

**PTPIP51 in der Embryonalentwicklung der Maus unter besonderer
Betrachtung der Augenentwicklung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
David Arthur Märker
aus Bottrop

Gießen 2007

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leitung: Prof. Dr. med. W. Kummer

1. Gutachter: Frau PD Dr. M. Wimmer-Röll

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Gräf

Tag der Disputation: 11.03.2008

..... Die notwendige Tendenz aller Naturwissenschaft ist, von der Natur aufs Intelligente zu kommen. Dies und nichts anderes liegt dem Bestreben zugrunde, in die Naturerscheinungen Theorie zu bringen. Die vollendete Theorie der Natur würde diejenige sein, kraft welcher die ganze Natur sich in eine Intelligenz auflöste.

Schelling

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen,

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Signal-Transduktion	1
1.2	Protein-Tyrosin-Phosphatasen	2
1.3	Phospho-Tyrosin-interagierendes Protein 51 (PTPIP51)	4
1.4	Übersicht über die embryonal Entwicklung der Maus	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Materialien	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3	Verwendete Pufferlösungen	14
2.1.4	Eindeckmedium	16
2.1.5	Tiere	16
2.2	Methoden	16
2.2.1	Entnahme der Embryonen	16
2.2.2	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	17
2.2.2.1	RNA-Isolation	17
2.2.2.2	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	17
2.2.3	Western blotting	18
2.2.4	Histologie	19
2.2.4.1	Kyrostatschnitttherstellung	19
2.2.4.2	Immunhistochemie	19
2.2.4.3	TUNEL Assay	21
2.2.4.4	Fluoreszenzmikroskopie	22
2.2.4.5	Dokumentation	23
2.2.5	In situ Hybridisierung	23
3	Ergebnisse	25
3.1	RT-PCR von Embryo Extrakten	25
3.2	Western blotting von Embryo Extrakten	25
3.3	Augenentwicklung	26
3.3.1	Das Auge des Embryos 12. d.p.c.	31

3.3.2	Das Auge des Embryos 13. d.p.c.	33
3.3.3	Das Auge des Embryos 14. d.p.c.	34
3.3.4	Das Auge des Embryos 15. d.p.c.	36
3.3.5	Das Auge des Embryos 16. d.p.c.	38
3.3.6	Das Auge des Embryos 17. d.p.c.	40
3.3.7	Das Auge des Embryos 18. d.p.c.	41
3.3.8	Auge 1. d.p.p.	42
3.3.9	Auge 7. d.p.p.	43
3.3.10	Auge 14. d.p.p.	45
3.3.11	Auge 21. d.p.p.	46
3.3.12	Auge des adulten Tieres	47
3.3.13	TUNEL-Assay der post partalen Augenentwicklung	48
3.3.14	Synaptophysin Kolokalisation	49
3.3.15	Calbindin Kolokalisation	50
3.3.16	In situ Hybridisierung des 14. - und 15. d.p.c	50
3.3.17	Western blotting der postpartalen Augenentwicklung	52
3.4	Entwicklung der Plexus choroidei	53
3.4.1	Plexus choroideus Embryo 12. d.p.c.	55
3.4.2	Plexus choroideus Embryo 13. d.p.c.	56
3.4.3	Plexus choroideus Embryo 14. d.p.c.	58
3.4.4	Plexus choroideus Embryo 15. d.p.c.	59
3.4.5	Plexus choroideus Embryo 16. d.p.c.	60
3.4.6	Plexus choroideus Embryo 17. d.p.c.	61
3.4.7	Plexus choroideus Embryo 18. d.p.c.	62
3.5	Zungenentwicklung	63
3.5.1	Zunge 12. d.p.c.	66
3.5.2	Zunge 13. d.p.c.	67
3.5.3	Zunge 14. d.p.c.	68
3.5.4	Zunge 15. d.p.c.	70
3.5.5	Zunge 16. d.p.c.	71
3.5.6	Zunge 17. d.p.c.	73
3.5.7	Zunge 18. d.p.c.	74

3.6	Lungenentwicklung	75
3.6.1	Lunge 12. d.p.c.	78
3.6.2	Lunge 13. d.p.c.	80
3.6.3	Lunge 14. d.p.c.	82
3.6.4	Lunge 15. d.p.c.	82
3.6.5	Lunge 16. d.p.c.	84
3.6.6	Lunge 17. d.p.c.	86
3.6.7	Lunge 18. d.p.c.	88
4	Diskussion	92
4.1	RT-PCR und Western blotting	92
4.2	PTPIP51 in der Augenentwicklung	92
4.2.1	TUNEL Assays der post partalen Augenentwicklung	99
4.2.2	Synaptophysin Kolokalisation	100
4.2.3	Calbindin Kolokalisation	100
4.2.4	In situ Hybrdisierung des 14. und 15. d.p.c.	101
4.3	PTPIP51 in der Entwicklung der Plexus choroidei	101
4.4	PTPIP51 in der Zungenentwicklung	103
4.5	PTPIP51 in der Lungenentwicklung	106
5	Zusammenfassung	109
6	Summary	112
7	Literaturverzeichnis	115
8	Anhang	131
8.1	Abkürzungsverzeichnis	131
8.2	Abbildungsverzeichnis	133
8.3	Publikation, Vortrag und Poster	136
8.4	Danksagung	138
8.5	Lebenslauf	139

1. Einleitung

1.1 Signal-Transduktion

Zelluläre Vorgänge bedürfen einer stetigen Regulation durch verschiedenste Faktoren; hier seien beispielhaft genannt: Wachstumsfaktoren, Hormone, Cytokine sowie viele weitere. Diese Faktoren wirken über verschiedene Signalkaskaden auf die Zelle. Sie gewährleisten auf diese Weise schließlich die Informationsweiterleitung zum Zellkern. Eine Form dieser zellulären Signal-Transduktion läuft über Phosphorylierungen der an den Kaskaden beteiligten Proteine oder anderer intrazellulär lokalisierter Proteine ab. Hierdurch wird die Regulation von Enzymaktivitäten erheblich beeinflusst, mithin auch der Metabolismus von Zellen, der Zellzyklus, die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose von Zellen und damit letztendlich die einzelnen Gewebe. Außerdem werden auf diese Weise die cytoskelettale Organisation und die neuronale Entwicklung, sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die Transkription und die Immunantwort reguliert.

Deshalb ist es zwingend notwendig, den Phosphorylierungsgrad der Proteine genauestens zu kontrollieren. Das Ausmaß der Phosphorylierung wird hierbei durch die aufeinander abgestimmten Aktivitäten von Kinasen und Phosphatasen bestimmt. Entfällt dieses Regulierungsprinzip *in vivo*, so kann es zu Gewebeentartungen, und immunologischen Defekten kommen.

Es wird geschätzt, dass etwa ein Drittel aller intrazellulären Proteine in phosphorylierter Form vorliegen [Cohen, 2000]. Phosphoryliert werden können nur Proteine, die Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste enthalten. Die meisten Proteine sind an Serin- oder Threonin-Resten phosphoryliert und nur 0,01-0,05% an Tyrosin-Resten [Hunter und Sefton, 1980; Hunter, 1995]. Bei den an Serin- und Threoninresten aktiven Enzymen befindet sich das Verhältnis von Kinasen zu Phosphatasen in etwa im Gleichgewicht.

Im Gegensatz dazu existiert ein deutliches Übergewicht der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) im Vergleich zu Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK). Die geschätzte Aktivität der PTPasen ist um 3-4 Größenordnungen höher, als die der PT-Kinasen [Mustelin et al., 1989]. Dies liegt darin begründet, dass PTPasen nicht nur Substrate von PTKs - ,sondern auch die Proteinkinasen selbst sowie andere phosphorylierte

Proteine dephosphorylieren und so deren Aktivitätsniveau kontrollieren können [Qu, 2002].

1.2 Protein-Tyrosin-Phosphatasen

PTPs katalysieren die Abspaltung von Phosphatresten bei Tyrosin enthaltenden Proteinen unter der Freisetzung von Wasser und Orthophosphat. Hierbei handelt es sich um eine durch PTKs reversible Reaktion.

Die Dephosphorylierung von Tyrosin-Resten durch die PTPs kann innerhalb der zellulären Signaltransduktion sowohl aktivierende - als auch inhibierende Effekte hervorrufen.

Die PTPs sind in verschiedene Gruppen eingeteilt:

- „standard“ PTPs mit einer ausschließlichen Spezifität für Tyrosinphosphate [Jia et al., 1995]
- „dual-spezifische“ Phosphatasen (DSPs), welche auch Serin- und Threoninphosphate dephosphorylieren können [Yuvaniyama et al., 1996, Dewang et al., 2005] und
- „low-molecular-weight“ PTPs, die aktiviertes PDGF-R, p190RhoGAP und die GTPase Rho dephosphorylieren und damit an der durch PDGF-R vermittelten Zellteilung und an der Reorganisation des Zellskelettes beteiligt sind [Raugei et al., 2002].

Trotz der Katalyse der gleichen chemischen Reaktion, ist der Reaktionsablauf bei den verschiedenen Gruppen unterschiedlich. DSPs sind Zwei-Metall-Ionen Metalloenzyme, die durch eine direkte Bindung an ein aktiviertes H_2O -Molekül am phosphorylierten Substrat dessen Dephosphorylierung katalysieren. „Standard“-PTPs sind Nicht-Metalloenzyme, die durch eine kovalente Bindung zunächst ein Phospho-Cystein-Intermediat bilden, welches dann in einem weiteren Reaktionsschritt zu den gleichen Endprodukten führt [Guan et al., 1991]. Die „Standard“-PTPs werden in cytoplasmatische - und transmembranäre PTPs mit Rezeptorfunktion unterteilt.

Low-molecular-weight PTPs (LMW-PTPs) tragen ihren Namen aufgrund des eher geringen Molekulargewichtes von 18 kDa. Im Unterschied zu den beiden oben genannten Typen werden die Low-Molecular-weight PTPs über H_2O_2 inaktiviert. Durch die Oxidation bildet das Enzym eine Disulfidbrücke zwischen zwei benachbarten

Cystein-Resten aus und geht damit in den inaktiven Zustand über [Caselli et al., 1998]. Im inaktiven Zustand können LMW-PTPs in cytoplasmatischen- und cytoskelettalen Fraktionen nachgewiesen werden. Im aktiven phosphorylierten Zustand jedoch nur in mit dem Cytoskelett assoziierten Fraktionen [Cirri et al., 1998].

Eine Gemeinsamkeit aller „Standard“-PTPs ist eine konservierte katalytische Domäne von 240 Aminosäuren. Diese erscheint in einer unabhängig gefalteten Domäne des Gesamtproteins mit der Sequenz (H/V) C (X)₅R(S/T), wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt [Neel et al., 1997]. Die dreidimensionale Struktur dieser Sequenz zeigt, dass es sich hierbei um eine Phosphat-bindende Schleife handelt, die als konserviertes strukturelles Merkmal einen essentiellen Aspartat-Rest trägt [Bradford, 1999]. Außerhalb dieser katalytischen Domäne liegen stark variable N- und C-terminale Sequenzen, die sich für die Substratspezifität der einzelnen Enzyme verantwortlich zeigen.

Bei Diabetes mellitus, Immundefekten, Entzündungsreaktionen, infektiologischen Erkrankungen und verschiedenen Krebsformen sind Defekte in PTPs nachweisbar [van Huijsduijnen et al., 2004; Wang et al., 2004; Zhang, Z.Y., 2001; Oulette et al., 2003, Freiss et al., 2004]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Krebserkrankungen das Verhältnis zwischen phosphorylierenden Kinasen, die Proliferationssignale weitergeben, und dephosphorylierenden Phosphatasen gestört ist [Freiss et al., 2004]. Im Zuge dieser Entdeckungen rückte die Frage nach der Funktionsweise von PTPs immer mehr in das wissenschaftliche Interesse.

Für die Ausbildung des Immunsystems sowie für die Mitose ist der T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase eine wichtige Rolle zugesprochen worden [You-Ten et al., 1997]. Die PTP-1B weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zur T-Zell-PTP auf. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen liegt bei 65%, betrachtet man die katalytische Domäne und das fertig gefaltete katalytische Zentrum isoliert, so liegt die Homologie sogar bei 74% und 100% [Iversen et al., 2002; Liu et al., 2003].

Diese Übereinstimmungen lassen auch eine große Ähnlichkeit für die physiologischen Funktionen und regulatorischen Mechanismen der beiden Enzyme annehmen. Auch in der Substratspezifität ist das Verhalten der beiden Enzyme, bis auf wenige spezifische Ausnahmen vergleichbar [Tonks et al., 1988; Tonks et al. 1988].

Bei der Suche nach Substraten, die als mögliche Interaktionspartner der T-Zell-PTP und PTP1B dienen, wurden mit dem Yeast-Two-Hybrid-System die Protein-Tyrosin-Phosphatase-Interagierende-Proteine 30 (PTPIP) und 51 ermittelt [Porsche, 2001]. Hierbei diente als Quelle für mögliche Interaktionspartner eine aus Jurkat-T-Zellen (humane T-Lymphom-Zellen) stammende cDNA-Bank. Die Namen der Proteine leiten sich von einer fortlaufenden Nummerierung der als potentielle Interaktionspartner identifizierten Proteine ab [Porsche, 2001].

Ein quantitativer Vergleich der Substratspezifität der beiden oben genannten Non-Receptor-PTPasen wurde über ein Pull-Down Experiment durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Interaktion der PTP-1B mit dem PTPIP 51 stärker ist, als dies für die T-Zell-PTP der Fall ist [Bürklen, 2001].

1.3 Phospho-Tyrosin-interagierendes Protein 51 (PTPIP51)

Die sequenzierte cDNA ergab ein trunkiertes Protein mit einer Länge von 394 Aminosäuren. Es zeigte sich jedoch, dass diese Aminosäuresequenz unvollständig war. Die unvollständige Gensequenz wurde sowohl unter dem Swiss Prot Accession code Q96SD6 als auch unter der EMBL Accession No. HSA24271 veröffentlicht [Welte 2000, Bürklen 2001]. Weitere Untersuchungen ermöglichten eine Vervollständigung der Sequenz, die unter der EMBL Accession No. AK001441 vorliegt [Ota et al., 2004].

Das codierende Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 15 (15q15.1) und weist eine Nucleotidlänge von 2251 Basenpaaren auf, was einer Sequenz von 470 Aminosäuren entspricht [Ota et al., 2004]. Die Berechnung des Molekulargewichtes des Proteins führt zu einem erwarteten Gewicht von 52.118 Dalton.

Nähere Untersuchungen konnten zeigen, dass PTPIP51 in verschiedenen großen Isoformen exprimiert wird. Die kleinste Form weist ein Molekulargewicht von 30 kDa auf (small PTPIP 51) und liegt in membrangebundener Form in der Zelle vor. Des weiteren liegen ein middle PTPIP 51 mit einem Molekulargewicht von 45- und ein large PTPIP 51 mit einem Molekulargewicht von 52,1 kDa vor. Das large PTPIP 51 entspricht somit am ehesten dem berechneten Molekulargewicht.

Es liegen insgesamt zwölf codierende Exone vor. Die Exone 1 bis 4 weisen auf DNA-Ebene das für Initiationskomplexe typische AUG-Triplett auf, wobei die Exone 1-3 AUG-Triplets ohne Kozak-Sequenz aufweisen, das Exon 4 hingegen eine solche zeigt.

Eine durchgeführte Berechnung der Molekulargewichte der einzelnen theoretischen Isoformen des Proteins führt zu Molekulargewichten von 30, 38, 45 und 52 kDa [Pfeiffer, 2006].

Die Sekundärstruktur des Proteins weist mit einer Wahrscheinlichkeit von 57,4% α -Helices, mit 12,1% β -Faltblättern und mit 30,5% Loops auf [Welte, 2000]. Potentielle Transmembrandomänen konnten bei der Durchführung von Hydrophobizitätsanalysen nicht beschrieben werden [Welte, 2001]. Zur biochemischen Charakterisierung wurde eine Motivsuche in einer Datenbank (PROSCAN in Expasy.ch) durchgeführt, die zu folgenden Ergebnissen führte:

1. Verschiedene hypothetische Phosphorylierungsstellen für:

- cAMP- und cGMP abhängige Protein Kinasen (AS 186-189)
- Protein Kinase C (AS 51-53, 91-93, 166-168, 181-183, 272-274, 324-326)
- Casein-Kinase II (AS 143-146, 145-148, 160-163, 166-169, 202-205, 210-213, 249-252, 324-327, 357-360, 375-378, 428-431)

2. N-myrtilisierungs-Stellen:

- AS 9-14 (GAGDAS)
- AS 54-59 (GVLPSTL)
- AS 141-146 (GATFTD)
- AS 151-156 (GGYTAA)
- AS 199-204 (GASSAL)
- AS 207-212 (GGSSGL)

3. Zell-Attachment-Stelle: AS 227-229 (RGD)

4. „Ran-GTPase-activating-protein“-Motiv (für dieses sind die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin verantwortlich). Mit einer 87%igen Sicherheit befindet sich ein solches Motiv zwischen den AS 1-386. Zwischen den AS 115-119 zeigt sich eine Folge von Arginin-Resten innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins.

Mit welcher Wahrscheinlichkeit diese Motive jedoch tatsächlich in dem Protein vorkommen, lässt sich bislang noch nicht eindeutig klären, da die Tertiärstruktur von PTPIP 51 noch unbekannt ist [Welte, 2000; Brüklen, 2001].

Ein weiterer möglicher Interaktionspartner des Proteins PTPIP 51 neben der T-Zell-PTP und der PTP1B ist der C-terminale Anteil des hypothetischen Proteins FLJ36029, einem Protein, das mit dem Nuf2 Protein verwandt ist. Das Nuf2 Protein ist am Centromer

lokalisiert und für die mitotische Progression in Vertebratenzellen essentiell [Hori et al., 2003]. Gleiches gilt für das hypothetische CNG6 Protein, welches mit dem Chicken homebox Genprodukt Prox 1 verwandt ist. Bei diesem handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der für eine normale Entwicklung essentiell ist [Tomarev et al., 1996, Büttel, 2000].

PTPIP 51 wird in vitro durch die src Kinase phosphoryliert. Die Dephosphorylierung in vitro erfolgt über Zellextrakte, die die PTP1B oder die src Kinase überexprimieren [Bürklen, 2001].

Aufgrund seiner Struktur, die ein modifiziertes Leucin-Zipper-Motiv zeigt, ist das PTPIP 51 in der Region 77-176 zur Dimerisierung, eventuell auch zur Trimerisierung, befähigt [Büttel, 2000].

Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurden gegen die Proteine PTPIP30 und PTPIP51 gerichtete polyklonale Antikörper hergestellt. Mit diesen Antikörpern konnte ein erstes immunhistochemisches Screening des Proteins in vielen verschiedenen Geweben und Spezies durchgeführt werden [Welte, 2000]. Hierbei zeigte sich, dass es sich bei PTPIP 51 um ein vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiertes Protein handelt, das relativ leicht löslich ist und wahrscheinlich mit der Membran des endoplasmatischen Reticulums assoziiert ist.

In der von Stenzinger et al., 2005 veröffentlichten Übersichtsarbeit zum immunhistologischen Nachweis des PTPIP 51 in situ wurde das Vorkommen des Proteins bei Schweinen, Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und dem Menschen gezeigt.

Das Protein PTPIP51 konnte im Skelettmuskel verschiedener Spezies, hier vor allem in Fasern vom schnellen Typ, in spezifischen Regionen des zentralen Nervensystems, hier beispielsweise in Neuronen des Hippocampus, in Ganglienzellen und auch in Zellen des autonomen Nervensystems nachgewiesen werden [Stenzinger et al., 2005]. Speziell in der Epidermis der Haut und dem männlichen Keimepithel fielen starke Reaktionen in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades auf, was zu der Annahme führte, dass PTPIP51 ein wichtiges Protein für die Regulation der Zelldifferenzierung sein könnte. Diese Vermutung resultiert vor allem daraus, dass das Protein nicht etwa in den basalen Zellen der Epidermis oder in frühen Reifestadien der Spermatogenese nachweisbar ist, sondern erst bei sich höher differenzierenden Zellformen wie zum

Beispiel den suprabasal gelegenen Keratinocyten der Epidermis und bei der Differenzierung der männlichen Keimzellen ab dem Stadium der Spermatocyten erster Ordnung bis hin zu funktionsfähigen Spermien detektierbar ist.

Weitere Untersuchungen der Epidermis stärkten diese Vermutung. Sie ließen die Hypothese aufkommen, dass die Limitierung der Expression von PTPIP 51 auf suprabasale Zelllagen durch eine Beteiligung des Proteins an Differenzierungsprozessen begründet sein kann [Pfeiffer, 2006].

Stenzinger et al. (2007) zeigten in Versuchen mit humanen Keratinocyten (HaCaT Zellen), dass der Einfluss von Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), welcher zu einer Differenzierung der HaCaT Zellen führt, zu einer verstärkten PTPIP 51 Expression führte. Eine Behandlung der Zellen mit niedrigen Konzentrationen von EGF, die bekannterweise als Proliferationsstimulus wirken, resultierte dagegen in einer Abnahme von PTPIP 51. Sehr hohe Konzentrationen von Retinolsäure, die zum Differenzierungsstop und zur Induktion von Apoptose führen, bedingten ebenfalls eine Zunahme der PTPIP 51 Expression, wobei möglicherweise verschiedene Isoformen des Proteins an den unterschiedlichen Prozessen der Zellen beteiligt sind

Experimente mit HaCaT Zellen haben weiterhin gezeigt, dass das vorwiegend cytoplasmatisch lokalisierte Protein in apoptotischen Zellen im Zellkern nachweisbar ist. In situ konnte PTPIP 51 in pyknotischen Zellkernen der inneren Zellschicht von Talgdrüsen nachgewiesen werden [Pfeiffer, 2006].

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Lv und Mitarbeiter (2006), die, im Gegensatz zu Welte (2001), eine mutmaßliche Transmembrandomäne am N-Terminus, die für eine mitochondriale Lokalisation des Proteins notwendig ist, beschrieben haben. Darüber hinaus zeigten sie, dass eine Überexprimierung von PTPIP 51 in HEK293T - und HeLa Zellen zur Induktion von für die Apoptose-typischen Prozessen wie der Kondensation des Nucleus, der Externalisation von Phosphatidylserin, einer Depolarisation des transmembranären Potentials der Mitochondrien, der Freisetzung von Cytochrom C und einer Aktivierung der Caspase 3 führte. Insgesamt erscheint eine Beteiligung von PTPIP 51 an apoptotischen Prozessen als sehr wahrscheinlich.

Roger et al. (2007) haben aufgezeigt, dass CNTF, ein neuropoetisches Zytokin, das die über Tyrosin-Phosphorylierung regulierte JAK-STAT Signalkaskade stimuliert, die PTPIP51 Transkription in Retina Explantaten von Ratten reguliert. Sie konnten ein

biphasisches Expressionsmuster von PTPIP51 während der postnatalen Retina-Entwicklung aufzeigen. CNTF spielt für die Retinaentwicklung eine wichtige Rolle: es inhibiert oder unterstützt die Stäbchen Differenzierung [Kirsch et al., 1996, Fuhrmann et al., 1998] und darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle für das Überleben von Photorezeptorzellen [LaVail et al., 1998]. CNTF scheint möglicherweise eine wichtige Rolle in der Behandlung degenerativer Retinaerkrankungen zu spielen [Sieving et al., 2006]. Roger und Mitarbeiter diskutierten basierend auf den Ergebnissen von Lv et al. (2006) eine mögliche Rolle von PTPIP51 in apoptotischen Prozessen. Hierbei ist besonders hervorzuheben, dass die apoptotische Prozesse eine essentielle Rolle in der postnatalen Retinalentwicklung bis zum 14. postnatalen Tag spielen [Smith et al., 2002, Linden et al., 2005, Marigo, 2007].

Auch in vivo kann davon ausgegangen werden, dass PTPIP51 sowohl in Differenzierung als auch in apoptotische Prozesse involviert ist. Gandarillas (2000) und Candi et al. (2005) haben beschrieben, dass eine direkte Beziehung und Abhängigkeit zwischen Proliferation, Differenzierung und programmiertem Zelltod besteht, die für die physiologische Funktion der Haut als Barriere zur Umwelt zwingend erforderlich ist. Die genannten Ergebnisse machen denkbar, dass PTPIP 51 möglicherweise in die Regulation dieser Abhängigkeiten involviert ist.

In weiteren Studien wurde die Expression von PTPIP51 in primären Zellkulturen (aus der pulmonalen Arterie gewonnene Endothelzellen sowie isolierte Neuronen) und auch in etablierten Zelllinien, wie zum Beispiel: Glucagon produzierenden Zellen (INR1G9), humanen Plazentazellen (BeWo), Acetylcholin produzierenden Zellen (NS20Y) und Jurkat Zellen gezeigt [Stenzinger et al., 2005]. Die Präsenz des Proteins in allen untersuchten Zelllinien könnte im Zusammenhang mit den oben genannten Prozessen stehen.

Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob das Protein auch an embryonalen Differenzierungsprozessen, die bekannterweise der Regulation durch verschiedenste Faktoren unterliegen, beteiligt ist. Als Modell hierfür diente die embryonale Entwicklung Maus (*Mus musculus*).

1.4 Übersicht über die embryonal Entwicklung der Maus

Die Befruchtung von meist 3-5 Oocyten in der Ampulla tubae stellt den Beginn der embryonalen Entwicklung dar. Nach etwa 20h sind die Eizellen in das Oviduct gewandert, der männliche Pronucleus hat sich dem weiblichen genähert und die erste Zellteilung beginnt. Sie wird nach etwa 4h beendet sein, so dass in den meisten Fällen nach 24h das Zweizellstadium erreicht ist.

52-53h nach der Befruchtung besteht der größte Teil der Embryonen aus 2-16 Zellen, wobei die relativ hohe Differenz der Zellzahl wahrscheinlich auf unterschiedlichen Befruchtungszeitpunkten basiert.

Drei Tage nach erfolgter Befruchtung befinden sich die befruchteten Eizellen schließlich im Uterus. Nach 69-71h bestehen sie im Mittel aus 16-25 Zellen und werden wegen ihres stacheligen Aussehens als Morula bezeichnet. 78h post coitum formt sich relativ schnell die Blastocystenhöhle, so dass in diesem Stadium erstmals Embryoblast und Trophoblast voneinander unterschieden werden können.

Bei Mäusen erfolgt am 4,5 d.p.c. nach Abstoßung der Zona pellucida die Nidation. Die Zellen des Trophoblasten umgeben den Embryoblasten nun vollständig. Sie verschmelzen bei der Implantation mit dem maternalen Gewebe, bilden den Synzytiotrophoblasten, aus dem sich im weiteren Verlauf die Placenta entwickeln wird.

Der Embryoblast differenziert sich weiter zum Epiblasten (embryonales Ektoderm), aus dem sich später die Amnionhöhle bildet, und dem Hypoblasten (extraembryonales Entoderm), aus dem im weiteren Verlauf der Dottersack wird.

Ab 5,5 d.p.c. beginnt mit der Gastrulation die eigentliche Entwicklung des Embryos. Die Keimblätter entstehen am 6,5 Tag der Entwicklung. Hier sind zum ersten Mal das Ektoderm, als innere dickere Masse, aus der sich unter anderem neuronale Strukturen entwickeln werden, sowie das Entoderm als äußere dünnere Schicht, die später unter anderem den Gastrointestinaltrakt bilden wird, auszumachen.

Anders als beim Menschen erfolgt bei Nagetieren eine Umkehrung der Keimblätter (d.h. das Entoderm legt sich nach außen und das Ektoderm nach innen).

Ab dem 7,5 Tag der Entwicklung entsteht das Mesoderm, welches als drittes Keimblatt zwischen Ekto- und Entoderm zu liegen kommt. Parallel zur Differenzierung der Keimblätter erfolgt durch eine Verdickung des Ektoderms die Anlage der Primitivrinne, welche im weiteren Verlauf die primäre Achse des Embryos bestimmen wird.

Mit dem 7,5 Entwicklungstag erfolgt die Bildung des Neuralrohres (Neurulation), welches ab 8,5 d.p.c. deutlich zu erkennen ist. Am 8,5 Tag der Entwicklung beginnt die Organogenese, das heißt die Ausbildung der elementaren Funktionssysteme. Diese beinhalten das bereits oben genannte Neuralrohr, sowie das Darmrohr und das Herz-Kreislaufsystem. Die Ausbildung eines funktionierenden Blutkreislaufes nimmt hierbei eine entscheidende Stellung ein, da nur so die zum weiteren Wachstum notwendigen Nährstoffe sowie deren Stoffwechselprodukte suffizient transportiert werden können.

Ab 9. d.p.c kann zum ersten Mal die spätere Form des Embryos beobachtet werden, wobei der Körper des Embryos noch sehr gewunden ist. Er streckt sich erst mit weiter fortschreitender Entwicklung. Zu diesem Zeitpunkt beginnt darüber hinaus die Separierung der Hirnbläschen.

Am 9,5 d.p.c. beginnt die Kondensation der späteren Armknospen, auch die späteren Lungenanlagen sind rudimentär als epitheliale Verdickungen auszumachen. Parallel dazu werden Leber und Pancreas angelegt. In der weiteren Folge kann dann eine rasche Größenzunahme beobachtet werden.

Am zehnten Entwicklungstag formiert sich eine erste Anlage der unteren Extremität. Die Lungenanlage ist nun deutlicher als bisher auszumachen und das Urogenitalsystem zeigt erste Anlagen. Um den 10,5 d.p.c. lässt sich ein deutlicher Fortschritt in der Entwicklung erkennen. Die Anlagen größerer Organe wie die der Leber sind jetzt deutlich zu erkennen. Die Lungenanlage hat sich zu primitiven Lungenflügeln formiert. Das Herz ist fast vollständig differenziert: die Atrien und Ventrikel sind ausgebildet und ohne weiteres voneinander abgrenzbar. Auch die Anlage des Gehirns ist gewachsen und differenziert sich fortschreitend. Es erfolgt eine deutliche Größenzunahme der Hirnbläschen und des Mesencephalons. Die bestehenden Hirnabschnitte können in Pros- und Rhombencephalon eingeteilt werden. Die später liquorgefüllten Ventrikel sind angelegt.

Am 11,5 Entwicklungstag ist die Entwicklung der Lunge so weit fortgeschritten, dass die Lungenanlagen Kontakt zum Bronchialsystem gewonnen haben. Die primären Bronchien entwickeln Äste, die als spätere Bronchii lobares in das Lungengewebe aussprossen.

Die Extremitäten weisen ebenfalls eine deutliche Größenzunahme auf, die mit dem 12,5 d.p.c. in einer deutlichen Streckung des gesamten embryonalen Körpers resultiert. Die

Entwicklung des Gehirns hat zu diesem Zeitpunkt die meisten Fortschritte gemacht: der Differenzierungsgrad hat zugenommen und es kann eine deutliche Neuroblasten-Proliferation beobachtet werden. Diese Zellvermehrung führt zu einer Zunahme der Gehirnwandungen und einem allmählichen Verschluss der Ventrikel. Dies wird besonders an Mes- und Telencephalon deutlich. Zu diesem Zeitpunkt nimmt der Kopf der Maus etwa ein Drittel des gesamten Körpervolumens ein. Dies unterstreicht eindrucksvoll wie schnell die Differenzierung des Hirns und dessen Wachstum fortschreitet.

Cardial ist der Embryo nun fast vollständig entwickelt: Die Öffnung zwischen den Atrien schließt sich immer mehr und die Vorhofsepten verschmelzen allmählich mit dem Endocardkissen. Die Ventrikel zeigen sich im Vergleich zu früheren Stadien wandstärker, wohingegen sich die Wände der Atrien ausdünnen und so insgesamt zu einer Ausdehnung der Vorhöfe führen.

Am 14,5 d.p.c. zeigt sich der Embryo durch das vehemente Längenwachstums des Rückens gestreckter. Die Extremitäten sind klar auszumachen, so sind beispielsweise einzelne Zehen abgrenzbar. Die meisten Organe sind jetzt vollständig angelegt und in der bis zur Geburt verbleibenden Zeit erfolgt eine fortschreitende Vaskularisierung und zelluläre Ausdifferenzierung der Gewebe. Der Embryo erscheint zu diesem Zeitpunkt zum ersten Mal topographisch komplett. Das Hirn hat sich durch die kontinuierlich weiter fortschreitende Verdickung der Ventrikelwände weiter differenziert, so dass die einzelnen Hauptabschnitte nun optisch voneinander unterschieden werden können. Die Hypophyse, die Riechgrube sowie die Augenanlage sind deutlich auszumachen. Es bilden sich Nervenfasern aus, die die Sinnesorgane mit dem Gehirn verbinden. Das optische System tritt mit dem sich aus dem Prosencephalon entwickelten Diencephalon und das olfaktorische System mit dem sich ebenfalls aus dem Prosencephalon differenzierten Telencephalon in Kontakt.

Am 15. Tag der Embryonalentwicklung hat das Gefäßsystem sowie das Herz seine endgültige pränatale Konfiguration erreicht. An der unteren Extremität sind die Zehen des Embryos deutlich voneinander abgrenzbar. Auch das Skelettsystem lässt deutliche Fortschritte erkennen. Die Verknöcherung beginnt vornehmlich in den platten Knochen, so sind im Os temporale, den Wirbelbögen und den Ossa ilii erste Knochenkerne auszumachen.

Ab dem 16,5 Tag ist der Embryo makroskopisch eindeutig als Maus erkennbar. Die Organogenese ist vollständig abgeschlossen. Nun erfolgt die endgültige Differenzierung der Extremitäten. Die enchondrale Verknöcherung ist in vollem Gange, wobei jedoch zu diesem Zeitpunkt der Knorpelanteil der späteren Knochen noch vorherrscht. Das zentrale Nervensystem ist in seinen Anlagen, mit Ausnahme des Cerebellums, voll entwickelt. Von jetzt an findet nur noch weiteres Größenwachstum und eine Myelinisierung der neuronalen Strukturen statt.

Die bis zur Geburt verbleibenden Tage sind insgesamt durch weitere Differenzierungs- und Reifungsprozesse gekennzeichnet. Als Beispiele seien die Entwicklung der Inselzellen des Pancreas und die weitere Reifung der Lunge mit der Entwicklung von funktionsfähigen Alveolen am 18. d.p.c. genannt.

Die Geburt findet am 19. Tag p.c. statt. Die neugeborene Maus ist zwar lebensfähig, jedoch sind auch zu diesem Zeitpunkt noch nicht alle Differenzierungsprozesse vollständig abgeschlossen. Die Maus ist zum Zeitpunkt der Geburt noch nackt und die Augenlider öffnen sich erst 12-14 Tage post partum.

Die hier beschriebene Abfolge der Wachstums- und Differenzierungsvorgänge stützen sich im Wesentlichen auf das Buch „The House Mouse“ [Theiler, 1972]

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die folgende Arbeit untersucht die Verteilung des PTPIP 51 während der Embryogenese der Maus ausgehend vom 12. Tag der Entwicklung. Ab 12. d.p.c. sind alle Anlagen der großen Organsysteme deutlich mikroskopisch voneinander zu differenzieren. Daneben sind die Embryonen ab diesem Stadium präparatorisch gut zugänglich. Auch eine Orientierung der Embryonen für die Schnittherstellung war ab diesem Stadium gut durchführbar. Hierbei werden das Auge, der Plexus choroideus des vierten Ventrikles, die Zunge, die Lunge, die Skelettmuskulatur und die Haut näher betrachtet.

Die einzelnen Prozesse, die bei der Entwicklung dieser Organe ablaufen, werden an entsprechender Stelle dargestellt. Ziel ist es hierbei die Verteilung und Lokalisation des Proteins während der einzelnen Entwicklungsstadien aufzuzeigen, um so einen Hinweis darauf zu erhalten, ob das Protein in spezifische Differenzierungsprozesse involviert ist.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Analysenwaage Modell Europe 1000	Gilbertini, Mailand, Italien
Fluoreszenz Mikroskop Modell Axioplan 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
T-Personal Thermal Cycler	Biometra, Göttingen
Kyrostat Modell CM1900	Leica, Wetzlar
Magnetrührer Modell RCT Basic	IKA works, Staufen
pH-Meter Modell 410 A	Orion, Waltham, Maryland, USA
Pipetten	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Reagenzschüttler Modell MS 1	IKA works, Staufen
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA, Staufen
Wippschüttler Modell Assistent	Karl Hecht GmbH, Sondheim
Zentrifuge Modell Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die gängigen Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen.

Die Hersteller spezieller Chemikalien, Antikörper und anderer Reagenzien sind an entsprechender Stelle genannt.

2.1.3 Verwendete Pufferlösungen

Laemmli-Puffer	63 mMolarer TRIS ($C_4H_{11}NO_3$) HCl
pH 6,8	pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren
	2,5% Natrium Dodecylsulfat (SDS)
	5% Glycerol
	0,005% Bromphenol Blau
NTB-Puffer	12,1g TRIS HCl

pH 9,6

5,84g NaCl

in 1l Aqua bidest. gelöst

pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren

1ml DEPC Wasser

vor Gebrauch 25ml 1 Molare MgCl_2 -
Lösung pro 500ml zugeben

PBS-Puffer

pH 7,4 0,1 Molar

2,72g KH_2HPO_4

14,24g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

9g NaCl

in 1l Aqua bidest. gelöst

pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren

SSC-Puffer

pH 7,4

4,41g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$

8,76g NaCl

in 1l Aqua bidest. gelöst

1ml DEPC Wasser

pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren

TBST-Puffer

10 mM Tris-HCl

pH 7,5

100 mM NaCl

0.1% Tween-20

TNMT-Puffer

pH 7,5

12,11g TRIS-HCl

5,84g NaCl

0,417g MgCl_2

in 1l Aqua bidest. gelöst

pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren

1ml DEPC Wasser

0,5ml Triton X 100

2.1.4 Eindeckmedium

Mowiol

6g Glycerol

2,4g Mowiol 4-88 (Calbiochem # 475904,
Merck Biosciences, Darmstadt)

6ml destilliertes Wasser

12ml 0,2 Molarer TRIS Puffer pH 8

2.1.5 Tiere

Für die hier vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Embryonen von Tieren des Mausstammes FVB benutzt. Die Tiere stammten aus der Zucht des Physiologischen Institutes des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die weiblichen Mäuse wurden für 24h von dem männlichen Tier getrennt. Anschließend wurden die Mäuse für einen Tag in den Käfig des Männchens gesetzt, um so bei ihnen einen Eisprung zu initiieren. Am nächsten Morgen wurde das Männchen zu den Weibchen in den Käfig gegeben und auf diese Weise mit ihnen verpaart. Nach acht Stunden wurde das Männchen aus dem Käfig herausgenommen, so dass der Zeitpunkt der Konzeption auf einen Zeitraum von 8h eingrenzt war. Dies ermöglichte die genaue Datierung des Alters der Embryonen.

Die Tiere wurden bei einer konstanten Temperatur von 22°C und 40-60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie erhielten Altromin Haltungsfutter (Altromin GmbH, Lage) sowie Leitungswasser ad libitum.

2.2 Methoden

2.2.1 Entnahme der Embryonen

Die Tiere wurden per Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) Narkose getötet. Der Bauchraum wurde durch einen Schnitt in der Medianlinie eröffnet. Die Haut und Muskelschichten wurden dann in cranialer, caudaler und lateraler Richtung eröffnet. Anschließend wurden die Uteri der Maus aufgesucht und die Embryonen entnommen.

Die Proben wurden in schmelzendem Isopentan (Fluka, Steinheim), welches in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, eingefroren. Zur histologischen Orientierung der

Proben diente Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Holland). Die Fixierung der nativen Gewebe erfolgte bei der Schnittherstellung (siehe unten).

2.2.2 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.2.2.1 RNA-Isolation

Es wurden ganze Embryonen vom 10., 14., 16. und 18. d.p.c. homogenisiert. Anschließend erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA nach dem Standardprotokoll des Herstellers des RNeasy kit (Qiagen, Hilden). Die RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt, auf 1µg/µl mit Aqua dest. verdünnt und die Lösung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Vervielfältigung von DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion nach Mullis et al. (1986) und Saiki et al. (1988) durchgeführt.

Zur Synthese wurden 2 µg der isolierten RNA mit der M-MuLV-reversen Transkriptase (MBI-Fermentas, St. Leon-Roth) und einem poly-dT18 Primer revers-transkribiert. Für die PCR wurden die folgenden mausspezifischen PTPIP51 Primer (überprüft durch Sequence blasting) benutzt: mAP51-(1010-1399)-5'[5'-agggcatctcgaaacgcatcca-3'], mAP51-(1010-1399)-3'[5'-cttctagttcttcagggtcttttg-3']. Hierbei kennzeichnen die Zahlen in den Klammern die Bindungsstelle des Primers der mPTPIP51-mRNA. Diese führten zu einem 389 Basenpaare großen Amplifikationsprodukt.

Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus: Reaktionspufferlösung, dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP, jeweils 10 mMol), Primern, template DNA und Polymerase in Konzentrationen, die den Angaben des Herstellers entsprechen.

Die Amplifikation erfolgte entsprechend einem Standardprotokoll im T-Personal Thermal Cycler (Biometra, Göttingen).

Für eine interne Kontrolle wurde mit dem Housekeeping protein GAPDH ebenfalls eine Amplifikation durchgeführt.

2.2.3. Western blotting

Western blotting wurde nach Towbin et al., 1979 durchgeführt. Embryonen wurden unter Zusatz von zweifach Laemmli-Puffer, 150 mM NaCl, 1% Triton X und Mercapto-Ethanol homogenisiert und anschließend für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit Laemmli-Puffer aufgefüllt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel (15% Acrylamid). Der Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen (Protran-BA85, Schleicher&Schuell, Dassel) erfolgte durch Tank-Blotting, hierbei enthielt der Laufpuffer 20 mM Tris-Base, 150 mM Glyzin, 20% Methanol und 0.1% SDS. Das Tank Blotting erfolgte über Nacht bei 30V bei 4°C Raumtemperatur.

Nach dem Elektrotransfer wurde die Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S (Serva, Heidelberg) gefärbt, um die Effektivität des Elektrotransfers zu überprüfen und um die Position des Markers zu bestimmen. Daran schloss sich ein Waschschrift in TBST Puffer an.

Anschließend wurde die Membran in 5%igem Magermilchpulver in TBST-Puffer für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur und leichter Bewegung auf dem Wippschüttler inkubiert. Daran schloss sich die Inkubation der Membran für ebenfalls mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (anti-PTPIP51 1:2000 in 5%igem Magermilchpulver in TBST Puffer) an.

Es folgte ein dreifacher Waschschrift in TBST-Puffer und die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (ant-Rabbit 1:10000 in 5%igem Magermilchpulver in TBST-Puffer), der an eine Horseradish-Peroxidase konjugiert war.

Nach fünfmaligem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran in zwei ECL-Lösungen getaucht: Lösung I - 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2.5 mM Luminol, 400 µM p-Coumarinsäure; Lösung II - 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.02% H₂O₂ in einem Verhältnis von 1:1 für ungefähr eine Minute. Als letzter Schritt erfolgte die Detektion durch Chemielumineszenz mit dem Las3000Imager digital system (Fuji, Düsseldorf).

Das Membran Stripping erfolgte durch Inkubation der Membran in Stripping Puffer (62,5mM Tris-HCl, pH 6,7, 7mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS) für 20 Minuten bei 56°C oder für eine Stunde bei Zimmertemperatur.

Daran schloss sich ein fünffacher Waschschrift in TBST-Puffer um das β -Mercaptoethanol vor der Inkubation mit den Antikörpern zu entfernen. Für das Stripping wurden folgende Antikörper verwendet: polyclonal anti-PTPIP51 (siehe oben), monoclonal anti-RGS-His6 (Dianova, Hamburg) und monoclonal anti- γ -tubulin (Serotec, Düsseldorf).

2.2.4 Histologie

2.2.4.1 Kryostatschnittherstellung

Es wurden 6 – 10 μ m dicke Serienschnitte des Embryos mittels eines Kryostaten (siehe oben) angefertigt und auf Objektträger (Superfrost Plus, R. Langenbrinck, Emmendingen) aufgenommen. Diese Schnitte wurden für fünf bis zehn Minuten in Aceton bei -20°C fixiert und anschließend bei Zimmertemperatur für 30 Minuten getrocknet. Die weitere Bearbeitung erfolgte entweder direkt oder die Schnitte wurden bei -20°C zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Auf den Objektträgern befanden sich mindestens drei Schnitte (bei späten Stadien auch nur zwei). Pro Embryo wurden durchschnittlich mindestens 50 Objektträger, ab 16. d.p.c. etwa 100 Objektträger oder mehr angelegt.

2.2.4.2 Immunhistochemie

Es wurde die Technik der indirekten Immunofluoreszenz gewählt. Hier ist im Gegensatz zur direkten Immunofluoreszenz der Primärantikörper nicht mit einem Fluorochrom markiert. So wird eine größere Sensitivität und eine höhere Flexibilität beim Einsatz der Detektionssysteme erreicht.

Die Schnitte wurden vor der Färbung mit dem Pap Pen (SCI Sciences Services, München) umfahren.

Anschließend begann die Aufarbeitung der Schnitte mit der Zugabe des Primärantikörpers gegen das Protein PTPIP51. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper wurde in dem Labor von Herrn Prof. Dr. W. Hofer (Universität Konstanz), durch Einsatz eines gereinigten und rekombinanten Proteinfragmentes von PTPIP 51, über eine 35tägige Immunisierung eines Kaninchens gewonnen und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Antikörper war zuvor von

Herrn Prof. Dr. W. Hofer charakterisiert und in einer Studie verwendet worden [Welte, 2000]. Als optimale Verdünnung hat sich für meine Arbeit eine Verdünnung des Antikörpers im Verhältnis 1:250 zur Blocklösung ergeben.

