

Untersuchung des Immunreaktivitätsprofils von Müller-Zellen für Nestin, CD44, Kollagen IX und GFAP in fetalen und kindlichen Augen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Louisa Maria Bulirsch

aus Bruchsal

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Martina Christina Herwig-Carl
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Glen Ole Kristiansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2021

Aus der Universitäts-Augenklinik Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Frank G. Holz

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1	Embryonalentwicklung der Netzhaut	9
1.2	Müller-Zellen	10
1.3	Nestin	13
1.4	CD44	14
1.5	Kollagen IX	15
1.6	GFAP	16
1.7	Abusive Head Trauma	18
1.8	Zielsetzung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.2	Vorbehandlung und immunhistochemische Anfärbung der Augen	21
2.3	Auswertung	23
2.4	Statistik	26
2.5	Antikörper	26
2.6	Geräte und Reagenzien	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Nestin	28
3.1.1	Nestin-Expression bezogen auf die Lokalisation	28
3.1.2	Nestin-Expression bezogen auf das Alter	31
3.2	CD44	32
3.2.1	CD44-Expression bezogen auf das Alter	32
3.2.2	CD44-Expression bezogen auf die Lokalisation	35
3.3	Kollagen IX	36
3.3.1	Kollagen IX-Expression bezogen auf die Lokalisation	37
3.3.2	Kollagen IX-Expression bezogen auf das Alter	38
3.4	GFAP	43
3.4.1	GFAP-Expression in Müller-Zellen	43
3.4.2	GFAP-Expression in Astrozyten	44

3.4.2.1	GFAP-Expression in Astrozyten bezogen auf das Alter	45
3.4.2.2	GFAP-Expression in Astrozyten bezogen auf die Lokalisation	46
4.	Diskussion	51
4.1	Nestin-Expression	51
4.1.1	Nestin-Expression in fetalen und embryonalen Augen.....	51
4.1.2	Lokalisation der Nestin-Expression in der Netzhaut.....	52
4.1.3	Nestin-Expression in anderen Augenstrukturen	54
4.1.4	Zur Rolle von Nestin in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen	55
4.2	CD44-Expression	56
4.2.1	CD44-Expression in fetalen und embryonalen Augen.....	56
4.2.2	CD44-Expression in adulten Augen	57
4.2.3	CD44-Expression im Mausmodell	58
4.2.4	Zur Rolle von CD44 in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen	59
4.3	Kollagen IX-Expression	60
4.3.1	Kollagen IX-Expression im Auge	60
4.3.2	Zur Rolle von Kollagen IX in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen	62
4.4	GFAP-Expression.....	62
4.4.1	GFAP-Expression in fetalen und embryonalen Augen	62
4.4.2	GFAP-Expression in Astrozyten der Netzhaut	63
4.4.3	GFAP-Expression in Krankheitsbefunden	64
4.4.4	Zur Rolle von GFAP in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen	66
5.	Zusammenfassung	68
6.	Abbildungsverzeichnis	70
7.	Tabellenverzeichnis	74
8.	Literaturverzeichnis	75
9.	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AHT	Abusive Head Trauma
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
FACIT	Fibril-associated Collagens with Interrupted Triple Helices
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
GAT1	GABA Transporter 1
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
kDa	Kilodalton
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin
LSD	Least Significant Difference
µm	Mikrometer
mRNA	Messenger Ribonucleid Acid
NHERF1	Natrium-Wasserstoff-Antiporter 3-Regulator 1
nm	Nanometer
PEDF	Pigment Epithelium Derived Factor
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris Buffered Saline

TGF-beta 2

Transforming Growth Factor Beta 2

TSP-1

Thrombospondin 1

1. Einleitung

1.1 Embryonalentwicklung der Netzhaut

Die embryonale Entwicklung des Auges beginnt am 22. Entwicklungstag mit der Ausstülpung der Augengruben an beiden Seiten des Vorderhirns. Mit Schluss des Neuralrohrs entwickeln sich diese in der 4. Schwangerschaftswoche zu den Augenbläschen. Durch weitere Einstülpung entwickelt sich im weiteren Verlauf in der 5. Schwangerschaftswoche der doppelwandige Augenbecher (Barishak, 2001).

Die äußere Schicht des Augenbechers bildet das retinale Pigmentepithel, aus der inneren Schicht des Augenbechers entstehen die sensorischen Netzhautschichten. Die Differenzierung der Zellen erfolgt zentrifugal (Moore und Persaud, 2007; Tamm und Ohlmann, 2012). In der 7. Schwangerschaftswoche kommt es durch Wanderung der proliferierenden Zellen nach innen zur Ausbildung der inneren Neuroblastenschicht. Hieraus gehen im weiteren Verlauf amakrine Zellen, retinale Ganglienzellen und Müller-Zellen hervor. Die innere plexiforme Schicht entwickelt sich im 3. und 4. Schwangerschaftsmonat, damit einhergehend ist die Ausbildung der Ganglienzellschicht (Tamm und Ohlmann, 2012) mit starker Zunahme der Anzahl der retinalen Ganglienzellen. Durch Apoptose werden diese jedoch mit zunehmender Differenzierung der Netzhaut wieder reduziert (Provis et al., 1985). Die Entwicklung der Zapfen beginnt in der 10. Schwangerschaftswoche, kurz darauf auch die der Stäbchen. Zu dieser Zeit differenzieren sich auch die Bipolar- und Horizontalzellen. Die Reifung der Zapfen und Stäbchen dauert bis zum 5. bzw. 13. Lebensjahr an. Ebenso reift auch die Fovea in den ersten vier Lebensjahren weiter (Yuodelis und Hendrickson, 1986).

Ab der 12. Schwangerschaftswoche sind die ersten Müller-Zellen in der Netzhaut nachzuweisen. Ihre Zellkerne befinden sich zu diesem Zeitpunkt noch in der sich entwickelnden retinalen Ganglienzellschicht und wandern erst mit zunehmender Netzhautdifferenzierung in die innere Körnerschicht ein. In Abbildung 1 sind die Müller-Zellen sowie die fetale Netzhaut in verschiedenen Entwicklungsabschnitten dargestellt. Die Anzahl der Müller-Zellen nimmt mit zunehmender Schwangerschaftsdauer – insbesondere zum Ende des 3. Monats – weiter zu (Spira und Hollenberg, 1973; Tamm und Ohlmann, 2012).

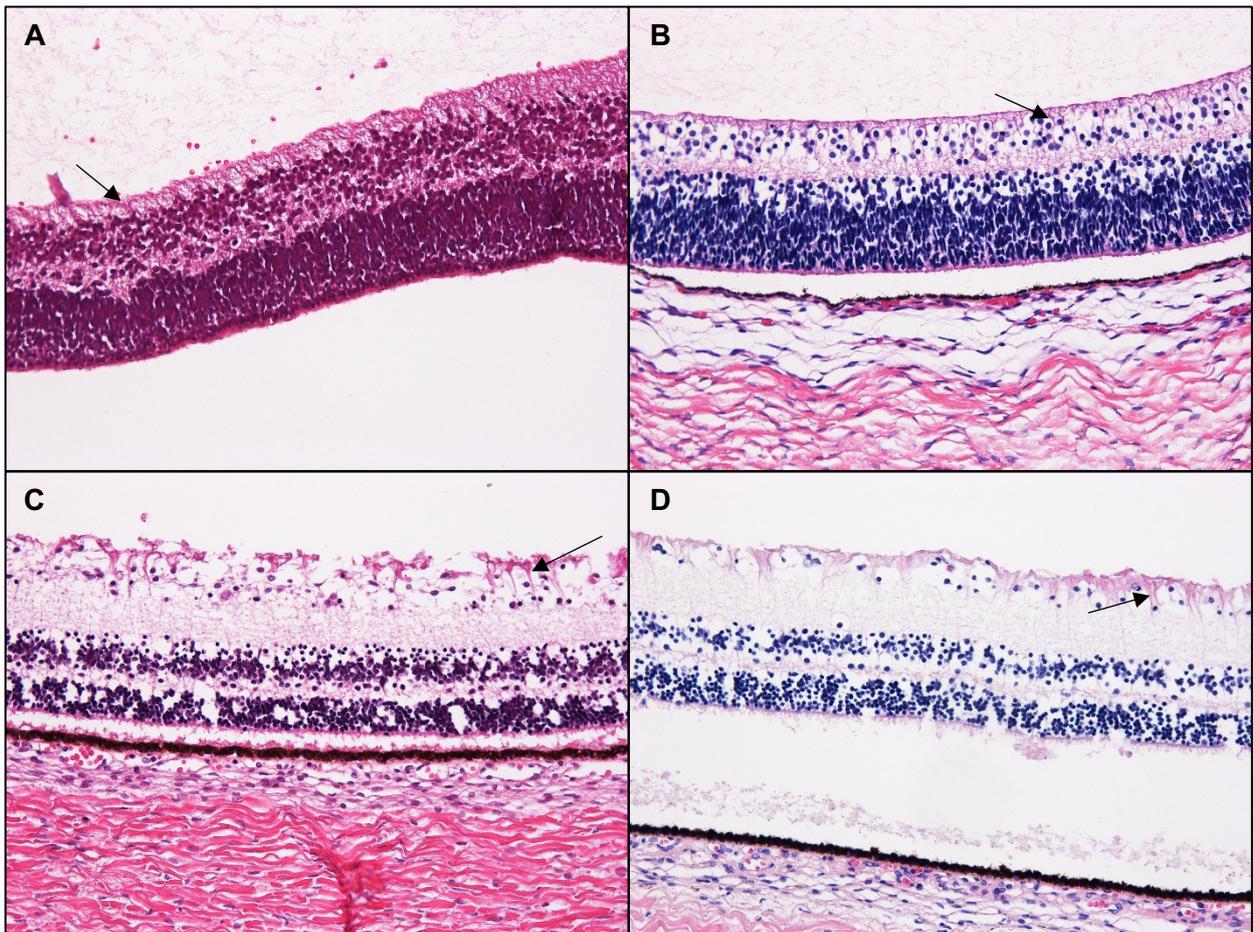


Abb. 1: Darstellung der fetalen peripheren Netzhaut in Augen der 12. SSW (A), 18. SSW (B), 27. SSW (C) und 38. SSW (D). Die Pfeile markieren exemplarisch Müller-Zellen (HE-Färbung, 200fache Vergrößerung).

1.2 Müller-Zellen

Müller-Zellen sind radiale Gliazellen. Ihre Fortsätze bilden nach basal und apikal jeweils das Stratum limitans internum und externum, ihr Zellkörper ruht in der inneren Körnerschicht (Abb. 2). Über ihre Ausläufer stehen die Müller-Zellen mit den sie umgebenden Zellen in Kontakt (Bringmann et al., 2006). Vor allem der basal liegende Anteil des Zytoplasmas beinhaltet glattes endoplasmatisches Retikulum und Endosome (Junqueira und Carneiro, 1996).

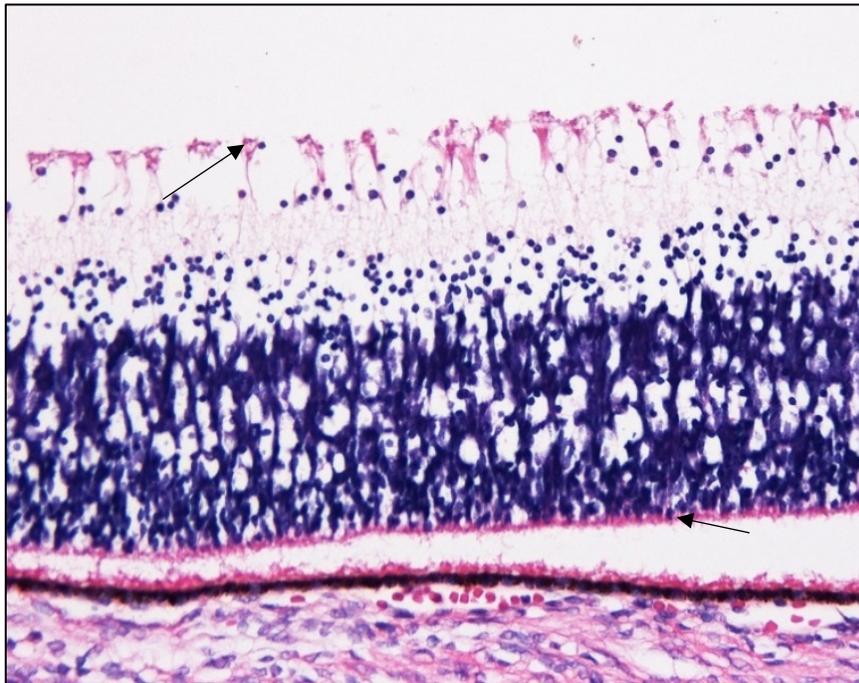


Abb. 2: Darstellung der Müller-Zellen in einem fetalen Auge der 23. Schwangerschaftswoche (HE Färbung, 200fache Vergrößerung). Die Pfeile markieren exemplarisch die Endfüße zum Glaskörper hin sowie die basalen Fortsätze.

Müller-Zellen übernehmen viele verschiedene Funktionen in der Netzhaut. Sie tragen zum Beispiel zum Stabilitätserhalt bei, können Einfluss auf den Stoffwechsel nehmen oder als Lichtleiter der Netzhaut dienen. In den folgenden Abschnitten wird genauer auf die verschiedenen Funktionen eingegangen.

Eine wichtige Aufgabe der Müller-Zellen ist der Stabilitätserhalt der Netzhaut. Müller-Zellen sind in regelmäßigen Abständen zueinander angeordnet. Zusammen mit den amakrinen Zellen, Photorezeptoren und bipolaren Zellen der Netzhaut bilden Müller-Zellen „Säulen“, welche eine funktionelle Informationsverarbeitungseinheit bilden. Zudem wird angenommen, dass Müller-Zellen den bipolaren und amakrinen Zellen als „Stützleiter“ bei deren Wanderung durch die Netzhaut während der Embryonalentwicklung dienen (Reichenbach et al., 1994).

Durch ihren Aufbau, der sich über die gesamte Netzhautdicke erstreckt, sind Müller-Zellen für die Stützfunktion gut gerüstet. Zwischen den einzelnen Müller-Zellen und den sie umgebenden Photorezeptoren befinden sich Aktin-Filamente, die mitverantwortlich für den Stabilitätserhalt der Netzhaut sind (Vaughan und Fisher, 1987).

Müller-Zellen scheinen sich auch an mechanische Veränderungen in der Netzhaut anzupassen. In Untersuchungen mit einem für diese Zwecke hergestellten Zugapparat fanden Lindqvist et al. heraus, dass Müller-Zellen in Meerschweinchen- und Rattenaugen auf mechanischen Zug der Retina reagieren. So zeigten sich etwa erhöhte intrazelluläre Calciumwerte in den Müller-Zellen sowie erhöhte Werte des Transkriptionsfaktors c-Fos. Es zeigte sich jedoch keine Veränderung der Expression von Intermediärfilamenten (Lindqvist et al., 2010). Auch in humanen Müller-Zellen wurden auf mechanischen Zug reagierende Ionen-Kanäle gefunden (Puro, 1991). Es bleibt zu klären, inwiefern diese Anpassungsmechanismen auch bei den mechanischen Veränderungen während des retinalen Wachstums von fetalen Augen eine Rolle spielen.

Müller-Zellen spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der metabolischen Versorgung der Netzhaut. Sie sind zum Beispiel in der Lage, Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) aus dem Extrazellulärraum aufzunehmen und tragen somit zur Regulation der synaptischen Antwort der Photorezeptoren bei. Die GABA-Aufnahme erfolgt über einen natrium- und chloridabhängigen Transporter (GAT1), die Aufnahme von Glutamat in die Müller-Zellen erfolgt über natriumabhängige Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) (Bringmann et al., 2013). Zudem können Müller-Zellen Glutamat ausschütten (Slezak et al., 2012).

Auch bei der Entstehung eines klaren und scharfen optischen Bildes auf der Netzhaut scheinen Müller-Zellen eine wichtige Rolle einzunehmen. Während des Durchtritts von Licht durch die Netzhaut kommt es zur Lichtbrechung an den Zellorganellen und Fortsätzen der Netzhautbestandteile. Aufgrund ihrer Ausdehnung über die gesamte Netzhautdicke kommen als Lichtleiter vor allem die Müller-Zellen in Frage. Franze et al. fanden in Untersuchungen mit Laserlicht heraus, dass Müller-Zellen eine weitestgehend brechungsarme Lichtpassage ermöglichen. Im Bereich der Müller-Zellen zeigt sich deutlich weniger zurückgeworfenes Licht. Dies liegt an ihrer Ausrichtung entlang des Lichtweges sowie an ihrem zellulären Aufbau mit wenigen Zellorganellen im Lichtweg. Müller-Zellen übernehmen somit in der Netzhaut eine ähnliche Rolle wie Glasfaserkabel. Durch das Vorhandensein der Müller-Zellen wird das optische Bild, das auf der Netzhaut abgebildet wird, verbessert (Franze et al., 2007).

Müller-Zellen sind des Weiteren an der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke beteiligt. Sie sind wie Astrozyten in der Lage, die Impermeabilität der Endothelzellverbände zu unterstützen (Tout et al., 1993). Auch unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei Hypoxie, nehmen Müller-Zellen durch die Ausschüttung von in die Angiogenese eingreifenden Faktoren (zum Beispiel PEDF, TGF-beta 2 und TSP-1) Einfluss auf diese und unterstützen antiproliferative und proapoptotische Signalwege (Eichler et al., 2004).

Über die bisher genannten Eigenschaften und Aufgaben von Müller-Zellen hinaus sind diese in einigen Tierarten auch in der Lage in den Zellzyklus einzutreten und retinale Vorläuferzellen zu produzieren. Diese können sich dann zu Zapfen oder Stäbchen differenzieren. Dies wurde zum Beispiel bei Zebrafischen (Bernardos et al., 2007) und Ratten (Kubota et al., 2006) nachgewiesen.

Zusammenfassend übernehmen Müller-Zellen viele verschiedene Aufgaben in der Netzhaut – von metabolischen wie der Produktion und Entsorgung von Stoffen, über mechanische wie dem Stabilitätserhalt der Netzhaut. Durch die Regulation der synaptischen Antwort der Photorezeptoren sowie ihr Potential als „Glasfaserkabel“ der Netzhaut zu dienen, optimieren Müller-Zellen das Bild der Umwelt, welches auf der Netzhaut entsteht.

Im Folgenden wird auf die untersuchten Antikörper eingegangen:

1.3 Nestin

Nestin ist ein Typ VI Intermediärfilament, welches im sich entwickelnden Nervensystem zu finden ist und dort von neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird. Hier sorgt Nestin für die Stabilität der Zellstruktur während der Migration und den weitreichenden strukturellen Veränderungen des sich entwickelnden Nervensystems. Im Vergleich zu anderen Intermediärfilamenten besitzt Nestin ein verhältnismäßig kurzes N-terminales Ende mit nur 11 Aminosäuren und ein langes C-terminales Ende mit 1314 Aminosäuren (Lendahl et al., 1990). Während der neuronalen Differenzierung kommt es zu einer Herunterregulation der Nestin-Expression (Dahlstrand et al., 1992).

Nestin spielt bei vielen Zellentwicklungsschritten eine Rolle. So unterstützt Nestin die Zelle bei der Mitose und spielt vermutlich auch bei der Zellregeneration eine Rolle. Durch Hoch- bzw. Herunterregulation der Nestin-Expression wird das Verhalten von Vimentin bei der Mitose beeinflusst. Wird Nestin herunterreguliert, verharren die Vimentin-Filamente zusammengeschlossen während der gesamten Mitose (Chou et al., 2003).

Außerdem handelt es sich bei Nestin um einen Stammzellmarker, der im sich entwickelnden Nervensystem (Lendahl et al., 1990) und bei Ratten unter anderem in der sich entwickelnden Niere und im Herzmuskel nachgewiesen werden konnte (Wagner et al., 2006).

Nestin wurde in fetalen humanen Augen zwischen der 15. und 19. Schwangerschaftswoche in differenzierten und undifferenzierten Müller-Zellen nachgewiesen (Walcott und Provis, 2003). Auch in embryonalen Augen zwischen der 5. und 12. Schwangerschaftswoche konnte Nestin mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz in Mesenchym, Sklera, Chorioidea, Linse und in der frühen Fetalzeit auch in länglichen Zellen der Netzhaut nachgewiesen werden (Matas et al., 2015).

Nestin befindet sich außerdem in frühen embryonalen Stammzellen, die sich in Neuroektoderm, Mesoderm und Entoderm differenzieren können, sowie in adulten Rattenaugen nach Verletzung wie zum Beispiel bei Hypoxie in den Endfüßen der Müller-Zellen (Xue et al., 2011), beim Glaukom oder nach Durchtrennung des Nervus opticus (Xue et al., 2010). Dies deutet auf eine potenzielle Rolle von Nestin bei der Geweberegeneration hin (Wiese et al., 2004).

1.4 CD44

Bei CD44 (Cluster of Differentiation) handelt es sich um eine große Gruppe von transmembranen Glykoproteinen, die mit vielen Komponenten der Extrazellulärmatrix interagieren (Morath et al., 2016). Des Weiteren ist CD44 – ebenso wie Nestin – ein Stammzellmarker und wurde in fetalem Blut, Leberzellen und Knochenmark nachgewiesen (Campagnoli et al., 2001).

Eine wichtige Fähigkeit von CD44 ist die Bindung von Hyaluronsäure (Aruffo et al., 1990). Hierfür sind zwei Bindungsregionen notwendig. Eine Bindungsstelle befindet sich am NH₂-

Ende von CD44, die andere in dem der Membran angrenzenden Molekülanteil. Wichtig für die Bindung von Hyaluronsäure sind vor allem die basischen Anteile der Bindungsstellen (Peach et al., 1993).

Auch im Auge konnte CD44 nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Müller-Zellen in Maus-Embryonen zeigte sich eine CD44-Expression in den Müller-Zellen ab dem 12. Tag postnatal (Shinoe et al., 2010). In fetalen menschlichen Augen wurde CD44 in einer Kohorte mit vier Augen zwischen der 6. und 21. Schwangerschaftswoche ab der 21. Schwangerschaftswoche in den Müller-Zellen nachgewiesen (Nishina et al., 1997). Auch in gesunden adulten Augen konnte CD44 in Müller-Zellen nachgewiesen werden. Hier wurde CD44 vor allem in den Fortsätzen der Müller-Zellen in der peripheren Netzhaut exprimiert (Too et al., 2017).

Zudem konnte in verschiedenen Tumorzellen eine vermehrte Expression von CD44 nachgewiesen werden, beispielsweise im Adenokarzinom des Pankreas (Li et al., 2014), in Gliomen (Pietras et al., 2014) oder im kolorektalen Karzinom (Wielenga et al., 1993). CD44 wird von ruhenden Lymphozyten in geringem Ausmaß exprimiert. Bei Aktivierung der T-Zellen kommt es zu einer Hochregulation von CD44-Isoformen. Durch die Aktivierung kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Wanderungsbereitschaft und Veränderung der Adhäsionseigenschaften der T-Zellen (Koopman et al., 1993). CD44 nimmt somit eine wichtige Rolle bei der Zellkommunikation, insbesondere mit Hyaluronsäure, und dem Überleben von Krebs-Stammzellen ein (Tamada et al., 2012). All dies führt dazu, dass CD44 im Fokus als potentieller Biomarker für Krebs-Stammzellen oder in Zukunft als Angriffspunkt für „targeted therapies“ steht (Yan et al., 2015).

1.5 Kollagen IX

Die Familie der Kollagene beinhaltet 28 Mitglieder, die alle mindestens eine Triple-Helix-Struktur aufweisen und sich im Extrazellulärraum ablagern. Kollagene spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation und dem Strukturerehalt von Geweben (Ricard-Blum, 2011).

Das Heterotrimer Kollagen IX hat eine Gesamtlänge von 171 bis 190 nm (Duance et al., 1984) und besteht aus drei relativ kurzen Triple-Helices (COL1, COL2 und COL3), die von

vier nicht Triple-Helices umgeben werden (NC1, NC2, NC3 und NC4). Durch diesen Aufbau entsteht ein flexibles Molekül (Bishop et al., 1992). Es handelt sich bei Kollagen IX somit um ein FACIT-Kollagen (Fibril-associated collagen with interrupted triple-helices). Diese Gruppe der Kollagene, die nur in Assoziation mit anderen Fibrillen auftreten, wurde erstmals 1989 beschrieben (Gordon et al., 1989). Zu der Gruppe der FACIT-Kollagene zählen unter anderem auch Kollagen XII, XIV, XVI und XIX. Kollagen IX bildet keine eigenen Polymere, sondern Fibrillen mit anderen Kollagenen. Dafür lagert sich Kollagen IX über kovalente Crosslink-Verbindungen an Kollagen II an (Eyre et al., 1987).

