nicht anatomisches Zielgebiet eingegangen werden. Dabei dient das Muskelgewebe als fremdes Zielgebiet. Um eine substantielle Regeneration zu gewährleisten, wird das Modell des peripheren Nerventransplantates im adulten Tier verwendet. Bislang ist über mögliche Langzeiterfolge der retinalen Regeneration wenig berichtet worden, so dass in dieser Arbeit der zeitliche Verlauf der regenerativen Prozesse über 24 Wochen dokumentiert wird. Des Weiteren wird eine neue operative Technik entwickelt, bei der der durchtrennte Sehnervenstumpf direkt mit dem fremden Zielgebiet verbunden wird.

Eine entscheidende Frage ist, welchen Einfluss das Zielgebiet, mit dem das distale Transplantatende in Kontakt tritt, auf das Überleben der RGZ und die Regenerationsbereitschaft der Axone hat. Gibt es zielabhängige Veränderungen bezüglich der retinalen Zellzahl sowie der morphologischen Erscheinung der RGZ? Können regenerierte Fasern substantiell elongieren und synaptische Kontakte zum Zielgebiet formieren? Kann durch diese Resynaptogenese eine funktionelle Verbindung mit dem fremden Zielgebiet stabilisiert werden? Kommt es zusätzlich zu Veränderungen auf molekularer Ebene im Sinne einer Umpolung?

Ergänzend sollte überprüft werden, ob auch ohne ein peripheres Nerventransplantat eine Regeneration retinaler Axone in ein fremdes Zielgebiet, den *Musculus temporalis*, möglich ist. Wichtig war dabei, ob auch das Muskelgewebe eine regenerationspermissive Umgebung für den verletzten Sehnerv bilden kann.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Operationen

##### 3.1.1 Material

Für die Durchführung aller operativen Eingriffe wurden ausschließlich weibliche adulte Albinoratten des Sprague-Dawley Stammes (*Rattus norvegicus*) mit einem Körpergewicht von 170 bis 220 g verwendet. Die Tiere stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden von der Firma Charles River (Sulzbach) bezogen. Die Tiere wurden paarweise bei einer Raumtemperatur von 18 bis 20° unter einem zirkadianen Hell-Dunkel-Rhythmus in den üblichen Zuchtbehältern (Makrolonkäfig, Typ III) gehalten. Die Ernährung erfolgte durch eine *ad libitum* Diät aus Alleinfutter und Leitungswasser. Alle genehmigungspflichtigen Versuche wurden mit der Zulassung des Regierungspräsidiums Münster unter der Versuchsnummer 50.0835.10 (G14/2004) durchgeführt. Die jeweiligen Operationen wurden gemäß §9a (1) des Tierschutzgesetzes protokolliert.

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 187 Tiere verwendet, die sich folgendermaßen auf die Operationsgruppen aufteilen ließen:

##### I. Transplantationen:

1.	Axotomie	20 Tiere
2.	Transplantat mit blind endendem Zielgebiet	13 Tiere
3.	Transplantat mit Zielgebiet <i>Kortex</i>	14 Tiere
4.	Transplantat mit Zielgebiet Muskel	17 Tiere

##### II. Direkte Anastomose:

1.	Zielgebiet direkt in den Muskel	65 Tiere
2.	Sehnervenquetschung	58 Tiere

Das Operationsbesteck bestand aus einem Skalpellhalter (Hermle) mit Skalpellklingen in den Größen 10 und 11 (Aesculap), einer geraden Augenschere (Hermle), einer Kapsulotomieschere (Gills-Welsh), einer geraden Vannas-Schere (Hermle), einer Mikropinzette (Hermle), einer Uhrmacherpinzette Nr. 4 und 5 (Hermle) und einem Nadelhalter (French).

Tupfer wurden auf die geeignete Größe (2 bis 5 mm) zugeschnitten. Das Nahtmaterial (4-0 Perma-Hand<sup>®</sup> Seide, 6-0 Prolene<sup>®</sup>, 10-0 Ethilon<sup>®</sup>) wurde von der Firma Ethicon Products (Johnson & Johnson) zur Verfügung gestellt. Die Operationen wurden an einem Operationsmikroskop (OMI 19-FC) der Firma Zeiss durchgeführt.

### 3.1.2 Operationstechniken

#### 3.1.2.1 Operationsvorbereitung

Vor jeder Operation wurden alle Ratten intraperitoneal mit einer Kombination von Ketamin 60-80 (Ketamin<sup>®</sup> 10% CEVA SANTE ANIMALE, Sanofi) und Xylazin 10-15 mg/kg (Xylazin<sup>®</sup> 2% CEVA SANTE ANIMALE, Sanofi) anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde mittels Erlöschen des Lid- und Zehenreflexes verifiziert. Mit Hilfe eines elektrischen Langhaarschneiders wurde das Fell über der Schädelkalotte, bei Transplantationen zusätzlich am rechten Hinterbein rasiert, so dass die Operationswunden nicht durch Haare kontaminiert werden konnten. Die Tiere wurden durch eine Maulklemme in Bauchlage am Operationstisch fixiert. Die Extremitäten wurden verstärkend mit Klebestreifen am Tisch festgeklebt. Alle Operationen wurden ausschließlich am linken Auge durchgeführt. Zum Schutz vor einer Austrocknung der Hornhaut bei erloschenem Lidreflex wurden die Augen mit Augensalbe (Vidisept<sup>®</sup> *ophthalmic gel*, Dr. Mann Pharma) befeuchtet.

### 3.1.2.2 Operationsgruppen

#### 3.1.2.2.1 Axotomie und Sehnervenquetschung

Die Sehnervenquetschung, die sogenannte *open crush* Technik, dient im Modell der Neuroprotektion *in vivo* als traumatischer Auslöser für den retrograden apoptotischen Zelltod der RGZ.

Die komplette Durchtrennung des Sehnervs, eine Axotomie, gleicht in den wesentlichen operativen Schritten der offenen Sehnervenquetschung, ein *crush*, und wird daher ebenfalls an dieser Stelle beschrieben. Die Axotomie des Sehnervs diente in allen Transplantationsgruppen als Ausgangsoperation.

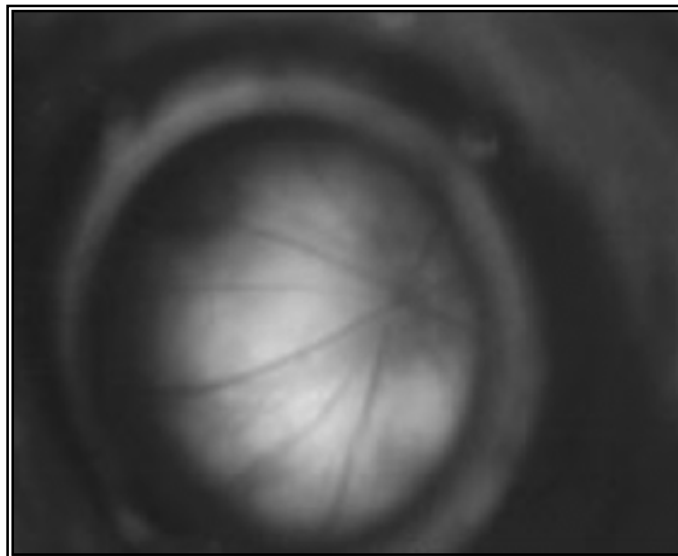
Der Zugangsweg zum *Bulbus oculi* erfolgte über einen ca. 1,5 cm langen sagittalen Hautschnitt mit dem Skalpell (Klingengröße 11, Aesculap) entlang der Schädelkalotte von frontal nach *occipital*. Die Kopfhaut konnte daraufhin vom *Periost* des Schädels gelöst werden, so dass der linke Hautlappen zur Vergrößerung des Operationsgebietes mit einem chirurgischen Faden (6-0 Prolene<sup>®</sup>, Ethicon) lateral aufgespannt werden konnte. Entlang des *Os frontale* wurde das Bindegewebe mit einem Skalpell (Klingengröße 10, Aesculap) inzidiert, um *suprabulbär* die *Orbita* zu eröffnen. Anteile der Tränendrüse wurden zur Verbesserung des Zugriffes zum *Nervus opticus* entfernt und die *superiore extrabulbäre* Muskulatur durchtrennt. Um einen optimalen Einblick in den *retrobulbären* Raum zu erhalten, wurden die restlichen *extraokulären* Muskeln durchtrennt und durch Haltefäden (6-0 Prolene<sup>®</sup>, Ethicon) am Operationstisch fixiert, so dass durch entsprechende Mobilisation des *Bulbus* der Sehnerv in seinem *intraorbitalen* Verlauf zugänglich wurde.

Die *Meningen* wurden ca. 0,5 cm hinter dem *Bulbus* mit einer Kapsulotomie-schere (Gills-Welsh) lateral eröffnet, ohne die dort verlaufende *Arteria centralis retinae* zu verletzen. Mit Hilfe einer Uhrmacherpinzette (Hermle) konnte der Sehnerv an dieser Stelle aus der *meningealen* Ummantelung freigelegt werden

und für eine Sehnervenquetschung mit der Pinzette für ca. zehn Sekunden gequetscht bzw. für eine Axotomie mit der Kapsulotomieschere (Gills-Welsh) komplett durchtrennt werden. Die entsprechende Läsionsstelle wurde mit dem Füllmaterial Gelfoam (Manufacturer Johnson & Johnson) verklebt, so dass kein Kontakt zum umliegenden Gewebe entstehen konnte.

Anschließend wurde das Wundgebiet mit einer antibiotischen Augensalbe (Gentamytrex<sup>®</sup> eye ointment, Dr. Mann Pharma) versorgt und die Hautinzision nach Entfernung aller Haltefäden mit einem 4-0 Perma-Hand<sup>®</sup> Seide (Ethicon) Faden vernäht. Auf die verschlossene Wunde wurde zusätzlich Gentamytrex<sup>®</sup> Augensalbe (Dr. Mann Pharma) appliziert.

Abschließend wurde nochmals die retinale Vaskularisation sichergestellt, indem das befeuchtete linke Auge durch Auflegen eines Objektträgers (Engelbrecht) unter dem Operationsmikroskop (OMI-19 FC, Zeiss) fundoskopiert wurde. Sofern sich die Gefäße als Sternform darstellen ließen, konnte von der Unversehrtheit der *Arteria centralis retinae* ausgegangen werden (Abb. 1).



**Abb. 1:** Fundoskopie des operierten Augapfels mit intakten Zentralgefäßen der Retina.

Ein traumatischer *Katarakt* wurde durch das Einstechen einer Mikrokapillare im Bereich des *Limbus* in den vorderen *Linsenkortex* induziert, ohne dabei die Iris zu beschädigen. Beim Herausziehen der Kapillare wurde diese mehrmals leicht

um die eigene Achse gedreht, um so den Einstichkanal zu vergrößern (Fischer 2000).

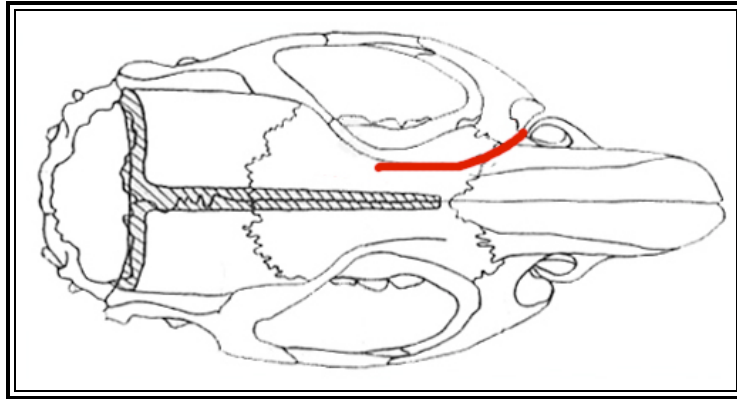
### 3.1.2.2.2 Periphere Nerven transplantationen

Voraussetzung für alle Transplantationen war die vorherige Durchführung einer Axotomie in der oben beschriebenen Weise.

Für die Transplantation eines peripheren Nerven transplantates wurde ausschließlich der rechte Ischiasnerv von derselben Ratte als autologes Transplantat verwendet, die zuvor einer kompletten Sehnervendurchtrennung unterlag. Durch dieses autologe Transplantat sollte eine mögliche *Graft-versus-Host*-Reaktionen unterbunden werden. Das rechte Hinterbein wurde distal zum *Os sacrum* mit einem elektrischen Langhaarschneider rasiert, um Kontaminationen durch Haare auszuschließen.

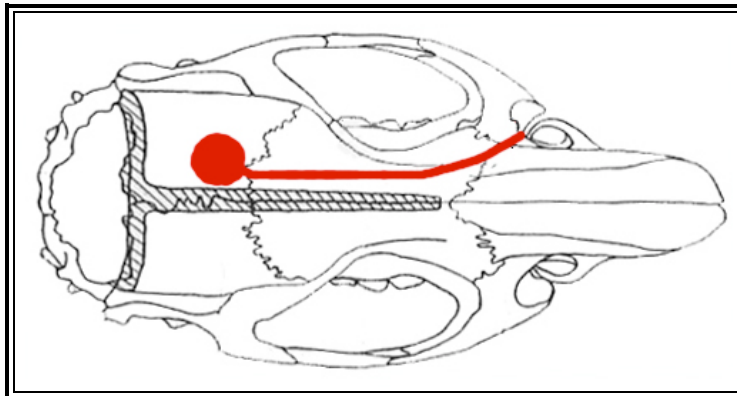
Nach Beendigung der Axotomie wurde in der gleichen Operationssitzung eine ca. 2 bis 3 cm lange Hautinzision mit einem Skalpell (Klingengröße 11, Aesculap) auf Höhe des *Os sacrum* entlang des *Femurs* in distaler Richtung durchgeführt. Der Faszien sack der *ischiokruralen* Muskulatur wurde mit dem Skalpell (Klingengröße 10, Aesculap) vorsichtig eröffnet, bis der Ischiasnerv in der Tiefe der Muskulatur durch stumpfes Vorpräparieren sichtbar wurde. Der *Nervus ischiadicus* wurde in seinem kompletten Verlauf vom Austritt im Bereich der Hüfte bis zur Aufzweigung in seine beiden großen Nervenäste freipräpariert und ohne das umliegende Bindegewebe entnommen. Zum Schutz vor Austrocknung wurde das ca. 1,5 cm lange Ischiastransplantat in *Hanks' balanced salt solution* pH 7,5 (HBSS, Gibco) aufbewahrt. Die entstandene Wundfläche wurde ebenfalls mit Gelfoam (Manufacturer Johnson & Johnson) sowie Gentamytrex<sup>®</sup> Augensalbe (Dr. Mann Pharma) versorgt und mit einem 4-0 Perma-Hand<sup>®</sup> Seide (Ethicon) Faden verschlossen.

Mit Hilfe eines feinen Bohrers mit Fräsaufsatz (Dremel) wurde ein Bohrkanal vom Orbitarand entlang der sagittalen *Suture* bis in den *occipitalen* Bereich gefräst (Abb. 2).



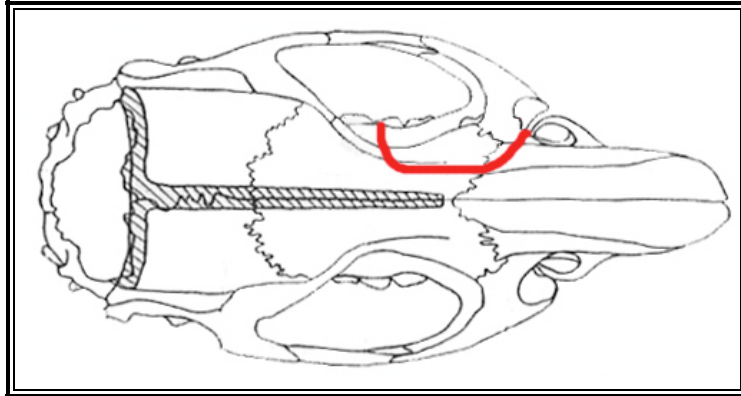
**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Schädels einer *Rattus norvegicus*. Rot dargestellt ist der gefräste Bohrkanal für das periphere Nerven­transplantat mit blind endendem Zielgebiet.

Um einen Kontakt zum *Kortex* herzustellen, wurde am distalen Ende des Bohrkanals das *Os occipitale* im Sinne einer *Trepanation* eröffnet (Abb. 3).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Schädels einer *Rattus norvegicus*. Rot dargestellt ist der gefräste Bohrkanal für das periphere Nerven­transplantat mit dem *kortikalen* Zielgebiet. Im *occipitalen* Bereich ist die *Trepanation* rot markiert.

Bei der Verbindung zum *Musculus temporalis* wurde der Bohrkanal vom Orbitarand Richtung *Os temporale* geführt (Abb. 4).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Schädels einer *Rattus norvegicus*. Rot dargestellt ist der gefräste Bohrkanal für das periphere Nerven­transplantat mit dem Zielgebiet Muskelgewebe.

Nach Anfrischung der Transplantatenden konnte das *Perineurium* des zuvor entnommenen Ischiassegmentes durch drei 10-0 Ethilon<sup>®</sup> (Ethicon) Fäden in einem Winkelabstand von ca. 30° zueinander an die *Dura* des okulären Sehnerventumpfes adaptiert werden. Zur Stabilisierung der echten *Opticus-Ischias-Anastomose* wurde die Kontaktstelle mit Gelfoam (Manufacturer Johnson & Johnson) versorgt. Zum Schutz vor äußeren Einwirkungen wurde das Transplantat in seinem weiteren Verlauf in den oben erwähnten Bohrkanal eingelegt (Abb. 2).

Das distale Transplantatende wurde erneut angefrischt und mit dem entsprechenden Zielgebiet in Kontakt gebracht.

Beim blind endenden Zielgebiet wurde das Transplantat ohne jeglichen Kontakt zum umliegenden Gewebe im Bohrkanal zurückgelassen (Abb. 2).

Für den Kontakt mit dem *kortikalen* Gewebe wurde das distale Transplantatende im Bereich der *Trepanation* mit Hilfe einer Kanüle in den *Kortex* eingebracht (Abb.3). Damit der Kontakt nicht unterbunden werden konnte, wurde die *Trepanation* mit Gelfoam (Manufacturer Johnson & Johnson) verschlossen.

Der *Musculus temporalis* wurde am Ende des zuvor gefrästen Bohrkana­ls taschenförmig aufgeschnitten und das distale Transplantatende dort

hineingelegt (Abb. 4). Zur Stabilisierung wurde auch an dieser Stelle Gelfoam (Manufacturer Johnson & Johnson) appliziert.

Abschließend erfolgte der Verschluss der Inzision in der oben beschriebenen Weise.

#### 3.1.2.2.3 Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel

Die direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes mit dem *Musculus temporalis* basierte ebenfalls auf der zuvor durchgeführten Axotomie.

Zunächst wurde der Muskel mit dem Skalpell (Klingengröße 11, Aesculap) vom Periost abgelöst, so dass er lediglich an seinem *inferioren* Anteil fixiert war. Der Muskellappen wurde Richtung *Bulbus* mobilisiert und mit einem 10-0 Ethilon® (Ethicon) Faden am Sehnervenstumpf befestigt. Die überstehenden Muskelreste wurden mit zwei weiteren 6-0 Prolene® (Ethicon) Fäden im *retrobulbären* sowie *periorbitalen* Bindegewebe fixiert, so dass der Muskel den *Bulbus suprabulbär* ummantelte. Der verbliebene Hohlraum im Bereich der ursprünglichen Muskellokalisierung wurde mit Gelfoam (Manufacturer Johnson & Johnson) aufgefüllt und die Wunde mit einem 4-0 Perma-Hand® Seide (Ethicon) Faden verschlossen.

#### 3.1.2.3 Operationszeiten

Postoperativ wurden die Tiere wieder in ihre Käfige zurückgesetzt und nach ca. zwei Stunden auf Wachheit sowie Schmerzfreiheit bzw. schmerzbedingtes aggressives Verhalten überprüft.

Für die postoperativen Auswertungen wurden verschiedene gruppenspezifische Zeitintervalle festgelegt:

I. Transplantationen:

- |                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| 1. Axotomie                                   | 24 Wochen |
| 2. Transplantat mit blind endendem Zielgebiet | 24 Wochen |
| 3. Transplantat mit Zielgebiet <i>Kortex</i>  | 24 Wochen |
| 4. Transplantat mit Zielgebiet Muskel         | 24 Wochen |

II. Direkte Anastomose:

- |                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| 1. Zielgebiet direkt in den Muskel | 1, 4, 24 Wochen |
| 2. Sehnervenquetschung             | 1, 4, 24 Wochen |

### 3.2 Retrograde Färbung

Bei der Methode der retrograden Färbung nutzt man die Wirkung des Fluoreszenzfarbstoffes 4 Di-10Asp (*N*-4-(4-didecylaminostyryl)-*N*-methylpyridium iodide) (Molecular Probes, Oregon), wie es bereits in vorherigen Studien beschrieben wurde (Naskar et al. 2002). Dieser lipophile Carbocyanin-Farbstoff kann retrograd in den Axonen transportiert werden und sich im Soma der RGZ anreichern (Kobbert and Thanos 2000). Dadurch lassen sich sowohl das Ausmaß der Degeneration der RGZ als Folge einer Sehnervenverletzung als auch deren Regenerationsbereitschaft durch die Auszählung der überlebenden Ganglienzellen bestimmen und somit Aussagen über die Morphologie der überlebenden Zellen treffen.

Nach den entsprechenden Zeitintervallen wurden die Tiere erneut durch *intraperitoneale* Applikation der oben genannten Anästhetika narkotisiert. Der Zugang zur *Orbita* bzw. zum Transplantatende wurde in der zuvor beschriebenen Weise sichergestellt. Das distale Nervenende, d. h. der Sehnervenstumpf bzw. das Transplantatende im Bereich des Zielgebietes, wurden mit einer Kapsulotomieschere (Gills-Welsh) erneut angefrischt.

An dieser Stelle wurde nun der fluoreszierende Farbstoff in kristalliner Form appliziert, mit einem organischen Lösungsmittel (unkomplettes Freund's Adjuvans, Sanofi) gelöst und mit Gelfoam (Manufacturer Johnson & Johnson) an der Applikationsstelle fixiert. Durch Diffusion wanderte der Farbstoff über die

bis dorthin ausgewachsenen Axone bis in das Soma der RGZ. Aufgrund bisheriger Studien wurde der *Bulbus* zehn Tage nach Applikation des lipophilen Farbstoffes enukleiert, um einen retrograden Transport zu gewährleisten (Vidal-Sanz et al. 1988; Kobbert and Thanos 2000).

### 3.2.1 Enukleation und Präparation des *Whole mounts*

Nach zehn Tagen wurden die Tiere mit einer CO<sub>2</sub>-Intubation getötet.

Der linke *Bulbus* wurde mit Hilfe einer Kapsulotomieschere (Gills-Welsh) enukleiert, damit anschließend unter sterilen Bedingungen die Retina als *Whole mount*-Präparat explantiert werden konnte.

Der *Bulbus* wurde in HBSS (Gibco) zunächst weitgehend von umliegendem Bindegewebe freipräpariert. Nach einer Inzision mit dem Skalpell (Klingengröße 11, Aesculap) im Bereich des *Limbus* wurde der *Bulbus* im vorderen Bereich mit einem zirkumferenten Schnitt eröffnet. Auf diese Weise ließen sich die vorderen Bulbusabschnitte von der Retina trennen.

Anschließend wurden vier radiäre Schnitte in einem Abstand von je 90° gesetzt, so dass eine flächige Ausbreitung der halbkugelförmigen Netzhaut auf einer Nitrozellulosemembran (Sartorius) möglich war. Durch zwei feine Uhrmacherpinzetten (Hermle) wurde vorsichtig die Retina von der Sklera abgetrennt und an der Papille mit einer Kapsulotomieschere (Gills-Welsh) vollständig abgelöst. Die Retina wurde mit der Ganglienzellschicht nach oben auf die Nitrozellulosemembran (Sartorius) kleeblattförmig ausgebreitet.

Zur besseren Haftung an dieser Membran wurde die Retina auf einem trockenen, weißen und sterilen Filterpapier (Whatman) abgelegt, um – ohne auszutrocknen – überschüssige Flüssigkeit abzusaugen. Residuen des Glaskörpers konnten vorsichtig mit einer feinen Uhrmacherpinzette (Hermle) von der Ganglienzellschicht extrahiert werden. Der Filter mit der aufliegenden Retina wurde in ein Fixiermedium (4%iges PFA in PBS) überführt und nach ca. zwei Stunden mit Mowiol 4-88 (Hoechst) auf einem Objektträger (Engelbrecht) aufgetragen.

### 3.2.2 Quantifizierung und Auswertung

Mit Hilfe des Mikroskopes Axiophot mit Epifluoreszenz (Zeiss) und dem FITC-Filter (Zeiss) konnten die mit 4Di-10ASP-angefärbten Ganglienzellen sichtbar gemacht werden. Die Zellen wurden mit einem Okulargitternetz mit dem 40-fachen Objektiv (400-fache Endvergrößerung) ausgezählt. Die Gesamtzahl der angefärbten RGZ entsprach der Zellzahl pro Retina.

Zur Dokumentation der Morphologie wurden die einzelnen RGZ in diversen Vergrößerungen fotografiert und mit Hilfe des Programmes Carl Zeiss Vision, Axio Vision Rel 4.5 bearbeitet.

### 3.3 **Anterograde Färbung**

Um die terminalen Verzweigungen der retinalen Axone darstellen und interpretieren zu können, wurde die anterograde Anfärbung mit dem fluoreszierenden Carbocyanine DiIC18 (3) ((1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), Molecular Probes) vorgenommen (Thanos and Bonhoeffer 1987).

Hierfür wurde der feste Farbstoff zunächst in einer phosphatgepufferten Salzlösung pH 7,4 (PBS) gelöst. Vor der Substanzapplikation in den *Bulbus* im Bereich des *Limbus* wurde zunächst etwas Kammerwasser mit einer Mikrokapillare abgesaugt, um durch die darauffolgende Farbstoffapplikation den Augeninnendruck nicht zu erhöhen.

#### 3.3.1 Enukleation und Kryoschnitte

Nach aktuellen Studien erreicht der Farbstoff nach zehn Tagen über einen anterograden Transport das terminale Axonende, so dass der *Bulbus* nach dieser Zeitspanne enukleiert werden konnte (Fischer et al. 2001).

Im unmittelbaren Anschluss wurde der *Bulbus* in flüssigem Stickstoff eingefroren und es wurden 30 µm dicke sagittale Gefrierschnitte des Sehnervs bzw. des Transplantates mit dem Kryostat (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) angefertigt. Die entsprechenden Zielgebiete wurden in identischer Weise aufbereitet.

### 3.3.2 Morphometrie und Auswertung

Die Kryostatschnitte wurden auf einem Objektträger (Engelbrecht) aufgebracht und mit dem Mikroskop Axiophot mit Epifluoreszenz (Zeiss) und dem FITC-Filter (Zeiss) analysiert. Die Präparate wurden entsprechend ihrem axonalen Verlauf analysiert und mit dem Programm Carl Zeiss Vision, Axio Vision Rel 4.5 fotografiert.

## 3.4 Immunhistochemie

Die Prozeduren für die Gewebeaufbereitung und die immunhistochemische Anfärbung wurde in Anlehnung an bereits bekannte vorherige Studien durchgeführt (Leon et al. 2000).

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf einer spezifischen Bindung eines nicht markierten Antikörpers an Membranantigenen bzw. anderen Proteinen im Gewebe. Der Zweitantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und bindet spezifisch an den unmarkierten Erstantikörper. Durch diese Komplexbildung lassen sich Membranantigene und andere Gewebeproteine im Fluoreszenzmikroskop darstellen.

### 3.4.1 Enukleation und Aufbereitung der Kryoschnitte

Nach den entsprechenden postoperativen Zeitintervallen wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und der *Bulbus* enukleiert. Der *Bulbus* wurde in Tissue-Tek (Sakura-Finetek) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gefrierschnitte von 12 µm wurden sagittal durch das mittlere Drittel des Auges mit dem Kryostat (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) geschnitten und auf gelatinisierten Objektträgern (Engelbrecht) abgelegt.