Die Blocklösung setzte sich wie folgt zusammen: 10 % normales Ziegenserum, 5 % Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg), 0,1 % Cold Water Fish Skin Gelatine in PBS. Diese Lösung diente dem Ausschalten zusätzlicher unspezifischer Proteinbindungsstellen [Hauri und Bucher, 1986].

Vor der Zugabe der Antikörper wurde der Blocklösung normal Goat Serum (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Endkonzentration von 5 % hinzugefügt.

Pro Schnitt wurde eine Menge von 150 µl benötigt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 24h bei Raumtemperatur in völliger Dunkelheit. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden ebenfalls in dieser feuchten Kammer durchgeführt

Als interne Negativkontrolle wurde ein Schnitt je Objektträger lediglich mit Blocklösung ohne Primärantikörper inkubiert. Diese Kontrolle diente dem Nachweis unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers.

Nach drei zehnmütigen Waschvorgängen mit PBS zur Entfernung überschüssigen Primärantikörpers wurden alle Schnitte inklusive der Negativkontrolle mit dem Sekundärantikörper Alexa fluor 555 Excitationsmaximum 555 und Emissionsmaximum 565 (Goat-anti-rabbit, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) im Falle von Doppelfärbungen, soweit nicht anders genannt, zusätzlich mit Alexa Fluor 488 Excitationsmaximum 491 und Emissionsmaximum 515 (Goat-anti-mouse, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einem Verhältnis von 1:400 bzw im Falle des zweiten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:800 in der oben beschriebenen Blocklösung erneut für 1h bei Dunkelheit inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte noch einmal dreifach für zehn Minuten in einer Standkuvette mit PBS gewaschen und schließlich für eine Minute mit 4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid-Methanol (DAPI-Methanol) (Boehringer Mannheim, Deutschland), einem fluoreszierenden DNA Farbstoff, überschichtet.

Nun wurden die Schnitte kurz in PBS gespült und mit gepuffertem Mowiol (pH 8,6) (Polyvinylalkohol 4-88, Fluka, Steinheim) als Medium eingedeckelt (Deckgläser: Menzel Gläser, Braunschweig). Zur Stabilisierung der Immunfluoreszenz wurden die Schnitte lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Doppelfärbungen erfolgten mit einem Antikörper gegen Calbindin (Goat-Antikörper, SWant, Bellinzona, Schweiz), als Sekundärantikörper wurde hier Fitc (Rabbit-anti-Goat, Sigma, München) verwandt, sowie einem Antikörper gegen Caspase 3 (Mouse-Antikörper, GeneTex, San Antonio, USA).

Bei Doppelimmunfluoreszenzen erfolgte die Inkubation mit den beiden Primärantikörpern, die unterschiedlichen Spezies entstammten, gleichzeitig, das heißt die Antikörper wurden gepoolt in entsprechender Verdünnung in Bocklösung angesetzt. Die weiteren Schritte entsprachen dem Vorgehen bei Inkubation mit nur einem Primärantikörper. Für die Detektion der beiden Primärantikörper wurden wieder beide Sekundärantikörper gemeinsam eingesetzt. Der weitere Ablauf war identisch zum Vorgehen bei Inkubation mit nur einem Antikörper.

Die zugehörigen Negativkontrollen werden in der Arbeit nicht gezeigt. Sie dienen dem Ausschluss unspezifischer Reaktionen des Sekundärantikörpers.

2.2.4.3 TUNEL Assay

Um apoptotische Zellen während der Mausentwicklung, im Speziellen während der Augenentwicklung, nachzuweisen, wurde ein TUNEL Assay durchgeführt.

Während apoptotischer Prozesse kommt es zur Fragmentation der DNA. Die DNA-Strangbrüche führen zum Vorhandensein freier 3'-OH Enden der DNA im Nucleus sowie in apoptotischen Körperchen. Bei proliferierenden - oder normalen Zellen liegt die Anzahl der freien 3'-OH Enden meist auf so niedrigem Niveau, dass sie von dem Detektionssystem nicht erkannt werden.

Das hier verwendete ApopTag®Kit (Chemicon International Ltd., Hampshire, England) erkennt sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche apoptotischer Zellen.

Das Prinzip des TUNEL Assays beruht auf der Erkennung der freien 3'-OH Enden durch die terminale desoxynucleotidyl Transferase (TdT). Dieses Enzym katalysiert die Verlängerung der 3'-OH Enden mit desoxy Uridintriphosphat (dUTP) Resten, die bei dem hier verwendeten Testsystem ein Oligomer bilden, das aus einer willkürlichen Mischung aus digoxigenin gekoppelten – und unmarkierten dUTP Resten besteht.

Das Verhältnis der dUTP Reste ist hierbei so eingestellt, dass es im anschließenden Schritt zu einer optimalen Bindung von anti-digoxigenin gekoppelten Antikörpern kommt. Diese lassen sich dann mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisen.

Die Herstellung der immunhistologischen Schnitte erfolgte wie oben beschrieben. Als erster Schritt erfolgte die Fixierung der einzelnen Schnitte in 1% Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger zweimalig für 5 Minuten in PBS gewaschen. Zur Postfixation diente eine auf -20°C vorgekühlte Mischung von Ethanol und Acetat im Verhältnis von 2:1. Es erfolgte ein erneuter zweimaliger Waschschrift von zwei Minuten in PBS.

Die nach dem Waschvorgang vorhandene Flüssigkeit wurde vorsichtig abgesaugt. Als nächster Schritt wurde unverzüglich der im Detektionskit enthaltene Äquilibrationpuffer in einer Menge von 75µl pro 5cm² aufgetragen. Dieser wurde für mindestens 10 Sekunden bei Raumtemperatur auf den einzelnen Schnitten belassen. Der Puffer wurde anschließend vorsichtig abgesaugt. Es erfolgte direkt das pipettieren von 55µl der Arbeitsverdünnung des TdT pro 5cm². Diese wurde vorher durch Mischen von 33 µl TdT Konzentrat mit 77 µl Reaktionspuffer, der im Kit enthalten war, hergestellt. Anschließend wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte in einer Küvette mit dem Stop/Wasch Puffer (im Kit enthalten) für 10 Minuten gespült. Der Puffer wurde in folgender Arbeitsverdünnung verwandt: 1ml des Stop/Wasch-Puffer Konzentrates auf 34ml Aqua bidest. Hieran schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang in PBS für jeweils 1 Minute an. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt.

Zur Fluoreszenzmarkierung wurden 65µl pro 5cm² der Arbeitsverdünnung (62 µl Antikörperkonzentrat in 68 µl Blocklösung) des anti-digoxigenin konjugierten Antikörpers, mit einem Excitationsmaximum von 490nm und einem Emissionsmaximum von 520nm hinzugegeben, und die Objektträger bei Dunkelheit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter viermaliger Spülvorgang für jeweils 2 Minuten in PBS.

Abschließend erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit DAPI-Methanol (siehe oben) und das Eindeckeln der Schnitte mit Mowiol.

2.2.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisation der Immunreaktion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mit dem oben genannten Aufrichtfluoreszenzmikroskop.

Für die Darstellung des Alexa Fluor 555 markierten Antikörpers im Schnitt wurde ein Anregungsfilter mit dem Spektrum von 525-560 benutzt. Durch die Verwendung eines Sperrfilters mit einem Spektrum von 570-650 wurden alle weiteren, störenden Lichtphänomene ausgeblendet. Für Alexa Fluor 488 umfasste der Wellenlängenbereich des Erregungsfilters 460-490nm und des Sperrfilters 515-550nm. Zur weiteren zellulären Lokalisation des PTP51 wurden die Kerne in den immunfluoreszenz markierten Proben wie oben beschrieben mit DAPI-Methanol gegengefärbt. Die Auswertung dieser Färbung erfolgte bei UV-Licht mit einem Anregungsfilter mit einem Spektrum von 360-370nm und einem Sperrfilter im Spektrum 420-450nm.

Für die Darstellung des TUNEL Assays, sowie für die Koloalisationsstudien mit Calbindin (Sigma, Schnelldorf) und Synaptophysin (Biomol, Hamburg) wurde ein Anregungsfilter mit einem Spektrum von 460-490nm und ein Sperrfilter mit einem Spektrum von 515-550nm verwendet.

2.2.4.5 Dokumentation

Die am Mikroskop gewonnen Bilder konnten über ein digitales Kamera System (Axio cam HR, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) am Mikroskop mit einem Computer aufgezeichnet werden. Die Daten wurden als TIFF-Dateien erfasst und konnten gespeichert werden.

Zur Nachbearbeitung diente eine Bildverarbeitungssoftware (Adobe Photoshop 7.0, Adobe, San Jose, USA).

2.2.5 In situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung wurde nach Protokollen von Steger et al., 1998, 2000 durchgeführt. Die zur in situ Hybridisierung vorgesehenen Schnitte wurden auf die gleiche Weise vorbereitet, wie die oben beschriebenen. Zur Prähybridisierung, die der Erhöhung der Permeabilität der Embryonalenzellen dient, wurden die Objektträger für zehn Minuten in PBS mit 0,25% Triton X 100 und 0,25% Nodidet P-40 gegeben. Als nächster Schritt erfolgte eine einstündige Inkubation in 20% Glycerol.

Die Hybridisierung erfolgte mit DIG markierten Sense- und Antisense c-RNA-Proben in einer Verdünnung von 1:100. Hierbei wurde ein Sondengemisch mit den cRNA-Proben, 10 µg/ml Salmon-Sperm-DNA (Sigma, München) und 10 µg/ml Yeast tRNA (Sigma,

München) verwendet. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 50% deionisiertem Formamid, 10% Dextransulfat, zweifach SSC und Denhardt-Reagenz (2% BSA, 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon, fertig zu beziehen bei Sigma, München).

Das Sondengemisch wurde mit dem Puffer auf die Objektträger mit den Schnitten gegeben und diese anschließend für 10 Minuten auf einer Heizplatte bei 70°C abgelegt. Anschließend wurden die Gewebe mit einem Kühlakku abgeschreckt und in einer Hybridisierungskammer über Nacht bei 42°C inkubiert.

Die Posthybridisierung wurde nach Lewis und Wells (1992) durch einen vierfachen zehnminütigen Waschvorgang in vierfach konzentriertem SSC-Puffer bei 42°C eingeleitet. Daran anschließend erfolgte ein weiterer fünfzehnminütiger Waschvorgang in zweifachem SSC-Puffer bei 60°C gefolgt von einem gleich langen Waschvorgang in 0,2fachem SSC-Puffer bei 42°C. Die beiden letzten, abschließenden Waschvorgänge erfolgten in 0,1fachem - und zweifachem SSC-Puffer für jeweils fünf Minuten bei Zimmertemperatur.

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Proben für 10 Minuten in TNMT-Puffer gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit 3%igem BSA-Blockpuffer bei Raumtemperatur. In einer Nasszelle wurden die Schnitte dann mit dem Sekundärantikörper Anti-DIG-Fab (Boehringer Mannheim, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:500 in 1%igem BSA-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert.

Es erfolgte ein zweifacher jeweils zehnminütiger Waschvorgang in TNMT-Puffer, ein fünfminütiger Waschvorgang in NTB-Puffer, weitere fünf Minuten in Levamisol und ein abschließender Waschvorgang in NTB-Puffer.

Das Entwickeln mit Nitro Blau Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (NTB-BCIP-Lösung, KPL, Gaithersbur, MD, USA) erfolgte in vollständiger Dunkelheit, wobei sich die dafür benötigte Entwicklungszeit als äußerst variabel erwies (Minuten bis Stunden).

Als letzte Schritte erfolgten dann noch ein fünfminütiger Waschvorgang in Levamisol gefolgt von fünf Minuten Waschen in NTB-Puffer. Nach kurzem Spülen in Aqua bidest. wurden die Schnitte in Glycergel (Dako, Hamburg) eingedeckelt.

3. Ergebnisse

3.1 RT-PCR von Embryo Extrakten

Um das Vorhandensein von PTPIP51 während der Embryonalentwicklung der Maus nachzuweisen, wurde dessen Expression mittels RT-PCR untersucht. Wie Abbildung 1 zu entnehmen ist, fand sich PTPIP51 mRNA in Extrakten von Embryonen des 10., 14., 16. und 18. d.p.c.

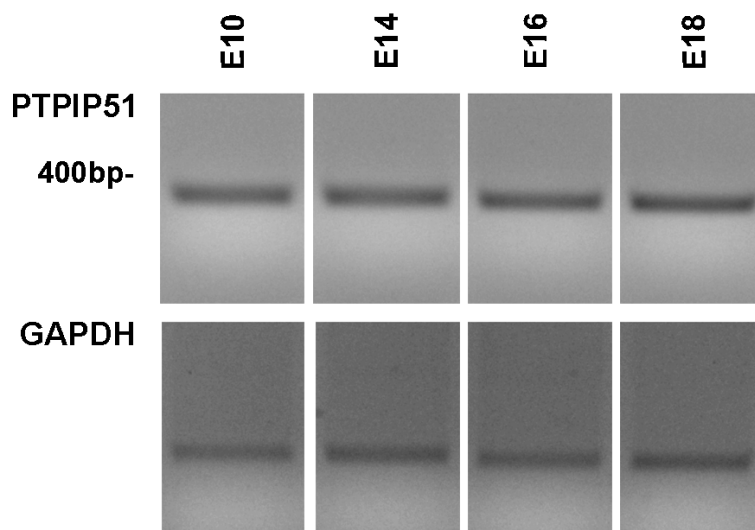


Abbildung 1: PCR von Embryo Extrakten

3.2 Western Blotting von Embryo Extrakten

Die PTPIP51-Expression konnte zusätzlich durch Western blotting verschiedener Embryonalstadien gesichert werden.

Es wurden die Stadien vom 12., 13., 14., 16. und 18. d.p.c. untersucht (Abb. 2). Zum Nachweis der Spezifität des Antikörpers wurde zusätzlich ein anti-RGS-His6-Antikörper verwendet. Die durch diesen Anti-His6 Antikörper detektierte Bande war nicht identisch mit den Isoformen, die der PTPIP51 Antikörper nachwies.

So konnten unspezifische Kreuzreaktionen mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper mit Histidin-reichen Regionen anderer Proteine an der gestrippten Membran

ausgeschlossen werden (Abb. 2b). Als Housekeepingprotein wurde Tubulin verwendet (Abb. 2c).

Am 12. d.p.c. waren zwei deutliche Banden mit Molekulargewichten von ~52 kDa und ~45 kDa nachweisbar, die mit fortschreitender Entwicklung schwächer ausgeprägt waren. Ab dem 13. Entwicklungstag konnte eine weitere allerdings schwach ausgeprägte Bande mit einem Molekulargewicht von ~38kDa kDa detektiert werden.

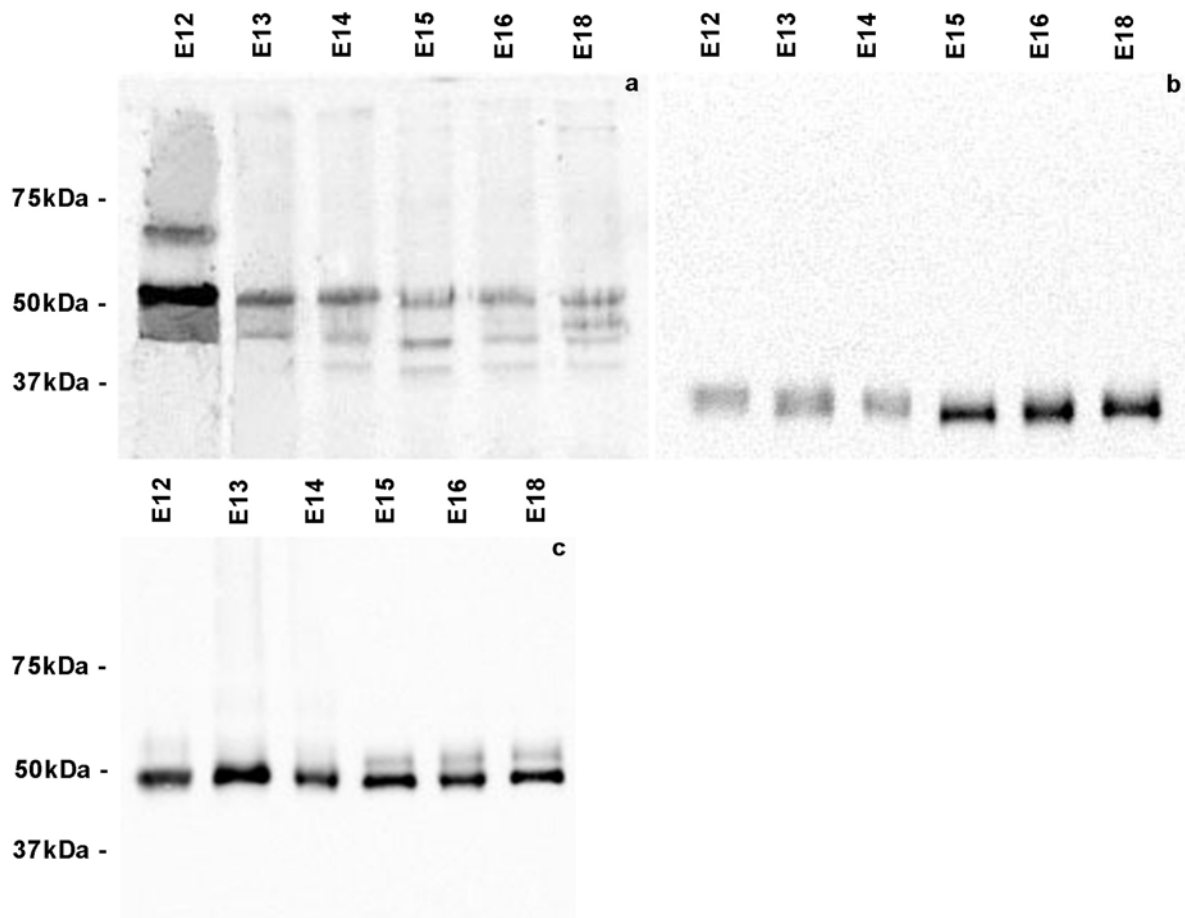


Abbildung 2: Western Blotting von Embryo Extrakten

- a anti-PTPIP51-Antikörper
- b anti-RGS-His6-Antikörper
- c anti-Tubulin-Antikörper

3.3 Augenentwicklung

Die hier dargestellten Abläufe basieren, soweit nicht anders gekennzeichnet, auf dem Buch „The anatomical basis of mouse development“ von Kaufmann und Bard (1999).

Das Auge ist ein komplex aufgebautes Sinnesorgan. An seinem Aufbau sind Gewebe aller drei Keimblätter (Neuroektoderm, Ektoderm und Mesoderm) beteiligt. Die Neurone und das Pigmentepithel der Retina, die Fasern des Nervus opticus sowie die die Augenmuskeln versorgenden peripheren Nerven sind neuroektodermaler Herkunft. Linse, Cornea, Augenlider und die Conjunctiva werden vom oberflächlichen Ektoderm gebildet. Sklera, die bindegewebigen Anteile des Auges einschließlich der Descemet-Membran, sowie die äußeren Augenmuskeln entstammen phylogenetisch dem Mesoderm.

Die Entwicklung des Sehorgans beginnt am 8. d.p.c. mit einer Ansammlung neuroepithelialer Zellen an der Innenseite der Neuralfaltens. Diese liegen am cranialen Ende des Neuralrohres. Aus den plattenartig angeordneten Zellen formiert sich innerhalb kurzer Zeit der Sulcus opticus, welcher die medialen Anteile der Augenanlagen mit den diencephalen Anteilen der Hirnanlage am späteren Chiasma opticum verbindet.

Eine leichte Vertiefung in der Mitte der Augenanlage zeigt den Ort an, an dem sich binnen kürzester Zeit die Augenblase bilden wird. Diese ist schon am 8,5 Tag der Embryonalentwicklung deutlich erkennbar.

Mit dem fortschreitenden Wachstum der Augenblase verengt sich die Verbindung der Augenanlage zum Hirn immer mehr, so dass sie auf den Augenblasenstiel reduziert wird. Dieser entspricht beim voll entwickelten Auge dem Nervus opticus.

Die Augenblase induziert durch Wechselwirkungen zwischen dem ihr außen anliegenden oberflächlichen Ektoderm und dem innen liegenden neuronalen Ektoderm die Bildung der Linsenplakode.

Die zentralen Anteile der Plakode vertiefen sich zum Linsenbläschen, welches vollständig vom oberflächlichen Ektoderm gelöst am 10. d.p.c. sichtbar wird. Durch diesen Vorgang wird die vormals äußere Schicht des Augenbläschens nach dorsal eingedrückt und bildet so den Augenbecher. An der Unterseite des Augenbechers und entlang des Augenblasenstiels bildet sich die fetale Augenspalte, durch welche die Blutgefäße sowie das Mesenchym in den Augenbecher einsprossen. Die einwachsenden Gefäße (Arteria- und Vena hyaloidea) versorgen das innere Blatt des Augenbechers und das im Inneren des Augenbechers gelegene Gewebe.

Die genannten Gefäße entspringen der Zentralarterie der Retina, einem Ast der A. ophthalmica, die ihrerseits aus der A. carotis interna hervorgeht. Am Ende der Augenentwicklung obliterieren die A.- und V. hyaloidea. Die proximalen Gefäßanteile, die die A.- und V. centralis retinae bilden, bleiben jedoch erhalten.

Das Lumen des Linsenbläschens engt sich im weiteren Verlauf stark ein, so dass es am 12. Tag der Mausentwicklung beinahe vollständig verschlossen ist. Am Linsenäquator werden die Linsenfasern produziert, so dass die notwendige Größenzunahme der Linse mit der weiteren Entwicklung des Auges Schritt halten kann. Die Linsenfasern werden mit höherer Differenzierung des Auges, also ab dem 17,5 Tag der Mausentwicklung, durchsichtig.

Ab dem 9,5 Tag der Embryonalentwicklung gehen die innere - und äußere Schicht des Augenbläschens unterschiedliche Wege in ihrer weiteren Entwicklung. Die äußeren Anteile bilden das Pigmentepithel der Retina, wobei Pigmentgranula ab dem 12,5 Tag nachweisbar sind. Die inneren Anteile teilen sich häufig, so dass mehrere neuroblastische Zelllagen entstehen, welche sich zu den verschiedenen Komponenten der Neuroretina differenzieren.

Bei dem noch nicht voll entwickelten Auge besteht zwischen dem Pigmentepithel und der Retina noch ein Spalt, der jedoch mit höherer Differenzierung der Retina nach und nach verschwindet. Da dieser Spalt jedoch kapillär erhalten bleibt, besteht zeitlebens die Möglichkeit der Ablösung der beiden Blätter voneinander.

Die unpigmentierten Anteile des Ciliarkörpers bilden sich um den 16,5 Embryonaltag aus den in der Peripherie der Retina gelegenen Zellen, welche später keinen direkten Lichtkontakt haben werden. Die Pigmentepithelschicht des Ciliarkörpers bildet sich aus den ehemals äußeren Anteilen des Augenbechers. Gleichzeitig hierzu schieben sich die vordersten Anteile der Retina vor die Linse, um hier die Iris zu formieren.

Am 12,5 Entwicklungstag wachsen Nervenfasern, die den späteren Ganglienzellen der Neuroretina entspringen, auf die innere Oberfläche des Augenbechers zu. Von dort aus treten sie in den Augenbecherstiel ein und füllen sein Lumen schon bald vollständig aus. Sie wachsen durch den Augenbecherstiel immer weiter in Richtung Chiasma opticum vor und von dort aus schließlich weiter zum Corpus geniculatum laterale, wo sie Kontakt mit dem 4. Neuron aufnehmen. Diese Nervenfasern, die nun die innerste Schicht der Retina bilden, sind noch nicht myelinisiert.

Die Retina zeigt eine fortschreitende Differenzierung. Ihre perinatale Konfiguration erreicht sie jedoch erst zwischen dem 16,5 bis 17,5 d.p.c. Die endgültige neuronale Differenzierung der Retina wird allerdings im Gegensatz zum Menschen erst mehrere Wochen nach der Geburt vollständig abgeschlossen sein.

Neben den vom N. opticus gebildeten optischen Fasern verfügt das Auge über weitere neuronale Strukturen, die die Augenmuskeln innervieren, beziehungsweise solche, die die Sensibilität des Auges gewährleisten, sowie über Fasern, die das Auge mit dem autonomen Nervensystem verbinden.

Die dem autonomen Nervensystem entspringenden Fasern wachsen mit den Gefäßen in das Auge ein. Der Sympathikus ist hierbei für eine Vasokonstriktion der Gefäße und für die Innervierung des M. dilatator pupillae verantwortlich. Der Parasympathikus entsendet Fasern, die den M. sphincter pupillae und den Ciliarkörper versorgen. Durch deren Kontraktion wird der Vorgang der Akkomodation ermöglicht. Diese glatten Muskeln entwickeln sich um den 16,5 d.p.c.

Die Sensibilität wird durch Fasern des N. ophthalmicus, dem ersten Ast des N. trigeminus, geleitet. Dieser versorgt die Cornea, die Iris und den Ciliarkörper.

Die äußeren Augenmuskeln gehen aus dem Mesoderm der cranialen Somiten um den 12.-12,5 d.p.c. hervor. Ihre Innervation erfolgt über den N. oculomotorius, den N. trochlearis sowie den N. abducens.

Hervorzuheben ist, dass die Entwicklung der äußeren Augenmuskeln im Gegensatz zu vielen anderen Strukturen des Auges vollkommen unabhängig erfolgt. Ihr Auftreten kann regelmäßig auch im Zustand der Anophthalmie beobachtet werden.

Die Cornea entsteht etwa zwischen dem 11,5 bis 12. Tag der Entwicklung aus dem Oberflächenepithel, das über der Linse liegt. Am 12,5 d.p.c. formiert sich das Stroma der Cornea aus Kollagenfibrillen. Wenige Tage danach (15,5 d.p.c.) bildet sich das Endothel der Cornea aus den posterioren Anteilen des Stromas. An dem basalen Zellpol des Endothels bildet sich schließlich die Descemet-Membran. Die vollständige Differenzierung der Cornea erfolgt ebenfalls erst nach der Geburt.

Mit dem Beginn der Corneal-Entwicklung bildet sich ein Spalt zwischen der vorderen Linsenoberfläche und der darüber liegenden Cornea, aus welchem im weiteren Verlauf die vordere Augenkammer mit all ihren Strukturen hervorgeht.

Aus den seitlich der Linse liegenden Anteilen des Augenbechers entwickelt sich eine Membran, aus der im Weiteren die Pupille entsteht. Mit der fortschreitenden Augenentwicklung wächst diese Membran auf die Linsenvorderfläche. Hier trennt sie die spätere Vorder- und Hinterkammer voneinander. Erst mit der Reifung des Auges nach der Geburt reißt die Membran ein, so dass Vorder- und Hinterkammer miteinander kommunizieren.

Die Iris bildet sich aus den an der Randzone des Augenbechers gelegenen Anteilen des vormals inneren - und äußeren Augenbechers. Sie entsteht in dem Bereich, in dem der Augenbecher die sich entwickelnde Linse überragt. Das Irisepithel setzt sich aus den beiden Blättern des Augenbechers zusammen. Auf der Irisrückseite geht das Epithel in die beiden Epithelschichten des Ciliarkörpers über. Hier bildet das äußere Blatt des Augenbechers den pigmentierten Anteil der Iris.

Als äußere Begrenzung des Augapfels entwickelt sich am 12,5 d.p.c. aus dem Mesenchym, das den Augenbecher umhüllt, eine innere Lamelle. Diese Lamelle bildet im weiteren Verlauf die gefäßreiche Choroidea. Darüber liegt eine gefäßarme, aber faserreiche Lamelle, aus der die Sklera hervorgeht.

Die Augenlider können zum ersten Mal am 11,5 Tag der Embryonalentwicklung im oberflächlichen Ektoderm ausgemacht werden. Deutlich treten sie jedoch erst zwischen dem 13,5-14,5 d.p.c. als zwei Hautfalten hervor. Um den 15,5 Tag sprosst vom Rand der Lider ein Epithel auf das Auge vor, welches im weiteren Verlauf die Cornea überzieht. Diese Aussprossungen von Ober- und Unterlid vereinigen sich in der Mittellinie und schließen so den Conjunctivalsack. Die Lider bleiben bis zum 12. Tag nach der Geburt verschlossen. Erst dann öffnen sich die Lider langsam, so dass sie nach weiteren zwei bis drei Tagen vollständig geöffnet werden können. Man nimmt an, dass die nach der Geburt geschlossenen Lider als Schutz dienen und so erst die vollständige Differenzierung des Auges ermöglichen.

Zahlreiche Studien belegen jedoch, dass auch nach dem Öffnen der Augen weitere Differenzierungsprozesse in der Retina stattfinden [Tian und Copenhagen, 2001].

Die Beschreibung der postnatalen Entwicklung stützt sich im Wesentlichen auf: „Systematic evaluation of the mouse eye – anatomy, pathology and biomethods“ von Richard S. Smith (2002).

Am Tag der Geburt zeigt das Cornealstroma im Vergleich zum adulten Tier noch eine höhere Zellzahl. Die Iris, der Ciliarkörper und das Trabekelwerk wirken im Vergleich zum Adulten noch plump.

Die Linse entspricht in ihrer Differenzierung der des erwachsenen Tieres, befindet sich aber noch in einer Phase rascher Größenzunahme. Die Retina besteht aus einer inneren - und äußeren Neuroblastenschicht. Die Ganglienzellen sind noch nicht voll entwickelt, die inneren und äußeren Segmente der Stäbchen und Zapfen haben sich noch nicht gebildet.

Die Tage 6 bis 8 der post partalen Entwicklung sind durch die Proliferation der Cornea und Conjunctiva gekennzeichnet, die beide aus drei - bis vier Zelllagen bestehen. Die Descemet-Membran ist deutlich vom Stroma der Cornea abgrenzbar und entspricht in ihrer Dicke der der ausgewachsenen Maus. Der Ciliarkörper ist jetzt ebenfalls voll entwickelt. Die Retina nähert sich in ihrer Differenzierung weiter der des erwachsenen Tieres an.

Mit dem Öffnen der Augenlider am 12. Tag nach der Geburt zeigt die Retina der Maus den gleichen Differenzierungsgrad wie die Retina der erwachsenen Maus [Daw, 1995], allerdings reicht sie noch bis direkt an den Ciliarkörper; die Ora serrata hat sich also noch nicht entwickelt. Auch Cornea und Conjunctiva sind voll entwickelt.

Mit einem Alter von 21 Tagen ist die Entwicklung des Auges bis auf drei Ausnahmen abgeschlossen: die Abflusswege des Kammerwassers sind noch nicht voll entwickelt, gleiches gilt für die Ora serrata und das hyaloidale Gefäßsystem.

3.3.1 Das Auge des Embryos 12. d.p.c.

Die Übersicht (50fache Vergrößerung; Abb. 3a) zeigt das gesamte Auge.

Die Augenlider sind zu diesem Entwicklungszeitpunkt noch nicht deutlich auszumachen. Jedoch fällt in der linken oberen Bildhälfte eine PTIP51 positive, vom Oberflächenektoderm abstammende Einstülpung auf, die beim Adulten dem Bindehautsack entspricht.

Die äußere Begrenzung des Auges wird durch das Ektoderm gebildet, welches sich im weiteren zur Cornea differenzieren wird. Auf dessen Vorder- wie Rückseite liegt jeweils eine positiv mit dem PTIP51 Antikörper reagierende Zellschicht.

Das Linsenbläschen ist zu diesem Entwicklungszeitpunkt noch nicht vollständig verschlossen (Abb. 3b). Das anteriore Linsenepithel reagiert in seinen apikalen und basalen Zellanteilen. Die posterioren Linsenepithelzellen, die auf die basalen Anteile des anterioren Linsenepithels zuwachsen, zeigen in ihrem auf dasselbige gerichteten Zellpol ebenfalls eine deutliche Reaktion.

Die zukünftige Neuroretina, welche das gesamte Augenbläschen einfasst, und die zu diesem Zeitpunkt aus einem mehrschichtigen Neuralepithel aufgebaut ist, zeigt in ihrem zur Linse orientierten Drittel und dem zum Pigmentepithel weisenden Anteil jeweils ein Band starker PTPIP 51 Reaktion. Der innere reaktive Anteil der Retina besteht aus den zu diesem Zeitpunkt auf den N. opticus zuwachsenden Axonen sowie den zukünftigen retinalen Ganglienzellen (Abb. 3c). Die übrigen Schichten der zukünftigen Neuroretina zeigen eine homogene positive Reaktion, wobei einzelne stärker reagierende Abschnitte auffallen, die zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keinem Zelltyp zugeordnet werden können. Auch das die Retina einfassende Pigmentepithel zeigt eine deutliche PTPIP51 Antigen Expression.

Auf Abbildung 3d ist darüber hinaus das Einwachsen eines in der Entwicklung begriffenen Augenmuskels in das sich später zur Sklera differenzierende Mesenchym deutlich zu erkennen. Der gesamte Augenmuskel reagiert mit dem PTPIP51 Antikörper positiv und fällt in der Übersicht deutlich ins Auge.

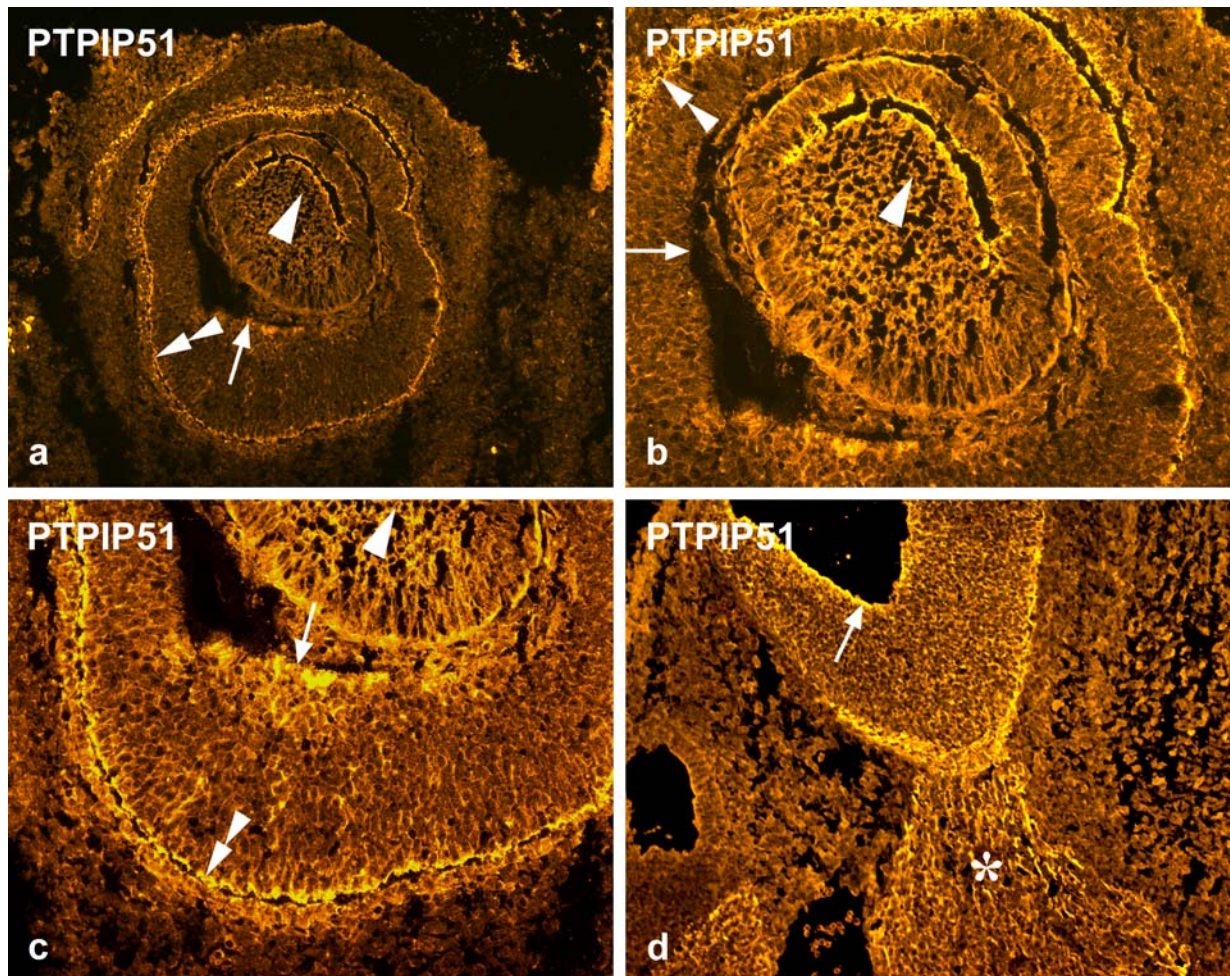


Abbildung 3: Auge 12. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linsenbläschen; Pfeil: Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- b Neuroretina und Linse (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linsenbläschen; Pfeil: Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- c zukünftige Neuroretina (200fache Vergrößerung); Pfeil: Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- d Augenmuskel und sklerales Mesenchym (100fache Vergrößerung); Pfeil: Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht; Stern: Augenmuskel

3.3.2 Das Auge des Embryos 13. d.p.c.

In der Übersichtsvergrößerung (Abb. 4a) fällt am linken Bildrand ein Saum reaktiver Zellen auf, der der Anlage der zukünftigen Conjunctiva und Cornea entspricht. Dieser reaktive Saum lässt sich auch hier bis in eine Umschlagsfalte verfolgen.

Auf dem vorliegenden Schnitt, wird die Linse in ihrer Gesamtheit von den neuroblastischen Schichten der Retina eingefasst. Das Linsenbläschen ist vollständig verschlossen. Das anteriore Linsenepithel zeigt die gleiche Verteilung von PTPIP51 wie

am Vortag. Jedoch fällt die Reaktion am basalen Pol deutlich stärker aus. Hier fusionieren die Linsenfaserepithelzellen mit dem anterioren Linsenepithel. An diesem Übergang entsteht im weiteren Verlauf die Basallamina, der das anteriore Linsenepithel aufsitzt.

Bei der sich entwickelnden Neuroretina entspricht die Verteilung des Proteins der des Vortages (Abb. 4b).

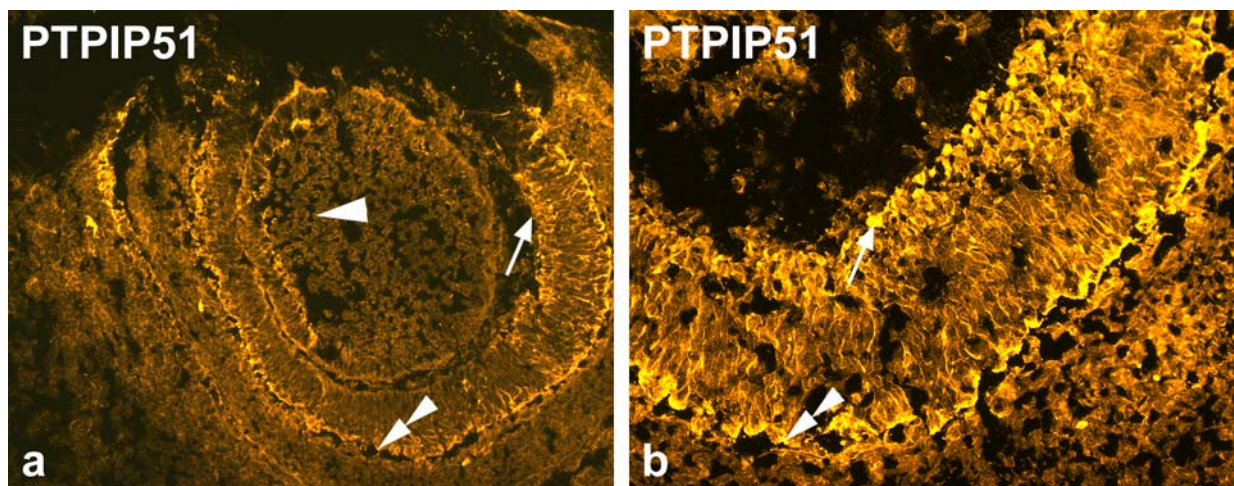


Abbildung 4: Auge 13. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- b Neuroretina (200fache Vergrößerung); Pfeil: Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.3 Das Auge des Embryos 14. d.p.c.

Abbildung 5a zeigt einen Überblick des gesamten Auges. Am 14. d.p.c. sind die Augenlider noch nicht voll entwickelt. Am rechten und linken Bildrand sind jedoch zwei in ihrem oberflächlich gelegenen Epithel positiv reagierende Hautfalten zu erkennen, aus denen sich im weiteren Verlauf die Lider entwickeln werden. Die Lideranlagen bedecken zu diesem Zeitpunkt etwa die Hälfte der Cornea.

Die Conjunctiva ist in diesem Stadium noch nicht voll entwickelt, lässt sich jedoch am rechten Bildrand bis in die Mitte der Abbildung verfolgen. Das corneale Stroma hat im Vergleich zu den Vortagen an Dicke zugenommen. Es fallen vor allem an der Oberfläche, an der das Epithel entstehen wird und an der Rückfläche der Cornea, an der sich das Endothel entwickelt hat, eine PTPIP51 Reaktion auf. Diese beiden reaktiven Zelllagen fassen das weniger reaktive Stroma ein.

Unterhalb liegt der Linsenkörper (Abb. 5a,b), der auch in diesem Stadium an seiner Oberfläche, die den apikalen Zellanteilen des vorderen Linsenepithels entspricht, positiv reagiert. Das vordere, durch die im Wachstum begriffenen primären Linsenfasern gebildete Drittel - sowie einige Bereiche im hinteren Drittel der Linse - zeigen sich ebenfalls positiv. Der Vergleich mit der DAPI-Färbung zeigt, dass die stärksten Fluoreszenzen mit Antikörpern gegen das PTPIP51 in Bereichen lokalisiert sind, die nicht mit Zellkernen korrelieren. Die Kerne des Linsenfaserepithels liegen in der äquatorialen Region der Linse. Diese Lokalisation entspricht auch der des adulten Tieres. Die Linsenkapsel hat sich noch nicht ausgebildet. Insgesamt zeigt die Linse im Vergleich zu den Vortagen ein deutliches Größenwachstum.

Zwischen der Linse und der sich entwickelnden Retina erkennt man vor allem im Vergleich zwischen den Abbildungen 5a, c und b, d eine Zelllage. Diese entspricht dem hyaloidalen Gefäßsystem und zeigt keine Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper.

Auf ihrer Rückseite wird die Linse vollständig von der Neuroretina eingefasst. In Abbildung 5c (Pfeil) ist die Neuroblastenschicht vor allem in den zukünftigen retinalen Ganglienzellen positiv angefärbt. Bei der Neuroretina können nun deutlich verschiedene Zelllagen voneinander abgegrenzt werden. Ein Vergleich mit der Lage der Kerne (Abb. 5d) zeigt deutlich, dass sich die Retina in eine innere (Länge des gesamten Pfeiles in Abb. 5d) und äußere Neuroblastenschicht differenziert hat. Auf der Rückseite der Retina lässt sich noch der Spalt zwischen dem inneren und dem äußeren Blatt des Augenbechers, also der zukünftigen Rezeptorzellschicht und dem Pigmentepithel erkennen.

Zu diesem Zeitpunkt kondensieren am Hinterpol des Auges mesenchymale Zellen, aus diesen differenziert sich im weiteren Verlauf die Sklera. Innerhalb des das Auge umgebenden Bindegewebes fallen keine PTPIP51 positiven Reaktionen auf.