Kollagen IX wurde erstmals 1985 von van der Rest et al. beschrieben (van der Rest et al., 1985) und ist zum Beispiel im Glaskörper zu finden. Hier macht Kollagen IX ungefähr 25 % des Gesamtkollagens aus und liegt auch hier in Verbindung mit Kollagen II vor (Bos et al., 2001). In humanen fetalen Augen wurde Kollagen IX bereits von Herwig et al. in Konjunktiva- und Korneaepithel (Herwig et al., 2013) sowie in Müller-Zellen (nicht publiziert) nachgewiesen. Außerhalb des Auges findet sich Kollagen IX zum Beispiel im adulten Gelenkknorpel und bildet dort bis zu 5 % des Gesamtknorpels (Eyre et al., 2006).

1.6 GFAP

GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) wurde erstmal 1971 im zentralen Nervensystem von Patienten mit Multipler Sklerose von Eng et al. beschrieben (Eng et al., 1971). Es ist ein Intermediärfilament, welches hochspezifisch für Astroglia ist. GFAP, das zusammen mit Vimentin, Desmin und Peripherin zur Klasse III der Intermediärfilamente zählt, wird vor allem von reifen Astrozyten exprimiert (Dahlstrand et al., 1992). Zudem wurde GFAP auch in Schwann-Zellen sowie Nicht-Gliazellen nachgewiesen, zum Beispiel in myoepithelialen Zellen, Chondrozyten sowie in Fibroblasten unterschiedlicher Gewebe (Hainfellner et al., 2001).

Das menschliche GFAP-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert. GFAP hat ein Molekulargewicht von 49 kDa und besteht aus der zentralen „Stab“-Region und aus einem sehr kurzen amino-terminalen sowie einem carboxy-terminalen Ende, die für die Ausbildung der

GFAP-Filamente sowie für die Interaktion mit anderen Intermediärfilamenten und Proteinen wichtig sind (Reeves et al., 1989). Es sind bislang acht Isoformen von GFAP bekannt, die wahrscheinlich verschiedene Funktionen erfüllen (Middeldorp und Hol, 2011).

Als Intermediärfilament ist eine der Hauptfunktionen von GFAP das Zytoskelett der Zelle zu stützen. Diese Funktion übernimmt GFAP in den Astrozyten zusammen mit Vimentin, Nestin und Synemin (Middeldorp und Hol, 2011). In GFAP-Knockout-Mäusen sorgte das Fehlen von GFAP für eine heruntergesetzte Stabilität der Endfüße der Müller-Zellen unter mechanischer Belastung (Lundkvist et al., 2004). Eine weitere wichtige Aufgabe von GFAP ist die richtige Ausrichtung der Zellfilamente während der Mitose. Dies geschieht durch Phosphorylierungsvorgänge (Inagaki et al., 1994). Eine wichtige Funktion von Astrozyten ist die Ausbildung von Synapsen und damit verbunden die Sekretion und Wiederaufnahme von Neurotransmittern. Bei dem Transport von Glutamat durch den GLAST-Transporter zeigt sich eine starke Zunahme der Transportfähigkeit unter Vorhandensein von GFAP. Zudem sorgt GFAP mithilfe von NHERF1 (Natrium-Wasserstoff-Antiporter 3-Regulator 1) und Ezrin für die Verankerung des GLAST-Transporters in der Membran der Astrozyten (Sullivan et al., 2007).

GFAP konnte in adulten Augen in Müller-Zellen bisher nur in nicht physiologischen Zuständen, etwa bei Netzhautschädigung, nachgewiesen werden. In den gesunden Augen der Kohorte färbten sich keine Müller-Zellen, sondern nur retinale Astrozyten (Okada et al., 1990). Ebenso konnte im Glaskörper von Patienten mit epiretinale Gliose oder Netzhautablösung eine erhöhte GFAP-Konzentration nachgewiesen werden (Jünemann et al., 2015). In Rattenaugen fand man eine erhöhte GFAP-Expression in Müller-Zellen nach Abklemmen der okulären Blutzufuhr (Osborne et al., 1991).

Bezogen auf die menschliche Entwicklung zeigten mehrere Studien die erste Expression von GFAP während der embryonalen Entwicklung in den Gliazellen der subventrikulären Zone des menschlichen Gehirns ab der 13. Schwangerschaftswoche und eine Zunahme der GFAP-Expression mit zunehmendem Gestationsalter (Middeldorp et al., 2010). Die GFAP-Expression nimmt bei Erwachsenen mit zunehmendem Alter sowie bei Schädigung des Gehirns zu (Middeldorp und Hol, 2011).

1.7 Abusive Head Trauma

Das Abusive Head Trauma (AHT) ist ein Schütteltrauma bei Säuglingen, das durch Scher- und Rotationskräfte bei starkem Schütteln des Kindes verursacht wird. Früher wurde das AHT auch als kindliches Schütteltrauma oder Shaken-Baby-Syndrom bezeichnet. Zu den häufig bei diesem Syndrom auftretenden Verletzungen gehören Netzhautblutungen, Subduralblutungen durch Einriss der Brückenvenen und Knochenbrüche der Rippen oder des Rückens (Nadarasa et al., 2014). Das AHT verläuft in 30 % der Fälle letal. Die überlebenden Kinder tragen häufig schwere kognitive Defizite davon (Keenan et al., 2007).

Aus forensischen Gründen werden die Augen der verstorbenen Kinder häufig auch durch Ophthalmopathologen untersucht, da es einige auf das AHT hinweisende ophthalmologische Befunde gibt, welche die Diagnosestellung unterstützen können. Insbesondere ausgeprägte bilaterale Netzhautblutungen sind charakteristisch. Dennoch müssen alle möglichen Ursachen für retinale Blutungen (zum Beispiel Gerinnungsstörungen oder Gefäßverschlüsse) sorgfältig ausgeschlossen werden. Weitere typische okuläre Befunde umfassen perimakuläre Falten mit hämorrhagischer makulärer Retinoschisis und Einblutungen in die Sehnervenscheiden (Verdijk und Herwig-Carl, 2020). Diese sind jedoch ebenfalls nicht pathognomonisch (Breazzano et al., 2014; Nadarasa et al., 2014). In einer Untersuchung von Wygnanski-Jaffe et al. wurden Netzhautblutungen nach AHT in 16 von 18 untersuchten Augen gefunden. In der Kontrollgruppe mit Augen nach akzidentiellem Unfalltrauma fanden sich Netzhautblutungen nur in 3 von 18 Augen. Auch Blutungen der Nervenöhle des Nervus opticus fanden sich in den Augen der Kinder mit AHT häufiger als in den Augen der Kontrollgruppe (Wygnanski-Jaffe et al., 2006). Als mögliche Erklärung für die Kombination der ophthalmologischen Befunde, die sich in dieser Kombination außerordentlich oft in Verbindung mit dem AHT zeigen, gibt es verschiedene Theorien. Ein Großteil sieht als Hauptursache die wiederholte Akzeleration und Dezeleration, die spezifisch für das Schütteln beim AHT ist. Dadurch kommt es zum Zug des Glaskörpers an der Netzhaut. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass durch die feste Verankerung der Augenstrukturen in der Orbita ein Drehpunkt entsteht, gegen den die Kraft bei der Beschleunigung und dem Abbremsen fokussiert wird und somit zu den Verletzungen führt (Breazzano et al., 2014; Wygnanski-Jaffe et al., 2006).

1.8 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird das Expressionsmuster der Stammzellmarker bzw. Strukturproteine Nestin, CD44, Kollagen IX und GFAP in 39 Augen von Feten der 11. bis 38. Schwangerschaftswoche untersucht. Es gibt bisher keine Untersuchung zur Expression von Nestin, CD44, Kollagen IX und GFAP in fetalen Augen einer ähnlich großen Kohorte. Besonderes Augenmerk wurde auf die Expression der Marker in fetalen Müller-Zellen gelegt. Zudem wurden sechs Augen von Kindern, die im Alter von einem bis neun Monaten verstarben, untersucht. Fünf der Kinder starben am AHT, ein Kind verstarb an einem unklaren Syndrom.

Ziel der Arbeit ist es, anhand des Expressionsmusters Rückschlüsse auf die Plastizität und Reifung der Müller-Zellen während der fetalen und frühkindlichen Entwicklung zu ziehen.

Im Einzelnen werden folgende Fragestellungen geprüft:

1. Welche Strukturen im fetalen Auge exprimieren Nestin, CD44, Kollagen IX und GFAP?
2. Ab welchem Zeitpunkt lassen sich Müller-Zellen in fetalen Augen immunhistochemisch nachweisen?
3. Gibt es räumliche Unterschiede in der Färbungsintensität der Marker in den Müller-Zellen in der Netzhaut?
4. Zeigt sich ein zeitlicher Unterschied der Färbungsintensität der Müller-Zellen im Verlauf der Schwangerschaft und postnatal?
5. Was sagen diese Beobachtungen über die Plastizität und den Reifungsprozess der Müller-Zellen während der fetalen und frühkindlichen Entwicklung aus?

2. Material und Methoden

2.1 Material

Untersucht wurden 39 fetale Augen der 11. bis 38. Schwangerschaftswoche sowie sechs Augen von Kindern im Alter von einem bis neun Monaten (Abb. 3). Die fetalen Augen wurden im Rahmen der kinderpathologischen Obduktion in der Pathologie des Universitätsklinikums Bonn routinemäßig entnommen und zur ophthalmopathologischen Begutachtung an das ophthalmopathologische Labor der Universitäts-Augenklinik Bonn weitergeben, wo sie auch archiviert wurden. Die Auswahl der untersuchten Augen orientierte sich am Alter der fetalen Augen sowie der guten Erhaltung der okulären Strukturen (ohne ausgeprägte Artefakte), insbesondere der Netzhaut, welche an HE-Schnitten ermittelt wurde. Drei kindliche Augen stammten aus dem ophthalmopathologischen Labor der Universitäts-Augenklinik Bonn. Drei weitere kindliche Augen wurden von der Ophthalmopathologie der Universität Kiel zur Verfügung gestellt. In allen Fällen liegt die Einwilligung der Eltern sowie ein Ethikvotum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn vor.

Verwendet wurde pro Fet nur ein Auge eines Augenpaares. Die Kohorte beinhaltete zwei Zwillingspaare. Von den 39 untersuchten fetalen Augen stammten 21 von männlichen und 16 von weiblichen Feten, bei zwei fetalen Augen war das Geschlecht unbekannt. Von den sechs untersuchten kindlichen Augen stammten vier von männlichen und zwei von weiblichen Säuglingen.

Neun Feten verstarben postnatal. Insgesamt 29 Feten verstarben intrauterin, davon 21 durch Fetozyd. Bei einem Fet war die Todesart unbekannt. Fünf frühkindliche Augen stammten von Säuglingen, die am AHT verstarben. Ein frühkindliches Auge stammte von einem Frühgeborenen der 36+5 SSW, das einen Monat nach der Geburt an einem unklaren Syndrom verstarb.

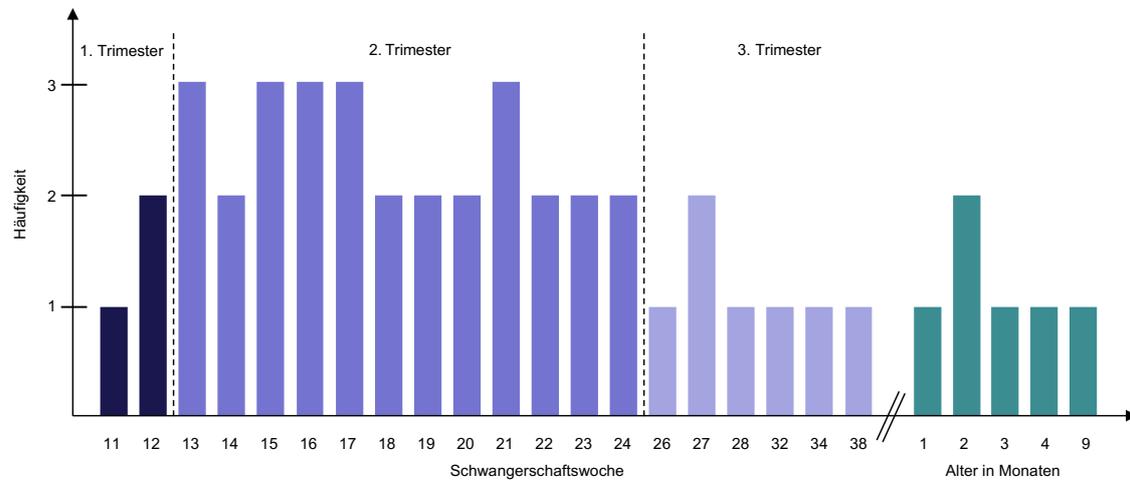


Abb. 3: Altersverteilung der untersuchten fetalen und kindlichen Augen. Modifiziert nach (Bulirsch et al., 2022).

Der Mittelwert des Alters der fetalen Augen lag bei 19 SSW (Median: 18 SSW). Bei den kindlichen Augen lag der Altersmittelwert bei 3,5 Monaten (Median: 3 Monate).

2.2 Vorbehandlung und immunhistochemische Anfärbung der Augen

Von den formalin-fixierten, über Xylol und Alkohol in Paraffinblöcke eingebetteten Augen wurden mithilfe eines Rotations-Mikrotoms 5 µm dünne Schnitte angefertigt, welche im Wasserbad bei 45 °C geglättet und anschließend auf Objektträger gezogen wurden. Es wurde darauf geachtet, dass insbesondere die Netzhaut gut auf der gewählten Schnittebene zu sehen war. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte in Xylol zuerst entparaffiniert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) rehydriert und mit destilliertem Wasser gespült.

Da durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung Antigene maskiert werden können, wurde als nächster Schritt eine Hitzedemaskierung durchgeführt, um die Epitope in den nächsten Schritten für die Antikörper wieder zugänglich zu machen. Hierfür wurden die Schnitte für 20 Minuten in einem mit Citratpuffer (pH 6,0) gefüllten Gefäß in der Mikrowelle

bei 750 Watt erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend 30 Minuten mit 5 % Tris Buffered Saline und Rinderserumalbumin Puffer (TBS/BSA) behandelt. Als nächsten Schritt wurden die Objektträger zweimal für jeweils 10 Minuten in 1 % TBS/BSA gestellt.

Im Anschluss wurde der Puffer vorsichtig von den Objektträgern abgesaugt. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu vermeiden, wurden die Präparate mit Proteinblock behandelt, der für 10 Minuten bei Raumtemperatur einwirkte und dann abgesaugt wurde. Nach erneutem Absaugen wurden anschließend die mit 1 % TBS/BSA angesetzten Primärantikörper auf die einzelnen Präparate aufgetropft. Die mit Primärantikörper behandelten Objektträger wurden dann über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger aus dem Kühlschrank genommen und für 30 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt. Um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen, wurden die Präparate anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Um die unspezifische Hintergrund-Markierung durch die endogene Peroxidase des Sekundärantikörpers zu verhindern, wurden die Präparate für 10 Minuten mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung geblockt und danach für 20 Minuten mit 1 % TBS/BSA behandelt. Nach erneutem Abspülen mit destilliertem Wasser wurde der Sekundär-Antikörper aufgetropft und die Präparate bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Präparate erneut mit destilliertem Wasser abgespült und danach für 20 Minuten mit TBS behandelt.

Die Färbung mit der LSAB-Methode wurde in dieser Versuchsreihe mit der 2-Schritt-Methode mit einem markierten Horseradish-Peroxidase Polymer-Sekundärantikörper (HRP) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde ein unkonjugierter Primärantikörper gegen ein Epitop des gesuchten Antigens auf das zu untersuchende Gewebe aufgetragen. Daraufhin erfolgte die Konjugation mit dem markierten HRP Polymer-Sekundärantikörper. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörperreaktion wurde dann eine Lösung aus 3-Amino-9-Ethylcarbol (AEC) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aufgetropft und nach 20 Minuten Einwirkzeit abgespült, wodurch sich eine rotbraune Färbung der Antigen-Antikörperreaktion ergibt. Zuletzt wurden die Präparate mithilfe der Hämalaun-Kernfärbung nach Meyer gefärbt und dann eingedeckt.

2.3 Auswertung

Die Augen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern (LMB, MCHC) lichtmikroskopisch in Bezug auf die Färbeintensität und die Lokalisation der Müller-Zellen in den angefärbten Netzhautabschnitten ausgewertet. In insgesamt 19 von 1246 Fällen kam es zu unterschiedlicher Bewertung der Farbintensität. In diesen Fällen erfolgte eine erneute gemeinsame Auswertung, bei der sich in allen Fällen auf einen Farbscore geeinigt wurde.

Die Intensität der Farbreaktion wurde semiquantitativ mit dem Immunreaktivitätsscore modifiziert nach Remmele beschrieben (Tab. 1 und Abb. 4).

Tab. 1: Beschreibung der Intensität der Farbreaktion.

0	keine Farbreaktion (Abb. 3A)
1	schwach positive Farbreaktion (Abb. 3B)
2	mittelgradig positive Farbreaktion (Abb. 3C)
3	stark positive Farbreaktion (Abb. 3D)

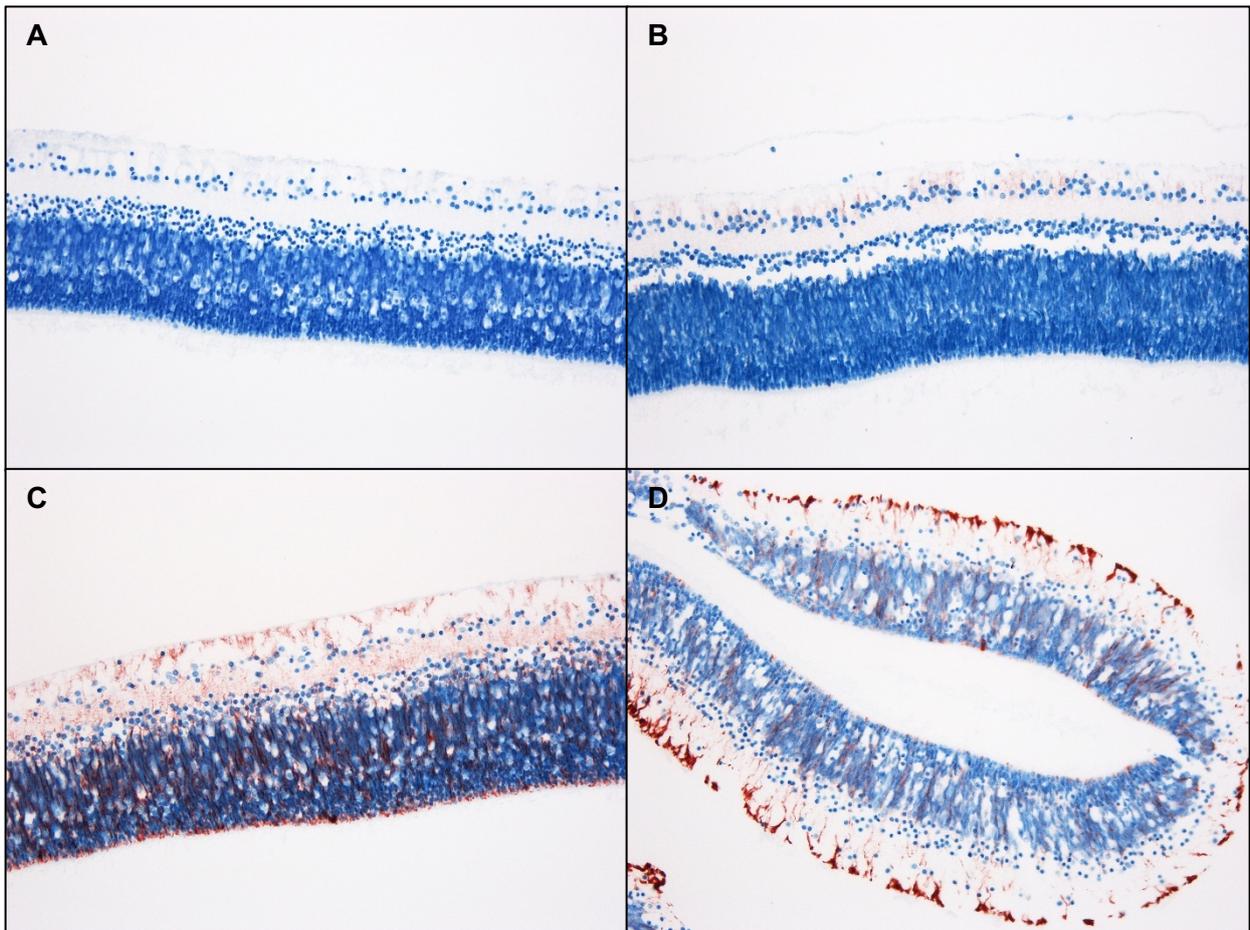


Abb. 4: Exemplarische Darstellung des angewendeten Farbscores am Beispiel von Nestin in der fetalen Netzhaut. A: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, B: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, C: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, D: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3. (200fache Vergrößerung).

Zur Auswertung der Lokalisation wurden die Augen in sieben Netzhautabschnitte unterteilt (Tab. 2 und Abb. 5).

Tab. 2: Beschreibung der Einteilung der Netzhautabschnitte.

1	Posteriorer Pol mit Makula und Nervus opticus
2N	Posteriorer Pol bis Äquator nasal
2T	Posteriorer Pol bis Äquator temporal
3N	Äquator bis Langefalte nasal
3T	Äquator bis Langefalte temporal
4N	Langefalte nasal
4T	Langefalte temporal

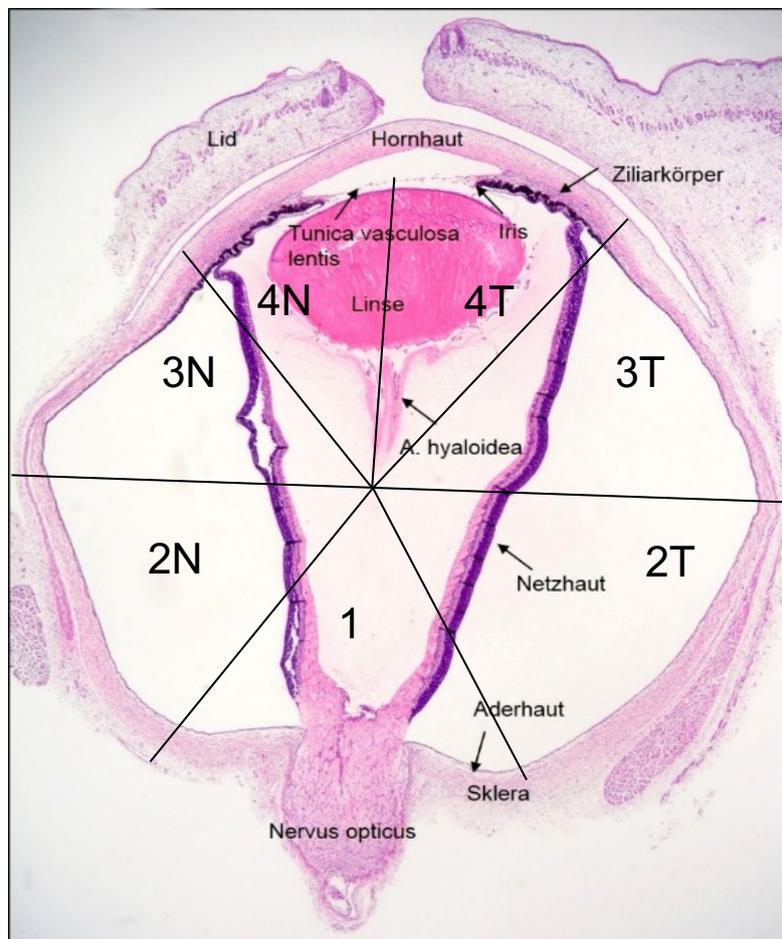


Abb. 5: Darstellung der räumlichen Einteilung der Augen am Beispiel eines fetalen Auges der 14. Schwangerschaftswoche (1: posteriorer Pol, 2N: posteriorer Pol bis Äquator nasal, 2T: posteriorer Pol bis Äquator temporal, 3N: Äquator bis Langefalte nasal, 3T: Äquator bis Langefalte temporal, 4N: Langefalte nasal, 4T: Langefalte temporal). Modifiziert nach (Herwig-Carl, 2015).

Für die Auswertung wurden die Augen ihrem Alter entsprechend in Altersgruppen eingeteilt (Tab. 3 und Abb.3).

Tab. 3: Definition der einzelnen Altersgruppen mit Angabe der Gruppengröße.