Die Immunhistochemie erfolgte nach einem standardisierten Protokoll.

#### Immunhistochemisches Protokoll:

1. Fixieren der Schnitte in -20°C kaltem Methanol (Merck) für 10 min
2. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für jeweils 3 x 5 min
3. Blocken mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Seromed) für 30 min
4. Entfernung der Blockierlösung
5. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für jeweils 3 x 5 min
6. Auftragen des Erstantikörpers in der entsprechenden Verdünnung
7. Inkubation bei 4°C in einem wasserdampfgesättigten Gefäß für 24 Stunden.
8. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für jeweils 3 x 5 min
9. Auftragen des Zweitantikörpers in der entsprechenden Verdünnung
10. Inkubation bei Raumtemperatur in einem wasserdampfgesättigten Gefäß bei Dunkelheit
11. Waschen der Schnitte in PBS, pH 7,4 für jeweils 3 x 5 min
12. Eindecken der Schnitte in Mowiol (DAPI-Zusatz: 5µl/ml)

Die folgenden monoklonalen Antikörper und Antiseren wurden verwendet, um die Morphologie der Retina und das Expressionsmuster der Proteine, die mit einer Regeneration und Degeneration assoziiert waren, zu bestimmen. Alle Kryoschnitte wurden doppelt gefärbt, wobei es sich bei dem Erstantikörper stets um anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) handelte. Der Erstantikörper wurde

mit TRITC rot fluoreszierend markiert, während der andere Erstantikörper entsprechend variierte. Die Kerne der retinalen Zellen wurden durch die Zugabe von *4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate* (DAPI; Sigma) in das Einbettungsmedium Mowiol gefärbt.

Antikörper:

I. Erstantikörper:

1. **GFAP** (*anti-gliai fibrillary acid protein*, developed in rabbit, SIGMA, G 9269, Verdünnung 1:80/ *anti-gliai fibrillary acid protein*, developed in mouse, SIGMA, G3893, Verdünnung 1:400)
2. **GAP 43** (*monoclonal Anti-GAP-43*, developed in mouse, SIGMA, G 9264, Verdünnung 1:500)
3.  **$\beta$ -III-Tubulin** (*monoclonal antibody III- $\beta$ -Tubulin*, developed in mouse, COVANCE, MMS-435P, Verdünnung 1:500)
4. **MAP 2** (*monoclonal anti-MAP 2*, developed in mouse, SIGMA, M 4403, Verdünnung 1:500)
5. **ChAT** (*polyclonal anti-choline acetyltransferase*, developed in goat, CHEMICON international, AB144P; Verdünnung 1:80)
6. **ISI 1** (*polyclonal anti-Isl 1*, developed in rabbit, CHEMICON international, AB 5754, Verdünnung 1:200)
7. **SMN 1** (*monoclonal SMN 1 antibody*, developed in mouse, Abnova, 5263-(2B11-2A9) Ab, Verdünnung 1:1000)
8. **LHX 3** (*polyclonal anti LHX 3*, developed in rabbit, CHEMICON international, AB 5758, Verdünnung 1:200)
9. **LHX 5** (*polyclonal anti LHX 5*, developed in rabbit, CHEMICON international, Verdünnung 1:200)

II. Zweitantikörper:

1. **TRITC** (*TRITC anti-rabbit*, SIGMA, T 6778, Verdünnung 1:400/ *TRITC anti-mouse*, SIGMA, T7782, Verdünnung 1:300)
2. **Cy 2** (*Cy TM2 goat anti-mouse*, Jackson Immuno Research, 56475, Verdünnung 1:50/ *Cy TM2 donkey anti-goat*, Jackson Immuno

Research, 54198, Verdünnung 1:200/ Cy TM2 goat anti-rabbit, Jackson Immuno Research, 50092, Verdünnung 1:200)

### 3.4.2 Morphometrie und Auswertung

Nach der Einbettung konnten die Objektträger (Engelbrecht) unter dem Mikroskop Axiophot (Zeiss) mit Epifluoreszenz analysiert werden. Mit Hilfe drei verschiedener Fluoreszenzfilter (395 bis 440 nm, 450 bis 490 nm, 510 bis 560 nm) ließen sich die Membranantigene bzw. Gewebeproteine, die mit den Antikörpern Komplexbindungen eingegangen waren, in den unterschiedlichen Netzhautschichten darstellen und mit dem Programm Carl Zeiss Vision, Axio Vision Rel 4.5 fotografieren.

## 3.5 **Statistische Auswertung**

### 3.5.1 Student's t-Test

Die Ergebnisse der retrograden Auswertung wurden als Mittelwert und Standardabweichung ausgedrückt. Statistische Analysen wurden in einem ungepaarten *t-Test* mit dem Programm SPSS 15.0 für Windows® durchgeführt. Dabei wurde ein *p-Wert* von  $< 0,05$  als statistisch signifikant angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Retrograde Färbung

Nach Abschluss der erforderlichen postoperativen Zeitintervalle wurden am distalen Nervenende, d. h. am Sehnervstumpf bzw. am Transplantatende im Bereich des Zielgebietes, 4 Di-10Asp-Kristalle platziert, so dass eine retrograde Anfärbung der RGZ über die gesamte Fläche der Retina erfolgte.

In allen Operationsgruppen zeigte sich eine erhöhte RGZ-Zahl mit einem abnehmenden Gradienten von zentral nach peripher entlang der retinalen Gefäßversorgung. Der Gradientenabfall ließ darauf schließen, dass der Farbstoff von den *retinofugalen* Enden der Axone gut aufgenommen und retrograd bis in die Zellkörper und dendritischen Verzweigungen transportiert werden konnte. Eine Diffusion des Farbstoffes in die extrazelluläre Matrix konnte nicht beobachtet werden. Dadurch kam es zu einer intrazellulären Speicherung des Farbstoffes ohne einen neurotoxischen Effekt.

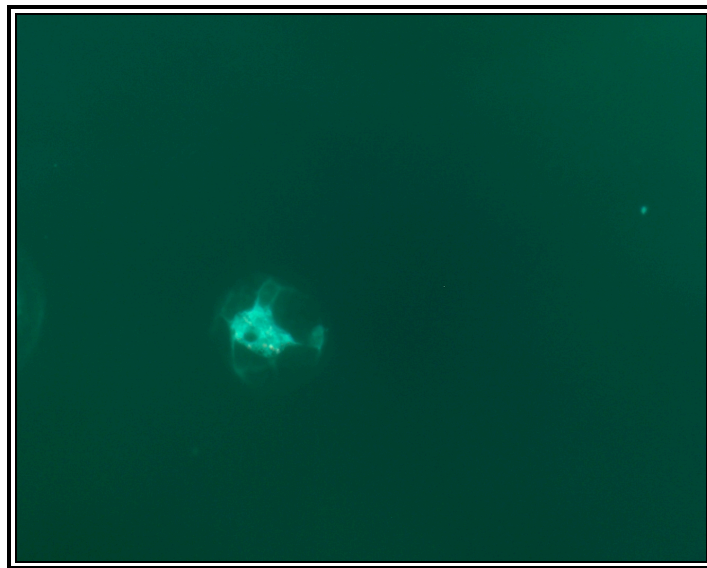
Nicht nur überlebende bzw. regenerierende RGZ ließen sich durch dieses Verfahren anfärben, sondern auch Mikrogliazellen, die bereits degenerierte RGZ phagozytiert hatten. Diese Zellen ließen sich morphologisch von den retinalen Ganglienzellen unterscheiden. Die normale retinale Ganglienzellzahl einer unbehandelten Netzhaut beträgt normalerweise bei einer Sprague Dawley Ratte mit einem Körpergewicht von ca. 200 g 77400 +/- 3120 RGZ pro Retina (Fischer 2000).

#### 4.1.1 Axotomie

In der Operationsgruppe, in der der Sehnerv vollständig durchtrennt wurde, ließ sich bei fünf Tieren nach 24 Wochen ein Überleben von RGZ durch das

retrograde Anfärben des durchtrennten Sehnervstumpfes mit 4 Di-10Asp-Kristallen darstellen. Es zeigte sich eine Zellzahl von 2, 34, 28, 187 und 136 RGZ/Retina (Mittelwert = 77,4 RGZ/Retina). Im Vergleich zu der Ganglienzellzahl einer unbehandelten, gesunden Retina kommt es zu einem signifikanten Verlust der RGZ.

Nach der durchgeführten Sehnervendurchtrennung unterschieden sich die RGZ morphologisch von den ursprünglichen RGZ. Die behandelten RGZ zeigten einen exzentrischen *Nukleus* sowie einen Mangel an Fortsätzen. Die Axone waren kurz. Dendritische Verzweigungen waren nur spärlich bis gar nicht vorhanden. Das Soma der Zellen erschien aufgetrieben und dysmorph verändert, so dass eine Chromatolyse erfolgt war (Abb. 5).



**Abb. 5:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach 24 Wochen nach der Durchführung einer Axotomie. Morphologisch präsentiert sich der degenerative Zustand der RGZ mit einer ausgeprägten Chromatolyse und einer Regression der dendritischen Fortsätze.

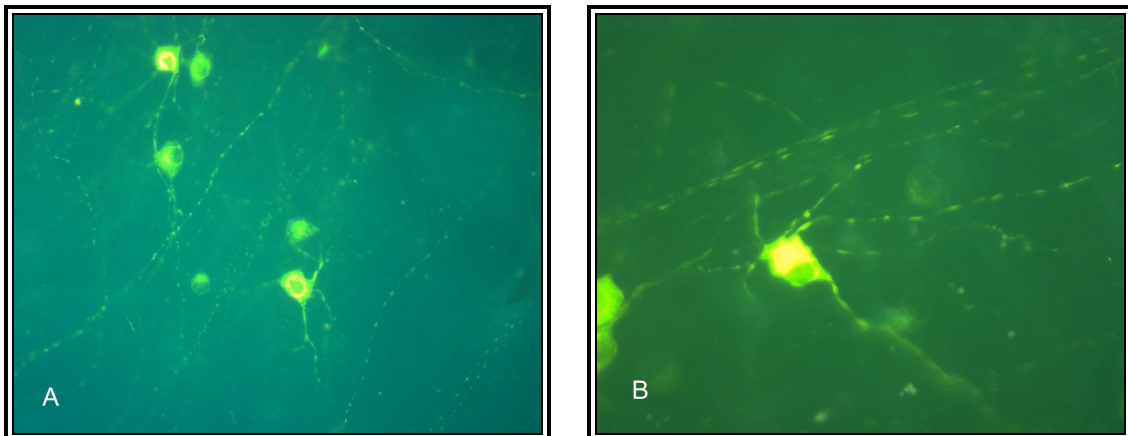
Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass degenerierte Ganglienzellen anhand ihrer morphologischen Veränderungen als solche identifiziert werden können.

#### 4.1.2 Blind endendes peripheres Nervenplantat

Nach der Applikation von 4 Di-10Asp-Kristallen an das distale Transplantatende, das ohne jeglichen Kontakt zu einem Zielgebiet in dem knöchernen Bohrkanal geschützt verblieb, ließen sich bei drei Tieren nach zehn Tagen markierte RGZ in der explantierten Retina nachweisen.

Pro Retina ließ sich in dieser Versuchsgruppe eine Zellzahl von 85, 132 und 1012 RGZ (Mittelwert = 409,7 RGZ/Retina) aufzeigen. Im Vergleich zur Zellpopulation der axotomierten RGZ kam es nach einem postoperativen Intervall von 24 Monaten durch die Transplantation mit einem peripheren Nerven zu einem signifikanten Anstieg ( $p=0,026$ ) der retinalen Zellzahl.

Diese RGZ traten mit einem ausgeprägten axonalen Wachstum auf. Die Dendriten überlagerten sich teilweise (Abb. 6).



**Abb. 6:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach 24 Wochen nach der Durchführung einer Transplantation mit blind endendem Zielgebiet.

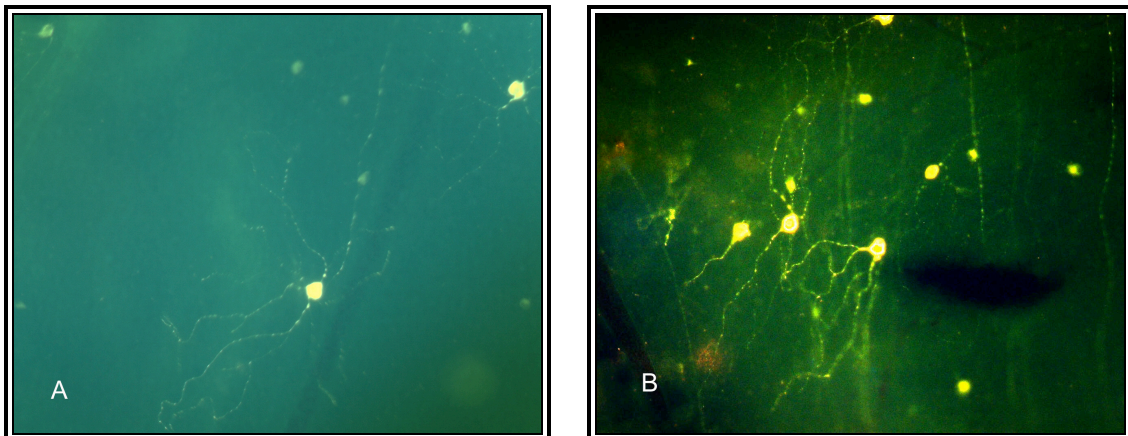
**A:** 10x Vergrößerung, **B:** 40x Vergrößerung.

Die RGZ verfügen morphologisch über ausgeprägte dendritische Verzweigungen, die sich teilweise überlagerten.

#### 4.1.3 Retinokortikale Verbindung mit einem peripheren Nerventransplantat

Wenn mit Hilfe des Ischiastransplantates eine Verbindung zum *Kortex* geschaffen wurde, entsprach die retinale Zellzahl bei insgesamt fünf Tieren 137, 151, 221, 298 und 615 RGZ (Mittelwert = 284,4 RGZ/Retina). Es ließ sich auch bei dieser Transplantation ein Trend bezüglich der ansteigenden Zellzahl durch das Transplantat erkennen, jedoch war diese Zunahme im Vergleich zur axotomierten Zellpopulation nicht signifikant.

Es zeigte sich nur eine geringe morphologische Änderung des natürlichen Aussehens der unbehandelten RGZ. Die Zellen glichen in ihrer Morphologie bipolaren Nervenzellen, die über ein langgestrecktes Axon in Richtung Sehnervenpapille wuchsen. Es wurden wenige dendritische Fortsätze bzw. nur ein einziger Dendrit ausgebildet (Abb. 7).



**Abb. 7:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach 24 Wochen nach der Durchführung einer Transplantation mit dem Zielgebiet *Kortex*.

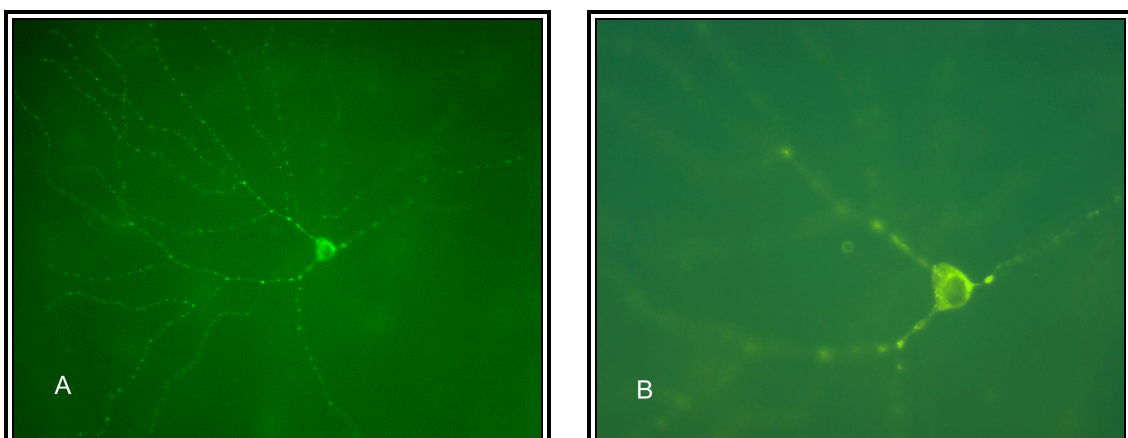
**A:** 10x Vergrößerung, **B:** 10x Vergrößerung.

Die RGZ weisen wenige dendritische Fortsätze auf und sind mit bipolaren Zellen vergleichbar.

#### 4.1.4 Retinomuskuläre Verbindung mit einem peripheren Nerventransplantat

Nachdem eine Verbindung des Sehnervstumpfes mit Hilfe des Transplantates zum *Musculus temporalis* geschaffen worden war, ließ sich bei fünf Ratten eine Zellzahl von 54, 68, 79, 232 und 380 RGZ/Retina (Mittelwert = 162,6 RGZ) nach einem postoperativen Zeitintervall von 24 Wochen bestimmen. Im Vergleich zur Sehnervendurchtrennung zeigte sich bei der Transplantation mit dem Zielgebiet Muskel ein Trend für einen Anstieg der retinalen Ganglienzellzahl nach 24 Wochen. Bei einer Verbindung zum Muskelgewebe kam es gegenüber der Transplantation mit blind endendem Zielgebiet zu einem signifikanten Anstieg ( $p=0,034$ ) der retinalen Zellzahl.

Die angefärbten RGZ zeigten sich gegenüber den normalen Zellen vergrößert. Ihre dendritischen Fortsätze verzweigten sich sternförmig über die gesamte Retina. Im Vergleich zu den unbehandelten Ganglienzellen vergrößerten sich auch die Zellkörper massiv. Es wurden jedoch auch RGZ mit wesentlich geringerer Größe beobachtet. Dieses deutete daraufhin, dass sich in diesen Netzhäuten unterschiedliche Zelltypen anfärben ließen. In dieser Gruppe waren die postoperativen morphologischen Veränderungen am eindrucksvollsten zu erkennen (Abb. 8).



**Abb. 8:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach 24 Wochen nach der Durchführung einer Transplantation mit dem Zielgebiet Muskel nach 24 Wochen. **A:** 20x Vergrößerung, **B:** 40x Vergrößerung.

Die RGZ weisen viele dendritische Verzweigungen auf, die sie über weite Bereiche der Netzhaut ausspannen.

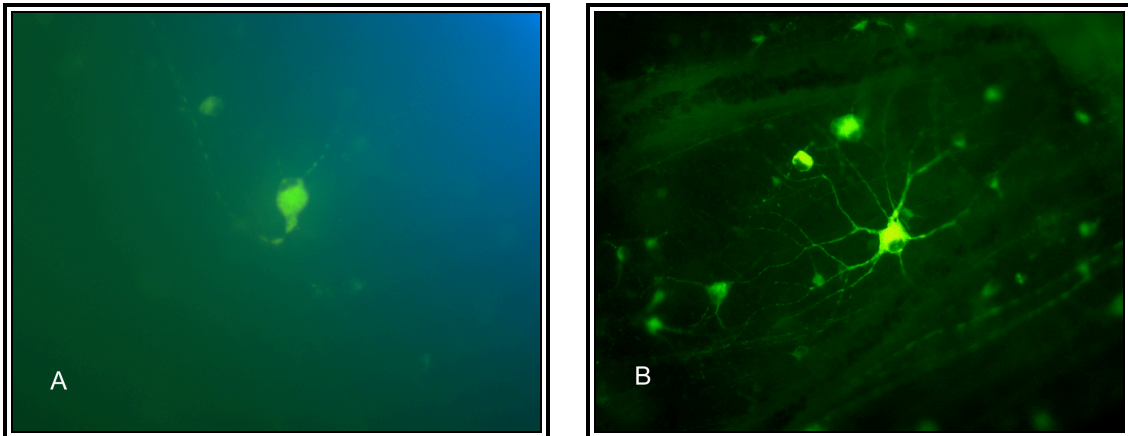
#### 4.1.5 Sehnervenquetschung

In diesem Degenerationsmodell erfolgte ein deutlicher Verlust der RGZ und ein vermehrtes Auftreten von angefärbten Mikrogliazellen, die bereits einen Teil der RGZ phagozitiert hatten.

Nach einer postoperativen Zeitspanne von einer Woche ließen sich noch 3678, 3798 und 8240 RGZ/Retina (Mittelwert = 5238,7 RGZ) anfärben. Innerhalb der vierwöchigen postoperativen Zeitspanne wurden nur noch 108, 204, 2788, 3407 und 4589 RGZ/Retina (Mittelwert = 2219,2 RGZ) bei insgesamt fünf getesteten Ratten gesehen. Bei vier Tieren ergaben sich nach einer postoperativen Verweildauer von 24 Wochen die Zellzahlen 156, 164, 32 und 404 RGZ/Retina (Mittelwert = 261 RGZ).

Während der Verlust der angefärbten RGZ nach einer Woche im Vergleich zu dem Verlust nach vier Wochen nur als Trend erschien, ließ sich ein hoch signifikanter Abfall ( $p < 0,01$ ) der retinalen Zellzahl zwischen der zeitlichen Periode von vier und 24 Wochen erkennen. Der ausgeprägte Verlust der RGZ mit einer stetigen Abnahme im zeitlichen Verlauf ließ sich graphisch im Boxplot darstellen. Dabei zeigte sich aber, dass die einzelnen Zellzahlen eine große Streubreite in den ersten beiden postoperativen Zeitintervallen hatten, was für eine ausgesprochene Dynamik bezüglich der frühen degenerativen Ereignisse sprach (Abb. 12).

Dass die RGZ einen Mangel an Zellfortsätzen mit einem dysmorphen Zellkörper im Sinne einer Chromatolyse aufwiesen, charakterisiert dieses degenerative Modell. Bereits nach einer Verweildauer von einer Woche war dieser Zusammenhang zu sehen (Abb. 9 A). Diese morphologischen Veränderungen entsprachen denen der Sehnervendurchtrennung. Vereinzelt konnten während dieser Periode noch RGZ mit mehrfachen dendritischen Verzweigungen dargestellt werden (Abb. 9 B).

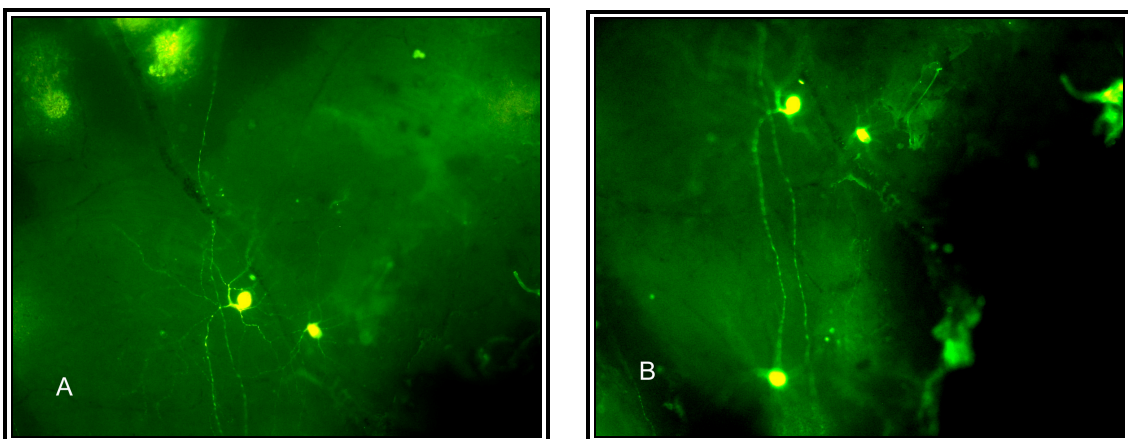


**Abb. 9:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach einer Woche nach der Durchführung einer Sehnervenquetschung.

**A:** 20x Vergrößerung, **B:** 20x Vergrößerung.

Nach einer Woche zeigen sich neben den degenerativ veränderten dysmorphen RGZ (A) auch wenige RGZ, die noch über dendritische Verzweigungen verfügen (B).

Vier Wochen später konnten die wenigen noch überlebenden RGZ mit ihren langgestreckten Fortsätzen, mit denen sie einzelne interneuronale Kontakte bildeten (Abb. 10B), retrograd markiert werden. Ein komplexes interneuronales Netzwerk konnte aber nicht dargestellt werden.

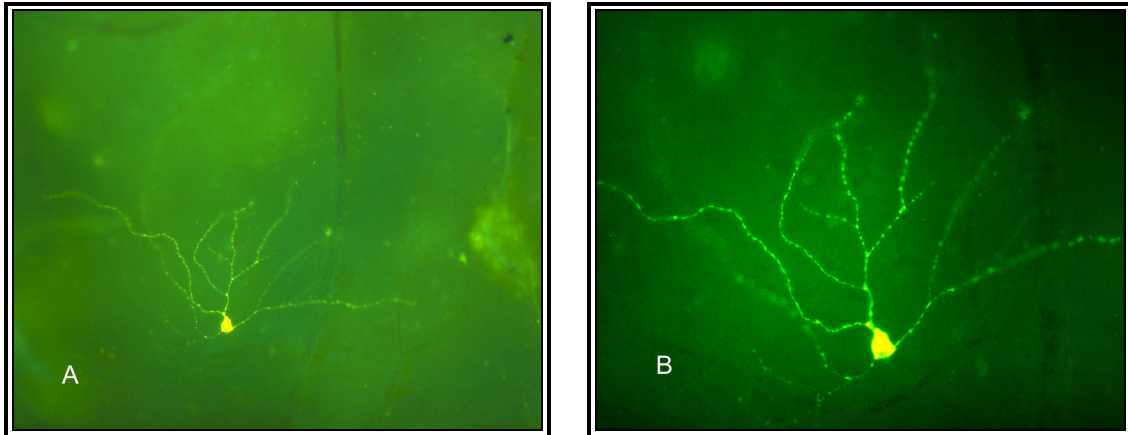


**Abb. 10:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach vier Wochen nach der Durchführung einer Sehnervenquetschung.

**A:** 10x Vergrößerung, **B:** 10x Vergrößerung.

Die markierten RGZ besitzen wenige, aber langgestreckte Fortsätze, über die sie vereinfachte Verbindungen mit einer weiteren Zelle ausbilden können.

Im weiteren postoperativen Verlauf konnte bei wenigen RGZ eine baumartige dendritische Verzweigungstendenz beobachtet werden (Abb. 11). Bereits nach einer Woche wurde eine dysmorphe Veränderung bei den RGZ festgestellt. Nach 24 Wochen war der größte Anteil der RGZ massiv degeneriert (Abb. 9 A).



**Abb. 11:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach 24 Wochen nach der Durchführung einer Sehnervenquetschung.

**A:** 10x Vergrößerung, **B:** 20x Vergrößerung.

Vereinzelte RGZ sind in der Lage, ihre dendritischen Enden baumartig zu verzweigen.