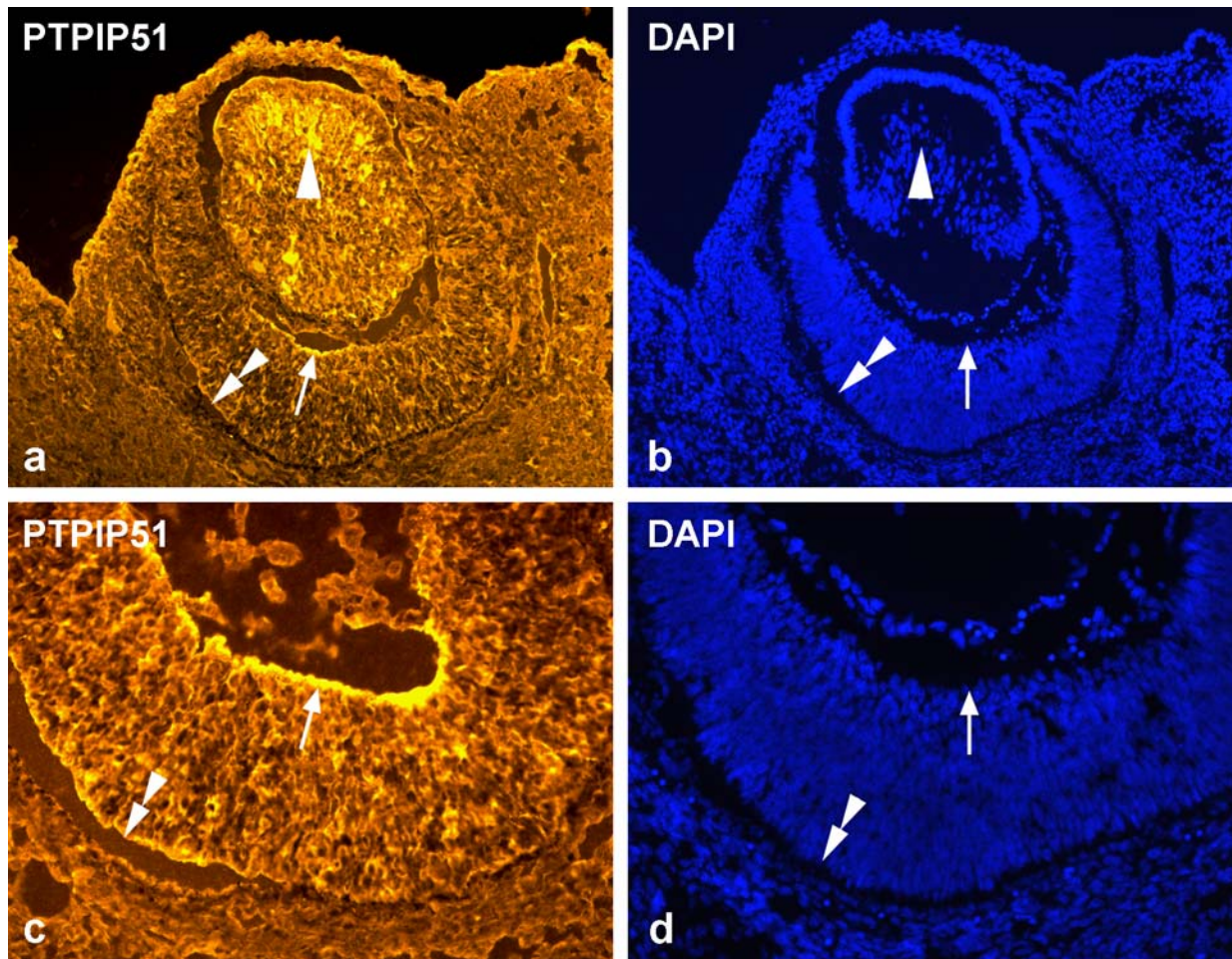


Abbildung 5: Auge 14. d.p.c.

- a Übersicht (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- b Übersicht DAPI-Färbung (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- c zukünftige Neuroretina (200fache Vergrößerung); Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- d zukünftige Neuroretina DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.4 Das Auge des Embryos 15. d.p.c.

Wie die 100fache Vergrößerung (Abb. 6a) zeigt, ist der vordere Anteil des Augapfels angeschnitten. Auf beiden Seiten wird der Augapfel von den sich entwickelnden Augenlidern eingefasst, die eine Expression des PTPIP51 Antigens in der sich differenzierenden Epidermis zeigen. Im Verlauf des 15. Entwicklungstages kommt es zur Fusion der Augenlider.

Auch die auf der Rückseite des Lides gelegene Conjunctiva zeigt in ihren epithelialen Anteilen eine deutliche Reaktion mit dem gegen das Protein gerichteten Antikörper.

Das wenig reaktive corneale Stroma hat sich weiter verdickt. Das Epithel und Endothel der Cornea weisen weiterhin eine PTPIP51 Antigen Expression auf und fassen das weniger reaktive Stroma ein.

Die Linse erscheint in diesem Schnitt homogen PTPIP 51 positiv. Da es sich um einen Tangentialschnitt handelt, lässt sich die genaue Lokalisation des PTPIP51 nicht bestimmen. Während der hier gezeigten Entwicklungsstufe kommt es zur Ausbildung der Linsenkapsel.

Auf Abbildung 6b ist der Austritt des Sehnervs durch die Lamina cribrosa angeschnitten. Der sich aus den Axonen der retinalen Ganglienzellen zusammensetzende Sehnerv ist stark PTPIP51 positiv. Vergleicht man Abbildung 6b mit der DAPI-Färbung (Abb. 6d), so fällt deutlich auf, dass sich in diesem Bereich des Sehnerven nur wenige Zellkerne befinden. Es handelt sich also unmissverständlich um die Nervenfasern des N. opticus. Die zukünftige Ganglienzellschicht zeigt weiterhin eine starke PTPIP51 Reaktion. Auch die noch nicht entwickelte Rezeptorzellschicht (doppelte Pfeilspitze) ist stark positiv angefärbt Abb. 6c.

Die inneren und äußeren Neuroblasten der Retina zeigen insgesamt weiterhin eine homogene PTPIP51 Reaktion.

Bei den über den zukünftigen Ganglienzellen der Retina gelegenen Zellen (Abb.6b, c, d) handelt es sich um das hyaloidale Gefäßsystem. Dieses steht topographisch in engem Bezug zum N. opticus, der ihm als Leitstruktur dient. Dies wird besonders in der DAPI Färbung deutlich, bei der man Anteile der Gefäße in den Sehnervenkopf verfolgen kann.

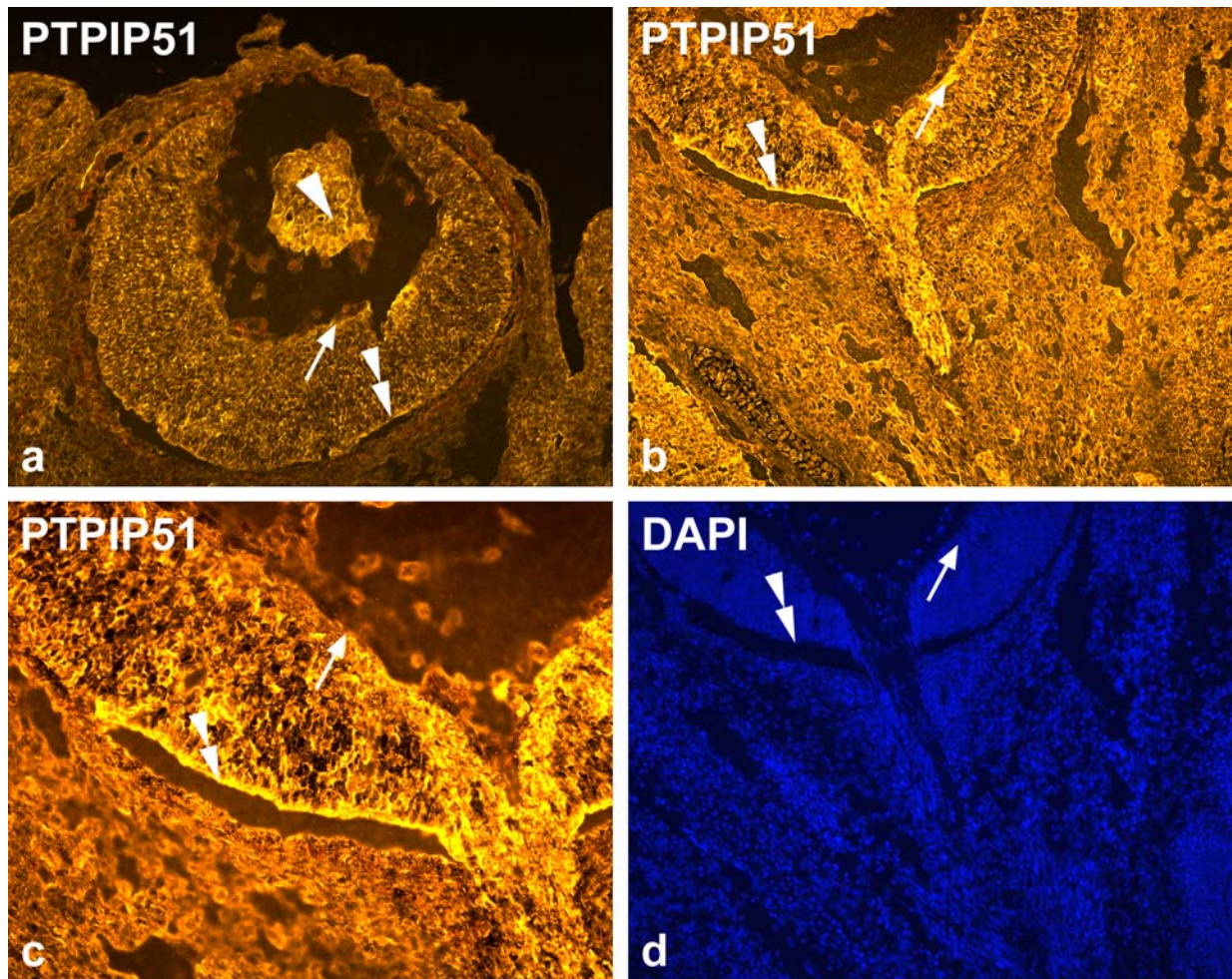


Abbildung 6: Auge 15. d.p.c.

- a Übersicht (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- b Übersicht (100fache Vergrößerung); Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- c zukünftige Neuroretina (200fache Vergrößerung); Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina
- d Übersicht DAPI Färbung (100fache Vergrößerung); Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.5 Das Auge des Embryos 16. d.p.c.

Die 50fache Vergrößerung (Abb. 7a) gibt einen Überblick über das gesamte Auge: als äußere Begrenzung fällt jeweils rechts und links des Augapfels die Epidermis der Lider auf, die in ihren suprabasalen Zellschichten eine starke Reaktion zeigt. Die Lider müssten zu diesem Zeitpunkt verschlossen sein. Die Lider erscheinen geöffnet, was wahrscheinlich durch die Manipulation bei der Präparation bedingt ist und somit als

Artefakt zu werten ist. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Entwicklung der Meibom-Drüsen sowie der Lidmuskeln.

Das Epithel der Conjunctiva reagiert positiv, so dass der gesamte Bindehautsack ohne weiteres aufgrund seiner Reaktion bis in seine Ausläufer verfolgt werden kann.

Auf der Vorder- und Rückseite der Cornea, entsprechend dem Epithel und Endothel, erscheinen einige Lagen kräftig fluoreszierender Zellen. Das corneale Stroma hat sich um weitere Schichten verstärkt. Es zeigt einen regelmäßigeren Aufbau, was durch die regelmäßige Anordnung der Kollagenfibrillen bedingt ist. Die Anzahl der im Stroma lokalisierten Keratocyten nimmt stetig zu.

Die sich entwickelnde Vorderkammer des Auges wird auf ihrer Rückseite von den sich entwickelnden Strukturen, die sie beim Adulten gegen die Hinterkammer begrenzen, eingefasst. Eine dünne Schicht von einwandernden Zellen neuroektodermaler und mesodermaler Herkunft bilden die Anlagen von Iris und Ciliarkörper. Diese areaktive Anlage liegt oberhalb der Retina, die nur einen schmalen Spalt zur Linse offen lässt.

Die Linse zeigt nur im anterioren Linsenepithel sowie der äquatorialen Region, dem Ort der Linsenfaserproduktion, eine Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Die Linsenkapsel ist PTPIP51 negativ.

Die Retina zeigt die für sie typische Reaktion: die innerste Neuroblastenschicht ist vornehmlich in dem Anteil der späteren Ganglienzellschicht PTPIP 51 reaktiv. Die darunter liegenden Schichten zeigen nur eine spärliche Reaktion. Auf ihrer Außenseite befindet sich die deutlich reaktive zukünftige Rezeptorzellschicht.

Die noch nicht vollständig differenzierte Choroidea und Sklera zeigen keinerlei Expression des Antigens. Lediglich die in die Sklera inserierenden äußeren Augenmuskeln weisen eine positive Reaktion auf. In Abbildung 7a und b erkennt man deutlich zwei Muskeln: einen am Hinterpol des Auges und den anderen rechts oberhalb davon.

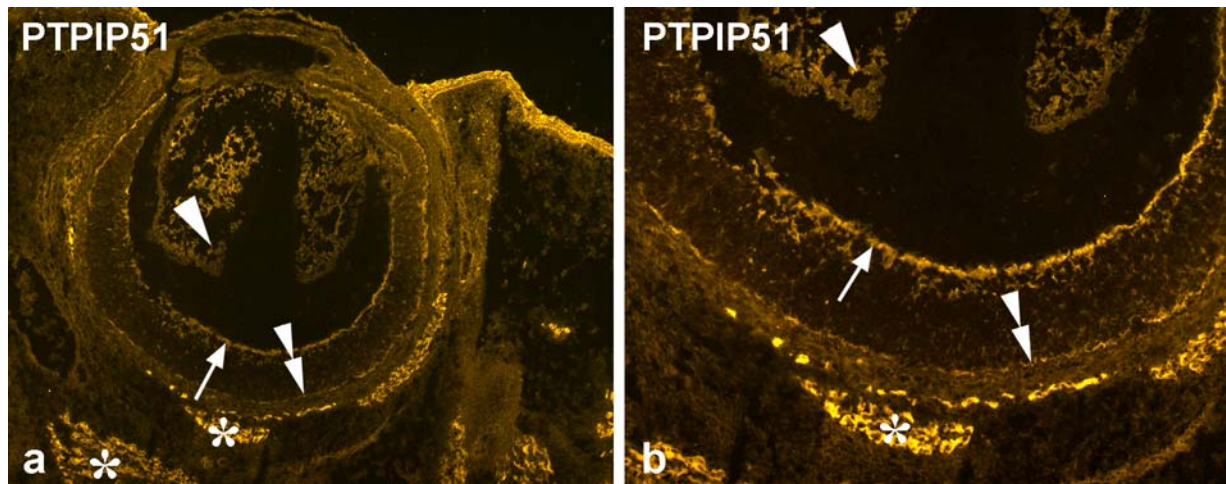


Abbildung 7: Auge 16. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina; Stern: Augemuskel
- b Retina (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.6 Das Auge des Embryos 17. d.p.c.

Abbildung 8a zeigt die deutliche PTPIP51 reaktive Epidermis der Augenlider. Auch auf dieser Abbildung erscheinen die Lider nicht geschlossen. Innerhalb der Lider lässt sich die Lidmuskulatur erkennen, die eine Expression des Antigens zeigt. Die Epidermis setzt sich an den Umschlagfalten beider Lider in das ebenfalls positiv reagierende Epithel der Conjunctiva fort.

Die Cornea nähert sich der vollen Differenzierung an. Allerdings bildet sich erst zu diesem Zeitpunkt die Descemet-Membran, welche zwischen Stroma und Epithel lokalisiert ist.

Äußere und innere Neuroblastenschicht sind gut ausgebildet und erstmals können verschiedene Zelltypen sicher voneinander unterschieden werden. Die Nervenfaserschicht ist entwickelt, wobei die retinalen Ganglienzellen allerdings noch nicht die Differenzierungsstufe von Zellen des Adulten erreicht haben. Die der Linse gegenüberliegenden Zellen der Retina (Abb. 8b) erscheinen, wie in den vorhergehenden Stadien, als eindeutig positiver Rand. Dieser entspricht der zukünftigen Ganglienzellschicht. Auch die zukünftige Rezeptorzellschicht zeigt weiterhin eine PTPIP51 positive Reaktion. Die retinale Entwicklung ist so weit fortgeschritten, dass sich das Stratum limitans internum und externum ausmachen lassen.

Auch auf diesem Präparat erkennt man einen PTPIP51 positiven Augenmuskel mit seiner Insertion an der areaktiven Sklera (Abb. 8a, b).

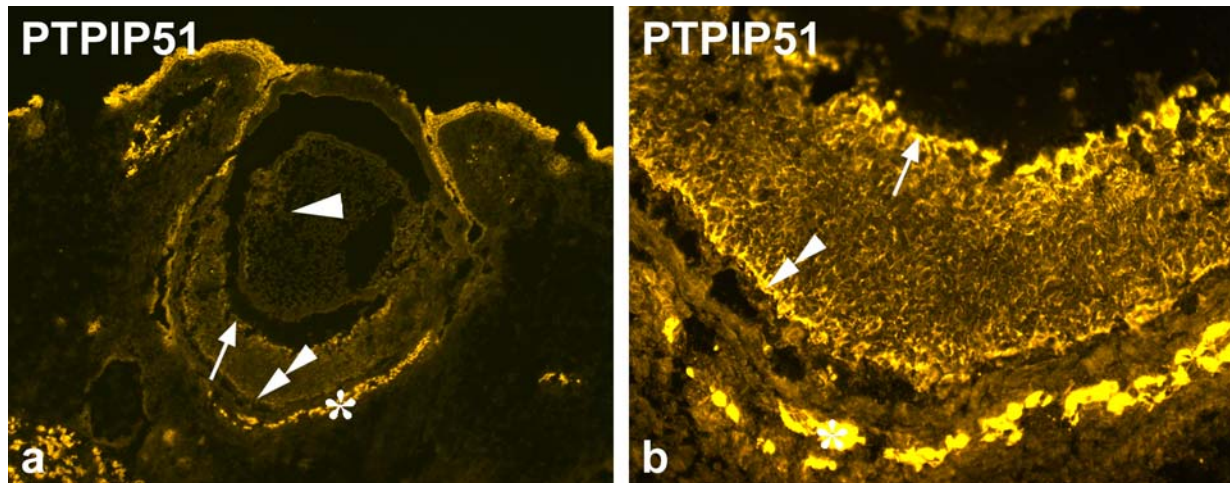


Abbildung 8: Auge 17. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina; Doppelpfeil: zukünftige Rezeptorzellschicht; Stern: Augenmuskel
- b Neuroretina (200fache Vergrößerung); Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina; Doppelpfeil: zukünftige Rezeptorzellschicht; Stern: Augenmuskel

3.3.7 Das Auge des Embryos 18. d.p.c.

Die 50fache Vergrößerung (Abb. 9a) zeigt einen Schnitt durch das Auge des 18 Tage alten Embryos. Am linken oberen Bildrand ist die stark reaktive Epidermis der verschlossenen Lider zu erkennen. Zwischen der Lidhaut und der Cornea liegt ein das PTPIP51 Antigen exprimierender Lidmuskel. Auf der Rückseite des Lides befindet sich die in ihren epithelialen Anteilen reagierende Conjunctiva. Die Cornea zeigt im Vergleich zu den vorherigen Stadien das gleiche positive Reaktionsmuster.

Die Linse zeigt lediglich im anterioren Linsenepithel einen reaktiven Saum. Das Linsenfaserepithel und die Linsenkapsel erscheinen areaktiv.

Die Retina zeigt das für sie typische Reaktionsmuster: das spätere Stratum ganglionare nervi optici und die darunter liegenden Anteile der inneren Neuroblastenschicht (gesamte Länge der Pfeils in Abb. 9b) sind PTPIP51 positiv. Bis auf die außen liegende reaktive, zukünftige Rezeptorzellschicht zeigen die übrigen Zellschichten der äußeren Neuroblastenschicht keine PTPIP51 Antigen Expression. Dies lässt die Schichtung der Neuroretina deutlicher hervortreten.

Choroidea und Sklera enthalten kein PTPIP51 Antigen. In die Sklera strahlen einzelne Augenmuskeln mit ihren Ansätzen ein (Abb. 9a und b). Die Augenmuskeln behalten die positive Reaktion der vorherigen Embryonalstadien bei.

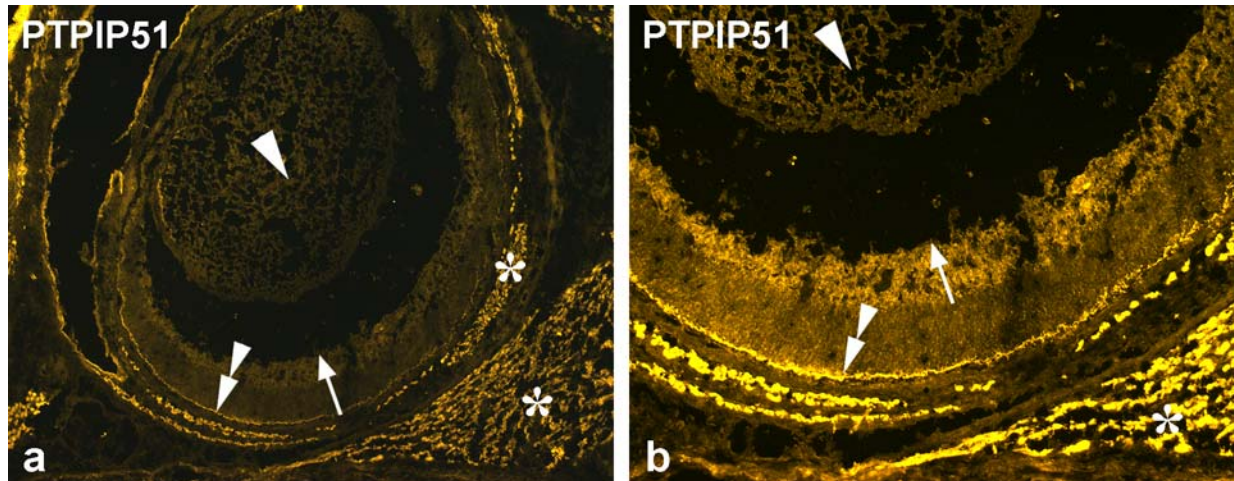


Abbildung 9: Auge 18. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina; Stern: Augenmuskeln
- b Linse und Retina (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht der Neuroretina, Ganglienzellschicht; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina; Stern: Augenmuskel

3.3.8 Auge 1. d.p.p.

Am ersten Tag der postnatalen Entwicklung zeigt sich in der Cornea keine Veränderung im Vergleich zum Vortag (ohne Abbildung). Auch die Linse zeigt im Vergleich mit dem Vortag die gleiche PTPIP51 Reaktionsverteilung: lediglich das anteriore Linsenepithel zeigt in seinem Verlauf eine Expression des untersuchten Proteins (ohne Abbildung). Die Retina erscheint im Vergleich zum Vortag stärker strukturiert. Es lässt sich erstmals deutlich die Ganglienzellschicht des N. opticus, in der sich einzelne stark PTPIP51 reaktive Zellen zeigen (Abb. 10a, b), ausmachen. Die unter der Ganglienzellschicht liegende zukünftige innere plexiforme Schicht ist ebenfalls hochreaktiv. Es folgt ein Saum wenig reaktiver Zellen, der der inneren Körnerschicht beim adulten Tier entspricht. Hieran schließt sich die zukünftige äußere plexiforme Schicht an, die ebenfalls starke Reaktionen mit dem Antikörper gegen das Protein zeigt. Die äußere plexiforme Schicht besteht aus drei Abschnitten:

1. die Außenzone besteht vornehmlich aus Axonen von Stäbchen und Zapfen,

2. die Mittelzone: diese beinhaltet die Endköpfe der Stäbchen und Endkolben der Zapfen,
3. die Innenzone, diese wiederum setzt sich aus den Fortsätzen der Bipolar- und Horizontalzellen der Retina zusammen.

Die äußere Körnerschicht zeigt nur spärliche Reaktionen. Gegenüber dem wenig reaktiven Pigmentepithel liegt die sich entwickelnde Rezeptorzellschicht, die ebenfalls starke Reaktionen zeigt. Die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Innensegmente der Rezeptorzellen zeigen zu diesem Zeitpunkt einen deutlichen Differenzierungsfortschritt.

In dem unter den Rezeptorzellen lokalisierten Pigmentepithel lassen sich vereinzelt PTPIP51 positive Zellen nachweisen. Die der Bruch-Membran folgende Sklera zeigt keinerlei Reaktionen. Am unteren Bildrand (Abb. 10a) erkennt man einen stark reagierenden Augenmuskel, der von links bis etwa in die Bildmitte verläuft.

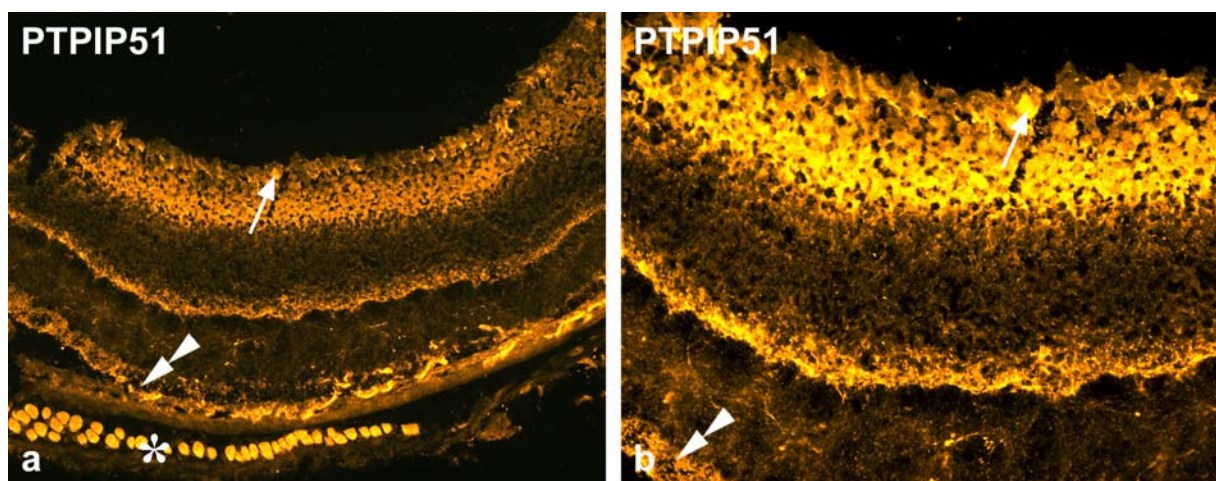


Abbildung 10: Auge 1. d.p.p.

- a Übersicht (100 fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzelle, zukünftige innere plexiforme Schicht der Retina; doppelte Pfeilspitze: zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina; Stern: Augenmuskel
- b Retina (200fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzelle, zukünftige innere plexiforme Schicht der Retina; doppelte Pfeilspitze: zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.9 Auge 7. d.p.p.

Abbildung 11a zeigt die Cornea zum 7. Tag der postnatalen Entwicklung. Es fällt das stark reaktive corneale Epithel auf, welches aus drei bis vier Lagen aufgebaut ist (siehe DAPI Färbung Abb. 11b). Das aus Kollagenfibrillen, Proteoglykanen, Wasser und Keratocyten zusammengesetzte Stroma der Cornea zeigt vor allem innerhalb der

Keratocyten eine Reaktion. Auch das der Descemet-Membran aufsitzende Endothel der Cornea (Pfeilspitze Abb. 11a, b) ist PTPIP51 reaktiv.

Die Retina zeigt im Vergleich zum ersten Tag der postnatalen Entwicklung keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 11c, d). Mit der endgültigen Entwicklung aller 10 Schichten weist die Retina nun strukturell alle Merkmale der adulten Retina auf. Die einzelnen Zellschichten sind jetzt durch ein größeres Zellreichtum gekennzeichnet. In den folgenden Stadien kommt es insbesondere durch apoptotische Prozesse zu einem Remodeling der Retina. Die Photorezeptoren sind noch nicht vollständig entwickelt und lassen sich nur elektronenmikroskopisch nachweisen.

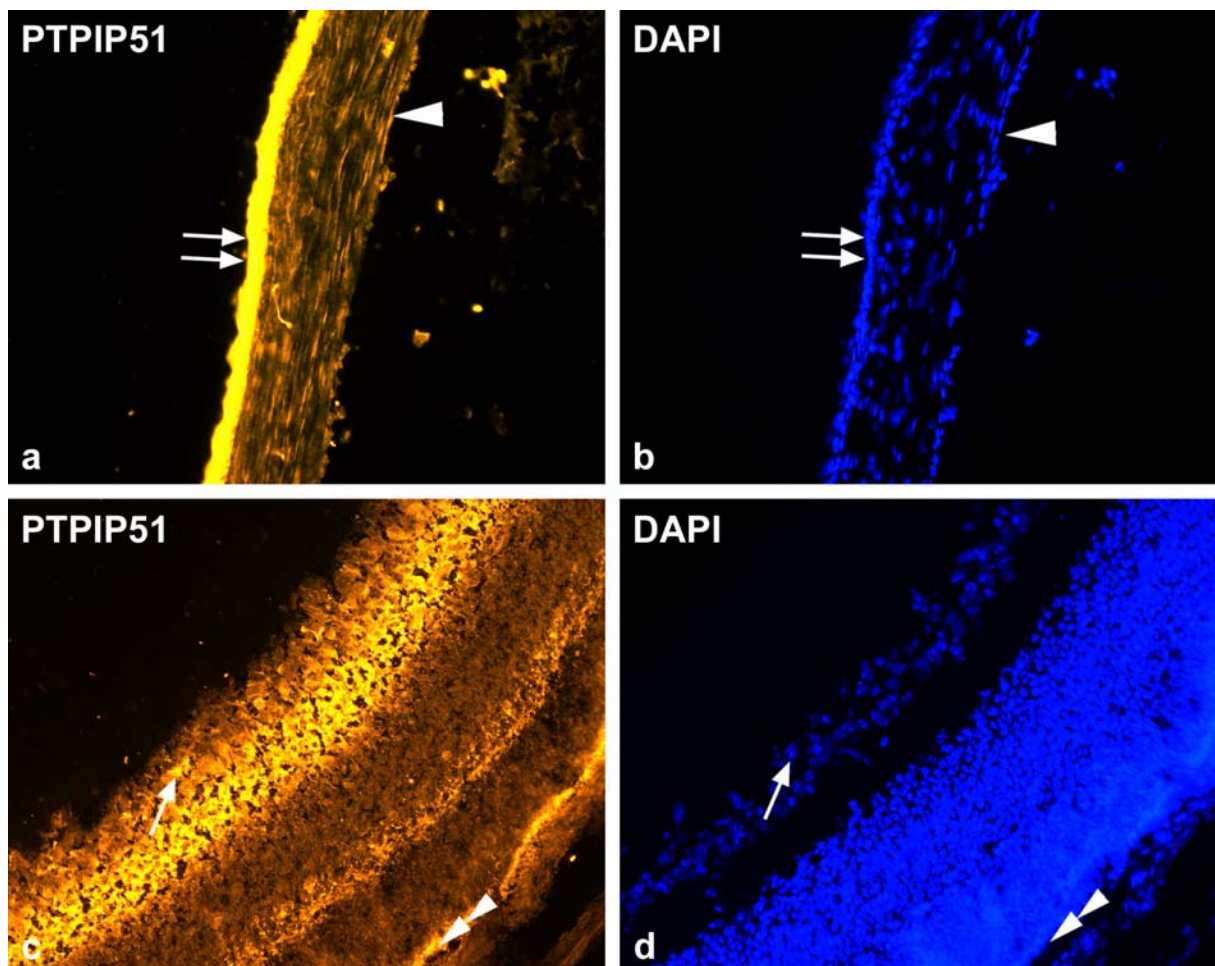


Abbildung 11: Auge 7. d.p.p.

- a Cornea (200fache Vergrößerung); Doppelpfeil: corneales Epithel; Pfeilspitze: zukünftiges Endothel
- b Cornea DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Doppelpfeil: corneales Epithel; Pfeilspitze: zukünftiges Endothel
- c Neuroretina (200fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzelle, innere plexiforme Schicht der Retina; doppelte Pfeilspitze: zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

- d Übersicht DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzelle, innere plexifome Schicht der Retina; doppelte Pfeilspitze: zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.10 Auge 14. d.p.p.

Beim cornealen Epithel (Abb. 12a) hat die Zahl der Zelllagen im Vergleich zum 7. d.p.p. zugenommen. Mit dem Öffnen der Lider ist die ausdifferenzierte Konfiguration erreicht worden. Die positive Reaktion lässt sich besser den einzelnen Epithelschichten zuordnen. In der basalen Epithelschicht fallen starke Reaktionen auf, wobei der Nucleus areaktiv ist. Die Reaktionen nehmen zu den apikalen Zelllagen hin zu. Es erscheint eine vollständig reaktive oberste Zelllage. Auch die der Cornea gegenüberliegende Conjunctiva zeigt eine starke Expression des PTPIP51 Antigens.

Der am rechten Bildrand vertikal getroffene, im Lid liegende M. orbicularis oculi zeigt eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper.

Auf der Abbildung 12b erscheint die Retina gewunden. Dabei handelt es sich um einen Schnittartefakt. Hierdurch wird deutlich, dass weiterhin ein kapillärer Spalt zwischen der Rezeptorschicht der Retina und dem Pigmentepithel besteht.

Die Menge an PTPIP51 in der Ganglienzellschicht der Retina ist im Vergleich zu den Vortagen konstant geblieben. Es fallen weiterhin einzelne, stark reaktive Ganglienzellen auf (Pfeil, Abb. 12b). Auch im Aufbau kam es zu keinen Veränderungen: die innere und äußere plexiforme Schicht der Retina exprimiert weiterhin das PTPIP51 Antigen. Die innere und äußere Körnerschicht der Retina zeigen keine Reaktion. Die Rezeptorschicht der Retina zeigt eine im Vergleich etwas kräftigere, weiterhin bandförmige Reaktion. Die Stäbchen und Zapfen haben seit zwei Tagen ihre Tätigkeit aufgenommen.

Die folgenden post partalen Entwicklungsprozesse führen zu weiteren Remodelingprozessen innerhalb der Retina.

Im Pigmentepithel lassen sich vereinzelt PTPIP51 positive Reaktionen nachweisen.

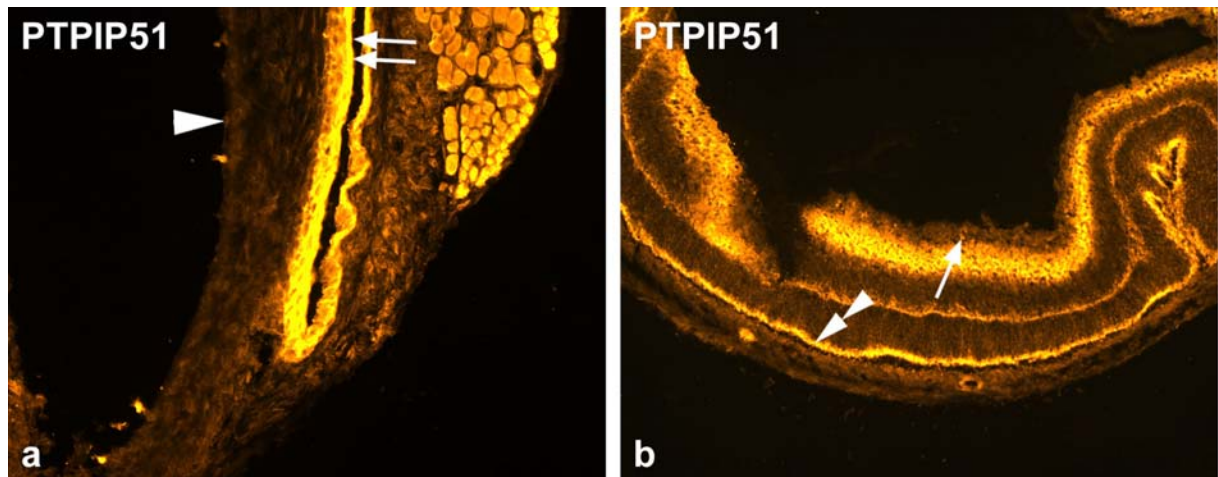


Abbildung 12: Auge 14. d.p.p.

- a Cornea (200 fache Vergrößerung); Doppelpfeil: corneales Epithel; Pfeilspitze: zukünftiges Endothel
- b Retina (100fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzelle; doppelte Pfeilspitze: Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.11 Auge 21. d.p.p.

Am 21. postnatalen Tag sind die retinalen Remodelingprozesse abgeschlossen. Die Retina gleicht der des erwachsenen Tieres.

Die Ganglienzellen des N. opticus behalten ihre starke Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper bei. Gleiches gilt für die innere plexiforme Schicht, die ebenfalls das Antigen exprimiert. Innerhalb der folgenden Schichten ist es zu einer Veränderung gekommen: die äußere plexiforme Schicht erscheint nicht mehr als stark positiv reagierendes Band, sie enthält kein PTPIP51 mehr. Die immer areaktiven Körnerschichten verbleiben PTPIP51 negativ.

Die Rezeptorzellschicht wiederum zeigt sich deutlich reaktiv. Auch das sich anschließende Pigmentepithel weist positiv reagierende Zellen auf. Es fallen vor allem im Cytosol gelegene PTPIP51 reaktive Areale auf; der Zellkern bleibt ausgespart.

Am linken unteren Bildrand ist ein Augenmuskel angeschnitten, der wie in den vorherigen Stadien eine starke Reaktion zeigt.

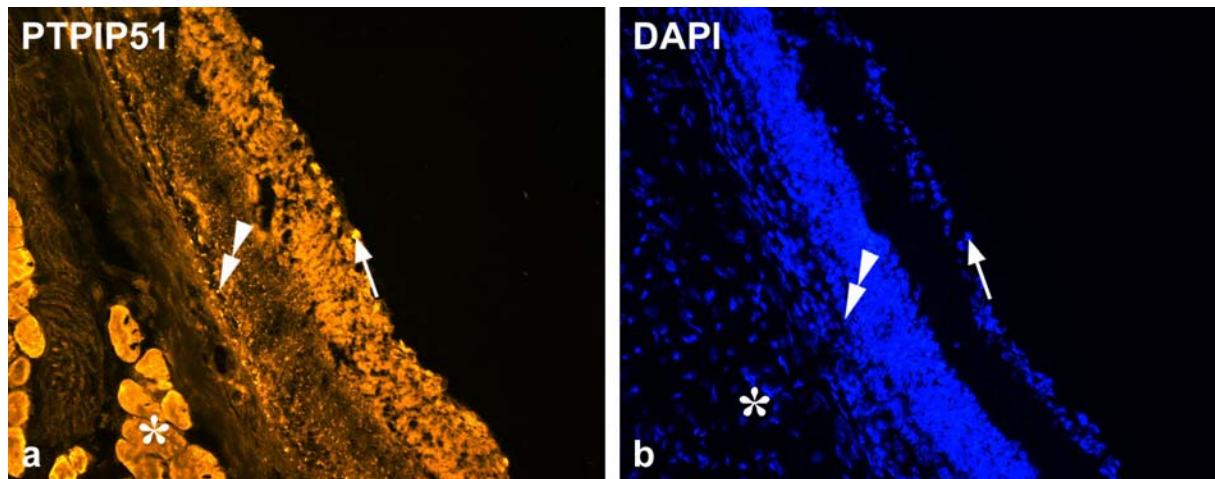


Abbildung 13: Auge 21. d.p.p.

- a Retina (200 fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzelle; doppelte Pfeilspitze: Rezeptorschicht der Neuroretina
- b Retina DAPI Färbung(100fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzelle; doppelte Pfeilspitze: Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.12 Auge des adulten Tieres

Die Cornea des voll entwickelten Auges zeigt sowohl in den äußeren Epithelschichten, als auch in dem der Descemet-Membran anliegenden Endothel eine Reaktion mit dem gegen das PTPIP 51 gerichteten Antikörper. Dies gilt auch für die die Linse umschließende Kapsel und das darunter liegende anteriore Linsenepithel (Abb. 14a und b).

Bei der Retina findet sich im Vergleich zu den in Entwicklung begriffenen Stadien eine Umverteilung des Proteins. Die während der Entwicklungsstadien positive äußere Neuroblastenschicht, zeigt in den voll differenzierten Geweben beim Adulten nur spärliche Reaktionen, wohingegen die innere Neuroblastenschicht in Form der inneren plexiformen Schicht und der Ganglienzellschicht des Nervus opticus beim Erwachsenen weiterhin PTPIP 51 positiv verbleibt (Abb. 14c und d).

Die äußere Körnerschicht zeigt weiterhin keine PTPIP51 Antigen Expression. Sklera und Choroidea bleiben weiterhin areaktiv. Der Augenmuskel enthält wie in allen Entwicklungsstadien PTPIP51 (Abb. 3-14).

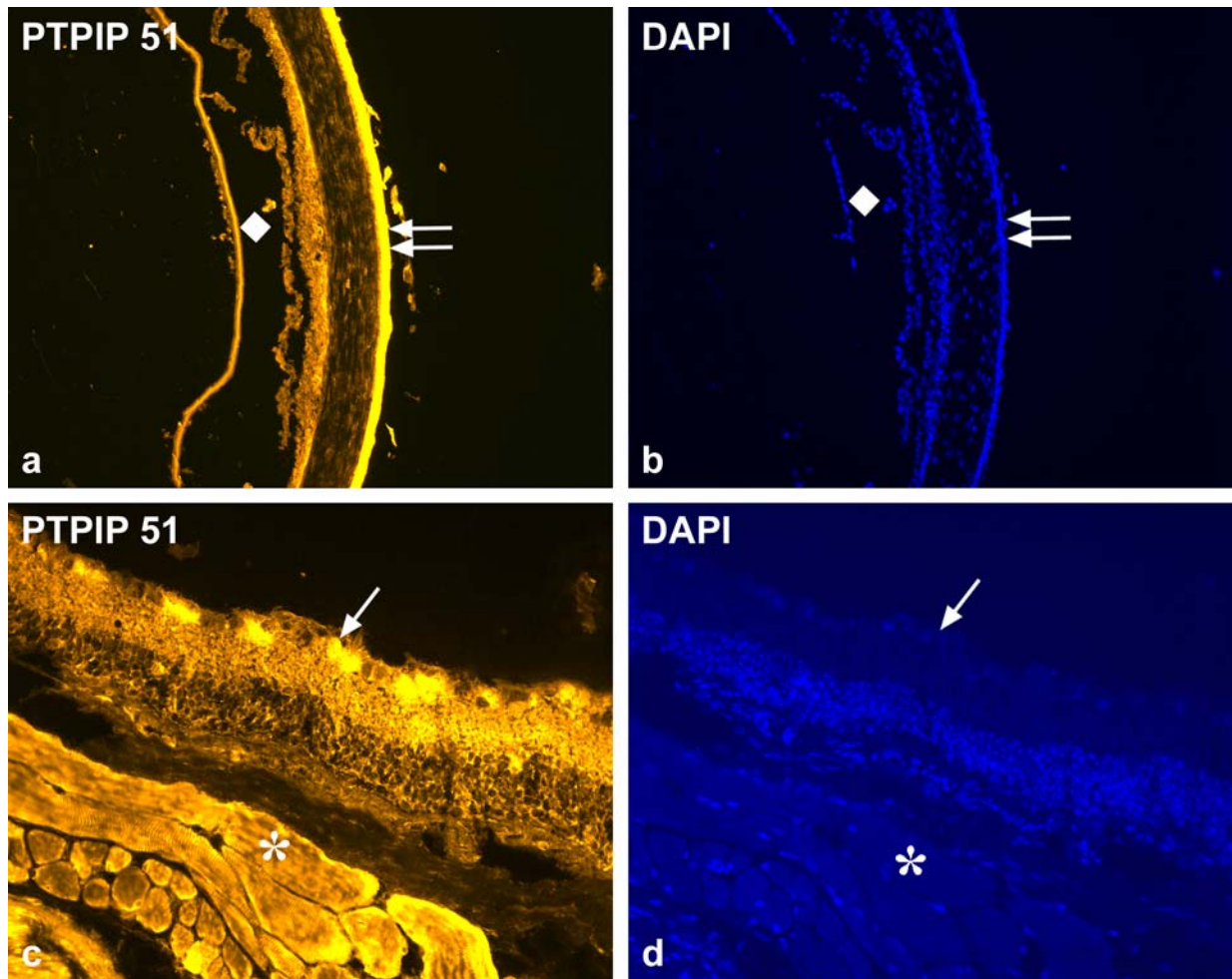


Abbildung 14: Auge adultes Tier

- a Cornea und Linsenkapsel (100fache Vergrößerung); Doppelpfeil: corneales Epithel; Raute: Linsenkapsel mit anteriorem Linsenepithel
- b Cornea und Linsenkapsel DAPI Färbung (100fache Vergrößerung); Doppelpfeil: corneales Epithel; Raute: Linsenkapsel mit anteriorem Linsenepithel
- c Retina (200fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzellschicht des Nervus opticus; Stern: Augenmuskel
- d Retina DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Pfeil: Ganglienzellschicht des Nervus opticus; Stern: Augenmuskel

3.3.13 TUNEL-Assay der post partalen Augenentwicklung

TUNEL Assays wurden zum 1., 7., 14. und 21. d.p.p. durchgeführt.

Hier wird beispielhaft der 14. d.p.p. gezeigt. Die Lokalisation des PTPIP51 entspricht der oben genannten Beschreibung. Bei der Überlagerung mit dem TUNEL Assay zeigen sich lediglich punktuelle Kolo-kalisation mit PTPIP51.

Es fallen deutliche Reaktionen mit apoptotischen Zellen in der inneren und äußeren Körnerschicht auf. In der Ganglienzellschicht und der äußeren plexiformen Schicht

zeigen sich lediglich vereinzelte apoptotische Zellen. Die innere plexiforme Schicht, die stark das PTPIP51 Antigen exprimiert, zeigt nur wenig apoptotische Zellen.

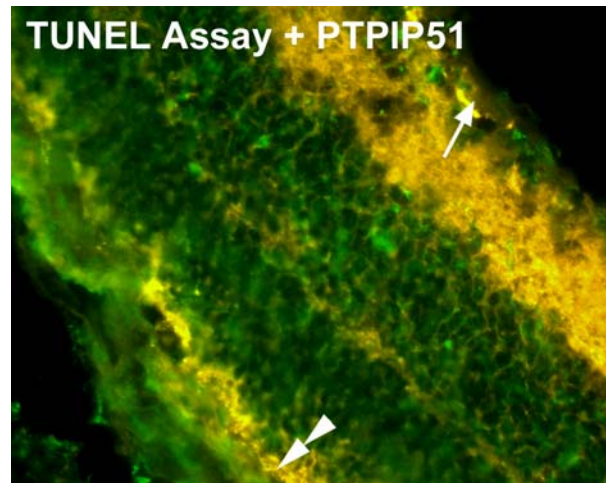


Abbildung 15: TUNEL Assay 14. d.p.p.