Gruppe	Alter	Anzahl (n)
1. Trimester	1. bis 12. Schwangerschaftswoche	3
2. Trimester	13. bis 24. Schwangerschaftswoche	29
3. Trimester	25. bis 38. Schwangerschaftswoche	7
Frühkindlich	1. bis 8. Monat postnatal	6

2.4 Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Softwarepaket IBM SPSS 25. Es wurde ein gemischt lineares Modell nach Greenhouse-Geisser mit anschließender Post-hoc Korrektur nach LSD (Least significant difference) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

2.5 Antikörper

Monoclonal Antibody to Nestin (C-term) // AM20271PU-S ACRIS // Clone SP103 // Lot: 140821LVC (Rabbit/IgG) // Verdünnung 1:100

Monoclonal Antibody to CD44 // SM3153P ACRIS // Clone MEM-85 // Lot: 522818 (Mouse/ IgG2b) // Verdünnung 1:50

Monoclonal Mouse Anti Human // Glial Fibrillary Acidic Protein // DAKO // Clone 6F2 // Ref: M0761 // Lot: 20024870 (Mouse/IgG1) // Verdünnung 1:50

Monoclonal Antibody to Collagen type IX // AF6410 ACRIS // Clone 23-5D1 // Lot: A150264BH (Mouse/IgG2a) // Verdünnung 1:90

Sekundär Antikörper (Dako EnVision Dual Link System HRP, K4063, Lot 10101679)

2.6 Geräte und Reagenzien

Xylol	(PanReac AppliChem)
Tris Puffer	(Roth)
Citronensäure Monohydrat	(Merck)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	(Roth)
Natriumchlorid	(Roth)
Wasserstoffperoxid	(Roth)
BSA	(Albumin IgG frei Roth)
Proteinblock	(Dako, Serum Free, Ready to Use)
AEC	(Dako AEC+ High Sensitivity Substrate Chromogen Ready to Use)
Objektträger	(Marienfeld)
Mikroskop	(Olympus BX50)
Kamera	(Nikon DS-Vi1)

3. Ergebnisse

Von den 39 untersuchten fetalen Augen zeigten bei Betrachtung aller vier Antikörper insgesamt acht Augen keine Farbreaktion in den Müller-Zellen. Da sich jedoch die jeweiligen Kontrollstrukturen, bei Kollagen IX die Linse bzw. bei GFAP der Nervus opticus, anfärbten, kann ein systematischer Fehler bei der Immunfärbung dieser Augen ausgeschlossen werden.

Unter den kindlichen Augen zeigten alle Augen für jeweils unterschiedliche Antikörper eine Farbreaktion.

Zusammenfassend konnten Müller-Zellen ab der 12. Schwangerschaftswoche immunhistochemisch nachgewiesen werden. Je nach Alter der Augen zeigten sich für die untersuchten Marker unterschiedliche Expressionsmuster bezogen auf die einzelnen Netzhautabschnitte. Dies wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

3.1 Nestin

In unserer Untersuchung zeigten 24 der 39 fetalen Augen (61,5 %) von der 12. bis zur 34. SSW sowie ein kindliches Auge (4 Monate) eine Farbreaktion der Müller-Zellen auf Nestin. Nestin wurde in fetalen Augen ab der 12. SSW exprimiert. Das Expressionsmuster für Nestin lässt sich am ehesten als zentrifugal beschreiben. Jüngere fetale Augen zeigten über die gesamte Netzhaut verteilt eine Farbreaktion gegen Nestin, während ältere fetale Augen stärker ausgeprägt in der peripheren Netzhaut eine Farbreaktion zeigten. Die frühkindlichen Augen zeigten bis auf ein Auge keine Farbreaktion.

3.1.1 Nestin-Expression bezogen auf die Lokalisation

Bei der Betrachtung der Expression von Nestin in den Müller-Zellen sahen wir einen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf die Anfärbung der Müller-Zellen in den einzelnen Netzhautabschnitten ($p=0,005$). Die fetalen Augen waren in der peripheren Netzhaut, insbesondere der Langefalte, stärker gefärbt als in den zentralen Netzhautabschnitten (Abb. 6 und Abb. 7).

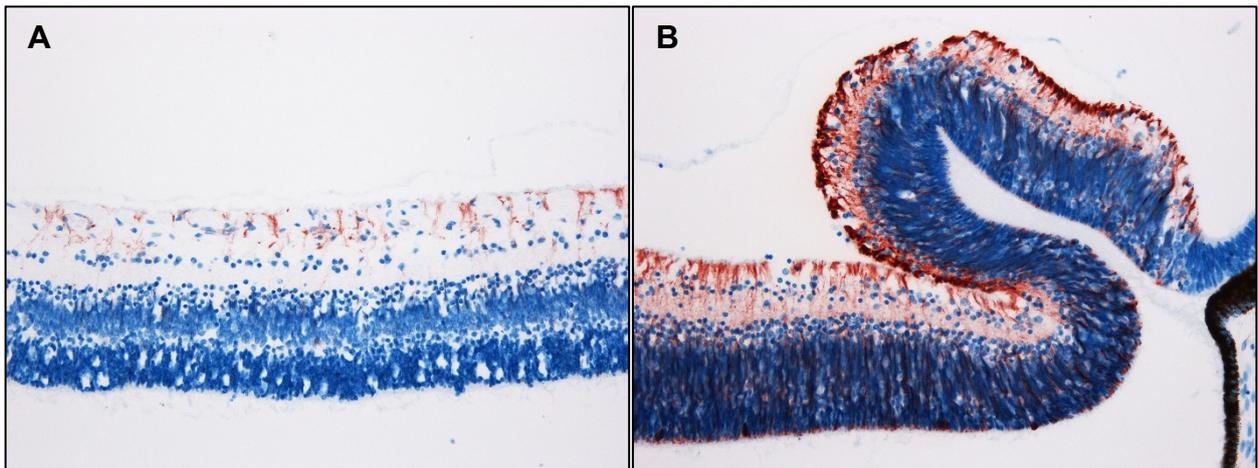


Abb. 6: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen zwischen posteriorem Pol und Äquator (A) gegenüber den Müller-Zellen der Langefalte (B) in einem fetalen Auge der 24. SSW (200fache Vergrößerung).

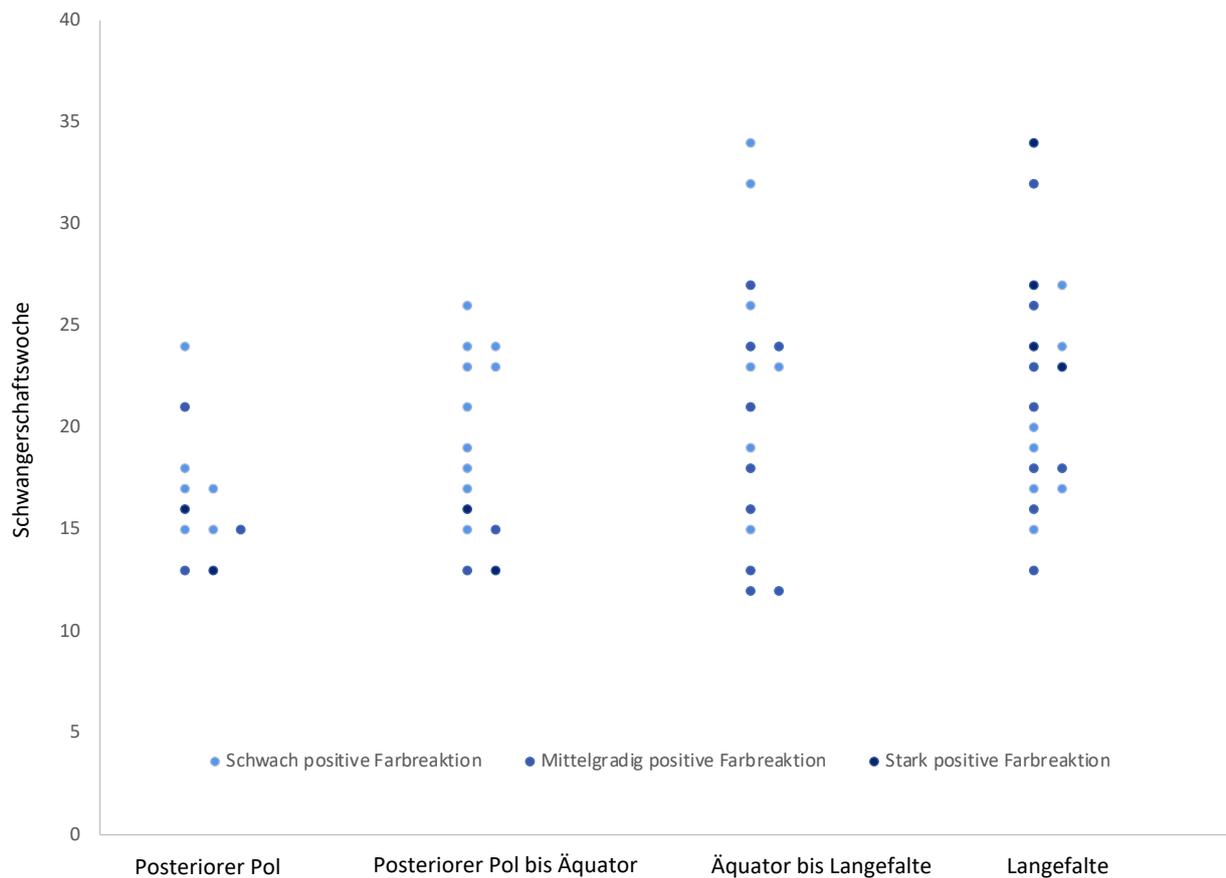


Abb. 7: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen in den einzelnen Netzhautabschnitten. Modifiziert nach (Bulirsch et al., 2022).

Am posterioren Pol zeigte sich vor allem bei den jungen fetalen Augen in der 13. bis 18. SSW eine schwach positive (Score 1) bis stark positive (Score 3) Immunreaktion (Mittelwert 1,67) der Müller-Zellen auf Nestin. In diesen SSW waren 9 von 16 Augen gefärbt (Farbscore 1 bis 3) (Abb. 8). Fetale Augen in späteren SSW und die kindlichen Augen waren nur in wenigen Ausnahmen am posterioren Pol angefärbt. Bei den fetalen Augen ab der 19. SSW färbten sich die Müller-Zellen am posterioren Pol nur bei 2 von 20 Augen an (Farbscore 1 und 2).

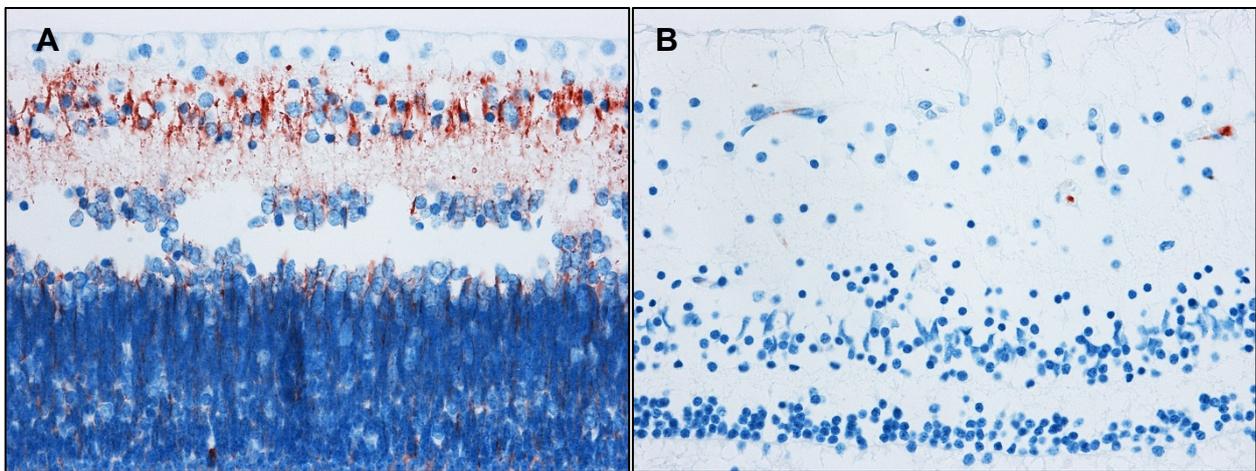


Abb. 8: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen der Netzhaut am posterioren Pol eines fetalen Auges der 15. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 26. SSW (B) (400fache Vergrößerung).

Die Müller-Zellen vom posterioren Pol bis zum Äquator zeigten vereinzelt bis zur 22. SSW eine Immunreaktion auf Nestin (9 nasal und 6 temporal von 28 Augen). Zudem zeigte sich eine schwach positive Anfärbung (Farbscore 1) in allen Augen zwischen der 23. und 26. SSW (n=5). In diesem Netzhautabschnitt zeigte sich sowohl nasal als auch temporal kein Unterschied der Farbintensität bezogen auf das Gestationsalter.

In der Netzhaut zwischen Äquator und Langefalte färbten sich Müller-Zellen über die gesamte Schwangerschaft verteilt (nasal 16 und temporal 15 von 39 Augen) an. Ab der 23. SSW kam es jedoch zu einer vermehrten Farbreaktion (nasal und temporal 8 von 11 Augen).

Auch in der Langegefalte färbten sich die Müller-Zellen ab der 23. SSW stark (nasal 7 und temporal 9 von 11 Augen) an (Abb. 9). Vor der 23. SSW reagierten die Müller-Zellen der Langegefalte vereinzelt auf Nestin (8 nasal und 10 temporal von 28 Augen).

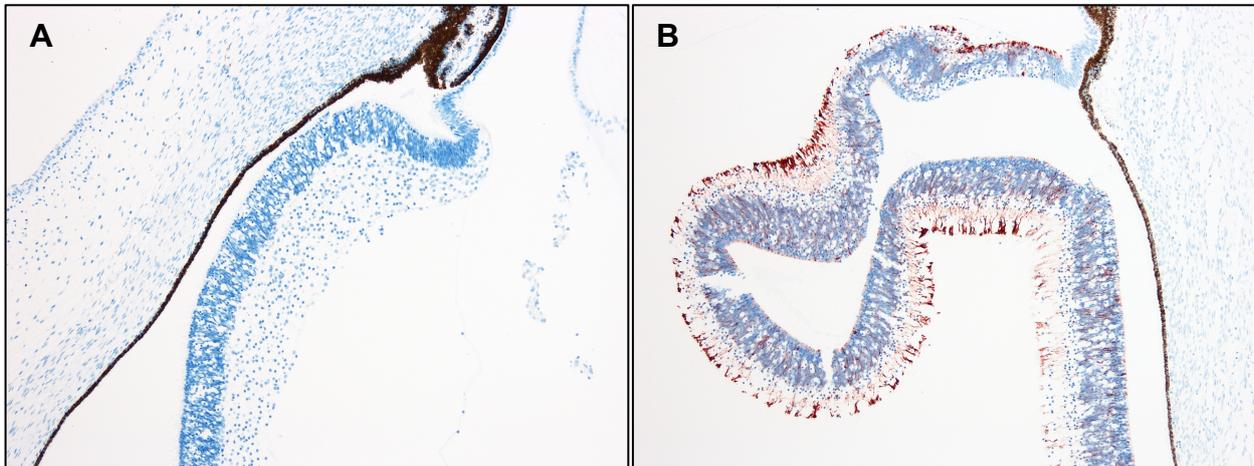


Abb. 9: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen der Langegefalte eines fetalen Auges der 15. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 23. SSW (B) (100fache Vergrößerung).

Bei den kindlichen Augen zeigte nur ein Auge (4 Monate) eine Farbreaktion auf Nestin. Dieses Auge zeigte in allen Netzhautabschnitten eine schwach positive bis stark positive Farbreaktion (Score 1 bis 3). Die anderen fünf kindlichen Augen zeigten keine Farbreaktion.

3.1.2 Nestin-Expression bezogen auf das Alter

Bezüglich des Alters zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Nestin-Farbreaktion in Müller-Zellen von fetalen und kindlichen Augen ($p=0,846$ zum ersten Trimester, $p=0,308$ zum zweiten Trimester und $p=0,401$ zum dritten Trimester) und auch nicht zwischen den einzelnen Altersgruppen insgesamt ($p=0,729$). Tendenziell waren die fetalen Augen jedoch etwas stärker angefärbt als die kindlichen Augen. Allerdings zeigte sich die Tendenz einer altersabhängigen Anfärbung der Müller-Zellen in Relation zur Lokalisation (Abb. 7), passend zur zentrifugalen retinalen Entwicklung.

3.2 CD44

In unserer Untersuchung zeigten 10 der 39 fetalen Augen (25,6 %) von der 13. bis zur 27. SSW sowie 3 von 6 kindlichen Augen (ab 2 Monaten) eine Farbreaktion der Müller-Zellen auf CD44. Die kindlichen Augen waren signifikant stärker gefärbt als die fetalen Augen (siehe Abschnitt 3.2.1). CD44 wurde vor allem in den zentralen Netzhautabschnitten der fetalen Augen exprimiert. Zudem zeigte sich eine CD44-Expression im Gewebe des Limbus.

3.2.1 CD44-Expression bezogen auf das Alter

In frühen Schwangerschaftswochen (11. bis 22. SSW) zeigten nur vereinzelte Augen eine Immunreaktion auf CD44 (5 von 28 Augen). Im Zeitraum zwischen der 23. und 27. SSW konnte eine CD44-Expression in 5 von 7 Augen beobachtet werden. Ältere fetale Augen zeigten keine CD44-Expression. In den frühkindlichen Augen kam es ab einem Alter von 4 Monaten zu einer starken CD44-Farbreaktion.

Die Unterschiede der CD44-Expression waren zwischen den einzelnen Trimestern nicht statistisch signifikant. Bezogen auf das Alter der Augen zeigte sich bei der Expression von CD44 jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den fetalen Augen und den kindlichen Augen, welche eine stärkere Farbreaktion zeigten: zwischen dem ersten Trimester und den kindlichen Augen ($p=0,003$), zwischen dem zweiten Trimester und den kindlichen Augen ($p<0,001$) und zwischen dem dritten Trimester und den kindlichen Augen ($p<0,001$).

Bezüglich der Lokalisation in Abhängigkeit des Alters zeigte sich, dass am posterioren Pol fetale Augen über alle Trimester verteilt (9 von 39 Augen) und kindliche Augen (3 von 6 Augen) angefärbt waren. Hierbei zeigten sich die kindlichen Augen tendenziell stärker gefärbt als die fetalen Augen (Abb. 10).

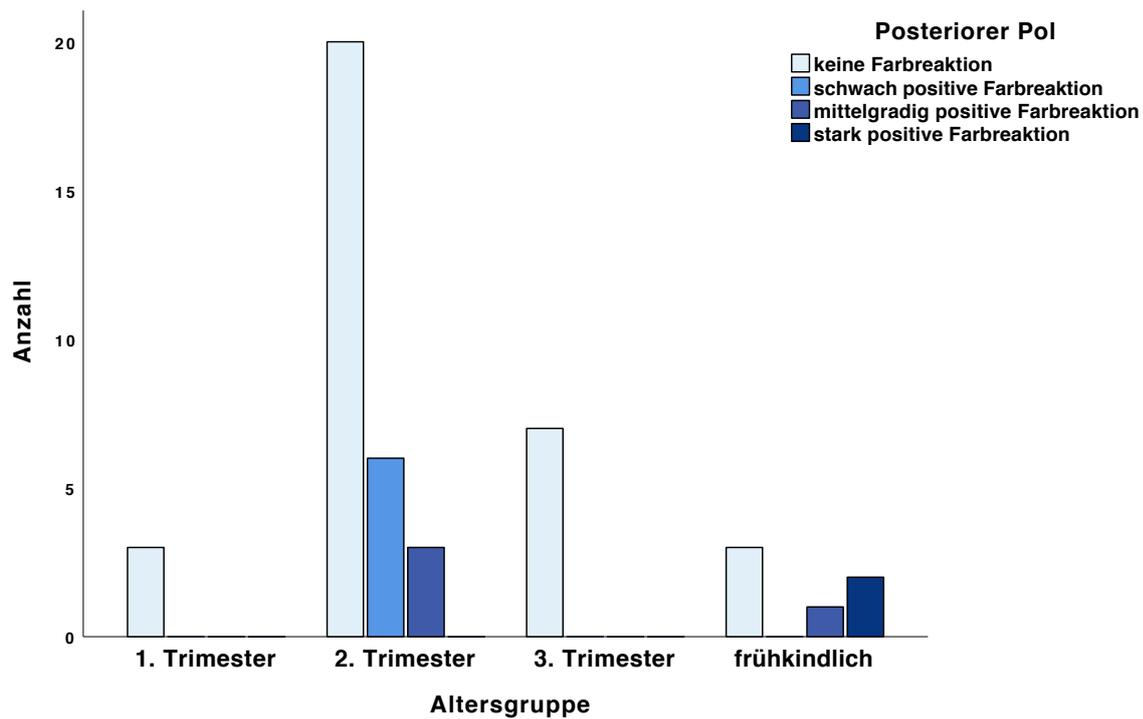


Abb. 10: Darstellung der der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen am posterioren Pol in den einzelnen Altersgruppen.

Vom posterioren Pol bis zum Äquator sahen wir eine Farbreaktion der fetalen Augen ab der 23. SSW fast ausschließlich temporal. In vorangehenden Schwangerschaftswochen färbten sich nur vereinzelte Augen leicht an (3 von 28 Augen). Die kindlichen Augen, die eine Reaktion auf CD44 zeigten (ab einem Alter von 2 Monaten), waren stärker gefärbt als die fetalen Augen (Abb. 11).

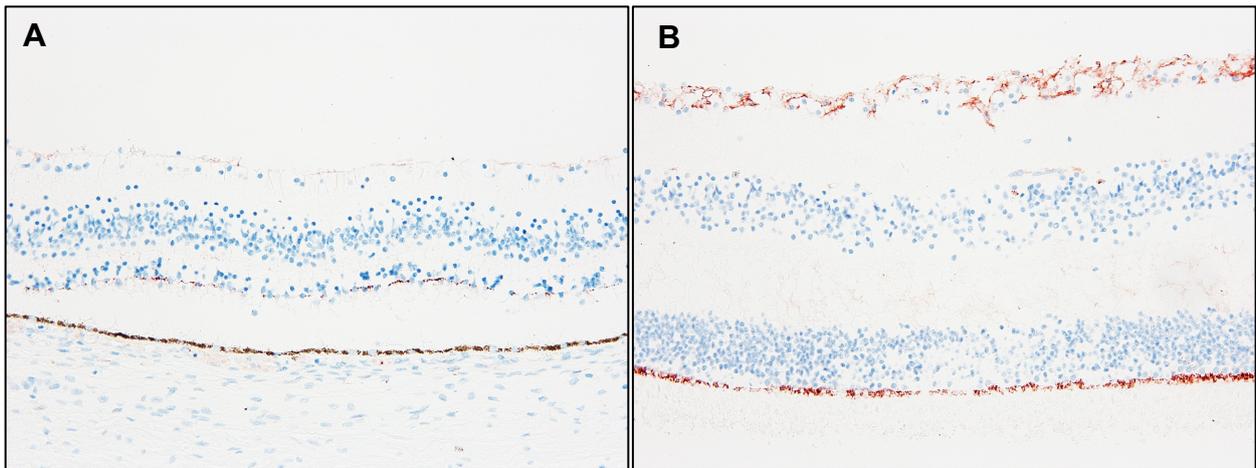


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator eines fetalen Auges der 24. SSW (A) gegenüber einem neun Monate alten frühkindlichen Auge (B) (200fache Vergrößerung).

Im Netzhautabschnitt zwischen Äquator und Langefalte zeigten die fetalen Augen keine Immunreaktion. Bei den kindlichen Augen färbten sich vor allem die älteren Augen der Kohorte (4 und 8 Monate alt) stark an (Abb. 12).

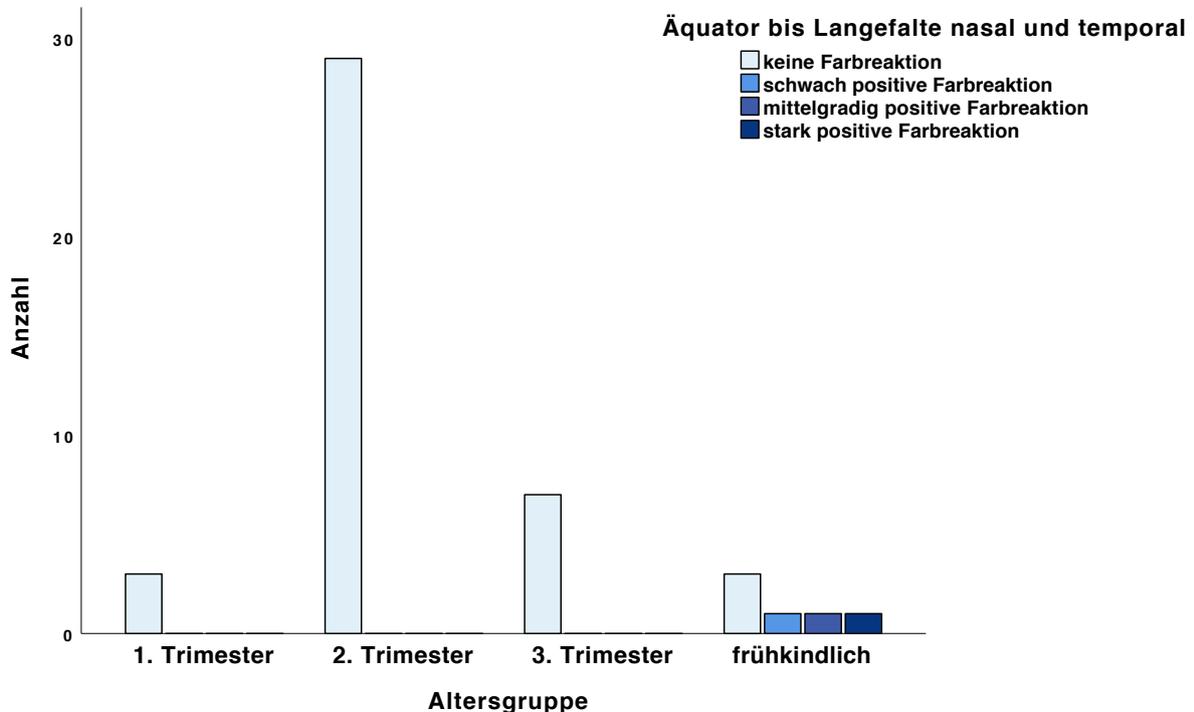


Abb. 12: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen zwischen Äquator und Langefalte in den einzelnen Altersgruppen.