#### 4.1.6 Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel

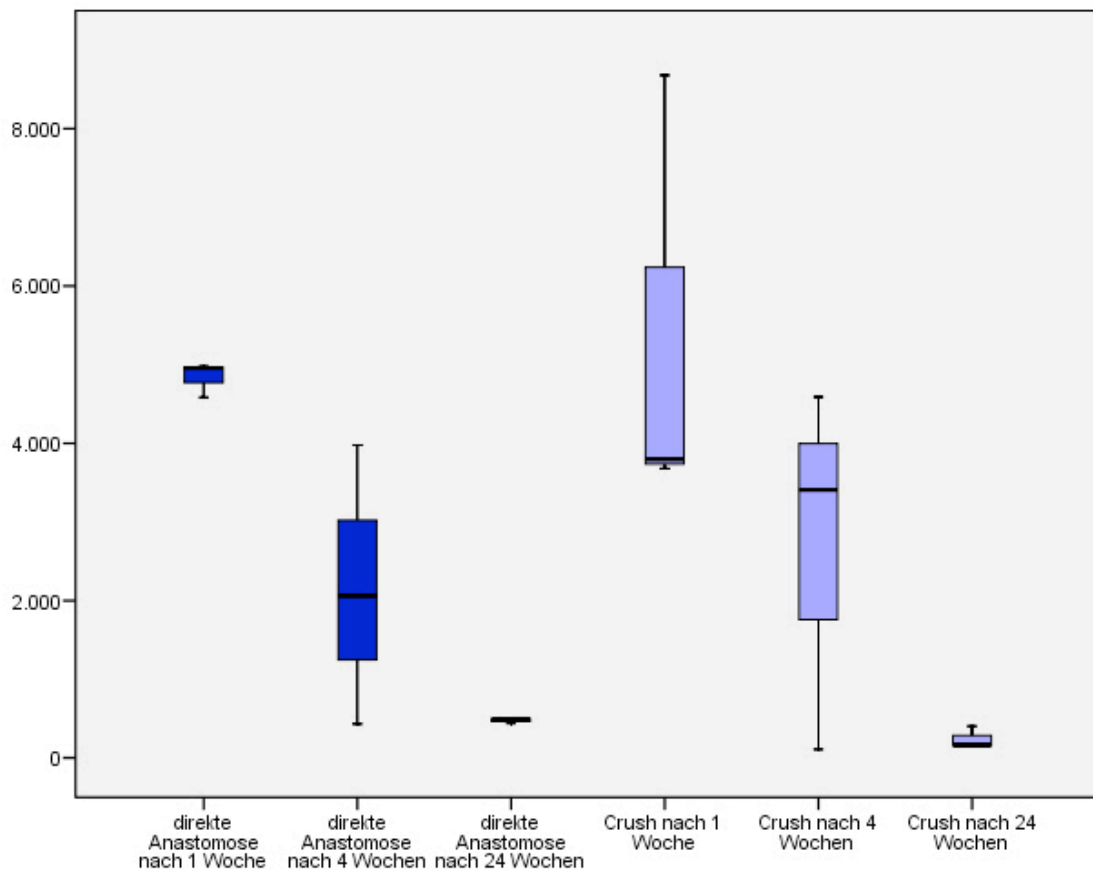
Bei der direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes mit dem Muskelgewebe ohne die Verwendung eines peripheren Nerventransplantates ließen sich die Netzhäute bei allen getesteten Ratten retrograd anfärben.

Nach einem Zeitintervall von einer Woche konnten 4584, 4956 und 4980 RGZ/Retina (Mittelwert = 4840 RGZ) beobachtet werden. Innerhalb von vier Wochen kam es zu einer weiteren Abnahme der Zellzahl von 432, 2061, 2994, 3689, 3978 und 4021 RGZ/Retina (Mittelwert = 2862,5 RGZ). Wurden die 4 Di-10Asp-Kristalle erst 24 Wochen nach der durchgeführten direkten Verbindung platziert, waren nur noch 387, 438, 488 und 512 RGZ/Retina (Mittelwert = 261 RGZ) zu sehen. Daraus ergab sich ein signifikanter Verlust der RGZ-Zahl ( $p < 0,05$ ) zwischen der postoperativen Zeitspanne von vier und 24 Wochen.

Ebenfalls setzte in den ersten vier Wochen ein nicht signifikanter Zellverlust ein, der jedoch als ein Trend angesehen werden konnte.

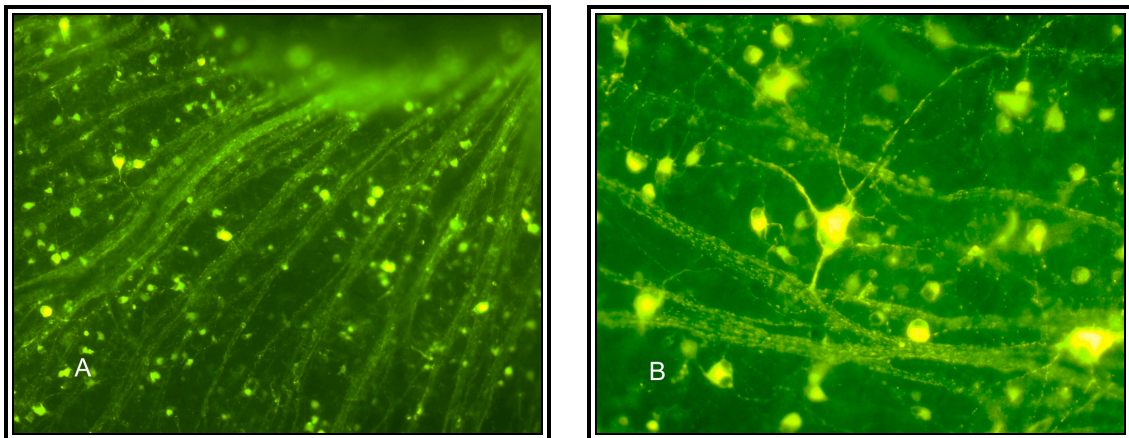
Im Vergleich zur Sehnervenquetschung konnte nur bei der direkten Verbindung zu dem Muskelgewebe nach vier und 24 Wochen ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) der retinalen Zellpopulation nachgewiesen werden, während sich nach einer Woche lediglich ein Trend für eine Zunahme der RGZ erkennen ließ.

Im dargestellten Boxplot konnte der hohe Verlust der Zellen, der vor allem nach einem Zeitintervall von 24 Wochen auftrat, graphisch aufgezeigt werden. Im ersten und letzten Zeitintervall kam es zu einer geringen Streubreite. Im Gegensatz dazu präsentierten sich die dynamischen Ereignisse nach vier Wochen mit einer intensiven Streufähigkeit (Abb. 12).



**Abb. 12:** Quantifizierung der retrograd markierten RGZ-Zahlen nach einer direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskelgewebe und nach einer Sehnervenquetschung im zeitlichen postoperativen Verlauf.

Nach einer postoperativen Verweildauer von einer Woche waren nur wenige chromatolytische RGZ vorhanden. Die meisten retrograd angefärbten RGZ dieser Versuchsgruppe zeigten langgestreckte Fortsätze, mit denen die Zellen ein umfangreiches interneuronales Netzwerk bildeten (Abb. 13).

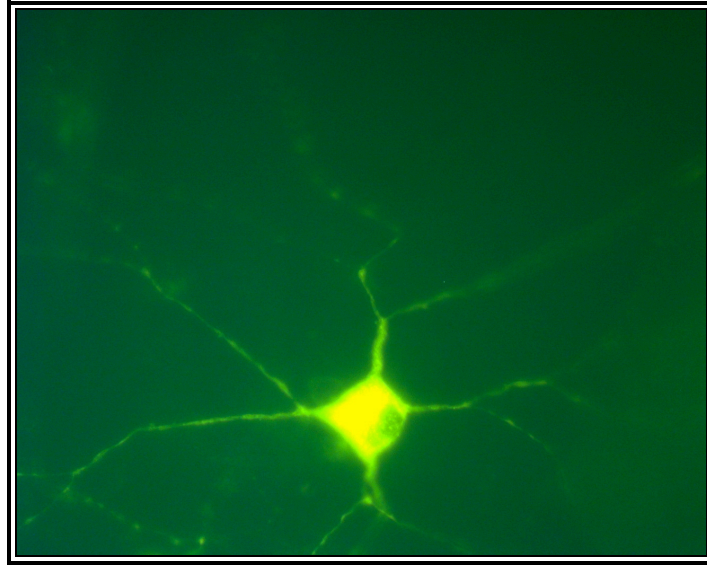


**Abb. 13:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach einer Woche nach der Durchführung einer direkten Verbindung zum Muskel.

**A:** 5x Vergrößerung, **B:** 20x Vergrößerung.

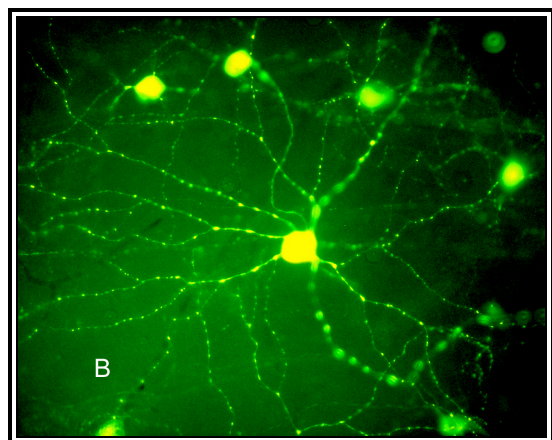
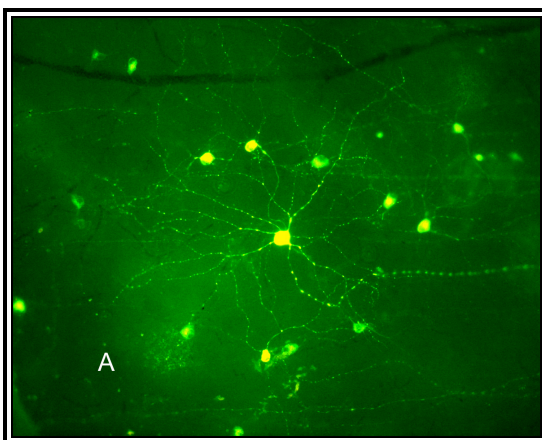
Die retrograd markierten RGZ bilden über langgestreckte Fortsätze ein interneuronales Netzwerk aus.

Innerhalb von vier Wochen war dieses interneuronale Netzwerk zwischen den RGZ weniger ausgeprägt. Bei einigen der RGZ wuchsen ihre dysmorphen Fortsätze so, dass diese RGZ für die Bildung eines neuen Netzwerkes ausfielen. Ein großer Anteil der RGZ verfügte über mehrfache dendritische Verzweigungen, die sich im zeitlichen Verlauf stärker ausprägten (Abb. 14).



**Abb. 14:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach vier Wochen nach der Durchführung einer direkten Verbindung zum Muskel. Die RGZ zeigt einige dendritische Verzweigungen.

Nach 24 Wochen breiteten sich die RGZ mit ihren stark ausgebildeten baumartigen Dendriten großflächig über die Netzhaut aus und interagierten über diese Fortsätze im interneuronalen Netzwerk (Abb.15). Es bestand eine morphologische Ähnlichkeit mit den RGZ, die ihre Verbindung zum Zielgebiet Muskelgewebe mit einem peripheren Nervenimplantat überbrückten (Abb. 8). Je länger die postoperative Verweildauer war, desto großflächiger breiteten sich die Zellen mit ihren zahlreichen Fortsätzen aus.

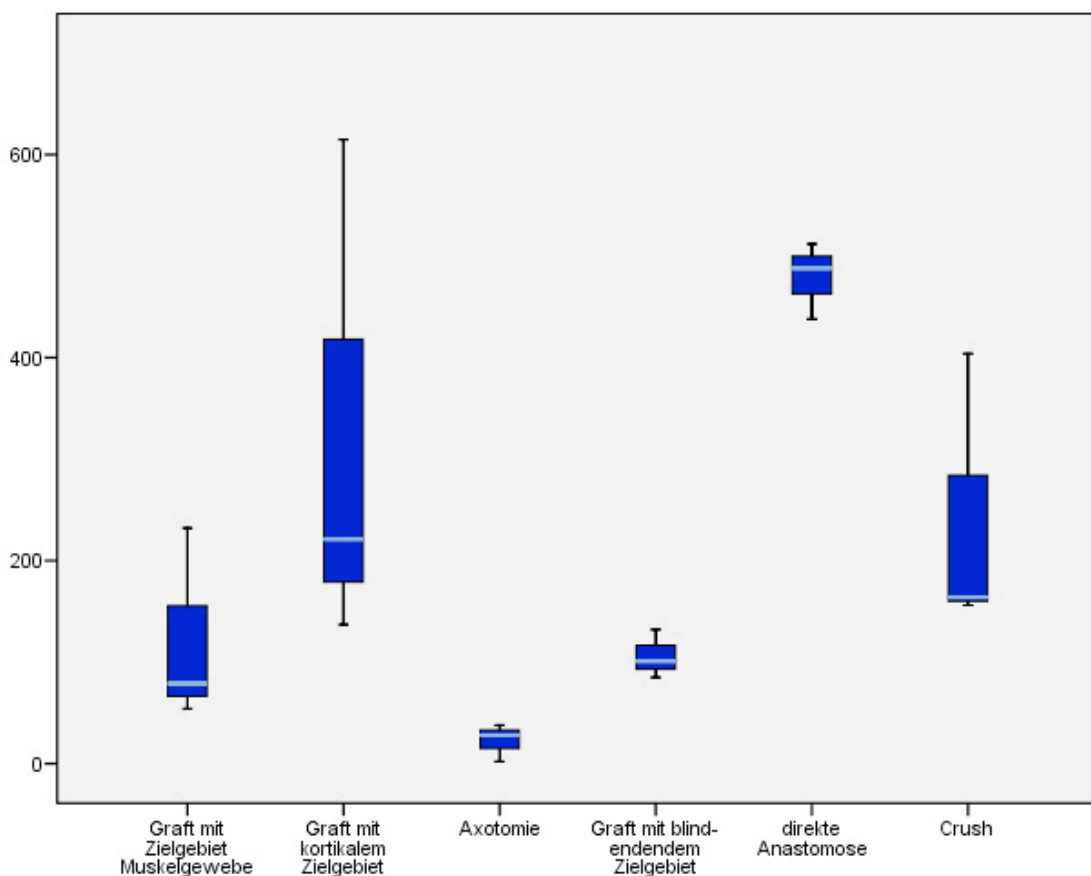


**Abb. 15:** Retrograd markierte RGZ mit 4 Di-10Asp nach 24 Wochen nach der Durchführung einer direkten Verbindung zum Muskel.

**A:** 10x Vergrößerung, **B:** 20x Vergrößerung.

Die dendritischen Fortsätze bilden sich mit einer flächigen Spannweite über die Retina aus.

Bezüglich der RGZ-Zahl ließ sich zusammenfassend sagen, dass im Vergleich zu den degenerativen Operationen das retinale Überleben durch die Hilfe eines peripheren Nervenimplantates intensiviert werden konnte. Entsprechend des jeweiligen Zielgebietes konnte die Zunahme der RGZ-Zahl unterschiedlich ausgeprägt sein, wobei dabei der Kontakt zum kortikalen Gewebe die beste Wirkung auf das Überleben der RGZ hatte. Die höchste RGZ-Zahl konnte durch die direkte Verbindung zum Muskel erzielt werden (Abb. 16).



**Abb. 16:** Quantifizierung der retrograd markierten RGZ-Zahlen nach den operativen Eingriffen nach einer postoperativen Verweildauer von 24 Wochen.

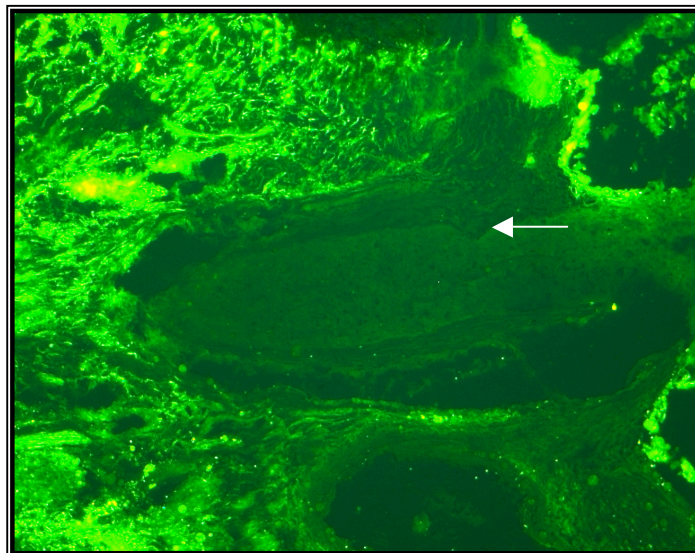
## 4.2 Anterograde Färbung

Bei dieser Auswertungsmethode wurde der fluoreszierende Farbstoff DilC18 verwendet, um eine Anfärbung der Axone der RGZ durch einen anterograden Transport zu ermöglichen. Von Interesse war dabei, wie und in welcher Dichte die Axone verliefen, sowie ob sie die Läsionsstellen überquerten bzw. in das Transplantat sowie in das entsprechende Zielgebiet einwuchsen.

Nach der jeweiligen postoperativen Verweildauer wurde der gelöste Farbstoff intravitreal appliziert. Nach einem zehntägigen Transport des Farbstoffes wurde der *Bulbus* enukleiert. In allen Präparaten konnten die Fasern der RGZ angefärbt werden.

### 4.2.1 Axotomie

Bei fünf Tieren konnten die Axone nach einer durchgeführten Sehnervendurchtrennung anterograd angefärbt werden, wobei deren Faserdichte nach 24 Wochen im Vergleich zu den Fasern des unbehandelten Sehnervs deutlich verringert war. An den äußeren Rändern des durchtrennten Sehnervs ließen sich vereinzelte ungebündelte Fasern anfärben, die sich aber nur kurzstreckig und nicht über die Gesamtlänge des Sehnervenstumpfes ausgebildet hatten. Insgesamt wirkten die Sehnervstümpfe angedaut und aufgetrieben (Abb. 17).

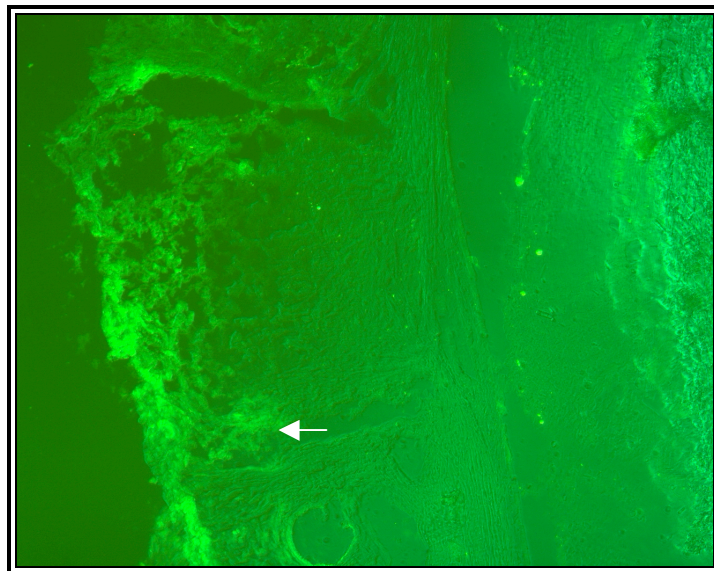


**Abb. 17:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs 24 Wochen nach einer Axotomie (10x Vergrößerung).

Der Sehnerv wirkt aufgetrieben und plump. Es lassen sich nur wenige Fasern, die die Läsionsstelle (Pfeil) überqueren, mit Hilfe des Dil-Farbstoffes im äußeren Bereich des Sehnervs dargestellt.

#### 4.2.2 Blind endendes peripheres Nerventransplantat

Bei der Verwendung eines blind endenden peripheren Nerventransplantates konnten die mit Dil angefärbten Axone die Läsionsstelle überbrücken und in das neurotrophe blind endende Transplantat einwachsen. Charakteristisch war in diesem Fall ein geordneter Faserverlauf parallel zum Transplantat. Je weiter sich die Fasern vom Sehnervenstumpf entfernten, desto geringer wurde die Faserdichte, bis es sogar zu einem Wachstumstopp im distalen Transplantatende kam. Demzufolge konnte kein Axon das Transplantat am distalen blinden Ende erreichen und weiter in die Peripherie wachsen (Abb. 18).



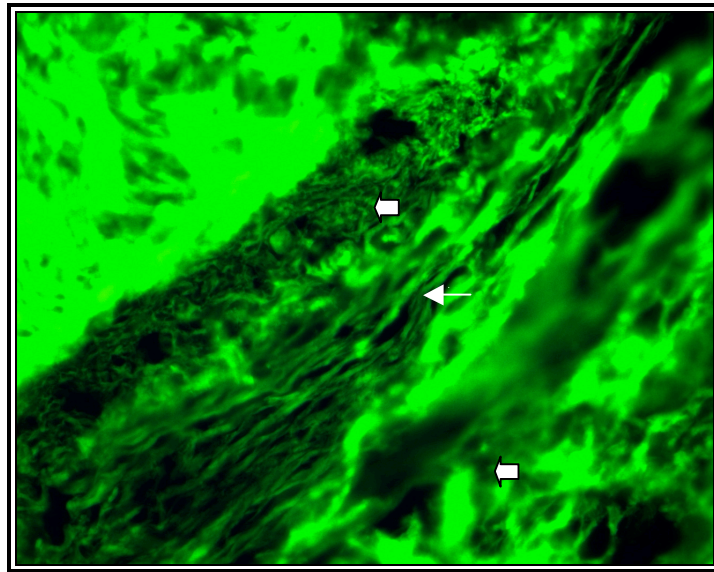
**Abb. 18:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs 24 Wochen nach einer Transplantation mit blind endendem Zielgebiet (10x Vergrößerung).

Im Bereich des distalen Transplantatendes verkümmern die markierten Axone (Pfeil).

#### 4.2.3 Retinokortikale Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat

Es wurde neben dem *Bulbus* auch das komplette periphere Nerven­transplantat sowie das *kortikale* Zielgebiet nach 24 Wochen entnommen und analysiert, um einen Faserverlauf entlang eines Nerven­transplantates in das *kortikale* Gewebe darzustellen.

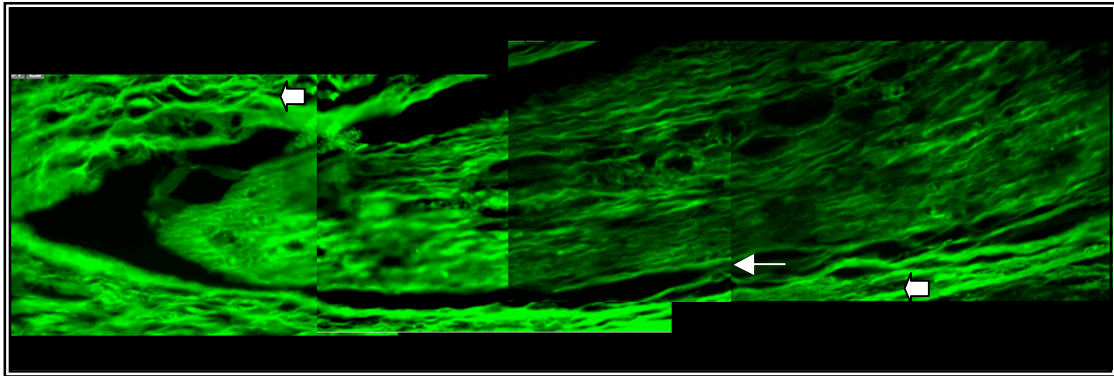
In dieser Gruppe wurden die Sehnerven von insgesamt drei Tieren anterograd markiert, wobei eine Vielzahl der Fasern sichtbar wurde. Bis zu der Läsionsstelle ließ sich ein enormes axonales Wachstum in Richtung des Transplantates nachweisen. An dieser Stelle konnten jedoch einzelne Nervenfasern nicht isoliert dargestellt werden, da sie in dicht gepackten Bündeln verliefen. Mit abnehmender Dichte elongierten die Axone in parallelem Verlauf durch das Transplantat hindurch, wie bereits in der Gruppe des blind endenden peripheren Nerven­transplantates gezeigt werden konnte (Abb. 19).



**Abb. 19:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs 24 Wochen nach einer Transplantation mit Zielgebiet *Kortex* (20x Vergrößerung). Longitudinales Wachstum der Axone (Pfeil) durch das periphere Nerven­transplantat in Richtung *kortikalem* Zielgebiet (Blockpfeile).

Einige Fasern legten auch die Strecke über die zweite Verbindungsstelle zurück und erreichten somit das *kortikale* Gewebe. Die retinalen Axone, die diese

enorme Strecke zurücklegten, waren rar und an ihren terminalen Enden aufgetrieben und verdickt. Eine Penetration ins *kortikale* Gewebe konnte nicht sicher dargestellt werden (Abb. 20).

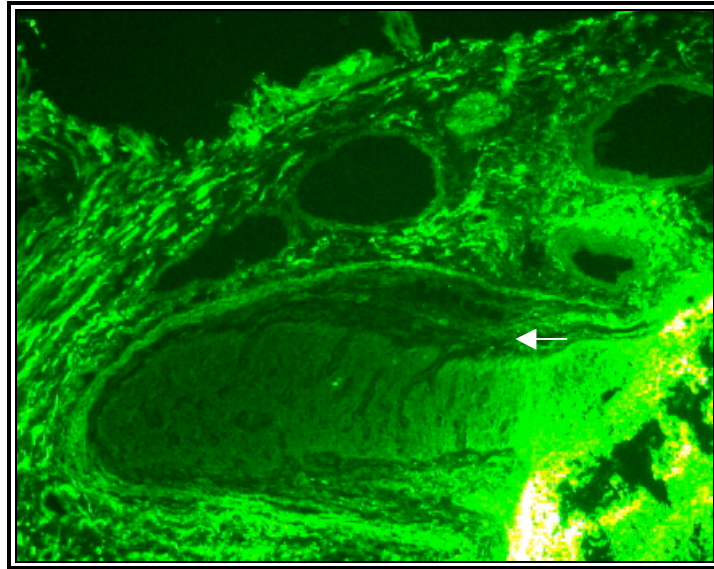


**Abb. 20:** Montage des *kortikalen* Zielgebietes 24 Wochen nach der Transplantation (20x Vergrößerung). Eine Penetration der Fasern (Pfeil) ins *kortikale* Gewebe (Blockpfeil) konnte nicht eindeutig beobachtet werden.

#### 4.2.4 Retinomuskuläre Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat

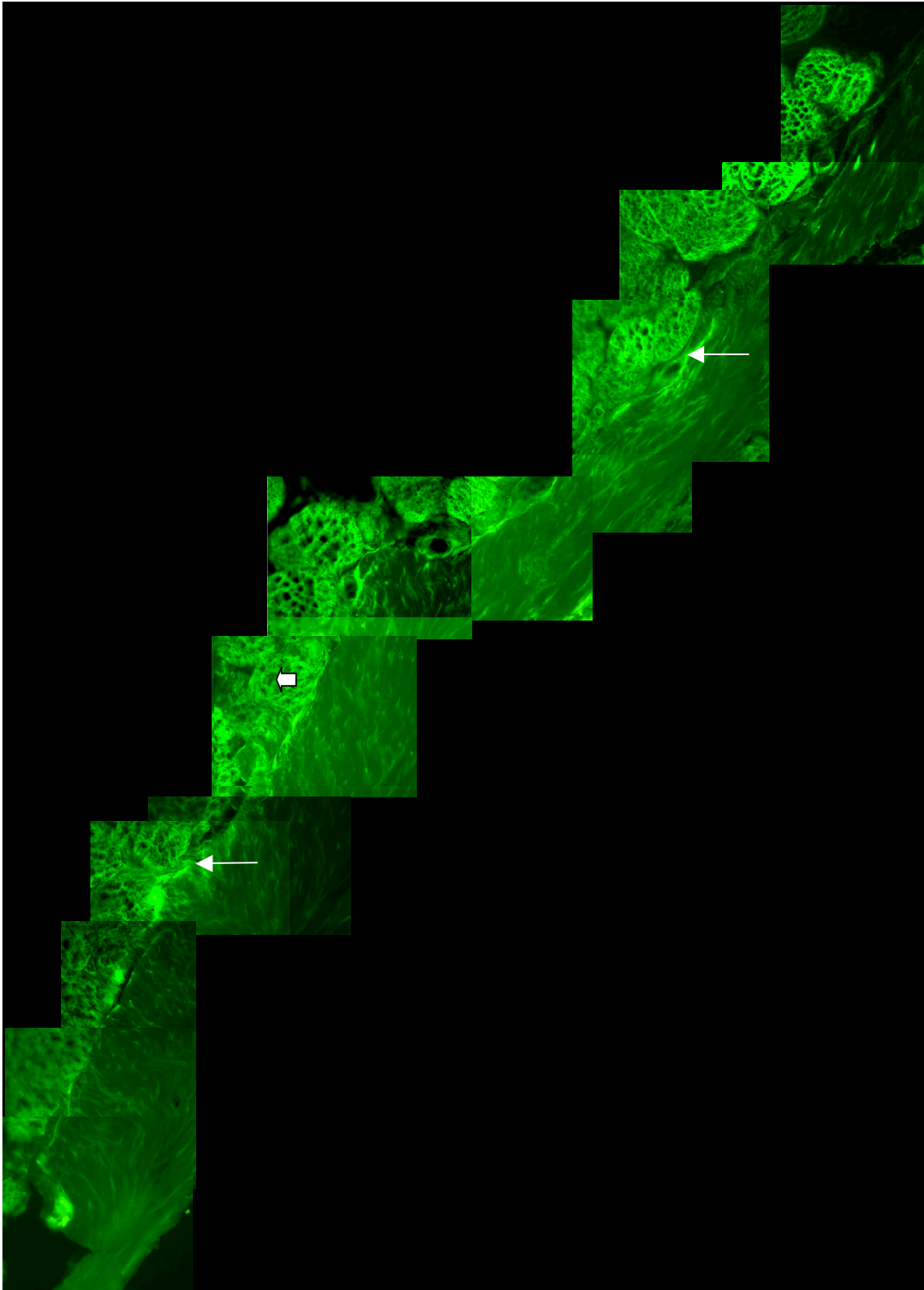
Nachdem der Sehnerv anterograd markiert worden war, wurde neben dem *Bulbus* auch das komplette periphere Nerven­transplantat inklusive des muskulären Zielgebietes entnommen.