Pfeil: Ganglienzelle; doppelte Pfeilspitze: Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.14 Synaptophysin Kolokalisation

Bei der Doppelfärbung mit Synaptophysin am 14. d.p.p. zeigt sich eine deutliche Kolokalisation mit PTPIP51 in der äußeren plexiformen Schicht der Neuroretina. In anderen Schichten der Neuroretina finden sich nur punktuell Kolokalisationen. Die sonstige Immunreaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper entspricht der oben genannten.

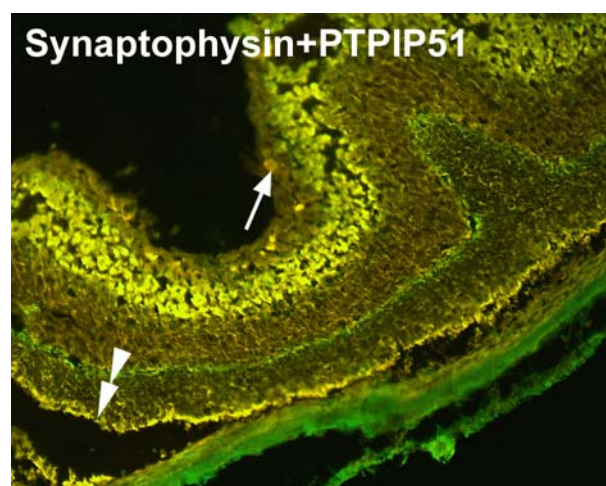


Abbildung 16: Kolokalisation von PTPIP51 und Synaptophysin 14. d.p.p.

Pfeil: Ganglienzelle; doppelte Pfeilspitze: Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.15 Calbindin Kolokalisation

Bei Kolokalisationsstudien mit PTPIP51 und einem gegen Calbindin gerichteten Antikörper zeigte sich eine Doppellokalisierung im Bereich der retinalen Ganglienzellschicht.

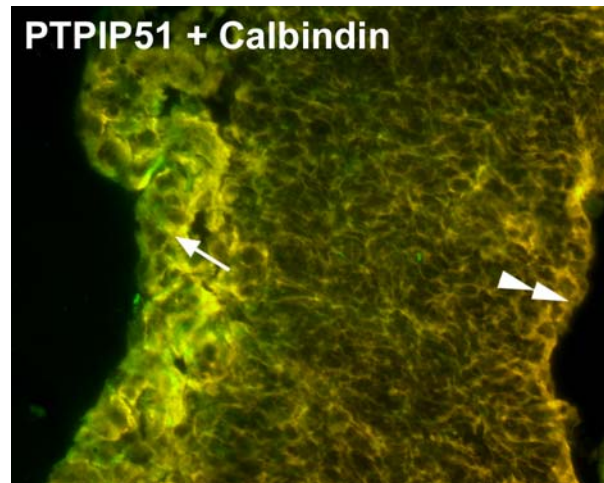


Abbildung 17: Kolokalisation von PTPIP51 und Calbindin 14. d.p.p.
Pfeil: Ganglienzelle; doppelte Pfeilspitze: Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.16 In situ Hybridisierung des 14. - und 15. d.p.c.

Das Vorkommen von PTPIP51 im embryonalen Auge konnte durch in situ Hybridisierungsexperimente verifiziert werden. Schnitte des Mausembryos am 14. d.p.c. (Abb. 18a) zeigen eine Expression der mRNA in der Epidermis der Lidanlagen, dem Epithel der zukünftigen Conjunctiva sowie dem cornealen Epithel. Das corneale Stroma zeigt eine spärliche PTPIP51 Expression. Der gesamte Linsenquerschnitt zeigt eine starke Reaktion. Auf der Rückseite der Cornea folgt das Endothel, das ebenfalls eine deutliche Reaktion erkennen lässt.

Die Linse zeigt insgesamt eine kräftige Expression des Proteins. Sowohl das anteriore Linsenepithel, als auch die Linsenfaserepithelzellen exprimieren deutlich die mRNA des Proteins. Auch die primären Linsenfasern exprimieren ebenfalls die PTPIP51 mRNA.

Gleiches gilt für die zukünftigen Ganglienzellen sowie einige darunter liegende Zelllagen, die aus der inneren Neuroblastenzellschicht hervorgehen, sie enthalten ebenfalls das Protein. Ebenso finden sich einzelne aktiv mRNA exprimierende Zellen in den dazwischen liegenden Schichten der inneren und äußeren Neuroblastenzellschicht.

Die zukünftige Rezeptorzellschicht zeigt an ihrem dem Pigmentepithel gegenüberliegenden Anteil eine deutliche Proteinexpression.

Die überaus starke Reaktion des Pigmentepithels ist nicht als Proteinexpression zu verstehen. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine Kreuzreaktion der nachweisenden Reagenzien mit dem in den Pigmentepithelzellen enthaltenem Melanin. Dies gilt ebenfalls für die Darstellung der mRNA Expression des Folgetages.

Auch für den 15. d.p.c. (Abb. 18b) ist eine deutliche Expression der mRNA von PTPIP51 in der Epidermis der Augenlidanlagen zu erkennen. Ebenso exprimiert das Epithel der Conjunctiva auf der Rückseite der Lider PTPIP51.

Die Cornea zeigt im Wesentlichen die gleichen Expressionsmuster wie am Vortag.

In der Linse beschränkt sich die mRNA nun allerdings auf das anteriore Linsenepithel und die direkt am Äquator liegenden Anteile des Epithels. Hierbei handelt es sich um die Zellen, die die Stammzellen für das Linsenfaserepithel darstellen.

Die Expression in der Retina bleibt im Wesentlichen gleich konfiguriert.

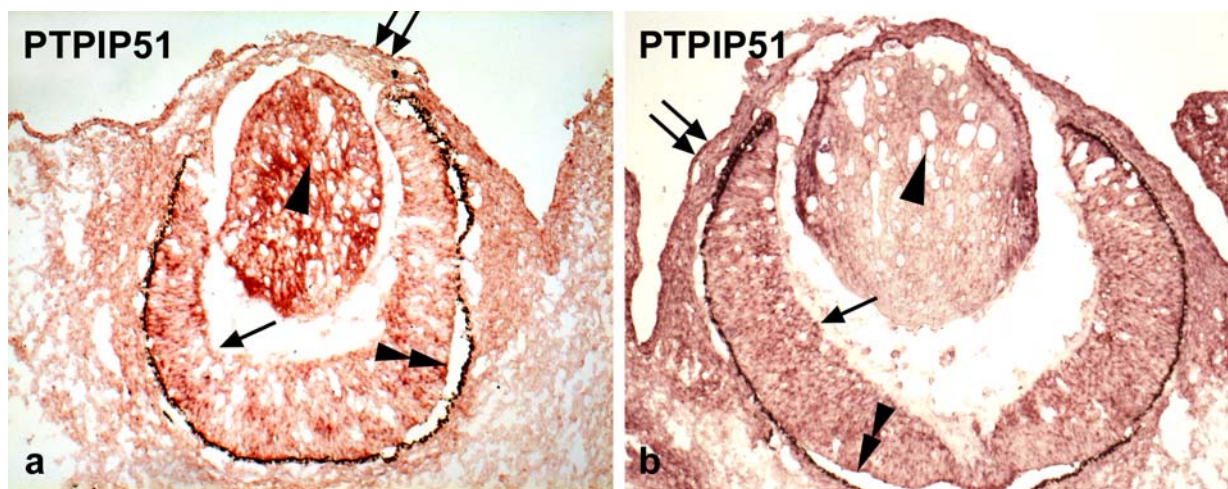


Abbildung 18: In situ Hybridisierung 14. und 15. d.p.c.

- a 14. d.p.c. Übersicht (100fache Vergrößerung); Doppelpfeil: Cornea; Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht der Neuroretina; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina;
- b 15. d.p.c. Übersicht (100fache Vergrößerung); Doppelpfeil: Conjunctiva; Pfeilspitze: Linse; Pfeil: innere Neuroblastenschicht, zukünftige Ganglienzellschicht der Neuroretina; doppelte Pfeilspitze: äußere Neuroblastenschicht, zukünftige Rezeptorschicht der Neuroretina

3.3.17 Western blotting von Extrakten postpartaler Augen

Da wie bereits geschildert die Augenentwicklung nicht vor dem 21. d.p.p. abgeschlossen ist, wurde die Expression von PTPIP 51 zusätzlich während der postnatalen Augenentwicklung mittels Immunoblotting untersucht (Abb. 19).

Zwischen dem ersten und 21. d.p.p. konnte eine Bande mit ~52 kDa nachgewiesen werden. Eine weitere Bande mit ~45 kDa war ab 7. d.p.p. nachweisbar (Abb. 19a).

Zur Validierung der Ergebnisse wurde auch hier nach dem Membran-Stripping ein Nachweis von Histidin-reichen Proteinen durch anti-RGS-His6-Antikörper durchgeführt (Abb. 19b). Wie bereits beim Blotting der pränatalen Stadien war auch hier keine Übereinstimmung mit den durch den PTPIP51 Antikörper detektierten Banden nachzuweisen. Als Housekeeping Protein wurde ebenfalls Tubulin nachgewiesen (Abb. 19c).

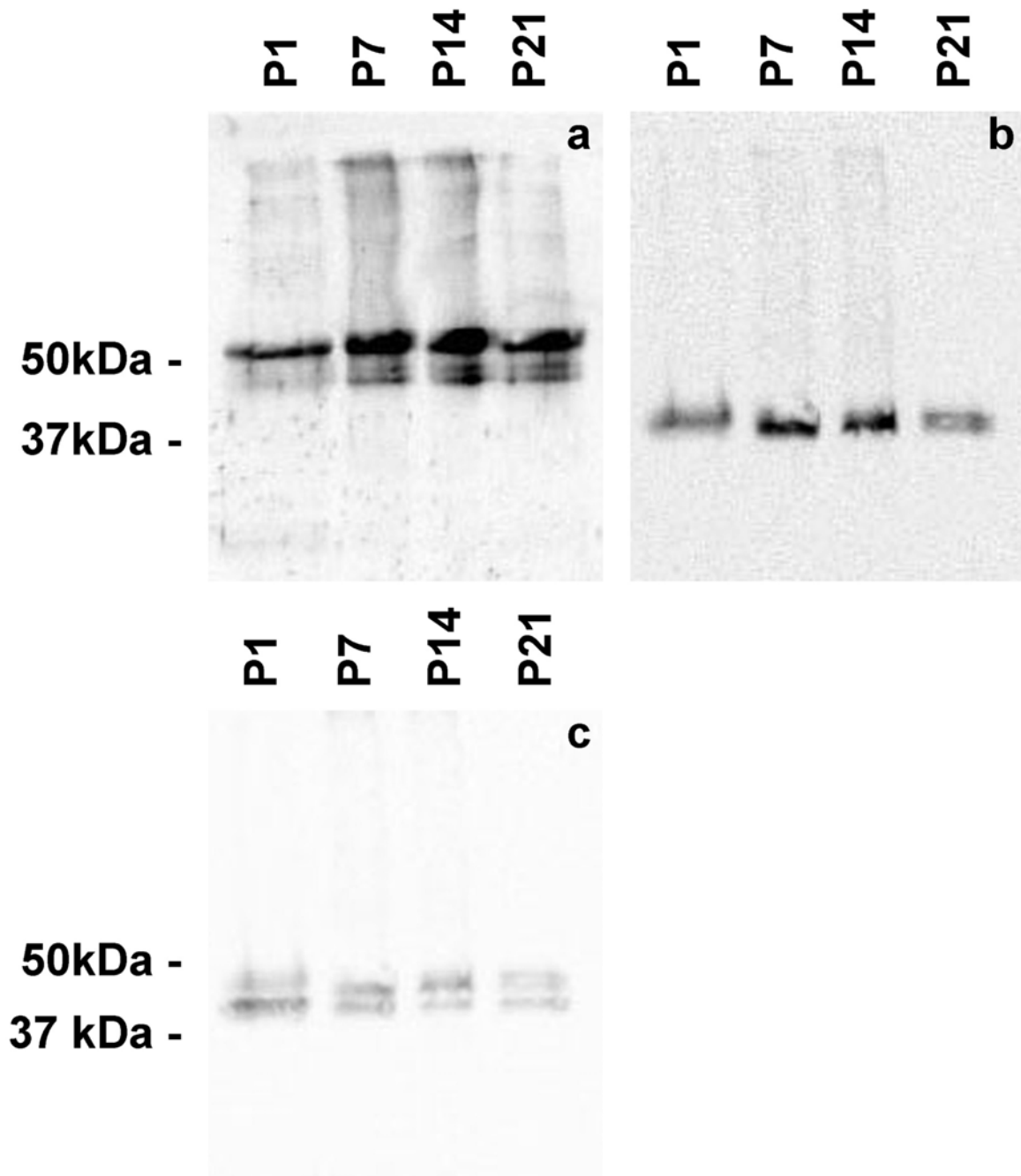


Abbildung 19: Western blotting von Extrakten postpartaler Augen

- a anti-PTPIP51-Antikörper
- b anti-RGS-His6-Antikörper
- c anti-y-Tubulin-Antikörper

3.4 Entwicklung der Plexus choroidei

Die vier Plexus choroidei, die in den Ventrikeln des Zentralnervensystems den Liquor produzieren, bilden sich aus zwei verschiedenen Keimblättern des Mausembryos. Die

im Liquor liegenden, epithelialen Anteile eines jeden Plexus choroideus entstammen dem Neural epithel des Neuralrohres. Die darunter liegenden mesenchymalen Anteile gehen aus dem paraxialen cranialen Mesoderm, das vornehmlich die Pia mater bildet, hervor. Die Entwicklung beginnt im vierten Ventrikel zwischen dem 10. bis 10,5 Tag der Mausentwicklung [Reid, 2003]. Die Plexus in den beiden lateralen Ventrikeln entstehen, kurz gefolgt vom Plexus choroideus des dritten Ventrikels, um den 11. d.p.c.

Das dünne Dach des vierten Ventrikels ist eng mit der gefäßreichen Pia mater verbunden. An dieser Stelle entsteht die Anlage des Plexus choroideus aus dem reich vaskularisierten Bindegewebe der Pia mater, der sogenannten Tela choroidea, und dem Ependym des Ventrikeldaches. Hierbei fällt auf, dass die Plexus, im Gegensatz zum sich entwickelnden Hirn, schon früh durch eine hohe Vaskularisierung gekennzeichnet sind. Die Plexgefäße unterliegen einer starken Proliferation, so dass sich die Tela choroidea mehr und mehr zottenartig in den vierten Ventrikel einstülpt und schließlich mit dem, dem Ependym entstammendem Epithel, den eigentlichen Plexus choroideus bildet. Dieser Vorgang findet auf gleiche Weise in den anderen Ventrikeln statt.

Aufgabe der Plexus choroidei ist die Produktion des Liquor cerebrospinalis. Das dichte Kapillarnetz der Plexus, auf dessen Außenseite das Plexusepithel liegt, erhöht durch seine Schlingen die sekretorisch aktive Oberfläche beträchtlich und ist durch einen besonderen Aufbau gekennzeichnet. Im Kapillarnetz lassen sich weite Poren nachweisen, diese ermöglichen in Kombination mit der Semipermeabilität der Kapillarmembran einen Stoffaustausch zwischen Plasma und Liquor entlang eines Konzentrationsgradienten. Die Konzentration der im Liquor gelösten Stoffe wird hierbei maßgeblich vom Plexusepithel bestimmt, das die Kapillarnetze umgibt.

Das Plexusepithel ist durch Tight junctions gekennzeichnet und bildet somit die eigentliche Blut-Liquorschranke. Es enthält reichlich Na^+/K^+ -ATPasen, durch welche ein osmotischer Gradient für bestimmte Substanzen in Richtung Ventrikellumen aufrechterhalten werden kann. Auf der luminalen Oberfläche ist es durch einen reichen Mikrovillibesatz und Kinocilien gekennzeichnet, welche zusätzlich die sekretorisch aktive Oberfläche stark vergrößern. Der produzierte Liquor fließt durch das Ventrikelsystem und wird in den Pacchioninischen Granulationen resorbiert und dem venösen Schenkel des Blutsystems zugeführt.

Besonders auffällig ist die Tatsache, dass die Plexus schon früh ultrastrukturell und morphologisch denen des adulten Tieres gleichen, dies gilt insbesondere für die Ausbildung von tight junctions [Reid et al. 2000, Catala 1998, Dziegielewska et al. 2000] und die Enzymausstattung, welche sich vor allem für die Sekretion des Liquor cerebrospinalis verantwortlich zeigt [Catala, 1997]. Man nimmt daher an, dass die Plexus einen wichtigen Beitrag zur Hirnentwicklung leisten, da sie aktiv an der Bereitstellung von Nährstoffen und der Homöostase des Liquors beteiligt sind.

3.4.1 Plexus choroideus Embryo 12. d.p.c.

Die 200fache Vergrößerung in Abb. 20 zeigt eine Übersicht über den sich entwickelnden Plexus choroideus am Dach des vierten Ventrikels. Man kann deutlich erkennen, wie das Plexusepithel durch die unter ihm liegenden Kapillarschlingen der Tela choroidea in den Ventrikel vorgestülpt wird. Das gesamte Plexusepithel zeigt starke Reaktionen mit gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Es fallen sowohl am basalen Pol, als auch am apikalen Pol einzelne hochreaktive Granula auf.

In der DAPI Zellkernfärbung (Abb. 20b) kann man deutlich das Plexusepithel ausmachen, das sich zottenartig in den Ventrikel vorwölbt. Siehe auch Abb. 20c, d (400fache Vergrößerung) hier fallen die einzelnen PTPIP51 positiven Granula noch deutlicher auf.

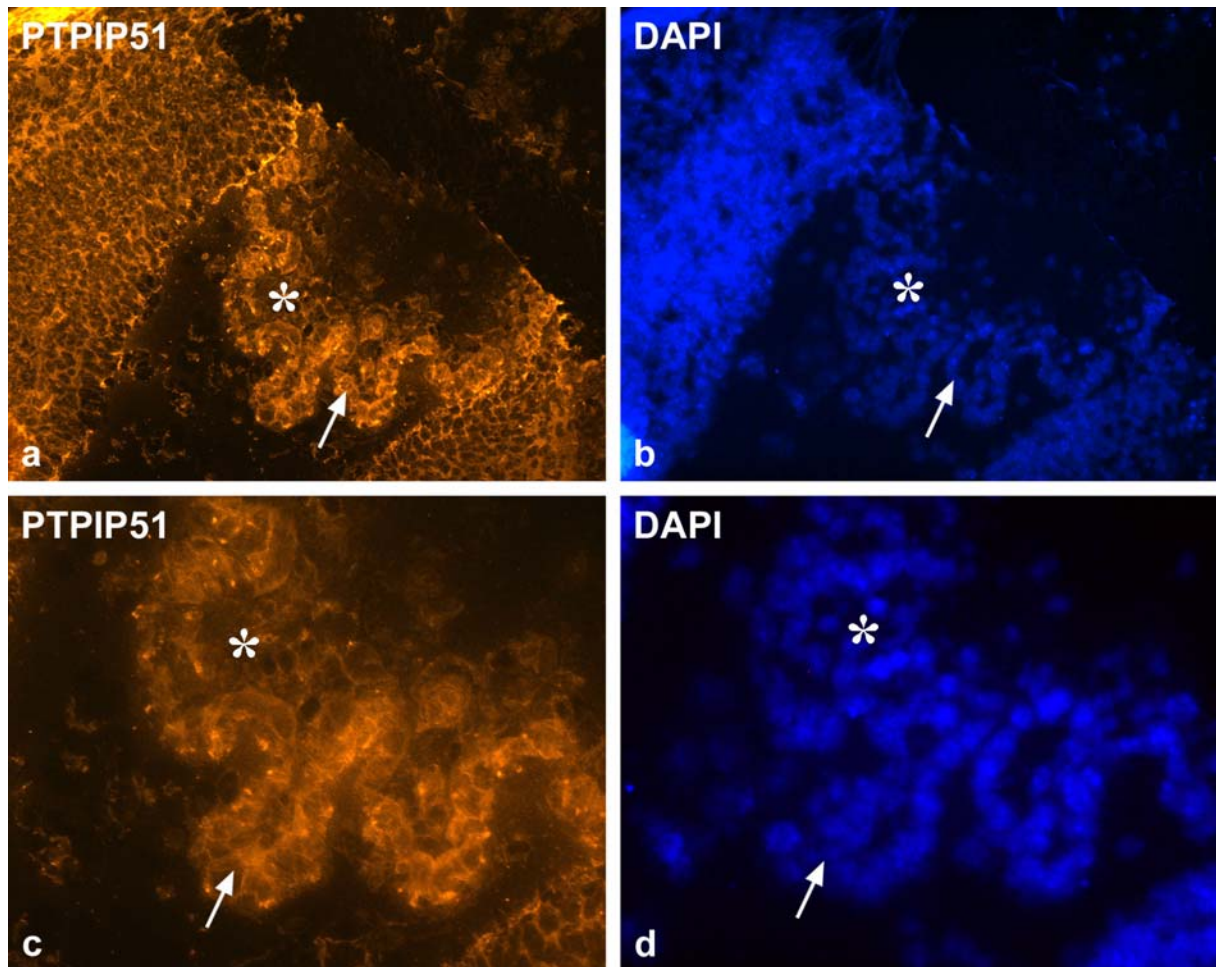


Abbildung 20: Plexus choroideus 12. d.p.c.

- a Plexus Choroideus (200 fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- b Plexus choroideus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- c Plexus choroideus (400fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- d Plexus choroideus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

3.4.2 Plexus choroideus Embryo 13. d.p.c.

Bei 100facher Vergrößerung blickt man auf Abbildung 21a auf den Plexus choroideus am Dach des vierten Ventrikels. Man kann deutlich die das Plexusepithel vorstülpenden Kapillarschlingen erkennen. Hierbei erscheint das gesamte Plexusepithel PTPIP51 positiv und weist einzelne deutlich fluoreszierende Granula auf. Die innen liegenden Kapillaren zeigen keine Reaktion. Das der gesamten Hirnsubstanz außen aufliegende Ependym sowie einzelne Hirnstrukturen zeigen ebenfalls positive Reaktionen mit dem Antikörper.

Der Vergleich der PTPIP51 Reaktion mit der DAPI-Färbung (Abb. 21d) zeigt, dass die stark PTPIP51 reaktiven Granula im Cytosol des Plexusepithels liegen.

Die 200fache Vergrößerung (siehe Abb. 21b) unterstreicht die bisherige Beschreibung. Die Granula innerhalb des Pigmentepithels sind regelmäßig am apikalen Zellpol zu erkennen und nur vereinzelt in den basalen Anteilen, die direkt dem Kapillarnetz aufliegen, lokalisiert. Weiterhin zeigt sich der größte Anteil der Zellkerne in der Immunreaktion mit dem PTPIP51 Antikörper als nicht reaktiv, da sie zum Teil deutlich ausgespart in den einzelnen Zellen des Plexusepithels hervortreten. Diese Aussparungen können mittels kernselektiver DAPI Färbung eindeutig als Zellkern identifiziert werden (Abb. 21d).

Die 400fache Vergrößerung in (Abb. 21c) lässt im Vergleich zum Vortag eine stärkere Reaktion im Plexusepithel ausmachen, wobei vor allem die apikalen Zellbereiche eine stärkere Reaktion zeigen.

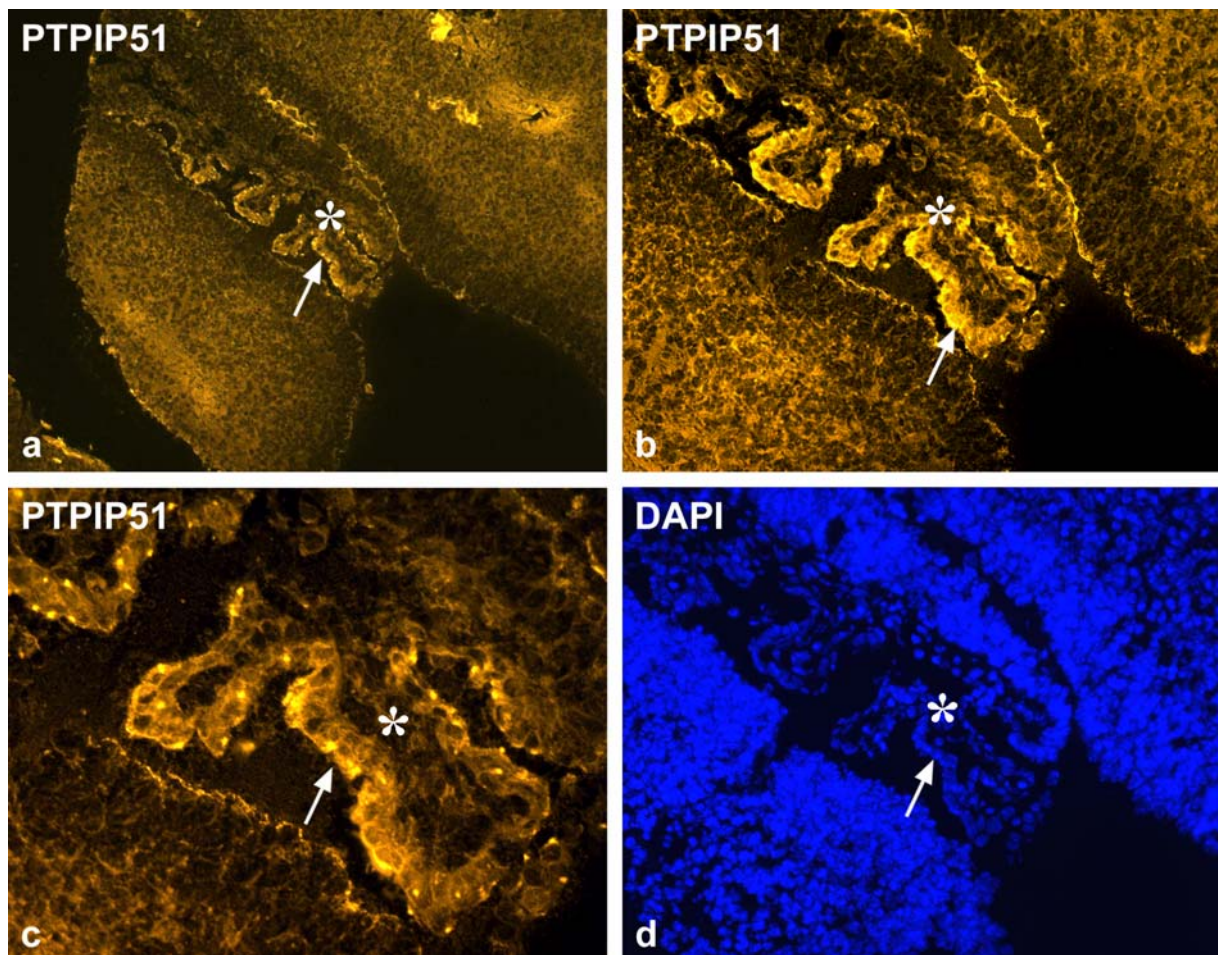


Abbildung 21: Plexus choroideus 13. d.p.c.

- a Übersicht (100 fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- b Plexus choroideus (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- c Plexus choroideus (400fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

- d Plexus choroideus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

3.4.3 Plexus choroideus Embryo 14. d.p.c.

Abbildung 22a (100fache Vergrößerung) zeigt erneut den Plexus choroideus am Dach des vierten Ventrikels.

Man erkennt deutlich eine PTPIP51 positive Reaktion des Ependyms, das dem Hirn direkt aufliegt, sowie des Plexusepithels. Der Plexus choroideus liegt, bedingt durch die Kapillarschlingen, zottenartig in den Ventrikel vorgestülpt. Weiterhin fallen sowohl im Bereich des Cortex als auch im Plexus selbst Areale auf, die ebenfalls eine PTPIP51 positive Reaktion zeigen.

Die 200-fache Vergrößerung (Abb. 22c) ermöglicht die Identifikation der kubischen Zellen des Plexusepithels, die durch den Antikörper gegen PTPIP51 markiert wurden. (Siehe auch Abb. 22 links oben: stark fluoreszierender Zellsaum).

Bei der Kernfärbung mit DAPI (Abb. 22d) entsteht der Eindruck eines Spaltes zwischen dem Kapillarnetz und dem Plexusepithel. Dieser ist jedoch nicht in Abb. 22c zu erkennen. Es handelt sich in diesen Bereichen um den PTPIP51 positiv reagierenden basalen Zellpol der Plexusepithelzellen, unter dessen Basalmembran die Kapillarschlingen liegen.

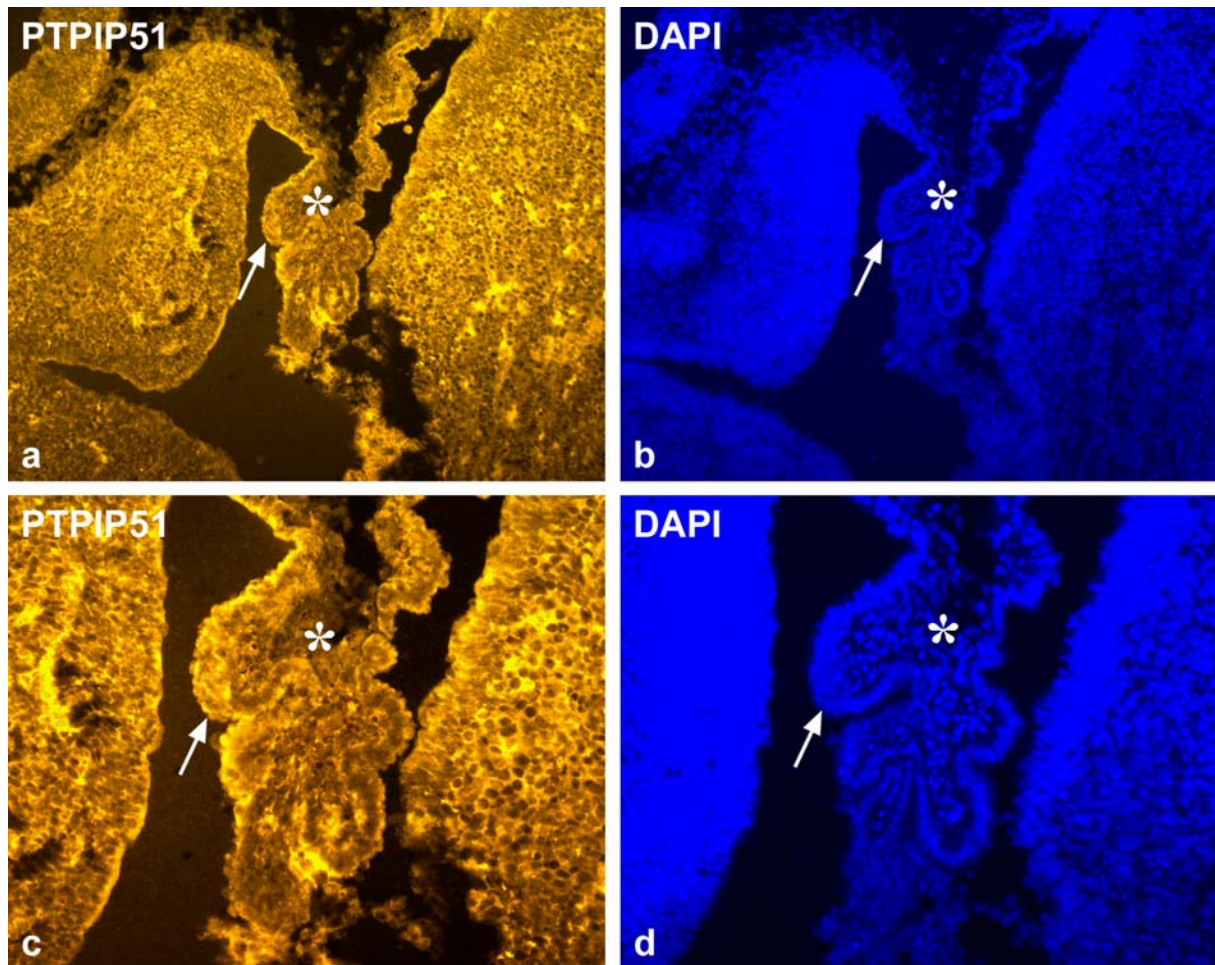


Abbildung 22: Plexus choroideus 14. d.p.c.

- a Plexus choroideus (100 fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- b Plexus choroideus DAPI Färbung (100fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- c Plexus choroideus (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- d Plexus choroideus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

3.4.4 Plexus choroideus Embryo 15. d.p.c.

Auch hier ist der Plexus choroideus des vierten Ventrikels im Querschnitt getroffen (Abb. 23a). Die Immunreaktionen mit dem Antikörper gegen PTPIP51 ähneln denen der vorangegangenen Tage der Embryonalentwicklung. Insgesamt erscheint das gesamte Ependym weniger reaktiv. Das Plexusepithel zeigt auf seiner, dem Kapillarnetz zugewandten Seite, einzelne positiv reagierende Bereiche, die am basalen Zellpol des Plexusepithels lokalisiert sind. Dieser reaktive Saum entspricht dem kernfreien Spalt in der Kernfärbung mit DAPI (nicht gezeigt), das heißt, bei den PTPIP51 reaktiven Bereichen handelt es sich eindeutig um das Cytosol am basalen Pol der Plexusepithelzellen, das der Basalmembran aufliegt. Die nächst höhere Vergrößerung

(Abb. 23b) bestätigt dies. Hier zeigt sich deutlich, dass das Ependym und die dem Liquor zugewandte Seite des Plexusepithels PTPIP51 reaktiv sind.

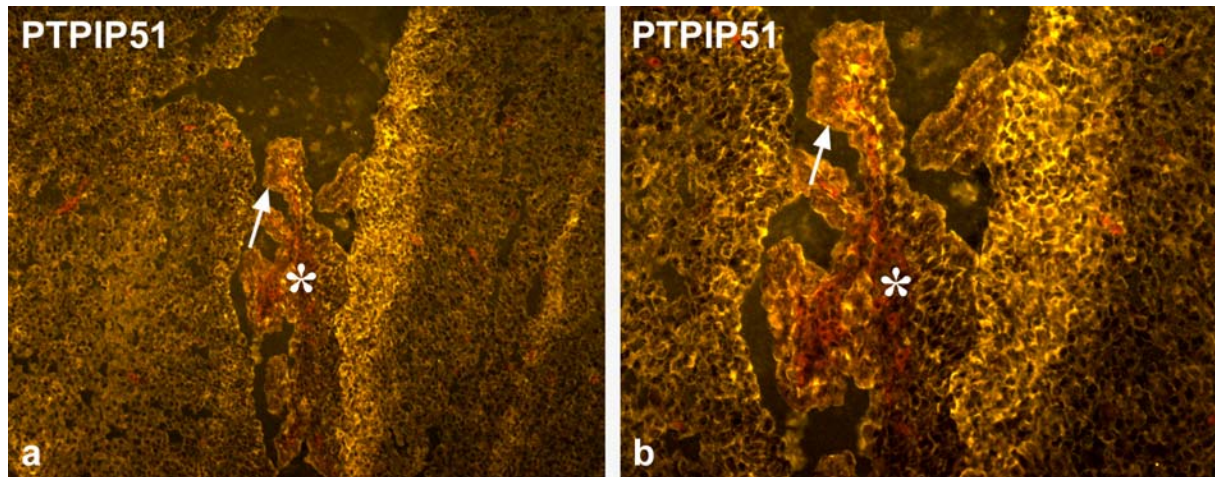


Abbildung 23: Plexus choroideus 15. d.p.c.

- a Plexus choroideus (100 fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
b Plexus choroideus (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

3.4.5 Plexus choroideus Embryo 16. d.p.c.

Abbildung 24a zeigt den Plexus choroideus des vierten Ventrikels in 100facher Vergrößerung. Hier zeigen sich positive Reaktionen mit dem PTPIP51 Antikörper auf der dem Ventrikellumen zugewandten Seite des Plexusepithels. Es fallen, wie schon bei den vorherigen Stadien, einzelne hochreaktive Granula auf, die ebenfalls auf der Außenseite des Plexusepithels und auf seiner Unterseite lokalisiert sind. Weiterhin fallen deutlich die Lumina des innen liegenden Kapillarnetzes mit dem PTPIP51 negativen Endothel ins Auge.

Die 200fache Vergrößerung (Abb. 24b) zeigt die gleiche Reaktionskonfiguration. Die Granula zeigen sich noch deutlicher. Ebenso fällt die Reaktion der in das Ventrikellumen ragenden Seite des Plexusepithels kräftiger aus.

Der Vergleich der Immunreaktion mit der DAPI Färbung (Abb. 24c) macht deutlich, dass die PTPIP51 positiven Areale nicht im Zellkern lokalisiert sind, sondern klar dem Cytosol und der Membran der Plexusepithelzellen zugeordnet werden können.

In der 400fachen Vergrößerung (Abb. 24d) fällt auf, dass die einzelnen PTPIP51 positiven Graunula vermehrt auf der dem Ventrikellumen zugewandten Seite lokalisiert sind.

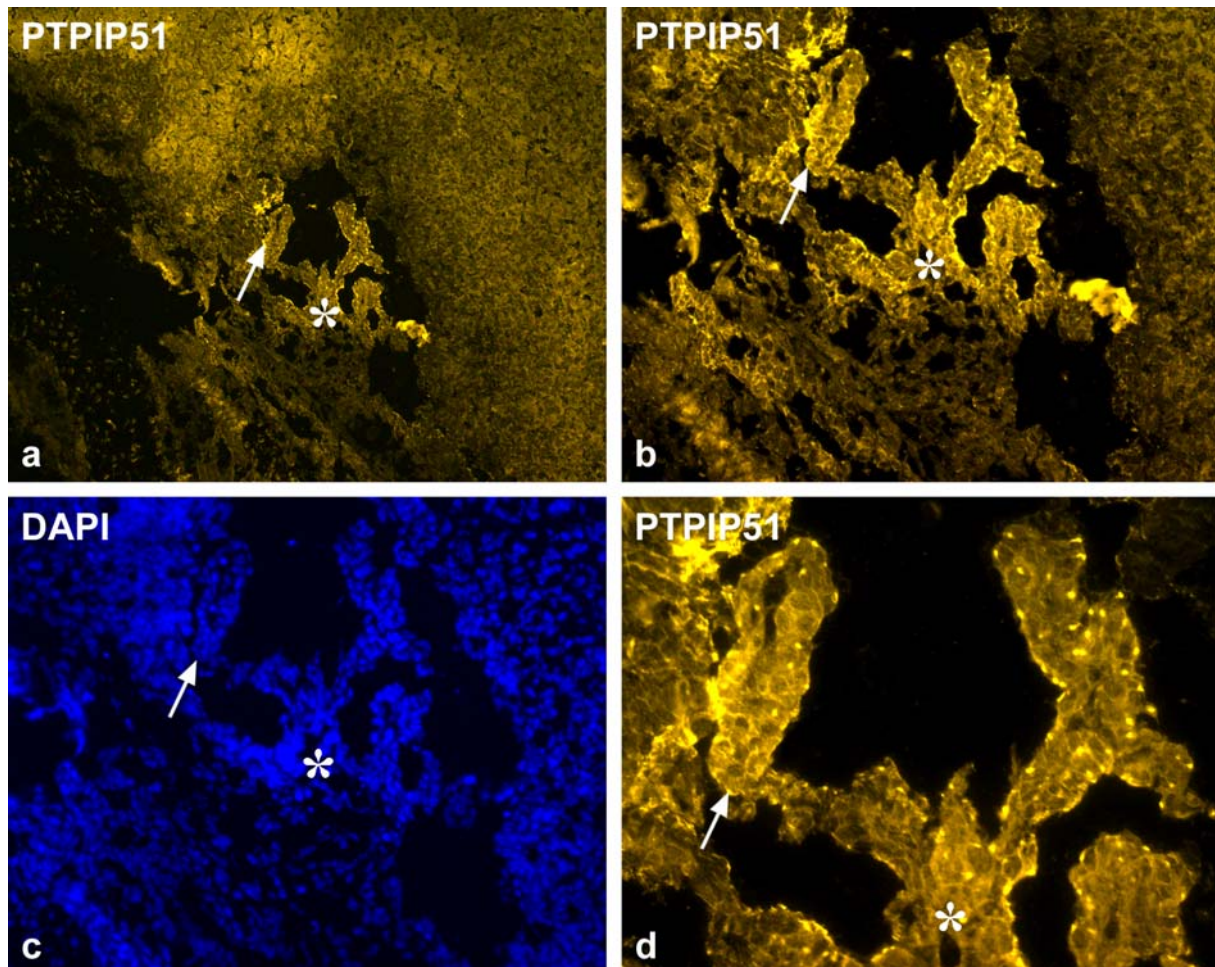


Abbildung 24: Plexus choroideus 16. d.p.c.

- a Plexus choroideus (100 fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- b Plexus choroideus (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- c Plexus choroideus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- d Plexus choroideus (400fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

3.4.6 Plexus choroideus Embryo 17. d.p.c.

Dieses Stadium ist durch eine deutliche Größenzunahme im Vergleich zu den vorhergehenden Embryonalstadien gekennzeichnet. Bereits bei 100facher Vergrößerung (Abb. 25a) fallen die Lumina des Plexus Kapillarnetzes auf. Das Plexusepithel zeigt auf seiner Außenseite eine eindeutig positive Reaktion mit den gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörpern. Einzelne Granula innerhalb des Epithels stechen mit besonders starken Reaktionen hervor.

Die Kernfärbung mit DAPI (Abb. 25b) zeigt im Vergleich zur PTPIP51 Reaktion nur wenige Unterschiede, auch hier fallen die Lumina der Kapillaren auf. Die einzelnen

Granula entsprechen nicht den Zellkernen, so dass sie wahrscheinlich den Basalkörperchen der Kinocilien des Plexusepithels entsprechen.

Die 200fache Vergrößerung (Abb. 25c) zeigt ebenfalls die punktförmig reaktiven Areale sowie eine starke Fluoreszenz der Außenseite des Plexusepithels, die auf eine hohe Konzentration des PTPIP51 hinweist.

Die DAPI Färbung in Abbildung 25d unterstreicht die vorherigen Beobachtungen.

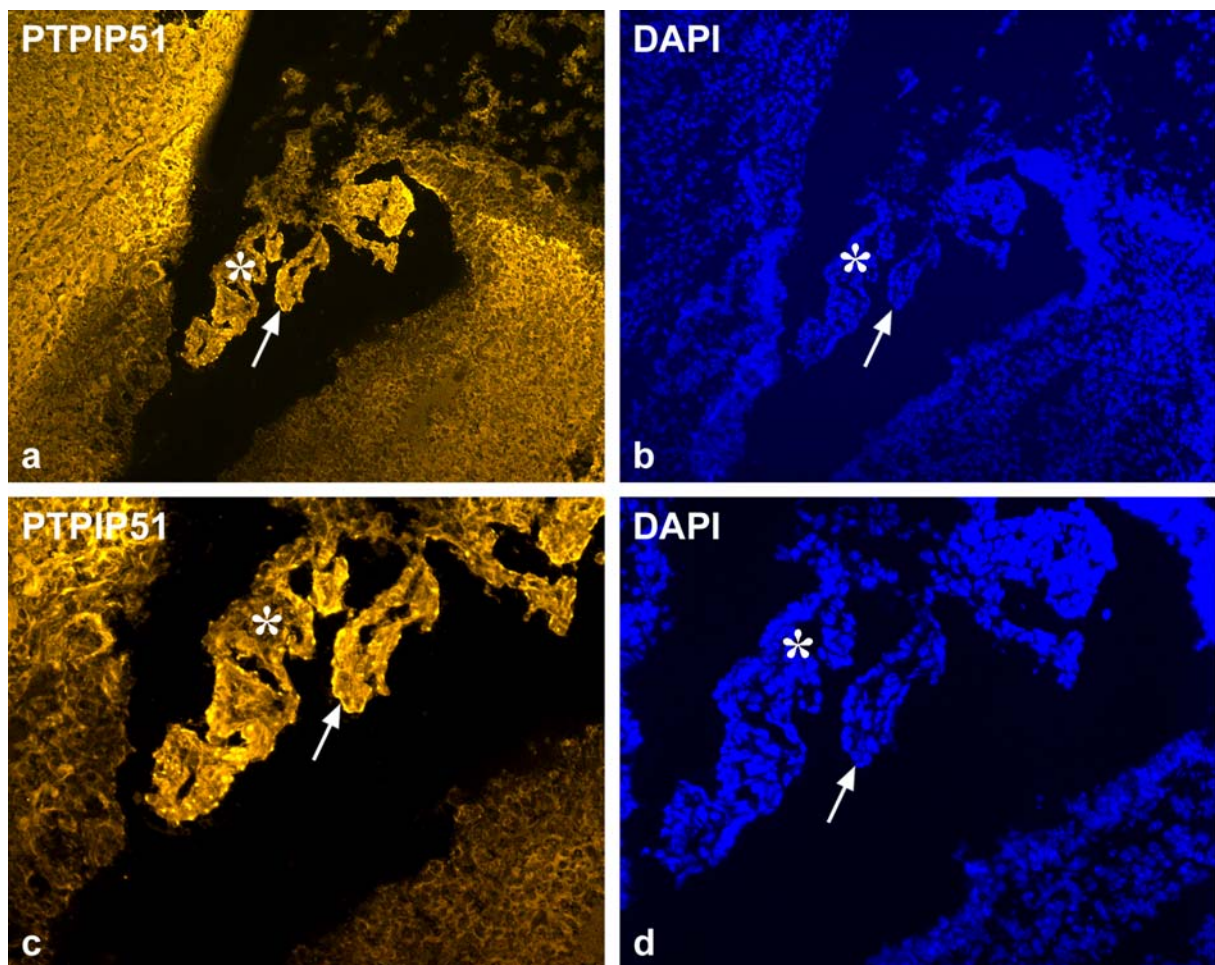


Abbildung 25: Plexus choroideus 17. d.p.c.