Fetale Augen zeigten an der Langefalte keine Immunreaktion. Die kindlichen Augen zeigten ab einem Alter von 4 Monaten eine starke Immunreaktion (Abb. 13).

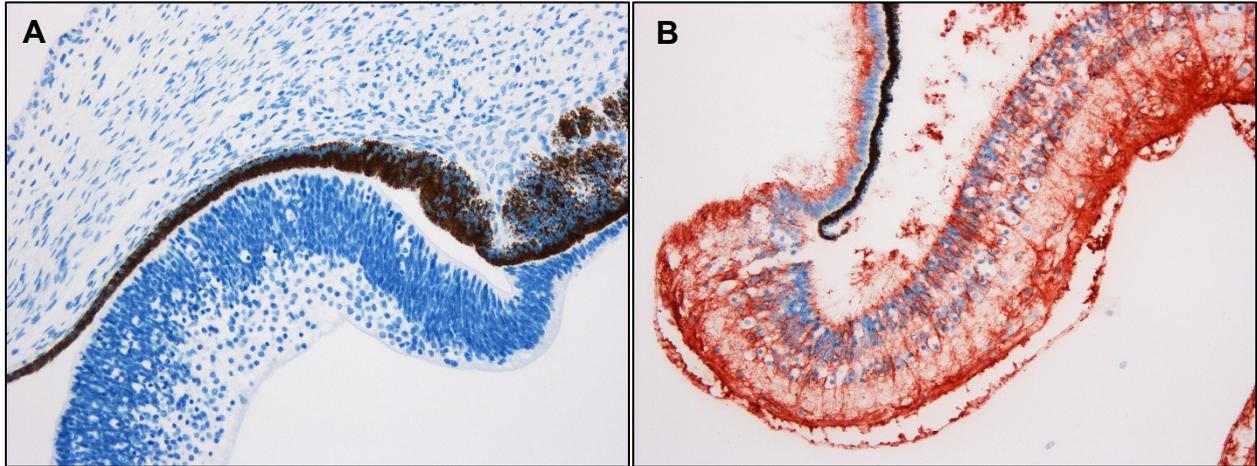


Abb. 13: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen der Langefalte eines fetalen Auges der 13. SSW (A) gegenüber einem vier Monate alten frühkindlichen Auge (B) (200fache Vergrößerung).

3.2.2 CD44-Expression bezogen auf die Lokalisation

Bei der Betrachtung der CD44-Expression in Abhängigkeit zur Lokalisation in der Netzhaut zeigten sich zwischen den einzelnen Netzhautabschnitten keine signifikanten Unterschiede ($p=0,182$). Tendenziell wurde CD44 in unserer Untersuchung in fetalen Müller-Zellen vor allem in der zentralen Netzhaut, allerdings in sehr geringer Ausprägung, exprimiert. In den kindlichen Augen zeigte sich auch eine Farbreaktion der Müller-Zellen in peripheren Netzhautabschnitten.

Außerhalb der Müller-Zellen zeigte außerdem das Limbusgewebe eine Immunreaktion auf CD44. Diese war in Augen der 12. bis 18. SSW sowie der 21. bis 27. SSW zu beobachten (Abb. 14).

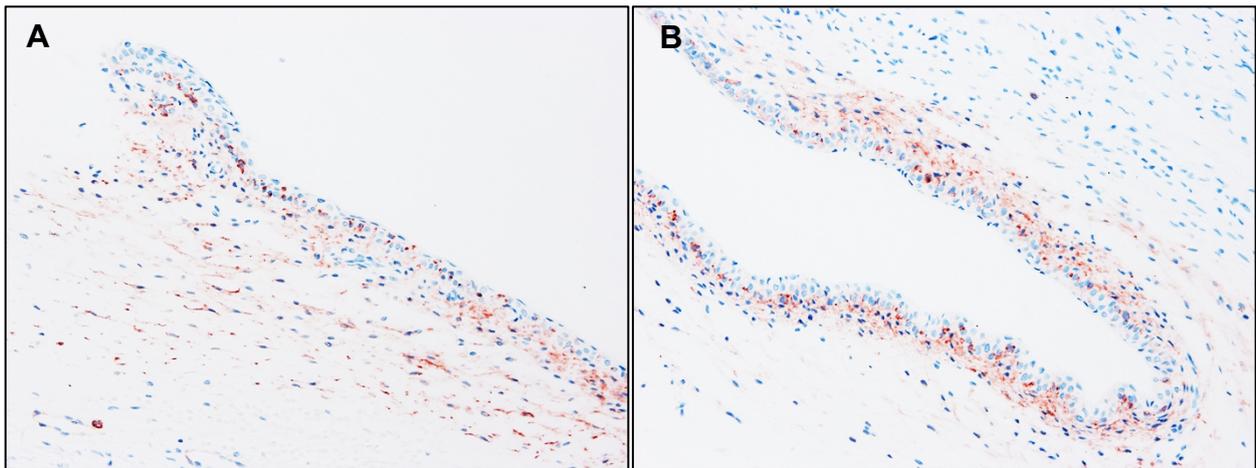


Abb. 14: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 im Limbusgewebe eines fetalen Auges der 23. SSW (A) und eines fetalen Auges der 21. SSW (B) (200fache Vergrößerung).

3.3 Kollagen IX

Insgesamt zeigten 24 von 37 fetalen Augen (64,9 %) ab der 13. SSW eine Farbreaktion gegen Kollagen IX. Kollagen IX wurde außer in den fetalen Müller-Zellen auch in den Blutgefäßen der Netzhaut und der Chorioidea sowie in der Hornhaut und Linse exprimiert (Abb. 15). In wenigen fetalen Augen waren Reste des Glaskörpers erhalten, welche eine schwache Farbreaktion auf Kollagen IX zeigten. Die Müller-Zellen zeigten eine stärkere Farbreaktion gegen Kollagen IX in der zentralen Netzhaut. Die fetalen Augen im dritten Trimester waren stärker gefärbt als die fetalen Augen im ersten und zweiten Trimester sowie die frühkindlichen Augen.

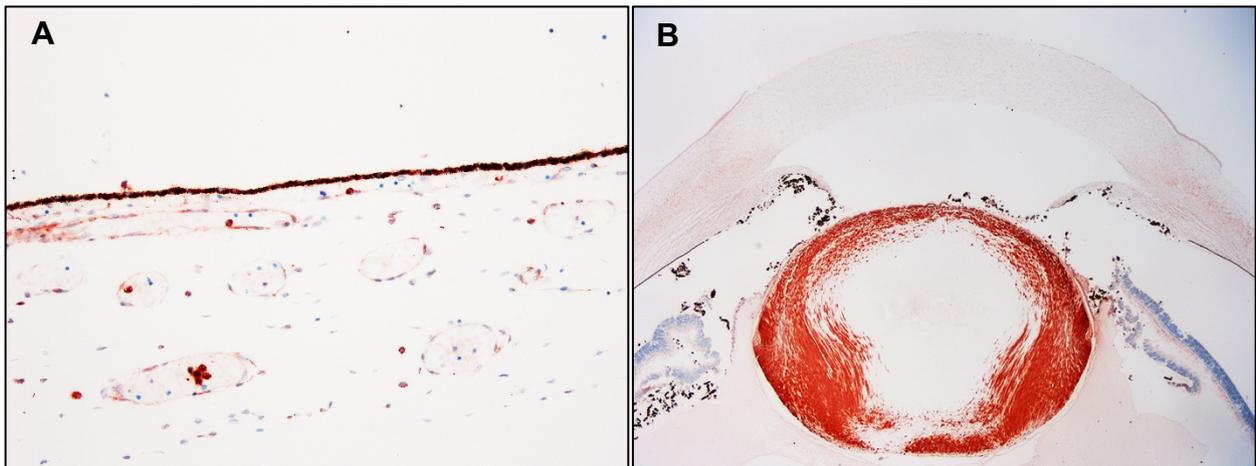


Abb. 15: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX der chorioidalen Blutgefäße in einem fetalen Auge der 27. SSW (A) (200fache Vergrößerung) und der Linse und Hornhaut in einem fetalen Auge der 20. SSW (B) (20fache Vergrößerung).

3.3.1 Kollagen IX-Expression bezogen auf die Lokalisation

Bei der Betrachtung der Kollagen IX-Expression der einzelnen Netzhautabschnitte zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Farbreaktion der Müller-Zellen in den unterschiedlichen Abschnitten ($p=0,015$). Die fetalen Augen zeigten vor allem in der zentralen Netzhaut eine stärkere Farbreaktion (Abb. 16).

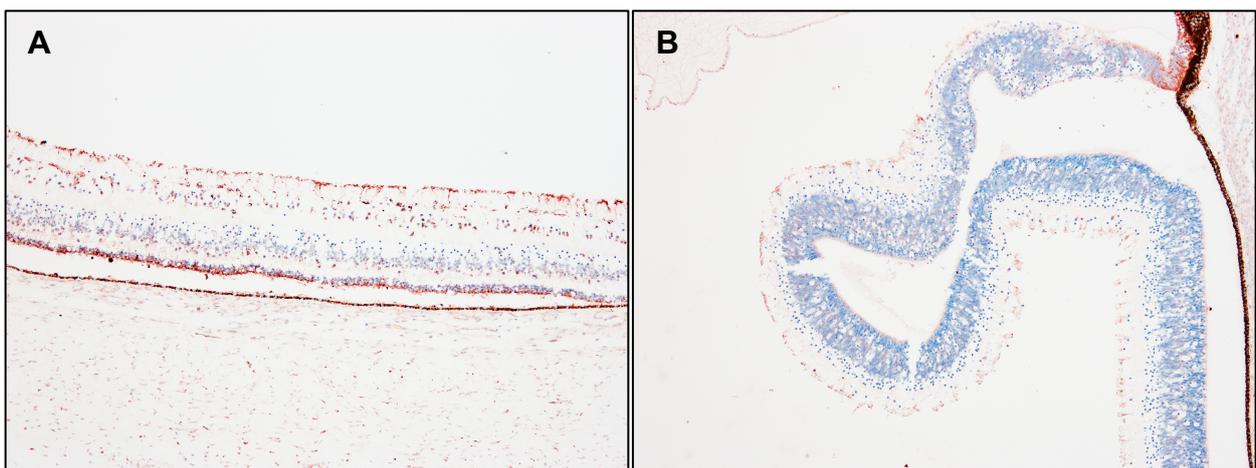


Abb. 16: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX der Müller-Zellen der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator (A) und in der Lamellafalte (B) in einem fetalen Auge der 23. SSW (100fache Vergrößerung).

3.3.2 Kollagen IX-Expression bezogen auf das Alter

Bei der Betrachtung der Kollagen IX-Expression der Müller-Zellen in Abhängigkeit vom Gestationsalter zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Färbung in Augen des dritten Trimesters im Vergleich zu den Augen der anderen Trimester sowie den kindlichen Augen ($p < 0,001$). Die Augen im dritten Trimester waren statistisch signifikant stärker gefärbt als die Augen der anderen Trimester ($p < 0,001$).

Am posterioren Pol der Netzhaut zeigten die fetalen Augen ab der 13. SSW eine Farbreaktion auf Kollagen IX. Fetale Augen, die eine starke Farbreaktion zeigten, waren tendenziell älter als fetale Augen, die keine Farbreaktion zeigten (Abb. 17 und Tab. 4). Unter den kindlichen Augen zeigte nur das mit einem Monat jüngste Auge eine mittelgradig positive Immunreaktion auf Kollagen IX.

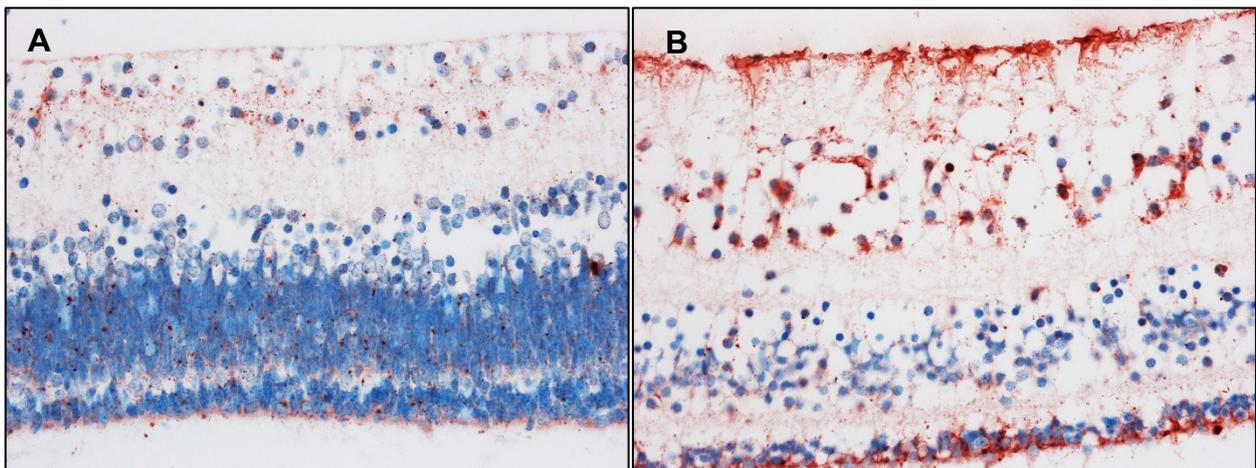


Abb. 17: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX der Müller-Zellen am posterioren Pol in einem fetalen Auge der 15. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 23. SSW (B) (400fache Vergrößerung).

Tab. 4: Immunhistochemische Färbung für Kollagen IX der Müller-Zellen am posterioren Pol und Gestationsalter (0=keine Farbreaktion, 1=schwach positive Farbreaktion, 2=mittelgradig positive Farbreaktion, 3=stark positive Farbreaktion).

Farbreaktion	Schwangerschaftswoche			
	Mittelwert	95% Konfidenzintervall des Mittelwertes Untergrenze	95% Konfidenzintervall des Mittelwertes Obergrenze	Standardabweichung
0	16,563	13,846	19,379	5,099
1	18,750	16,815	20,685	2,315
2	26,833	16,436	37,231	9,908
3	22,429	20,110	24,474	2,507

Vom posterioren Pol bis zum Äquator zeigte sich sowohl nasal als auch temporal eine stärkere Immunreaktion der fetalen Augen mit zunehmenden Gestationsalter. Fetale Augen mit einer leicht positiven oder stark positiven Farbreaktion der nasalen Netzhaut waren älter als fetale Augen, die keine Farbreaktion zeigten. Im temporalen Netzhautabschnitt vom posterioren Pol bis zum Äquator waren fetale Augen, die eine mittelgradig bis stark positive Farbreaktion zeigten, älter als fetale Augen, die keine Farbreaktion zeigten (Abb. 18). Unter den kindlichen Augen zeigte nur das mit einem Monat jüngste Auge eine mittelgradig positive Farbreaktion.

Vom Äquator bis zur Langefalte zeigten die fetalen Augen erst ab der 22. SSW eine Immunreaktion. Jüngere fetale Augen zeigten keine Farbreaktion. Fetale Augen, die eine leicht positive und mittelgradig positive Farbreaktion zeigten, waren älter als fetale Augen, die keine Farbreaktion zeigten (Abb. 19). Auch hier sahen wir nur für das einen Monat alte Auge eine schwach positive Farbreaktion.

Auch in der Langefalte zeigten die fetalen Augen ab der 22. Schwangerschaftswoche eine Immunreaktion auf Kollagen IX. Die jüngeren fetalen Augen sowie die kindlichen Augen zeigten keine Reaktion auf Kollagen IX. Fetale Augen, die nasal eine mittelgradige Farbreaktion zeigten, waren älter als fetale Augen, die keine Farbreaktion zeigten. In der temporal gelegenen Langefalte waren fetale Augen mit leicht und mittelgradig positiver Farbreaktion älter als fetale Augen, die keine Farbreaktion zeigten (Abb. 20).

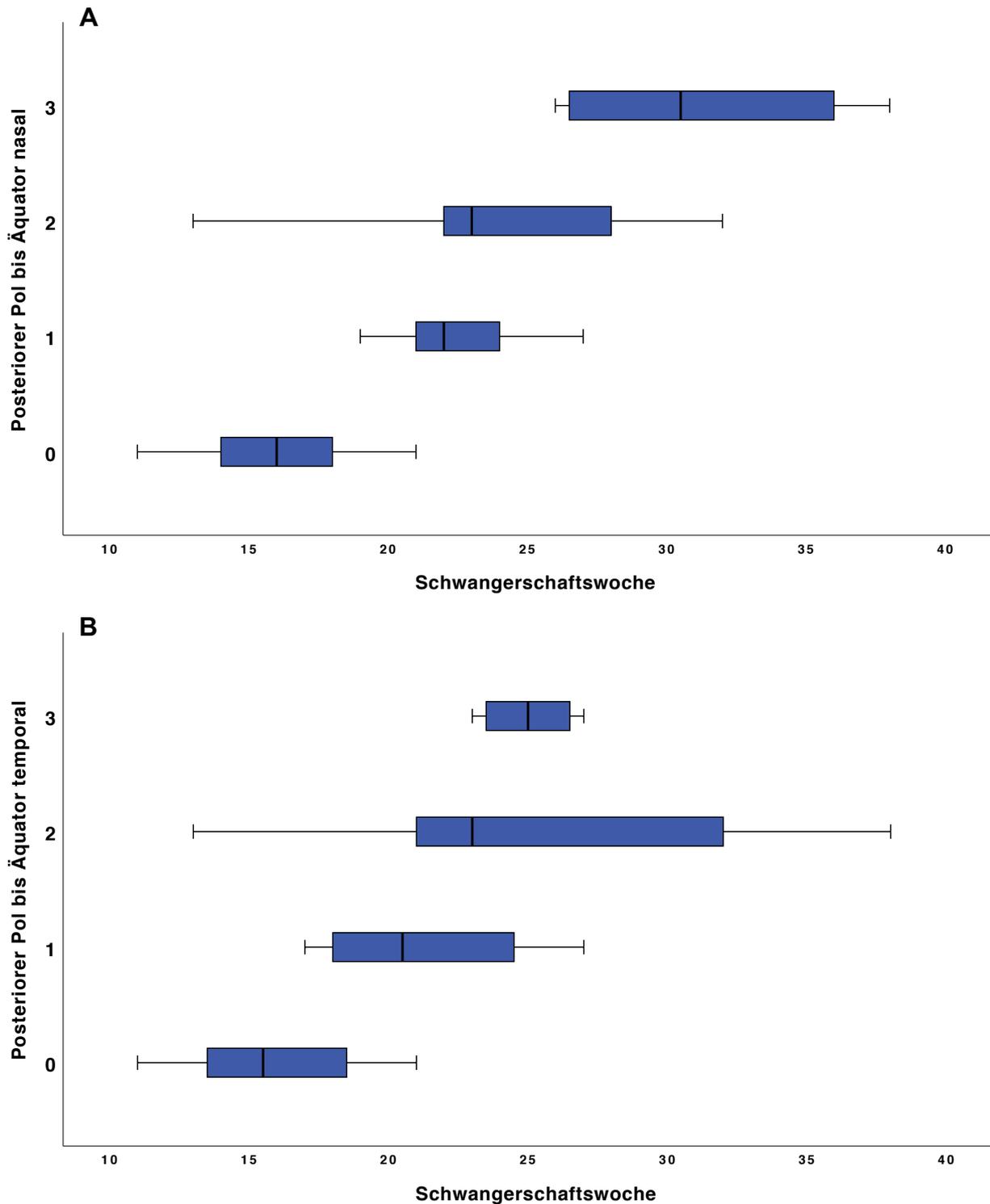


Abb. 18: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, 3: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3) der Müller-Zellen der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.

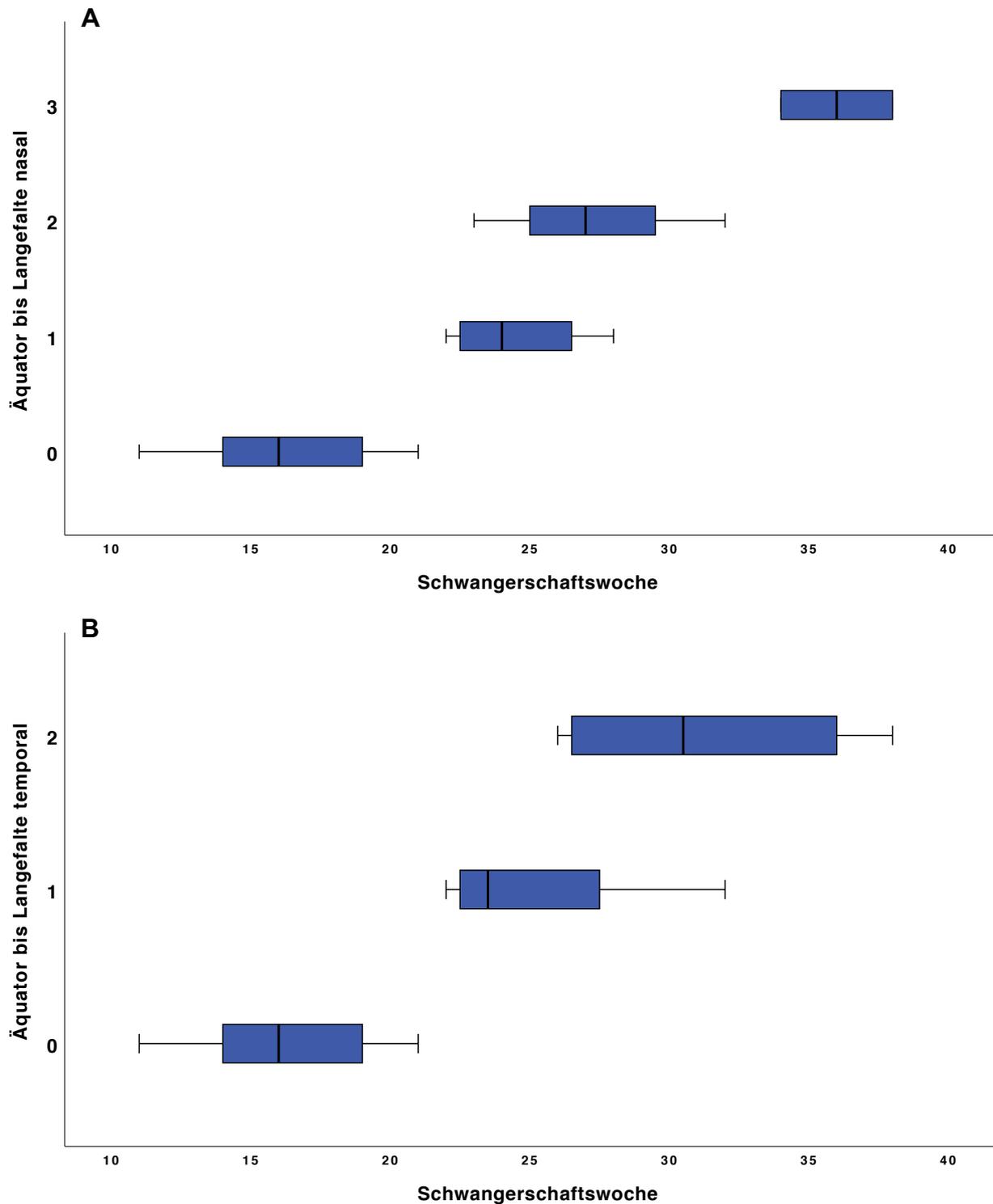


Abb. 19: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, 3: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3) der Müller-Zellen vom Äquator bis zur Längefalte nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.

