

Aus der
Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Anatomie – Vegetative Anatomie
Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Calretinin-Expression in Nervenendigungen der äußeren Augenmuskeln beim Menschen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Kathrin Ernestine Sänger
aus
Pfaffenhofen an der Ilm

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Günter Rudolph

Prof. Dr. Christoph Schmitz

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiterin: Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

Inhaltsverzeichnis	
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Augenbewegungen	1
1.2 Anatomie der extraokulären Muskulatur	2
1.3 Funktion der äußeren Augenmuskeln	3
1.4 Feinanatomie der extraokulären Muskulatur	5
1.5 Innervation	6
1.5.1 Motorische Innervation	6
1.5.2 Autonome Innervation	7
1.5.3 Sensible Innervation	7
1.6 Augenmuskelkerne	12
1.7 Propriozeption	13
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Augenmuskeln	16
3.1.1 Präparate	16
3.1.2 Präparation der Augenmuskeln	17
3.1.3 Auswahl der Schnitte mittels Trichromfärbung nach van Gieson	19
3.1.4 Immunhistochemische Färbungen	19
3.1.5 Auswertung der angefärbten Schnitte	24
3.2 Hirn	25
3.2.1 Präparate	25
3.2.2 Präparation	25
3.2.3 Paraffinschnitte	25
3.2.4 Nissl-Färbung	26
3.2.5 Immunhistochemische Färbung mittels Avidin-Biotin-Methode	26
3.2.6 Auswertung der Hirnschnitte	27
4. Ergebnisse	28
4.1 Extraokuläre Muskulatur	28
4.1.1 Maße der Muskelsehnenübergänge der geraden EOM	28

4.1.2	Identifizierung der Muskelsehnenübergänge	28
4.1.3	Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Augenmuskelschnitte	29
4.1.4	Identifizierung von Nervenendigungen in den extraokulären Muskeln mit SNAP-25	30
4.1.5	Identifizierung von Nervenendigungen in den extraokulären Muskeln mit Calretinin	33
4.2	Auswertung der Gehirnschnitte	41
5.	Diskussion	47
5.1	Methodische Probleme	47
5.2	Darstellung der Innervation der EOM mittels SNAP-25-Antikörpern	48
5.3	Calretinin-Expression in der EOM	48
5.4	Identifizierung von Zellkörpern von Calretinin-positiven Palisadenendigungen	50
5.5	Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen als anatomische Einheit?	51
5.6	Welche Funktion haben die Palisadenendigungen?	52
5.7	Calretinin als Marker für sensible Fasern?	53
5.8	Funktionelle Relevanz von Calretinin in PEs von MR und IR	54
5.9	Spiralendigungen	54
5.10	Klinische Relevanz	55
5.11	Ausblick	56
6.	Zusammenfassung	57
7.	Anhang	58
7.1	Verwendete Augenmuskelschnitte	58
7.2	Verwendete Lösungen	62
7.3	Verwendete Antikörper	64
7.4	Färbeprotokolle	65
7.4.1	Van Gieson-Färbung	65
7.4.2	Doppelimmunfluoreszenzfärbung	66
7.4.2.1	SNAP-25 und Calretinin Version 1 (SNAP-25 rot, CR grün)	66
7.4.2.2	SNAP-25 und Calretinin Version 2 (SNAP-25 grün, CR rot)	67
7.4.2.3	ChAT und Calretinin	68
7.4.3	Doppelfärbung mittels Avidin-Biotin-Methode	69
7.4.4	Nisslfärbung für Paraffinschnitte	73
7.4.5	Immunhistochemische Färbung mit DAB der Gehirnschnitte	74
8.	Literatur	78
	Danksagung	86
	Eidesstattliche Versicherung	87

Abkürzungsverzeichnis

ABM = Avidin-Biotin-Methode

AK = Antikörper

Aqua dest. = destilliertes Wasser (lat. „Aqua destillata“)

Biot. = Biotiniliert

CCN = Nucleus centralis caudalis

ChAT = Cholinacetyltransferase

DAB = Diaminobenzidintetrahydrochlorid

DPX = Distyrene plasticizer and xylene (Eindeckmedium)