- a Plexus choroideus (100 fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- b Plexus choroideus DAPI Färbung (100fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- c Plexus choroideus (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
- d Plexus choroideus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

3.4.7 Plexus choroideus Embryo 18. d.p.c.

Im Vergleich mit dem vorherigen Entwicklungstag lassen sich kaum Veränderungen erkennen. In der 100fachen Vergrößerung fallen wieder die PTPIP51 reaktiven

Kinocilien mit ihren Basalkörperchen auf (Abb. 26a). Das Plexusepithel zeigt zudem zu diesem Entwicklungszeitpunkt vereinzelt schwach reaktive Plexusepithelzellen. Die Außenseite des Epithels zeigt weiterhin eine, wenn auch im Vergleich zu den vorherigen Stadien, geringere Reaktion. In der höheren Vergrößerung (Abb. 26b) ist die Reaktion der Außenseite deutlicher zu erkennen. Die basalen Anteile des Plexusepithels zeigen nur spärliche Reaktionen.

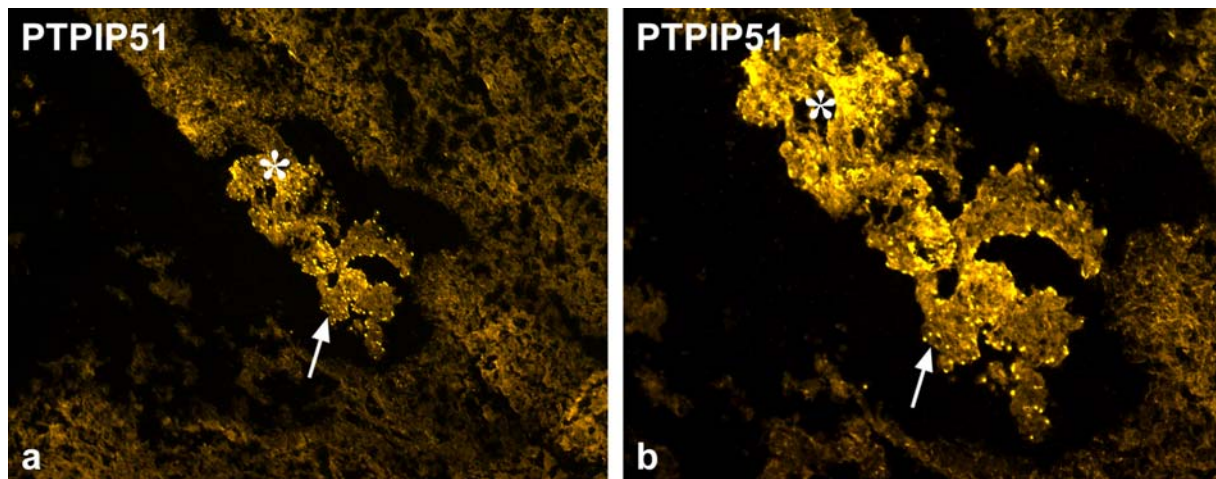


Abbildung 26: Plexus choroideus 18. d.p.c.

- a Plexus choroideus (100 fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel
b Plexus choroideus (200fache Vergrößerung); Stern: Kapillarschlingen, Pfeil: Plexusepithel

3.5 Zungenentwicklung

Die Zungenentwicklung beginnt am Boden der primitiven Mundhöhle und des Kiemendarmes mit einer Invasion der epithelialen und mesenchymalen Anteile der ersten vier Kiemenbögen am Boden des zukünftigen Oropharynx. Als erste Anzeichen bilden sich am 11. d.p.c. zwei diskrete Wülste, die lateralen Zungenanlagen, die mit der dorsalen Oberfläche des mandibulären Anteils des ersten Kiemenbogens verbunden sind. Die Zungenanlage wölbt sich hinter der Rachenmembran am Boden des Schlunddarms vor und wächst in die spätere Mundhöhle ein. Die lateralen Zungenanlagen vergrößern sich rasch und bilden im weiteren Verlauf die vorderen zwei Drittel der Zungenoberfläche sowie das darunter liegende mesenchymale Bindegewebe. Hierdurch wachsen sie schon bald über das Tuberculum impar. Dieses hat sich ebenfalls aus dem ersten Kiemenbogen am 11. d.p.c. entwickelt. Es handelt sich jedoch lediglich um eine vorübergehend vorhandene Struktur, aus der kein Bestandteil der ausdifferenzierten Zunge hervorgehen wird. Die lateralen

Zungenanlagen verschmelzen um den 11,5 d.p.c. schließlich mit ihren mittleren Anteilen. Der Ort der Fusion wird anfänglich durch den tiefen dorsalen Sulcus medianus, der im Weiteren abflacht, aber erhalten bleibt, und ab 13,5 d.p.c. durch das Vorhandensein eines in der Mittellinie liegenden, vertikal ausgerichteten, fibrösen Septums, dem Septum medianum gekennzeichnet.

Ein weiteres, kleineres Paar von Wülsten bildet sich gleichzeitig im caudalen Teil der Zungenanlage. Dieses verschmilzt zur Copula und stellt ein Verbindungsstück der Derivate des zweiten Kiemenbogens dar. Caudal der Copula entwickelt sich am 12. d.p.c. aus dem Mesenchym des ersten und zweiten Kiemenbogens, mit dem sich am 12,5 d.p.c. auch Anteile des dritten und vierten Kiemenbogens vereinigen, die Eminentia hypobranchialis. Diese wächst in der weiteren Zungenentwicklung bald über die Copula hinweg, so dass diese schon bald verschwunden ist. Ab 12,5 d.p.c. ist es somit nicht mehr möglich, die einzelnen Zungenanlagen mitsamt ihrer Derivate weiter zu verfolgen.

Allerdings ermöglicht die Innervation der Zunge Rückschlüsse auf die Herkunft der einzelnen Abschnitte der voll entwickelten Zunge:

Die sensible Innervation der Oberfläche der vorderen zwei Drittel der Zunge wird durch den N. lingualis vermittelt, einem Ast des N. mandibularis, der der dritte Ast des N. trigeminus (V) ist. Der N. trigeminus entstammt dem ersten Kiemenbogen, welcher die medialen und distalen Anteile der Zungenknospe bildet. Hieraus lässt sich somit ableiten, dass das dem Endoderm entstammende oberflächliche Epithel sowie das Mesoderm der vorderen zwei Drittel der Zunge aus Derivaten des 1. Kiemenbogens hervorgeht. Die sensorische Innervation der Geschmacksknospen der vorderen zwei Drittel der Zunge entstammt der Chorda tympani, einem Ast des N. facialis (VII). Dieser entstammt dem zweiten Kiemenbogen. Da der 2. Kiemenbogen vom 3. überwuchert wird, hat der N. facialis lediglich einen Anteil an der sensorischen Versorgung der Mundschleimhaut.

Als Derivat des 3. Kiemenbogensegmentes versorgt der N. glossopharyngeus (IX) das hintere Drittel der Zunge, das somit klar dem genannten Segment zugeordnet werden kann. Der N. vagus (X), der aus dem 4. Kiemenbogen hervorgeht, versorgt mit dem N. laryngeus superior nur einen kleinen Teil der Zunge: die Zungenwurzel, die um die Epiglottis liegenden Gewebe und die Epiglottis selbst, die Abkömmlinge des 4.

Kiemenbogens darstellen. Dieser caudalste Teil der Zunge bildet sich um den 11,5-12. d.p.c.

Die Rachenmembran bildet die Grenze zwischen ektodermalem und endodermalem Mundhöhlenepithel. Das Epithel der Schleimhaut des Zungenkörpers ist demnach ektodermalen Ursprungs und das der Zungenwurzel endodermaler Herkunft.

Der N. hypoglossus (XII) versorgt alle äußeren Muskeln der Zunge, bis auf eine Ausnahme. Der M. palatoglossus wird durch den N. glossopharyngeus (IX) innerviert.

Die Zungenmuskulatur stammt von Myoblasten der occipitalen Myotome ab, die in breiten Bahnen mitsamt der zugehörigen Innervation in die Zunge einwandern.

Die occipitalen Myotome bilden sich aus 3 oder 4 Einheiten von paraxialem Mesoderm, welches in der occipitalen Region lokalisiert ist. Am 15,5 d.p.c. ist sowohl die Zungenmuskulatur (vertikale und transversale Anteile) als auch die paarig angelegte an der Zunge ansetzende Muskulatur entwickelt (M. genioglossus, hypoglossus, styloglossus, chondroglossus und palatoglossus).

Als erste der Zungenpapillen bildet sich als Vertiefung des oberflächlichen Epithels am 12,5-13,5 d.p.c. die mediane circumvallate Papille (MCP), die schon zu diesem frühen Zeitpunkt mit einem feinen Geflecht von Nervenendungen in Kontakt steht.

Mit fortschreitender Entwicklung wird die MCP immer prominenter und zeigt schon bald eine zentrale Kuppel, die von einem tiefen Sulcus umgeben wird, der bilateral vom N. glossopharyngeus (IX) innerviert wird.

Lateral der MCP finden sich bald eine große Anzahl an Papillae filiformes und – fungiformes. Die Papillae filiformes bedecken vor allem den vor dem Sulcus gelegenen Anteil des Zungenrückens und entwickeln sich um den 13,5 d.p.c.

Es sind winzige Strukturen, die in Reihen, die parallel zum Sulcus terminalis stehen, angeordnet sind. An der Zungenspitze folgen sie einer transversalen Anordnung.

Am 14,5-15,5 d.p.c. bilden sich, durch Induktion von Endästen der Chorda tympani induziert, die Papillae fungiformes. In ihrer Struktur gleichen sie einer Miniaturversion der MCP. Sie sind auf der gesamten Zungenoberfläche, vor allem an den seitlichen Anteilen und der Zungenspitze, verteilt.

In der Mittellinie wird die Zungenunterseite um den 13,5 d.p.c. durch das Frenulum, einer Schleimhautsichel, mit dem Mundboden verbunden. Beidseits davon liegen am

Mundboden die Carunculae, die an ihrer Oberfläche die Ausführungsgänge der sublingualen und submandibularen Speicheldrüsen enthalten.

Die hier dargestellten Abläufe sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, dem Buch: „The anatomical basis of mouse development“ [Kaufmann und Bard, 1999] entnommen.

3.5.1 Zunge 12. d.p.c.

In der Übersichtsvergrößerung (Abb. 27a) fallen in der sich entwickelnden Zunge vor allem starke Reaktionen mit dem gegen das PTP1B51 gerichteten Antikörper in den Myoblasten, der sich entwickelnden Zungenmuskulatur sowie der Muskulatur des späteren Mundbodens auf. Das oberflächliche Epithel des Zungenrückens sowie die differenzierende Epidermis der Mundregion weisen ebenfalls eine Expression des Proteins auf.

Die höhere Vergrößerung (Abb. 27c) zeigt die hochreaktiven Myoblasten der Zungenmuskulatur deutlich als organisierten Bereich in den mesenchymalen Anteilen des Zungenkörpers. Es fallen einzelne, besonders stark reaktive Areale auf. Innerhalb des bindegewebigen Anteils sind nur vereinzelt reaktive Zellen zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich ebenfalls um versprengte Myoblasten handelt.

Das an der Zungenoberfläche gelegene Epithel stellt sich als Saum reaktiver Zellen dar. Der Antikörper markiert vor allem die basalen und apikalen Zellanteile. Die Reaktion innerhalb der einzelnen Zellen der Zungenmuskulatur sowie der Epithelien ist vorwiegend cytosolisch lokalisiert. Der enorme Zellenreichtum der Myoblasten zeigt sich in der Zellkernfärbung mit DAPI in Abbildung 27d.

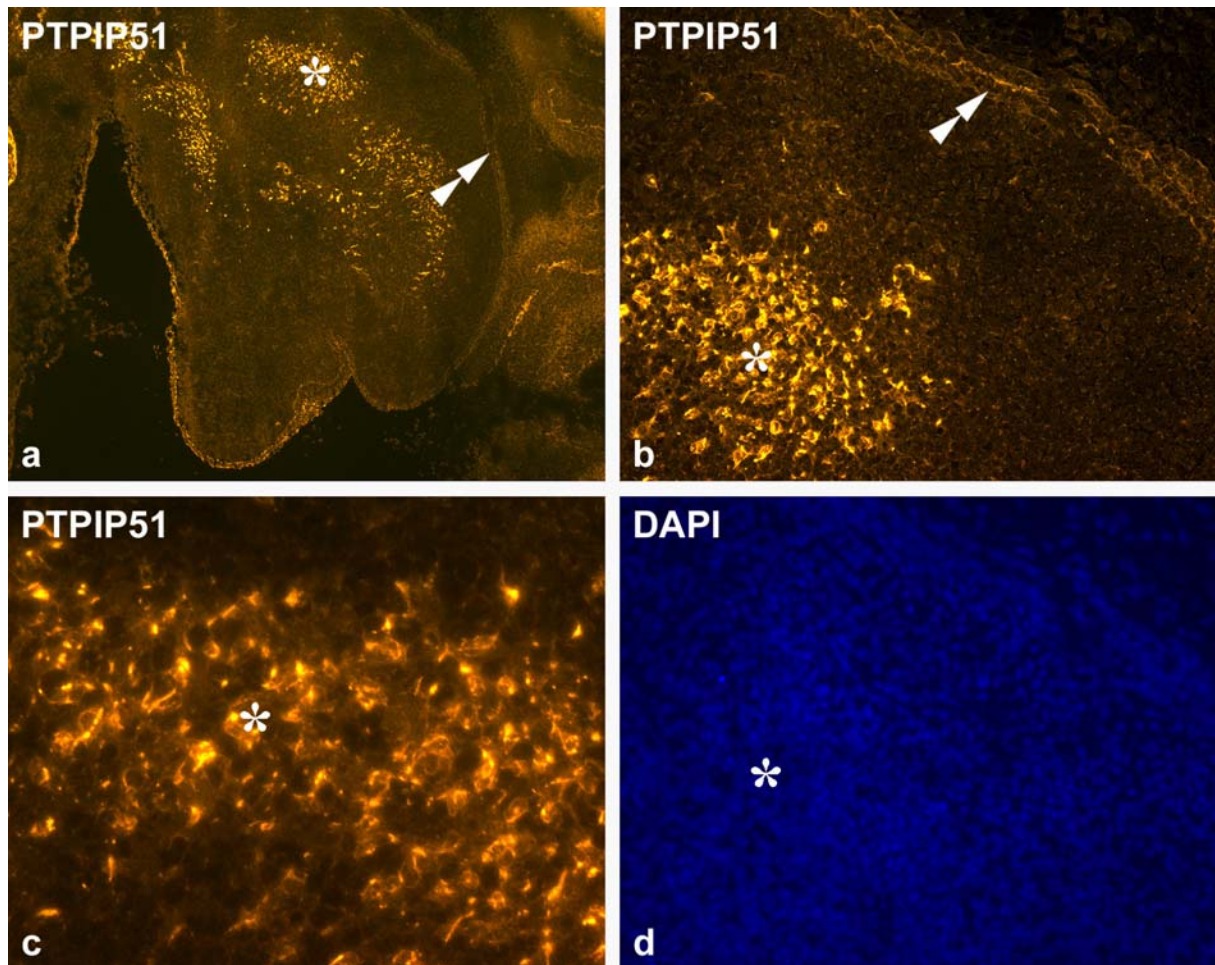


Abbildung 27: Zunge 12. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten der zukünftigen Zungenmuskulatur; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- b Zunge (200fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten der zukünftigen Zungenmuskulatur; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- c Zunge (400fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten der zukünftigen Zungenmuskulatur
- d Zunge DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten der zukünftigen Zungenmuskulatur; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

3.5.2 Zunge 13. d.p.c.

Auf Abbildung 28a erscheinen die das PTPIP51 Antigen exprimierenden Myoblasten der Zungenmuskulatur im Vergleich zum Vortag schon deutlich organisierter. Sie liegen bandförmig in einem Abstand zu dem, ebenfalls reaktiven, Epithel der Zungenoberfläche. Die einzelnen Myoblasten des zukünftigen M. longitudinalis linguae liegen säulenartig angeordnet untereinander.

Das oberflächliche Epithel beginnt wenig später die Differenzierung der einzelnen Papillenformen. Es zeigt eine starke Reaktion in seinen basalen, der zukünftigen Aponeurose aufsitzenden, Anteilen. Hier kommt es durch die Nervenfasern des

zukünftigen N. lingualis zur Induktion der Papillae filiformes. Diese bilden beim erwachsenen Tier vor allem den Tastsinn der Zunge, der über im Bindegewebssockel der Papillen liegenden Nervenendungen vermittelt wird. Abbildung 28b zeigt, dass das oberflächliche Epithel des Zungenrückens eine bandförmige Reaktion mit einzelnen hochreaktiven Granula, in den basalen Anteilen aufweist. Die Myoblasten liegen unterhalb des in einzelnen Bereichen ebenfalls positiv reagierenden Bindegewebes.

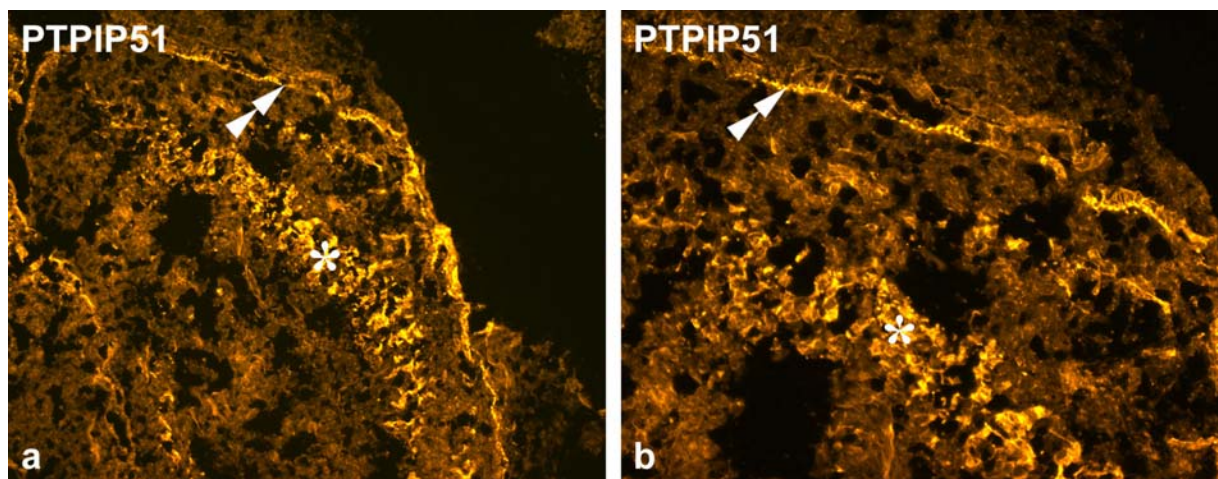


Abbildung 28: Zunge 13. d.p.c.

- a Übersicht (100fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten der zukünftigen Zungenmuskulatur; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- b Zunge (200fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten der zukünftigen Zungenmuskulatur; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

3.5.3 Zunge 14. d.p.c.

Im Vergleich zu den Vortagen ist es zu einem deutlichen Fortschritt in der Differenzierung des gesamten Mundbereiches gekommen. In Abb. 29a füllt die Zunge fast den gesamten Mundraum aus. Im Bereich des zukünftigen Gaumens ist es zu Differenzierungsprozessen gekommen, das Knorpelgewebe des zukünftigen harten Gaumens tritt deutlich hervor (oberer, mittlerer Bildrand).

Auch die Zunge weist deutliche Fortschritte in ihrer Differenzierung auf. Das Epithel der Zungenoberfläche erscheint im Vergleich zu den Vortagen weniger stark reaktiv, es grenzt sich jedoch nach wie vor gegen das bindegewebige Gerüst der Zunge ab.

Der zukünftige M. longitudinalis linguae zeigt sich weiterhin als hochreaktives Band, das über die gesamte Zungenlänge ohne weiteres verfolgbar ist. Unterhalb des Muskels findet sich eine nur in wenigen Bereichen reaktive Schicht von Bindegewebe, unterhalb

welcher der ebenfalls das PTPIP51 Antigen exprimierende zukünftige M. transversus linguae liegt. Dieser zeigt einen säulenartigen Aufbau.

In der 200fachen und 400fachen Vergrößerung (Abb. 29b, c) erkennt man, dass die Muskelfasern innerhalb des M. longitudinalis linguae eine deutliche Ausrichtung zeigen. Innerhalb des Muskels lassen sich einzelne Stränge ausmachen, die in der voll differenzierten Zunge dem M. verticalis linguae entsprechen. Mittels der Kernfärbung (Abb. 29d) lassen sich die hochreaktiven Bereiche dem Cytosol der Myoblasten zuordnen.

Das Epithel des Zungenrückens erscheint als schwach reaktives Band über der zukünftigen Aponeurose. Das unverhornte Plattenepithel der Mundhöhle ist in seinen apikalen - und basalen Anteilen PTPIP51 positiv, wobei die Reaktion in den apikalen Anteilen stärker ausfällt. Die apikalen Anteile zeigen fingerförmige, reaktive Ausstülpungen.

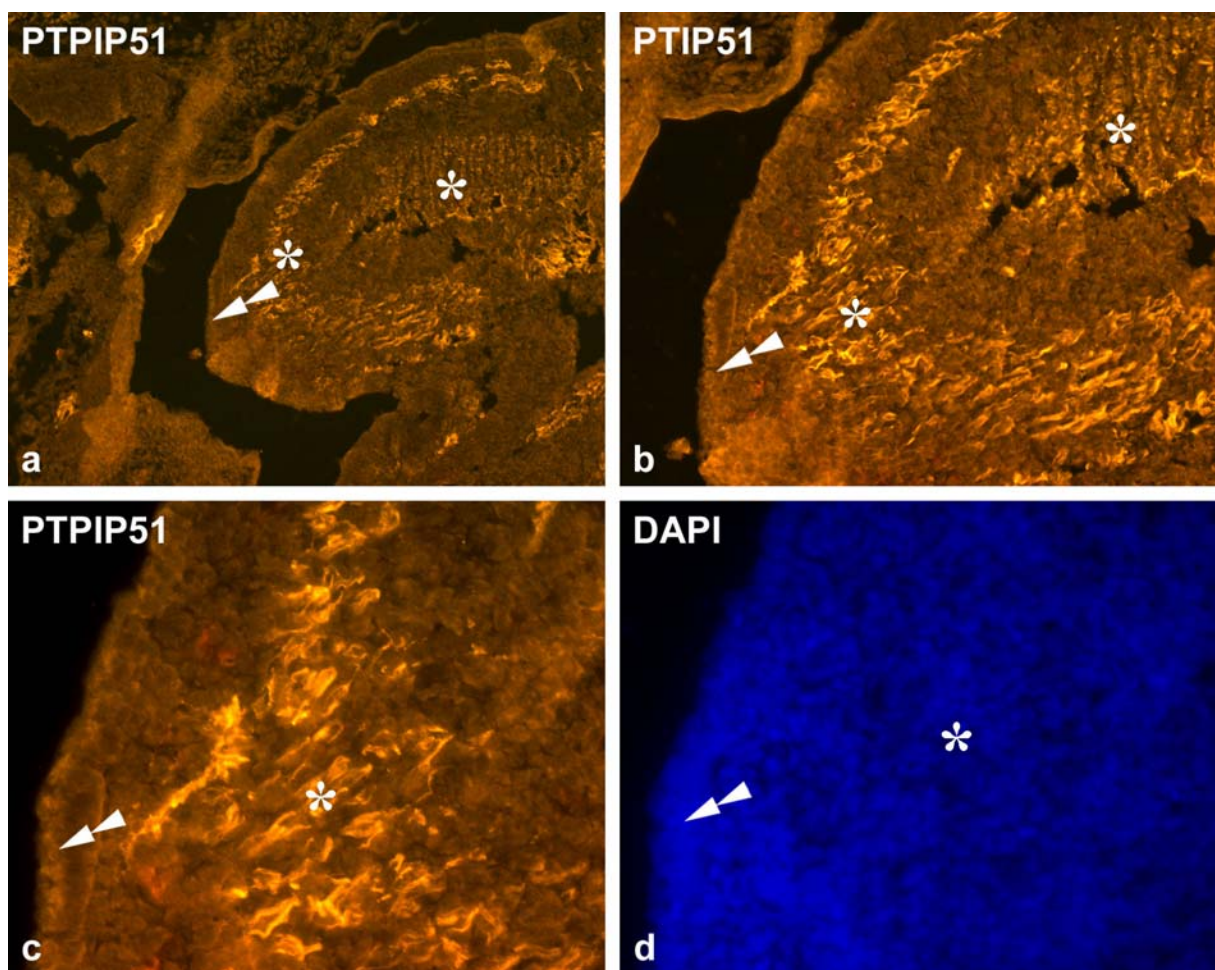


Abbildung 29: Zunge 14. d.p.c.

- a Übersicht (100fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten des zukünftigen M. longitudinalis - und M. transversus linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- b Zunge (200fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten des zukünftigen M. longitudinalis - und M. transversus linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- c Zunge (400fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten des zukünftigen M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- d Zunge DAPI Färbung (400fache Vergrößerung); Stern: Myoblasten des zukünftigen M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

3.5.4 Zunge 15. d.p.c.

Am 15. Tag der Mausentwicklung ist es erneut zu deutlichen Fortschritten in der Zungenentwicklung gekommen. Die Gliederung der Muskulatur tritt noch klarer hervor (Abb. 30a). Der M. longitudinalis linguae, immer noch hochreaktiv, stellt beinahe den gesamten Zungenkörper. Die hochreaktiven Muskelfasern verlaufen sowohl in longitudinaler - als auch in transversaler Ausrichtung. Das Bindegewebe zwischen dem M. longitudinalis - und dem M. transversus linguae, der weiterhin eine säulenartige Konfiguration zeigt, ist im Vergleich zum Vortag schmaler geworden.

Insgesamt wirkt die Zunge im Vergleich zum Vortag weniger plump, was durch eine deutliche Streckung der Zunge hervorgerufen wird. Die höheren Vergrößerungen (Abb. 30b, c) machen die Faserausrichtung der einzelnen Zungenmuskeln noch deutlicher. Das PTPIP51 Antigen ist im Cytosol lokalisiert. Die Zellkerne lassen sich als eindeutig areaktiv in den einzelnen Muskelanteilen erkennen.

Das Epithel, welches die Zunge bedeckt, ist im Vergleich zu den Vortagen wieder stärker reaktiv, vor allem in seinen apikalen Anteilen.

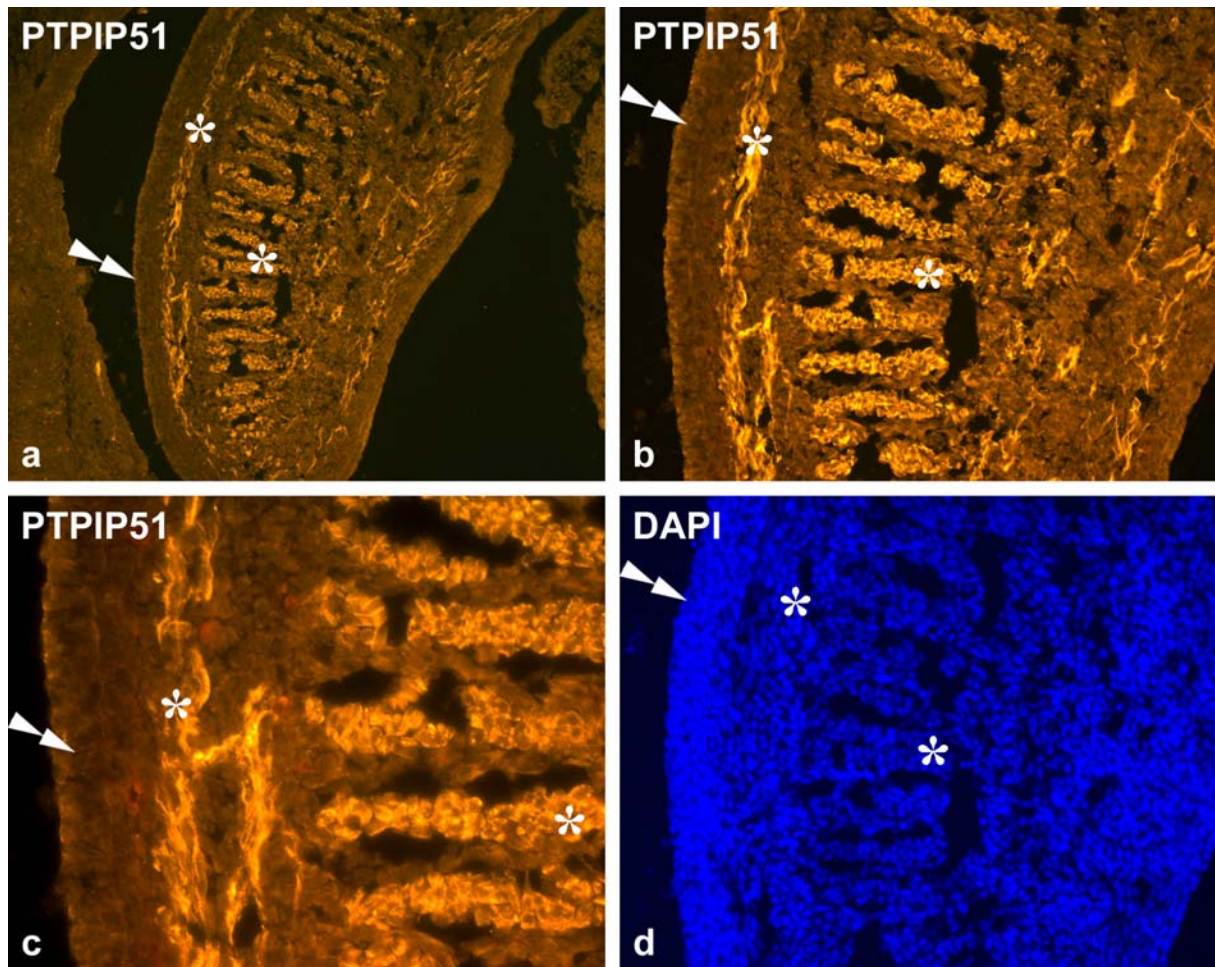


Abbildung 30: Zunge 15. d.p.c.

- a Übersicht (100fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis - und M. transversus linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- b Zunge (200fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis - und M. transversus linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- c Zunge (400fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis - und M. transversus linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- d Zunge DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis - und M. transversus linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

3.5.5 Zunge 16. d.p.c.

Im Vergleich zum Vortag fällt in Abb. 31a sofort das hochreaktive Epithel der Zungenoberfläche auf. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt sind alle Papillenformen etabliert und die Zunge hat strukturell die Form wie bei der erwachsenen Maus. Das gesamte Epithel zeigt in allen Zellschichten eine starke Expression des PTPIP51 Antigens. Abbildung 31d zeigt deutlich die homogene Reaktion des Zungenepithels. Einzelne Papillenformen lassen sich hier jedoch nicht voneinander unterscheiden. Es fällt auf, dass in den Bereichen, in denen es zu Zell-Zell-Kontakten kommt, häufig eine starke Reaktion mit dem Antigen beobachtet werden kann. Auch das unverhornte

Plattenepithel des Mundbodens weist dasselbe Reaktionsmuster auf (Abb. 31a). Dies gilt jedoch nicht für das Epithel des Gaumens. Im Vergleich zum Zungenepithel sowie dem Mundbodenepithel fällt die Reaktion hier deutlich schwächer aus. Das Epithel reagiert ausschließlich in den apikalen - und basalen Anteilen. Das bindegewebige Gerüst der Zunge, aus dem auch die Aponeurose besteht, ist areaktiv. Der M. longitudinalis, der hier die Zungenspitze umrundet, zeigt wie in den vorherigen Stadien eine deutliche Reaktion mit dem gegen das Protein gerichteten Antikörper. Beim Vergleich mit der DAPI Zellkernfärbung (Abb. 31b) fällt auf, dass der Großteil der PTPIP51 Reaktion weiterhin cytosolisch lokalisiert ist.

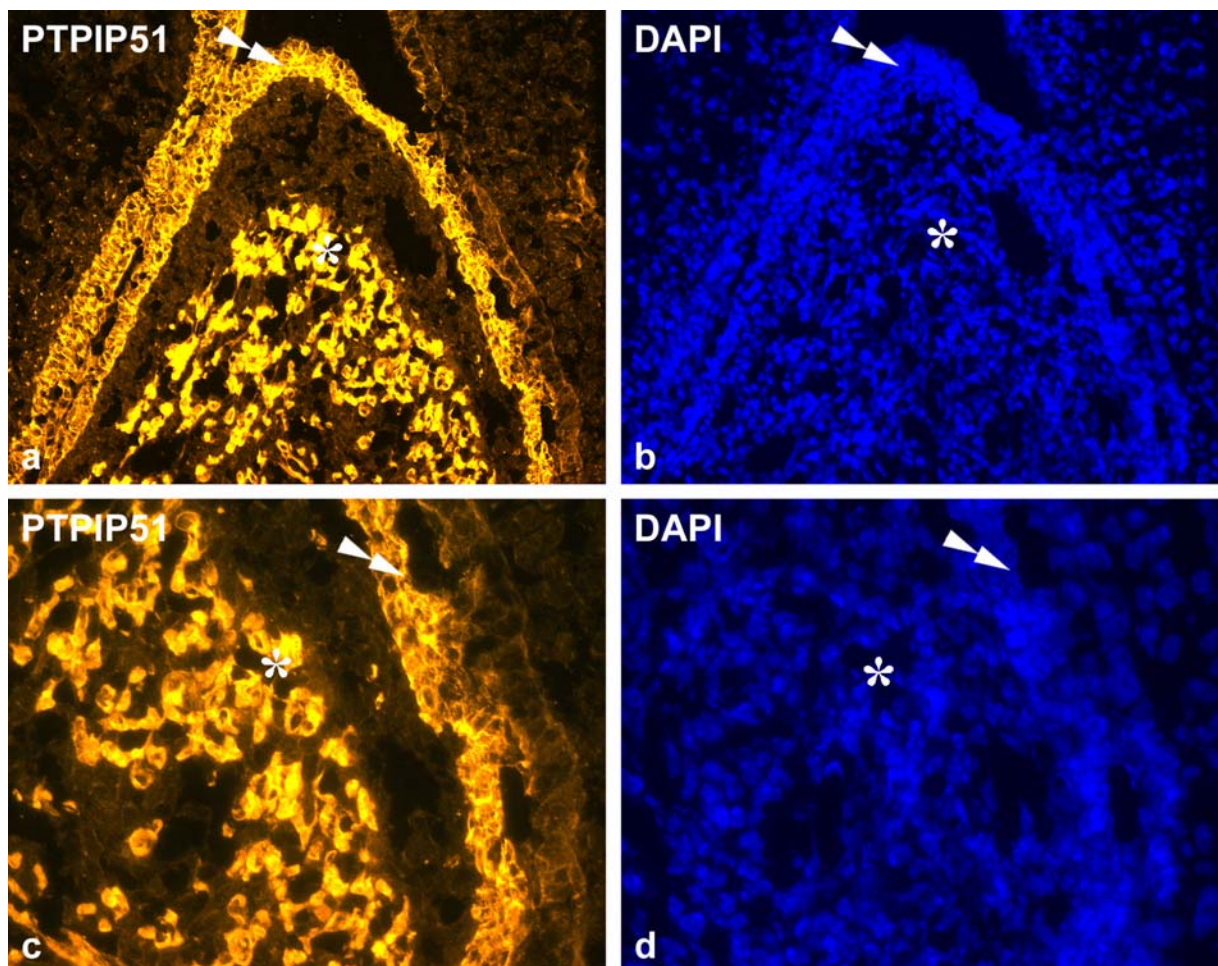


Abbildung 31: Zunge 16. d.p.c.

- a Zunge (200fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- b Zunge DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- c Zunge (400fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

- d Zunge DAPI Färbung (400fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

3.5.6 Zunge 17. d.p.c.

Das Epithel des Gaumens zeigt am 17. d.p.c. eine positive Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper (Abb. 32a). Zum ersten Mal weisen alle Epithelien der Mundhöhle eine deutliche Reaktion auf. Das Reaktionsmuster ist in allen Epithelien identisch: alle Schichten exprimieren das Antigen.

Das Bindegewebe der Zunge, das als Ansatz und Ursprung der inneren Zungenmuskeln dient, zeigt keine Expression des Proteins.

Die Binnenmuskulatur der Zunge ist klar gegliedert. Sie weist unverändert eine deutliche Reaktion auf. In der 400fachen Vergrößerung (Abb. 32b) erkennt man, dass zu diesem Zeitpunkt alle Muskeln angelegt sind und auch deutlich in ihrem Faserverlauf verfolgt werden können. Der M. longitudinalis linguae liegt als erste Muskelschicht unterhalb der Aponeurose. Seine Fasern verlaufen parallel zur Zungenoberfläche. Eingestreut in diesen finden sich die vertikal verlaufenden Fasern des M. verticalis linguae. Diese beiden Muskeln umschließen bandförmig den M. transversalis linguae, dessen Fasern waagrecht in der Zunge verlaufen.

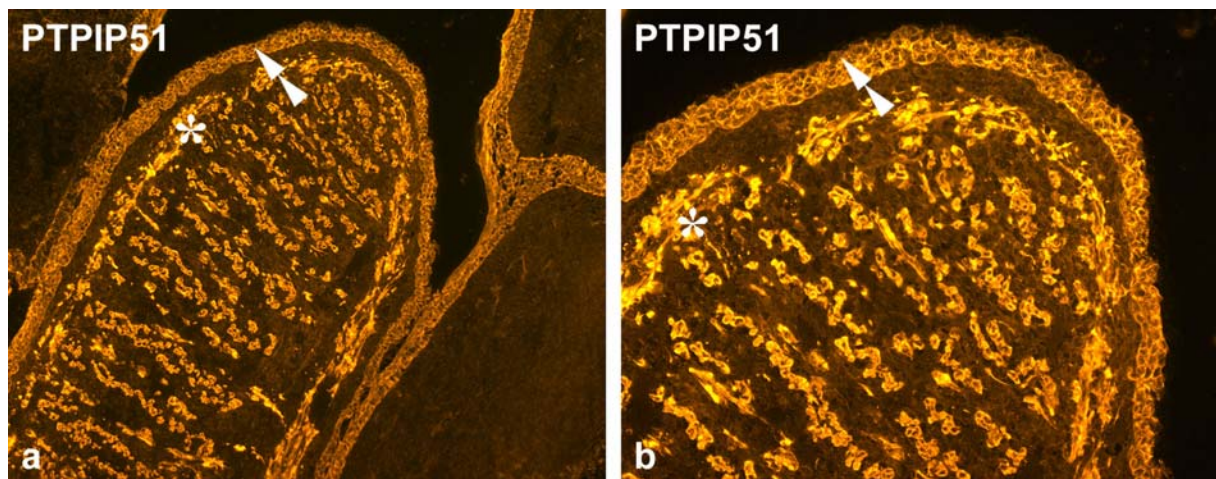


Abbildung 32: Zunge 17. d.p.c.

- a Zunge (100fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis -, M. verticalis und M. Transversalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
b Zunge (200fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis -, M. verticalis – und M. transversalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

3.5.7 Zunge 18. d.p.c.

Im Vergleich mit den vorherigen Stadien der Mausentwicklung ist es zu einer sukzessiven Verschmälerung der Zunge gekommen.

Das oberflächliche Epithel der Zunge (Abb. 33a) weist am 18. d.p.c. in allen Zellschichten eine positive Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 Antigen gerichteten Antikörper auf. Auffällig ist, dass zu diesem Zeitpunkt die obersten Epithelschichten der Zunge verhornen. Die unter dem Epithel liegende Aponeurose bildet nur noch einen schmalen Saum, der kein PTPIP51 enthält. Der darunter liegende *M. longitudinalis linguae*, sowie der *M. transversus linguae* reagieren positiv mit dem Antikörper.

Das Epithel des Mundgrundes ist in seinen obersten Schichten ebenfalls verhornt und stellt sich als reaktiver Streifen dar, der vom rechten unteren Bildrand in die Mitte zieht. Unterhalb hiervon findet sich der *M. geniohyoideus*.

Die 200fache Vergrößerung (Abb. 33b) verdeutlicht die Verhältnisse. Der Vergleich mit der DAPI Färbung (Abb. 33d) erlaubt es, trotz der hohen Zellzahl, die PTPIP51 Reaktion dem Cytosol zuzuordnen. In Abbildung 33d lässt sich eindrücklich die Ausdünnung der bindegewebigen Anteile des Zungengerüsts erkennen.

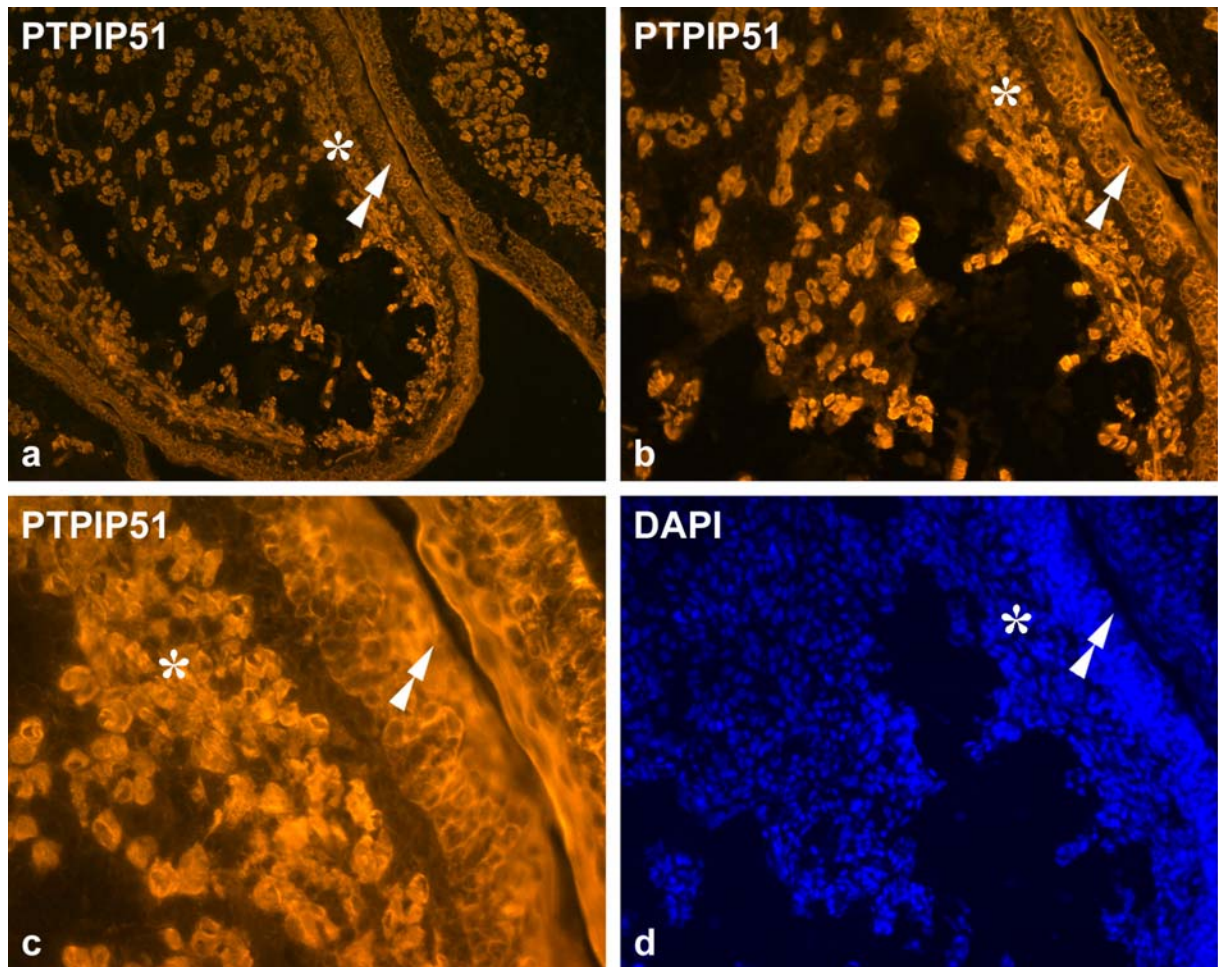


Abbildung 33: Zunge 18. d.p.c.

- a Zunge (100fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- b Zunge (200fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- c Zunge (400fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge
- d Zunge DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Stern: Myocyten des M. longitudinalis linguae; doppelte Pfeilspitze: oberflächliches Epithel der Zunge

3.6 Lungenentwicklung

Das respiratorische System der Maus entwickelt sich um den 9,5 Tag der Embryonalentwicklung. Als erstes Anzeichen hierfür bildet sich eine mediane Längsfurche am Boden der entodermalen Darmbucht, die man als Laryngotrachealrinne bezeichnet. Die Rinne vertieft sich, so dass ein Divertikel entsteht, welches sich seinerseits durch das Septum oesophagotracheale vom Vorderdarm, aus dem sich im weiteren Verlauf der Oesophagus entwickeln wird, abtrennt. Das tracheale Divertikel vertieft sich weiter und aus seinem proximalen Anteil entwickelt sich im weiteren Verlauf die Trachea. Der distale Anteil teilt sich schon bald, so dass die Bifurkation mit den

beiden Hauptbronchien entsteht. Das Epithel, das Trachea und Bronchien auskleidet, entspricht zum Beginn der Prozesse in seinem Aufbau noch dem des sich simultan entwickelnden Oesophagus. Ab dem 11,5 Tag erfolgt die Weiterdifferenzierung zu respiratorischem Epithel, welches ein von vielen mukösen Drüsen durchsetztes mehrreihiges Epithel mit Kinocilienbesatz ist. Aus dem umgebenden Kiemenbogenapparat differenzieren sich die Epiglottis, die Kehlkopfknorpel sowie die Muskulatur des Larynx und Pharynx.