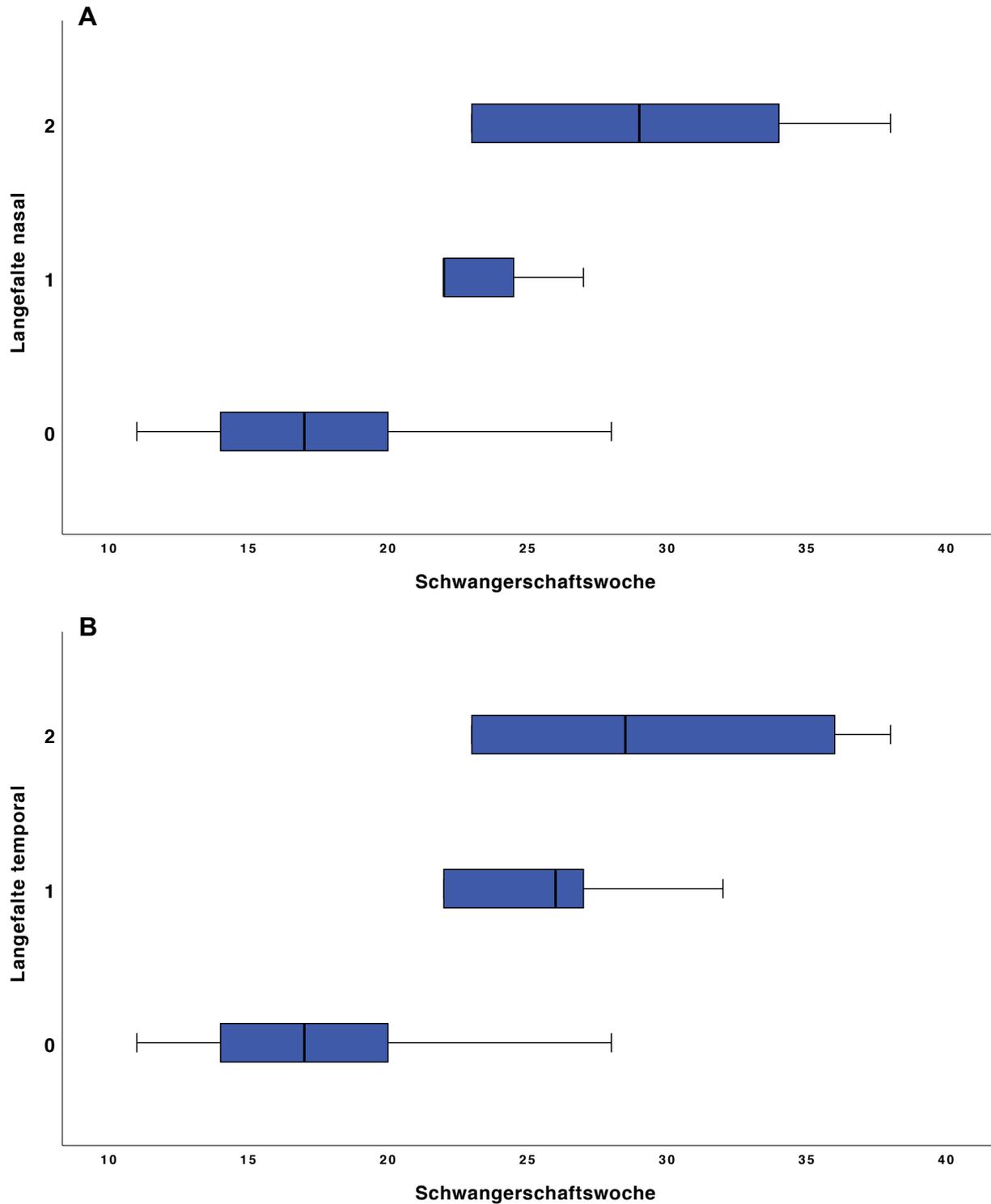


Abb. 20: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2) der Müller-Zellen der Längefalte nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.

3.4 GFAP

GFAP wurde in den fetalen Augen in den Astrozyten und bis auf eine Ausnahme (ein in der 38. SSW postnatal verstorbener Fet) nicht in den Müller-Zellen exprimiert. GFAP wurde vor allem in den Astrozyten der zentralen Netzhautabschnitte sowie im Nervus opticus exprimiert. Es zeigte sich zudem, dass ältere fetale Augen stärker gefärbt waren als jüngere fetale Augen. Müller-Zellen zeigten in den Augen der am AHT verstorbenen Kinder eine Farbreaktion gegen GFAP. Jedoch sahen wir auch bei einem frühkindlichen Auge von einem einen Monat postnatal verstorbenen Säugling eine Farbreaktion der Müller-Zellen in der Längsfalte. Dieser Säugling starb nicht am AHT, sondern an einem unklaren Syndrom.

3.4.1 GFAP-Expression in Müller-Zellen

In der Netzhaut der Kinder, die am AHT verstarben, zeigte sich insbesondere in der peripheren Netzhaut eine Immunreaktion der Müller-Zellen gegen GFAP. Zudem zeigte sich in der Längsfalte eines einen Monat alten kindlichen Auges eine Immunreaktion der Müller-Zellen gegen GFAP (Abb. 21). Dieser Säugling, ein Frühgeborenes der 36+5 SSW, starb einen Monat postnatal an einem unklaren Syndrom mit konnataler Kardiomegalie bei Kardiomyopathie. Am Auge zeigte sich eine ausgeprägte Hornhauttrübung sowie eine konnatale Katarakt. Des Weiteren zeigte das Auge eines Fet der 38. SSW, der am Smith-Lemli-Opitz-Syndrom litt und postnatal an einer Pilzsepsis verstarb, eine Immunreaktion der Müller-Zellen der Längsfalte.

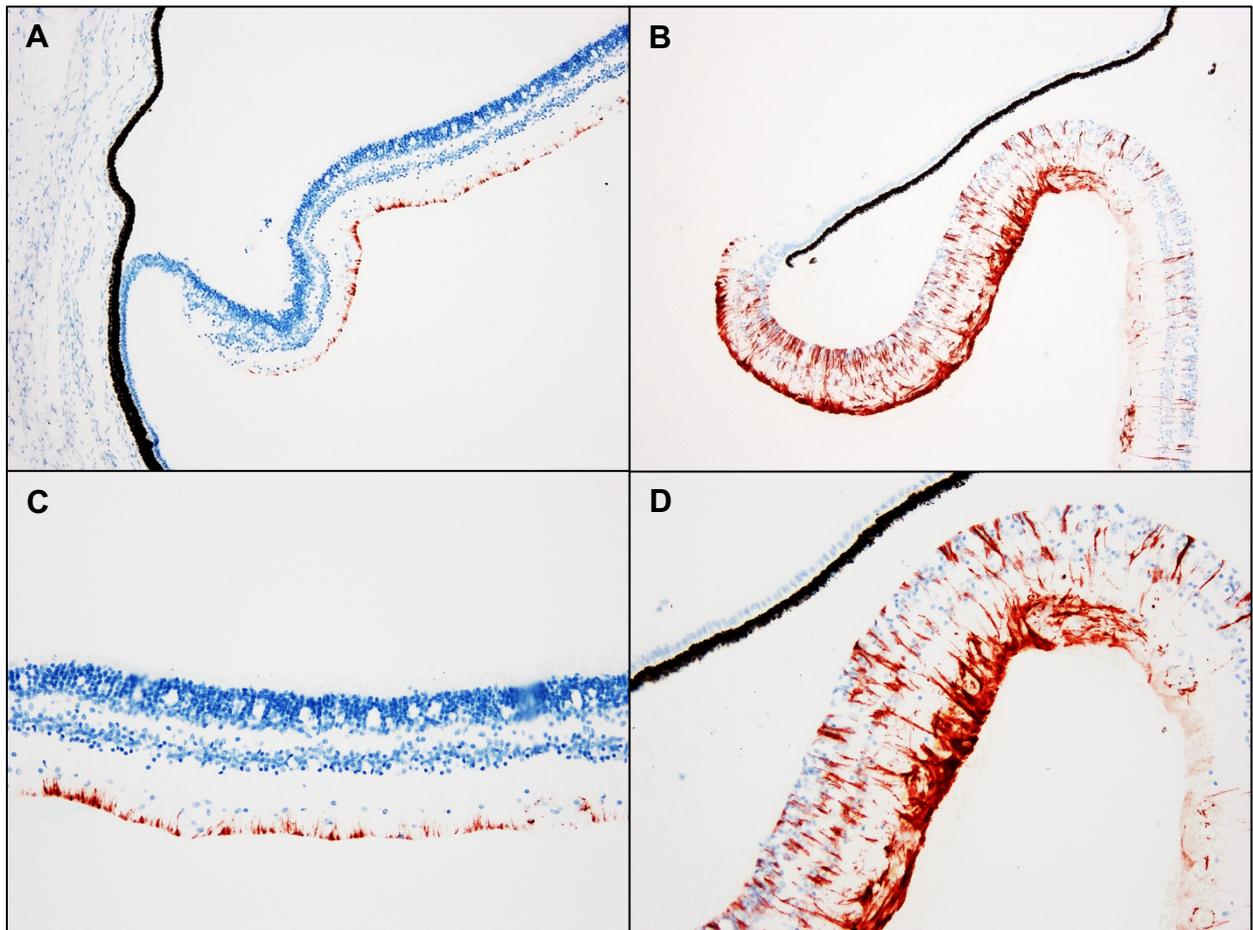


Abb. 21: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Müller-Zellen der Langefalte bei einem Säugling, der einen Monat postnatal an einem unklaren Syndrom verstarb (A 100fache Vergrößerung und C 200fache Vergrößerung) gegenüber einem vier Monate alten Säugling, der am AHT verstarb (B 100fache Vergrößerung und D 200fache Vergrößerung).

3.4.2 GFAP-Expression in Astrozyten

In unserer Untersuchung zeigten 11 von 39 fetalen Augen (28,2 %) eine Immunreaktion gegen GFAP ab der 20. SSW in den Astrozyten. Bei den kindlichen Augen zeigten alle sechs Augen zusätzlich zur Anfärbung der Müller-Zellen eine Immunreaktion der Astrozyten gegen GFAP. GFAP wurde vor allem in den zentralen Netzhautabschnitten exprimiert. Sofern im Anschnitt vorhanden, färbte sich der Nervus opticus in allen untersuchten Augen an. Dies ist als positive interne Kontrolle anzusehen. Nicht alle Augen, in denen der Sehnerv angefärbt war, zeigten auch eine Reaktion der Müller-Zellen bzw. Astrozyten (Abb. 22 und Abb. 23). Im Folgenden gehen wir näher auf die Immunreaktion der Astrozyten ein.

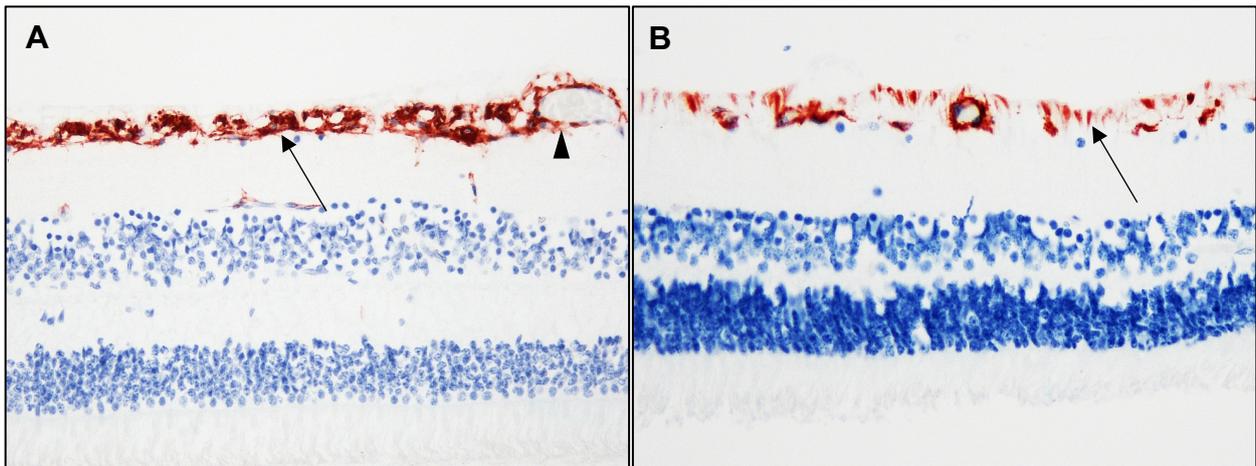


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung für GFAP zur exemplarischen Gegenüberstellung von Astrozyten (A) und Müller-Zellen (B) in einem 3 Monate alten frühkindlichen Auge. Die Pfeile kennzeichnen die Astrozyten (A) und Müller-Zellen (B) in der Ganglienzellschicht. Die Pfeilspitze kennzeichnet ein Blutgefäß, das von Astrozyten umgeben wird.

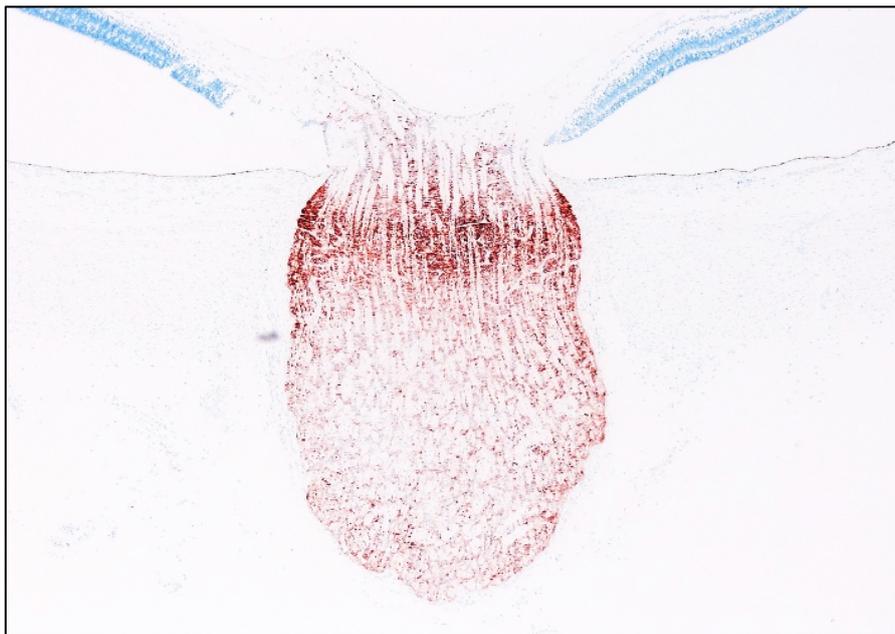


Abb. 23: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP des Nervus opticus bei einem fetalen Auge der 21. SSW (40fache Vergrößerung).

3.4.2.1 GFAP-Expression in Astrozyten bezogen auf das Alter

Insgesamt waren ältere fetale Augen des dritten Trimesters stärker gefärbt als jüngere fetale Augen des ersten ($p < 0,001$) und zweiten Trimesters ($p < 0,001$). Die frühkindlichen Augen waren signifikant stärker gefärbt als die fetalen Augen ($p < 0,001$) (Abb. 24). Die

fetalen Augen im ersten und zweiten Trimester zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Farbreaktion ($p=0,860$). Ab der 23. SSW färbten sich 10 von 11 Augen. In den früheren SSW vor der 23. SSW zeigte nur 1 von 28 Augen eine Farbreaktion der Astrozyten auf GFAP.

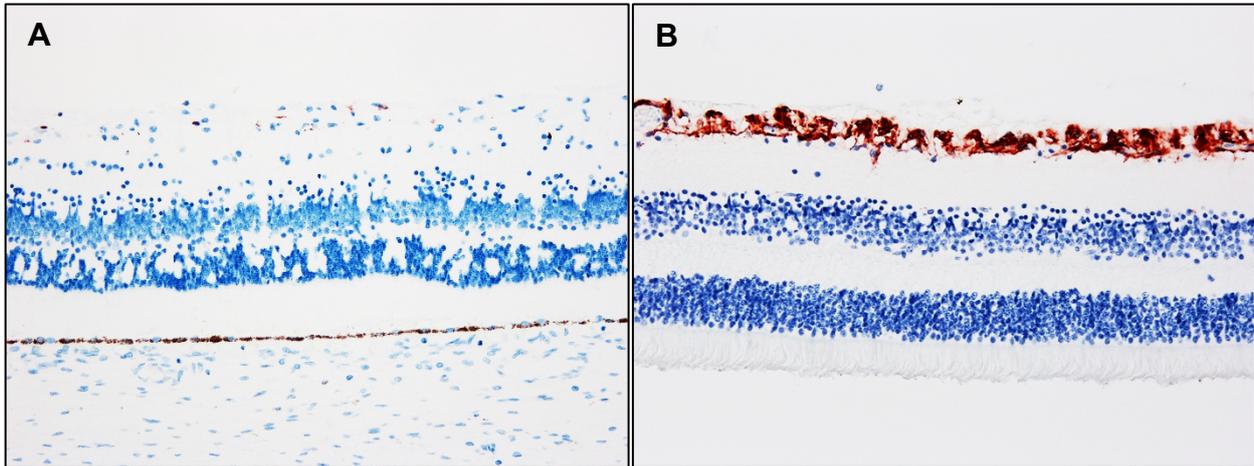


Abb. 24: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP in den Astrozyten in einem fetalen Auge der 24. SSW (A) und einem 3 Monate alten frühkindlichen Auge (B) (200fache Vergrößerung).

3.4.2.2 GFAP-Expression in Astrozyten bezogen auf die Lokalisation

Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Netzhautabschnitte zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der GFAP-Expression in den einzelnen Abschnitten ($p<0,001$). Die Expression von GFAP erfolgte besonders stark am posterioren Pol der Netzhaut (Abb. 25).

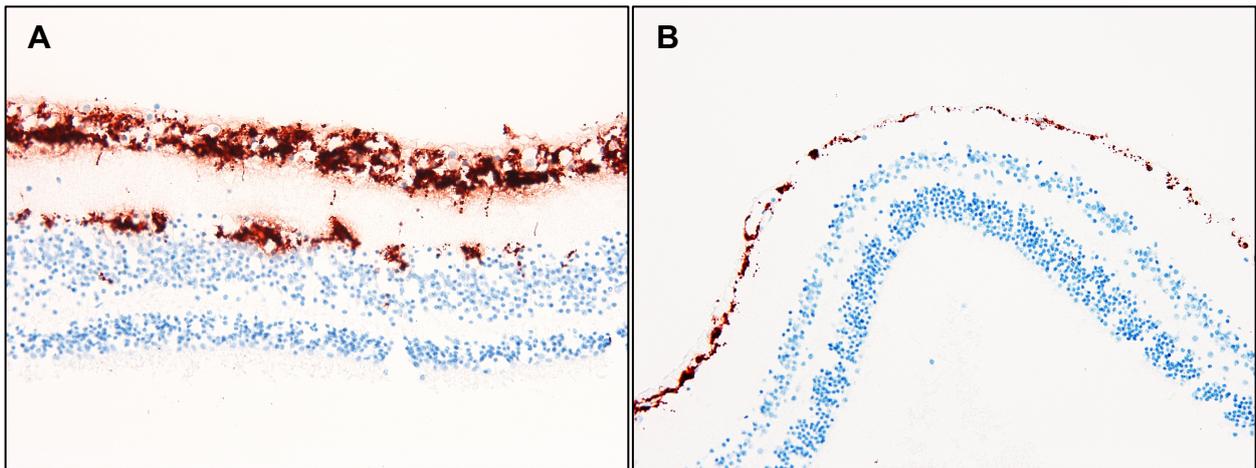


Abb. 25: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten am posterioren Pol (A) und in der Langegefalte (B) in einem fetalen Auge der 38. SSW (200fache Vergrößerung).

Am posterioren Pol waren fetale Augen bis zur 20. SSW nicht angefärbt. Bis zur 27. SSW waren vereinzelte fetale Augen angefärbt (6 von 13 Augen). Ab der 28. Schwangerschaftswoche zeigten alle fetalen Augen eine mittelgradige (Score 2) bis starke (Score 3) Expression von GFAP (Abb. 26 und Abb. 27). Zudem zeigten auch alle kindlichen Augen eine Farbreaktion in diesem Netzhautabschnitt.

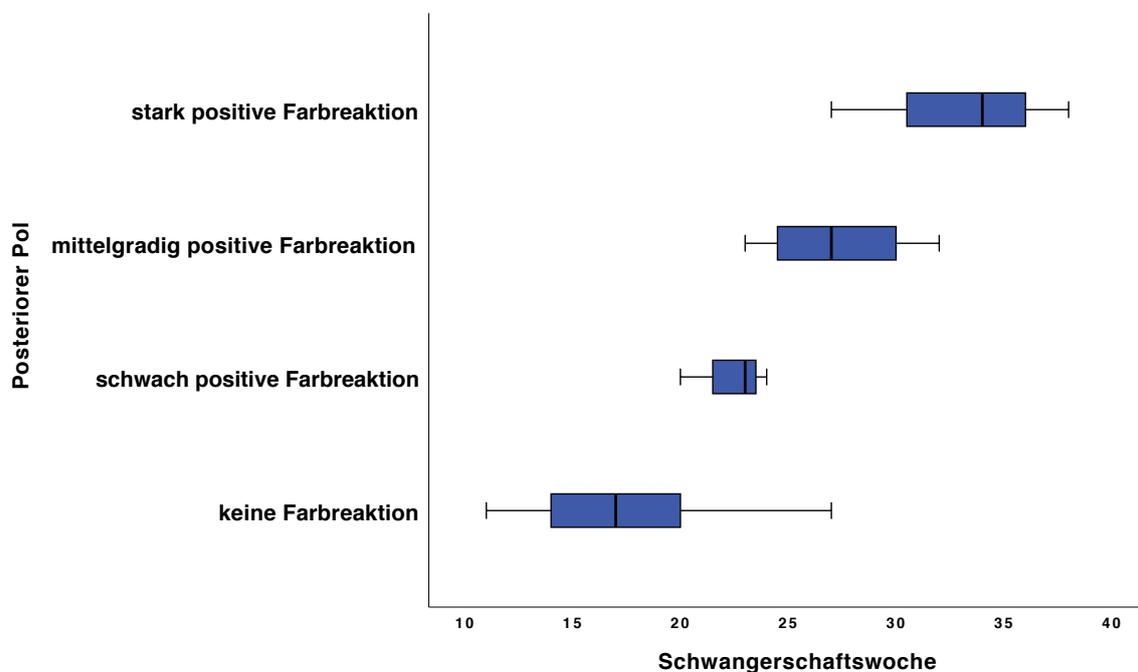


Abb. 26: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten am posterioren Pol bezogen auf das Gestationsalter.

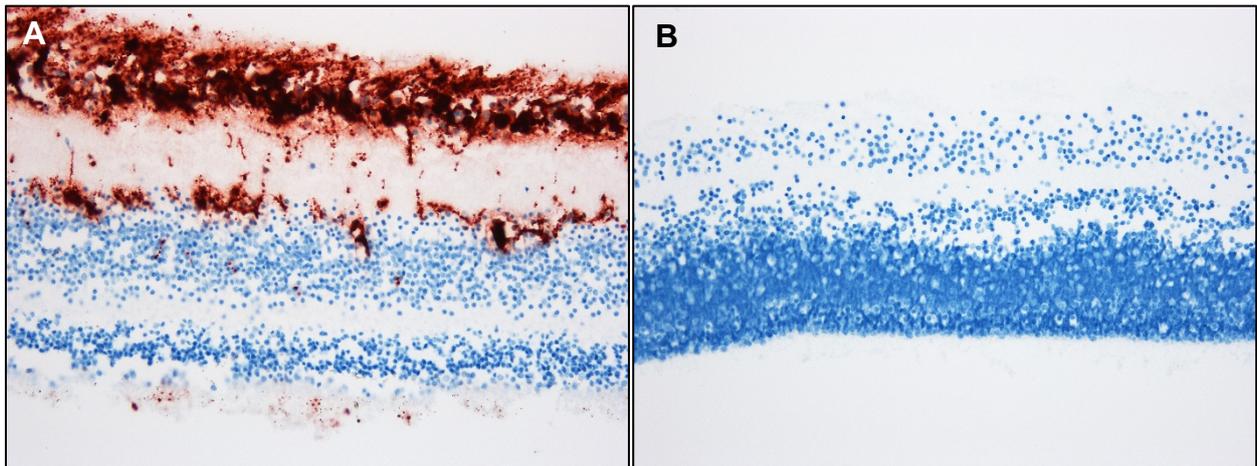


Abb. 27: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten am posterioren Pol eines fetalen Auges der 38. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 17. SSW (B) (200fache Vergrößerung).

Vom posterioren Pol bis zum Äquator waren, sowohl nasal als auch temporal, schwach positive und mittelgradig positiv gefärbte fetale Augen tendenziell älter als fetale Augen, die keine Farbreaktion zeigten (Abb. 28 und Abb. 29). Auch die kindlichen Augen zeigten eine stark positive Farbreaktion (4 von 6 Augen), in den anderen beiden Augen lag eine schwach positive Farbreaktion vor.

Im Netzhautabschnitt zwischen Äquator und Langefalte sahen wir erst ab der 34. SSW sowie bei den frühkindlichen Augen eine Immunreaktion.

In der Langefalte färbten sich die älteren Augen der kindlichen Kohorte stark an. In den fetalen Augen zeigte sich eine Anfärbung ab der 38. SSW in einem fetalen Auge.