Entsprechend der bisher vorliegenden Ergebnisse zeigte sich auch bei diesem Transplantationsverfahren ein Faserverlauf über die Läsionsstelle entlang des peripheren Nerven­transplantates mit einer abnehmenden Faserdichte in Richtung Peripherie. Wie bereits beim Kontakt mit dem *kortikalen* Gewebe beobachtet wurde, konnten die Axone aus dem Transplantat heraus in Richtung Zielgebiet weiterwachsen (Abb. 21).



**Abb. 21:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs 24 Wochen nach einer Transplantation mit dem Zielgebiet Muskel (10x Vergrößerung). Die Faserdichte der Axone nimmt in die periphere Richtung kontinuierlich ab (Pfeil).

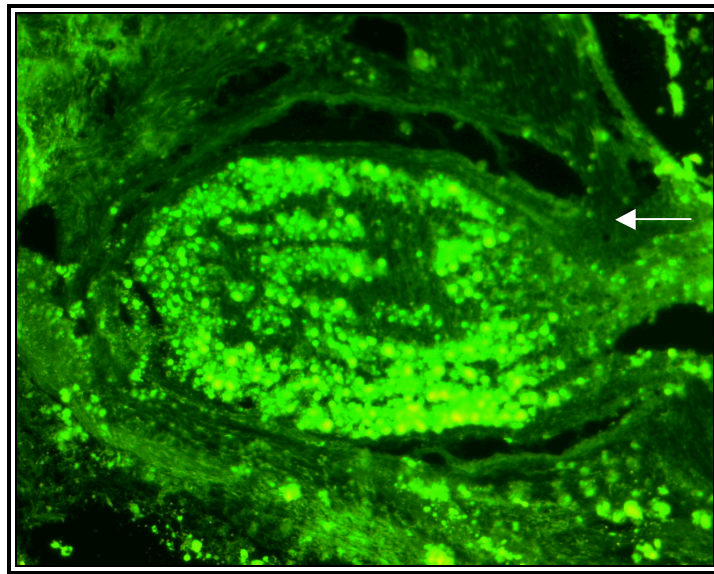
Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein geringer Faseranteil sogar das Fremdgebiet, das Muskelgewebe, penetrierte. Der größte Anteil der noch übrig gebliebenen Fasern beendete jedoch sein Wachstum kurz vor Erreichen des fremden Zielgebietes (Abb. 22).



**Abb. 22:** Montage des Zielgebietes Muskel (Blockpfeil) 24 Wochen nach der Transplantation (40x Vergrößerung). In einigen Bereichen kommt es zu einer Penetration des Muskels als Zielgebiet durch die Fasern (Pfeile).

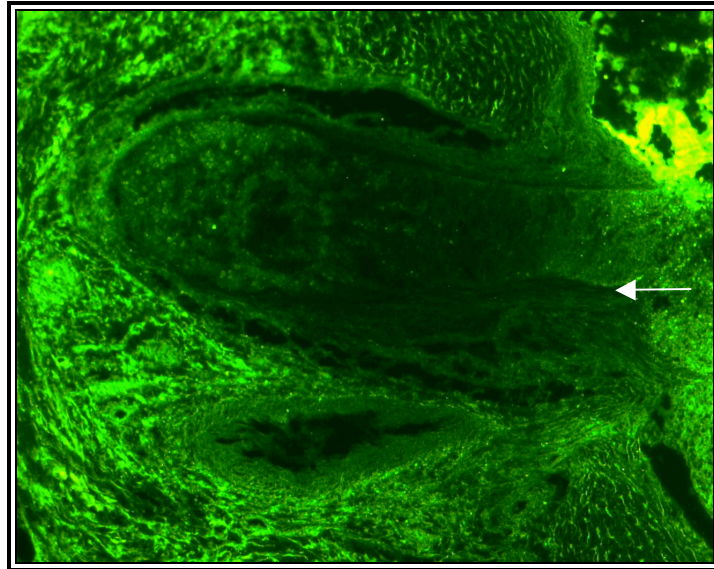
#### 4.2.5 Sehnervenquetschung

Durch die anterograde Markierung ließen sich Fasern der RGZ anfärben. Im Bereich der zuvor erzeugten Nervenkompressionsstelle kam es zu einem abrupten Wachstumsstopp, so dass distal dieser Lokalisation keine Fasern mehr nachweisbar waren (Abb. 23). Daraus resultierte ein degenerativer Prozess der retinalen Ganglienzellen.

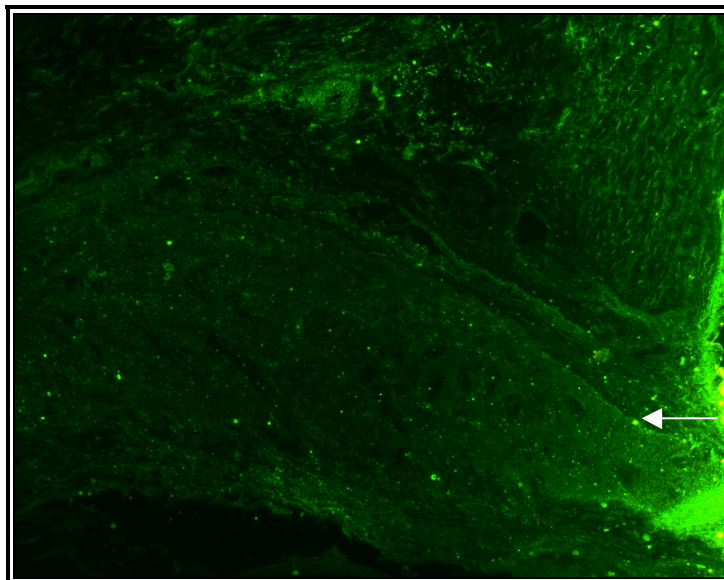


**Abb. 23:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs eine Woche nach einer Sehnervenquetschung (10x Vergrößerung). Es besteht eine abrupte Unterbrechung der markierten Fasern distal der Kompressionsstelle (Pfeil).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender postoperativer Verweildauer das Faserwachstum auch proximal der Läsionsstelle massiv abnahm (Abb. 24, 25).



**Abb. 24:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs vier Wochen nach einer Sehnervenquetschung (10x Vergrößerung). Die Axone nehmen auch proximal der Kompressionsstelle bezüglich ihrer Dichte deutlich ab (Pfeil).

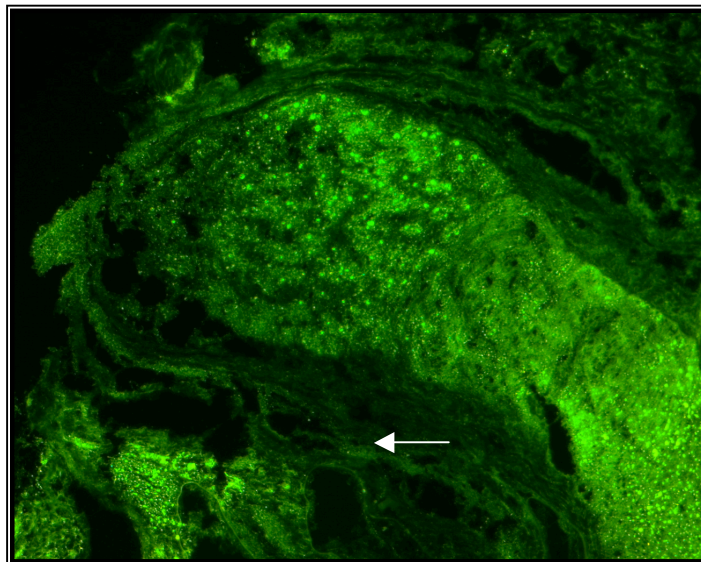


**Abb. 25:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs 24 Wochen nach einer Sehnervenquetschung (10x Vergrößerung). Die Axone nehmen weiterhin proximal der Kompressionsstelle bezüglich ihrer Dichte deutlich ab (Pfeil).

#### 4.2.6 Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel

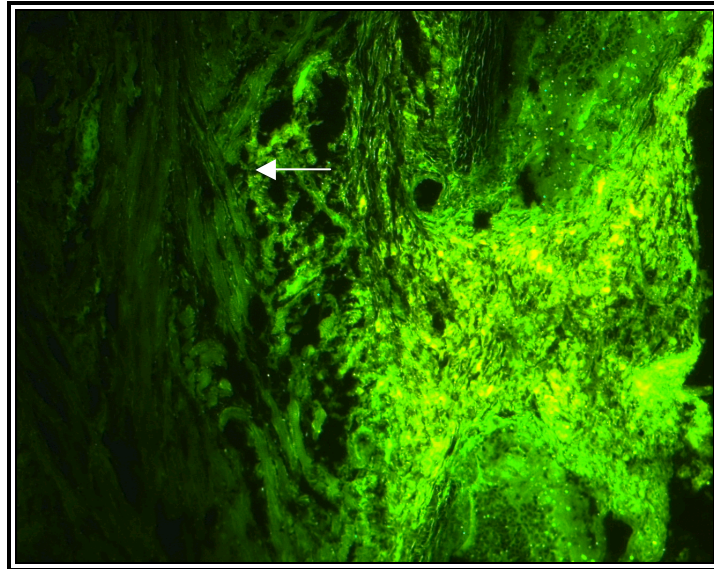
Wurde der Sehnervenstumpf direkt mit dem Muskelgewebe verbunden, fand nach einer anterograden Markierung in allen Präparaten eine positive Anfärbung der Axone statt.

Die Fasern waren ungeordnet, weniger gebündelt und netzartig verteilt. Sie unterschieden sich deutlich von dem Faserverlauf innerhalb des peripheren Nerventransplantates. Es konnten aber auch hier Fasern beobachtet werden, die das Muskelgewebe bereits nach einer Woche erreichten. Mit zunehmender postoperativer Zeit nahm die Zahl der Axone im Muskelgewebe ab (Abb. 26-28).

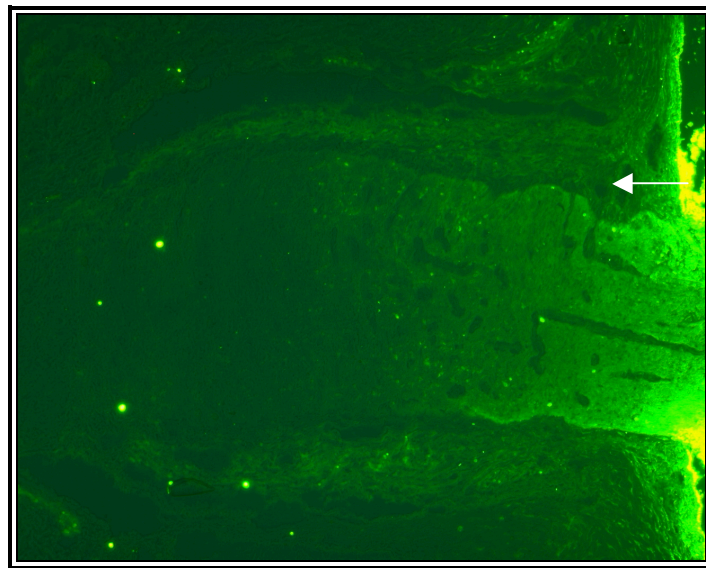


**Abb. 26:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs eine Woche nach einer direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel (10x Vergrößerung).

Die anterograd markierten Fasern elongieren ungeordnet in Richtung Muskelgewebe (Pfeil).



**Abb. 27:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs vier Wochen nach einer direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel (10x Vergrößerung). Die anterograd markierten Fasern erreichen das Zielgebiet Muskel (Pfeil).



**Abb. 28:** Übersichtsaufnahme eines anterograd markierten Sehnervs nach 24 Wochen nach einer direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel (10x Vergrößerung). Die Faserdichte nimmt nach einer Verlängerung des postoperativen Zeitintervalls auf 24 Wochen ab (Pfeil).

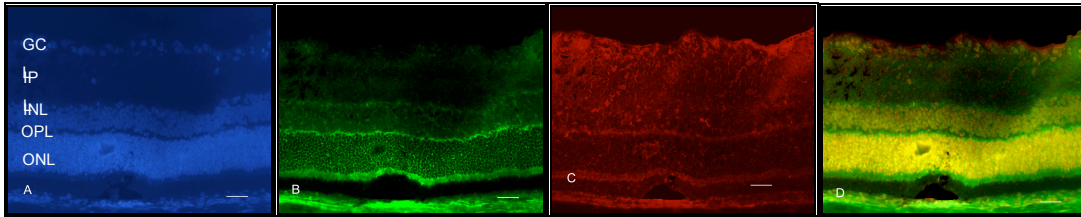
### 4.3 Immunhistochemie der explantierten Retina

Durch die Immunhistochemie der explantierten Retina wurden die Proteine im retinalen Gewebe mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Der Nachweis beruhte auf der Affinität zwischen einem entsprechenden Antikörper und einer bestimmten Gewebeeigenschaft, dem Epitop. Dieses führte zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Mit dieser Methode konnte auch genau das Kompartiment der retinalen Zelle bestimmt werden, in dem das entsprechende Protein lokalisiert war, das mit dem Antikörper eine Bindung einging. Transkriptionsfaktoren im Zellkern färbten nur den Zellkern an, während membranständige Proteine Teile der Zellmembran markierten. Im Idealfall kam es zu einer spezifischen und stabilen Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Es sollte ein Signal nur am Ort des Epitops in ausreichender Stärke erkennbar werden. Der Antikörper sollte sich durch eine hohe Spezifität und Affinität auszeichnen und keine Kreuzreaktion mit ähnlichen Epitopen zeigen.

Neben neuronspezifischen Antikörpern wurden auch motoneuronspezifische Antikörper verwendet, um retinale Proteine, die während der verschiedenen Operationsverfahren in unterschiedlicher Weise translatiert wurden, analysieren zu können. Die unbehandelte Netzhaut, die aus dem rechten *Bulbus* enukleiert wurde, diente als Referenz. Durch eine semiquantitative Bestimmung wurden die Intensitäten der Antikörperreaktionen als negativ oder einfach bis dreifach positiv charakterisiert (Tab. 1, 2).

#### 4.3.1 Kontrollretina

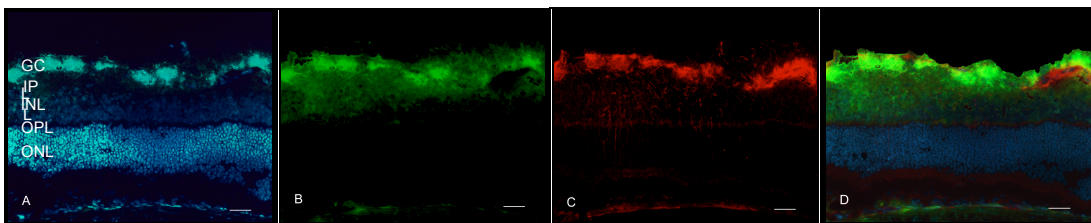
Der Antikörper GFAP ist ein Marker für Astrozyten im normalen ZNS-Gewebe. In der unbehandelten Netzhaut, die als Kontrollretina diente, war die Immunreaktivität für anti-GFAP auf das Zweifache erhöht und markierte die Astrozyten und Müllerzellen in der Ganglienzellschicht. GAP 43 ist ein Protein der axonalen Wachstumskegel. Dieses Protein konnte in der inneren plexiformen Schicht der Kontrollretina zweifach positiv angereichert werden.



**Abb. 29:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper GAP 43 (Maßstab 50  $\mu\text{m}$ )

**A:** Dapi-Färbung **B:** GAP-43 **C:** GFAP **D:** Merge

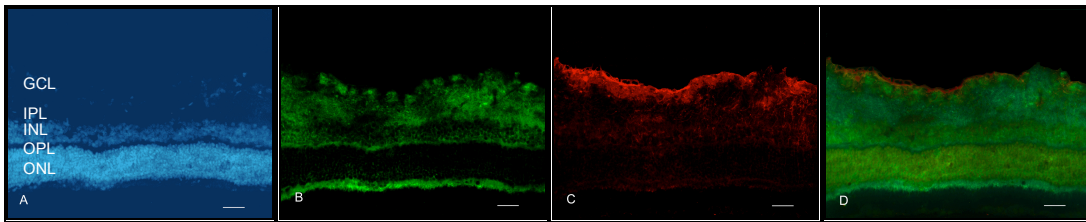
Durch die zweifach positive Aktivität von  $\beta$ -III-Tubulin, ein neuronspezifischer Antikörper, konnten Mikrotubulin-Strukturen im Bereich der Ganglienzellschicht dargestellt werden.



**Abb. 30:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper  $\beta$ -III-Tubulin (Maßstab 50  $\mu\text{m}$ )

**A:** Dapi-Färbung **B:**  $\beta$ -III-Tubulin **C:** GFAP **D:** Merge

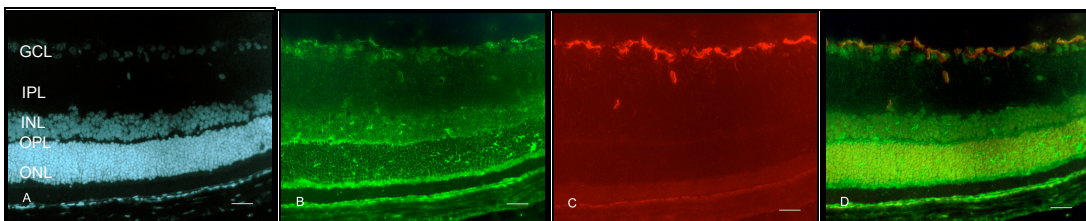
MAP 2 ist einer der wichtigsten Mikrotubulin-assoziierten Proteine. Durch die Aktivität von MAP 2 in der Kontrollretina konnten die Elemente des Zytoskeletts wie das Neurofilament und Aktin in der inneren und äußeren plexiformen Schicht, im Pigmentepithel sowie in der Choroidea und Sklera nachgewiesen werden.



**Abb. 31:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper MAP 2 (Maßstab 50  $\mu\text{m}$ )

**A:** Dapi-Färbung **B:** MAP 2 **C:** GFAP **D:** Merge

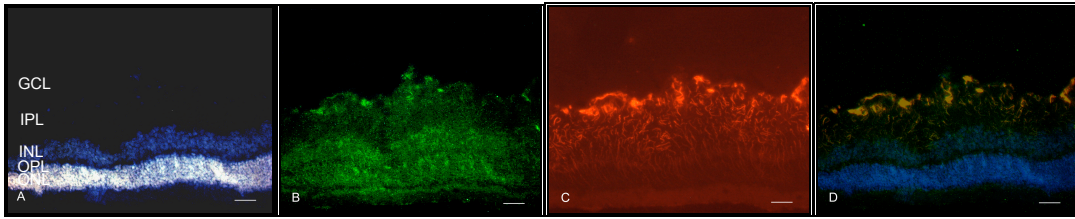
Anti-Choline Acetyltransferase ist ein Antikörper, der cholinerge Neurone im Gehirn und im zentralen Nervensystem sowie amakrine Zellen markiert. So konnte der Antikörper ChAT auch cholinerge Neurone in der unbehandelten Netzhaut anfärben. Es zeigte sich in jeder Kontrollretina eine dreifache Aktivität dieses Proteins in der Ganglienzellschicht sowie in der inneren nukleären und plexiformen Schicht. Jedoch waren nicht in allen Schnittebenen einer Kontrollretina cholinerge Zellen angeschnitten.



**Abb. 32:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper ChAT (Maßstab 50  $\mu\text{m}$ )

**A:** Dapi-Färbung **B:** ChAT **C:** GFAP **D:** Merge

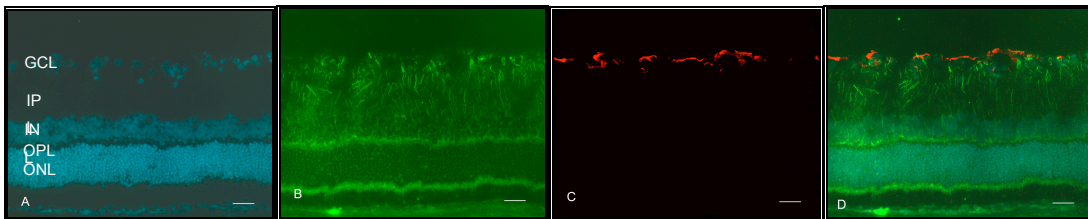
Im Einklang mit bereits bestehenden Arbeiten zur retinalen Ganglienzellforschung konnte auch in der hier vorliegenden Studie der Antikörper Isl 1 mit einer einfachen bzw. schwachen Aktivität in der Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren nukleären Schicht beobachtet werden. Isl 1 ist ein in der LIM Region enthaltener Transkriptionsfaktor, der motoneuron-spezifisch ist.



**Abb. 33:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper Isl 1 (Maßstab 50 µm)

**A:** Dapi-Färbung **B:** Isl 1 **C:** GFAP **D:** Merge

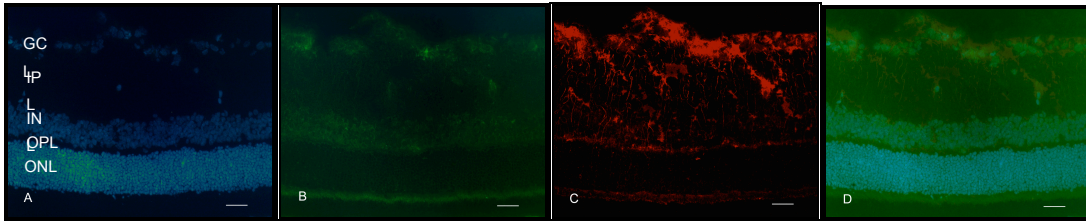
Anti-LHX 3 ist ein Antikörper, der den Transkriptionsfaktor LHX 3 in der LIM Region 3 erkennt. In der Ganglienzellschicht und der inneren sowie äußeren plexiformen Schicht der unbehandelten Netzhaut konnte die Aktivität des Proteins LHX 3 dargestellt werden. Das Protein LHX 3 läßt sich in Zellen nachweisen, die motorische Funktionen besitzen. Zu diesen Zellen zählen Motoneurone und Interneurone.



**Abb. 34:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper LHX 3 (Maßstab 50 µm)

**A:** Dapi-Färbung **B:** LHX 3 **C:** GFAP **D:** Merge

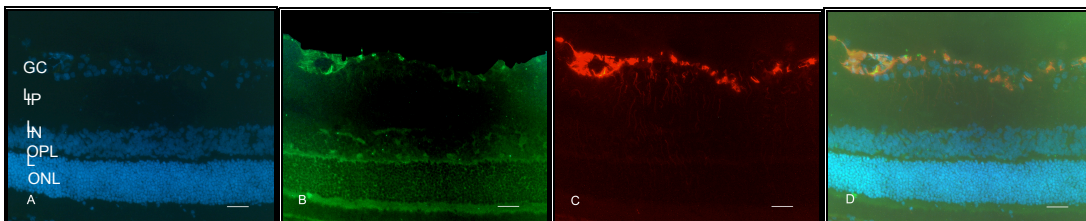
SMN 1 ist ein monoklonaler Antikörper, der zum Nachweis des Überlebens von Motoneuronen bei der spinalen Muskelatrophie verwendet wird. Das Signal für den Antikörper SMN 1 war in den unbehandelten Netzhäuten mit einer einfach positiven Intensität im Bereich der Ganglienzellschicht sowie der inneren nukleären Schicht nur schwach zu erkennen.



**Abb. 35:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper SMN 1 (Maßstab 50 µm)

**A:** Dapi-Färbung **B:** SMN 1 **C:** GFAP **D:** Merge

Der Antikörper LHX 5 markiert den in der LIM Region 5 enthaltenen Transkriptionsfaktor. Seine Aktivität konnte in der Kontrollretina im Bereich der Ganglienzellschicht und der inneren sowie äußeren plexiformen Schicht sichtbar gemacht werden.



**Abb. 36:** Immunhistochemische Auswertung der Kontrollretina mit dem Antikörper LHX 5 (Maßstab 50 µm)

**A:** Dapi-Färbung **B:** LHX 5 **C:** GFAP **D:** Merge

#### 4.3.2 Axotomie

In Astrozyten und Müllerzellen erhöhte sich die GFAP-Expression nach der Durchtrennung des Sehnervs auf einen dreifach positiven Wert im Vergleich zur unbehandelten Kontrollretina. Eine zusätzliche Hochregulierung von GFAP konnte in den Müllerzellen der durchtrennten Retinae als Nachweis für eine RGZ-Regeneration gefunden werden. Die Immunreaktivität für anti-GAP 43 stieg ebenfalls im Vergleich zur unbehandelten Netzhaut dreifache positiv an. Der Aktivitätsanstieg des Proteins GAP 43 könnte auf eine Zunahme der axonalen Wachstumskegel hinweisen. Durch die Zunahme der mikrotubulären

Strukturen in der Netzhaut nach einer Sehnervendurchtrennung verstärkte sich das Signal für  $\beta$ -III-Tubulin in der inneren plexiformen Schicht auf das Dreifache. Für das wichtige Mikrotubulin, das MAP 2 Protein, zeigte sich jedoch eine Intensitätsabnahme, was auf eine Regression der dendritischen Verzweigung schließen ließ. Das Signal für den Antikörper ChAT konnte nur minimal bis gar nicht dargestellt werden. Isl1 wurde nach einer Sehnervendurchtrennung zweifach positiv angeregt, so dass von einer erhöhten Expression des in der LIM Region vorhandenen Transkriptionsfaktors ausgegangen werden konnte. Die Aktivität der LHX 3 markierten Strukturen war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollretina identisch. Die Expression des motoneuronspezifischen Proteins SMN 1 konnte zweifach positiv verbessert werden. Die Präsenz von LHX 5 konnte mit zweifacher Intensität nachgewiesen werden.

#### 4.3.3 Blind endendes peripheres Nerventransplantat

Bei dieser Transplantationsgruppe zeigte sich die angefärbte Netzhaut ebenfalls dreifach positiv für den anti-GFAP in der Ganglienzellschicht. Mit dieser Aktivierung konnten vermehrt Astrozyten und Müllerzellen dargestellt werden. Durch den Anstieg von GAP 43 in der inneren plexiformen Schicht konnten eine Axogenese und eine Regeneration nach einer blind endenden peripheren Nerventransplantation nachgewiesen werden. Die Intensität von  $\beta$ -III-Tubulin erreichte ebenfalls dreifach positive Werte durch die Unterstützung des peripheren Nerventransplantates. Das Signal für MAP 2 blieb konstant zweifach positiv, so dass die zytoskelettalen Komponenten für die dendritischen Verzweigungen nicht vermehrt expremiert wurden. ChAT positive Bereiche waren mit einer zweifachen Intensität zu erkennen und konnten somit den Nachweis für cholinerge Neurone in der transplantierten Netzhaut erbringen. Die Aktivität für Isl 1 stimmte mit den Ergebnissen der unbehandelten Netzhaut überein. LHX 3 ließ sich mit einem dreifach positiven Wert messen, wodurch die Expression des Transkriptionsfaktors in der LIM Region 3 nach blind endender peripherer Nerventransplantation hochreguliert wurde. Die Fluoreszenz von

SMN 1 und LHX 5 lag bei einer zweifachen Intensität, die sich damit im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollretina verstärkte.