Die Lungenanlagen bilden sich um den 9,5-10. d.p.c. am distal gelegenen Ende der Hauptbronchien. Die beiden Lungenknospen, die aus Entoderm bestehen und bereits um den 10. d.p.c. von Mesenchym umgeben werden, differenzieren sich zu den Lungen mitsamt des im weiteren Verlauf einsprossenden Bronchialsystems. Die Lungenknospen wachsen gegen die laterale Wand des pleuroperitonealen Kanals vor und liegen zu diesem Zeitpunkt unterhalb der noch nicht getrennten Vorhöfe. Während dieser Prozesse bildet sich zunächst eine primitive Pleurahöhle aus, in der sich die Lungenknospe im Weiteren auf der rechten Seite in vier sekundäre Knospen teilt. Die linke Lungenknospe besteht bei der Maus nur aus einem Ast.

Die genannten Vorgänge werden durch die Teilung des rechten Hauptbronchius in vier Bronchii lobares initiiert und um den 10,5-11. Entwicklungstag abgeschlossen. Die einzelnen Lungenlappen lassen sich jedoch erst mit dem 12,5-13,5 Embryonaltag sicher voneinander unterscheiden. Hier kann eine Einteilung vorgenommen werden: es lassen sich innerhalb der rechten Lungenanlage ein cranialer, ein mittlerer, ein caudaler sowie ein akzessorischer Lungenlappen abgrenzen. Jede der sekundären Knospen teilt sich um den 12,5 d.p.c. wiederum mehrfach dichotom auf, so dass sich tertiäre, auch segmental genannte, Bronchien ausbilden. Während dieser Teilungsprozesse spaltet sich auch die die Lunge einfassende Mesenchymhülle auf. Aus jeder dieser tertiären Bronchialknospen, die den späteren Segmentbronchien entsprechen, entwickelt sich mitsamt des zugehörigen Mesenchyms ein bronchiopulmonales Segment. Diese einzelnen Lungensegmente zeigen einen pyramidenartigen Aufbau: mit ihrer Spitze weisen sie auf den Lungenhilus und die Basis ist zur Lungenoberfläche hin ausgerichtet.

Um den 11,5 Entwicklungstag differenzieren sich aus den mesenchymalen Anteilen des Bronchialsystems die knorpeligen Anteile des respiratorischen Systems sowie die glatte

Muskulatur. Auch die bindegewebigen Anteile der Lunge und das Gefäßsystem der Lunge gehen aus diesem hervor. Die Knorpelspangen der Trachea und Hauptbronchien entwickeln sich ab 13,5-14,5 d.p.c. und haben ihre Entwicklung zu hyalinem Knorpel am 15,5 d.p.c. abgeschlossen.

Jedes der Lungensegmente verfügt über eine eigene Blutversorgung, so dass die einzelnen Segmente als unabhängige Einheiten funktionieren. Am 10. d.p.c. entwickeln sich die Pulmonalarterien, die aus der 6. Kiemenbogenarterie hervorgehen. Sie wachsen caudal auf die Lungenanlage zu und treten durch den Lungenhilus um den 11,5 Embryonaltag in die Lungenanlagen ein. Ebenso folgt der Lymphabfluss der segmentalen Anordnung, die Drainage erfolgt über die im Lungenhilus lokalisierten Lymphknoten.

Zusammengenommen führt dies zu einer deutlichen Größenzunahme der Lungenanlagen. Der rechte Anteil wächst über die obere Hälfte der posterioren Lebersegmente und wird von ihm durch die Kuppeln des Diaphragmas getrennt.

Mit der fortschreitenden Größenzunahme kommt es auch im Mesoderm des früheren pleuroperitonealen Kanals zu Umbauprozessen an deren Ende die Differenzierung zur Pleura visceralis und Pleura parietalis steht.

Schließlich kommen die Lungen mit dem Herzen in Kontakt und ab dem 16,5-17,5 Tag der Mausentwicklung auf gleicher Höhe zu ihm im Thorax zu liegen.

Der histologische Aufbau der Lunge entspricht um den 17,5 d.p.c. dem Bild unmittelbar vor Geburt. Die Differenzierung des Lungengewebes kann generell in drei Abschnitte unterteilt werden:

1. Pseudoglanduläre oder auch Drüsenperiode: diese dauert etwa bis zum 10. d.p.c. an. Im Wesentlichen ist die Lungenanlage in diesem Entwicklungsabschnitt mit einer Drüse vergleichbar: sie besteht aus einer lose miteinander verbundenen, überwiegend aus Bindegewebe bestehenden Zellmasse, die in ihren zentralen Anteilen eine aktive Proliferation mit bereits lobulärer Konfiguration zeigt.
2. Canaliculäre Periode: diese nimmt den Zeitraum bis zum 15,5 Tag der Embryonalentwicklung ein. Die Bronchien teilen sich aktiv: oft dichotom, gelegentlich auch als unpaare Äste. Die bindegewebigen Anteile nehmen ab, Bronchien sowie Bronchiolen erweitern sich und Gefäße sprossen ein. Zwischen

dem 13,5 bis 14,5 d.p.c. kommt es zum Auftreten der terminalen Bronchien sowie der Bronchiolen, die in ihrem histologischen Aufbau denen des adulten Tieres gleichen.

3. Alveoläre Periode: sie nimmt die letzten zwei bis drei Tage der Mausentwicklung ein. Es differenzieren sich die definitiven Alveolen mit ihrem typischen Epithel, das von Kapillarnetzen umschlossen wird. Während der noch bis zur Geburt verbleibenden Zeit flacht das Alveolarepithel immer weiter ab, so dass schließlich zum Zeitpunkt der Geburt der Gasaustausch ermöglicht wird. Mit dem 17,5 d.p.c. hat die Lunge schließlich ihre pränatale Konfiguration erreicht: die Alveolen sind deutlich ausgebildet.

Vor der Geburt umfasst die Pleurahöhle ein größeres Volumen, als es durch die Lungenanlagen ausgefüllt wird. Mit dem Entfalten der Alveolen durch die ersten Atemzüge wird dieses zusätzliche Volumen dann durch die expandierende Lunge ausgefüllt sein. Der Spalt zwischen den Pleurablättern wird durch eine Flüssigkeit ausgefüllt, welche schließlich beim Atemvorgang das Gleiten der Pleurablätter und durch seine Kapillarkräfte die Expansion der Lunge gewährleisten wird. Durch den Geburtsprozess kommt es zum Austausch der intraalveolaren Flüssigkeit mit Luft. Die in der Lunge befindliche Flüssigkeit setzt sich aus Amnionflüssigkeit, von der Lunge selbst sezernierter Flüssigkeit und aus Sekret der Drüsen des Bronchialbaumes zusammen.

Einzelne Nervenfasern können um den 11,5-12. Entwicklungstag beobachtet werden. Sie sind jedoch erst mit dem 12,5-13,5 Tag kräftig ausgebildet.

Das respiratorische System entwickelt sich so, dass es nach der Geburt seine Funktion aufnehmen kann. Im postnatalen Verlauf ist es jedoch noch durch eine weitere Vermehrung von Bronchioli respiratorii und von Alveolen gekennzeichnet. Dies zeigt sich besonders im histologischen Bild, das im Vergleich zum erwachsenen Tier noch nicht durch solch filigrane Strukturen gekennzeichnet ist.

3.6.1 Lunge 12. d.p.c.

Abbildung 34a zeigt die Abzweigung der Lappenbronchien aus dem rechten Hauptbronchus. In der Lungenperipherie sind Teile der sich zu diesem Zeitpunkt entwickelnden Segmentbronchien angeschnitten. Das respiratorische Epithel zeigt eine

starke Expression des PTPIP51 Antigens vor allem in seinen apikalen, mit Kinocilien besetzten Anteilen. Das die Bronchien umgebende Mesenchym zeigt noch keine eindeutige Differenzierung in Knorpelgewebe und glatte Muskulatur, ist jedoch deutlich als reaktiver Saum, der die Bronchien umfasst, auszumachen. Die genannten Prozesse werden allerdings erst zu diesem Stadium der Lungenentwicklung initiiert.

Am 12. d.p.c. befindet sich die Lunge in der canaliculären Phase der Lungenentwicklung, die durch die dichotome Aufteilung der Bronchien gekennzeichnet ist. Insgesamt ist das Lungengewebe noch von relativ plumper Gestalt. Es wird lediglich durch die angeschnittenen Bronchien in seiner Kompaktheit aufgelockert.

Am mittleren rechten Bildrand ist die hochreaktive Wand des rechten Vorhofes angeschnitten. Unterhalb davon liegt der im Vergleich deutlich muskelstärkere, ebenfalls positiv reagierende rechte Ventrikel. Im Vergleich fällt die Reaktion der Lunge deutlich schwächer aus, dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Reaktion innerhalb des Bronchialepithels auf einen kleinen Teil der Zelle beschränkt ist, wohingegen die Herzmuskelzellen fast vollständig eine Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper zeigen.

Abb. 34b zeigt die Aufzweigung des rechten Hauptbronchus in 200facher Vergrößerung. Auch hier ist die positive Reaktion des Kinocilienbesatzes deutlich. Die Basallamina, der das respiratorische Epithel aufsitzt, erscheint als positiv reagierender Saum. Auch die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Epithelzellen erscheinen vereinzelt PTPIP51 reaktiv.

Das die Bronchien umgebende Mesenchym tritt deutlich als eine das PTPIP51-Antigen exprimierende Zelllage hervor. Die umgebenden bindegewebigen Anteile der sich differenzierenden Lunge zeigen nur vereinzelte Reaktionen.

Der Bronchus in 400facher Vergrößerung in Abb. 34c unterstreicht die bisherige Beschreibung: der apikale und basale Zellpol des respiratorischen Epithels zeigen eine deutliche Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Der Vergleich mit der DAPI Färbung (Abb. 34d) zeigt deutlich, dass das Protein nicht im Zellkern lokalisiert ist.

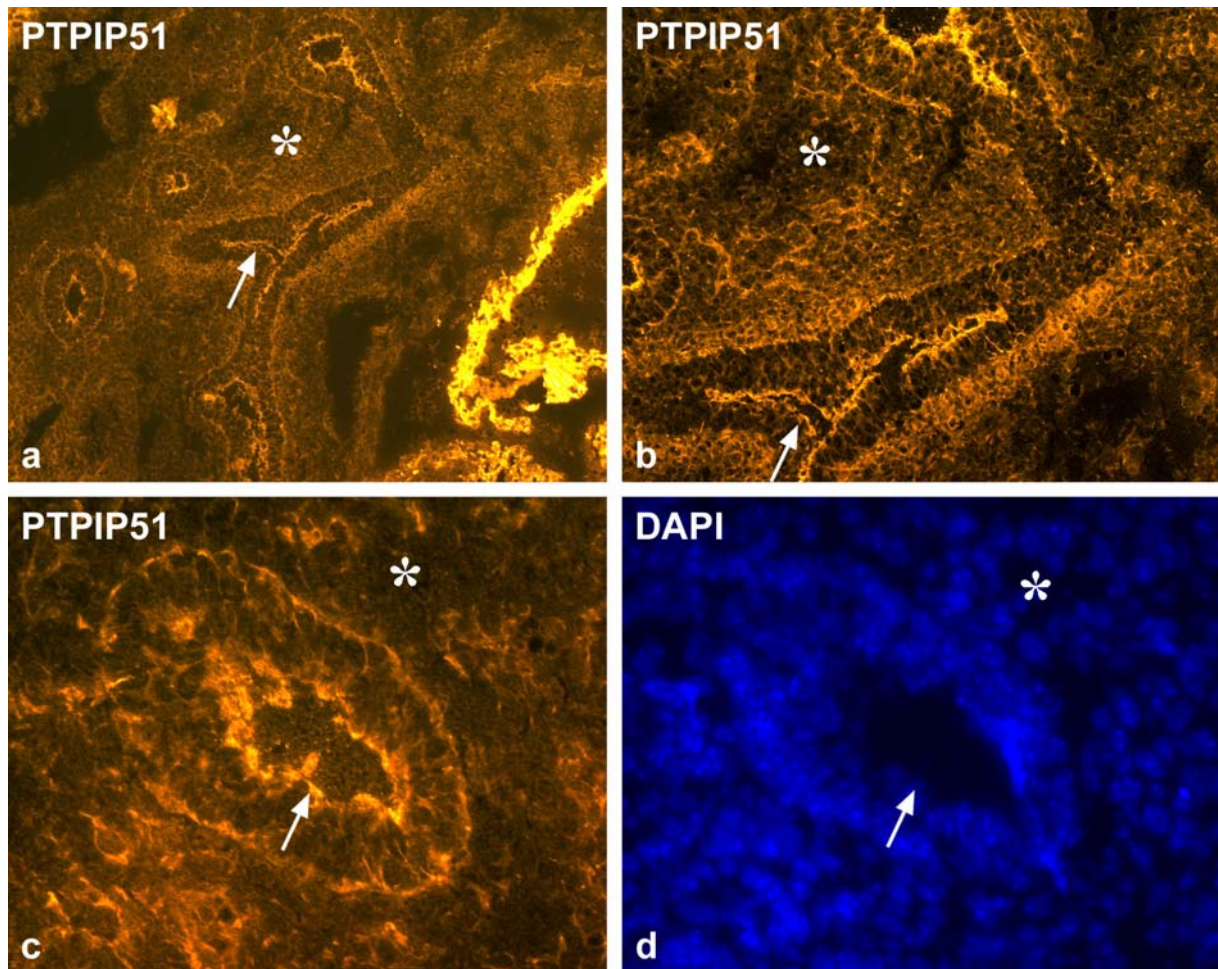


Abbildung 34: Lunge 12. d.p.c.

- a Übersicht über die Aufzweigung des rechten Hauptbronchus (100fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel Bronchus; Stern: bindegewebiger Anteil der noch nicht ausdifferenzierten Lunge
- b Aufzweigung des rechten Hauptbronchus (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel Bronchus; Stern: bindegewebiger Anteil der noch nicht ausdifferenzierten Lunge
- c Bronchus (400fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel; Stern: bindegewebiger Anteil der noch nicht ausdifferenzierten Lunge
- d Bronchus DAPI Färbung (400fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel; Stern: bindegewebiger Anteil der noch nicht ausdifferenzierten Lunge

3.6.2 Lunge 13. d.p.c.

Abbildung 35 zeigt eine Übersicht über die Lunge bei 50facher Vergrößerung. Hier fällt besonders das stark mit dem Antikörper reaktive Diaphragma auf, welches bogenförmig von der linken Bildmitte nach rechts unten zieht. Im linken oberen Bildquadranten ist der linke Vorhof angeschnitten, der ebenfalls eine starke Reaktion mit dem PTPIP 51 Antikörper aufweist. In der Bildmitte ist ein reaktiver Bronchus in seinem Verlauf angeschnitten. Besonders reaktiv zeigen sich das den Bronchus umgebende

Mesenchym sowie die Kinocilien des Bürstensaums des respiratorischen Epithels. Die übrigen Anteile des Lungenparenchyms wirken im Vergleich zum Vortag deutlich aufgelockerter und somit weniger kompakt.

Bei 100facher Vergrößerung sind die Reaktionsmuster der einzelnen Strukturen deutlicher gegeneinander abgrenzbar. Das den Bronchius umgebendes Mesenchym ist deutlich als hochreaktive Zelllage zu erkennen. Hier findet die Differenzierung des Mesenchyms in die zukünftige Tunica muscularis und den Knorpel des Bronchius statt. Das mehrreihige hochprismatische Epithel des Bronchius zeigt weiterhin an seiner dem Bronchiuslumen zugewandten Oberfläche eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper. Das Lungengewebe weist eine weniger kompakte Struktur auf, es lassen sich vereinzelte Reaktionen mit dem Antikörper ausmachen. In dem linken unteren Bildviertel zeigt das Diaphragma eine deutliche Expression des PTPIP51 Antigens.

Die 400fache Vergrößerung (Abb. 35c, d) verdeutlicht die bereits beschriebene Konfiguration des Bronchius.

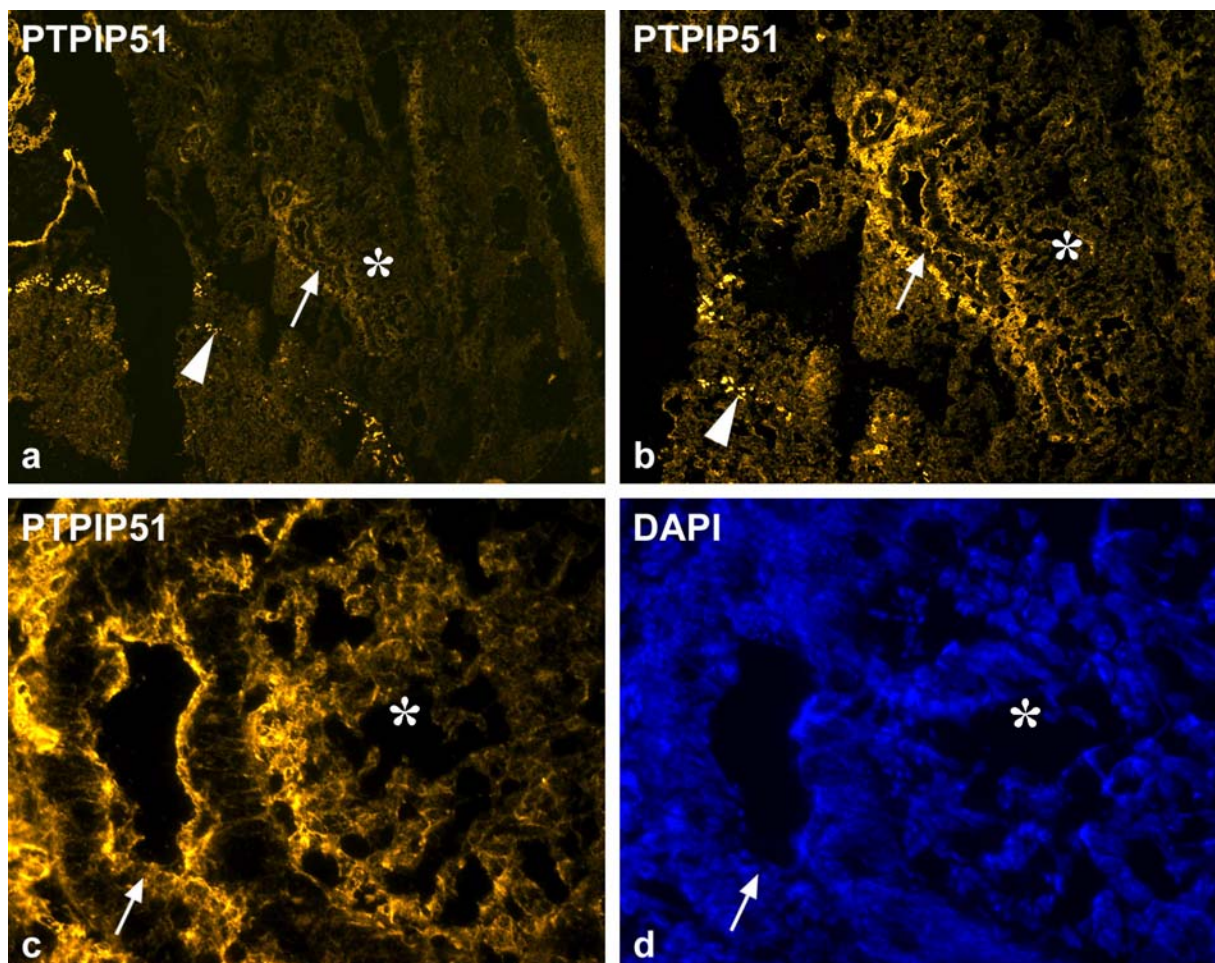


Abbildung 35: Lunge 13. d.p.c.

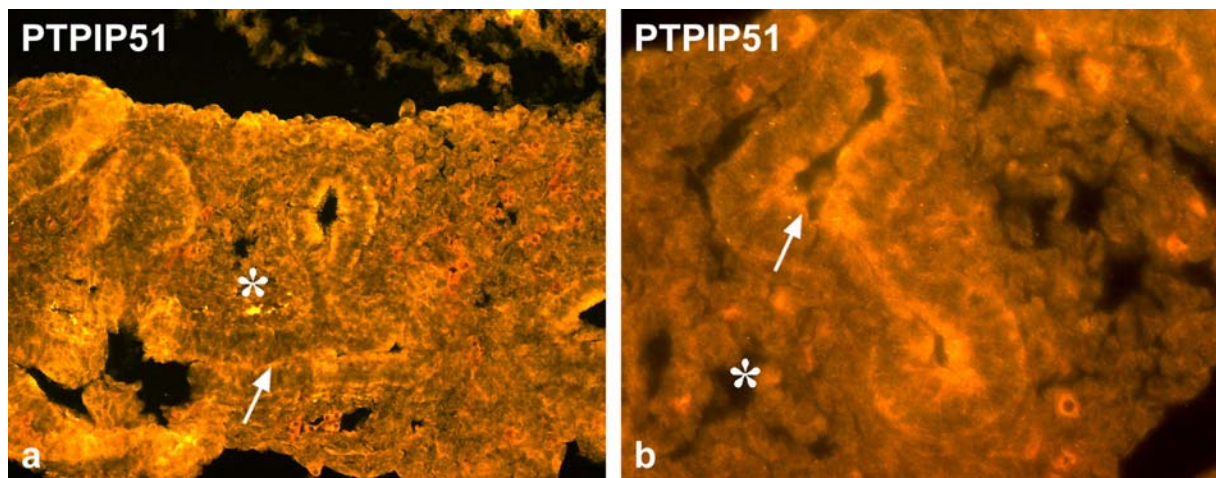
- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel Bronchius; Stern: terminale Bronchien
- b Bronchius (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel Bronchius; Stern: terminale Bronchien
- c Bronchius (400fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel; Stern: terminale Bronchien
- d Bronchius DAPI Färbung (400fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel; Stern: terminale Bronchien

3.6.3 Lunge 14. d.p.c.

Der auf Abbildung 36a im unteren linken Bildviertel angeschnittene Hauptbronchius teilt sich in die Lappen- und Segmentbronchien auf. Auch hier findet sich in den apikalen und basalen Anteilen des respiratorischen Epithels eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper gegen das PTPIP51.

Im oberen Bilddrittel ist deutlich das ebenfalls das Antigen exprimierende Epithel der sich differenzierenden Pleura visceralis zu erkennen.

Abbildung 36b zeigt einen Segmentbronchius in 400facher Vergrößerung. Das respiratorische Epithel zeigt das typische PTPIP51 Expressionsmuster.


Abbildung 36: Lunge 14. d.p.c.

- a Übersicht (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel Bronchius; Stern: noch nicht voll differenzierte terminale Bronchien
- b Bronchius (400fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel Bronchius; Stern: terminale Bronchien, die in die zukünftigen Alveolen übergehen

3.6.4 Lunge 15. d.p.c.

Die 200fache Vergrößerung (Abb. 37a) zeigt den linken Hautbronchius, der sich in die einzelnen Segmentbronchien des Lungenlappens aufteilt. Im respiratorischen Epithel zeigen sich starke Reaktionen mit dem Antikörper gegen das PTPIP51 Antigen, diese

fallen vor allem im apikalen, mit Kinocilien, sowie dem basalen Zellpol auf. Die Tunica muscularis sowie die noch nicht voll ausdifferenzierten hyalinen Knorpelspangen zeigen vereinzelte Reaktionen.

Unterhalb des Pfeils, der das respiratorische Epithel kennzeichnet, verläuft parallel zum Hauptbronchus eine PTPIP51 positive Nervenfaser. Im Lungenparenchym liegen Segmentbronchien mit analogem Wandaufbau. Im Vergleich zum Vortag hat sich das Lungenparenchym weiter aufgelockert. Dies ist vor allem durch die Zunahme an terminalen Bronchien bedingt. Außerdem fallen einzelne Gefäße auf, die vor allem im Vergleich mit der DAPI Färbung (Abb. 37b) hervortreten.

Abbildung 37c zeigt vier hilusnahe Segmentbronchien, die das gleiche PTPIP51 Expressionsmuster aufweisen. Die elastischen Gefäße des linken Truncus pulmonalis zeigen im Endothel eine deutliche Reaktion. Am linken unteren Bildrand ist die im Vergleich hochreaktive Muskulatur des linken Atriums angeschnitten.

Mittels DAPI Färbung (Abb. 37d) kann die Reaktion im respiratorischen Epithel und dem Endothel dem Cytoplasma zugeordnet werden, eine Kernreaktion kann hier ausgeschlossen werden.

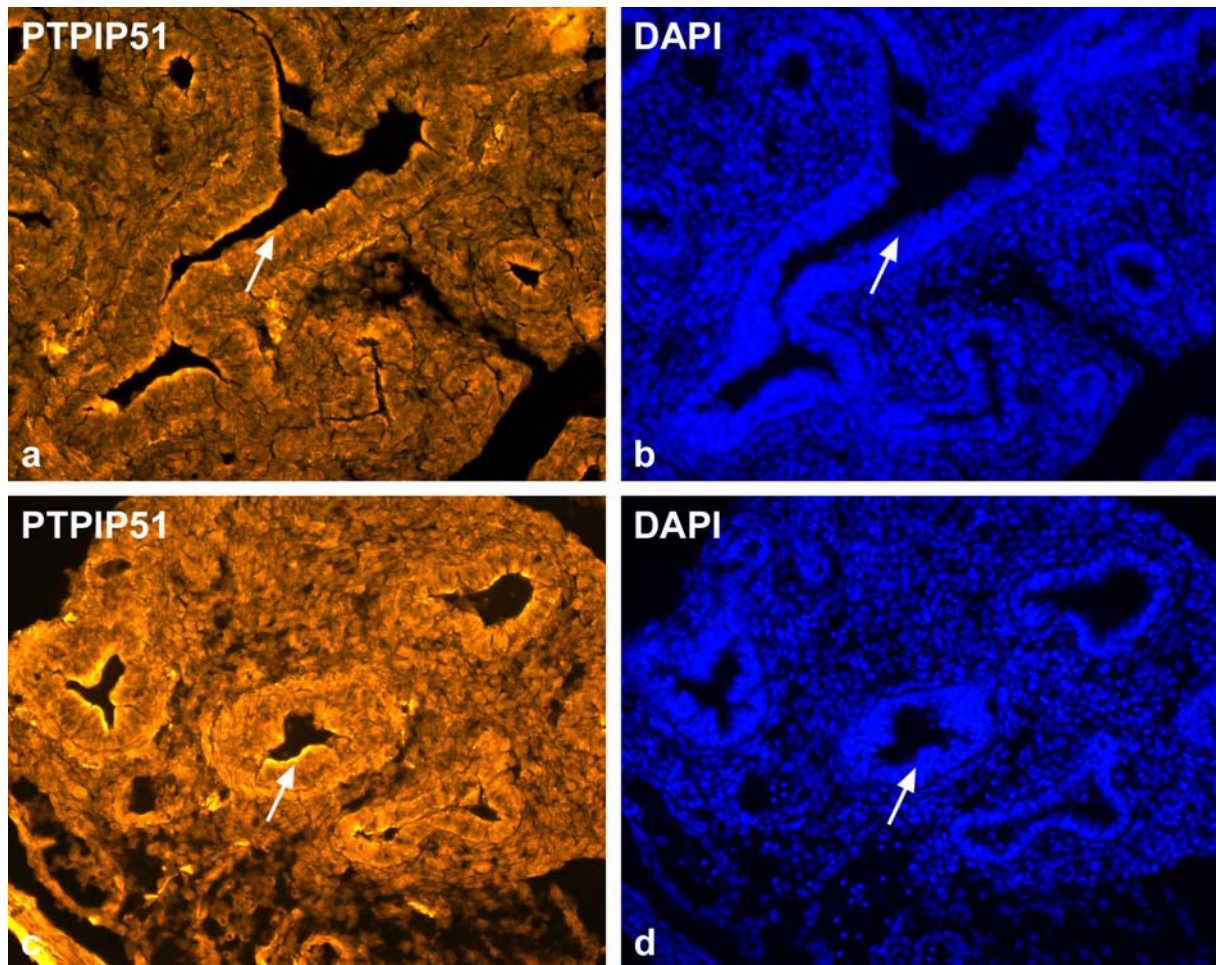


Abbildung 37: Lunge 15. d.p.c.

- a linker Hauptbronchus (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel des linken Hauptbronchus;
- b linker Hauptbronchus (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel des linken Hauptbronchus
- c Segmentbronchien (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel
- d Segmentbronchien DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel

3.6.5 Lunge 16. d.p.c

Bei 50facher Vergrößerung (Abb. 38a) fallen bei der Immunhistochemischenreaktion gegen das PTPIP51 folgende Strukturen besonders auf: besonders stark reaktiv zeigt sich die Muskulatur des Diaphragmas, welche bogenförmig in der rechten Bildhälfte zu erkennen ist. PTPIP51 findet sich auch in der sich entwickelnden Interkostalmuskulatur. Das Lungenparenchym ist von aufgelockerter Konsistenz und die Bronchien fallen als ebenfalls eindeutig reaktive kreisrunde Formationen auf. Sowohl Pleura parietalis als auch visceralis zeigen eine deutliche Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Die Kernfärbung mit DAPI (Abb. 38b) veranschaulicht eindrücklich die hohe

Zellzahl des Lungengewebes. Auch hier sind die einzelnen Bronchien als kreisrunde Strukturen im Lungenparenchym deutlich auszumachen.

Bei 100facher Vergrößerung (Abb. 38c) fallen innerhalb des gezeigten Ausschnittes zwei Bronchien auf, die besonders starke Reaktionen innerhalb der Tunica muscularis und dem hyalinen Knorpel zeigen. Außerdem findet sich das untersuchte Protein in den mit Kinocilien besetzten Zellen des respiratorischen Epithels. Das übrige Lungengewebe zeigt sich bis auf wenige vereinzelte Reaktionen nur wenig reaktiv.

Bei höherer Vergrößerung (400fach, Abb. 38c,d) eines Bronchius tritt die Reaktion innerhalb der Tunica muscularis, dem hyalinen Knorpel der Bronchien und in den mit Kinocilien besetzten Anteilen des respiratorischen Epithels deutlich hervor. Das übrige Lungengewebe erscheint im Vergleich mit den vorherigen Stadien durch eine weitere numerische Zunahme an terminalen Bronchien deutlich aufgelockerter. Die Lunge steht nun am Beginn der alveolären Periode, die durch die Differenzierung der definitiven Alveolen gekennzeichnet sein wird.

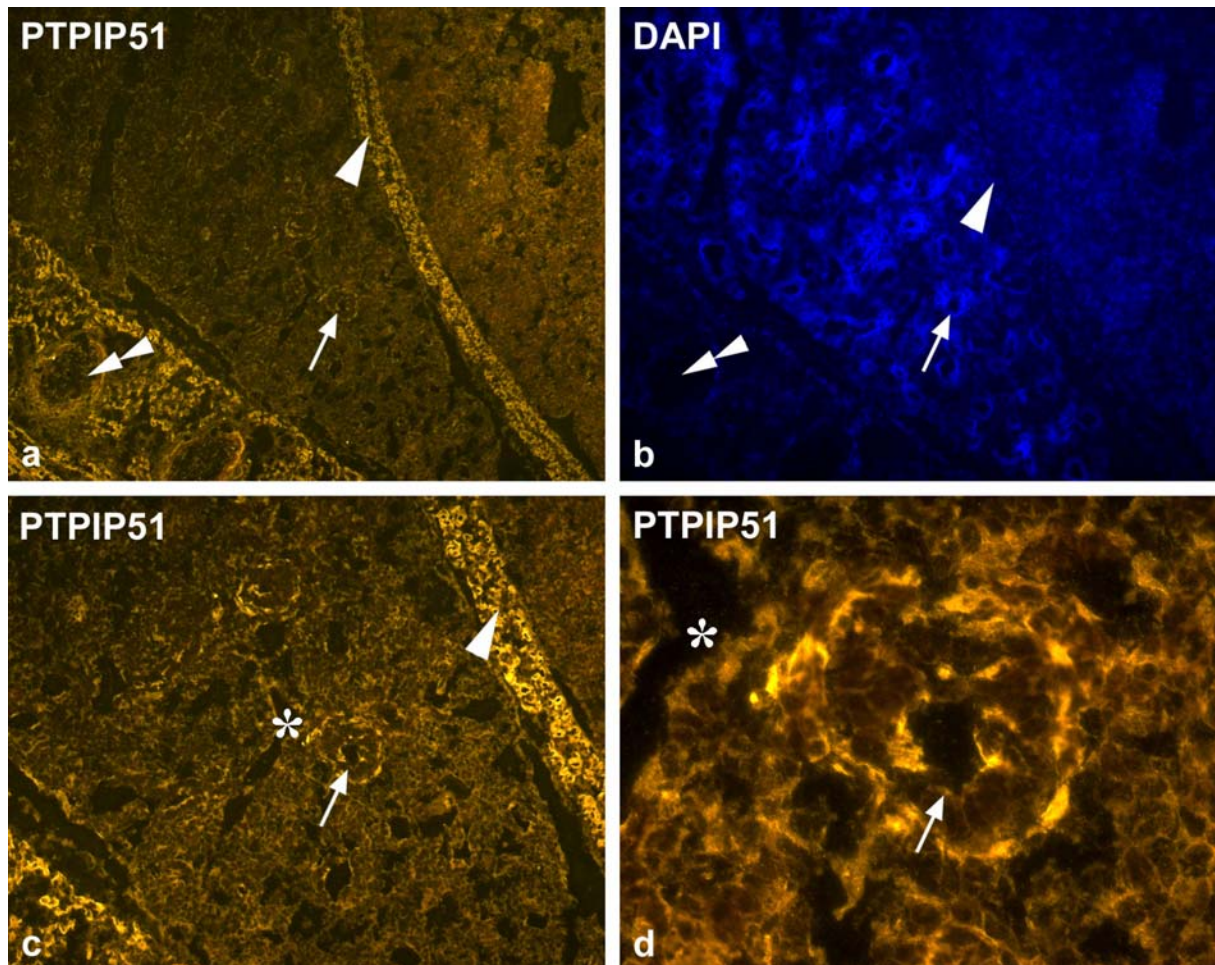


Abbildung 38: Lunge 16. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel eines Bronchius lobaris; doppelte Pfeilspitze: Rippenknorpel
- b Übersicht DAPI (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel eines Bronchius lobaris; doppelte Pfeilspitze: Rippenknorpel
- c Übersicht (100fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel eines Bronchius lobaris; Stern: terminale Bronchien, Pfeilspitze: Diaphragma
- d Bronchius lobaris DAPI Färbung (400fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel; Stern: terminale Bronchien

3.6.6 Lunge 17. d.p.c.

Die 50fache Übersichtsvergrößerung zeigt den Unterlappen des linken Lungenflügels, der vom stark positiv reagierenden Diaphragma und der ebenfalls deutlich angefärbten Interkostalmuskulatur eingefasst wird (Abb. 39a). Innerhalb des Lungenparenchyms erkennt man deutlich eine große Anzahl von verschiedenen Bronchien, die eine für sie typische Reaktion mit dem Antikörper gegen das PTPIP51 zeigen. Das respiratorische Epithel des mit dem Pfeil gekennzeichneten Segmentbronchius zeigt an seiner mit Kinocilien besetzten Oberfläche eine deutliche Reaktion. Das Cytoplasma der

Epithelzellen zeigt jedoch nur eine geringe Reaktion. Jeder der verschiedenen Bronchiustypen wird von einer kontinuierlichen glatten Muskelschicht eingefasst, die deutlich durch den PTPIP51 Antikörper markiert ist. Das Lungenparenchym zeigt keine besonders auffälligen Reaktionen, sondern nur vereinzelt PTPIP51 reaktive Bereiche.

Die 100fache Vergrößerung unterstreicht die oben genannte Beschreibung. Man erkennt einzelne Bronchien, die längs angeschnitten sind und so ein Stück in ihrem Verlauf betrachtet werden können. Auch hier findet sich die gleiche Reaktionskonfiguration im respiratorischen Epithel und der Tunica muscularis.

Am unteren Bildrand erkennt man die deutlich reagierende Interkostalmuskulatur.

Im Vergleich zum Vortag erscheint das Lungengewebe insgesamt deutlich aufgelockerter. Dies dürfte am ehesten dadurch begründet sein, dass es zu einer deutlichen Zunahme an sich terminal differenzierenden Alveolen gekommen ist. Bei 200facher Vergrößerung (Abb. 39c) erkennt man am oberen Bildrand einen Segmentbronchus, der die schon beschriebene Reaktion zeigt. Die Oberfläche des respiratorischen Epithels zeigt eine deutliche Reaktion, die Epithelzellen selbst zeigen nur vereinzelte Reaktionen. Erst die den Segmentbronchus umfassende Tunica muscularis sowie der in das Lungengewebe eingestreute hyaline Knorpel zeigen wieder eine starke Immunfluoreszenz. Im terminalen Bronchus (unterer Bildrand), erkennt man das einschichtig zylindrische Bronchialepithel, welches auf seiner apikalen und basalen Seite eine positive Reaktion mit dem Antikörper aufweist. Die zwischen den Epithelzellen liegenden Becherzellen zeigen keine Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Der Vergleich mit der selektiven DAPI-Zellkernfärbung (Abb. 39d) fällt, wie bereits an den Vortagen beschrieben, aus.

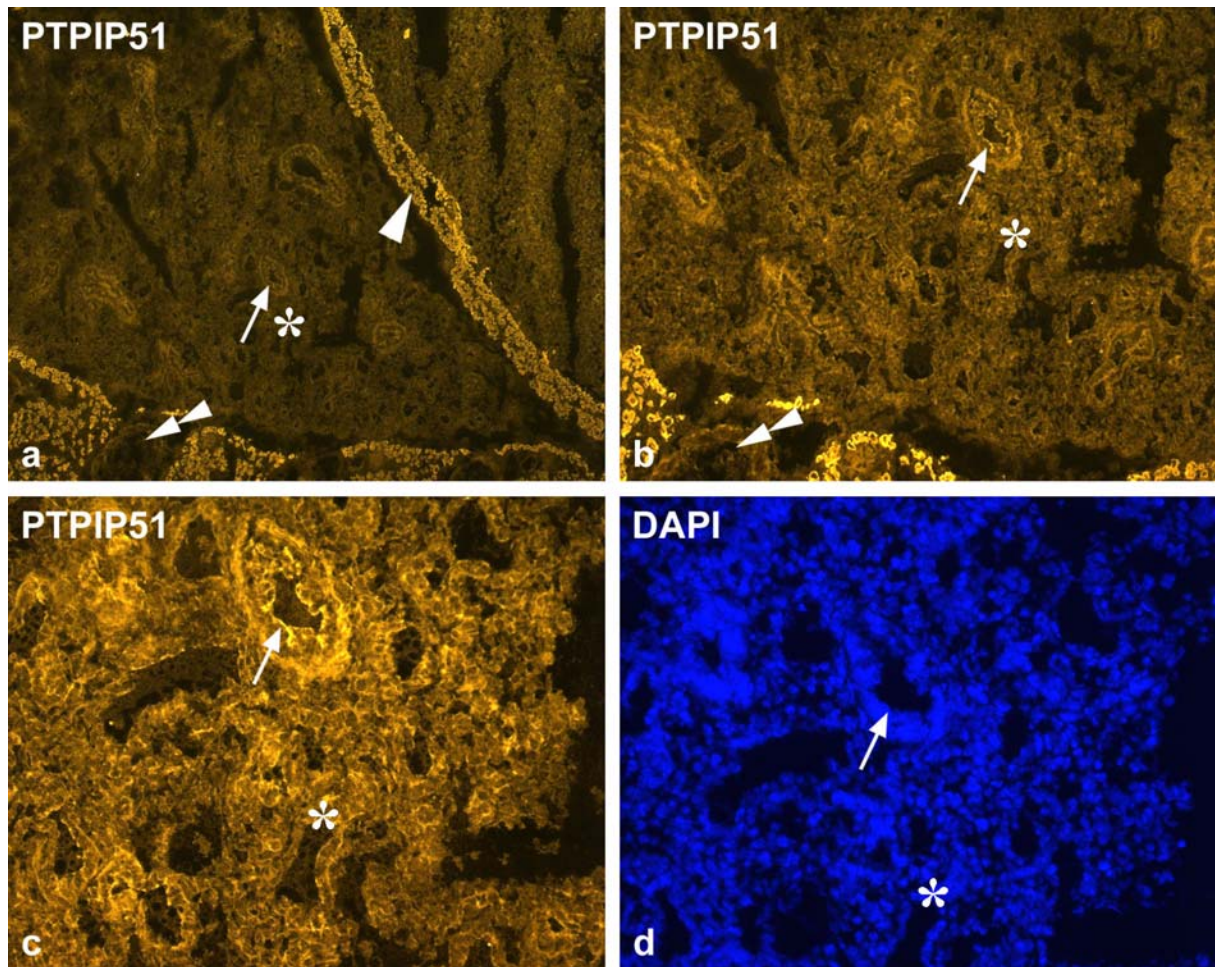


Abbildung 39: Lunge 17. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel eines Segmentbronchus; Stern: terminale Bronchien, die in Alveolen übergehen; doppelte Pfeilspitze: Rippenknorpel
- b Übersicht (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel eines Segmentbronchus; Stern: terminale Bronchien, die in Alveolen übergehen, doppelte Pfeilspitze: Rippenknorpel
- c Segmentbronchus (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel; Stern: Alveolen,
- d Segmentbronchus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel; Stern: terminale Bronchien, die in Alveolen übergehen

3.6.7 Lunge 18. d.p.c.

Bei 50facher Übersichtsvergrößerung (Abb. 40a) erkennt man im Vergleich zu den vorherigen Stadien erneut eine deutliche Auflockerung des Lungengewebes. Dies wird durch die weitere Reifung der Lungen am letzten Tag der Mausentwicklung, die insbesondere durch eine Zunahme an funktionsfähigen Alveolen gekennzeichnet ist, bedingt. Am linken Bildrand ist das positiv reagierende Diaphragma, am rechten oberen Bildrand die ebenfalls positiv angefärbte Pleura parietalis mit den dahinter liegenden Rippen und der reaktiven Intercostalmuskulatur zu erkennen. Innerhalb des

Lungenparenchyms fallen besonders einige im Querschnitt getroffene Bronchien, sowie ein im Längsschnitt getroffener Unterlappenbronchus in seinem Verlauf auf.

Die 100fache Vergrößerung (Abb. 40b) kann die positive Reaktion dem Flimmerepithel, der Tunica muscularis sowie dem hyalinen Knorpel zuordnen. Zusätzlich erkennt man einzelne, den Bronchus versorgende Nervenfasern, die PTPIP51 positiv sind. Darüber hinaus lassen sich einzelne das PTPIP51 Antigen exprimierende Inseln aus hyalinem Knorpel ausmachen.

In Abbildung 40c (200fache Vergrößerung) erkennt man zusätzlich eine positive Reaktion im Endothel der beiden Arterien, die links neben dem Bronchus liegen. Am unteren Bildrand, sowie im linken oberen Quadranten zeigen sich hochreaktive Nervenfasern.

Der Vergleich mit der DAPI Zellkernfärbung (Abb. 40d) bestätigt die cytoplasmatische Lokalisation des PTPIP51 in den Zellen des respiratorischen Epithels.

Die 400fache Vergrößerung (Abb. 40e) untermauert diese Beobachtungen. Die hochreaktiven Fasern in der Bildmitte sind, wenn man die Kernfärbung (Abb. 40f) hinzuzieht, eindeutig dem Cytosol von Axonen zuzuweisen.