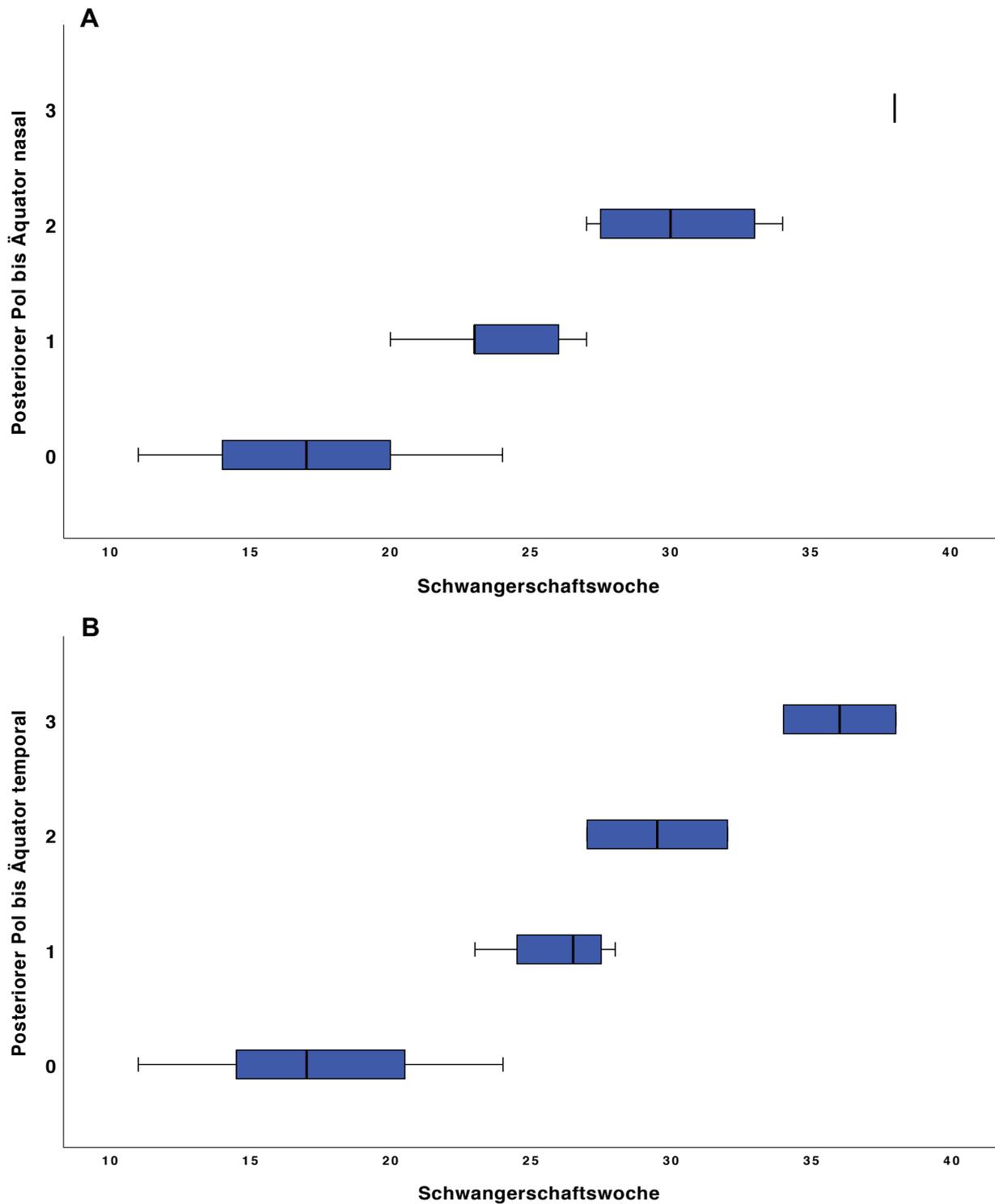


Abb. 28: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, 3: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3) der Astrozyten der Netzhaut vom posterioren Pol und bis zum Äquator nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.

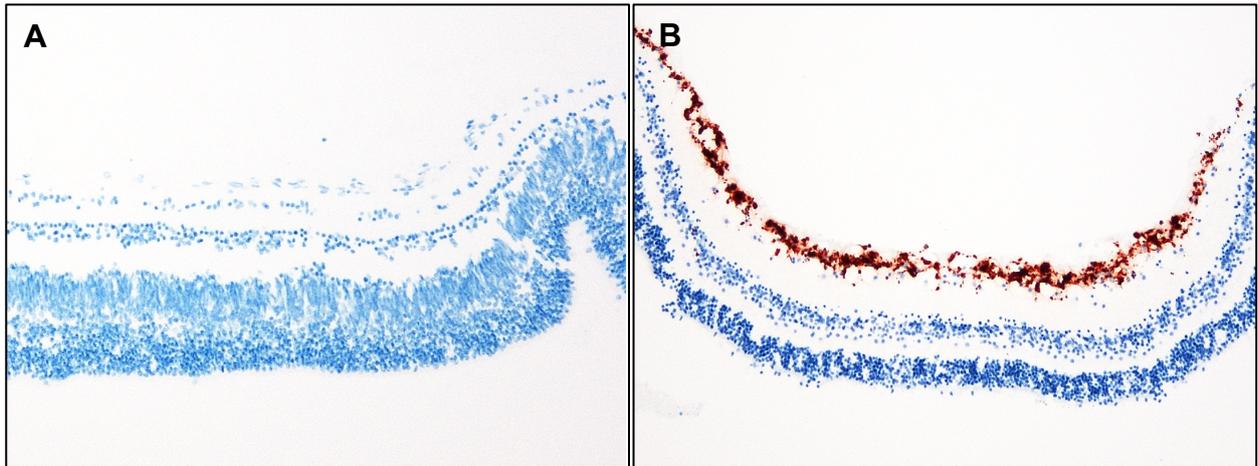


Abb. 29: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator in einem fetalen Auge der 20. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 34. SSW (B) (100fache Vergrößerung).

4. Diskussion

4.1 Nestin-Expression

4.1.1 Nestin-Expression in fetalen und embryonalen Augen

In unserer Untersuchung zeigten 24 der 39 fetalen Augen, verteilt über die gesamte beobachtete Schwangerschaftsdauer (ab der 12. SSW), sowie ein kindliches Auge eine Farbreaktion der Müller-Zellen auf Nestin. Es zeigte sich somit kein signifikanter Unterschied der Farbreaktion zwischen den einzelnen Altersgruppen. Jedoch zeigte sich die Tendenz einer altersabhängigen Anfärbung der Müller-Zellen in Relation zur Lokalisation, entsprechend der zentrifugalen Entwicklung der Netzhaut.

Nach aktueller Literaturrecherche gibt es zu diesem Zeitpunkt (April 2021) keine Untersuchung der Nestin-Expression in fetalen und kindlichen Augen einer ähnlich großen Kohorte. In einer Untersuchung mit vier fetalen Augen zwischen der 15. und 19. Schwangerschaftswoche konnte Nestin in Müller-Zellen in humanen fetalen Augen in differenzierter und undifferenzierter Netzhaut nachgewiesen werden (Walcott und Provis, 2003). Auch in unserer Untersuchung zeigten 6 von 13 Augen in diesem Schwangerschaftsabschnitt eine Immunreaktion in Müller-Zellen in mehreren Netzhautabschnitten. Unsere Ergebnisse bestätigen die Möglichkeit einer Nestin-Expression in diesem Entwicklungsstadium. Jedoch zeigte sich in unserer Untersuchung keine klar definierte Zeitspanne, in der fetale Müller-Zellen Nestin exprimieren. In den 24 fetalen Augen, in denen Nestin exprimiert wurde, war die Nestin-Expression über die gesamte Schwangerschaft verteilt. Tendenziell war die Nestin-Expression ab der 27. Schwangerschaftswoche auf die Müller-Zellen zwischen Äquator bis inklusive Längefalte beschränkt.

Wir untersuchten die Nestin-Expression in der Fetalperiode ab der 11. Schwangerschaftswoche. In Untersuchungen von Matas et al. mit Augen aus früheren Schwangerschaftsabschnitten konnte Nestin in 14 humanen embryonalen und fetalen Augen zwischen der 5. und 12. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden. Von der 5. bis 6. Schwangerschaftswoche konnte Nestin in den externen Augenmuskeln, dem Augenblasenstiel, der Sklera, der Chorioidea, der Linse und in Zellen der inneren Neuroblastenschicht der Netzhaut nachgewiesen werden. In der frühen Fetalperiode beschreiben die Autoren eine Nestin-Expression in länglichen Zellen, welche die Gesamtheit der Netzhaut überspannen

(Matas et al., 2015). Diese Beschreibung deckt sich mit dem histologischen Bild der Müller-Zellen, welche sich über die gesamte Dicke der Netzhaut spannen. Auch in unserer Kohorte konnte eine Farbreaktion in den Müller-Zellen ab der 12. Schwangerschaftswoche beobachtet werden. Eine Expression von Nestin in den anderen in der Untersuchung von Matas et al. genannten Strukturen konnten wir in unserer Kohorte nicht beobachten. Dies könnte auf das fortgeschrittene Alter unserer Augen und die damit einhergehende Reifung dieser Strukturen zurückzuführen sein.

In Untersuchungen zur Nestin-Expression in der Embryonalperiode mit 16 Augen von acht Embryonen der 5. bis 9. Schwangerschaftswoche zeigte sich eine Nestin-Expression in unterschiedlichen Augenabschnitten (Bozanić et al., 2006). In dem fünf Wochen alten Embryo waren Nestin-positive Zellen im gesamten Neuroepithel des Augenblasenstiels und dem Augenbecher zu finden. In der 6. Schwangerschaftswoche zeigte sich eine Nestin-Expression in den inneren Anteilen der neuronalen Retina, dem Linsenepithel und dem Oberflächen-Ektoderm. In den Embryonen der 7. bis 8. Schwangerschaftswoche war Nestin in der inneren Neuroblastenschicht und der Nervenfaserschicht der Netzhaut, im Linsenepithel, kornealen Epithel und Stroma zu beobachten. In den Embryonen der 8. bis 9. Schwangerschaftswoche zeigte sich eine ähnliche Nestin-Expression wie in der vorherigen Altersgruppe (Bozanić et al., 2006). In unserer Kohorte zeigte sich keine Nestin-Expression in der Linse. Dies deckt sich mit der Herunterregulation der Nestin-Expression in den Linsenepithelzellen mit zunehmender Elongation in der 6. Schwangerschaftswoche, die auch von Bozanić et al. in ihrer Studie beschrieben wird. Auch in den anderen Augenabschnitten, zum Beispiel der Kornea, zeigten die Augen unserer Kohorte keine Nestin-Expression. Dies werten wir als Hinweis darauf, dass diese Strukturen in der Fetalperiode schon ausgereifter sind und den Stammzellmarker Nestin daher nicht mehr exprimieren.

4.1.2 Lokalisation der Nestin-Expression in der Netzhaut

Die in unserer Untersuchung erhobenen Ergebnisse zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied der Farbreaktion der Müller-Zellen zwischen den untersuchten Netzhautabschnitten ($p=0,005$). So zeigten vor allem die Müller-Zellen in der peripheren Netzhaut, besonders der Langefalte, eine stärkere Farbreaktion gegen Nestin.

Auch in adulten humanen Müller-Zellen konnte Nestin in der gesunden Netzhaut nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte vor allem in der peripheren Netzhaut nahe der Ora serrata. Die Autoren deuten dies als einen Hinweis auf das Regenerationsvermögen der Netzhaut unter bestimmten Bedingungen (Mayer et al., 2003). Dieser Abschnitt der Netzhaut entspricht in unserer Untersuchung der Netzhaut der Langefalte, da auch diese die peripheren Netzhautabschnitte kurz vor der Ora serrata einschließt. Auch wir sahen in den fetalen Augen vor allem in diesem Abschnitt und in den Müller-Zellen der Netzhaut zwischen Äquator und Langefalte eine Expression von Nestin. In den frühkindlichen Augen konnten wir im Bereich der Langefalte jedoch in nur einem Auge eine Farbreaktion der Müller-Zellen beobachten.

Auch in adulten humanen Augen, die von Bhatia et al. untersucht wurden, exprimierten vor allem die Müller-Zellen der peripheren Netzhaut Nestin (Bhatia et al., 2009). Da jedoch nicht alle Müller-Zellen eine Nestin-Expression zeigten, gehen die Autoren davon aus, dass es im menschlichen Auge Populationen von Müller-Zellen gibt, die Progenitorzeleigenschaften besitzen. Die Eigenschaft der Müller-Zellen in den Zellzyklus einzutreten und somit retinale Vorläuferzellen zu bilden, die sich zu Zapfen und Stäbchen differenzieren können, wurde schon in verschiedenen Tierversuchen bestätigt (Bernardos et al., 2007) sowie (Kubota et al., 2006). Bhatia et al. gehen jedoch davon aus, dass es strenge Kontrollmechanismen gibt, welche die Proliferation der Müller-Zellen einschränken und somit in situ eine Netzhautregeneration verhindern (Bhatia et al., 2009). In vitro scheint es möglich zu sein diese Regulationsmechanismen aufzuheben. So zeigten Müller-Zellen aus peripheren Netzhautabschnitten in Zellkulturstudien eine deutlich stärkere Nestin-Expression als Zellen der zentralen Netzhaut. Jene Zellen waren zudem in der Lage sich zu teilen und zu Zellen zu differenzieren, die Photorezeptor- und Gliazellmarker exprimieren (Mayer et al., 2005).

Insgesamt deutet die Expression von Nestin in Müller-Zellen in gesunder Netzhaut auf eine hohe Plastizität der Zellen und ein mögliches Potenzial dieser Zellen zur Zelldifferenzierung – zumindest in vitro – hin.

4.1.3 Nestin-Expression in anderen Augenstrukturen

Außerhalb der fetalen Müller-Zellen konnte Nestin auch in anderen Strukturen des Auges nachgewiesen werden. In einer Studie mit fetalen Augen aus der 16. und 18. Schwangerschaftswoche, in der die extraokulären Augenmuskeln untersucht wurden, zeigten diese eine Expression von Nestin (Janbaz et al., 2014). In unserer Untersuchung sahen wir in diesem Bereich keine Expression von Nestin, wenngleich die Augenmuskeln nicht in jedem Auge angeschnitten waren. Des Weiteren konnte Nestin in Zellkulturexperimenten in fetalen Kornea-Endothelzellen nachgewiesen werden (Gao et al., 2011). In unserer Untersuchung zeigte sich keine Nestin-Expression in den Endothelzellen der Kornea. Dies kann zum einen an dem fortgeschrittenen Alter der untersuchten Augen und zum anderen an autolytischen Prozessen im Rahmen der Verarbeitung liegen.

Chen et al. konnten nachweisen, dass Nestin während der Entwicklung des Gehirns und der Augen im Zebrafisch eine wichtige Rolle spielt. In der Untersuchung zeigten sich 51 Stunden nach der Fertilisierung in Nestin-Knockout-Fischen nicht nur Defekte in der Gehirnentwicklung, sondern auch eine schlecht entwickelte Netzhaut sowie unterentwickelte Linsen (Chen et al., 2010).

Doch nicht nur im gesunden Auge scheint es zu einer Expression von Nestin zu kommen. Auch bei verschiedenen Erkrankungen des Auges konnte eine Expression von Nestin beobachtet werden. Beispielsweise zeigte sich eine vermehrte Nestin-Expression in Epithel und Stroma aus Pterygium-Proben im Vergleich zum gesunden angrenzenden Bindehautepithel und -stroma (Tonthat und Di Girolamo, 2014). Im Retinoblastom konnte Nestin nicht im Tumorstroma, jedoch in angrenzenden Zellen, die den Müller-Zellen ähnelten, gefunden werden (Sakata und Yanagi, 2008). Das Intermediärfilament Nestin scheint also ähnlich wie GFAP eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Müller-Zellen während verschiedener Erkrankungen einzunehmen.

Auch in Krankheitsmodellen in Tierversuchen konnte Nestin vor allem in den Müller-Zellen nachgewiesen werden. In Rattenaugen zeigte sich eine Hochregulation der Nestin-Expression in Müller-Zellen nach Durchtrennung des Nervus opticus (Xue et al., 2006b). Im durch Verschluss der den Limbus drainierenden Venen erzeugten Glaukom in Rattenaugen zeigte sich vor allem in der Ganglienzellschicht eine Nestin-Expression in den Müller-Zellausläufern und Endfüßen. Die Expression im Soma der Müller-Zellen war schwächer

ausgeprägt. Die Autoren nehmen an, dass dies auf eine wichtige Rolle der Müller-Zellen bei der Frühreaktion auf pathologische Veränderungen der Netzhaut hinweist (Xue et al., 2006a). Auch nach Laserverletzung der Netzhaut von Ratten kam es zu einer vermehrten Nestin-Expression in den Müller-Zellen drei Tage nach Laser-Photokoagulation. Die Expression verringerte sich langsam nach 7 bis 14 Tagen (Kohno et al., 2006). In einer weiteren Studie von Xue et al. kam es nach Hypoxie-Behandlung im Tierversuch zu einer Nestin-Expression in den Endfüßen der Müller-Zellen. Nach Hyperoxie-Behandlung wurde die Nestin-Expression jedoch wieder herunterreguliert. Dies werten die Autoren als einen Hinweis auf die Plastizität der Müller-Zellen (Xue et al., 2011). Auch wir schließen aus der unterschiedlichen Expression der von uns untersuchten Marker auf eine hohe Plastizität der Müller-Zellen.

Auch in Strukturen außerhalb des Auges scheint Nestin eine wichtige Rolle während der Entwicklung zu spielen. In sich entwickelndem Muskelgewebe aus einer fetalen Zelllinie außerhalb des Auges konnte Nestin vor allem in den frühen Entwicklungswochen nachgewiesen werden (Sejersen und Lendahl, 1993). Des Weiteren wurde Nestin in sich entwickelnden Meningen ab der 9. SSW (Yay et al., 2014) sowie in Mesenchymzellen des Ohres von Feten der 14. bis 16. SSW (Kim et al., 2016) nachgewiesen. Dies deckt sich auch mit dem Zeitraum, in dem in unserer Untersuchung Nestin in fetalen Augen nachgewiesen werden konnte.

4.1.4 Zur Rolle von Nestin in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen

Nestin wurde bereits in vielen embryonalen und fetalen Strukturen während der menschlichen Entwicklung nachgewiesen. Auch während der Entwicklung des Auges scheint Nestin eine wichtige Rolle einzunehmen. Dies wird zum Beispiel in Versuchen mit Nestin-Knockout-Tieren deutlich, in denen das Fehlen von Nestin zu ausgeprägten Fehlentwicklungen von Gehirn und Augen führt. Hier scheint Nestin einen protektiven Effekt auf sowohl neuronale als auch retinale Vorläuferzellen zu haben und diese somit vor Apoptose zu schützen (Chen et al., 2010). Auch in Müller-Zellen könnte Nestin eine ähnliche Rolle einnehmen und so die Müller-Zellen in ihrer Ausreifung unterstützen. Zu dieser Annahme

passt auch, dass Nestin vorwiegend in der Frühschwangerschaft in mehreren Augenstrukturen, wie zum Beispiel der Linse oder Kornea, exprimiert wird und später zunehmend in den Müller-Zellen.

Die Expression des Stammzellmarkers Nestin in den fetalen Müller-Zellen unterstreicht zudem die Plastizität dieser Zellen und gibt Hinweise auf das Potential dieser Zellen zur Zelldifferenzierung (Mayer et al., 2005).

Als Intermediärfilament kann Nestin außerdem, ähnlich wie im zentralen Nervensystem, auch in den Müller-Zellen eine wichtige Rolle beim Stabilitätserhalt spielen. Die Ausdehnung der Müller-Zellen über die gesamte Netzhaut ist für die Erfüllung ihrer Aufgaben sehr wichtig. Ein ausreichend stützendes Zytoskelett ist also während der Entwicklung der Müller-Zellen von hoher Relevanz (Lendahl et al., 1990).

4.2 CD44-Expression

4.2.1 CD44-Expression in fetalen und embryonalen Augen

CD44 wurde in unserer Untersuchung vor allem in fetalen Müller-Zellen der zentralen Netzhaut exprimiert. In den kindlichen Augen zeigte sich auch eine Farbreaktion der Müller-Zellen in peripheren Netzhautabschnitten. Der Unterschied der Farbreaktion zwischen den einzelnen Netzhautabschnitten war jedoch nicht signifikant. In frühen Schwangerschaftswochen (11. bis 22. Schwangerschaftswoche) zeigten nur vereinzelte Augen eine Immunreaktion auf CD44 (5 von 28 Augen). Im Zeitraum zwischen der 23. und 27. Schwangerschaftswoche sahen wir jedoch eine CD44-Expression in 5 von 7 Augen. Ältere fetale Augen zeigten keine CD44-Expression. In den frühkindlichen Augen kam es ab einem Alter von 4 Monaten zu einer starken Farbreaktion von CD44. Die Unterschiede der CD44-Expression waren zwischen den Trimestern nicht statistisch signifikant. Kindliche Augen waren jedoch stärker gefärbt als fetale Augen.

In der größten Kohorte von fetalen Müller-Zellen, die bei der Literaturrecherche zur CD44-Expression gefunden wurde, wurden von Nishina et al. vier Augen der 6., 10., 16. und 21. Schwangerschaftswoche untersucht. CD44 wurde hier ab der 21. Schwangerschaftswoche in den Fortsätzen von Müller-Zellen beschrieben (Nishina et al., 1997). Auch in unse-

rer Kohorte zeigte sich vor allem eine Anfärbung der Müller-Zellen ab der 23. Schwangerschaftswoche. Da in unserer Kohorte etwa ein Viertel aller fetalen Augen eine Immunreaktion gegen die Müller-Zellen zeigten, ist gerade bei einer kleineren Kohorte unterschiedlichen Alters ein verlässlicher Nachweis schwierig. In früheren Schwangerschaftsabschnitten kam es nur in vereinzelt fetalen Augen zu einer CD44-Expression in den Müller-Zellen. Nishina et al. untersuchten zudem ein kindliches Auge. Hier beschrieben sie eine CD44-Expression in den Astrozyten um die Blutgefäße. In unserer Kohorte zeigten 3 der 6 frühkindlichen Augen eine starke CD44-Expression der Müller-Zellen in allen Netzhautabschnitten sowie vereinzelt auch in den Astrozyten. Da in der Studie von Nishina et al. nicht die Todesursache des Kindes angegeben ist, ist es schwierig einen Vergleich zwischen dem unterschiedlichen Färbungsverhalten ziehen (Nishina et al., 1997).

In einer weiteren Untersuchung wurde in Zellkulturen von drei verschiedenen Feten der 24. Schwangerschaftswoche CD44 in Zellen des fetalen Trabekelmaschenwerks nachgewiesen (Lin et al., 2007); dies konnten wir in unserer Kohorte nicht beobachten. Außerhalb der Müller-Zellen zeigte in unserer Kohorte der Limbus (Übergang zwischen Kornea und Konjunktiva, der korneale Stammzellen enthält) eine Immunreaktion auf CD44. Diese war zwischen der 12. und 18. Schwangerschaftswoche sowie zwischen der 21. und 27. Schwangerschaftswoche zu beobachten. Es färbte sich hier das Zytoplasma von Zellen im Bindegewebe des Limbus, das Epithel zeigte keine Farbreaktion.

4.2.2 CD44-Expression in adulten Augen

Auch in adulten Augen konnte eine Expression von CD44 in den Müller-Zellen der peripheren Netzhaut nachgewiesen werden (Too et al., 2017). Hier wurde CD44 nur in den Fortsätzen der Müller-Zellen nachgewiesen. In unserer Kohorte färbte CD44 teilweise nur die Fortsätze, in vielen Augen jedoch auch die gesamte Müller-Zelle, an. Bezüglich dieses Anfärbemusters zeigte sich keine Abhängigkeit von Alter oder Lokalisation. Too et al. gehen von einer Wechselwirkung von CD44 mit dem im Glaskörper enthaltenem Hyaluron als Ursache für die Anfärbung der Ausläufer der Müller-Zellen aus (Too et al., 2017).

Zu den weiteren Strukturen des adulten Auges, in denen CD44 nachgewiesen werden konnte, zählt zum Beispiel die Konjunktiva, die Kornea oder unter pathologischen Bedingungen auch das Kammerwasser. Im Bindehautepithel von gesunden Probanden zeigte sich eine verstärkte CD44-Färbung im Vergleich zu Patienten mit Atopie (auch außerhalb der Allergie-Zeit). Die Autoren schließen hieraus auf eine wichtige Rolle von CD44 für das Instandhalten des Zellverbandes und der damit verbundenen Abwehr von Allergenen (Hughes et al., 2006). In der gesunden adulten Kornea konnte CD44s in der Membran der basalen Epithelzellen und Keratozyten nachgewiesen werden. Zudem waren die vaskulären Endothelzellen des Kornealimbus angefärbt (Zhu et al., 1997). Zhu et al. fanden heraus, dass die CD44s-Expression im Falle einer Entzündung der Kornea verstärkt war. Auch hier schließen die Autoren aus ihren Ergebnissen, dass CD44s eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion spielt (Zhu et al., 1997). In weiteren Untersuchungen wurde CD44 im Hornhautepithel und -endothel in gesunden adulten menschlichen Augen nachgewiesen. In der Descemet-Membran zeigte sich jedoch keine Anfärbung durch CD44 (Lerner et al., 1998). Welche genaue Rolle CD44 hier einnimmt, bleibt zu klären.