#### 4.3.4 Retinokortikale Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat

Wie bereits in der Transplantationsgruppe mit blind endendem Zielgebiet gezeigt werden konnte, waren die Signale für anti-GFAP und anti-GAP 43 auch bei einem Kontakt zum *Kortex* dreifach angestiegen. Dadurch ließen sich Astrozyten und Müllerzellen sowie die axonalen Wachstumskegel deutlich vermehrt markieren. Das Mikrotubulin-assoziierte Protein  $\beta$ -III-Tubulin wurde vermehrt expremiert, sofern eine Verbindung zum *Kortex* geschaffen wurde. Die mit MAP 2 markierten Bereiche zeigten eine zweifach positive Fluoreszenz, so dass die dendritische Verzweigungsbereitschaft durch den Kontakt zum *kortikalen* Gewebe aktiviert wurde. Durch die mit ChAT gefärbten Strukturen konnten auch in dieser Transplantationsgruppe cholinerge Neurone nachgewiesen werden. Das Signal für den Antikörper Isl 1 intensivierte sich um das Zweifache. Die verstärkte Immunreaktivität des Antikörpers LHX 3 ließ eine Zunahme der Expression seines Transkriptionsfaktors in der LIM Region vermuten. Das motoneuronspezifische Protein SMN 1 präsentierte sich mit einer Aktivitätssteigerung nach der durchgeführten Transplantation. Durch die Verbindung des peripheren Nerven­transplantates mit einem Zielgebiet kam es zu einer erhöhten Expression des Proteins LHX 5 auf das Dreifache. Die LIM Region 5 reguliert die neuronale Differenzierung und Migration während der Entwicklung des ZNS, was sich in dieser Gruppe durch den Kontakt zum *kortikalen* Gewebe verstärken ließ.

#### 4.3.5 Retinomuskuläre Verbindung mit einem peripheren Nerven­transplantat

Sofern der Sehnervstumpf mit Hilfe des peripheren Nerven­transplantates mit dem fremden muskulären Zielgebiet in Verbindung stand, konnte auch hier eine dreifach positive Immunreaktivität für die Antikörper GFAP und GAP 43

nachgewiesen werden. Durch diese nicht anatomische Verbindung kam es demzufolge zu einem Anstieg der RGZ-Regeneration mit einer axonalen Wachstumsbereitschaft. Nicht nur axonale Strukturen wurden vermehrt aktiviert, sondern auch die Proteine der zytoskelettalen Strukturen der Dendriten wie  $\beta$ -III-Tubulin und MAP 2 konnten zweifach positiv angefärbt werden. Die Intensivierung der immunhistochemischen Markierung für cholinerge Neuronen konnte mit Hilfe des ChAT Antikörpers bei einer Verbindung zum Muskelgewebe aufgezeigt werden. Im Vergleich zu den anderen Transplantationsgruppen konnte durch den Kontakt zum Muskelgewebe keine Signalverstärkung auf den Antikörper Isl 1 erzielt werden. Die Expression des Transkriptionsfaktors in der LIM Region 3 wurde durch die *retinomuskuläre* Verbindung hochreguliert. Eine ähnliche Aktivitätssteigerung konnte auch für den motoneuronspezifischen Antikörper SMN 1 dargestellt werden. In Anlehnung an die Resultate der *retinokortikalen* Verbindung konnte auch beim muskulären Zielgebiet eine vermehrte Präsenz für das Signal des Proteins LHX 5 erreicht werden. Das deutete auf eine neuronale Differenzierung und Migration während der Entwicklung des ZNS hin.

#### 4.3.6 Sehnervenquetschung

In diesem Degenerationsmodell zeigte sich nach einer postoperativen Verweildauer von sieben Tagen, dass alle Präparate einen dreifach positiven Wert für GFAP aufwiesen und damit die Astrozyten und Müllerzellen in der Ganglienzellschicht markierten. In dieser frühen postoperativen Phase kam es zu einem dreifachen Anstieg der Immunreaktivität für anti-GAP 43 und anti- $\beta$ -III-Tubulin als Hinweis auf eine axonale Wachstumstendenz. Eine Veränderung der Expression konnte für die folgenden Proteine MAP 2, Isl 1, LHX 3 und SMN 1 im Vergleich zu der unbehandelten Netzhaut nicht erfaßt werden. Die Aktivität der Acetyltransferase konnte durch die vermehrte Anfärbung cholinergischer Zellen verdeutlicht werden. Als Hinweis auf die neuronale Differenzierung konnte eine Signalverstärkung für den Antikörper LHX 5 dargestellt werden.

Nach einer postoperativen Zeitspanne von vier Wochen blieb die Intensität des Signals für anti-GFAP, anti-GAP 43 und anti- $\beta$ -III-Tubulin auf das Dreifache erhöht. Die Expression des Mikrotubulin-assoziierten Proteins MAP 2 verringerte sich nach vier Wochen auf einen einfach positiven Wert, so dass eine Regression der Dendriten angenommen wurde. Die Aktivität der Acetyltransferase war nach einer durchgeführten Sehnervenquetschung nach vier Wochen sehr variabel. Im Vergleich zur Sehnervenquetschung nach einer Woche und zur unbehandelten Retina konnten tendenziell weniger cholinerge Neurone markiert werden. Das Signal für Isl 1 konnte auf das Zweifache gesteigert werden. Die Expression des Transkriptionsfaktors der LIM Region 3 und des Proteins SMN 1 konnte durch die Zunahme der postoperativen Verweildauer hochreguliert werden. Die Intensität des Antikörpers LHX 5 blieb im Verlauf der postoperativen Zeitspanne stabil.

Nach 24 Wochen konnten Astrozyten und Müllerzellen weiterhin durch die Antigen-Antikörper-Reaktion mit GFAP angefärbt werden. Die axonalen Wachstumskegel wurden durch das dreifach positive Signal von anti-GAP 43 markiert. Die Reaktion des Proteins  $\beta$ -III-Tubulin blieb auch nach 24 Wochen konstant erhöht. Durch den erneuten Anstieg des Antikörpers MAP 2 nach einer Verlängerung des postoperativen Intervalls auf 24 Wochen konnte von einer zweiten Phase des dendritischen Wachstums ausgegangen werden. Nach 24 Wochen wurden cholinerge Neurone in der behandelten Netzhaut nachgewiesen. Im weiteren postoperativen Verlauf ergab sich bezüglich der Expression des Proteins Isl 1 keine Veränderung. Die Aktivitäten für die Antikörper LHX 3 und LHX 5 blieben im Vergleich zur vierwöchigen postoperativen Zeitspanne konstant. Nach 24 Wochen reduzierte sich das Signal für den Antikörper SMN 1 wieder auf die Ausgangswerte der Sehnervenquetschung nach einer Woche bzw. der Kontrollretina.

#### 4.3.7 Direkte Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel

Nach der Herstellung einer direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes mit dem Muskelgewebe zeigte sich nach einer postoperativen Zeitspanne von einer

Woche eine dreifach positive Aktivität für die Antikörper GFAP und GAP 43. Da sich diese Proteine über den weiteren postoperativen Verlauf von 24 Wochen auf diesem erhöhten Aktivitätsniveau konstant hielten, wurde eine stabile RGZ-Regeneration und eine weitere Ausbildung axonaler Wachstumskegel angenommen. Das Signal für  $\beta$ -III-Tubulin war initial entsprechend der Kontrollretina auf das dreifach Positive angestiegen, fiel jedoch nach 24 Wochen wieder auf die Ausgangswerte der Kontrollretina ab. MAP 2 stabilisierte sich in allen postoperativen Zeitintervallen bei einer zweifachen Intensität. Durch diesen Nachweis konnten die zytoskelettalen Elemente, die für das dendritische Wachstum verantwortlich sind, markiert werden. Die Aktivität der Acetyltransferase konnte das Vorliegen von cholinergen Neuronen innerhalb des kompletten zeitlichen Verlaufes bestätigen. Während das Signal für den motoneuron-spezifischen Antikörper Isl 1 zu Beginn einfach positiv blieb, kam es anschließend zu einem schnellen Anstieg auf das Dreifache. Bei der direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes mit dem Muskel zeigte sich erst in späteren Phasen eine Hochregulierung der Expression des motoneuron-spezifischen Proteins SMN 1. Ähnliche Erkenntnisse wurden auch für die Expression der Proteine LHX 3 und LHX 5 erzielt. Durch das Protein LHX 3 ließen sich Zellen mit einer motorischen Funktion wie Motoneurone und Interneurone nachweisen. Entsprechend der Resultate aus den peripheren Nerven transplantationen mit einer *retinokortikalen* bzw. *retinomuskulären* Verbindung wurde auch bei der direkten Verbindung zum muskulären Zielgebiet eine vermehrte Aktivität des Proteins LHX 5 über den gesamten postoperativen Verlauf von 24 Wochen erreicht, was auf eine neuronale Differenzierung und Migration während der Entwicklung des ZNS hindeutete.

**Tabelle 1:** Semiquantitative Bestimmung der immunhistochemischen Antikörperreaktionen bezogen auf die einzelnen Netzhautschichten der adulten Retina  
 Erläuterung der Zeichen: +++ sehr stark präsent; ++ stark präsent; + präsent;  
 - nicht detektiert

	Graft mit Zielgewebe Muskel	Graft mit Zielgewebe Kortex	Axotomie	Blindes Ende	Kontrolle	Bemerkung
<b>GFAP</b>	+++	+++	+++	+++	++	GCL; Astrozyten; Müllerzellen
<b>GAP 43</b>	+++	+++	+++	+++	++	IPL
<b>β-III- Tubulin</b>	+++	+++	+++	+++	++	GCL
<b>MAP 2</b>	++	++	+	++	++	GCL; IPL; OPL
<b>ChAT</b>	++	++	-/+	++	-/+++	GCL; IPL; INL
<b>ISL 1</b>	+	++	++	+	+	GCL; INL; ONL
<b>LHX 3</b>	+++	+++	++	+++	++	GCL; IPL; OPL
<b>SMN 1</b>	+++	++	++	++	+	GCL; INL
<b>LHX 5</b>	+++	+++	++	++	+	GCL; IPL; OPL

– Ergebnisse –

**Tabelle 2:** Semiquantitative Bestimmung der immunhistochemischen Antikörperreaktionen bezogen auf die einzelnen Netzhautschichten der adulten Retina  
 Erläuterung der Zeichen: +++ sehr stark präsent; ++ stark präsent; + präsent;  
 - nicht detektiert

	Direkte Anastomose			Crush			Kontrolle	Bemerkung
	1 Woche	4 Wochen	24 Wochen	1 Woche	4 Wochen	24 Wochen		
<b>GFAP</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	GCL; Astrozyten; Müllerzellen
<b>GAP 43</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	IPL
<b>β-III-Tubulin</b>	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	GCL
<b>MAP 2</b>	++	++	++	++	+	++	++	GCL; IPL; OPL
<b>ChAT</b>	+++	+++	+++	+++	-	+	- / +++	GCL; IPL; INL
<b>Isl 1</b>	+	+	+++	+	++	++	+	GCL; INL; ONL
<b>LHX 3</b>	++	+++	+++	++	+++	+++	++	GCL; IPL; OPL
<b>SMN 1</b>	++	++	+++	+	++	+	+	GCL; INL
<b>LHX 5</b>	+	++	+++	++	++	++	+	GCL; IPL; OPL

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher Zellverlust als Ergebnis einer Sehnervendurchtrennung sowie -quetschung nach 24 Wochen durch die retrograde Anfärbung demonstriert werden. Durch die Überbrückung mit Hilfe eines peripheren Nerven transplantates konnte ein großer Anteil der RGZ an der Degeneration gehindert werden. Des Weiteren konnte durch diese Methode ein verbessertes Überleben der RGZ erreicht werden.

Bezüglich der Regeneration von RGZ zeigte sich eine Abhängigkeit vom Zielgebiet, so dass die höchste Zellzahl bei der *retinokortikalen* Verbindung festgestellt werden konnte. Es konnten zudem auch morphologische Unterschiede erkannt werden. Während in den degenerativen Modellen, d.h. nach partieller bzw. kompletter Sehnervenverletzung, eine Chromatolyse erfolgte, konnte bei der peripheren Nerven transplantation sowie bei der direkten Verbindung zum Muskelgewebe ein Aussprossen der neuronalen Fortsätze der RGZ dargestellt werden.

Das Elongationsverhalten der Axone konnte mit Hilfe der anterograden Markierung beobachtet werden. Im Bereich der Läsionstelle des Sehnervs kam es zu einem abrupten Wachstumsstopp der Axone. Durch die Unterstützung eines peripheren Nerven transplantates konnten die auswachsenden Fasern im Bereich der Läsion überbrückt werden. Der Faserverlauf verlief parallel zum Transplantat. Mit zunehmender Distanz vom peripheren Nerven transplantat kam es zu einer Abnahme der Faserdichte, so dass nur ein geringer Faseranteil das Zielgebiet erreichen konnte.

Die immunhistochemischen Untersuchungen ermöglichten Einsichten in die Unterschiede bei der Proteinexpression der degenerativen und regenerativen Operationsmodelle. Es konnten Proteine nachgewiesen werden, die durch ablaufende degenerative Prozesse vermehrt translatiert wurden. Das Expressionsverhalten veränderte sich auch über den postoperativen Zeitraum in den einzelnen Operationsmodellen.

## 5.1 Retrograde Färbung

Das Modell des peripheren Nerven­transplantates ist eine etablierte Methode, um eine partielle Regeneration eines durchtrennten Sehnervs zu ermöglichen. Trotz zahlreicher Untersuchungen wurden die Langzeiterfolge der axonalen Regeneration sowie die Regeneration in nicht-anatomische Zielgebiete weitgehend vernachlässigt. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf diese Thematik gelegt werden. Bestandteil der vorliegenden Untersuchungen war außerdem eine Regeneration nicht-anatomisches Zielgebiet ohne die Unterstützung eines peripheren Nerven­transplantates zu erreichen.

Durch die retrograde Markierung mit dem Farbstoff 4 Di-10Asp konnten in dieser Arbeit alle Netzhäute nach der entsprechenden postoperativen Verweildauer angefärbt werden. Der Farbstoff persistierte, wie bereits in vorherigen Arbeiten dargestellt werden konnte, in den Zellkörpern der retinalen Zellen, so dass die Zellzahl und Morphologie bestimmt werden konnte (Vidal-Sanz et al. 1987).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die retinalen Zellen, die die Sehnervenverletzung überlebten, sich nahe der retinalen Gefäßversorgung befanden. Aufgrund der Abnahme der Zellzahl mit zunehmender retinaler Exzentrizität (Watanabe et al. 1993) wurde auch in anderen Arbeiten angenommen, dass der nutritive Transport von neurotrophen Faktoren sowie die Oxygenierung entlang der retinalen Vaskularisation stattfand. Im Gegensatz dazu existieren jedoch andere Arbeiten, die das Überleben der RGZ nach einer peripheren Nerven­transplantation vermehrt in peripheren Bereichen der Retina demonstrierten (Quan et al. 1999). Somit scheint nicht nur die Gefäß- und Sauerstoffversorgung einen Einfluss auf die Wirksamkeit nutritiver Faktoren zu haben.

Die Zellzahl der axotomierten RGZ reduzierte sich nach einer postoperativen Verweildauer von 24 Wochen um das 1000-fache der Zellzahlen einer unbehandelten Netzhaut. Wie bereits in vorherigen Studien beobachtet wurde, konnte ein signifikanter Zellverlust mit einem geringen Langzeit-Überleben der RGZ nach einer Sehnervendurchtrennung dargestellt werden (Misantone et al. 1984; Villegas-Perez et al. 1988; Fischer et al. 2004). Diese Erkenntnisse vergegenwärtigen, dass eine traumatische Nervenverletzung im ZNS nicht vollständig reparabel ist. Dieses Trauma bewirkt eine ausgeprägte Degeneration der zentralen Nervenzellen, so dass nur eine geringe Zellzahl überleben kann. Hindernisse der spontanen Reparatonsmechanismen wurden zuvor in diversen Arbeiten untersucht. Dabei spielt die gliale Umgebung der zentralen Nervenzellen, die Oligodendrozyten, eine Schlüsselrolle, wie auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Schwab and Thoenen 1985).

Ähnliche degenerative Erkenntnisse konnten auch bei einer partiellen Sehnervenverletzung, einer Sehnervenquetschung, nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse einer Sehnervenquetschung nach einer postoperativen Verweildauer von 24 Wochen zeigten eine Reduktion der retinalen Zellzahl auf 0,3 Prozent. Dies steht im Einklang mit anderen Arbeiten, die einen retinalen Zellverlust bei adulten *Rana pipiens* von mehr als zwei Drittel innerhalb von sechs Monaten beschrieben (Scalia et al. 1985).

Die vorliegenden Daten der Sehnervenquetschung zeigten eine Korrelation zwischen dem zunehmenden Zellverlust und der Verlängerung der postoperativen Verweildauer. Je größer das postoperative Zeitintervall gewählt wurde, desto ausgeprägter fiel der resultierende Zellverlust aus. Während in der ersten Woche nach einer Sehnervenquetschung ein massiver Zellverlust auf 6,77 Prozent der ursprünglichen Zellzahl bestand, überlebten nach vier Wochen nur noch 2,87 Prozent der retrograd markierten RGZ der gesamten Netzhaut. Somit resultierte ein intensiver Zellverlust in der ersten postoperativen Phase. Im weiteren Verlauf in einer zweiten Phase schritt der Zellverlust mit einer geringeren Progredienz fort. Diese Ergebnisse werden durch die Erkenntnisse

von Villegas-Perez et al. (1993) bestätigt, die ebenfalls zwei unterschiedliche Phasen des Verlustes von RGZ ergaben (Villegas-Perez et al. 1993).

Die unterschiedliche Intensität des Zellverlustes könnte mit der Aktivität der Mikrogliazellen und Makrophagen in Zusammenhang stehen. Initial könnte es im Rahmen eines gesteigerten inflammatorischen Prozesses zu einer massiven Invasion phagozytischer Zellen gekommen sein. Im weiteren zeitlichen Verlauf könnte die Inflammation möglicherweise durch eine aktivitäts-mindernde Reaktion der Makrophagen abgeklungen sein, so dass nur noch wenige RGZ phagozytiert werden. Andererseits könnte es nicht nur zu einem Aktivitätsmangel der Makrophagen gekommen sein, sondern es könnte sich auch eine Resistenz der RGZ gegenüber den phagozytierenden Zellen im zeitlichen Verlauf entwickelt haben (Thanos et al. 1993; Langmann 2007). Diese Hypothese kann durch die Erkenntnisse anderer Arbeiten gestützt werden, die die Existenz einer zellulären Uhr für den neuronalen Zelluntergang während der verschiedenen Entwicklungsphasen vermuten (Galli-Resta and Ensini 1996).

Im Vergleich zur Sehnervenquetschung war der retinale Zellverlust nach einer kompletten Nervendurchtrennung ausgeprägter und schneller. Vermutlich könnte es bei einer vollständigen Sehnervendurchtrennung zu einem abrupten Stopp des axonalen Transportes von neurotrophischen und neurogenen Faktoren gekommen sein. Im Gegensatz dazu könnte bei einer Sehnervenquetschung nur eine partielle Transportunterbrechung zytoskelettaler Strukturen stattgefunden haben, so dass ein geringer Teil der RGZ überleben konnte (McKerracher et al. 1990). Durch die Zugabe von neurotrophen Faktoren (BDNF, CNTF etc.) konnte dieser Zellverlust wieder ausgeglichen und das Überleben sowie die Regeneration der RGZ gefördert werden. Somit demonstrierten auch andere Arbeiten, welche Rolle der axonale Transport für das Überleben der RGZ spielt (Aguayo et al. 1996). Ein entscheidendes Element für die Entwicklung von regenerationsfördernden Substraten war nicht nur der entsprechende neurotrophische Faktor sondern auch der Zelltyp, der diesen Faktor expremierte (Hu et al. 2007).

In dieser Arbeit konnte auch ein morphologischer Unterschied nach einer Sehnervenverletzung beobachtet werden. Es konnte nach einer Sehnervenläsion eine Chromatolyse der retinalen Zellen mit einer Regression der Zellfortsätze nachgewiesen werden. Die RGZ zeigten sich umfassend degeneriert und dysmorph, denn die Axone und Dendriten waren rarefiziert und das Perikaryon aufgetrieben. Dieses dysmorphe Erscheinungsbild verstärkte sich mit ansteigender postoperativer Verweildauer. Nach einer Woche waren die RGZ zwar zum größten Teil noch mit den unbehandelten RGZ morphologisch identisch, aber nach einem Monat verwandelten sich die RGZ in der zuvor beschriebenen Weise. Andere Arbeitsgruppen berichten von einem ähnlichen morphologischen Zelluntergang bei peripheren Neuronen, jedoch nicht oder lediglich minimal bei zentralen Neuronen (Cragg 1970). Verantwortlich für diese komplexe Antwort der peripheren Nervenzellkörper ist ein getriggertes Signal, das, von der Läsion ausgehend, retrograd über die Axone transportiert wird (Cragg 1970; Kreutzberg 1996). Es wurde zudem beobachtet, dass diese morphologischen Veränderungen durch die Behandlung mit Meclobalamin verbessert werden konnten (Kong et al. 2004).

Im Vergleich mit anderen Arbeiten ergaben sich speziesspezifische morphologische Veränderungen. Bei der kompletten Sehnervendurchtrennung eines Kaninchens jedoch zeigten sich vergleichbare Veränderungen der Zellmembran sowie des Zytoskeletts der RGZ. Die überlebenden RGZ demonstrierten aber keine Regression der Fortsätze, sondern bildeten dendritische Verzweigungen aus (Germain et al. 2003; Germain et al. 2007). Diese Unterschiede wurden durch weitere Erkenntnisse unterstützt, denn die Vulnerabilität der RGZ auf eine Sehnervenläsion und deren morphologische Veränderungen unterschieden sich nicht nur in den einzelnen Spezies sondern auch in den einzelnen RGZ-Typen (Thanos 1988).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit das Degenerationsmodell durch eine partielle bzw. vollständige Sehnervenverletzung bestätigt werden konnte. In den Langzeituntersuchungen

konnte ein irreversibler struktureller Zelluntergang ohne spontane Reparationsfähigkeit nachgewiesen werden.

Bei der Betrachtung des peripheren Nerven­transplantates überlebten in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Sehnervendurchtrennung bzw. –quetschung nach 24 Wochen postoperativer Verweildauer deutlich mehr RGZ. Dabei wurde festgestellt, dass die RGZ-Population unabhängig von dem jeweiligen Zielgebiet, das für das distale Transplantatende gewählt wurde, im Vergleich zu der RGZ-Population nach einer Sehnervendurchtrennung um mindestens das Doppelte zunahm. Diese Resultate standen im Einklang mit der bekannten neurotrophen Wirkung des peripheren Nerven­transplantates auf eine Sehnervenverletzung (Bahr et al. 1992). Denn ein entscheidender Schritt zur Überbrückung einer kompletten Sehnervendurchtrennung war die Erzeugung einer regenerationspermissiven Umgebung mit Hilfe eines peripheren Nerven­transplantates, des *PN-Grafts* (So and Aguayo 1985).

Aus diversen Arbeiten ist bekannt, dass das periphere Nerven­transplantat durch seine regenerationspermissive Wirkung nicht nur ein signifikant höheres Überleben der RGZ ermöglicht, sondern auch ein Aussprossen retinaler Axone fördert. Die Anzahl der in das periphere Transplantat einwachsenden Axone nahm nach zwei bis drei Monaten nach der durchgeführten Transplantation nach Aussage anderer Autoren ab, wodurch es zu einem Langzeitverlust bereits regenerierter RGZ kam (Bahr et al. 1992; Thanos and Mey 1995). Dies könnte für die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bedeuten, dass die gemessene Zellzahl der überlebenden RGZ nach sechs Monaten das Resultat eines Langzeitverlustes ist. Damit handelt es sich bei den Langzeituntersuchungen um einen hochempfindlichen und instabilen Zustand der überlebenden RGZ.

Da nur die Ergebnisse der peripheren Nerven­transplantation nach einem postoperativen Zeitpunkt von 24 Wochen eruiert wurden, konnte der initiale abrupte Verlust des Überlebens der RGZ nach kürzeren postoperativen Zeiträumen nicht beurteilt werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen der Sehnervenquetschung im zeitlichen Verlauf kann jedoch angenommen werden,

dass auch bei einer peripheren Nerven-Transplantation der initiale Zellverlust nach einer Woche deutlich erhöht gewesen wäre. Dieser Zeitpunkt wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet. Um einen erneuten Langzeitverlust bereits regenerierter RGZ beurteilen zu können, hätte die Zellzahl zu verschiedenen, früheren Zeitpunkten in dieser Operationsgruppe bestimmt werden müssen. Bezüglich der Ergebnisse der direkten Verbindung zum Muskelgewebe und der Sehnervenquetschung war aufgrund der Messungen nach verschiedenen postoperativen Zeitintervallen der genannte erneute Langzeitverlust der bereits überlebten RGZ zu erfassen und konnte somit in dieser Studie bestätigt werden.

Wie bereits erwähnt wurde, konnte das periphere Nerven-Transplantat das Überleben der RGZ auch auf längere Sicht positiv beeinflussen. In diversen Studien wurde das Transplantat als ein entscheidender Stimulus für eine vermehrte Regenerationsbereitschaft genauer analysiert. Bahr et al. (1992) zeigten, dass ein zuvor gequetschtes Transplantat keinen intensiveren Einfluss auf die Regenerationsfreudigkeit der RGZ ausübte (Bahr et al. 1992), sondern identische Ergebnisse wie ein unbehandeltes Transplantat erzeugte (Decherchi and Gauthier 1996).

Aus anderen Arbeiten wurde auch über eine Veränderung der elektrophysiologischen Zellaktivität nach einer Sehnervenverletzung berichtet. Neurone, die von der Retina (Keirstead et al. 1985) oder vom Hirnstamm (Gauthier and Rasminsky 1988) adulter Ratten in ein peripheres Nerven-Transplantat regenerierten, zeigten während der ersten fünf Monate eine normale elektrophysiologische Eigenschaft. Nach neun bis zwölf Monaten wurden jedoch geringere elektrophysiologische Antworten gemessen. Möglicherweise könnte diese späte Abnahme der funktionellen und strukturellen Integrität der Neurone mit einem Mangel an neurotrophen Molekülen zusammenhängen, die nach einer Reinnervation nicht mehr exprimiert wurden (Muller et al. 1986). Diese trophischen Einflüsse könnten demzufolge nur

transient bereitgestellt worden sein. Dabei lässt sich eine Abhängigkeit der terminalen Kontakte mit dem Zielgebiet vermuten (Doering and Aguayo 1987).

In der vorliegenden Studie konnte beim Vergleich der retinalen Zellzahl in den einzelnen Transplantationsgruppen die höchste Zellzahl in der Gruppe mit blind endendem Transplantat nachgewiesen werden, die bereits um das Fünffache der axotomierten Zellpopulation gestiegen war. Durch eine Verbindung zum *Kortex* konnten mehr als das Dreifache an axotomierten RGZ überleben. Bei einem Kontakt zum Muskelgewebe konnte das Doppelte der axotomierten RGZ nach 24 Wochen gerettet werden.