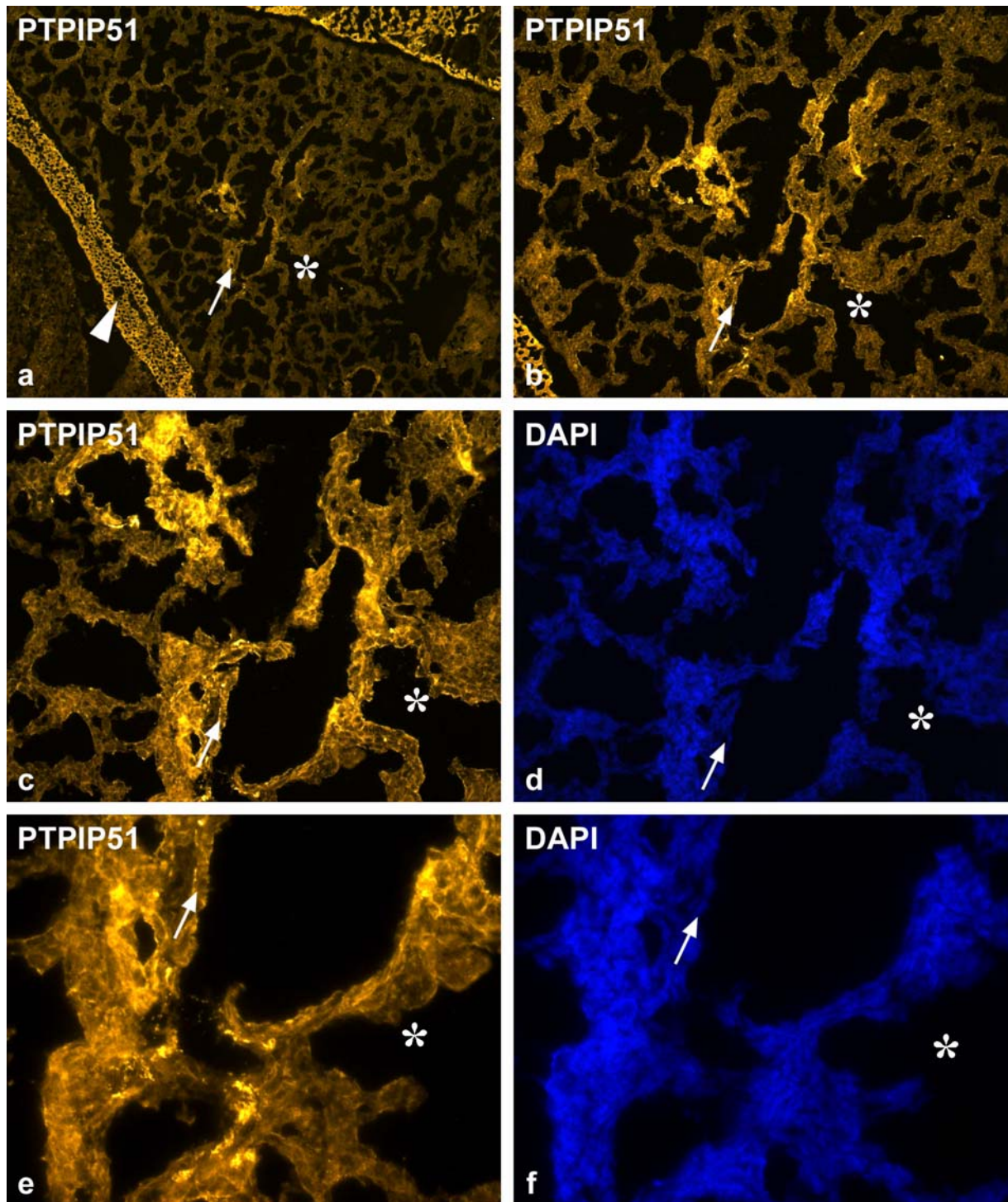


Abbildung 40: Lunge 18. d.p.c.

- a Übersicht (50fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel des Unterlappenbronchus; Stern: terminaler Bronchus, der in die Alveolen übergeht
- b Übersicht (100fache Vergrößerung); Pfeilspitze: Diaphragma; Pfeil: respiratorisches Epithel des Unterlappenbronchus; Stern: terminaler Bronchus, der in die Alveolen übergeht
- c Unterlappenbronchus (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel des Unterlappenbronchus; Stern: Saccus alveolaris
- d Unterlappenbronchus DAPI Färbung (200fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel des Unterlappenbronchus; Stern: Saccus alveolaris

- e Unterlappenbronchius (400fache Vergrößerung); Pfeil: respiratorisches Epithel des Unterlappenbronchius; Stern: Saccus alveolaris
- f Bronchius DAPI Färbung (400fache Vergrößerung): Pfeil: respiratorisches Epithel des Unterlappenbronchius; Stern: Saccus alveolaris

4. Diskussion

4.1 RT-PCR und Western blotting

Durch die PCR ließ sich bei allen untersuchten Stadien die mRNA Expression des PTPIP51 nachweisen. Zusätzlich gelang mittels Western Blotting der Nachweis verschiedener Isoformen des PTPIP51 im Mausembryo in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums. Ab 12. d.p.c. waren Banden mit ~52 kDa und ~45 kDa nachweisbar, ab 13. d.p.c. eine weitere schwache Bande mit ~38kDa.

Die Bande mit ~52 kDa entspricht hierbei der full-length Form von PTPIP51 mit einem theoretisch errechneten Molekulargewicht von 52118 Dalton. Die weiteren Banden mit ~45 kDa und ~38kDa stellen möglicherweise Splicing Varianten dar, oder aber sie entstehen durch die Translation an abweichenden AUG Start Kodons. Die Exone 1, 2 und 3 der humanen cDNA Sequenz beinhalten solche Triplets an ihrem Anfang und das Exon 4 weist ein AUG Triplet auf, das von einer Kozak Sequenz eingefasst wird.

Die potentiellen Isoformen stimmen mit den theoretischen Molekulargewichten von 45368 Da und 38247 Da der verschiedenen Initiationskomplexe überein (Stenzinger et al., 2005). Des weiteren unterstützen die Ergebnisse Beobachtungen von Stenzinger und Mitarbeitern (2005), die eine unterschiedliche Expression potentieller Isoformen in verschiedenen Geweben beobachteten.

Die während der postnatalen Augenentwicklung nachweisbaren Isoformen stimmen mit den bereits oben beschriebenen Ergebnissen überein.

4.2 PTPIP51 in der Augenentwicklung

Mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper kann in den verschiedenen Stadien der Augenentwicklung ein spezifisches Expressionsmuster des Antigens aufgezeigt werden.

Die Epidermis der Augenlider zeigt ab 14. d.p.c. eine Reaktion mit dem Antikörper. Mit fortschreitender Differenzierung kommt es zu einer deutlichen Zunahme an PTPIP51 positiven Zelllagen. Das Expressionsmuster entspricht hierbei demjenigen, das bereits von Thorsten Pfeiffer in seiner Dissertationsarbeit (2006) in der voll differenzierten Epidermis verschiedener Spezies beschrieben wurde. Das mitotisch aktive Stratum basale zeigt keine Reaktionen. Erst die suprabasalen Zellschichten, in denen sich die

Keratinocyten zunehmend differenzieren, zeigen eine starke Antigen-Expression. In diese Differenzierungsprozesse der Epidermis sind verschiedene Marker wie beispielsweise Involucrin, K1 und K10, die früh beobachtet werden können, sowie Filaggrin, Loricin und Transglutaminase, die später auftreten, involviert [Fuchs, 1996, Presland und Dale, 2000, Gibbs et al., 2000]. Diese Differenzierungsmarker sind in den meisten Fällen, ebenso wie das untersuchte Protein, cytosolisch lokalisiert. Das Auftreten der Marker gerade in den suprabasalen Zellschichten unterstützt die Hypothese, dass das PTPIP51 an den Differenzierungsprozessen der Epidermis beteiligt sein könnte.

Ab 12. d.p.c. sind die Vorläufer und in der Folge auch die voll ausdifferenzierte Conjunctiva PTPIP51 positiv. In allen untersuchten Stadien lässt sich stets der immer reaktive Bindehautsack gut bis in seine Ausläufer verfolgen. Beide Blätter der Conjunctiva, das heißt die Tunica conjunctiva palpebrarum und die Tunica conjunctiva bulbi zeigen eine Expression des PTPIP51 Antigens.

Cornea und Conjunctiva unterscheiden sich nur in wenigen Bereichen voneinander. Die Conjunctiva ist im Gegensatz zur Cornea ein hochvaskularisiertes Gewebe. Um die Transparenz der Cornea zu gewährleisten, ist diese nicht vaskularisiert. Sie enthält viele Gap junctions, die die Diffusion von Ionen, von kleinmolekularen Metaboliten und von Signalmolekülen erlauben [Wolosin et al., 2004].

Gemeinsam ist ihnen, dass beide Epithelien die Fähigkeit behalten, sich weiter zu verhornendem Plattenepithel differenzieren zu können [Nakamura et al., 2001]. Dies wird unter physiologischen Bedingungen durch die in der Tränenflüssigkeit gelösten Retinoide verhindert. Bei Neugeborenen, die eine Diät ohne Vitamin A erhielten, konnte eine Verhornung von Conjunctiva und Cornea beobachtet werden [DeMaeyer, 1986].

Die potentielle Möglichkeit der Umwandlung in verhornendes Plattenepithel könnte mit der Expression des möglicherweise in diese Prozesse eingeschalteten PTPIP51 Antigens in Zusammenhang stehen. Das Protein spielt, wie bereits beschrieben, möglicherweise eine Rolle in der Differenzierung von verhornendem Plattenepithel der Epidermis.

Ab 14. d.p.c. finden sich starke Reaktionen in dem noch aus wenigen Zellschichten bestehenden Cornealepithel, sowie in dem auf der Rückseite der Cornea lokalisierten Endothel. Das Stroma erscheint als schmaler wenig reaktiver Saum. Während der

fortschreitenden Entwicklung nimmt die Zahl der PTPIP51 positiven Epithelzellen allmählich zu. Das Stroma der Cornea verdickt sich, und es können ab 16. d.p.c. leicht das Antigen exprimierende Keratocyten ausgemacht werden.

Hierbei sollte bedacht werden, dass die Cornea aus Abkömmlingen unterschiedlicher Keimblätter aufgebaut ist. Mit der Differenzierung des Oberflächenektoderms in die Linse und die Anlage der Cornea, kommt es zu einer Einwanderung von Zellen aus dem Neuralrohr, aus denen dann im weiteren Verlauf die Keratocyten des Stromas sowie das corneale Endothel entstehen [Zieske, 2004]. Da mit dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, dass alle Abkömmlinge der verschiedenen Keimblätter, die die Cornea bilden, PTPIP51 enthalten, kann von einer zentralen Funktion des untersuchten Proteins bei der Differenzierung der einzelnen Keimblätter ausgegangen werden.

Beim Adulten dient das Epithel der Cornea zum Schutz gegen einen Flüssigkeitsverlust sowie als Barriere gegen pathogene Keime. Mit dem Öffnen der Augenlider kommt es zu einer deutlichen Verdickung des cornealen Epithels vom 1. d.p.p. von 12,7µm bis zum 30. d.p.p. auf 49,3µm [Song et al., 2003], was durch eine Zunahme an epithelialen Zelllagen bedingt ist. Zusätzlich kommt es zu einer Formveränderung der basalen Zellreihe. Bis zum 10. d.p.p. zeigen die Zellen ein eher flaches, ovales Aussehen. Unmittelbar mit dem Öffnen der Augenlider zeigen die Zellen eher ein rundliches, cuboidales Aussehen und mit dem 21. d.p.p. kommt es schließlich zu einer cuboidalen, in Säulen angeordneten Konfiguration.

Innerhalb des Epithels kommt es ebenfalls zu deutlichen Differenzierungsprozessen. Über der basalen Zellschicht tritt eine zunehmende Abflachung der Zellen auf. Gleichzeitig bilden sich Desmosomen. Die superfiszialen Zelllagen sind zusätzlich durch tight junctions miteinander verbunden, die die Barrierenfunktion der Cornea gewährleisten [Hogan et al., 1971]. Im Gegensatz zur Epidermis zeigen die cornealen Epithelzellen keinen Zellkernverlust.

Die starke Expression von PTPIP51 in den superfiszialen Zelllagen könnte mit diesen Differenzierungsprozessen in Verbindung stehen.

Wichtig ist die Abgrenzung zwischen Proliferations- und Differenzierungsprozessen. Das Öffnen der Augenlider führt zu einem deutlichen Proliferationsstimulus des cornealen Epithels [Zieske, 2004]. Dieses zeigt bereits vor dem Öffnen der Augenlider eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper. Auch bei der adulten Maus, bei der das

Epithel einen konstanten Umsatz abschilfernder Zellen zeigt, konnte eine starke Expression des Proteins, gerade in den differenzierenden Zelllagen gezeigt werden. Zusammen genommen spricht dies für eine wichtige Rolle von PTPIP51 in Differenzierungsprozessen und weist eher auf eine untergeordnete Rolle in den Proliferationsvorgängen, die unabhängig von der Lokalisation des untersuchten Proteins ablaufen, hin.

Das PTPIP51 Expressionsmuster könnte in Zusammenhang mit einer möglichen Interaktion mit über TGF β 1 und 2 vermittelte Signalkaskaden stehen, da für beide Wachstumsfaktoren gezeigt werden konnte, dass sie eine essentielle Rolle in der Bildung des cornealen Stromas sowie des Endothels der Cornea spielen [Fluegel-Koch et al., 2002; Saika et al., 2001].

Das Endothel dient dazu, das corneale Stroma in einem Zustand relativer Dehydratation zu halten, der für die Transparenz des Stromas zwingend erforderlich ist. Dies wird durch die Ausbildung von tight junctions zwischen den Endothelzellen und eine Pumpenfunktion des Endothels erreicht. Diese Mechanismen erfordern einen hohen Grad der zellulären Differenzierung und Regulation, beides Prozesse in die das untersuchte Protein möglicherweise eingeschaltet sein könnte.

PTPIP51 ist während der Linsenentwicklung zu allen Stadien im einschichtigen anterioren Linsenepithel nachweisbar. Das noch nicht verschlossene Linsenbläschen zeigt am 12. d.p.c in allen Abschnitten eine starke Reaktion mit dem Antikörper. Im weiteren Verlauf schließt sich das Linsenbläschen, und es kommt zu einer Reduktion der Reaktion in die, das PTPIP51 Antigen anfangs stark exprimierenden, Linsenfaserepithelzellen. Ab 16. d.p.c. sind nur noch die in der Äquatorialebene lokalisierten anterioren Linsenepithelzellen, die für die Linsenfaserepithelzellen als Stammzellen dienen, PTPIP51 positiv. Diese Zellen dienen als Reservoir für die Differenzierung in Zellen des anterioren Linsenepithels oder aber in Linsenfaserepithelzellen. Beim erwachsenen Tier zeigen die Linsenkapsel, das anteriore Linsenepithel sowie die äquatoriale Region des Linsenepithels eine starke Reaktion.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer operativen Entfernung des Linsenkörpers die verbleibenden Linsenepithelzellen die Möglichkeit besitzen die Linse zu regenerieren. Diese Regeneration der Linse geht dabei von den Linsenepithelzellen

aus, nicht etwa von den Zellen, die die Linsenfasern produzieren [Gwon, 2006]. In eben diesen Linsenepithelzellen konnte, wie oben beschrieben, das Protein nachgewiesen werden. Es ist also in den Zellen vorhanden, die die Fähigkeit behalten, weitere Differenzierungsprozesse zu durchlaufen.

Die Ausreifung der Linsenfasern ist von Signalen abhängig, die über den FGF-Rezeptor vermittelt werden [Govindarajan und Overbeek, 2001]. Von de longh und seinen Mitarbeitern (1997) wurde beschrieben, dass der FGF-Rezeptor-1 und FGFR2 (IIIb) schwach im anterioren Linsenepithel und stark in der germinativen und transitionalen Zone der Linse exprimiert werden. Diese Expressionmuster unterscheiden sich lediglich punktuell in den Reaktionen mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper, der zusätzlich eine starke Reaktion im anterioren Linsenepithel zeigt. Gleiches gilt auch für die Verteilung des FGFR2 (IIIc), der stark in den Epithelzellen exprimiert wird, aber mit der Linsenfaserdifferenzierung herunterreguliert wird.

Als weitere Faktoren spielen für die Linsenentwicklung eine wichtige Rolle: PDGF α , FGF, TGF β , Insulin sowie der IGF1 und EGF. Die Rezeptoren dieser verschiedenen Faktoren wirken alle über Mechanismen auf die Zelle, die mit Tyrosinphosphorylierungen assoziiert sind [Jacobs et al., 1992; Potts et al., 1994; de longh et al., 1997, 2001; Obata et al., 1999; Ireland and Mrock, 2000], so dass auch hier eine mögliche Interaktion mit dem Protein 51 bestehen kann.

Umeda und Mitarbeiter (2001) haben das Vorkommen einer 18kDa Protein Tyrosin Phosphatase in der Linse beschrieben, die wahrscheinlich in die Familie der LMW-PTPs gehört. Diese ist wahrscheinlich ebenfalls in Signaltransduktionsprozesse eingegliedert, die durch die genannten Faktoren vermittelt werden, und kommt somit als ein weiterer potentieller Interaktionspartner für das PTPIP51 in Betracht.

Ab 12. d.p.c. zeigt sich eine starke Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper in der sich entwickelnden Neuroretina. In diesem noch relativ frühen Stadium der Retinaentwicklung sind vor allem die innere Neuroblastenschicht, - hier insbesondere der Teil, der den späteren Ganglienzellen des N. opticus sowie seiner Axone entspricht - die zukünftigen Rezeptorzellschicht und das in Entwicklung begriffene Pigmentepithel positiv mit dem Antikörper gefärbt. Im weiteren Verlauf kommt es vor allem zu einer numerischen Zunahme an Neuroblasten. Ab 16. d.p.c. kommt es allmählich zu einer klareren Gliederung der Neuroretina. Die Anteile der inneren

Neuroblastenschicht zeigen eine deutliche Reaktion. Gleiches gilt für die in Entwicklung begriffene Rezeptorzellschicht. Am nächsten Tag zeigt sich innerhalb der inneren Neuroblastenschicht eine Zunahme PTIP51 positiver Zellen. Am 18. d.p.c. fällt die Gliederung in die einzelnen Schichten noch deutlicher auf. Diese ist vor allem in einer weiteren Zunahme von PTIP51 reaktiven Zellen in der inneren Neuroblastenschicht begründet. Ab 1. d.p.p. ist die Ganglienzellschicht als solche erstmals deutlich auszumachen. Die unter ihr gelegene, zukünftige innere plexiforme Schicht ist ebenfalls hochreaktiv. Darunter lassen sich Vorläufer der inneren Körnerschicht als Saum wenig reaktiver Zellen erkennen. Hierauf folgt die zukünftige äußere plexiforme Schicht, die ebenfalls starke Reaktionen mit dem Antikörper gegen das Protein zeigt. Der hier reaktiv hervortretende Anteil könnte der zukünftigen Mittelzone entsprechen. Hier sind die synaptischen Verbindungen zwischen Stäbchen und Zapfen mit Bipolar- und Horizontalzellen angesiedelt. Dieser Abschnitt ist durch eine hohe Spezialisierung mit gap junctions zwischen den Rezeptorzellen sowie flachen synaptischen Kontakten zwischen Bipolar- und Rezeptorzellen gekennzeichnet. Dieser hohe Differenzierungsgrad kann die Ursache für die starke Expression des PTIP51 Antigens sein. Die äußere Körnerschicht zeigt lediglich spärliche Reaktionen. Die sich entwickelnde Rezeptorzellschicht zeigt hingegen eine starke Reaktion. Die Innensegmente der Rezeptorzellen zeigen zu diesem Zeitpunkt einen deutlichen Differenzierungsfortschritt. Sie sind durch einen hohen Anteil an Mitochondrien, glattem ER, freien Ribosomen und Anteilen des Golgiapparates gekennzeichnet. Lv et al. (2006), sowie Stenzinger et al. (2006) haben eine Assoziation des PTIP51 zu Mitochondrien beschrieben. Des weiteren wurde von Welte (2000) beschrieben, dass das Protein cytosolisch lokalisiert ist und wahrscheinlich mit der Membran des endoplasmatischen Reticulums assoziiert ist. Der relative Reichtum an beiden genannten Organellen in der beschriebenen Region korreliert gut mit diesen Beobachtungen. Die folgenden Tage der postnatalen Augenentwicklung sind vor allem durch ein Remodeling der Retina gekennzeichnet. Alle Schichten der Retina sind angelegt und durch einen im Vergleich zum adulten Tier hohen Zellreichtum gekennzeichnet. Ab 21. d.p.c. zeigt sich die äußere plexiforme Schicht nicht mehr reaktiv. Die Retina hat die Konfiguration des adulten Tieres erreicht. Starke Reaktionen mit dem gegen das PTIP51 gerichteten Antikörper fallen in den Ganglienzellen des N.

opticus, der inneren Körnerschicht, den Außensegmenten der Rezeptorzellen und dem Pigmentepithel auf.

Es konnte gezeigt werden, dass die für die Linsenentwicklung genannten Faktoren und deren Rezeptoren (FGF, FGFR, PDGF, TGF, Insulin, IGF und EGF) auch für die Entwicklung der Neuroretina eine bedeutende Rolle spielen (Kinkl, et al. 2002; McCabe et al., 1999; Pimentel et al., 2002; Vetter und Moore, 2001; Zhang et al., 2005). Auch hier gilt, dass das PTPIP51 möglicherweise in die Signaltransduktionsprozesse der einzelnen Faktoren eingebunden sein könnte.

Weiterhin konnte für die Retina des Huhns gezeigt werden, dass das Wachstum der Neuriten der Retina durch ein molekulares System reguliert wird, dass eine Spaltform der PTP1B als wichtige Komponente beinhaltet (Pathre et al., 2001). Das Neuritenwachstum wird darüber hinaus in vitro durch die RPTP und die PTP μ reguliert (Ensslen and Brady-Kalnay, 2004). Diese Forschungsgruppe (2003) wies außerdem nach, dass es während späterer Stadien der Retinaentwicklung zu einer Restriktion der PTP μ auf die innere plexiforme Schicht und die Ganglienzellen, mitsamt der Axone, zu späteren Stadien kommt. Diese Verteilung entspricht dem in dieser Arbeit dargestellten Reaktionsmuster des PTPIP51 und macht eine mögliche Interaktion mit diesem wahrscheinlich.

Während der Embryogenese kommt es neben den genannten Enzymen in den Müllerzellen und den plexiformen Schichten der Retina zum Auftreten auch von anderen Proteinen, die an Tyrosin Resten phosphoryliert werden (Biscardi et al., 1993; Shores und Maness, 1989).

Untersuchungen von Bell et al. (1999) konnten zeigen, dass Licht die Tyrosin-Phosphorylierung in den Außensegmenten der Stäbchen stimuliert, was auf eine aktive Rolle von PTPs in den Photorezeptoren weist und eine mögliche Erklärung für die Expression des PTPIP51 in den muren Photorezeptoren ist.

Gotho et al. (2004) haben gezeigt, dass über FGF ablaufende Signalkaskaden, vermittelt über den FGF-Rezeptor, das Protein FRS2 α phosphorylieren. Dieses Protein beinhaltet sechs Tyrosinreste, die durch das Adaptor Protein Grb2 und die PTP Shp2 phosphoryliert werden können und so in die über FGF vermittelten Transduktionsprozesse eingeschaltet sind. Eine Ausschaltung des FRS2 α Genes führt zum frühen Versterben des Embryos. Eine Mutation der Shp2 Bindungsstellen führte

zu unterschiedlichen Defekten in der Augenentwicklung und reichte vom Zustand der Microophthalmie bis hin zur Anophthalmie. Das genannte Protein könnte ein weiterer möglicher Interaktionspartner des PTPIP51 in der über FGF regulierten Signalkaskade sein und zeigt eindrücklich wie essentiell die Tyrosinphosphorylierung und deren Regulation für die Augenentwicklung sind.

Das Pigmentepithel zeigte vor allem am 12. d.p.c. eine starke Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. In den folgenden Stadien war das Pigmentepithel nicht mehr so stark PTPIP51 positiv, exprimierte aber weiterhin deutlich das Antigen. Ab 11,5 d.p.c. enthält das Pigmentepithel Melanin und ist funktionell ausdifferenziert (Raymond und Jackson, 1995). Versuche dieser genannten Autoren konnten zeigen, dass das Pigmentepithel eine wichtige Rolle für die Differenzierung der Neuroretina spielt. Insbesondere der laminäre Aufbau der Retina ist vom Vorhandensein des Pigmentepithels abhängig. Veränderungen der Genexpression, die die Bildung des Pigmentepithels verhindern, führen zum Versagen der Retinaentwicklung sowie zum Ausbleiben der Differenzierung weiterer wichtiger Strukturen des Auges, woraus letztendlich eine Anophthalmie resultiert.

Die Augenmuskeln reagieren von Beginn der Augenentwicklung bis zum adulten Tier stets PTPIP51 positiv. Im Gegensatz zu den komplett reaktiven Augenmuskeln, die aus verschiedenen Faserntypen bestehen, zeigt sich in der Skelettmuskulatur eine enge Assoziation zu Muskelfasern des Typs IIa (Stenzinger et al., 2005). Dies ist möglicherweise durch die Feststellung von McLoon und Mitarbeitern (2004) erklärbar, die zeigen konnten, dass in den Augenmuskeln ein kontinuierliches und das gesamte Leben andauerndes Remodeling der Muskelfibertypen stattfindet. Des Weiteren haben Rubinstein und Hoh (2000) das Vorhandensein von schweren Ketten des embryonalen Myosins in den Augenmuskeln aufgezeigt. Dies spricht für Differenzierungsprozesse in den Augenmuskeln, die kontinuierlich andauern und mit jenen der Embryonalentwicklung vergleichbar sind.

4.2.1 TUNEL Assays der post partalen Augenentwicklung

TUNEL Assays der postpartalen Augenentwicklung zeigen lediglich punktuelle Kolokalisationen von PTPIP51 in apoptotischen Zellen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es lediglich bei der Überexpression der gesamten Aminosäuresequenz von

PTPIP51, die am N-Terminus eine Verankerungssequenz für die Mitochondrienmembran enthält, zur Induktion apoptotischer Prozesse gekommen ist (Lv et al., 2006). Fehlt diese Sequenz, liegt das Protein in cytosolischer Form vor und es verliert die Fähigkeit Apoptose zu induzieren.

Dies macht es insgesamt unwahrscheinlich, dass PTPIP51 exklusiv in die Regulation apoptotischer Prozesse eingeschaltet ist. Unterstützt wird dies beispielsweise durch die deutliche Expression des Proteins in der Neuroretina des adulten Tieres, bei dem alle Remodelling-Prozesse abgeschlossen sind.

Wichtig zu beachten ist darüber hinaus, dass mit dem TUNEL Assay lediglich solche Zellen markiert werden, deren DNA bereits fragmentiert ist, aber nicht alle Zellen, die in Apoptose übergehen.

4.2.2 Synaptophysin Kolokalisation

Sharma und Mitarbeiter (2003) haben eine Assoziation von Synaptophysin zur Synaptogenese in der äußeren plexiformen Schicht der Mausretina zwischen dem 5. bis 7. d.p.p. beschrieben. Es kommt zur Ausbildung von Actin und Tubulin, die eine spezifische Ausrichtung der Zellen wahrscheinlich macht. Diese Reaktion stimmt mit der hier beschriebenen Kolokalisation von PTPIP51 und Synaptophysin in der äußeren plexiformen Schicht überein, so dass eine Interaktion von PTPIP51 in diese Prozesse wahrscheinlich ist.

4.2.3 Calbindin Kolokalisation

Calbindin färbt selektiv Zellen der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht [Sharma et al., 2003]. Die hier beschriebene Kolokalisation mit PTPIP51 ermöglicht es die retinalen Ganglienzellen somit sicher zu identifizieren. Rogers (2007) konnte zeigen, dass Calbindin in vielen Zellen des Gehirns von Hühnern nachweisbar ist und spekulierte, dass Calbindin möglicherweise in die Signalkaskaden dieser Zellen eingebunden ist. Es ist unwahrscheinlich, dass PTPIP51 ausschließlich in diese Signalkaskaden eingebunden ist, aber eine Interaktion mit den über Calbindin vermittelten Signalkaskaden ist möglich. Weiterhin konnten Ellis und Mitarbeiter (2001) zeigen, dass die Calbindin Expression in der Retina von Hühnern abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen ist. Sie stellten fest, dass die Synaptogenese kongruent

mit dem Auftreten von Calbindin in der sich entwickelnden Neuroretina ist. Möglicherweise spielt PTPIP51, wie bereits oben beschrieben eine Rolle in der Ausbildung der synaptischen Zell-Zell-Kontakte.

4.2.4 In situ Hybridisierung des 14. und 15. d.p.c.

Mittels in situ Hybridisierung konnte der Nachweis der mRNA von PTPIP51 zu den oben dargestellten Stadien erbracht werden. Hierbei entspricht die Lokalisation der mRNA derjenigen der Immunhistochemie.

4.3 PTPIP51 in der Entwicklung der Plexus choroidei

Ab 12. d.p.c. zeigen sich starke Reaktionen mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper im Plexusepithel am Dach des vierten Ventrikels. Vor allem in den basalen - und apikalen Zellanteilen ist eine Expression des Antigens zu beobachten, wobei am apikalen Zellpol einzelne reaktive Granula hervortreten. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer deutlichen Größenzunahme der Plexus choroidei. Das Expressionsmuster des PTPIP51 bleibt dabei im Wesentlichen gleich. Am 18. d.p.c. finden sich weiterhin positiv reagierende Granula, die den Bereichen der Basalkörperchen der Kinocilien zugeordnet werden können. Das Cytosol des Plexusepithels zeigt ebenfalls eine Reaktion. Das Endothel der Gefäße, die aus der Tela choroidea hervorgehen, zeigt zu allen betrachteten Stadien keine PTPIP51-Antigen-Expression.

Die Plexus choroidei nehmen in der Hirnentwicklung eine besonders wichtige Stellung ein. Sie zeigen schon früh ultrastrukturell alle Eigenschaften des adulten Tieres [Reid et al. 2000, Dziegielewska et al. 2000]: so sind die Zellen durch tight junctions miteinander verbunden [Møllgård und Saunders, 1986] und die Enzymausstattung entspricht dem voll entwickelten Stadium [Catala, 1998].

Unterschiede finden sich lediglich in der Zusammensetzung des produzierten Liquor cerebrospinalis. Bei dem unreifen, sich entwickelnden Hirn finden sich im Liquor höhere Konzentrationen sowohl von Proteinen als auch an kleinen, fettunlöslichen Molekülen, die immunologisch denen des Blutplasmas gleichen [Dziegielewska et al., 2001]. Im Rahmen dieser Beobachtungen stieß man auf spezifische regulierte Transportsysteme, die durch ein System aus tubulären Zisternen und dem ER bestehen, TER genannt. Møllgård und Rostgard (1978) konnten mit Aican blau, das an Albumin gebunden wird,

zeigen, dass dieses System vor allem an Albumin gebundene Moleküle transportiert. Weitere Versuche konnten zeigen, dass wahrscheinlich auch andere, für die Entwicklung essentielle Proteine über dieses System durch die Plexusepithelien transportiert werden [Balslev et al., 1997].

Desmond und Jacobson (1977) konnten am Hühnerembryo zeigen, dass der Liquor cerebrospinalis in seiner spezifischen Zusammensetzung beim Embryo eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Hirnbläschen spielt. Durch eine Intubation der Liquor-gefüllten Räume kam es zum Verlust der charakteristischen Hirnform. Im Weiteren zeigte das Hirn einen unorganisierten Aufbau.

Insgesamt geht man davon aus, dass der Liquor bei der Entwicklung der zentralnervösen Strukturen die für die Differenzierung benötigten Substanzen zur Verfügung stellt. Die Hirnsubstanz ist gerade in den frühen Entwicklungsstadien noch nicht ausreichend vaskularisiert, weshalb die benötigten Nährstoffe über den Liquor bereitgestellt werden müssen. Lefauconnier (1992) hat beispielsweise beschrieben, dass die Blut-Hirn-Schranke des Embryos durch eine im Vergleich zum Adulten höhere Anzahl an Aminosäuretransportern charakterisiert ist.

Das hier untersuchte Protein könnte möglicherweise in die Regulation der einzelnen Transportprozesse involviert sein. Hier ist erneut auf die bereits von Welte (2000) beschriebene Assoziation des Proteins zum ER hinzuweisen, das beim Plexus choroideus, wie oben dargestellt, als TER ein spezifisches Transportsystem für die bei der Hirnentwicklung essentiellen Nährstoffe bildet.

An Ratten, die einen Apoplex erlitten, konnte gezeigt werden, dass es in der Folge zu einer Proliferation und Differenzierung des Plexusepithels kam. Dies führte zu der Annahme, dass die Plexusepithelien potentiell zu neuronalen Regenerationsprozessen auch bei adulten Tieren beitragen [Li et al., 2002]. Diese Beobachtung korreliert gut mit der oben genannten Hypothese, dass PTPIP51 positive Zellen auch beim Adulten die Fähigkeit behalten, weitere Differenzierungsprozesse zu durchlaufen. Ähnliche Beobachtungen, die zu der gleichen Vermutung führten, ließen sich bei der Augenentwicklung beispielsweise für die Cornea und die Linse machen.

Reid und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass die Entwicklung des Plexus choroideus der Maus wahrscheinlich über FGF und seine Rezeptoren reguliert wird. Während der Entwicklung kommt es zu einer unterschiedlichen Expression der

einzelnen FGFR. Die FGFR2 IIIb und IIIc wurden ab 12,5 d.p.c. stark exprimiert. Mit fortschreitender Entwicklung kam es zu einer Reduktion der Rezeptorverteilung auf das Plexusepithel. Die Autoren gehen davon aus, dass der FGFR2 während des gesamten Lebens exprimiert wird und möglicherweise für die normale Funktion der Plexus choroidei eine essentielle Rolle spielt.

Für den FGFR1 zeigte sich ab 12. d.p.c. eine Abnahme der Expression, der FGFR3 war ab 12,5 d.p.c. im Nucleus nachweisbar und FGFR4 war am 12,5 d.p.c. in den Plexus nachweisbar, verschwand aber ab 15,5 d.p.c.

Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Funktion von FGF und seinen Rezeptoren während der Ontogenese des Plexus choroideus.

Die Rezeptorverteilung der FGFR2 IIIb und IIIc entspricht vollständig der des PTPIP51 Antigens im Plexus choroideus, so dass eine mögliche Interaktion des hier untersuchten Proteins mit diesem wahrscheinlich ist. Gleiches ist auch, wie an entsprechender Stelle bereits dargestellt, für die Vorgänge in der Linse während der Augenentwicklung denkbar, hier könnte es zu Interaktionen von PTPIP51 mit diesen Rezeptoren und den über FGF vermittelten Signalkaskaden kommen.

4.4 PTPIP51 in der Zungenentwicklung

Das Epithel des zukünftigen Mundbodens, des Gaumens und das die Zunge bedeckende Epithel zeigen am 12. und 13. d.p.c. eine Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Während der folgenden Entwicklungsstadien lassen sich nur schwache Reaktionen, vor allem in den apikalen Anteilen der Epithelien, erkennen. Mit dem 16. d.p.c., an dem die Zunge morphologisch beinahe der des erwachsenen Tieres entspricht, finden sich starke Reaktionen in dem Epithel des Mundbodens und der Zunge. Der Gaumen zeigt sich im Vergleich nur wenig reaktiv. Ab 17. d.p.c. zeigen alle Epithelien des Mundraumes eine gleichmäßig starke Expression des Antigens.

Das Zungenepithel unterscheidet sich durch die Ausbildung der einzelnen Papillenformen stark von den anderen Epithelien. Als erster Papillentyp des Zungenrückens bilden sich die Papillae fungiformes. Diese entstehen aus Epithelverdickungen, die am 12,5 d.p.c. entstehen [Kim et al., 2003]. Während des 13.-16. d.p.c. kommt es dann zu Wechselwirkungen zwischen dem unter dem Epithel

liegenden Mesenchym und dem Epithel. Hierbei ist auffällig, dass morphologisch gezeigt werden konnte, dass die Signalmoleküle Shh und Bmp-4, die diese Prozesse regulieren, vor allem im Epithel lokalisiert sind [Kim et al., 2003].

Das PTPIP51 ließ sich während der genannten Tage vor allem in den apikalen Anteilen des Epithels nachweisen, so dass eine Interaktion mit den ablaufenden Signaltransduktionsprozessen denkbar ist. Zwischen dem 14.-15. d.p.c. finden sich jedoch nur spärliche Reaktionen in den apikalen Anteilen des Epithels des Zungenrückens. Während dieses Zeitraumes kommt es jedoch zur weiteren Differenzierung der Papillenanlagen, so dass eine Beteiligung des untersuchten Proteins an der Ausbildung der Papillen des Zungenrückens eher unwahrscheinlich ist. Ab 16. d.p.c kommt es zur Keratinisierung des Zungenepithels [Dahl, et al. 1995]. Wie im Abschnitt zur Epidermis der Augenlider aufgezeigt wird, ist eine Beteiligung des PTPIP51 an der Regulation der Differenzierungsprozesse, die zur Verhornung führen, sehr wahrscheinlich. Ab 16. d.p.c. zeigt auch das Zungenepithel wieder eine starke Reaktion mit dem Antikörper.

Xuguang (2005) konnte ab 11. bis 15. d.p.c. sporadisch apoptotische Zellen im Mesenchym und dem Epithel des Zungenrückens nachweisen. Bei den Entwicklungstagen vom 16. bis 18. d.p.c. kam es zu einer Zunahme an apoptotischen Zellen, die vor allem in den suprabasalen Zelllagen des Epithels der Zunge nachweisbar waren. Hier findet sich auch eine starke Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper, die für eine Beteiligung des Proteins an apoptotischen Prozessen spricht.

Die intrinsische - und extrinsische Zungenmuskulatur zeigt mit dem 12. d.p.c. eine starke Expression des PTPIP51 Antigens, die in allen folgenden Stadien und beim adulten Tier erhalten bleibt. Die Zungenmuskulatur unterscheidet sich in den ablaufenden Differenzierungsprozessen grundlegend von der restlichen Skelettmuskulatur. Sie spielt für viele physiologische Prozesse wie das Saugen, Schlucken, Kauen, Atmen und Sprechen ab der Geburt eine wichtige Rolle und muss ihre Differenzierung zu diesem Zeitpunkt weitestgehend abgeschlossen haben.

Allen Muskelzellen ist eine in fünf Stufen ablaufende Differenzierung gemeinsam. In der ersten Stufe erfolgt in den Somiten die Differenzierung von undifferenzierten Vorläuferzellen zu Muskelvorläuferzellen. Der nächste Schritt besteht in der

Auswanderung der Muskelvorläuferzellen zu den Orten, an denen die Muskelanlagen gebildet werden. Hier kommt es dann in der dritten Stufe zur Proliferation der Zellen und zur Differenzierung in Myoblasten. Anschließend schließen sich zwischen dem 13. bis 15. d.p.c. die einzelnen Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben zusammen. In der letzten Stufe kommt es dann schließlich ab 15. d.p.c bis zur Geburt zur Reifung der Myotuben zu Muskelfasern, die einen bestimmten Fasertyp aufweisen [Nagata und Yamane, 2004].

Für TGF α und den korrespondierenden EGF-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle in der Differenzierung von Myoblasten spielen [Yamane et al., 2003]. Während der Muskelzelldifferenzierung zwischen dem 11. bis 15. d.p.c. kam es unter dem Einfluss von TGF α und EGF zu einer 22fachen Zunahme an Desmin, einem muskelspezifischem Strukturprotein, das in Myoblasten, Myotuben und Muskelfasern vorkommt [Yamane et al., 1998]. Olson et al. (1991, 1992) haben gezeigt, dass FGF und TGF β die Proliferation von Myoblasten der Zungenanlage stimulieren und die weitere Differenzierung inhibieren. IGF I und II, die in Kolokalisation mit dem IGFR1 vorkommen, stimulieren sowohl Proliferation als auch Differenzierung der Myoblasten der Zungenanlage [Ewton et al., 1994; Rosenthal und Cheng, 1995; Engert et al., 1996; Florini et al., 1996, Yoshiko et al., 1996, Yamane et al., 2000].

Sämtliche hier genannten Faktoren spielen eine Rolle bei der Augenentwicklung und zum Teil auch bei der Entwicklung der Plexus choroidei. An den entsprechenden Stellen wurde bereits auf eine mögliche Einbindung des hier untersuchten Proteins in die über die einzelnen Faktoren und Rezeptoren regulierten Signalkaskaden hingewiesen. Auch für die Entwicklung der Zunge ist dies als überaus wahrscheinlich anzusehen.

Die Zunge zeigt auf dem Weg zur vollen Differenzierung ein unterschiedliches Expressionmuster von schweren Myosinketten. Bei der neugeborenen Maus sind die Muskelfasern vor allem aus embryonalen und für das Neugeborene typischen Fasern zusammengesetzt. Mit fortschreitender Entwicklung kommt es vom 7. bis 21. d.p.p. zur intermittierenden Expression von einem niedrigen Anteil an Typ IIa Fasern, beim Überwiegen von für das Neugeborene typischen Fasern und zum späteren Zeitpunkt von IIX/IID Fasern. Mit der Reifung der Zunge kommt es zu einer weiteren Zunahme an

IIX/IID Fasern und IIB Fasern, die beim 90 Tage alten Tier vorherrschend sind [Agbulut et al., 2003].

Stenzinger et al. (2005) haben eine Assoziation von dem PTPIP51 zu Fasern des schnellen Typs (IIa) beschrieben. In der Zunge ist eine solche Assoziation nicht nachweisbar. Zu den untersuchten Stadien liegen vorwiegend schwere Ketten des Myosins vom embryonalen - und neugeborenen Typ vor, die in allen Stadien eine starke Expression des PTPIP51 Antigens zeigen.

4.5 PTPIP51 in der Lungenentwicklung

Am 12. Tag der embryonalen Entwicklung der Maus findet man eine starke Expression des PTPIP51 Antigens im respiratorischen Epithel der Haupt- sowie der Segmentbronchien. Vor allem die apikalen Anteile des respiratorischen Epithels, die von Kinocilien besetzt sind, sowie das Cytosol zeigen sich PTPIP 51 positiv. Im Bereich der Zellkontakte des respiratorischen Epithels zeigen sich deutliche Reaktionen mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Dieses PTPIP51 Reaktionsmuster bleibt in den folgenden Stadien und beim adulten Tier gleich.

Das die Bronchien umgebende Mesenchym, welches sich im Weiteren in die Muskulatur und das Knorpelgewebe differenzieren wird, zeigt ebenfalls eine positive Reaktion mit dem Antikörper. Die übrigen Anteile des zukünftigen Lungenparenchyms zeigen lediglich vereinzelt PTPIP51 reaktive Zellen und wirken noch sehr plump. Mit den folgenden Entwicklungstagen kommt es zu einer sukzessiven Auflockerung des Gewebes durch die Ausbildung der Bronchi intrasegmentales, der Bronchioli, der Bronchioli terminales und schließlich der Alveolen.

Ab 15. d.p.c. lässt sich in den Knorpelanlagen der Bronchien eine Expression des PTPIP51 Antigens nachweisen. Auch das die Bronchien versorgende Nervensystem zeigt hier eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper.

Die Gefäße des Truncus pulmonalis reagieren in ihrem Endothel PTPIP51 positiv.

Die sich entwickelnde Pleura visceralis und - parietalis zeigen ab 12. d.p.c. sowie in allen folgenden Stadien eine deutliche Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Lungenentwicklung über verschiedene auto- und parakrine Faktoren reguliert wird. In diese Prozesse sind beispielsweise EGF,

FGF, HGF, IGF, PDGF und TGF β eingebunden. Generell gilt hierbei, dass alle Faktoren, wie EGF, FGF, IGF und PDGF, die die zellulären Signalkaskaden über entsprechende Tyrosin Kinase assoziierte Rezeptoren initiieren, einen stimulierenden Effekt auf die Morphogenese der Lunge aufweisen [Warburton et al., 2000]. In diese Signaltransduktionsprozesse könnte das hier untersuchte Protein eingebunden sein. Dafür sprechen die häufig beobachteten Kollokalisierungen mit den genannten Rezeptoren, wie zum Beispiel bei der Entwicklung des Auges, des Plexus choroideus und der Zunge. Hier konnte gezeigt werden, dass einzelne der oben genannten Moleküle in deren Regulation involviert sind.

Während der Lungenentwicklung kommt es durch Interaktionen zwischen dem respiratorischen Epithel und dem umgebenden Mesenchym zu einer Kontrolle der mesenchymalen Genexpression, die wiederum einen Einfluss auf die Differenzierung des Epithels hat [Warburton et al., 2000]. Auch bei der Zungenentwicklung kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den stets PTPIP51 reaktiven epithelialen Anteilen und dem areaktiven Mesenchym im Falle der Differenzierung der Zungenpapillen. In die Mechanismen, die die Differenzierung des Epithels regulieren, dürfte demnach das hier untersuchte Protein eingeschaltet sein.

Die Vorläuferzellen des respiratorischen Epithels haben während den frühen Entwicklungsstadien die Fähigkeit, in die verschiedenen Epithelformen des Respirationstraktes überzugehen. Diese Differenzierungsprozesse werden über verschiedene Mechanismen reguliert. Hong et al. (2004) konnten zeigen, dass K14 exprimierende Basalzellen der adulten Maus in der Lage sind, durch eine Verletzung geschädigtes Bronchialepithel zu ersetzen. Rawlins et al. (2007) haben gezeigt, dass dies prinzipiell auch für die Kinocilien tragenden Zellen des respiratorischen Epithels gilt. Bei akuten viralen Infektionen und beim Asthma bronchiale kommt es beispielsweise zur Umwandlung von Kinocilien tragenden Zellen in Becherzellen [Reader et al., 2003; Tyner et al., 2006].

Beide genannten Zelllagen exprimieren während der Mausentwicklung und beim adulten Tier PTPIP51. Bei den anderen untersuchten Geweben, fiel bereits auf, dass es sich bei den PTPIP51 positiven Geweben in den meisten Fällen um Gewebe handelt, das auch nach der embryonalen Entwicklung die Fähigkeit behält weitere

Differenzierungsprozesse zu durchlaufen. Dies ist auch bei dem respiratorischen Epithel der Fall.

Ab 12. d.p.c zeigt das Myocard eine starke Expression des PTPIP51 Antigens, die in allen folgenden Stadien und beim adulten Tier erhalten bleibt. Gleiches gilt für das Diaphragma und die Anlagen der Intercostalmuskulatur, die in allen untersuchten Stadien eine kräftige Expression des PTPIP51 Antigens aufweist.