Des Weiteren wurde bei verschiedenen Krankheitsbildern des Auges eine Erhöhung der CD44-Expression in unterschiedlichen Strukturen beschrieben. Beim primären Offenwinkelglaukom zeigte sich eine Erhöhung des Kammerwinkelabflusswiderstandes durch Überexpression von CD44 (Giovingo et al., 2013). Von einer Erhöhung der Konzentration des gelösten CD44 im Kammerwasser von Patienten mit erhöhtem Augeninnendruck durch ein akutes primäres Winkelblockglaukom konnten auch Chen et al. berichten. Im Kammerwasser von bereits abgelaufenen, akuten primären Winkelblockglaukomen und im Kammerwasser aus Augen mit Katarakt war die Konzentration von gelöstem CD44 deutlich niedriger (Chen et al., 2015).

4.2.3 CD44-Expression im Mausmodell

Auch im Mausmodell konnte CD44 in Müller-Zellen nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Müller-Zellen während der murinen Entwicklung zeigte sich in den Augen von Mausembryonen und postnatal in den Müller-Zellen eine Expression von CD44 (Shinoe et al., 2010). Chaitin et al. konnten CD44 in den apikalen Mikrovilli der Müller-

Zellen von Mäusen nachweisen. Die Autoren gehen von einer möglichen Rolle von CD44 bei der Verankerung der neuronalen Netzhaut an den Photorezeptoren aus (Chaitin et al., 1994). In einer weiterführenden Studie wurde in der sich normal entwickelnden Netzhaut von Mäusen ab dem 10. Tag postnatal eine vermehrte Expression von CD44 in den apikalen Mikrovilli der Müller-Zellen festgestellt. In diesem Zeitraum kommt es in der Maus-Netzhaut zu Zelldifferenzierung und programmierten Zelltod einiger Zellen. Im Verlauf der Entwicklung kam es zu einer vermehrten CD44-Expression und einer Anfärbung der gesamten Länge der Müller-Zellen. Mit Ausreifung der Netzhaut war eine Anfärbung der Müller-Zellen nicht mehr nachzuweisen (Chaitin et al., 1996). Auch in unserer Untersuchung war vor allem in den frühkindlichen Augen eine vermehrte CD44-Expression in den Müller-Zellen zu beobachten. Weiterführend könnte eine Untersuchung der Müller-Zellen in adulten humanen Augen angebracht sein, um zu sehen, ob es auch hier zu einer Herunterregulation von CD44 mit Ausreifung der Netzhaut kommt.

4.2.4 Zur Rolle von CD44 in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen

Da es sich auch bei CD44 um einen Stammzellmarker handelt, welcher jedoch im Gegensatz zu Nestin überwiegend erst in späteren Schwangerschaftsstadien von Müller-Zellen exprimiert wird, scheint die hohe Plastizität der Müller-Zellen auch noch in weiterführenden Schwangerschaftswochen und in der frühen Kindheit zu bestehen.

In fetalen Augen konnte sowohl in unserer als auch in einer Untersuchung von Nishina et al. CD44 über die gesamte Länge der Müller-Zellen nachgewiesen werden (Nishina et al., 1997). In adulten Müller-Zellen beschränkte sich die CD44-Expression auf die Fortsätze der Müller-Zellen in der peripheren Netzhaut (Too et al., 2017). Dies kann auf eine mögliche Rolle von CD44 als Hyaluronrezeptor bei der Kommunikation zwischen Glaskörper, der größtenteils aus Hyaluronsäure besteht, und der Netzhaut hindeuten (Too et al., 2017). Bach und Berman konnten Hyaluron in der Matrix zwischen den Photorezeptoren von Rindern nachweisen (Bach und Berman, 1971). Es ist also auch möglich, dass CD44 die Müller-Zellen in ihrer Verankerung in der Netzhaut unterstützt.

4.3 Kollagen IX-Expression

4.3.1 Kollagen IX-Expression im Auge

In unserer Untersuchung konnten wir Kollagen IX in Müller-Zellen, retinalen und chorioi-dalen Blutgefäßen, der Hornhaut, dem Glaskörper und der Linse der fetalen Augen nachweisen. Fetale Augen im dritten Trimester waren signifikant stärker gefärbt als jüngere fetale Augen ($p < 0,001$). Die frühkindlichen Augen zeigten bis auf ein Auge keine Immunreaktion auf Kollagen IX. Bei diesem Auge handelte es sich um das mit einem Monat jüngste Auge der Altersgruppe. Bezüglich der Farbreaktion von Kollagen IX in den verschiedenen Netzhautabschnitten sahen wir einen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression zwischen den einzelnen Abschnitten ($p = 0,015$).

In einer Untersuchung mit Müller-Zellen der Zelllinie MIO-M1 konnten die Autoren nachweisen, dass verschiedene Kollagene von diesen Zellen exprimiert werden können. In der PCR konnten die Autoren Kollagen IX-mRNA nachweisen. Auch in der immunhistochemischen Untersuchung färbten sich die Müller-Zellen mit Kollagen IX an. Im Western Blot konnte zudem gezeigt werden, dass die Zellen Kollagen IX auch in ihr Medium sezernieren (Ponsioen et al., 2008a). Da es sich bei diesem Nachweis um das Verhalten von Müller-Zellen einer Zellkultur handelt, bleibt zu klären, ob Müller-Zellen auch in vivo ähnliche Fähigkeiten besitzen. Die Autoren vermuten, dass die Fähigkeit zur Kollagen-IX-Synthese zur Aufrechterhaltung der Glaskörperkonsistenz beiträgt (Ponsioen et al., 2008a).

Aus dem primären und sekundären Glaskörper geht während der fetalen Entwicklung im 4. Monat schließlich der tertiäre Glaskörper hervor. Im weiteren Verlauf der Glaskörperentwicklung kommt es zu einer Erhöhung der Hyaluronsäure-Konzentration im Vergleich zur Kollagen-Konzentration, die zu einem Auseinanderdriften der einzelnen Kollagenfibrillen und folglich zu einer vermehrten Transparenz des Glaskörpers führt (Sebag, 1989). Es wird geschätzt, dass bis zu 25% des adulten Glaskörpers aus Kollagen IX besteht (Bos et al., 2001). Den größten Anteil am Kollagen des Glaskörpers bildet mit circa 75% Kollagen II (Bishop et al., 1994). Mit zunehmendem Alter verringert sich jedoch der Anteil von Kollagen IX im Glaskörper. Die Halbwertszeit von Kollagen IX wird auf 11 Jahre geschätzt. Kollagen IX dient der Ummantelung von Kollagen II, wodurch eine Auflagerung und Verklebung der Kollagen II-Fibrillen verhindert wird. Bishop et al. zeigten in einer Untersuchung von 21 Glaskörperproben von Patienten zwischen 3 und 89 Jahren, dass die

Ummantelung mit Kollagen IX mit zunehmendem Alter verschwindet und die Kollagen II-Oberfläche der Fibrillen frei liegt. In jüngeren Augen konnte auf der Oberfläche der Kollagenfibrillen nur sehr wenig Kollagen II nachgewiesen werden. Im Alter nahm der Anteil an nachweisbarem Kollagen II an der Oberfläche zu. Der Verlust des Kollagen IX an der Fibrilloberfläche korrelierte mit der Kollagen II-Exposition (Bishop et al., 2004).

An anderer Stelle in fetalen humanen Augen konnte Kollagen IX bisher im Konjunktiva- und Korneaepithel nachgewiesen werden. Im Stroma zeigte sich keine Immunreaktion auf Kollagen IX. Ältere Augen waren weniger stark gefärbt als jüngere Augen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Herwig et al., 2013).

In Retinektomie-Proben aus vier adulten humanen Augen (zwischen 70 und 87 Jahren) konnte Kollagen IX immunhistochemisch an der Kontaktstelle zwischen Netzhaut und Glaskörper nachgewiesen werden. In den Blutgefäßen konnte Kollagen IX nur sehr variabel in zwei Augen um den Äquator nachgewiesen werden. In einem Auge konnte Kollagen IX auch in der Ganglienzellschicht nachgewiesen werden (Ponsioen et al., 2008b). Die unterschiedliche Ausprägung der Expression von Kollagen IX in den Blutgefäßen deckt sich mit unserer Untersuchung, in welcher die Blutgefäße der Netzhaut und Chorioidea zwar häufig, jedoch ohne eine deutlich erkennbare Tendenz bezüglich Alter oder Lokalisation angefärbt waren.

Auch im Mausmodell konnte Kollagen IX in verschiedenen Strukturen der Augen nachgewiesen werden. In den Mausembryonen wurde Kollagen IX in der Membrana limitans interna und der Ganglienzellschicht der Netzhaut, im Glaskörper und im Pigmentepithel exprimiert. In schwächerer Intensität fand sich auch ein Kollagen IX Hybridisationssignal nahe der hinteren Linsenkapsel (Savontaus et al., 1998). In einer anderen Untersuchung wurden die Augen von neugeborenen Mäusen untersucht. Von Tag 5 bis 20 zeigten sich jedoch nur sehr geringe Mengen an Kollagen IX-mRNA, sodass diese nicht quantifiziert werden konnten. In Augen im Alter von 15 Tagen und 15 Monaten wurde Kollagen IX und Kollagen II im Glaskörper, der Membrana limitans interna und nahe des Linsenäquators exprimiert. Zum Zeitpunkt der Geburt fand sich Kollagen IX zudem nahe des sich entwickelnden Ziliarkörpers. Auch hier trat Kollagen IX nur in Verbindung mit Kollagen II auf (Ihanamäki et al., 2001).

4.3.2 Zur Rolle von Kollagen IX in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen

Kollagen IX kann in den Müller-Zellen dem Stabilitätserhalt des Zytoskeletts dienen. Eine andere mögliche Funktion kann in der Interaktion mit bzw. dem Aufbau des Glaskörpers liegen (Ponsioen et al., 2008a). Es bleibt zu klären, welche endgültige Rolle Kollagen IX in den fetalen Müller-Zellen einnimmt und aus welchen Gründen eine Kollagen IX Expression in den fetalen sowie adulten, nicht aber in den frühkindlichen Müller-Zellen vorzufinden ist.

4.4 GFAP-Expression

4.4.1 GFAP-Expression in fetalen und embryonalen Augen

In unserer Untersuchung wurde GFAP vor allem am posterioren Pol der Netzhaut in den Astrozyten der fetalen Augen exprimiert – nur ein Auge von einem postnatal verstorbenen Fet der 38. SSW besaß positiv gefärbte Müller-Zellen im Bereich der Längsfalte. Zudem sahen wir eine GFAP-Expression im Nervus opticus. GFAP zeigte sich in den Astrozyten unserer Kohorte ab der 20. Schwangerschaftswoche besonders in den zentralen Netzhautabschnitten. Die Intensität der GFAP-Farbreaktion nahm mit zunehmendem Alter der Feten zu. Insgesamt waren ältere fetale Augen signifikant stärker gefärbt als jüngere fetale Augen. Die frühkindlichen Augen waren signifikant stärker gefärbt als die fetalen Augen.

In einer Studie mit 16 Augen von 8 Embryonen sahen die Untersucher ein Expressionsmuster für GFAP (Bozanić et al., 2006), das stark dem Expressionsmuster in Astrozyten von älteren fetalen Augen ähnelt. In Embryonen der 7. bis 8. Schwangerschaftswoche kam GFAP in den radialen Nervenfasern der neuronalen Netzhaut, die sich durch die Nervenfaserschicht zur inneren Neuroblastenschicht ziehen, vor. Zudem war GFAP im Linsenepithel und Zytoplasma der Linsenfasern sowie im Stroma und Endothel der Kornea und in der Vorderkammer zu finden. Des Weiteren zeigte das Mesenchym der Augenlider, die Chorioidea und Sklera und der Glaskörper eine GFAP-Expression. Die GFAP-Expression in der Linse nahm mit zunehmendem Alter und damit zunehmender Elongation der Fasern ab. Dies deckt sich mit unserer Untersuchung, in der wir keine Expression von GFAP in diesen Strukturen fanden (Bozanić et al., 2006). Auch in den

anderen beschriebenen Strukturen konnten wir keine Expression von GFAP beobachten. Dies kann an der zunehmenden Reife unserer mit einem Alter von 11 Wochen älteren fetalen Augen liegen. Interessant wäre an dieser Stelle eine Untersuchung der GFAP-Expression in fetalen Augen der 9. bis 11. Schwangerschaftswoche. In anderen Strukturen des Auges wird von einem Einfluss von GFAP auf die Differenzierung der fetalen und embryonalen Strukturen ausgegangen (Bozanić et al., 2006).

Während der Entwicklung des Mauseuges kommt es unter physiologischen Bedingungen nicht zu einer GFAP-Expression in Müller-Zellen (Verderber et al., 1995). Eine GFAP-Expression in retinalen Astrozyten konnte jedoch nachgewiesen werden. In den Augen von Mausembryonen zeigte sich eine GFAP-Expression im Nervus opticus sowie in Zellen in der Ganglienzellschicht, ansonsten aber in keiner anderen Netzhautschicht. Die Farbreaktion der angefärbten Strukturen war am posterioren Pol stärker als in peripheren Netzhautstrukturen. Auch die Ausdehnung in die Peripherie nahm erst mit zunehmendem Alter zu. Aufgrund der Lokalisation und der GFAP-Expression gehen die Autoren davon aus, dass es sich bei den angefärbten Zellen um Astrozyten handelt (Sarthy et al., 1991). Die Lokalisation am posterioren Pol, welche die Autoren beobachten konnten, deckt sich mit dem Expressionsmuster von GFAP in den Astrozyten in unserer Untersuchung.

Außerhalb des Auges konnte GFAP in Feten der 10. bis 16. Schwangerschaftswoche im Nervengewebe sowie im Knorpel nachgewiesen werden (Kim et al., 2013). Im ZNS kommt es mit zunehmender Ausreifung zum Austausch von Nestin zu GFAP (Dahlstrand et al., 1992).

4.4.2 GFAP-Expression in Astrozyten der Netzhaut

Im Gegensatz zu Müller-Zellen sind Astrozyten in Säugetieraugen nur in den vaskularisierten Netzhautabschnitten zu finden (Triviño et al., 1997). Bei Tieren mit avaskulärer Netzhaut lassen sich Astrozyten nicht nachweisen (Lin et al., 2007; Stone und Dreher, 1987). Astrozyten kommen vor allem in der Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht vor. Einige Zellausläufer können jedoch bis in die innere Körnerschicht ziehen (Triviño et al., 1997). Morphologisch kann man drei unterschiedliche Arten von Astrozyten unterscheiden: Bipolare Astrozyten, deren Ausläufer parallel zur Nervenfaserschicht verlaufen und

perivaskuläre und sternförmige Astrozyten, die zwischen Gefäßen und Nervenfasern lokalisiert sind (Reichenbach und Bringmann, 2020).

Die Aufgaben der Astrozyten in der Netzhaut ähneln teils denen der Müller-Zellen. So beteiligen sich Astrozyten im Auge der Ratte an der Aufrechterhaltung des pH-Werts und des Elektrolythaushaltes (Newman, 1999). Zudem sind Astrozyten auch an der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke beteiligt (Reichenbach und Bringmann, 2020).

Da GFAP einer der Hauptbestandteile des Astrozyten-Zytoskeletts ist, eignet sich dieser Marker zur immunhistochemischen Untersuchung von Astrozyten (Bignami et al., 1972). In Mausaugen wurde GFAP-mRNA in stark vaskularisierten Netzhautarealen stärker exprimiert als in weniger stark vaskularisierten Netzhautabschnitten. Die sich bildenden Gefäße initiierten einen Feedback-Zyklus, der zur Astrozyten-Differenzierung und der damit verbundenen GFAP-Hochregulierung führte (West et al., 2005). Zudem wird die GFAP-Expression nach Verletzung der Netzhaut im Rahmen der reaktiven Gliose mit Aktivierung, Reaktivierung und Migration von Astrozyten hochreguliert (Luna et al., 2010).

Es wird vermutet, dass Astrozyten vom Sehnerv aus in die Netzhaut einwandern. Watanabe und Raff zeigten durch immunhistochemische Färbung mit GFAP bei Rattenaugen, dass Astrozyten mit zunehmendem Entwicklungsalter nicht nur in zentralen Netzhautbereichen, sondern zunehmend auch peripher exprimiert werden (Watanabe und Raff, 1988). Dies deckt sich mit dem Expressionsmuster der Astrozyten in unserer Kohorte. Auch wir sahen mit zunehmendem Alter der Augen eine zentrifugale Ausbreitung der Astrozyten. Ein weiterer Grund für die vor allem zentral lokalisierten Astrozyten kann zudem die zur Ora serrata hin abnehmende Dicke der Nervenfaserschicht sein, in der folglich nur eine geringere Dichte an Astrozyten zu finden ist (Vecino et al., 2016).

4.4.3 GFAP-Expression in Krankheitsbefunden

Während adulte Müller-Zellen unter physiologischen Umständen kein GFAP exprimieren, kommt es in pathologischen Zuständen, wie zum Beispiel bei Erkrankungen des Auges, zu einer vermehrten GFAP-Expression der Müller-Zellen der Netzhaut. In unserer Unter-

suchung muss daher besonders die GFAP-Expression in den Müller-Zellen der frühkindlichen Augen kritisch betrachtet werden, da es beim AHT in den meisten Fällen zur Netzhautschädigung kommt.

Als reaktive Müller-Zellen bezeichnet man Müller-Zellen, die bei Schädigung der Netzhaut zum Teil mit protektivem, teilweise aber auch schädlichem Verhalten reagieren (Seitz et al., 2013). Es kommt zu einer vermehrten Expression von Intermediärfilamenten wie GFAP, Nestin und Vimentin (Luna et al., 2010). Zudem schütten reaktive Müller-Zellen vermehrt VEGF aus, welches zwar zum einen die Netzhautneuronen vor Apoptose schützen kann (Kilic et al., 2006), bei zu lang andauernder Ausschüttung jedoch zur vorzeitigen Netzhautdegeneration durch starke Gefäßproliferation führt (Tolentino et al., 2002).

Außerhalb von pathologischen in vivo-Situationen wird GFAP auch in primären Müller-Zellkulturen exprimiert. Die Zellen stammten aus Augen von Patienten zwischen 5 und 35 Jahren. Das Vorhandensein von GFAP-mRNA wurde in der RT-PCR bestätigt. Die Autoren schließen daraus, dass Zellkulturen von Müller-Zellen für die Zellen einen ähnlichen Stresszustand wie Netzhauterkrankungen darstellen. Ebenso scheinen Müller-Zellen in Zellkulturen in ihren Eigenschaften eher reaktiven Müller-Zellen zu ähneln (Lupien et al., 2004).

Die Erkrankungen, bei denen es zu einer Hochregulierung von GFAP in den Müller-Zellen kommt, sind vielfältig. In einer Untersuchung von drei Patienten mit Netzhautablösung konnte GFAP in den Intermediärfilamenten der Müller-Zellen nachgewiesen werden (Okada et al., 1990). Auch bei an altersabhängiger Makuladegeneration erkrankten Augen konnte in einigen reaktiven Müller-Zellen GFAP nachgewiesen werden (Edwards et al., 2016). Augen mit ausgeprägteren Drusenbefunden und geographischer Atrophie zeigten zudem eine stärkere GFAP-Expression in den äußeren Müller-Zellfortsätzen als gesunde Kontrollaugen. Ältere gesunde Augen zeigten eine leichte GFAP-Expression in einzelnen Müller-Zellen (Wu et al., 2003).

Auch im Glaskörper konnte eine Erhöhung der GFAP-Konzentration bei Netzhauterkrankungen beobachtet werden, zum Beispiel bei Netzhautablösung oder epiretinaler Gliose (Jünemann et al., 2015) oder bei Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt waren (Vujosevic et al., 2015).

Aus welchen Gründen GFAP in reaktiven Müller-Zellen vermehrt exprimiert wird, ist noch nicht geklärt. Einen Hinweis auf die mögliche Rolle von GFAP lieferte eine Untersuchung mit GFAP-/- Vimentin-/- Mäusen. Hier zeigte sich, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, eine geringere Toleranz der Müller-Zellen gegenüber mechanischem Stress, welche sich in einer Ablösung der Membrana limitans interna vom Rest der Netzhaut äußerte. Dies lag an einer Instabilität der Fortsätze der Müller-Zellen, die sich jedoch nicht unter physiologischen Bedingungen bemerkbar machte. Die Expression von GFAP in reaktiven Müller-Zellen scheint also eine wichtige Rolle beim Stabilitätserhalt der Müller-Zellen zu spielen (Lundkvist et al., 2004).

4.4.4 Zur Rolle von GFAP in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen

Die Expression von GFAP in einem fetalen Auge der 38. Schwangerschaftswoche, einem einen Monat alten Auge sowie den vom AHT betroffenen frühkindlichen Augen unserer Kohorte ist vorsichtig zu betrachten, da es sich bei GFAP in adulten Augen um einen bekannten Marker für reaktive Müller-Zellen bei Erkrankungen der Netzhaut handelt. So ist besonders bei Augen von Kindern mit AHT bekannt, dass diese Netzhautschäden aufweisen (Betz et al., 1996). Auch in älteren fetalen oder frühkindlichen Augen können während des Schwangerschaftsabbruchs und der Geburt oder aufgrund von Vorerkrankungen Netzhautschäden auftreten. All dies kann zu einer Reaktivierung der Müller-Zellen geführt haben. GFAP wird zudem als immunhistochemischer Marker für den Nachweis einer Netzhautschädigung bei Verdacht auf AHT benutzt (Verdijk und Herwig-Carl, 2020).

Da GFAP aber auch bei einem Auge eines Fet der 38. SSW und eines Säuglings, der einen Monat postnatal an einem unklaren Syndrom mit konnataler Kardiomegalie bei Kardiomyopathie verstarb, exprimiert wurde und wir bei unserer Untersuchung darauf geachtet haben Augen mit einer möglichst unbeschädigten Netzhaut auszuwählen, ist es durchaus möglich, dass es sich bei der GFAP-Expression in diesen Augen um eine physiologische oder erkrankungsbedingte Expression von GFAP oder aber um eine Expression nach Geburt (bei der auch Netzhautblutungen, jedoch meistens in geringerem Ausmaß, beobachtet werden können (Kim et al., 2018)) handelt.

Die GFAP-Expression in Müller-Zellen sollte daher nicht als alleiniger Anhalt für ein AHT, sondern nur in Ergänzung zu anderen okulären Befunden angesehen werden, da sich auch in zwei nicht vom AHT betroffenen Augen eine Anfärbung der Müller-Zellen für GFAP zeigte. Auch muss eine Anfärbung der retinalen Astrozyten sorgfältig von einer Anfärbung der Müller-Zellen abgegrenzt werden, was vor allem durch die Lokalisation gelingt. Astrozyten befinden sich vor allem in der retinalen Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht. Müller-Zellen hingegen spannen ihre Ausläufer von der inneren zur äußeren Grenzmembran. Ihr Zellkörper ist in der inneren Körnerschicht lokalisiert (Reichenbach und Bringmann, 2020).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von Nestin, CD44, Kollagen IX und GFAP in Müller-Zellen und anderen Augenstrukturen in fetalen und frühkindlichen Augen untersucht. Hierzu betrachteten wir das Expressionsmuster in 39 fetalen Augen der 11. bis 38. Schwangerschaftswoche sowie in den Augen von sechs Kindern, die im Alter von einem bis neun Monaten verstarben.

Nestin wurde zwischen der 12. bis 34. Schwangerschaftswoche vor allem in der peripheren Netzhaut exprimiert. Jüngere fetale Augen zeigten eine Farbreaktion in der zentralen und peripheren Netzhaut, während ältere fetale Augen vor allem eine starke Farbreaktion in der peripheren Netzhaut zeigten. Die mit zunehmendem fetalem Alter in den peripheren Netzhautabschnitten auftretende Farbreaktion deckt sich mit der zentrifugalen Entwicklung der Netzhaut.

CD44 wurde vor allem von Müller-Zellen der 23. bis 27. Schwangerschaftswoche sowie in den frühkindlichen Augen exprimiert. Die Expression war in den frühkindlichen Augen stärker als in den fetalen Augen. Wir beobachteten CD44 vor allem in den zentralen Netzhautabschnitten.

Für Kollagen IX zeigte sich ab der 13. Schwangerschaftswoche eine Anfärbung der Müller-Zellen am posterioren Pol. Ab der 22. Schwangerschaftswoche sahen wir zudem eine Expression von Kollagen IX in den peripheren Netzhautabschnitten. Ältere fetale Augen waren signifikant stärker gefärbt als jüngere fetale Augen.

GFAP wurde in den fetalen Augen ab der 23. Schwangerschaftswoche exprimiert. Die Expression war besonders ausgeprägt in den Astrozyten am posterioren Pol. Fetale Müller-Zellen zeigten bis auf ein Auge der 38. Schwangerschaftswoche keine GFAP-Immunreaktion. Alle frühkindlichen Augen zeigten eine GFAP-Expression in den Müller-Zellen neben der Expression in den Astrozyten. Der Nachweis von GFAP in Müller-Zellen eines Fet und eines postnatal verstorbenen Säuglings ohne Traumaanamnese unterstreicht, dass GFAP in Müller-Zellen unter gewissen Umständen auch unabhängig vom Abusive Head Trauma exprimiert werden kann.