EAP = Extravidinperoxidase

EOM = Extraokuläre Muskulatur

EW = Edinger-Westphal-Kern

EW_{cp} = Edinger-Westphal-Kern, peptiderge Neurone

EW_{pg} = Edinger-Westphal-Kern, präganglionäre Neurone

GS = Globale Schicht

H₂O₂ = Wasserstoffperoxid

IO = M. obliquus inferior

IR = M. rectus inferior

LR = M. rectus lateralis

M = Mol

MIF = Multiple innervierte Muskelfaser (engl. „multiply innervated fiber“)

MR = M. rectus medialis

MS = Muskelspindel

MSÜ = Muskelsehnenübergang

N. = Nervus

Ncl. = Nucleus

NDS = Normal Donkey Serum

NGS = Normal Goat Serum

Ni = Nickel

NII = Nervus opticus

nIII = Nucleus oculomotorius

NIII = Nervus oculomotorius

nIV = Nucleus trochlearis

NIV = Nervus trochlearis

NP = Nucleus Perlia

nVI = Nucleus abducens

NVI = Nervus abducens

OS = Orbitale Schicht

PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. „phosphate buffered saline“)

PE = Palisadenendigung

PFA = Paraformaldehyd

RSA = Rinderserumalbumin

RT = Raumtemperatur

SIF = Einfach innervierte Muskelfaser (engl. „singly innervated fiber“)

SO = M. obliquus superior

SR = M. rectus superior

TBS = Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. „tris buffered saline“)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Funktionen der extraokulären Muskeln	3
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Augenmuskeln	16
Tabelle 3: Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25 und Calretinin (Version 1)	22
Tabelle 4: Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25 und Calretinin (Version 2)	23
Tabelle 5: Übersicht über die Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf ChAT und Calretinin	23
Tabelle 6: Übersicht der Doppelfärbung mittels Avidin-Biotin-Methode auf SNAP-25 und SMHC	24
Tabelle 7: Übersicht der Doppelfärbung mittels Avidin-Biotin-Methode auf CR und SMHC	24
Tabelle 8: Verwendete Fälle der Gehirnschnitte	25
Tabelle 9: Übersicht der DAB-Färbung auf Calretinin der Hirnschnitte	27
Tabelle 10: Übersicht der DAB-Färbung auf ChAT der Hirnschnitte	27
Tabelle 11: Übersicht über die gemessenen Abstandswerte der geraden äußeren Augenmuskeln	28
Tabelle 12: Calretinin-Expression in den verschiedenen äußeren Augenmuskeln	40
Tabelle 13: Übersicht über das Vorkommen der Nervenendigungen im Längsverlauf der EOM	41
Tabelle 14: Ausgewertete ChAT/CR-Schnittpaare nach Ebenen sortiert	44
Tabelle 15: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus medialis	58
Tabelle 16: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus lateralis	59
Tabelle 17: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus inferior	59
Tabelle 18: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus superior	60
Tabelle 19: Verwendete Augenmuskelschnitte M. obliquus inferior	61
Tabelle 20: Verwendete Augenmuskelschnitte M. obliquus superior	61
Tabelle 21: Auflistung der verwendeten primären Antikörper	64
Tabelle 22: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der extraokulären Muskulatur, Ansicht von lateral	2
Abbildung 2: Anatomie der extraokulären Muskulatur, Ansicht von kranial	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung vom Ansatz der Muskelschichten am Bulbus oculi	4
Abbildung 4: Querschnitt durch den M. rectus medialis des Menschen	5
Abbildung 5: Darstellung der Innervation der EOM	6
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Spiralendigung	7
Abbildung 7: Entwicklung von Golgi-Sehnenorganen in der Ratte	9
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines myotendinösen Zylinders	10
Abbildung 9 A und B: Hypothesen über das Zusammenspiel von Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen	11
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Hirnstamms	12
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ncl. oculomotorius	12
Abbildung 12: Schematische Übersichtsdarstellung des Ncl. oculomotorius	13
Abbildung 13: Ansicht eines präparierten Auges von kranial	17
Abbildung 14: Abbildung eines präparierten Auges von kaudal	18
Abbildung 15: Schema der Avidin-Biotin-Methode	20
Abbildung 16: Schematische Darstellung der gemessenen Abstandswerte	29
Abbildung 17: Van Gieson-Färbung der Muskelschnitte	39
Abbildung 18: Aufnahme einer en plaque- (Bild A) und en grappe- (Bild B) Endigung im Hellfeld	30
Abbildung 19: Aufnahme einer Spiral- (Bild A) und Palisadenendigung (Bild B) im Hellfeld	31
Abbildung 20: Aufnahme einer speziellen fokalen Endigung (Bild A) und Muskelspindel (Bild B) im Hellfeld	32
Abbildung 21: En plaque-Endigung in ChAT- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	32
Abbildung 22: En grappe-Endigung in SNAP-25- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	33
Abbildung 23: En grappe-Endigung in ChAT- & CR- bzw. SNAP-25- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	34
Abbildung 24: Spiralendigungen in SNAP-25- & CR- bzw. ChAT- & CR- Doppelimmunfluoreszenzfärbung	35
Abbildung 25: Palisadenendigungen in SNAP-25- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	36
Abbildung 26: Palisadenendigungen in ChAT- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	37
Abbildung 27: Spezielle fokale Endigungen in SNAP-25- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	38
Abbildung 28: Muskelspindeln in SNAP-25- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	39
Abbildung 29: Nervenfasern in Gefäßwänden in ChAT- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	40
Abbildung 30: ChAT- negative Nervenfasern in ChAT- & CR-Doppelimmunfluoreszenzfärbung	40
Abbildung 31: Schema der Ebeneneinteilung des Nucleus oculomotorius	41
Abbildung 32: Ebeneneinteilung des Ncl. oculomotorius anhand von Nisslschnitten	41
Abbildung 33: Markierte Neurone in den verschiedenen Ebenen	43
Abbildung 34: Detailansicht eines en plaque-Neurons in ChAT- & CR-Färbung	45
Abbildung 35: Detailansicht eines CR- & ChAT-positiven Neurons im nIII in ChAT- & CR-Färbung	45
Abbildung 36: Detailansicht eines CR- & ChAT-positiven Neurons im Randbereich des nIII in ChAT- & CR-Färbung	46
Abbildung 37: Plot der doppeltmarkierten Neurone in Ebene 2 (A) und Ebene 3 (B)	46