Das Zielgebiet zeigte dabei zwar einen stimulierenden Effekt, aber dennoch bestand die größte Überlebenswahrscheinlichkeit der RGZ nach einer Transplantation ohne Zielgebiet, d. h. mit blindem Ende (Thanos 1997; Harvey et al. 2006). Die RGZ erkannten ihr neues, nicht-anatomisches Zielgebiet (Zwimpfer et al. 1992), was nicht nur ein Überleben der RGZ, sondern auch eine dauerhafte synaptische Verknüpfung mit dem neuen Ziel ermöglichte. Das *kortikale* Zielgewebe löste aber im Vergleich zu dem blind endenden Zielgebiet keine weitere Zunahme der überlebenden Zellzahl aus. Das *kortikale* Zielgebiet wurde demnach nicht als natürliches, sondern als nicht-anatomisches Zielgebiet anerkannt, obwohl dieses Ziel, als Teil des Gehirns, in lokaler Nähe zum *Colliculus superior* lag.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass ein Kontakt mit Fremdgewebe eine geringere Überlebensrate der RGZ erzeugte. Entscheidend war aber, dass überhaupt ein Überleben ermöglicht werden konnte.

Da vor allem beim Kontakt zum Muskelgewebe die überlebende Zellzahl gering war, könnte das Muskelgewebe möglicherweise einen wachstumseinschränkenden Effekt haben. Die vom Zielgebiet ausgehenden Neurotrophine beeinflussten das Überleben der RGZ entscheidend. Durch die Unterbrechung der lokalen neurotrophen Unterstützung im Läsionsbereich entstand ein Verlust an RGZ (Zhang et al. 1998). Die gliale Vernarbung im Bereich der Läsion

könnte dabei eine wesentliche Rolle spielen, da die zentralen Neurone diese Barriere nicht selbstständig überbrücken konnten. Diese Ergebnisse standen somit in Einklang mit den bislang erhobenen Daten anderer Arbeiten (Hall and Berry 1989). Über welche Mechanismen das fremde Zielgebiet seinen Einfluß auf die RGZ übermittelte, blieb weiterhin fraglich.

In einer Studie mit retinalen neuronalen Progenitorzellen wurde über einen extrinsischen Stimulus berichtet, der durch die extraokuläre skelettale Muskulatur bereitgestellt wurde. Dieser Stimulus determinierte jedoch nur die cholinergen amakrinen Zellen. Für andere retinale Zelltypen, wie die RGZ, war dieser Stimulus aber nicht essentiell (Kablar 2003). Deswegen könnte auch der *Musculus temporalis* im adulten Tier einen extrinsischen Einfluss auf die retinale Organisation ausüben und für bestimmte Zelltypen essentiell sein.

Es ist zudem bekannt, dass extrinsische und möglicherweise auch intrinsische Mechanismen einen morphologischen Wandel der RGZ bewirken könnten (Ma et al. 2004). Morphologisch wurden in dieser Arbeit deutliche Unterschiede innerhalb der einzelnen Transplantationsgruppen festgestellt. Es konnte daraufhin angenommen werden, dass es sich dabei um einen vom Zielgebiet abhängigen Einfluss handelte (Thanos and Mey 1995).

Durch eine periphere Nerven transplantation überlebten nach sechs Monaten nur wenige, aber morphologisch große Zellen, wodurch von einer spezifischen Überlebensfähigkeit der unterschiedlichen RGZ-Typen ausgegangen werden konnte (Thanos 1997). Quan et al. (1999) identifizierten zwei unterschiedliche überlebende Zelltypen nach einer peripheren Nerven transplantation, die RGZ-Typen, die überlebten, sowie die RGZ-Typen, die überlebten und regenerierten (Quan et al. 1999).

Bei dem blind endenden Zielgebiet bildeten die überlebenden RGZ mit ihren langstreckigen Fortsätzen Kontakte im Sinne einer Synaptogenese. Durch die Größe des Zellkörpers konnte angenommen werden, dass diese Zellen keiner Chromatolyse unterlagen. Die großen Zellkörper deuteten vielmehr auf einen

abgelaufenen regenerativen Prozess hin (Quan et al. 1999). Bei dieser Regeneration, die durch die Wirkung des peripheren Nerventransplantates ermöglicht wurde, bildete sich ein interneuronales Netzwerk aus - auch ohne einen Kontakt zu einem Zielgebiet. Somit musste das Transplantat allein bereits eine regenerative Wirkung auf die RGZ haben.

Bei einem Kontakt mit einem Zielgebiet veränderte sich die Zellmorphologie. Durch den Kontakt mit *kortikalem* Gewebe verformten sich die Zellkörper pyramidenartig und besaßen einen bipolaren Charakter. Diese Morphologie der Neurone entsprach dem natürlichen Aussehen zentraler Neurone im *Neokortex*. Dies verstärkte die Hypothese, dass es zu einem *target*-abhängigen morphologischen Wandel der überlebenden RGZ kam. Die Axone wiesen durch ihre terminalen Verdickungen auf eine gesteigerte Synaptogenese hin. Mit Hilfe der Synaptogenese entstand eine größere Komplexität der neugebildeten neuronalen Verbindungen, wie es für den *Neokortex* typisch ist. Die Retina verfügt über einen ähnlichen neuroanatomischen Aufbau wie der *Neokortex*. Möglicherweise führten diese Parallelen zu einer erleichterten Ausbildung des neuronalen Netzwerkes der regenerierten RGZ. Dadurch könnte die Integration der elongierten Axone in das *kortikale* Zielgebiet, als neu geschaffene Umgebung, unterstützt worden sein (Nieuwenhuys 1994).

Erstmalig wurde in dieser Arbeit eine Langzeituntersuchung durchgeführt, bei der der Kontakt zum Muskel als nicht-anatomisches Zielgebiet hergestellt wurde. In dieser Operationsgruppe beeindruckte der morphologische Wandel. Die RGZ nahmen deutlich an somatischer Größe und dendritischer Verzweigungsbereitschaft zu, was auf einen erhöhten Informationsaustausch hindeutete. Es zeigte sich aber auch, dass nicht alle markierten Zellen diesem morphologischen Wandel unterlagen, sondern auch gewöhnliche, jedoch erheblich kleinere RGZ vorhanden waren. Dieses sprach für eine spezifische Empfänglichkeit der einzelnen RGZ-Typen für diese morphologischen Veränderungen (Thanos 1997). Entscheidend könnte hierbei sein, dass der Kontakt zum Fremdgebiet definitiv gewährleistet werden musste. Die einzelnen

RGZ erhielten über ihre Kontakt aufnehmenden Axone den zielabhängigen Wachstumsstimulus und unterlagen damit der entsprechenden morphologischen Veränderung (Villegas-Perez et al. 1988). Da aber nicht alle überlebenden RGZ auch regenerierten, blieben eventuell zwei unterschiedliche RGZ-Typen erhalten (Quan et al. 1999). Ungeklärt bleibt aber, ob durch eine weitere Verlängerung des postoperativen Zeitintervalls alle überlebenden RGZ einen ausreichenden Kontakt zum zielabhängigen Wachstumsstimulus gewonnen und sich dementsprechend morphologisch verwandelt hätten.

Andere Arbeitsgruppen berichten über elf unterschiedliche morphologische Subtypen der RGZ im adulten Säugetier (Rockhill et al. 2002). Diese Subtypen unterscheiden sich durch ihre veränderte dendritische Architektur (Wassle and Boycott 1991) und ihr axonales Projektionsmuster (Yamagata and Sanes 1995). Die dendritischen Fortsätze der RGZ gehen nur mit bestimmten bipolaren und amakrinen Zellen in der inneren plexiformen Schicht eine synaptische Verbindung ein (Tian 2004), was für eine funktionelle und morphologische Spezifität der RGZ der adulten Retina spricht.

Das neue Operationsverfahren in dieser Arbeit bestand darin, eine direkte Verbindung zwischen dem Sehnervstumpf und dem *Musculus temporalis* ohne Nutzung eines peripheren Nerventransplantates herzustellen. Es sollte dabei analysiert werden, ob der Muskel ohne die Mithilfe eines Nerventransplantates eine regenerationspermissive Umgebung für den durchtrennten Sehnerv erzeugen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass ein Überleben von RGZ auch ohne ein Transplantat in ein nicht-anatomisches, funktionell andersartiges Gewebe, das Muskelgewebe, möglich war. Hierbei kam es ebenfalls zu einem deutlichen Verlust der RGZ. Es überlebten 6,25 Prozent der ursprünglichen Zellzahl nach 24 Wochen. Dies entsprach einer fünfmal größeren Zellzahl als nach einer Axotomie. Das Zielgebiet Muskel selbst schien das Überleben der RGZ positiv zu beeinflussen, da die Zellzahl ohne Transplantat mehr als doppelt so groß war wie bei der Verwendung eines überbrückenden peripheren Transplantates. Das Muskelgewebe hatte somit einen wachstumsstimulierenden Einfluss. Dieser Wachstumsstimulus addierte

sich aber nicht durch das zwischengelagerte Nerven-Transplantat, sondern schwächte sich eher - wie zuvor beschrieben - ab (Kablar 2003). Diese Abschwächung ist vermutlich durch die große Distanz zwischen Sehnervenstumpf und Muskelgewebe durch das zwischengeschaltete Transplantat begründet. Dadurch könnte der wachstumsstimulierende Reiz die RGZ schlechter erreichen und damit deren Überleben weniger intensiv fördern.

Morphologisch waren die überlebenden RGZ bei der direkten Verbindung zum Muskel identisch mit den RGZ, die über ein zwischengeschaltetes Transplantat verfügten. Dadurch erhärtete sich die Vermutung, dass nicht das periphere Nerven-Transplantat, sondern das muskuläre Zielgebiet selbst eine morphologische Veränderung der RGZ auslöste.

Im zeitlichen Verlauf konnte initial bei der direkten Verbindung zum Muskelgewebe und bei der Sehnervenquetschung ein abrupter Zelluntergang dokumentiert werden. Wie bereits beschrieben wurde, kam es bei einer Sehnervenverletzung zu einer Unterbrechung des Transportes von neurotrophen Faktoren. Durch den Mangel dieser Faktoren folgte die ausgeprägte Degeneration der RGZ (McKerracher et al. 1990; Mey and Thanos 1996). Durch den Kontakt zum Muskel konnte jedoch der wachstumsstimulierende Einfluss durch das fremde Gewebe schneller wiederhergestellt werden. Nach vier Wochen überlebten mehr RGZ die direkte Verbindung zum Muskel als nach einer Sehnervenquetschung. Es handelte sich dabei aber um einen sehr kurzfristigen instabilen Zustand der RGZ, da sich die Zellzahl nach der direkten Verbindung zum Muskel nach 24 Wochen wieder der Zellzahl nach einer Sehnervenquetschung anpasste.

## **5.2 Anterogrades Färbung**

Als Folge einer mechanischen Nervenverletzung im PNS tritt die Degeneration des distalen Axons im Sinne einer schnellen anterograden und einer verzögerten retrograden Waller'schen Degeneration ein. Dabei spielen

Schwann`sche Zellen eine Schlüsselrolle (Terenghi 1995). Anders verhält es sich im ZNS. Zentrale Neurone können aufgrund degenerativer Prozesse nach einer Nervenläsion ihre Axone nicht spontan substantiell auswachsen lassen.

In der vorliegenden Arbeit konnten sich initial nach einer kompletten Sehnervendurchtrennung die Wachstumskegel formieren. Dieser Prozess entspricht bereits der ersten Phase der Regeneration. Aufgrund eines mangelnden Wachstumsstimulus war die axonale Elongation jedoch instabil. Dies verdeutlichten die morphologisch aufgetriebenen Sehnerven. Da eine komplette Sehnervendurchtrennung in dieser Arbeit erst nach 24 Wochen beurteilt wurde, konnten die zwischenzeitlichen Veränderungen nicht eruiert werden. Dadurch könnte es möglicherweise über diesen langen postoperativen Zeitraum zu nicht erfassbaren Verlusten bereits zuvor regenerierter Axone gekommen sein. Diese Vermutung steht mit Ergebnissen anderer Arbeiten im Einklang, die von einem graduellen Verlust neuronaler Zellen berichten, sofern die axotomierten Zellen keinen terminalen Kontakt mit der Peripherie aufwiesen (Tessler et al. 1985).

Andererseits ist bereits bekannt, dass bei einem Kontakt des proximalen und distalen Nervenstumpfes die Nervenfasern in der Lage sind, über größere Distanzen zu elongieren und mit ihrem ursprünglichen Zielgebiet wieder eine funktionelle Einheit zu bilden (Schuetz and Thanos 2004). Durch das Modell des peripheren Nerventransplantates konnte das axonale Wachstum über eine traumatische Läsionsstelle deutlich verbessert werden.

Bei der Transplantation eines peripheren Nerven werden Schwann`sche Zellen importiert und können so das axonale Wachstum zentraler Nervenzellen nach einer partiellen (*crush*) oder kompletten (Axotomie) Sehnervenläsion stimulieren (Taniuchi et al. 1986). Durch die direkte Transplantation von Schwann`schen Zellen ohne peripheres Nerventransplantat kann ebenfalls eine regenerationspermissive Umgebung für das ZNS geschaffen werden. Die Axone interagieren dabei mit den Schwann`schen Zellen über *tight* und *gap*

*junctions*, durch die wachstumsstimulierende Substrate bereitgestellt werden (Dezawa 2002).

Die axonale Regeneration nach einer peripheren Nerventransplantation ließ sich in zwei Phasen unterteilen. Die erste Phase zeichnete sich durch die Formation von Wachstumskegeln an der Verbindung zwischen Sehnervstumpf und Transplantat nach sechs Tagen aus (Trecarten 1986) und blieb für fünf bis sechs Wochen nach der Transplantation erhalten (Vidal-Sanz et al. 1987). Schwann'sche Zellen im Bereich des Transplantats proliferierten zwei bis drei Tage nach der Operation und ermöglichten die Formierung von Wachstumskegeln im Bereich der Sehnervendurchtrennung (Trecarten 1986).

In der zweiten Phase der Regeneration, die zum Zeitpunkt des Einwachsens der Fasern in das zentrale Gebiet begann, kam es zu einer Resynaptogenese mit dem Zielgebiet. Die Morphologie der RGZ schien in der ersten Phase der Regeneration unabhängig vom Zielgebiet zu sein, aber abhängig von pharmakologischen Einflüssen der Retina mit dem Mikroglia-inhibitorischen Faktor (Thanos et al. 1993) oder von neurotrophen Faktoren ausgehend vom Transplantat (Villegas-Perez et al. 1988).

Die erfolgreiche axonale Elongation, die erste Phase der Regeneration, wurde bei einer blind endenden Transplantation unabhängig vom Zielgebiet, beeinflusst. Die Regeneration in der zweiten Phase, die in Abhängigkeit vom Zielgebiet stand (Trecarten 1986), konnte in der vorliegenden Arbeit durch das fehlende Zielgewebe nicht stattfinden. Es konnten dementsprechend keine Synapsen ausgebildet werden.

Am proximalen Transplantatende bestand eine ausgeprägte axonale Faserdichte durch die neurotrophe Wirksamkeit des Transplantates und seiner glialen Umgebung, wie in der zuvor beschriebenen Weise (Hall and Berry 1989). In einem Review von Harvey et al. (1995) wurde berichtet, dass das axonale Wachstum auf die proximalen 1 bis 1,5 mm des Transplantates limitiert ist. Dabei kommt es folglich zu keiner selektiven Erkennung der Zielregion (Harvey et al.

1995). Die stetige Abnahme der Axone im Verlauf des Transplantates ist ebenfalls mit der Abnahme des neuritogenen Wachstumsstimulus in Richtung des Zielgebietes zu erklären (Tan and Harvey 1999).

Axone elongierten erst dann über das distale Transplantatende, wenn diese durch ein wachstumsförderndes Signal angeregt wurden. Diese Signal befand sich an der Grenze zum Zielgebiet (Hankin and Lund 1991).

Am distalen Ende entfernten sich die regenerierten Axone vom trophischen Wachstumsstimulus, der durch das Transplantat bereitgestellt wurde. Durch die fortschreitende Distanzierung vom Transplantat sistierte das Wachstum vollständig (Hall and Berry 1989). Durch Interaktionen mit dem Zielgebiet über stabile synaptische Verbindungen wurde ein andauerndes Überleben der regenerierenden Neurone ermöglicht (Vidal-Sanz et al. 1987; Villegas-Perez et al. 1988). Diese Synaptogenese kann im Sinne der Hebb'schen Theorie verstanden werden (Hebb 1949). Aus diesem Grund kam es bei der blind endenden Verbindung am distalen Transplantatende zu einem Sistieren des Faserwachstums (Bahr et al. 1992).

Erstaunlicherweise wurde aber in der Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit eine geringere retinale Regenerationbereitschaft am distalen Transplantatende bei Kontakt mit dem *kortikalen* Zielgebiet ausgelöst. Nur wenige Fasern elongierten bis zur *kortikalen* Grenze ohne Penetration des fremden Zielgebietes. Der entsprechende wachstumsfördernde Stimulus, der vom Zielgebiet ausgehen sollte, konnte wahrscheinlich nicht angeregt werden. Durch die fehlgeschlagene Penetration stellten die Fasern ihr Wachstum reaktiv ein oder wechselten ihre Verlaufsrichtung. Dieses Phänomen wird in anderen Arbeiten bestätigt (Hall and Berry 1989). Ähnliche Änderungen des Faserverlaufes konnten in anderen Studien durch nahegelegene kotransplantierte Schwann'sche Zellen induziert werden (Harvey et al. 1995). Dadurch konnten keine stabilen synaptischen Verbindungen zum Zielgebiet geknüpft werden, um ein andauerndes Überleben der regenerierten Neurone zu ermöglichen (Vidal-Sanz et al. 1987; Villegas-Perez et al. 1988; Debanne et al. 2003). Möglicherweise war die Kontaktfläche mit dem fremden Gewebe für die

Formation einer synaptischen Verbindung zu gering (Tan and Lund 1999). Andere Arbeitsgruppen demonstrierten, dass bei einem Kontakt zum *Cerebellum* persistierende Synapsen der neu entstandenen Axone mit dem neuen nicht-anatomischen Zielgebiet geknüpft werden konnten (Zwimpfer et al. 1992).

In anderen Studien konnte bereits eine Synaptogenese bei einer Verbindung zu verschiedenen Hirnstrukturen sicher nachgewiesen werden. In einem Versuch einer Arbeit konnten die Axone bei einem Kontakt mit einem zentralen Zielgebiet wie dem *ipsilateralen Hirnstamm* in einer Distanz von mehr als 6 mm auswachsen. Im *Pretectum*, eine Struktur des Vorderhirns, innervierten die Axone bevorzugt den OPN (*olivary pretectum nucleus*) und den Nukleus des *Traktus opticus*, dabei verzweigten sie sich mit ihren terminalen Enden in unterschiedlicher Weise. Diese Ergebnisse zeigten, dass die regenerierten Axone selektiv die denervierten Nuklei reinnervieren konnten, wobei sie typische terminale Verzweigungen ausbildeten, mit denen sie über ihre Substrate die funktionelle Einheit aufrechterhielten (Vidal-Sanz et al. 2002).

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte an dem Grenzgebiet zwischen dem abnormem *Thalamusparenchym* und dem Transplantat eine große Anzahl von dünnen Nervenenden (0,05 bis 0,20 microns Durchmesser) nach fünf bis vierzehn Tagen beobachtet werden (Campbell et al. 1992).

In Anbetracht der erwähnten Fakten ist zu diskutieren, inwiefern sich das *Pretectum* sowie der *Thalamus* vom *Kortex* unterscheiden, da bei der *retinokortikalen* Verbindung keine Penetration möglich war. Vielleicht verfügen das *Pretectum* sowie der *Thalamus* über andere wachstumsstimulierende Faktoren als der *Kortex* im *occipitalen* Bereich, so dass es im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie zu synaptischen Verknüpfungen kam. Dies würde eine regionale Spezifität der Sekretion von Wachstumsstimulanzien und damit eine vom Zielgebiet abhängige Regenerationsbereitschaft bestätigen.

Andererseits könnte das *kortikale* Gewebe einen negativen Einfluss auf das axonale Wachstum gehabt haben, indem die intakte Glia an der Grenzfläche

zwischen dem Transplantat und dem *Kortex* die Penetration durch die Formierung einer Barriere, im Sinne einer glialen Narbe, limitierte (Zwimpfer et al. 1992). Durch die ausgeprägte Gliose ist der Läsionsbereich für die aussprossenden Axone nicht zu passieren, so dass die Axone demyelinisieren (Bush et al. 1999) und der Phagozytose unterliegen (Thanos et al. 1993). Ob dabei die Verlängerung des postoperativen Zeitintervalls einen begünstigenden Einfluss hatte, bleibt weiterhin fraglich.

Auch bei der Transplantation von fetalem *tektalen* Gewebe ergeben sich entscheidende Unterschiede in den verschiedenen Arbeitsgruppen. Es sind Arbeiten bekannt, in denen bei einer Transplantation von fetalem Gewebe eine Penetration der Axone möglich ist. Die intakte Glia scheint für die Penetration kein Hindernis zu sein (Tan and Harvey 1999). Dies lässt vermuten, dass bei fetalem Gewebe eine gliale Narbe kein limitierender Faktor ist, so dass also auch der Reifegrad des Zielgebietes eine entscheidende Rolle in diesem Kontext spielt. Andere Arbeitsgruppen berichten über ein spärliches Einwachsen der regenerierten Axone in das fetale *tektale* Gewebe. Substrat- und zielabhängige Faktoren sorgen für die entsprechende Wachstumsrichtung der neu ausgebildeten Axone (Hankin and Lund 1991). Damit könnte auch in der vorliegenden Arbeit das Penetrationsverhalten der Axone zu erklären sein, das sich je nach Zielgebiet unterscheidet. Es wurde ein ähnliches anatomisches und chemisches Muster der fetalen *tektalen* Transplantate wie das des *Stratum griseum superficiale* des normalen *Colliculus superior* festgestellt (Harvey and Lund 1981). Diese Ähnlichkeit könnte einen positiven Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Axone ausgelöst haben. Bei dieser Transplantation war aber die Penetration des fetalen Neuropils durch die regenerierten Axone limitiert. Es gab jedoch keinen Hinweis auf eine selektive Innervation von bevorzugtem *retinorecipienten* Zielregionen im *tektalen* Transplantat (Tan et al. 1990). Dies bestätigen auch Arbeiten von Harvey et al. In einer Studie von Harvey et al. (1995) wurde das distale Transplantatende mit fetalem *Tektumgewebe* verbunden, das zuvor in den *frontalen Kortex* implantiert wurde.

Die aus dem Transplantat austretenden regenerierenden Axone konnten ihre Zielregion, das *tektale* Implantat, nicht selektiv erkennen (Harvey et al. 1995).

Bei Kontakt zum Muskelgewebe kam es zu einem retinalen Auswachsen der Axone in das Fremdgewebe. Die Länge der Axone betrug dabei vom Beginn des peripheren Nerventransplantates 300 bis 465  $\mu\text{m}$ . Eine Penetration des Muskelgewebes und ein Einwachsen der Axone konnte nicht sichergestellt werden (Tan and Harvey 1999).

Bei der peripheren Nerventransplantation mit dem muskulären Zielgebiet konnten in der vorliegenden Arbeit ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Die Faserdichte nahm mit einer größeren Distanz vom Sehnervenstumpf ab, so dass nur wenige Axone über das distale Transplantatende hinaus elongierten. Durch eine geringere axonale Regenerationsbereitschaft in das fremde Zielgebiet Muskel wurde angenommen, dass die Axone sich am distalen Transplantatende vom neurotrophen Stimulus des Transplantats entfernten und wachstumsverzögernd in Richtung Muskel elongierten. Erstaunlicherweise penetrierte ein geringer Teil der Axone sogar in das fremde Zielgebiet. Es lässt sich vermuten, dass synaptische Verknüpfungen mit dem neuen Zielgebiet ausgebildet werden konnten (Zwimpfer et al. 1992). Das Zielgebiet stimulierte dadurch das Wachstum der Axone, wobei ungeklärt blieb, welchen Einfluss dabei extrinsische und intrinsische Mechanismen ausübten. Ob diese Penetrationsfähigkeit zu einer strukturellen Änderung im Sinne einer motorischen Endplatte führte, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht genauer analysiert werden und bedarf einer elektronmikroskopischen Auswertung.

Bisher konnte nicht vollständig geklärt werden, ob adulte RGZ in der Lage waren, ihr Wachstumsprogramm durch die Verbindung zum Muskelgewebe in ähnlicher Weise, zu reaktivieren und auf das neue Zielgebiet umzustellen, wie es regenerierten peripheren Neuronen möglich ist. Diese molekularen Veränderungen konnten bei Hinterwurzelganglien nach einer Sehnervendurchtrennung in Genexpressionsanalysen entschlüsselt werden (Xiao et al. 2002). Fischer et al. (2004) beobachteten bereits einen Wandel (*switch*) des Genexpressionsprofils, das dem genetischen Profil peripherer

Neurone ähnlich war. Durch die Blockierung von RhoA konnte eine Aktivierung des Wachstumsprogrammes in reifen zentralen Neuronen ermöglicht werden. Durch eine zusätzliche Linsenverletzung kam es zu einem extensiven RGZ-Auswachsen assoziiert mit einer Verschiebung (*shift*) der Genexpression (Fischer et al. 2001; Fischer et al. 2004). Durch die Reaktivierung dieses Wachstumsprogrammes konnten die RGZ ihre Axone eindrücklich über größere Distanzen regenerieren. Das Wachstum wurde aber durch myelin-assoziierte inhibitorische Signale limitiert. Möglicherweise haben die veränderten Expressionsmuster von Molekülen und Substraten, wie Zelladhäsionsmoleküle, einen Effekt auf die Erkennung des Zielgebietes durch regenerierten Axone der RGZ (Tan and Harvey 1999). Scheinbar war das Muskelgewebe durch die Fähigkeit zur Penetration im Gegensatz zum *Kortex* in der Lage, neue Signale über das Axon an die RGZ zu geben, so dass ein Informationsaustausch stattfand.

Neuroanatomisch wird eine funktionelle Verbindung zwischen einem Axon und einer Muskelfaser als motorische Endplatte bezeichnet. Bei dieser neuromuskulären Endplatte werden die Erregungen über eine chemische Synapse mit dem Transmitter Acetylcholin weitergeleitet. Ob jedoch der Kontakt zwischen dem Axon und dem *Musculus temporalis* jedoch in seiner Funktion einer motorischen Endplatte entspricht, konnte nicht eindeutig beurteilt werden. In anderen Studien wuchsen retinale Axone entlang eines Nerven-Transplantates über 0,5 mm in ein fremdes Zielgebiet. Es wurde dabei ein Muskeltransplantat in den frontalen *Kortex* implantiert. Dabei bildeten die Axone eine „Schwellung“ im Bereich der Muskelfasern. Diese Verdickung erinnerte an eine motorische Endplatte (Tan and Harvey 1999). Endplattenähnliche Formierungen wurden auch in *In-vitro*-Studien von embryonalen Retinaexplantaten beobachtet, die mit der Skelettmuskulatur kokultiviert wurden (Puro et al. 1977; Ruffolo et al. 1978; Smalheiser et al. 1981). Die Umgebung eines Muskelgewebes verfügte über einige ähnliche Eigenschaften wie das PNS (Hall 1997). Vermutlich erleichterten diese Ähnlichkeiten die Bereitschaft zur axonalen Elongation bei einem Ko-Transplantat mit dem Muskel. Zusätzlich besaß der Muskel seine eigene Zusammensetzung an Schwann'schen Zellen (Tan and Harvey 1999).

Problematisch erschien bei der Penetration die strukturelle Beschaffenheit des Muskelgewebes. Denn aufgrund seiner fragmentierten Natur und der daraus resultierenden geringen Kontaktfläche konnten nur weniger als 40 Axone der RGZ vordringen (Tan and Harvey 1999). Somit musste der Kontakt zum Zielgebiet maximiert werden, so dass kein Verlust der Kontaktfläche entstand, wie z. B. durch eine Auslockerung des distalen peripheren Nervenimplantates an der Kontaktstelle.