5. Zusammenfassung

Das Phospho-Tyrosin-Phosphatase interagierende Protein 51, ein möglicher Interaktionspartner zweier Nicht-Rezeptor-PTPs, namentlich PTP1B und TCPTP, findet sich bei vielen Säugetieren in unterschiedlichsten Geweben und in verschiedensten kultivierten primären und sekundären Zelllinien. Diese Assoziation mit proliferierenden Zellen weist auf die Beteiligung des PTPIP51 an Proliferationsvorgängen hin. Auf Grund seines spezifischen Verteilungsmusters in der Epidermis - hier nur in den differenzierenden suprabasalen Schichten - kann außerdem von einer Assoziation des Proteins zu Differenzierungsprozessen ausgegangen werden. Eine Überexpression des Proteins in Zellkultur führte zur Apoptose.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zuordnungen zu diesen Funktionen während der Embryonalentwicklung der Maus zu untersuchen. Im Laufe der Embryogenese ist ein balanciertes Zusammenspiel zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose für die Organogenese und damit die Entwicklung des gesamten Embryos von zentraler Bedeutung. Zur Klärung etwaiger Zusammenhänge zwischen PTPIP51 Expression und Funktion wurde das Expressionsmuster des Proteins im Rahmen dieser Arbeit im Verlauf der Embryogenese der Maus untersucht.

Mittels Immunoblotting, RT-PCR, Immunhistochemie und in situ Hybridisierung konnte das PTPIP51 in allen untersuchten Geweben während aller Stadien nachgewiesen werden. Die Expression des PTPIP51 in den einzelnen Geweben erfolgte in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. Detailliert untersucht wurden: die Entwicklung der Augen, des Plexus choroideus, der Zunge und der Lunge.

Im Immunoblotting wurde die Expression verschiedener Isoformen nachgewiesen. Die Molekulargewichte der gefundenen Isoformen stimmen mit den aus der Aminosäuresequenz theoretisch berechneten Größen überein. Auch bei der postpartalen Entwicklung des Auges ist die Expression unterschiedlicher Isoformen in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums zu beobachten.

Während der Augenentwicklung blieb das PTPIP51 Antigen zu allen untersuchten Stadien in suprabasalen Zelllagen der Epidermis nachweisbar. In Conjunctiva und Cornea gelang ebenfalls der Nachweis bei allen untersuchten Stadien. Während der Cornea-Entwicklung kam es zur Expression von PTPIP51 im Cornealepithel, dem Endothel und ab 16. d.p.c. fielen im Stroma der Cornea reaktive Keratocyten auf.

Hierbei ist auffällig, dass die PTPIP51 reaktiven Strukturen ihre Fähigkeit zur weiteren Differenzierung behalten: das Epithel der Cornea und der Conjunctiva können sich weiterhin in verhornendes Plattenepithel umwandeln, des weiteren kommt es bei einem Trauma ausgehend von den genannten Strukturen zu Reparaturprozessen.

Während der Linsenentwicklung war das untersuchte Antigen ebenfalls in allen untersuchten Stadien im anterioren Linsenepithel nachweisbar. Auch hier bleibt die Fähigkeit zur Differenzierung lebenslang erhalten.

In der sich entwickelnden Neuroretina war PTPIP51 ab 12. d.p.c. nachweisbar. In frühen Stadien war die innere Neuroblastenschicht und die sich entwickelnde Rezeptorzellschicht reaktiv mit dem gegen das PTPIP51 gerichteten Antikörper. Während der weiteren Entwicklung kam es zu einer verstärkten Expression des PTPIP51 Antigens in der inneren Neuroblastenschicht, hier vor allem in den zukünftigen Ganglienzellen, in der inneren plexiformen Schicht, der äußeren plexiformen Schicht und der sich entwickelnden Rezeptorzellschicht. Beim adulten Auge findet sich in der bisher positiven äußeren Neuroblastenschicht nur eine spärliche Reaktion, wohingegen die innere Neuroblastenschicht in Form der inneren plexiformen Schicht und der Ganglienzellschicht des Nervus opticus beim erwachsenen Tier weiterhin PTPIP 51 positiv verbleibt.

Da bei der Augenentwicklung apoptotische Vorgänge eine zentrale Rolle einnehmen, wurde eine mögliche Rolle des PTPIP51 während dieser Prozesse untersucht. Hier konnte in vivo keine Assoziation des Proteins zur Apoptose festgestellt werden.

Kolokalisationsstudien mit Synaptophysin und Calbindin machen eine Funktion von PTPIP51 bei der Ausbildung von Synapsen wahrscheinlich.

In allen untersuchten Stadien waren die extraokulären Muskeln stets PTPIP51 reaktiv. Auch hier besteht eine Assoziation zu Differenzierungsprozessen, da die Muskeln zeitlebens embryonales Myosin exprimieren und einer stetigen Differenzierung unterliegen.

Ab 12. d.p.c. fiel eine starke Expression von PTPIP51 im Plexus choroideus in apikalen- und basalen Anteilen des Plexusepithels auf. Am apikalen Zellpol zeigen sich hierbei oft einzelne reaktive Granula, die den Basalkörperchen der Kinocilien entsprechen könnten. Die Plexus choroidei spielen von Beginn an eine essentielle Rolle für die Entwicklung des ZNS. Sie sind durch ein spezifisches Transportsystem für

verschiedenste Nährstoffe und durch die Ausbildung charakteristischer Zell-Zell-Kontakte gekennzeichnet.

Dies erklärt, warum sich nur wenige Unterschiede im PTPIP51 Expressionsmuster finden. Eine mögliche Assoziation zu den Zell-Zell-Kontakten und/oder den spezifischen Transportsystemen ist wahrscheinlich. Weiterhin behält auch das Plexusepithel die Fähigkeit zur Differenzierung bei, da es bei Reparaturmechanismen im Rahmen hypoxischer Schädigungen eine entscheidende Bedeutung innehat.

In dem Epithel des zukünftigen Mundbodens, des Gaumens und der Zunge ist ab 12. d.p.c. eine PTPIP51 Expression detektierbar. Ab 16. d.p.c, dem Zeitpunkt, an dem die Zunge morphologisch beinahe der des adulten Tieres entspricht, zeigt sich eine deutliche Reaktion im Epithel des Mundbodens und der Zunge.

Während der Zungenentwicklung, aber auch während der Entwicklung aller anderen untersuchten Organe, kommt es zur Interaktion von Geweben mit Ursprung in den drei Keimblättern des Embryos. Diese Interaktionen werden über Faktoren wie TGF, EGF, IGF, FGF, PDGF und HGF reguliert. Die Effekte dieser Wachstumsfaktoren werden über spezifische Rezeptoren und nachfolgende Signalkaskaden vermittelt. In diesen Signalkaskaden finden sich immer wieder Tyrosinphosphorylierungen und Dephosphorylierungen. Es ist deshalb denkbar, dass das PTPIP51 an der Übermittlung der Effekte beteiligt ist. Auch bei der Lungenentwicklung spielen diese Mechanismen eine wichtige Rolle.

Hier ließ sich ab 12. d.p.c. eine starke Reaktion mit dem gegen das PTPIP51 gerichtete Antigen im respiratorischen Epithel der Haupt- und Segmentbronchien sowie spärlich im umgebenden Mesenchym nachweisen. Das Lungengewebe ist ebenfalls durch spezifische Zell-Zell-Kontakte und einen charakteristischen Oberflächenbesatz mit Kinocilien charakterisiert, für deren Ausbildung und Funktion PTPIP51 möglicherweise mit verantwortlich ist.

Auch im Bereich der Lunge kommt es bei der Metaplasie zu Plattenepithel oder bei der Umwandlung zu Becherzellen und auch bei der Reparatur von traumatischen Defekten zu Differenzierungsprozessen innerhalb des respiratorischen Epithels ausgehend von den PTPIP51 positiven Zellen.

6. Summary

Protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 a potential interacting partner of two highly homologous non-receptor protein tyrosine phosphatases, namely PTP1B and TCPTP, was found in various mammalian tissues as well as in different cultured cell lines.

Its association to proliferating cells indicates a possible role of PTPIP51 in proliferation processes. Due to the specific expression of PTPIP51 in the epidermis - only the differentiating suprabasal cell layers are PTPIP51 positive - an association of PTPIP51 to differentiation processes is likely. An overexpression of PTPIP51 in specific cultured cells results in apoptosis.

Aim of this study was to investigate, whether the protein is associated to the above mentioned processes in embryonic development of the mouse. During embryogenesis a balanced interplay between proliferation, differentiation and apoptosis is required for organogenesis and therefore is essential for all developmental processes. Assumed connections of PTPIP51 expression and function during mouse embryogenesis were investigated in this thesis.

The expression of PTPIP51 during mouse development was studied by RT-PCR, in situ hybridization, immunoblotting and immunohistochemistry. The expression of PTPIP51 could be demonstrated in all investigated stages. Moreover, the quantity of PTPIP51 expression was shown to be dependent on the developmental stage. A more detailed analysis was performed for the eye, the choroid plexus, the tongue and lung tissue.

Immunoblotting experiments suggest the development and tissue dependent expression of different putative isoforms, whose molecular weights match with calculated theoretical data. This holds particularly true for the postpartal development of mouse eye.

During eye development PTPIP51 protein was found in all suprabasal layers of the epidermis. Regarding corneal tissue, PTPIP51 could be traced in the corneal epithelium and endothelium during all investigated stages. Moreover, from day 16 p.c. onwards keratocytes also expressed PTPIP51 protein. From day 12 p.c. unto the adult stage, PTPIP51 was found in the anterior lens epithelium.

It is noteworthy that all PTPIP51-positive structures keep their life-long potential for differentiation, the later being important in repair processes following trauma. This is well established for corneal epithelium and conjunctival tissue.

The evolving neuroretina displayed PTPIP51 protein in the inner neuroblastic as well as in the developing photoreceptor cell layer. Ongoing development led to an enhanced expression of PTPIP51 in both layers. In addition, PTPIP51 was upregulated in (the formerly negative) inner and outer plexiform layer. PTPIP51 expression persists in the adult stage except for the outer neuroblastic layer.

Apoptotic processes play a central role during eye development, yet, an in vivo association of TUNEL-labelled cells with PTPIP51 expression could not be observed.

Since immunolabeling studies with PTPIP51 and synaptophysin, as well as calbindin revealed a partial colocalization, one may speculate about a role of PTPIP51 in synapsis formation.

Extraocular muscles were PTPIP51-positive during all investigated stages. These muscles express embryonic myosin and undergo a constant redifferentiation. Therefore, PTPIP51 may serve as a signalling partner in this process.

On day 12 p.c. the apical and basal part of cells comprising the choroid plexus were PTPIP51-positive. The apical cell pole showed PTPIP51-immunoreactive granula, which may correspond to the basal bodies of kinocilia.

The choroid plexus is essentially required for CNS development harbouring the blood-brain barrier, which is characterized by tissue-specific cell-cell contacts.

The choroid epithelium retains its ability to differentiate and plays therefore an important role for regenerating processes following hypoxic damage.

On day 12 p.c., PTPIP51 protein could be traced in the epithelium of the developing floor of the oral cavity, palate and tongue. From day E16 onwards PTPIP51-labeling showed a steadily stronger reaction with the PTPIP51-antibody.

Tongue formation in particular but also the development of all other investigated organs ultimately evolving from the three germ layers are regulated by growth factors such as TGF, EGF, IGF, FGF, PDGF, HGF and their corresponding receptors and tyrosine-phosphorylation dependent signalling cascades. PTPIP51 may serve as a signalling partner in these cascades.

The respiratory epithelium of the main- and segmental bronchi of the lung bud were found to be PTPIP51-positive. Some surrounding stromal cells also expressed PTPIP51. Since this epithelium harbours kinocilia as well as specific cell-cell contacts, one may hypothesize that PTPIP51 is mandatory for signalling pathways associated with cell-cell interaction and animation of kinocilia. Metaplasia to squamous epithelium, as well as reparation events require cells, which retain the ability to differentiate. As stated above, PTPIP51 expression particularly occurs in these tissues and therefore may be important for these processes.

7. Literaturverzeichnis

Agbulut, O., Noirez, P., Beaumont, F., Butler-Browne, G. (2003); Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mouse; *Biol. of the cell* 95(6):399-406

Balslev, Y., Dziegielewska, K.M., Møllgård, K., Saunders, N.R. (1997); Intercellular barriers to and transcellular transfer of albumin in the fetal sheep; *Anat. Embryol.* 195(3) 229-236

Bell, M.W., Alvarez, K., Ghalayini, A.J. (1999); Association of the tyrosine phosphatase Shp2 with Transducin- α and a 97-kDa tyrosine-phosphorylated protein in photoreceptor rod outer segments; *J. Neurochem.* 73(6):2331-2340

Biscardi, J.S., Cooper, N.G., Maness, P.F. (1993); Phosphotyrosine modified proteins are localized in Müller cells of the chick neural retina; *Exp. Eye. Res.* 56(3):281-289

Bradford, D. (1999); Colworth Medal lecture. Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases; *Biochem. Soc. Trans.* 27(6):751-766

Bürklen, T. (2001); Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase und möglichen Interaktionspartnern; Diplomarbeit, Universität Konstanz

Büttel, R. (2000); Untersuchungen zur Funktion von potentiellen Proteintyrosin-Phosphatasen interagierenden Proteinen; Diplomarbeit, Universität Konstanz

Candi, E., Schmidt, R., Melino, G. (2005); The cornified envelope: a model of cell death in the skin; *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(4):328-40

Caselli, A., Marzocchi, R., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pieraccini, G. and Ramponi, G. (1998); The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H_2O_2 ; *J. Biol. Chem.* 273(49):32554-32560

Catala, M. (1997); Carbonic anhydrase activity during development of the choroid plexus in the human fetus; *Childs. Nerv. Syst.* 13(7):364-368

Catala, M. (1998); Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebrospinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges, and choroid plexuses; *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* 46(3):153-169

Cirri, P., Chiarugi, P., Taddei, L., Raugei, G., Camici, G., Manao, G. and Ramponi, G. (1998); Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting; *J. Biol. Chem.* 273(49):32522-32527

Cohen, P. (2000); The regulation of protein function by multisite phosphorylation- a 25 year update; *Trends Biochem. Sci.* 25(12):596-601

Dahl, E., Winterhager, E., Traub, O., Willecke, K. (1995); Expression of gap junction genes, connexin 40 and connexin 43, during fetal mouse development; *Anat. Embryol.* 191(3):267-278

Daw, N.W. (1995); Visual development; Plenum Press, New York

De longh, R.U., Lovicu, F.J., Chamberlain, C.G., McAvoy J.W. (1997); Differential expression of fibroblast growth factor receptors during rat lens morphogenesis and growth; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 (9):1688-1699

De longh, R.U., Lovicu, F.J., Overbeek, P.A., Schneider, M.D., Joya, J., Hardemann, E.D., McAvoy, J.W. (2001); Requirement for TGFbeta receptor signaling during terminal lens fibre differentiation. *Development* 128(20):3995-4010

DeMaeyer, E.M. (1986); The WHO programme of prevention and control of vitamin A deficiency, xerophthalmia and nutritional blindness; *Nutr. Health* 4(2):105-112

Dewang P.M., Hsu, N.M., Peng, S.Z., Li, W.R. (2005); Protein tyrosine phosphatases and their inhibitors; *Curr. Med. Chem.* 12(1):1-22

Dziegielewska K.M., Knott, G.W., Saunders, N.R. (2000); The nature and composition of the internal environment of the developing brain; *Cell. Mol. Neurobiol.* 20(1):41-56

Dziegielewska, K.M., Ek, J., Habgood, M.D., Saunders, N.R. (2001); Development of the plexus choroideus; *Microsc. Res. Tech.* 52(1):5-20

Ellis, J.H., Richards, D.E., Rogers, J.H. (1991); Calretinin and Calbindin in the retina of the developing chick; *Cell Tissue Res.* 264(2):197-208

Engert, J.C., Berglund, E.B., Rosenthal, S.M. (1996); Proliferation precedes differentiation in IGF-I stimulated myogenesis; *J. Cell. Biol.* 135(2):431-440

Ensslen, S.E., Brady-Kalnay, S.M. (2004); PTP μ signaling via PKC δ is instructive for retinal ganglion cell guidance; *Mol. Cell. Neurosci.* 25(4) 558-571

Ensslen, S.E., Rosdahl, J.A., Brady-Kalnay, S.M. (2003); The receptor protein tyrosine phosphatase mu, PTP μ , regulates histogenesis of the chick retina; *Dev. Biol.* 264(1):106-118

Ewton, D.Z., Roof, S.L., Magri, K.A., McWade, F.J., Florini, J.R. (1994); IGF-II is more active than IGF-I in stimulating L6A1 myogenesis: greater mitogenic actions of IGF-I delay differentiation; *J. Cell. Physiol.* 161(2):277-284

Florini, J.R., Ewton, D.Z., Coolican, S.A. (1996); Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis; *Endocr. Rev.* 17(5):481-517

Fluegel-Koch, C., Ohlmann A., Piatigorsky J., Tamm E.R. (2002); Disruption of anterior segment development by TGF-beta1 overexpression in the eyes of transgenic mice; *Dev. Dyn.* 225 (2):111-125

Freiss, G., Vignon, F. (2004); Protein tyrosine phosphatases and breast cancer; *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 52(1):9-17

Fuchs, E. (1990); Epidermal differentiation: the bare essentials; *J. Cell Biol.* 111(6 Pt. 2):2807-14

Fuhrmann, S., Heller, S., Rohrer, H., Hofmann, H.D. (1998); A transient role for ciliary neurotrophic factor in chick photoreceptor development; *J. Neurobiol.* 37(4):672-683

Gandarillas A. (2000); Epidermal differentiation, apoptosis and senescence: common pathways?; *Exp. Gerontol.* 35(1): 53-62

Gibbs, S., Ponec, M. (2000); Intrinsic regulation of differentiation markers in epidermis, hard palate and buccal mucosa; *Arch. Oral Biol.* 45(2): 149-158

Gotho, N., Ito, M., Yamamoto, S., Yoshino, I., Song, N., Wang, Y., Schlessinger, J., Shibuya, M., Lang, R.A. (2004); Tyrosine phosphorylation sites on FRS2 α responsible for Shp2 recruitment are critical for induction of lens and retina; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(49): 17144-17149

Govindarajan V., Overbeek P.A. (2001); Secreted FGFR3, but not FGFR1, inhibits lens fibre differentiation; *Development* 128(9): 1617-1627

Guan, K.L. and Dixon, J.E. (1991); Evidence for protein-tyrosine phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate; *J. Biol. Chem.* 266(20):17026-17030

Gwon, A. (2006); Lens regeneration in mammals: a review; *Surv. of Ophthalmol.* 51(1):51-62

Hauri, H.P. und Bucher, K.(1986); Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution; *Anal. Biochem.* 159(2):386-389

Hogan, M.J., Alvarado, J.A., Wedell, J.E. (1971); Histology of the human eye; WB Saunders Co., Philadelphia

Hong, K.U, Reynolds, S.D., Watkins, S., Fuchs, E., Stripp, B.R. (2004); Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium; *Am. J. Pathol.* 164(2):577-588

Hooft van Huijsduijnen H., R., Sauer, W.H., Bombrun, A. and Swinnen, D. (2004); Prospects for inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B as antidiabetic drugs; *J. Med. Chem.* 47(17):4142-4146

Hori, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Kimura, H., Fukagawa, T. (2003); Dynamic behaviour of Nuf2-Hecl complex that localizes to the RT centrosome and is essential for mitotic progression in RT vertebrate cells; *J. Cell. Sci.* 116(16):3347-3362

Hunter, T. and Sefton, B.M. (1980); Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(3):1311-1315

Hunter, T. (1995); Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling; *Cell.* 80(2):225-236

Ireland, M.E. and Mrock, L.K. (2000); Differentiation of chick lens epithelial cells: involvement of the epidermal growth factor receptor and endogenous ligand; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (1):183-190

Iversen, F.I., Møller, K.B., Pedersen, A.K., Peters, G.H., Petersen, A.S., Andersen, H.S., Branner, S., Mortensen, S.B., Møller, N.P.H. (2002); Structure determination of T-cell protein-tyrosine phosphatase; *J. Biol. Chem.* 277(22):19982-19990

Jacobs, D.B., Ireland, M., Pickett, T., Maisel, H., Grunberger, G. (1992); Functional characterization of insulin and IGF-1 receptors in chicken lens epithelial and fibre cells; *Curr. Eye Res.* 11(12): 1137-1145

Jia, Z., Bradford, D., Flint, A.J. and Tonks, N.K. (1995); Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B; *Science* 268(5218):1754-1758

Kaufmann, M.H. und Bard, J.B.L. (1999); The anatomical basis of mouse development; Academic Press, San Diego · London

Kim, J.Y., Mochizuki, T., Akita, K., Jung, H.S. (2003); Morphological device of the importance of epithelial tissue during mouse tongue development; *Exp. Cell Res.* 290(2):217-226

Kinkl, N., Hageman, G.S., Sahel, J.A., Hicks, D. (2002); Fibroblast growth factor receptor (FGFR) and candidate signaling molecule distribution within rat and human retina; *Mol. Vis.* 8: 149-160

Krisch, M., Fuhrmann, S., Wiese A., Hofmann H.D. (1996); CNTF exerts opposite effects on in vitro development of rat and chick photoreceptors; *Neuroreport* 7(3):697-700

Klingmüller, U., Lorenzo, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. and Lodish H.F. (1995); Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals; *Cell.* 80(5):729-738

LaVail M.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C.H., Steinberg, R.H. (1998); Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39(3): 592-602

Lefauconnier, J.M. (1992); Transport of amino acids; in: Physiology and pharmacology of the blood-brain barrier, Hrsg.; Bradbury, M.W.B.; Springer, Berlin

Lewis, F.A. and Wells, M. (1992); Detection of virus in infected human tissue by in situ hybridisation; in: Wilkinson, D.G. (ed.); In situ hybridisation, a practical approach; Oxford University Press, Oxford, U.K.; pp121-135

Li, Y., Chen, J., Chopp, M. (2002); Cell proliferation from ependymal, subependymal and choroids plexus cells in response to stroke in rats; *J. Neurol. Sci.* 193(2):137-146

Linden R., Martins, R.A., Silveira, M.S. (2005); Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina; *Prog. Retin. Eye Res.* 24(4):457-491

Liu, G., Xin, Z., Liang, H., Abad-Zapatero, C., Hajduk, P.J., Janowick, D.A., Szczepankiewicz, B.G., Pei, Z., Hutchins, C.W., Ballaron, S.J., Stashko, M.A., Lubben, T.H., Berg, C.E., Rondinone, C.M., Trevillyan, J.M. and Jirusek, M.R. (2003); Selective Proteine Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors: Targetting the second phosphotyrosine binding site with non-carbocyclic acid-containing ligands; *J. Med. Chem.* 46(16):3437-3440

Lv, B.F., Yu, C.F., Chen, Y.Y., Lu, Y., Guo, J.H., Song, Q.S., Ma, D.L., Shi, T.P., Wang, L. (2006); Protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 (PTPIP51) is a novel mitochondrial protein with a N-terminal mitochondrial targeting sequence and induces apoptosis; *Apoptosis* 11(9):1489-1501

Marigo, V. (2007); Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration; *Cell Cycle.* 6(6):652-655

McCabe, K.L., Gunther, E.C., Reh, T.A. (1999); The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation; *Development* 126(24):5713-5724

McLoon, L.K., Rowe, J.Y.N., Wirtschafter, J., McCormick, K. (2004); Continuous myofibre remodelling in uninjured extraocular myofibres: myonuclear turnover and evidence for apoptosis; *Muscle Nerve* 29(5):707-715

Møllgård, K., Rostgard, J. (1978); Morphological aspects of some sodium transporting epithelia suggesting a transcellular pathway via elements of the endoplasmatic reticulum; *J. Membrane Biol.* 40: 71-89

Møllgård, K., Saunders, N.R. (1986); The development of the human blood-brain and blood-CSF barriers; *Neuropath. Applied Neurobiol.* 12(4):337-358

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986); Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51(Pt.1):263-273

Mustelin T., Coggeshall, K.M. and Altman, A. (1989); Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56lck by the CD 45 phosphotyrosine phosphatase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(16):6302-6306

Nagata, J., Yamane, A. (2004); Progress of cell proliferation in striated muscle tissues during development of the mouse tongue; *J. Dent. Res.* 83(12):926-929

Nakamura, T., Nishida, K., Dota, A., Matsuki, M., Yamanishi, K., Kinoshita, S. (2001); Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42(3):549-556

Neel, B.G., Tonks, N.K.(1997); Protein tyrosine phosphatases in signalling transduction; *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(2):193-204

Obata, H., Kaji, Y., Yamada, H., Kato, M., Tsuru, T., Yamashita, H. (1999); Expression of transforming growth beta-superfamily receptors in rat eyes; *Acta Ophthalmol. Scand.* 77(2):151-156

Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., Kimura, K., Makita, H., Sekine, M., Obayashi, M., Nishi, T., Shibahara, T., Tanaka, T., Ishii, S., Yamamoto, J., Saito, K., Kawai, Y., Isono, Y., Nakamura, Y., Nagahari, K., Murakami, K., Yasuda, T., Iwayanagi, T., Wagatsuma, M., Shiratori, A., Sudo, H., Hosoiri, T., Kaku, Y., Kodaira, H., Kondo, H., Sugawara, M., Takahashi, M., Kanda, K., Yokoi, T., Furuya, T., Kikkawa, E., Omura, Y., Abe, K., Kamihara, K., Katsuta, N., Sato, K., Tanikawa, M., Yamazaki, M.,
Ninomiya, K., Ishibashi, T., Yamashita, H., Murakawa, K., Fujimori, K., Tanai, H., Kimata, M., Watanabe, M., Hiraoka, S., Chiba, Y., Ishida, S., Ono, Y., Takiguchi, S., Watanabe, S., Yosida, M., Hotuta, T., Kusano, J., Kanehori, K., Takahashi-Fujii, A., Hara, H., Tanase, T., Nomura, Y., Togiya, S., Komai, F., Hara, R., Takeuchi, K., Arita, M., Imose, N., Musashino, K., Yuuki, H., Oshima, A., Sasaki, N., Aotsuka, S., Yoshikawa, Y., Matsunawa, H., Ichihara, T., Shiohata, N., Sano, S., Moriya, S., Momiyama, H., Satoh, N., Takami, S., Terashima, Y., Suzuki, O., Nakagawa, S., Senoh, A., Mizoguchi, H., Goto, Y., Shimizu, F., Wakebe, H., Hishigaki, H., Watanabe, T., Sugiyama, A., Takemoto, M., Kawakami, B., Yamazaki, M., Watanabe, K., Kumagai, A., Itakura, S., Fukuzumi, Y., Fujimori, Y., Komiyama, M., Tashiro, H., Tanigami, A., Fujiwara, T., Ono, T., Yamada, K., Fujii, Y., Ozaki, K., Hirao, M., Ohmori, Y., Kawabata, A., Hikiji, T., Kobatake, N., Inagaki, H., Ikema, Y., Okamoto, S., Okitani, R., Kawakami, T., Noguchi, S., Itoh, T., Shigeta, K., Senba, T., Matsumura, K., Nakajima, Y., Mizuno, T., Morinaga, M., Sasaki, M., Togashi, T., Oyama, M., Hata, H., Watanabe, M., Komatsu, T., Mizushima-Sugano, J., Satoh, T., Shirai, Y., Takahashi, Y., Nakagawa, K., Okumura, K., Nagase, T., Nomura, N., Kikuchi, H., Masuho, Y., Yamashita, R., Nakai, K., Yada, T., Nakamura, Y., Ohara,

O., Isogai, T. and Sugano, S. (2004); Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs; *Nat. Genet.* 36(1):40-45

Oullette , M., Barbeau, B. and Tremblay, M.J. (2003); Protein tyrosyl phosphatases in T cell activation: implication for human immunodeficiency virus transcriptional activity; *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 73:69-105

Pathre, P., Arregui, C., Wampler, T., Kue, I., Leung, T.C., Lilien, J., Balsamo, J. (2001); PTP1B regulates neurite extension mediated by cell-cell and cell-matrix adhesion molecules; *J. Neurosci. Res.* 63(2):143-150

Pfeiffer, T. (2006); Regulierte Expression von PTPIP 51 in der Epidermis und den Hautanhangsgebilden; Dissertation, Universität Gießen

Pimentel, B., Rodriguez-Borlado, L., Hernandez, C., Carrera, A.C. (2002); A role for phosphoinositide 3-kinase in the control of cell division and survival during retinal development; *Develop. Biol.* 247(2):295-306

Pingel J.T. and Thomas, M.L. (1989); Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation; *Cell.* 58(6):1055-1065

Porsche, A. (2001); Identifikation von Interaktionspartnern der T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase durch das Lex-A Two Hybrid System. Thesis (Ph.D.), Universität Konstanz, 2001, (UFO Publishers, Allensbach, Vol. 414)

Potts, J.D., Bassnett, S., Kornacker, S., Beebe, D.C. (1994); Expression of platelet-derived growth factor receptors in the developing chicken lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (9):3413-3421

Presland, R.B., Dale, B.A. (2000); Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease; *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11(4):383-408

Qu, C.K. (2002); Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signalling and cellular response; *Biochem. Biophys. Acta.* 1592(3):297-301

Raugei, G., Ramponi, G. and Chiarurgi, P. (2002); Low molecular weight tyrosine phosphatases: small, but smart; *Cell. Mol. Life Sci.* 59(6):941-949

Rawlins, E.L., Ostrowski, L.E., Randell, S.H., Hogan, B.L.M. (2007); Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(2):410-417

Raymond, S.M., Jackson, I.J. (1995); The retinal pigment epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina; *Curr. Biol.* 5(11):1286-1295

Reader, J.R., Tepper, J.S., Schelegle, E.S., Aldrich, M.C., Putney, L.F., Pfeiffer, J.W., Hyde, D.M. (2003); Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model; *Am. J. Pathol.* 162(6):2069-2078

Reid, S.L., Copp, A., Ferretti, P. (2000); The effect of FGF-2 on developing choroids plexus in vitro; *Abstract. Eur. J. Neurosci.* 12(Suppl. 11):163.2

Reid, S., Ferretti, P. (2003); Differential expression of fibroblast growth factor receptors in the developing murine choroid plexus; *Brain Res. Dev. Res.* 141(1-2):15-24

Roger, J., Goureau, O., Sahel, J.A., Guilloneau X. (2007); Use of suppression subtractive hybridization to identify genes regulated by ciliary neurotrophic factor in postnatal retinal explants; *Mol. Vis.* 13:206-219

Rogers, J.H. (1989); Two calcium-binding proteins mark many chick sensory neurons; *Neuroscience* 31(3):697-709

Rosenthal, S.M., Cheng, Z.Q. (1995); Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(22):10307-10311

Rubinstein, N.A., Hoh, J.F.Y. (2000); The distribution of myosin heavy chain isoforms among rat extraocular muscle fibre types; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(11):3391-3398

Saika S., Saika S., Liu, C.Y., Azhar, M., Sanford, L.P., Doetschman, T., Gendron, R.L., Kao, C.W., Kao, W.W. (2001); TGFbeta2 in corneal morphogenesis during mouse embryonic development; *Dev. Biol.* 240(2):419-432

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988); Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase; *Science* 239(4839):487-91

Schelling, F.W.J., System des transzendentalen Idealismus, zit. nach: Ueberweg, F., Grundriß der Geschichte der Philosophie, Berlin 1903, Bd. 1, S. 31

Sharma R.K., O'Leary, T.E., Fields, C.M., Johnson, D.A. (2003); Development of the outer retina in the mouse; *Dev. Brain Res.* 145(1):93-105

Shores, C.G., Maness, P.F. (1989); Tyrosine phosphorylated proteins accumulate in junctional regions of the developing chick neural retina; *J. Neurosci. Res.* 24(1):59-66

Sieving P.A., Caruso, R.C., Tao, W., Coleman, H.R., Thompson, D.J., Fullmer, K.R., Bush, R.A. (2006); Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell interocular implants; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(10):3896-3901

Smith, R.S., John, S.W.M., Nishina, P.M., Sundberg, J.P. (2002); Systematic evaluation of the mouse eye – anatomy, pathology and biometrics; CRC Press, Boca Raton · London · New York · Washington, D.C.

Song, J, Lee, Y.G., Houston, J., Petroll, W.M., Chakravarti, S., Cavanagh, H.D., Jester, J.V. (2003); Neonatal corneal stromal development in the normal and lumican-deficient mouse; *Invest. Ophthalm. Sci.* 44(2): 548-557

Steger, K., Klonisch, T., Gayenis, K., Drabent, B., Dönecke, D., Bergmann, M. (1998); Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermatogenesis; *Mol. Hum. Reprod.* 4(10):939-945

Steger, K., Pauls, K., Klonisch, T., Franke, F.E. and Bergmann, M. (2000); Expression of protamine 1 and 2 during human spermatogenesis; *Mol. Hum. Reprod.* 6(3):219-225

Stenzinger, A., Kajosch, T., Tag, C., Porsche, A., Welte, I., Hofer, H.W., Steger, K. and Wimmer, M. (2005); The novel protein PTPIP51 exhibits tissue- and cell-specific expression; *Histochem. Cell. Biol.* 123(1):19-28

Stenzinger, A., Schreiner, D., Pfeiffer, T., Tag, C., Hofer, H.W., Wimmer, M. (2007); EGF, TGF- β , retinoic acid and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ regulated expression of the novel protein PTPIP 51 in keratinocytes; *Cells Tissue Organs* 184(2):76-87

Theiler, K. (1972); The House Mouse; Springer Verlag, Berlin · Heidelberg · New York

Tian, N., Copenhagen D.R. (2001); Visual deprivation alters development of synaptic function in inner Retina after eye opening; *Neuron* 32(3):439-449

Tomarev, S.I., Sundin, O., Banerjee-Basu, S., Dun Piatigorsky, J. (1996); A chicken homeobox gene Prox1 related to Drosophila prospero is expressed in the developing lens and retina; *Dev. Dyn.* 206(4):354-367, *Erratum in Dev. Dyn.* 207(1):120

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979); Electrophoretic transfer of proteins from nitrocellulose sheets: procedure and some applications; *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 76:4350-4354

Tonks, N.K., Diltz, C.D., Fischer, E.H. (1988); Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta; *J. Biol. Chem.* 263(14):6722-30

Tonks, N.K., Diltz, C.D., Fischer, E.H. (1988); Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta; *J. Biol. Chem.* 263(14):6731-6737

Tyner, J.W., Kim, E.Y., Ide, K., Pelletier, M.R., Roswit, W.T., Morton, J.D., Battaile, J.T., Patel, A.C., Patterson, G.A., Castro, M., Spoor, M.S, You, Y., Brody, S.L., Holtzman, M.J. (2006); Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals; *J. Clin. Invest.* 116(2):309-321

Umeda, I.O., Kashiwa, Y., Nishigori, H. (2001); 18kDa protein tyrosine phosphatase in the ocular lens; *Exp. Eye Res.* 73(1):123-132

Vetter, M.L., Moore, K.B. (2001); Becoming glia in the neural retina. *Dev. Dyn.* 221(2):146-153

Warburton, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K.D., Cardoso, W.V. (2000); The molecular basis of lung morphogenesis; *Mech. Dev.* 92(1):55-81

Wang, Z., Shen, D., Parsons, D.W., Bardelli, A., Sager, J., Szabo, S., Ptak, J., Silliman, N., Peters, B.A., van der Heijden, M.S., Parmigiani, G., Yan, H., Wang, T.L., Riggins, G., Powell, S.M., Willson, J.K., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E. (2004); Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal tumors; *Science* 304(5674):1164-1166

Welte, I. (2000); Untersuchungen und Struktur des potentiell mit der T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase interagierenden Proteins P30, Diplomarbeit, Universität Konstanz

Wimmer, M., Hofer, H.W., Tag, C. and Stenzinger, A. (2003); TCPTPIP51 expression is upregulated in fast twitch skeletal muscle by low frequency stimulation; *Eur. J. Biochem.* 270 (Suppl.1):167

Wolosin, J.M., Budak, M.T., Akinci, M.A.M. (2004); Ocular surface epithelial and stem cell development; *Int. J. Dev. Biol.* 48(8-9):981-991

Yamane, A., Mayo, M.L., Schuler, C. (2000); Expression of myogenic regulatory factors during the development of mouse tongue striated muscle; *Arch. Oral Biol.* 45(1):71-78

Yamane, A., Bringas, P., Mayo, M.L., Amano, O., Takahashi, K., Vo, H., Shum, V., Slavkin, H.C. (1998); Transforming growth factor alpha up-regulates desmin expression during embryonic mouse tongue myogenesis; *Dev. Dyn.* 213(1) 71-81

Yoshiko, Y., Hirao, K., Sakabe, K., Seiki, K., Takezawa, J., Maeda, N. (1996); Autonomous control of expression of genes for insulin-like growth factors during the proliferation and differentiation of C2C12 mouse myoblasts in serum-free culture; *Life Sci.* 59(23):1961-1968

You-Ten, K.E., Muise, E.S., Itie, A., Michaliszny, E., Wagner, J., Jothy, S., Lapp, W.S and Tremblay, M.L. (1997); Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T-cell-protein-tyrosine-phosphatase-deficient mice; *J. Exp. Med.* 186(5):683-693

Yuvaniyama, J., Denu J.M., Dixon J.E., Saper M.A. (1996); Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR; *Science* 272(5266):1328-1331

Zhang, S.S., Liu, M.G., Kano, A., Zhang, C., Fu, X.Y., Barnstable, C.J. (2005); STAT3 activation in response to growth factors or cytokines participates in retina precursor proliferation. *Exp. Eye. Res.* 81(1):103-115

Zhang, Z.Y. (2001); Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics; *Curr. Opin. Cell Biol.* 5(4):416-423

Zieske, J.D. (2004); Corneal development associated with eyelid opening; *Int. J. Dev. Biol.* 48(8-9):903-911

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Nr.	Bezeichnung	Seite
1	RT-PCR Embryo Extrakten	25
2	Western blotting von Embryo Extrakten	26
3	Augen 12. d.p.c.	33
4	Augen 13. d.p.c.	34
5	Augen 14. d.p.c.	36
6	Augen 15. d.p.c.	38
7	Augen 16. d.p.c.	40
8	Augen 17. d.p.c.	41
9	Augen 18. d.p.c.	42
10	Augen 1. d.p.p.	43
11	Augen 7. d.p.p.	44
12	Augen 14. d.p.p.	46
13	Augen 21. d.p.p.	47
14	Augen adultes Tier	48
15	TUNEL Assay 14. d.p.p.	49
16	Kolokalisation von PTIP51 und Synaptophysin 14. d.p.p.	49
17	Kolokalisation von PTIP51 und Calbindin 14. d.p.p.	50
18	In situ Hybridisierung 14. und 15. d.p.c.	51
19	Western blotting post partaler Augen	53
20	Plexus 12. d.p.c.	56
21	Plexus 13. d.p.c.	57
22	Plexus 14. d.p.c.	59
23	Plexus 15. d.p.c.	60
24	Plexus 16. d.p.c.	61
25	Plexus 17. d.p.c.	62
26	Plexus 18. d.p.c.	63
27	Zunge 12. d.p.c.	67
28	Zunge 13. d.p.c.	68

29	Zunge 14. d.p.c.	69
30	Zunge 15. d.p.c.	71
31	Zunge 16. d.p.c.	72
32	Zunge 17. d.p.c.	73
33	Zunge 18. d.p.c.	75
34	Lunge 12. d.p.c.	80
35	Lunge 13. d.p.c.	81
36	Lunge 14. d.p.c.	82
37	Lunge 15. d.p.c.	84
38	Lunge 16. d.p.c.	86
39	Lunge 17. d.p.c.	88
40	Lunge 18. d.p.c.	90

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
bidest.	zweifach destilliert
Bmp-4	Bone morphological protein 4
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD 45	Cluster of Differentiation 45
cDNA	klonale Desoxyribonucleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cRNA	klonale Ribonucleinsäure
C-terminal	carboxy-terminal
DAPI	4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid-Methanol
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC Wasser	Diethylpyrocarbonate Wasser
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
d.p.c.	dies post conceptionem
d.p.p.	dies post partum
DSPs	dualspezifische Phosphatasen
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EGF	epidermal growth factor
E	Embryo d.p.c.
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FRS2 α	fibroblast growth factor receptor substrate 2 alpha
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2

h	hora
HaCaT	humane Keratinocyten
IGF	insulin like growth factor
JAK2	Janus Kinase 2
K	Keratin
Kb	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
LMW	low molecular weight
M	Molar
M.	Musculus
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NaCl	Natrium-Chlorid
N.	Nervus
NTB	Nitroblautetrazoliumchlorid
N-terminal	amino terminal
P	post partum
PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
pH	mit -1 multiplizierter dekadischer Logarithmus der Aktivität der Oxoniumionen
Prox 1	prospero homeobox 1
PT	Phospho-Tyrosin
PTK	Phosphotyrosin Kinase
PTP	Phosphotyrosin Phosphatase
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
PTPIP51	Phosphotyrosin Phosphatase interagierendes Protein 51
Rpm	Rounds per Minute
Shh	Sonic hedgehog
Shp2	Tyrosinphosphatase SHP2
SDS	Natrium Dodecylsulfat
Src	„rous sarcoma virus“

TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TdT	Terminale desoxynucleotidyl Transferase
TER	tubulo-zisternisches endoplasmatisches Reticulum
TGF	transdermal growth factor
TNMT	TRIS-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton-Base
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	terminal transferase dUTP nick end labelling
dUTP	desoxy Uridintriphosphat

8.3 Publikationen, Vortrag, Poster

Expression of PTPIP51 during mouse eye development

DAVID MAERKER^{*}, ALBRECHT STENZINGER^{*}, DIETMAR SCHREINER[°], CLAUDIA TAG^{*} AND MONIKA WIMMER^{*}

^{} Justus-Liebig-University Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, 35385 Giessen, Germany*

[°] University of Konstanz, Department of Biology, 78547 Konstanz, Germany

in Druck bei Histochemistry, 2007

The novel protein PTPIP51 is expressed in human keratinocyte carcinomas and their surrounding stroma

PHILIPP KOCH^{*}, ALBRECHT STENZINGER^{*}, MAXIME VIARD^{*}, DAVID MAERKER^{*}, PETER MAYSER^{\$}, MARTIN NILLES^{\$}, DIETMAR SCHREINER[°], KLAUS STEGER[%] AND MONIKA WIMMER^{*}

^{} Justus-Liebig-University Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, 35385 Giessen, Germany*

^{\$} Justus-Liebig-University Giessen, Department of Dermatology and Andrology, 35385 Giessen, Germany

[°] University of Konstanz, Department of Biology, 78547 Konstanz, Germany

[%] Justus-Liebig-University Giessen, Department of Urology and Pediatric Urology, 35385 Giessen, Germany

eingereicht bei Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2007

PTP interacting protein 51 in eye development during mouse embryogenesis

DAVID MAERKER^{*}, CLAUDIA TAG^{*} AND MONIKA WIMMER^{*}

^{} Justus-Liebig-University Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, 35385 Giessen, Germany*

Vortrag als "invited speaker": 48th Symposium of the Society for Histochemistry, Stresa, 2006, Session 7

PTP interacting protein 51 in embryonic mouse tissue

DAVID MAERKER^{*}, CLAUDIA TAG^{*} AND MONIKA WIMMER^{*}

^{} Justus-Liebig-University Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, 35385 Giessen, Germany*

Poster: 102nd Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft Gießen 2007, DI / Poster 109

PTP interacting protein 51 in eye development during mouse embryogenesis

DAVID MAERKER^{*}, CLAUDIA TAG^{*} AND MONIKA WIMMER^{*}

** Justus-Liebig-University Giessen, Institute of Anatomy and Cell Biology, 35385 Giessen, Germany*

Poster: 101st Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft Freiburg 2006, Poster
Nummer 139

8.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. Wimmer für die Überlassung des Themas und die immerwährende Unterstützung sowie die ausgesprochen gute Betreuung über die gesamte Zeit bedanken.

Bei Claudia Tag möchte ich mich für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und ihre Hilfe in allen Belangen bedanken. Ohne ihre Unterstützung wären weite Teile der Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch den anderen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie danke ich für viele gute Ratschläge und die sehr nette, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Steger und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei der in situ Hybridisierung und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hofer in Konstanz für die Hilfe bei der PCR sowie für die kritische Auseinandersetzung mit den Manuskripten, an denen ich beteiligt war.

Herrn Albrecht Stenzinger gilt mein Dank bei der Unterstützung an der Erstellung und Umsetzung der Manuskripte sowie für seine fachliche Unterstützung, die mir in häufigen Diskussionen und Gesprächen zu Gute gekommen ist.

Herrn Tim Hornung danke ich für die langjährige Freundschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Märker, David Arthur
Geburtsdatum:	28. April 1979
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1985 – 1989	Katholische Grundschule Grafenwald
1989 – 1998	Janusz-Korczak-Gesamtschule Bottrop

Zivildienst:

01.07.1998 – 31.07.1999	Malteser Hilfsdienst, Essen
-------------------------	-----------------------------

Studium:

Wintersemester 1999/2000 bis
einschließlich Wintersemester
2000/2001 an der Westfälischen
Wilhelms Universität Münster

Kunstgeschichte,
Philosophie und Anglistik

ab Sommersemester 2001
an der Justus Liebig Universität
Gießen

Humanmedizin

Wintersemester 2002/2003
Sommersemester 2006 und
Wintersemester 2006/2007

1. ärztliche Prüfung
Praktisches Jahr an der Asklepios-Klinik
Lich, am Universitätsspital Zürich und an der
Universitätsklinik Gießen

Wahlfach: Augenheilkunde in Zürich

Wintersemester 2007/2008

2. ärztliche Prüfung

November 2007

Approbation