Wir konnten zeigen, dass alle von uns untersuchten Marker in unterschiedlichem Ausmaß in fetalen und frühkindlichen Müller-Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsabschnitten exprimiert werden. Der immunhistochemische Nachweis von Müller-Zellen gelang mittels Nestin ab der 12. Schwangerschaftswoche. Aus der Eigenschaft der Müller-Zellen, die hier untersuchten Marker zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten in verschiedenen Netzhautabschnitten zu exprimieren, schließen wir auf eine hohe räumliche und zeitliche Plastizität der Müller-Zellen. Dies steht auch im Einklang mit der Annahme, dass Müller-Zellen während der fetalen Entwicklung vielfältige Aufgaben übernehmen und an der Entwicklung der Netzhaut und des Glaskörpers teilhaben.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Darstellung der fetalen peripheren Netzhaut in Augen der 12. SSW (A), 18. SSW (B), 27. SSW (C) und 38. SSW (D). Die Pfeile markieren exemplarisch Müller-Zellen (HE-Färbung, 200fache Vergrößerung).....10
- Abb. 2:** Darstellung der Müller-Zellen in einem fetalen Auge der 23. Schwangerschaftswoche (HE Färbung, 200fache Vergrößerung). Die Pfeile markieren exemplarisch die Endfüße zum Glaskörper hin sowie die basalen Fortsätze.11
- Abb. 3:** Altersverteilung der untersuchten fetalen und kindlichen Augen. Modifiziert nach (Bulirsch et al., 2022).21
- Abb. 4:** Exemplarische Darstellung des angewendeten Farbscores am Beispiel von Nestin in der fetalen Netzhaut. A: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, B: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, C: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, D: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3. (200fache Vergrößerung).24
- Abb. 5:** Darstellung der räumlichen Einteilung der Augen am Beispiel eines fetalen Auges der 14. Schwangerschaftswoche (1: posteriorer Pol, 2N: posteriorer Pol bis Äquator nasal, 2T: posteriorer Pol bis Äquator temporal, 3N: Äquator bis Längsfalte nasal, 3T: Äquator bis Längsfalte temporal, 4N: Längsfalte nasal, 4T: Längsfalte temporal). Modifiziert nach (Herwig-Carl, 2015).25
- Abb. 6:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen zwischen posteriorem Pol und Äquator (A) gegenüber den Müller-Zellen der Längsfalte (B) in einem fetalen Auge der 24. SSW (200fache Vergrößerung).29
- Abb. 7:** Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen in den einzelnen Netzhautabschnitten. Modifiziert nach (Bulirsch et al., 2022).29
- Abb. 8:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen der Netzhaut am posterioren Pol eines fetalen Auges der 15. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 26. SSW (B) (400fache Vergrößerung).....30

- Abb. 9:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Nestin der Müller-Zellen der Langefalte eines fetalen Auges der 15. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 23. SSW (B) (100fache Vergrößerung).....31
- Abb. 10:** Darstellung der der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen am posterioren Pol in den einzelnen Altersgruppen.....33
- Abb. 11:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator eines fetalen Auges der 24. SSW (A) gegenüber einem neun Monate alten frühkindlichen Auge (B) (200fache Vergrößerung).34
- Abb. 12:** Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen zwischen Äquator und Langefalte in den einzelnen Altersgruppen.....34
- Abb. 13:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 der Müller-Zellen der Langefalte eines fetalen Auges der 13. SSW (A) gegenüber einem vier Monate alten frühkindlichen Auge (B) (200fache Vergrößerung).....35
- Abb. 14:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für CD44 im Limbusgewebe eines fetalen Auges der 23. SSW (A) und eines fetalen Auges der 21. SSW (B) (200fache Vergrößerung).36
- Abb. 15:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX der chorioidalen Blutgefäße in einem fetalen Auge der 27. SSW (A) (200fache Vergrößerung) und der Linse und Hornhaut in einem fetalen Auge der 20. SSW (B) (20fache Vergrößerung).37
- Abb. 16:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX der Müller-Zellen der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator (A) und in der Langefalte (B) in einem fetalen Auge der 23. SSW (100fache Vergrößerung).37
- Abb. 17:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX der Müller-Zellen am posterioren Pol in einem fetalen Auge der 15. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 23. SSW (B) (400fache Vergrößerung).....38

Abb. 18: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, 3: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3) der Müller-Zellen der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.40

Abb. 19: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, 3: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3) der Müller-Zellen vom Äquator bis zur Längsfalte nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.41

Abb. 20: Darstellung der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IX (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2) der Müller-Zellen der Längsfalte nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.....42

Abb. 21: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Müller-Zellen der Längsfalte bei einem Säugling, der einen Monat postnatal an einem unklaren Syndrom verstarb (A 100fache Vergrößerung und C 200fache Vergrößerung) gegenüber einem vier Monate alten Säugling, der am AHT verstarb (B 100fache Vergrößerung und D 200fache Vergrößerung).44

Abb. 22: Immunhistochemische Färbung für GFAP zur exemplarischen Gegenüberstellung von Astrozyten (A) und Müller-Zellen (B) in einem 3 Monate alten frühkindlichen Auge. Die Pfeile kennzeichnen die Astrozyten (A) und Müller-Zellen (B) in der Ganglienzellschicht. Die Pfeilspitze kennzeichnet ein Blutgefäß, das von Astrozyten umgeben wird.....45

Abb. 23: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP des Nervus opticus bei einem fetalen Auge der 21. SSW (40fache Vergrößerung).45

Abb. 24: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP in den Astrozyten in einem fetalen Auge der 24. SSW (A) und einem 3 Monate alten frühkindlichen Auge (B) (200fache Vergrößerung).....46

- Abb. 25:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten am posterioren Pol (A) und in der Langeefalte (B) in einem fetalen Auge der 38. SSW (200fache Vergrößerung).....47
- Abb. 26:** Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten am posterioren Pol bezogen auf das Gestationsalter.47
- Abb. 27:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten am posterioren Pol eines fetalen Auges der 38. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 17. SSW (B) (200fache Vergrößerung).....48
- Abb. 28:** Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP (0: keine Farbreaktion entsprechend Score 0, 1: schwach positive Farbreaktion entsprechend Score 1, 2: mittelgradig positive Farbreaktion entsprechend Score 2, 3: stark positive Farbreaktion entsprechend Score 3) der Astrozyten der Netzhaut vom posterioren Pol und bis zum Äquator nasal (A) und temporal (B) bezogen auf das Gestationsalter.49
- Abb. 29:** Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung für GFAP der Astrozyten der Netzhaut vom posterioren Pol bis zum Äquator in einem fetalen Auge der 20. SSW (A) gegenüber einem fetalen Auge der 34. SSW (B) (100fache Vergrößerung).
.....50

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beschreibung der Intensität der Farbreaktion.....	23
Tab. 2: Beschreibung der Einteilung der Netzhautabschnitte.....	25
Tab. 3: Definition der einzelnen Altersgruppen mit Angabe der Gruppengröße.	26
Tab. 4: Immunhistochemische Färbung für Kollagen IX der Müller-Zellen am posterioren Pol und Gestationsalter (0=keine Farbreaktion, 1=schwach positive Farbreaktion, 2=mittelgradig positive Farbreaktion, 3=stark positive Farbreaktion).....	39

8. Literaturverzeichnis

- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990; 61: 1303-1313
- Bach G, Berman ER. Amino sugar-containing compounds of the retina. I. Isolation and identification. *Biochim Biophys Acta*. 1971; 252: 453-461
- Barishak RY. *Embryology of the Eye and Its Adnexa*. Karger, 2001
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci*. 2007; 27: 7028-7040
- Betz P, Puschel K, Miltner E, Lignitz E, Eisenmenger W. Morphometrical analysis of retinal hemorrhages in the shaken baby syndrome. *Forensic Sci Int*. 1996; 78: 71-80
- Bhatia B, Singhal S, Lawrence JM, Khaw PT, Limb GA. Distribution of Müller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Exp Eye Res*. 2009; 89: 373-382
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res*. 1972; 43: 429-435
- Bishop P, McLeod D, Ayad S. Extraction and characterisation of the intact form of bovine vitreous type IX collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 185: 392-397
- Bishop PN, Crossman MV, McLeod D, Ayad S. Extraction and characterization of the tissue forms of collagen types II and IX from bovine vitreous. *Biochem J*. 1994; 299 (Pt 2): 497-505
- Bishop PN, Holmes DF, Kadler KE, McLeod D, Bos KJ. Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 1041-1046

Bos KJ, Holmes DF, Kadler KE, McLeod D, Morris NP, Bishop PN. Axial structure of the heterotypic collagen fibrils of vitreous humour and cartilage. *J Mol Biol.* 2001; 306: 1011-1022

Bozanić D, Bocina I, Saraga-Babić M. Involvement of cytoskeletal proteins and growth factor receptors during development of the human eye. *Anat Embryol (Berl).* 2006; 211: 367-377

Breazzano MP, Unkrich KH, Barker-Griffith AE. Clinicopathological findings in abusive head trauma: analysis of 110 infant autopsy eyes. *Am J Ophthalmol.* 2014; 158: 1146-1154.e1142

Bringmann A, Grosche A, Pannicke T, Reichenbach A. GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 48

Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006; 25: 397-424

Bulirsch LM, Loeffler KU, Holz FG, Koinzer S, Nadal J, Müller AM, Herwig-Carl MC. Spatial and temporal immunoreaction of nestin, CD44, collagen IX and GFAP in human retinal Müller cells in the developing fetal eye. *Exp Eye Res.* 2022; 217: 108958

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001; 98: 2396-2402

Chaitin MH, Ankrum MT, Wortham HS. Distribution of CD44 in the retina during development and the rds degeneration. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996; 94: 92-98

Chaitin MH, Wortham HS, Brun-Zinkernagel AM. Immunocytochemical localization of CD44 in the mouse retina. *Exp Eye Res.* 1994; 58: 359-365

Chen HL, Yuh CH, Wu KK. Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PLoS One.* 2010; 5: e9318

Chen S, Huang W, Wang J, Zhang J, Wang W, Zhou M, Gao X, Zhang X. Soluble CD44 and vascular endothelial growth factor levels in patients with acute primary angle closure. *Acta Ophthalmol.* 2015; 93: e261-265

Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD. Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell.* 2003; 14: 1468-1478

Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci.* 1992; 103 (Pt 2): 589-597

Duance VC, Wotton SF, Voyle CA, Bailey AJ. Isolation and characterization of the precursor of type M collagen. *Biochem J.* 1984; 221: 885-889

Edwards MM, McLeod DS, Bhutto IA, Villalonga MB, Seddon JM, Luttly GA. Idiopathic preretinal glia in aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2016; 150: 44-61

Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A. Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Müller) cells in hypoxia. *Neuroreport.* 2004; 15: 1633-1637

Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 1971; 28: 351-354

Eyre DR, Apon S, Wu JJ, Ericsson LH, Walsh KA. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett.* 1987; 220: 337-341

Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater.* 2006; 12: 57-63

Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 8287-8292

Gao Y, Zhou Q, Qu M, Yang L, Wang Y, Shi W. In vitro culture of human fetal corneal endothelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 249: 663-669

Giovingo M, Nolan M, McCarty R, Pang IH, Clark AF, Beverley RM, Schwartz S, Stamer WD, Walker L, Grybauskas A, Skuran K, Kuprys PV, Yue BY, Knepper PA. sCD44 overexpression increases intraocular pressure and aqueous outflow resistance. *Mol Vis*. 2013; 19: 2151-2164

Gordon MK, Gerecke DR, Nishimura I, Ninomiya Y, Olsen BR. A new dimension in the extracellular matrix. *Connect Tissue Res*. 1989; 20: 179-186

Hainfellner JA, Voigtländer T, Ströbel T, Mazal PR, Maddalena AS, Aguzzi A, Budka H. Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60: 449-461

Herwig MC, Müller AM, Holz FG, Loeffler KU. Immunolocalization of different collagens in the cornea of human fetal eyes: a developmental approach. *Curr Eye Res*. 2013; 38: 60-69

Herwig-Carl MC. Das menschliche Auge in der Fetalperiode: Untersuchungen im Hinblick auf die klinische Diagnostik und die Expression entwicklungsrelevanter Proteine. 2015

Hughes JL, Lackie PM, Wilson SJ, Church MK, McGill JI. Reduced structural proteins in the conjunctival epithelium in allergic eye disease. *Allergy*. 2006; 61: 1268-1274

Ihanamäki T, Salminen H, Säämänen AM, Pelliniemi LJ, Hartmann DJ, Sandberg-Lall M, Vuorio E. Age-dependent changes in the expression of matrix components in the mouse eye. *Exp Eye Res*. 2001; 72: 423-431

Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol*. 1994; 4: 239-243

Janbaz AH, Lindström M, Liu JX, Pedrosa Domellöf F. Intermediate filaments in the human extraocular muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 5151-5159

Jünemann AG, Rejdak R, Huchzermeyer C, Maciejewski R, Grieb P, Kruse FE, Zrenner E, Rejdak K, Petzold A. Elevated vitreous body glial fibrillary acidic protein in retinal diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015; 253: 2181-2186

Junqueira LC, Carneiro J. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie.* Springer, 1996

Keenan HT, Hooper SR, Wetherington CE, Nocera M, Runyan DK. Neurodevelopmental consequences of early traumatic brain injury in 3-year-old children. *Pediatrics.* 2007; 119: e616-623

Kilic U, Kilic E, Järve A, Guo Z, Spudich A, Bieber K, Barzena U, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci.* 2006; 26: 12439-12446

Kim JH, Jin ZW, Murakami G, Cho BH. Characterization of mesenchymal cells beneath cornification of the fetal epithelium and epidermis at the face: an immunohistochemical study using human fetal specimens. *Anat Cell Biol.* 2016; 49: 50-60

Kim JH, Parkkila S, Shibata S, Fujimiya M, Murakami G, Cho BH. Expression of carbonic anhydrase IX in human fetal joints, ligaments and tendons: a potential marker of mechanical stress in fetal development? *Anat Cell Biol.* 2013; 46: 272-284

Kim SY, Morgan LA, Baldwin AJ, Suh DW. Comparison of the characteristics of retinal hemorrhages in abusive head trauma versus normal vaginal delivery. *J aapos.* 2018; 22: 139-144

Kohno H, Sakai T, Kitahara K. Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 244: 90-95

Koopman G, Heider KH, Horst E, Adolf GR, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a

homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med.* 1993; 177: 897-904

Kubota A, Nishida K, Nakashima K, Tano Y. Conversion of mammalian Müller glial cells into a neuronal lineage by in vitro aggregate-culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351: 514-520

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990; 60: 585-595

Lerner LE, Schwartz DM, Hwang DG, Howes EL, Stern R. Hyaluronan and CD44 in the human cornea and limbal conjunctiva. *Exp Eye Res.* 1998; 67: 481-484

Li L, Hao X, Qin J, Tang W, He F, Smith A, Zhang M, Simeone DM, Qiao XT, Chen ZN, Lawrence TS, Xu L. Antibody against CD44s inhibits pancreatic tumor initiation and postradiation recurrence in mice. *Gastroenterology.* 2014; 146: 1108-1118

Lin S, Lee OT, Minasi P, Wong J. Isolation, culture, and characterization of human fetal trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res.* 2007; 32: 43-50

Lindqvist N, Liu Q, Zajadacz J, Franze K, Reichenbach A. Retinal glial (Müller) cells: sensing and responding to tissue stretch. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 1683-1690

Luna G, Lewis GP, Banna CD, Skalli O, Fisher SK. Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Mol Vis.* 2010; 16: 2511-2523

Lundkvist A, Reichenbach A, Betsholtz C, Carmeliet P, Wolburg H, Pekny M. Under stress, the absence of intermediate filaments from Müller cells in the retina has structural and functional consequences. *J Cell Sci.* 2004; 117: 3481-3488

Lupien C, Brenner M, Guérin SL, Salette C. Expression of glial fibrillary acidic protein in primary cultures of human Müller cells. *Exp Eye Res.* 2004; 79: 423-429

Matas A, Filipovic N, Znaor L, Mardesic S, Saraga-Babic M, Vukojevic K. Interplay of proliferation and differentiation factors is revealed in the early human eye development. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015; 253: 2187-2201

Mayer EJ, Carter DA, Ren Y, Hughes EH, Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ, Dick AD. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89: 102-106

Mayer EJ, Hughes EH, Carter DA, Dick AD. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol*. 2003; 87: 1154-1158

Middeldorp J, Boer K, Sluijs JA, De Filippis L, Encha-Razavi F, Vescovi AL, Swaab DF, Aronica E, Hol EM. GFAPdelta in radial glia and subventricular zone progenitors in the developing human cortex. *Development*. 2010; 137: 313-321

Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011; 93: 421-443

Moore KL, Persaud TVN. *Embryologie. Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik*. Urban & Fischer Verlag, 2007

Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; 81: 166-173

Nadarasa J, Deck C, Meyer F, Willinger R, Raul JS. Update on injury mechanisms in abusive head trauma--shaken baby syndrome. *Pediatr Radiol*. 2014; 44 Suppl 4: S565-570

Newman EA. Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat. *Glia*. 1999; 26: 302-308

Nishina S, Hirakata A, Hida T, Sawa H, Azuma N. CD44 expression in the developing human retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997; 235: 92-96

Okada M, Matsumura M, Ogino N, Honda Y. Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1990; 228: 467-474

Osborne NN, Block F, Sontag KH. Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Müller cells. *Vis Neurosci.* 1991; 7: 637-639

Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol.* 1993; 122: 257-264

Pietras A, Katz AM, Ekström EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL, Werbeck JL, Amankolor NM, Huse JT, Holland EC. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell.* 2014; 14: 357-369

Ponsioen TL, van Luyn MJ, van der Worp RJ, Pas HH, Hooymans JM, Los LI. Human retinal Müller cells synthesize collagens of the vitreous and vitreoretinal interface in vitro. *Mol Vis.* 2008a; 14: 652-660

Ponsioen TL, van Luyn MJ, van der Worp RJ, van Meurs JC, Hooymans JM, Los LI. Collagen distribution in the human vitreoretinal interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008b; 49: 4089-4095

Provis JM, van Driel D, Billson FA, Russell P. Development of the human retina: patterns of cell distribution and redistribution in the ganglion cell layer. *J Comp Neurol.* 1985; 233: 429-451

Puro DG. Stretch-activated channels in human retinal Muller cells. *Glia.* 1991; 4: 456-460

Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 5178-5182

Reichenbach A, Bringmann A. Glia of the human retina. *Glia.* 2020; 68: 768-796

Reichenbach A, Ziegert M, Schnitzer J, Pritz-Hohmeier S, Schaaf P, Schober W, Schneider H. Development of the rabbit retina. V. The question of 'columnar units'. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994; 79: 72-84

Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3: a004978

Sakata R, Yanagi Y. Expression of immature and mature retinal cell markers in retinoblastoma. *Eye (Lond)*. 2008; 22: 678-683

Sarthy PV, Fu M, Huang J. Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina. *Cell Mol Neurobiol*. 1991; 11: 623-637

Savontaus M, Ihanamäki T, Perälä M, Metsäranta M, Sandberg-Lall M, Vuorio E. Expression of type II and IX collagen isoforms during normal and pathological cartilage and eye development. *Histochem Cell Biol*. 1998; 110: 149-159

Sebag J. *The Vitreous*. New York: Springer-Verlag, 1989

Seitz R, Ohlmann A, Tamm ER. The role of Müller glia and microglia in glaucoma. *Cell Tissue Res*. 2013; 353: 339-345

Sejersen T, Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci*. 1993; 106 (Pt 4): 1291-1300

Shinoe T, Kuribayashi H, Saya H, Seiki M, Aburatani H, Watanabe S. Identification of CD44 as a cell surface marker for Müller glia precursor cells. *J Neurochem*. 2010; 115: 1633-1642

Slezak M, Grosche A, Niemiec A, Tanimoto N, Pannicke T, Münch TA, Crocker B, Isope P, Härtig W, Beck SC, Huber G, Ferracci G, Perraut M, Reber M, Miehe M, Demais V, Lévêque C, Metzger D, Szklarczyk K, Przewlocki R, Seeliger MW, Sage-Ciocca D, Hirrlinger J, Reichenbach A, Reibel S, Pfrieder FW. Relevance of exocytotic glutamate release from retinal glia. *Neuron*. 2012; 74: 504-516

Spira AW, Hollenberg MJ. Human retinal development: ultrastructure of the inner retinal layers. *Dev Biol*. 1973; 31: 1-21

Stone J, Dreher Z. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol*. 1987; 255: 35-49

Sullivan SM, Lee A, Björkman ST, Miller SM, Sullivan RK, Poronnik P, Colditz PB, Pow DV. Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. *J Biol Chem.* 2007; 282: 29414-29423

Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M, Saya H. Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res.* 2012; 72: 1438-1448

Tamm ER, Ohlmann A. [Development of the human eye]. *Ophthalmologe.* 2012; 109: 911-928

Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, Otsuji T, Adamis AP, Luty GA. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol.* 2002; 133: 373-385

Tonthat CV, Di Girolamo N. Nestin expression in pterygia: potential role in angiogenesis. *Br J Ophthalmol.* 2014; 98: 801-807

Too LK, Gracie G, Hasic E, Iwakura JH, Cherepanoff S. Adult human retinal Müller glia display distinct peripheral and macular expression of CD117 and CD44 stem cell-associated proteins. *Acta Histochem.* 2017; 119: 142-149

Tout S, Chan-Ling T, Holländer H, Stone J. The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience.* 1993; 55: 291-301

Triviño A, Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J. Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Res.* 1997; 37: 1707-1711

van der Rest M, Mayne R, Ninomiya Y, Seidah NG, Chretien M, Olsen BR. The structure of type IX collagen. *J Biol Chem.* 1985; 260: 220-225

Vaughan DK, Fisher SK. The distribution of F-actin in cells isolated from vertebrate retinas. *Exp Eye Res.* 1987; 44: 393-406

Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016; 51: 1-40

Verderber L, Johnson W, Mucke L, Sarthy V. Differential regulation of a glial fibrillary acidic protein-LacZ transgene in retinal astrocytes and Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 1137-1143

Verdijk RM, Herwig-Carl MC. *Fetal and Neonatal Eye Pathology.* Springer, 2020

Vujosevic S, Micera A, Bini S, Berton M, Esposito G, Midená E. Aqueous Humor Biomarkers of Müller Cell Activation in Diabetic Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56: 3913-3918

Wagner N, Wagner KD, Scholz H, Kirschner KM, Schedl A. Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor *Wt1*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291: R779-787

Walcott JC, Provis JM. Müller cells express the neuronal progenitor cell marker nestin in both differentiated and undifferentiated human foetal retina. *Clin Exp Ophthalmol.* 2003; 31: 246-249

Watanabe T, Raff MC. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature.* 1988; 332: 834-837

West H, Richardson WD, Fruttiger M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development.* 2005; 132: 1855-1862

Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 1993; 53: 4754-4756

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61: 2510-2522

Wu KH, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol.* 2003; 87: 1159-1166

Wyganski-Jaffe T, Levin AV, Shafiq A, Smith C, Enzenauer RW, Elder JE, Morin JD, Stephens D, Atenafu E. Postmortem orbital findings in shaken baby syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2006; 142: 233-240

Xue L, Ding P, Xiao L, Hu M, Hu Z. Nestin, a new marker, expressed in Müller cells following retinal injury. *Can J Neurol Sci.* 2010; 37: 643-649

Xue L, Ding P, Xiao L, Hu M, Hu Z. Nestin is induced by hypoxia and is attenuated by hyperoxia in Müller glial cells in the adult rat retina. *Int J Exp Pathol.* 2011; 92: 377-381

Xue LP, Lu J, Cao Q, Hu S, Ding P, Ling EA. Müller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina. *Neuroscience.* 2006a; 139: 723-732

Xue LP, Lu J, Cao Q, Kaur C, Ling EA. Nestin expression in Müller glial cells in postnatal rat retina and its upregulation following optic nerve transection. *Neuroscience.* 2006b; 143: 117-127

Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med.* 2015; 4: 1033-1043

Yay A, Ozdamar S, Canoz O, Baran M, Tucer B, Sonmez MF. Intermediate filament protein nestin is expressed in developing meninges. *Bratisl Lek Listy.* 2014; 115: 718-722

Yuodelis C, Hendrickson A. A qualitative and quantitative analysis of the human fovea during development. *Vision Res.* 1986; 26: 847-855

Zhu SN, Nölle B, Duncker G. Expression of adhesion molecule CD44 on human corneas. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81: 80-84

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt allen voran meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Martina Herwig-Carl für die Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung in jedem Abschnitt der Promotion. Die Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren immer eine große Bereicherung und haben mich stets ermutigt und motiviert.

Ich danke zudem Herrn Prof. Dr. med. Glen Kristiansen für die Betreuung als Zweitgutachter.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Karin Löffler für ihre unermüdliche Bereitschaft ihr histologisches Wissen weiterzugeben.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Frank Holz für die Förderung der Forschung an der Universitäts-Augenklinik Bonn danken.

Ich danke zudem Parand Widmar für ihre Unterstützung und ihren wertvollen Rat bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate.

Zudem möchte ich Frau Prof. Dr. med. Annette Müller und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Koinzer für das zur Verfügung stellen der Präparate danken.

Weiterer Dank gilt Frau Jennifer Nadal für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mich auf dem gesamten Weg begleitet und unterstützt haben.