Bei einer Sehnervenquetschung reichte die Kompression des Sehnervs für ca. zehn Sekunden bereits aus, um einen Transport von neurotrophen wachstumsstimulierenden Faktoren zu verhindern und so einen Stillstand des axonalen Wachstums zu erzeugen. Da aber ein geringer Faseranteil weiter wuchs, konnte der Wachstumsstimulus jedoch nur partiell unterbrochen werden. In den unterschiedlichen postoperativen Zeitintervallen konnte eine Rückbildung bzw. ein kompletter Verlust der Axone beobachtet werden. Die Fasern, die sich bereits in frühen Phasen bis zur Läsionsstelle ausgebildet hatten, waren nach einem postoperativen Intervall von 24 Monaten nicht mehr zu erkennen. Die spontan auswachsenden Fasern nach einer Sehnervenquetschung schienen keine andauernden synaptischen Verbindungen auszubilden, so dass die elongierten Fasern nicht über eine längere Zeit persistieren konnten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Aussagen anderer Autoren überein (Vidal-Sanz et al. 1987; Villegas-Perez et al. 1988; Debanne et al. 2003)

Bei der direkten muskulären Verbindung elongierten die RGZ ihre Axone. Es konnte demzufolge angenommen werden, dass das periphere Nervenimplantat für eine axonale Elongation in das Muskelgewebe nicht absolut notwendig war. Die Schwann'schen Zellen im PNS stimulierten das Wachstum retinaler Axone in eine unpassende Zielregion durch die dort vorliegenden extrinsischen Mechanismen. Unter bestimmten Umständen konnte der Kontakt zur peripheren glialen Umgebung, die durch das Muskelgewebe erzeugt wurde, die Kapazität der regenerierten Axone positiv

beeinflussen, indem sie die passenden Zielneuronen erkannten (Harvey et al. 1995). Da das Zielgebiet Muskelgewebe einen ausreichenden Wachstumsstimulus für eine Regeneration bot, wurde vermutet, dass durch die in der Nähe des Muskelgewebes befindlichen Schwann'schen Zellen eine regenerations-permissive Umgebung geschaffen wurde. Ohne die Hilfe des Transplantates elongierten die Axone, wiesen aber eine strukturelle Unordnung auf. Das axonale Wachstum schien nur mit der Unterstützung des Transplantates in eine gezielte Richtung möglich zu sein. Diese erschwerten Verhältnisse während der Reinnervation könnten durch einen Verlust von entscheidenden Führungsmolekülen wie Ephrin und Netrin ausgelöst worden sein (Mann et al. 2004).

Trotz dieser ungerichteten Struktur der Axone war eine Penetration des direkt verbundenen Muskelgewebes vorhanden, wie es in ähnlicher Weise zuvor beschrieben wurde (Tan and Harvey 1999). Nach einer Woche erreichten die Axone bereits das Muskelgewebe, da die Distanz zum Zielgebiet durch die direkte Verbindung gering war. Je größer aber das postoperative Zeitintervall gewählt wurde, desto weniger Fasern erreichten das Muskelgewebe. Der Faseranteil, der über einen längeren Zeitraum persistierte, hatte tatsächlich Kontakt zum Fremdgewebe. Die Fasern, die zu Beginn vorhanden waren, aber keinen Kontakt zum Fremdgewebe eingehen konnten, gingen auf längere Sicht wieder verloren. Dies bestätigen auch andere Studien (Vidal-Sanz et al. 1987; Villegas-Perez et al. 1988; Debanne et al. 2003). Dadurch verblieben nur Axone, die einen synaptischen Kontakt zum Zielgebiet erlangt hatten, wodurch der Verlauf der noch vorhandenen Fasern besser organisiert war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Art der terminalen Morphologie der regenerierten Axone durch das Zielgebiet, in das die Fasern mit oder ohne die Hilfe eines peripheren Nerven­transplantates einwuchsen, beeinflusst wurde.

### 5.3 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Auswertung diente der rechte unbehandelte *Bulbus* als Referenz. Die Kontrollretina zeigte bei der immunhistochemischen Markierung mit dem Antikörper *glial fibrillary acidid protein* (anti-GFAP) eine zweifach positive Anfärbung in der Ganglienzellschicht, wo dieser Astrozyten und Müllerzellen darstellte. Alle anderen behandelten Netzhäute erhöhten die GFAP Immunreaktivität auf eine dreifache Intensität. Diese Ergebnisse stimmten mit den Erkenntnissen bisheriger Studien überein, da unter physiologischen Bedingungen einer unbehandelten Retina die Expression von GFAP in Astrozyten der Ganglienzellschicht normalerweise minimal war (Wang et al. 2000). Durch die Nervenverletzung als eine durch äußere Einflüsse hervorgerufene Stresssituation wurde die Expression von GFAP in Astrozyten und Müllerzellen hochreguliert. Dadurch waren die Makroglia sowie die Astrozyten und die Müllerzellen an der Pathophysiologie des Todes der RGZ sowie den retinalen Reparaturmechanismen beteiligt (Lam et al. 2003). Die GFAP Expression veränderte sich im Anschluss an eine Sehnervenquetschung mit der Zunahme des postoperativen Intervalls. Während am ersten postoperativen Tag die Expression unverändert war, kam es bereits innerhalb von zwei Wochen zu einer GFAP Erhöhung auf das Neunfache (Chen and Weber 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Steigerung der GFAP Immunreaktivität nach einer Sehnervenquetschung beobachtet werden, wobei aber während aller gewählten postoperativen Zeitintervalle das Signal dreifach erhöht war. Es wurde sogar eine zusätzliche GFAP Erhöhung durch eine periphere Nerventransplantation unabhängig von dem jeweiligen Zielgebiet beobachtet, so dass von einem regenerativen Prozess der überlebenden RGZ ausgegangen werden konnte. Das steht im Einklang mit den bisherigen Aussagen (Schuetz et al. 2003). Aber auch ohne Transplantat wurde durch den Kontakt zum Muskelgewebe ein Anstieg der Immunreaktion beobachtet, weshalb von einer Regeneration der Axone ausgegangen werden konnte.

Das neuronspezifische *Growth-Associated Protein-43* (GAP 43) ist ein intrazelluläres Phosphoprotein im peripheren sowie zentralen Nervensystem, das sich in retinalen Axonen sowie in einem Teil von Zellkörpern und Dendriten der RGZ findet (Soto et al. 2003). Das Phosphoprotein wird in einem schnellen Transport in großen Mengen in die Spitzen von axonalen Wachstumskegeln befördert, um die funktionelle Motilität und die Orientierung während der Axogenese und Regeneration zu ermöglichen (Skene and Willard 1981). In der unbehandelten Kontrollretina war GAP 43 in den drei Unterschichten der inneren plexiformen Schichten angesiedelt. Obwohl GAP 43 während der synaptischen Formierung herunterreguliert wurde, konnte es als Folge einer Nervenverletzung wie eine Axotomie wieder reexprimiert werden (Coblentz et al. 2003). Diese Erkenntnis spiegelte sich in der vorliegenden Arbeit durch eine Intensivierung des immunreaktiven Signals für GAP 43 nach einer Sehnervendurchtrennung wider. Eine Überexpression von GAP 43 in transgenen Mäusen führte zu einer spontanen Formierung neuer Synapsen und förderte ein axonales Wachstum nach einer Nervenverletzung (Benowitz and Routtenberg 1997). Es wurde berichtet, dass die Hochregulierung von GAP 43 während der Zeit andauerte, in der die retinalen Axone mit ihrem *tektalen* Zielgebiet erneut verbunden wurden (Soto et al. 2003). Immunhistochemisch konnte eine Verstärkung des GAP 43 Signals bei einer Nerven transplantation beobachtet werden. Dieses verstärkte Signal bestand auch bei einem blind endenden Transplantat, wodurch auch ohne ein spezielles Zielgebiet eine Regeneration möglich wäre. Schon in den frühen postoperativen Phasen stieg die Fluoreszenz von anti-GAP 43 bei einer direkten Verbindung mit dem Muskelgewebe an. Dieser Anstieg konnte über 24 Wochen hinaus, eine beachtliche Zeitspanne, aufrechterhalten werden. Dies war ein Hinweis darauf, dass die RGZ mit ihren Axonen auch ohne peripheres Nerven transplantat in ein fremdes Gewebe elongierten.

Der neuronspezifische Antikörper  $\beta$ -III-Tubulin ist gegen eine zytoskelettale Struktur, die Mikrotubuli, im Rattengehirn gerichtet. Die Kontrollretina verfügte über eine zweifach positive Immunreaktivität für diesen Antikörper.

Der Antikörper  $\beta$ -III-Tubulin verteilte sich dynamisch entlang der sich entwickelnden und adulten regenerierten Axone sowie in der C-Domäne ihrer Wachstumskegel (Avwenagha et al. 2003). Es wurde berichtet, dass sich die Menge und Rate der Anlieferung von  $\beta$ -III-Tubulin in den Axonen der regenerierten DRG-Neuronen im Anschluss an eine Sehnervendurchtrennung erhöhte. Dieses veränderte hochregulierte Expressionsmuster beeinflusste den Aufbau und die Organisation des axonalen Zytoskeletts in einer Weise, durch die das axonale Wachstum vereinfacht wurde (Moskowitz and Oblinger 1995). Durch die dreifache Erhöhung der Immunreaktivität für  $\beta$ -III-Tubulin nach einer partiellen und kompletten Schädigung des Sehnervs konnte vermutet werden, dass das Expressionsmuster ebenfalls so verändert wurde, dass das axonale Wachstum erleichtert wurde. Der axonale Transport sowie das veränderte Expressionsmuster für  $\beta$ -III-Tubulin war eine Voraussetzung für die Regeneration (Moskowitz and Oblinger 1995). Durch die erhöhte Fluoreszenz im Transplantationsmodell konnte somit eine wachstumsassoziierte Antwort der reifen zentralen Neurone im Sinne einer Regeneration erkannt werden, wie sie bereits beschrieben wurde (McKerracher et al. 1990; McKerracher et al. 1990; McKerracher et al. 1993). Aber auch ohne die Mithilfe des Transplantates erhöhte sich die  $\beta$ -III-Tubulin Immunreaktivität bei der direkten Verbindung mit dem Muskel. Jedoch fiel diese erhöhte Fluoreszenz nach 24 Wochen auf eine zweifache Intensität, wie bei der Kontrollretina, ab. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Regeneration bei einer direkten Verbindung über längere Zeitspannen andauerte bzw. bereits abgeschlossen war.

*Microtubule-associated protein-2* (MAP 2) ist ein Phosphoprotein, das in neuronalen Somata und Dendriten lokalisiert ist. Während der Entwicklung des Nervensystems wurden drei MAP 2 Isoformen (MAP 2a, MAP 2b, MAP 2c) in unterschiedlicher Weise expremiert und spielten in der Dynamik der Mikrotubuli eine wichtige Rolle (Shafit-Zagardo and Kalcheva 1998). MAP 2 Transkripte konnten in ihrer somato-dendritischen Verteilung mit einer intensiveren Anreicherung in den dendritischen Regionen beim Nagetier beobachtet werden. Bei der Kontrollretina war eine zweifache Immunreaktivität für MAP 2 zu

erkennen. Der Nachweis von MAP 2 Transkripten war von der Spezies abhängig, so dass sich die Dendriten mit einer unterschiedlichen Kompetenz in das entsprechende Ziel entfalteteten (Cristofanilli et al. 2004).

Das reduzierte Niveau von MAP 2 wurde als eine durch die Sehnervendurchtrennung induzierte dendritische Retraktion dokumentiert (Svensson and Aldskogius 1992). Die dendritische Retraktion wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur durch eine Sehnervendurchtrennung, sondern auch durch eine Sehnervenquetschung nach einem postoperativen Intervall von vier Wochen induziert. Da das Signal für MAP 2 in der Sehnervenquetschung nach 24 Wochen erneut anstieg, kam es auf längere Sicht zu einer dendritischen Formierung. Durch den zweifach positiven Nachweis von MAP 2 nach einer Transplantation kam es nach 24 Wochen zu keiner Änderung im Vergleich zur Kontrollretina. Dadurch konnte angenommen werden, dass die dendritische Formierung nach 24 Wochen bereits abgelaufen war oder dass es zu keiner Veränderung in der MAP 2 Immunreaktivität durch das Transplantat kam. Die Ergebnisse der direkten Verbindung zeigten aber, dass das zweifach erhöhte Signal für MAP 2 im zeitlichen Verlauf konstant blieb, so dass es zu keinem dendritischen Rückzug kam.

*Choline acetyltransferase* (ChAT) ist das biosynthetische Enzym für den Neurotransmitter Acetylcholine (ACh) und dient zur Lokalisierung von Acetylcholine in Neuronen (Criswell and Brandon 1993). Acetylcholine (ACh) wurde in der Retina als Neurotransmitter identifiziert (Puro 1983). Dort fanden sich cholinerge amakrine Zellen, die für ChAT immunreaktiv waren, in der innersten Zone der inneren nukleären Schicht und in der äußeren Zone der Ganglienzellschicht. Zusätzlich formierten sie ihre Dendriten, so dass auch zwei getrennte Banden in der inneren plexiformen Schicht des adulten Tieres durch die Markierung mit ChAT fluoreszierten (Mitrofanis et al. 1988). Das ChAT immunoreaktive Material war – außer im *Nukleus*, in den Mitochondrien, im Golgi Apparat und in vesikulären Komponenten – diffus im Zytoplasma verteilt (Kondo et al. 1985). Diese ChAT positiven Bereiche stimmten mit den Ergebnissen für die Kontrollretina überein. Aber das Signal variierte deutlich in

seiner Intensität, da die unbehandelte Netzhaut entweder kein Signal oder ein dreifach positives Signal für ChAT zeigte. Diese Varianz wurde bereits in anderen Studien erwähnt. Obwohl die cholinerge Natur der RGZ bereits bei Kröten vermutet wurde (Oswald and Freeman 1980), hatten viele morphologische Studien bezüglich des Nachweises dieser These keinen Erfolg. Das Problem dabei war, dass sich ACh selbst kaum histologisch nachweisen ließ, so dass sich die ChAT Immunhistochemie als beste Methode für einen adäquaten Nachweis cholinergener Neurone durchsetzte. Die meisten Studien konnten zwar eine ChAT Immunreaktivität für amakrine Zellen in der Retina aber nicht für RGZ zeigen (Eckenstein and Thoenen 1982). Es wurden zwei verschiedene Splicevarianten für ChAT identifiziert (Tooyama and Kimura 2000). Durch eine *intracranielle* Sehnervenquetschung konnte erstmals mit pChAT die Präsenz von cholinergen Ganglienzellen in der Netzhaut der Ratte gezeigt werden (Yasuhara et al. 2003). Bei der *intraorbitalen* Sehnervenquetschung variierte der Nachweis cholinergener Zellen im zeitlichen Verlauf, so dass es im Anschluss an ein dreifach positives Signal nach einer Woche zu einem kompletten Verlust der ChAT Immunreaktivität nach vier Wochen kam. Nach 24 Wochen konnte wieder ein einfach positives ChAT Signal erzeugt werden. Durch diese schwankenden Ergebnisse könnte eine Fehlmessung in der zuvor beschriebenen Weise angenommen werden. Es könnte aber auch vermutet werden, dass offensichtlich nicht jede Retina bzw. nicht jeder Bereich in der Retina über ChAT positive Areale verfügte. Bei einer Sehnervendurchtrennung bestanden ebenfalls Varianzen, die entweder einen einfach positiven Wert oder ein negatives Signal für ChAT äußerten. Dies könnte für einen partiellen bzw. kompletten Verlust cholinergener Neurone durch die degenerativen Ereignisse sprechen. In allen Transplantationsgruppen konnten ChAT positive Bereiche erfaßt werden, so dass eventuell das periphere Nerven­transplantat einen positiven stabilisierenden Effekt auf die cholinergen Neurone hatte. Durch die direkte Verbindung mit dem Muskelgewebe kam es zu einer Erhöhung des ChAT Signals auf das Dreifache, so dass der Muskel durch seinen peripheren Charakter einen stimulierenden Effekt auf die cholinergen Zellen haben könnte.

SMN 1 und SMN 2 sind zwei beinahe identische Kopien des *survival of motorneuron gen* im Menschen. Die Deletion des SMN 1 Gens, die mit der Unfähigkeit des SMN 2 Gens gekoppelt ist, den SMN 1 Verlust zu kompensieren, führt zu einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, die spinale Muskelatrophie (SMA). Diese Erkrankung endet häufig im infantilen Stadium letal (Singh 2007). Die motoneuron-spezifische SMN Immunoreaktivität konnte in verschiedenen Regionen des Rückenmarks, aber auch in diversen Regionen des zentralen Nervensystems (Hirnstamm, *Cerebellum*, *Thalamus*, *Kortex* sowie *Hippocampus*) nachgewiesen werden. Es wurde berichtet, dass das SMN Protein eine wichtige Rolle im nukleozytoplasmatischen und dendritischen Transport spielte (Bechade et al. 1999). Es war während der postnatalen Entwicklung mit zytoskelettalen Strukturen in spinalen Dendriten und Axonen assoziiert. Es wurde vermutet, dass das SMN Protein über einen axoplasmatischen Bewegungsfluss in die reifenden Neurone transportiert werden könnte (Pagliardini et al. 2000). In der Ganglienzellschicht der Retina konnte ein eindrucksvoller Expressionslevel des SMN Proteins gezeigt werden (Soler-Botija et al. 2005), was sich in der Kontrollretina durch eine einfache SMN 1 Immunreaktivität nachweisen ließ. Durch eine Durchtrennung des Sehnervs wurde ein Anstieg dieses Antikörpers auf eine zweifache Intensität erzeugt. Interessanterweise war die Intensität von SMN 1 bei der Durchführung einer Sehnervenkompression in den verschiedenen postoperativen Zeitintervallen sehr unterschiedlich. Während die Intensität für SMN 1 nach einer Woche wie auch nach 24 Wochen dem SMN 1 Signal der Kontrollretina entsprach, kam es nach vier Wochen zu einem kurzzeitigen Anstieg auf eine zweifach positive Intensität. Möglicherweise konnte der nukleozytoplasmatische und dendritische Transport von SMN 1 erst nach vier Wochen aktiviert werden, aber reduzierte sich bereits wieder nach 24 Wochen. Die Immunreaktivität von SMN 1 nahm bei der Transplantation eines peripheren Nerventransplantates auf eine zweifache Intensität zu. Das Transplantat schien damit einen Einfluss auf die Expression des SMN Proteins zu haben, so dass die zytoskelettalen Elemente in den retinalen Dendriten und Axonen besser dargestellt werden

konnten. Durch die Verbindung zum Muskelgewebe über ein peripheres Nerven-Transplantat kam es zu einem dreifach positiven Signal von SMN 1. Bei der direkten Verbindung mit dem Muskelgewebe intensivierte sich die Immunreaktivität von SMN 1 in den frühen Phasen auf eine zweifache Positivität und steigerte sich nach 24 Wochen sogar auf eine dreifache Intensität. Diese Intensitätszunahme im postoperativen Verlauf zeigte einen dynamischen Prozess der Expression des SMN 1 Proteins. Durch die ausgeprägte Zunahme der Immunreaktivität des motoneuronspezifischen Antikörpers SMN 1, die bei einem Kontakt zum Muskelgewebe über die entsprechenden Zeiträume bestand, konnte vermutet werden, dass sich eine synaptische Formierung in der Funktion einer motorischen Endplatte entwickelt hatte. Da aber auch die unbehandelte Netzhaut sowie die Netzhaut nach einer Transplantation mit einem nicht-muskulären Zielgebiet in geringer Intensität über ein SMN 1 Signal verfügte, konnte nicht zwangsläufig von einer motorischen Endplatte ausgegangen werden. Welche Funktion aber der motoneuronspezifische Antikörper in der Netzhaut genau hat, konnte nicht ausreichend geklärt werden. Möglicherweise zeigen nicht nur Motoneurone eine SMN 1 Immunreaktivität.

Der *LIM homeodomain* Code reguliert die Entwicklung von retinalen Neuroepithelien.

*Islet 1* (Isl 1) ist ein hoch konservierter Transkriptionsregulator, der zur Familie der *LIM homeodomain*-enthaltenden Proteine gehört, die das Schicksal der Zellen in den verschiedenen Systemen beeinflussen (Pfaff et al. 1996; Hobert and Westphal 2000). In der Retina konnte die Isl 1 mRNA in der Ganglienzellschicht sowie in der inneren nukleären Schicht gefunden werden. Es wurde angenommen, dass das Isl Gen eine entscheidende Rolle in der Zelldetermination und Zelldifferenzierung im heranreifenden Nervensystem spielten (Gong et al. 1995) und damit zu den spät neuronalen Differenzierungsmarkern im zentralen Nervensystem gehörte (Vogel-Hopker et al. 2000). Bereits in den frühen embryonalen Phasen konnte die äußere nukleäre Schicht mit LHX 3, Isl 1 und Isl 2 markiert werden (Edqvist et al. 2006).

In der adulten Kontrollretina konnte Isl 1 in bipolaren Zellen, cholinergen amakrinen Zellen, Horizontalzellen und Ganglienzellen einfach positiv nachgewiesen werden. Bei dem blind endenden Zielgebiet und dem muskulären Zielgebiet war die Immunreaktion für Isl 1 mit der der Kontrollretina identisch. Bei einem Kontakt zum *Kortex* und bei einer Sehnervendurchtrennung intensivierte sich das Signal für Isl 1 auf das Zweifache. Durch diese Ergebnisse konnte das Transplantat nicht als entscheidender Faktor für die Zelldifferenzierung angesehen werden. Bezüglich der Immunreaktivität von Isl 1 konnten auch beim zeitlichen Verlauf Varianzen entdeckt werden. Zu Beginn der direkten Verbindung war das Signal mit dem der Kontrollretina identisch, aber nach 24 Wochen stieg die Intensität auf das Dreifache an. Diesen verzögerten Signalanstieg für Isl 1 konnte man auch bei der Sehnervenquetschung beobachten, wobei sich der Anstieg in späteren Phasen nur auf das Zweifache steigerte. Damit konnte von einer Zelldifferenzierung in späteren Phasen ausgegangen werden. Außerdem wurde Isl 1 als ein Transkriptionsfaktor angesehen, der für die Expression von Proteinen verantwortlich war, die für den physiologisch intakten neuronalen Phänotyp signifikant regulierten (Hol et al. 1999), so dass die Zunahme der Isl Immunreaktivität ein Nachweis für eine funktionsfähige neuronale Integrität bedeutete.

Der zur *LIM home domain* gehörende Faktor *Lim 3* (LHX 3) ist ein potentieller Transkriptionsregulator für bestimmte Gene, die während der Morphogenese und der Differenzierung in der Hypophyse, der Epiphyse und in Motoneuronen eine entscheidende Rolle spielen (Seidah et al. 1994). In bisherigen Untersuchungen anderer Arbeiten konnte die Beteiligung von LHX 3 an der Morphogenese von zwei benachbarten, aber verschiedenartigen Zelltypen, die Motoneurone und V2 Interneurone, identifiziert werden (Thaler et al. 2002). LHX 3 und Isl 1, als *LIM home domain* Proteine, bildeten einen kombinierten Code, der die eindeutigen Motoneuronidentitäten generiert (Thor et al. 1999).

In dieser Studie konnte zum ersten Mal ein immunhistochemischer Nachweis für LHX 3 in der Netzhaut erbracht werden. Die unbehandelte Kontrollretina

verfügte über eine zweifache Intensität des Antikörpers LHX 3, die nach einer Sehnervendurchtrennung bestehen blieb. In der frühen Phase der Sehnervenquetschung und der direkten Verbindung mit dem Muskel resultierte ebenfalls ein zweifach positives Signal, aber schon nach vier Wochen stieg das immunreaktive Signal für LHX 3 auf das Dreifache an und stabilisierte sich für einen längeren Zeitraum. Durch die Transplantation eines peripheren Nervs verstärkte sich das LHX 3 Signal unabhängig von dem gewählten Zielgebiet. Morphologisch ließ sich dadurch vermuten, dass der Antikörper LHX 3 in der Netzhaut Interneurone, wie die bipolaren Zellen, markierte. Durch die Intensivierung der Immunreaktivität konnte eine vermehrte Differenzierungsbereitschaft im Sinne regenerativer Prozesse angenommen werden, die durch das Transplantat besonders stimuliert wurde.

Das *LIM homeobox* Gen LHX 5 ist auch bekannt als *lim 2* und wird im ZNS des embryonalen und adulten Tieres expremiert. Es bestehen strukturelle Ähnlichkeiten mit den anderen *LIM homeodomain* Proteinen LHX 1/*lim 1* und LHX 3/*lim 3* (Bertuzzi et al. 1996). Während der neuronalen Entwicklung wurde die Expression von LHX 5 hauptsächlich in den vorderen Anteilen des Neuralrohrs nachgewiesen, wodurch LHX 5 eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Spezifizierung des Vorderhirns zugeteilt wurde. Es konnte aber auch eine Expression im Zwischen-, Hinter- und Mittelhirn sowie im Rückenmark nachgewiesen werden (Sheng et al. 1997). Während der Entwicklung des *Hippocampus* und des *Cerebellums* war LHX 5 für die Regulierung der Morphogenese sowie für die Differenzierung von *hippocampalen* Neuronen und *Purkinje Zellen* verantwortlich (Zhao et al. 1999; Zhao et al. 2007). In der optischen Sehrinde des adulten Tieres expremierten vereinzelte Zellen die Transkriptionsfaktoren LHX 1/LHX 5. Dabei war die Expression für LHX 1 und LHX 5 in allen Neuronenschichten des *Tektums* ähnlich verteilt, allerdings wurden die tiefen Schichten bevorzugt (Moreno et al. 2005). Bisher wurde kein Nachweis für eine Expression von LHX 5 in der Netzhaut erbracht. In der Kontrollretina konnte erstmals eine einfache Immunreaktivität für LHX 5 in der Ganglienzellschicht sowie in der inneren und

äußeren plexiformen Schicht dargestellt werden. Die *LIM homeodomain* Gene beeinflussten die Bahnung und Zielfindung der *thalamokortikalen* Axone durch autonome und nicht autonome Mechanismen (Nakagawa and O`Leary 2001). Diese Erkenntnisse konnten auch bei den Transplantationen mit einem definitiven Zielgebiet wie dem *Kortex* sowie dem Muskel durch einen zusätzlichen Anstieg des LHX 5 Signals auf das Dreifache gestützt werden. Bei der Transplantation mit einem unbestimmten Zielgebiet konnte vermutlich keine bzw. nur eine geringe Zielfindung der elongierten Axone stattfinden, so dass das Signal für LHX 5 zweifach positiv ausfiel. Durch den Mangel der spontanen substantiellen Regenerationsbereitschaft nach einer Sehnervendurchtrennung sowie einer -quetschung resultierte nur eine minimale Erhöhung des LHX 5 Signals. Bei der direkten Verbindung mit dem Muskel erkannte man einen zeitlichen Verlauf bezüglich der ansteigenden Immunreaktivität für LHX 5, so dass eine Bahnung der regenerierten Fasern auch ohne ein peripheres Nerven­transplantat möglich war.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regenerationsbereitschaft adulter retinaler Ganglienzellen als Folge einer traumatischen Sehnervenverletzung durch die Unterstützung eines peripheren Nerventransplantats untersucht. Durch dieses Modell sollte ermittelt werden, ob die retinalen Ganglienzellen ohne den Kontakt zum anatomischen Gewebe in ein fremdes neuronales Zielgebiet regenerieren können. Neben einem kortikalen und einem blind endenden Ziel wurde ein besonderes Augenmerk auf die Verbindung zu dem *Musculus temporalis* als muskuläres Zielgebiet gelegt. Aufgrund der großen Distanz zum Zielgebiet musste die postoperative Auswertung 24 Wochen später erfolgen, um eine mögliche axonale Elongation zu gewährleisten. Durch die Entwicklung eines neuen Operationsverfahrens wurde erstmals ein direkter Kontakt des durchtrennten Sehnervenstumpfes zum *Musculus temporalis* geschaffen. Aufgrund der geringeren Distanz ohne das Nerventransplantat wurde das postoperative Verhalten der retinalen Ganglienzellen im zeitlichen Verlauf (eine Woche, vier Wochen, 24 Wochen) beobachtet.

Die überlebenden retinalen Ganglienzellen wurden durch retrograde Färbungen bezüglich ihrer quantitativen (Zellzahl) und qualitativen (Morphologie) Veränderungen durch die Verbindung zum neuen Zielgebiet nachgewiesen. Die Regeneration auswachsender Axone wurde mit Hilfe der anterograden Markierung beurteilt. Die Expressionsprofile diverser neuron- bzw. motoneuronspezifischer Antikörper wurden postoperativ immunhistologisch bestimmt.

Bei der retrograden Färbung zeigte sich ein zielabhängiger massiver Zellverlust, wobei die retinale Zellzahl durch das periphere Nerventransplantat im Vergleich zur vollständigen Sehnervendurchtrennung signifikant erhöht war. Interessanterweise überlebten die meisten retinalen Zellen bei der direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskelgewebe. Zusätzlich korrelierte die phänotypische Veränderung mit dem Zielgewebe, die bei dem Kontakt zum

Muskel durch eine intensive dendritische Verzweigungenbereitschaft erstaunen ließ. In der anterograden Auswertung elongierten die Axone und nahmen bezüglich ihrer Faserdichte mit zunehmender Distanzierung vom peripheren Transplantat ab. Eine Resynaptogenese und Penetration konnte lediglich beim Kontakt zum Muskelgewebe vermutet werden. Bei der direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskelgewebe war die Projektion der elongierten Fasern deutlich unorganisierter, wobei die Fasern über die Dauer quantitativ abnahmen. Mit Hilfe der Immunhistochemie konnten die veränderten Expressionsprofile sowohl der neuron- als auch der motoneuronspezifischen Markerproteine im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen lässt sich somit sagen, dass eine Regeneration in ein fremdes Zielgebiet möglich ist. Es finden dabei zielabhängige Veränderungen bezüglich der Quantität, der Morphologie der retinalen Ganglienzellen sowie des Expressionsmusters neuron- und motoneuronspezifischer Markerproteine statt. Erstaunlicherweise konnte sogar eine Regeneration bei einer direkten Verbindung des Sehnervenstumpfes zum Muskel erzielt werden.

Eine Erweiterung der vorliegenden Arbeit wäre dahingehend interessant, ob es auch zu einer funktionellen Verknüpfung mit dem fremden Zielgebiet kommt, über die ein Informationsaustausch stattfinden könnte. Diese Erkenntnisse könnten einen Grundstein für zukünftige Arbeiten legen, indem durch elektronenmikroskopische Analysen, elektrophysiologische Messungen sowie gentechnische Verfahren die Funktionalität synaptischer Verbindungen mit dem fremden Zielgebiet genauer analysiert werden könnte.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aguayo, A. J., D. B. Clarke, et al. (1996). "Effects of neurotrophins on the survival and regrowth of injured retinal neurons." Ciba Found Symp **196**: 135-44; discussion 144-8.
2. Aguayo, A. J., M. Rasminsky, et al. (1991). "Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **331**(1261): 337-43.
3. Avwenagha, O., G. Campbell, et al. (2003). "Distribution of GAP-43, beta-III tubulin and F-actin in developing and regenerating axons and their growth cones in vitro, following neurotrophin treatment." J Neurocytol **32**(9): 1077-89.
4. Bahr, M. (2000). "Live or let die - retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS." Trends Neurosci **23**(10): 483-90.
5. Bahr, M., G. W. Eschweiler, et al. (1992). "Precrushed sciatic nerve grafts enhance the survival and axonal regrowth of retinal ganglion cells in adult rats." Exp Neurol **116**(1): 13-22.
6. Bechade, C., P. Rostaing, et al. (1999). "Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport." Eur J Neurosci **11**(1): 293-304.
7. Belliveau, M. J. and C. L. Cepko (1999). "Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina." Development **126**(3): 555-66.
8. Benowitz, L. I. and A. Routtenberg (1997). "GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity." Trends Neurosci **20**(2): 84-91.
9. Bertuzzi, S., H. Z. Sheng, et al. (1996). "Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the mouse LIM/homeobox gene Lhx5." Genomics **36**(2): 234-9.
10. Bray, G. M., M. P. Villegas-Perez, et al. (1987). "The use of peripheral nerve grafts to enhance neuronal survival, promote growth and permit terminal reconnections in the central nervous system of adult rats." J Exp Biol **132**: 5-19.
11. Bush, T. G., N. Puvanachandra, et al. (1999). "Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice." Neuron **23**(2): 297-308.
12. Butts, D. A., P. O. Kanold, et al. (2007). "A burst-based "Hebbian" learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement." PLoS Biol **5**(3): e61.
13. Cajal, R. y. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. London, University Press.

14. Campbell, G., A. R. Lieberman, et al. (1992). "Regeneration of adult rat CNS axons into peripheral nerve autografts: ultrastructural studies of the early stages of axonal sprouting and regenerative axonal growth." J Neurocytol **21**(11): 755-87.
15. Carbonetto, S., D. Evans, et al. (1987). "Nerve fiber growth in culture on tissue substrata from central and peripheral nervous systems." J Neurosci **7**(2): 610-20.
16. Caroni, P. and M. E. Schwab (1988). "Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter." Neuron **1**(1): 85-96.
17. Carter, D. A., G. M. Bray, et al. (1989). "Regenerated retinal ganglion cell axons can form well-differentiated synapses in the superior colliculus of adult hamsters." J Neurosci **9**(11): 4042-50.
18. Cepko, C. L., C. P. Austin, et al. (1996). "Cell fate determination in the vertebrate retina." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 589-95.
19. Chen, H. and A. J. Weber (2002). "Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor." Glia **38**(2): 115-25.
20. Chen, M. S., A. B. Huber, et al. (2000). "Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1." Nature **403**(6768): 434-9.
21. Coblentz, F. E., M. J. Radeke, et al. (2003). "Evidence that ganglion cells react to retinal detachment." Exp Eye Res **76**(3): 333-42.
22. Cragg, B. G. (1970). "What is the signal for chromatolysis?" Brain Res **23**(1): 1-21.
23. Cristofanilli, M., S. Thanos, et al. (2004). "Neuronal MAP2 mRNA: species-dependent differential dendritic targeting competence." J Mol Biol **341**(4): 927-34.
24. Criswell, M. H. and C. Brandon (1993). "Acetylcholinesterase and choline acetyltransferase localization patterns do correspond in cat and rat retinas." Vision Res **33**(13): 1747-53.
25. Debanne, D., G. Daoudal, et al. (2003). "Brain plasticity and ion channels." J Physiol Paris **97**(4-6): 403-14.
26. Decherchi, P. and P. Gauthier (1996). "In vitro pre-degenerated nerve autografts support CNS axonal regeneration." Brain Res **726**(1-2): 181-8.
27. Dezawa, M. (2002). "Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells." Anat Sci Int **77**(1): 12-25.
28. Doering, L. C. and A. J. Aguayo (1987). "Hirano bodies and other cytoskeletal abnormalities develop in fetal rat CNS grafts isolated for long periods in peripheral nerve." Brain Res **401**(1): 178-84.
29. Eckenstein, F. and H. Thoenen (1982). "Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons." Embo J **1**(3): 363-8.
30. Edqvist, P. H., S. M. Myers, et al. (2006). "Early identification of retinal subtypes in the developing, pre-laminated chick retina using the

- transcription factors Prox1, Lim1, Ap2alpha, Pax6, Isl1, Isl2, Lim3 and Chx10." Eur J Histochem **50**(2): 147-54.
31. Erskine, L. and E. Herrera (2007). "The retinal ganglion cell axon's journey: Insights into molecular mechanisms of axon guidance." Dev Biol **308**(1): 1-14.
  32. Fenrich, K. and T. Gordon (2004). "Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances." Can J Neurol Sci **31**(2): 142-56.
  33. Fischer (2000). Protektiver Einfluss von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristallinen auf das neuronale Überleben und die axonale Regeneration im adulten Zentralen Nervensystem.
  34. Fischer, D., P. Heiduschka, et al. (2001). "Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats." Exp Neurol **172**(2): 257-72.
  35. Fischer, D., V. Petkova, et al. (2004). "Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation." J Neurosci **24**(40): 8726-40.
  36. Fisher, L. J. (1979). "Development of synaptic arrays in the inner plexiform layer of neonatal mouse retina." J Comp Neurol **187**(2): 359-72.
  37. Gaiarsa, J. L., O. Caillard, et al. (2002). "Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance." Trends Neurosci **25**(11): 564-70.
  38. Galli-Resta, L. and M. Ensigni (1996). "An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer." J Neurosci **16**(7): 2318-24.
  39. Gauthier, P. and M. Rasminsky (1988). "Activity of medullary respiratory neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts in the adult rat." Brain Res **438**(1-2): 225-36.
  40. Germain, F., E. Fernandez, et al. (2003). "Morphometrical analysis of dendritic arborization in axotomized retinal ganglion cells." Eur J Neurosci **18**(5): 1103-9.
  41. Germain, F., E. Fernandez, et al. (2007). "Morphological signs of apoptosis in axotomized ganglion cells of the rabbit retina." Neuroscience **144**(3): 898-910.
  42. Gispen, W. H. (1993). "Neuronal plasticity and function." Clin Neuropharmacol **16 Suppl 1**: S5-11.
  43. Goldberg, J. L. and B. A. Barres (2000). "The relationship between neuronal survival and regeneration." Annu Rev Neurosci **23**: 579-612.
  44. Goldberg, J. L., M. P. Klassen, et al. (2002). "Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells." Science **296**(5574): 1860-4.
  45. Gong, Z., C. C. Hui, et al. (1995). "Presence of isl-1-related LIM domain homeobox genes in teleost and their similar patterns of expression in brain and spinal cord." J Biol Chem **270**(7): 3335-45.
  46. Hall, S. (1997). "Axonal regeneration through acellular muscle grafts." J Anat **190 ( Pt 1)**: 57-71.

47. Hall, S. and M. Berry (1989). "Electron microscopic study of the interaction of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts." J Neurocytol **18**(2): 171-84.
48. Hankin, M. and R. Lund (1991). "How do retinal axons find their targets in the developing brain?" Trends Neurosci **14**(6): 224-8.
49. Harvey, A. R., Y. Hu, et al. (2006). "Gene therapy and transplantation in CNS repair: the visual system." Prog Retin Eye Res **25**(5): 449-89.
50. Harvey, A. R. and R. D. Lund (1981). "Transplantation of tectal tissue in rats. II. Distribution of host neurons which project to transplants." J Comp Neurol **202**(4): 505-20.
51. Harvey, A. R., G. W. Plant, et al. (1995). "Schwann cells and the regrowth of axons in the mammalian CNS: a review of transplantation studies in the rat visual system." Clin Exp Pharmacol Physiol **22**(8): 569-79.
52. Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York Wiley.
53. Hobert, O. and H. Westphal (2000). "Functions of LIM-homeobox genes." Trends Genet **16**(2): 75-83.
54. Hol, E. M., F. W. Schwaiger, et al. (1999). "Regulation of the LIM-type homeobox gene islet-1 during neuronal regeneration." Neuroscience **88**(3): 917-25.
55. Hu, Y., A. Arulpragasam, et al. (2007). "The importance of transgene and cell type on the regeneration of adult retinal ganglion cell axons within reconstituted bridging grafts." Exp Neurol.
56. Kablar, B. (2003). "Determination of retinal cell fates is affected in the absence of extraocular striated muscles." Dev Dyn **226**(3): 478-90.
57. Keirstead, S. A., M. Vidal-Sanz, et al. (1985). "Responses to light of retinal neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts in the rat." Brain Res **359**(1-2): 402-6.
58. Kobbert, C. and S. Thanos (2000). "Topographic representation of the sciatic nerve motor neurons in the spinal cord of the adult rat correlates to region-specific activation patterns of microglia." J Neurocytol **29**(4): 271-83.
59. Kondo, H., H. Kuramoto, et al. (1985). "Discrete distribution of cholinergic and vasoactive intestinal polypeptidergic amacrine cells in the rat retina." Neurosci Lett **54**(2-3): 213-8.
60. Kong, X., X. Sun, et al. (2004). "The protective role of Mecobalamin following optic nerve crush in adult rats." Yan Ke Xue Bao **20**(3): 171-7.
61. Kottis, V., P. Thibault, et al. (2002). "Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth." J Neurochem **82**(6): 1566-9.
62. Kreutzberg, G. W. (1996). "Principles of neuronal regeneration." Acta Neurochir Suppl **66**: 103-6.
63. Lam, T. T., J. M. Kwong, et al. (2003). "Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(2): 638-45.
64. Langmann, T. (2007). "Microglia activation in retinal degeneration." J Leukoc Biol **81**(6): 1345-51.

65. Lau, K. C., K. F. So, et al. (1994). "Intravitreal transplantation of a segment of peripheral nerve enhances axonal regeneration of retinal ganglion cells following distal axotomy." Exp Neurol **128**(2): 211-5.
66. Leon, S., Y. Yin, et al. (2000). "Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve." J Neurosci **20**(12): 4615-26.
67. Liedtke, T., R. Naskar, et al. (2007). "Transformation of adult retina from the regenerative to the axonogenesis state activates specific genes in various subsets of neurons and glial cells." Glia **55**(2): 189-201.
68. Liu, H. H. and S. T. Brady (2004). "cAMP, tubulin, axonal transport, and regeneration." Exp Neurol **189**(2): 199-203.
69. Ma, W., R. T. Yan, et al. (2004). "bHLH genes cath5 and cNSCL1 promote bFGF-stimulated RPE cells to transdifferentiate toward retinal ganglion cells." Dev Biol **265**(2): 320-8.
70. Mann, F., W. A. Harris, et al. (2004). "New views on retinal axon development: a navigation guide." Int J Dev Biol **48**(8-9): 957-64.
71. Marquardt, T. and P. Gruss (2002). "Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all." Trends Neurosci **25**(1): 32-8.
72. Maslim, J., M. Webster, et al. (1986). "Stages in the structural differentiation of retinal ganglion cells." J Comp Neurol **254**(3): 382-402.
73. Matthew, W. D. and P. H. Patterson (1983). "The production of a monoclonal antibody that blocks the action of a neurite outgrowth-promoting factor." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **48 Pt 2**: 625-31.
74. McDonald, J. W., X. Z. Liu, et al. (1999). "Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord." Nat Med **5**(12): 1410-2.
75. McKerracher, L., C. Essagian, et al. (1993). "Marked increase in beta-tubulin mRNA expression during regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals." J Neurosci **13**(12): 5294-300.
76. McKerracher, L., M. Vidal-Sanz, et al. (1990). "Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats." J Neurosci **10**(2): 641-8.
77. McKerracher, L., M. Vidal-Sanz, et al. (1990). "Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats." J Neurosci **10**(8): 2834-41.
78. Mey, J. and S. Thanos (1996). "Functional and biochemical analysis of CNS-relevant neurotrophic activity in the lesioned sciatic nerve of adult rats." J Hirnforsch **37**(1): 25-50.
79. Misantone, L. J., M. Gershenbaum, et al. (1984). "Viability of retinal ganglion cells after optic nerve crush in adult rats." J Neurocytol **13**(3): 449-65.
80. Mitrofanis, J., J. Maslim, et al. (1988). "Catecholaminergic and cholinergic neurons in the developing retina of the rat." J Comp Neurol **276**(3): 343-59.
81. Moreno, N., I. Bachy, et al. (2005). "LIM-homeodomain genes as territory markers in the brainstem of adult and developing *Xenopus laevis*." J Comp Neurol **485**(3): 240-54.

82. Moskowitz, P. F. and M. M. Oblinger (1995). "Sensory neurons selectively upregulate synthesis and transport of the beta III-tubulin protein during axonal regeneration." J Neurosci **15**(2): 1545-55.
83. Mukhopadhyay, G., P. Doherty, et al. (1994). "A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration." Neuron **13**(3): 757-67.
84. Muller, H. W., M. J. Ignatius, et al. (1986). "Expression of specific sheath cell proteins during peripheral nerve growth and regeneration in mammals." J Cell Biol **102**(2): 393-402.
85. Nakagawa, Y. and D. D. O'Leary (2001). "Combinatorial expression patterns of LIM-homeodomain and other regulatory genes parcellate developing thalamus." J Neurosci **21**(8): 2711-25.
86. Naskar, R., M. Wissing, et al. (2002). "Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(9): 2962-8.
87. Nieuwenhuys, R. (1994). "The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology." Anat Embryol (Berl) **190**(4): 307-37.
88. Oswald, R. E. and J. A. Freeman (1980). "Optic nerve transmitters in lower vertebrate species." Life Sci **27**(7): 527-33.
89. Pagliardini, S., A. Giavazzi, et al. (2000). "Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord." Hum Mol Genet **9**(1): 47-56.
90. Perez-Otano, I. and M. D. Ehlers (2005). "Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking." Trends Neurosci **28**(5): 229-38.
91. Perry, V. H., Z. Henderson, et al. (1983). "Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat." J Comp Neurol **219**(3): 356-68.
92. Pfaff, S. L., M. Mendelsohn, et al. (1996). "Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation." Cell **84**(2): 309-20.
93. Pizzi, M. A. and M. J. Crowe (2007). "Matrix metalloproteinases and proteoglycans in axonal regeneration." Exp Neurol **204**(2): 496-511.
94. Puro, D. G. (1983). "Cholinergic transmission by embryonic retinal neurons in culture: inhibition by dopamine." Brain Res **285**(1): 79-86.
95. Puro, D. G., F. G. De Mello, et al. (1977). "Synapse turnover: the formation and termination of transient synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(11): 4977-81.
96. Quan, M. Z., J. Kosaka, et al. (1999). "Survival of axotomized retinal ganglion cells in peripheral nerve-grafted ferrets." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(10): 2360-6.
97. Ramon-Cueto, A., M. I. Cordero, et al. (2000). "Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia." Neuron **25**(2): 425-35.
98. Riopelle, R. J., R. J. Boegman, et al. (1981). "Peripheral nerve contains heterogeneous growth factors that support sensory neurons in vitro." Neurosci Lett **25**(3): 311-6.

99. Rockhill, R. L., F. J. Daly, et al. (2002). "The diversity of ganglion cells in a mammalian retina." J Neurosci **22**(9): 3831-43.
100. Ruffolo, R. R., Jr., G. S. Eisenbarth, et al. (1978). "Synapse turnover: a mechanism for acquiring synaptic specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(5): 2281-5.
101. Scalia, F., V. Arango, et al. (1985). "Loss and displacement of ganglion cells after optic nerve regeneration in adult *Rana pipiens*." Brain Res **344**(2): 267-80.
102. Scarlato, M., T. Xu, et al. (2001). "Axon-Schwann cell interactions regulate the expression of fibroblast growth factor-5 (FGF-5)." J Neurosci Res **66**(1): 16-22.
103. Schuetz, E., K. Rose, et al. (2003). "Regeneration of ganglion cell axons into a peripheral nerve graft alters retinal expression of glial markers and decreases vulnerability to re-axotomy." Restor Neurol Neurosci **21**(1-2): 11-8.
104. Schuetz, E. and S. Thanos (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 Res Bull **62**(5): 391-6.
105. Schwab, M. E. and P. Caroni (1988). "Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro." J Neurosci **8**(7): 2381-93.
106. Schwab, M. E. and H. Thoenen (1985). "Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors." J Neurosci **5**(9): 2415-23.
107. Seidah, N. G., J. C. Barale, et al. (1994). "The mouse homeoprotein mLIM-3 is expressed early in cells derived from the neuroepithelium and persists in adult pituitary." DNA Cell Biol **13**(12): 1163-80.
108. Sernagor, E., S. J. Eglon, et al. (2001). "Development of retinal ganglion cell structure and function." Prog Retin Eye Res **20**(2): 139-74.
109. Shafit-Zagardo, B. and N. Kalcheva (1998). "Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron." Mol Neurobiol **16**(2): 149-62.
110. Sheng, H. Z., S. Bertuzzi, et al. (1997). "Expression of murine Lhx5 suggests a role in specifying the forebrain." Dev Dyn **208**(2): 266-77.
111. Shi, S. H., Y. Hayashi, et al. (1999). "Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation." Science **284**(5421): 1811-6.
112. Singh, R. N. (2007). "Evolving concepts on human SMN pre-mRNA splicing." RNA Biol **4**(1): 7-10.
113. Skene, J. H. and M. Willard (1981). "Characteristics of growth-associated polypeptides in regenerating toad retinal ganglion cell axons." J Neurosci **1**(4): 419-26.
114. Smalheiser, N. R., S. M. Crain, et al. (1981). "Development of ganglion cells and their axons in organized cultures of fetal mouse retinal explants." Brain Res **204**(1): 159-78.

115. So, K. F. and A. J. Aguayo (1985). "Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats." Brain Res **328**(2): 349-54.
116. Soler-Botija, C., I. Cusco, et al. (2005). "Implication of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function?" J Neuropathol Exp Neurol **64**(3): 215-23.
117. Soto, I., B. Marie, et al. (2003). "FGF-2 modulates expression and distribution of GAP-43 in frog retinal ganglion cells after optic nerve injury." J Neurosci Res **73**(4): 507-17.
118. Svensson, M. and H. Aldskogius (1992). "The effect of axon injury on microtubule-associated proteins MAP2, 3 and 5 in the hypoglossal nucleus of the adult rat." J Neurocytol **21**(3): 222-31.
119. Tan, M. M. and A. R. Harvey (1999). "Retinal axon regeneration in peripheral nerve, tectal, and muscle grafts in adult rats." J Comp Neurol **412**(4): 617-32.
119. Tan, M. M., A. R. Harvey, et al. (1990). "Regeneration of retinal axons in grafts of peripheral and central nervous tissue in the adult rat." Neurosci Lett **117**(1-2): 14-9.
120. Taniuchi, M., H. B. Clark, et al. (1986). "Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 4094-8.
121. Terenghi, G. (1995). "Peripheral nerve injury and regeneration." Histol Histopathol **10**(3): 709-18.
122. Tessler, A., B. T. Himes, et al. (1985). "Sciatic nerve transection produces death of dorsal root ganglion cells and reversible loss of substance P in spinal cord." Brain Res **332**(2): 209-18.
123. Thaler, J. P., S. K. Lee, et al. (2002). "LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions." Cell **110**(2): 237-49.
124. Thanos, S. (1988). "Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments." Cell Tissue Res **254**(3): 599-609.
125. Thanos, S. (1997). "Neurobiology of the regenerating retina and its functional reconnection with the brain by means of peripheral nerve transplants in adult rats." Surv Ophthalmol **42 Suppl 1**: S5-26.
126. Thanos, S. and F. Bonhoeffer (1987). "Axonal arborization in the developing chick retinotectal system." J Comp Neurol **261**(1): 155-64.
127. Thanos, S. and J. Mey (1995). "Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats." J Neurosci **15**(2): 1057-79.
128. Thanos, S., J. Mey, et al. (1993). "Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro." J Neurosci **13**(2): 455-66.
129. Thor, S., S. G. Andersson, et al. (1999). "A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection." Nature **397**(6714): 76-80.

130. Tian, N. (2004). "Visual experience and maturation of retinal synaptic pathways." Vision Res **44**(28): 3307-16.
131. Tooyama, I. and H. Kimura (2000). "A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers." J Chem Neuroanat **17**(4): 217-26.
132. Trecarten, M. J., M. P. Villegas-Perez, M. Vidal-Sanz, S. Thanos, and A. J. Aguayo (1986). "Growth of axons along peripheral nerve system grafts inserted into the retina of adult rats." Neuroscience.
133. Turner, D. L., E. Y. Snyder, et al. (1990). "Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina." Neuron **4**(6): 833-45.
134. Vanselow, J., D. Dutting, et al. (1990). "Target dependence of chick retinal ganglion cells during embryogenesis: cell survival and dendritic development." J Comp Neurol **295**(2): 235-47.
135. Vidal-Sanz, M., M. Aviles-Trigueros, et al. (2002). "Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies." Prog Brain Res **137**: 443-52.
136. Vidal-Sanz, M., G. M. Bray, et al. (1987). "Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat." J Neurosci **7**(9): 2894-909.
137. Vidal-Sanz, M., M. P. Villegas-Perez, et al. (1988). "Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil." Exp Neurol **102**(1): 92-101.
138. Villegas-Perez, M. P., M. Vidal-Sanz, et al. (1988). "Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats." J Neurosci **8**(1): 265-80.
139. Villegas-Perez, M. P., M. Vidal-Sanz, et al. (1993). "Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats." J Neurobiol **24**(1): 23-36.
140. Vogel-Hopker, A., T. Momose, et al. (2000). "Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development." Mech Dev **94**(1-2): 25-36.
141. Wang, X., S. S. Tay, et al. (2000). "An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma." Exp Brain Res **132**(4): 476-84.
142. Wassle, H. and B. B. Boycott (1991). "Functional architecture of the mammalian retina." Physiol Rev **71**(2): 447-80.
143. Watanabe, M. and Y. Fukuda (2002). "Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats." Prog Retin Eye Res **21**(6): 529-53.
144. Watanabe, M., H. Sawai, et al. (1993). "Number, distribution, and morphology of retinal ganglion cells with axons regenerated into peripheral nerve graft in adult cats." J Neurosci **13**(5): 2105-17.
145. Wizenmann, A. and M. Bahr (1997). "Growth characteristics of ganglion cell axons in the developing and regenerating retino-tectal projection of the rat." Cell Tissue Res **290**(2): 395-403.

146. Wong, W. T. and R. O. Wong (2000). "Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement." Curr Opin Neurobiol **10**(1): 118-24.
147. Xiao, H. S., Q. H. Huang, et al. (2002). "Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8360-5.
148. Yamagata, M. and J. R. Sanes (1995). "Target-independent diversification and target-specific projection of chemically defined retinal ganglion cell subsets." Development **121**(11): 3763-76.
149. Yasuhara, O., I. Tooyama, et al. (2003). "Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase." J Neurosci **23**(7): 2872-81.
150. Yin, Y., Q. Cui, et al. (2003). "Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration." J Neurosci **23**(6): 2284-93.
151. Zhang, Y., P. A. Dijkhuizen, et al. (1998). "NT-3 delivered by an adenoviral vector induces injured dorsal root axons to regenerate into the spinal cord of adult rats." J Neurosci Res **54**(4): 554-62.
152. Zhao, Y., K. M. Kwan, et al. (2007). "LIM-homeodomain proteins Lhx1 and Lhx5, and their cofactor Ldb1, control Purkinje cell differentiation in the developing cerebellum." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(32): 13182-6.
153. Zhao, Y., H. Z. Sheng, et al. (1999). "Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene Lhx5." Science **284**(5417): 1155-8.
154. Zwimpfer, T. J., A. J. Aguayo, et al. (1992). "Synapse formation and preferential distribution in the granule cell layer by regenerating retinal ganglion cell axons guided to the cerebellum of adult hamsters." J Neurosci **12**(4): 1144-59.

## 8 Danksagung

Mein persönlicher Dank gebührt...

... an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos, Leiter der Experimentellen Ophthalmologie der Universitätsklinik Münster, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die es mir ermöglichte, mich für das faszinierende Gebiet der retinalen Ganglienzellforschung zu begeistern. Ich danke ihm herzlich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, bei der er mir mit förderlichem wissenschaftlichem Rat zur Seite stand und mich so zu neuen Denkansätzen anregte. Darüber hinaus danke ich ihm für die Möglichkeit, die Kunst der mikrochirurgischen Operationstechniken zu erlernen und eigenständig umzusetzen. Die Arbeit inspirierte mich zudem für meinen weiteren beruflichen Werdegang in der Ophthalmologie.

... Frau Mechthild Wissing. Durch ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft wurde die Umsetzung und Durchführung meiner Auswertungsmethoden erst möglich. Es war mir immer eine große Freude, mit ihr arbeiten zu dürfen.

...den Kollegen der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie, für die sehr gute Zusammenarbeit und ihre freundliche Unterstützung.

...Philipp Paprottka, der mich über die gesamte Zeit unglaublich unterstützte. Ich danke ihm für sein Durchhaltevermögen und seinen Beistand während intensiver Arbeitsphasen. Darüber hinaus danke ich ihm für die unzähligen wertvollen Gespräche.

...meiner Schwester Mareen Hofbauer für die exzellente Hilfestellung und die inspirierenden Telefonate während des Verfassens dieser Arbeit.

## 9 Lebenslauf