1. Einleitung

1.1 Augenbewegungen

Das Zusammenspiel der äußeren Augenmuskeln dient der stabilen Abbildung der Umwelt, sowie dem Erfassen neuer Sehobjekte auf der Fovea centralis beider Augen (Leigh and Zee, 2015). Dabei lassen sich grundsätzlich sechs verschiedene Augenbewegungsarten voneinander unterscheiden: Sakkaden, langsame Folgebewegungen, vestibulookulärer Reflex, optokinetischer Reflex, Vergenzen und Fixationsbewegung (Büttner and Büttner-Ennever, 2006). Während sich vestibulookuläre und optokinetische Reflexbewegungen in allen Vertebraten finden, treten Fixationsbewegungen, Sakkaden und langsame Folgebewegungen phylogenetisch erst später mit der Entwicklung einer Fovea auf (Büttner and Büttner-Ennever, 2006).

Je nach Typ der Augenbewegung scheinen unterschiedliche Informationen zum erfolgreichen Ablauf notwendig zu sein (Horn and Leigh, 2011). Bei schnellen Augenbewegungen (Sakkaden und schnelle Phase des vestibulookulären Reflexes) sind nach derzeitigem Wissensstand keine propriozeptiven Informationen erforderlich, ausschlaggebend ist die Verwendung einer Efferenzkopie (Carpenter, 1988). Da diese Augenbewegungen nach Beginn nicht mehr verändert werden können, ist hier keine visuelle Kontrolle während der Ausführung möglich (Carpenter, 1988). Bei langsamen Bewegungen, wie den optokinetischen Augenbewegungen, langsamen Folgebewegungen und Vergenzen ist dagegen eine gute visuelle Kontrolle möglich, aber auch propriozeptive Elemente scheinen beteiligt zu sein (Miller et al., 2005; Lienbacher and Horn, 2012).

Bewegen sich beide Augen in dieselbe Richtung entspricht dies einer konjugierten Bewegung. Eine diskonjugierte Augenbewegung wird ausgeführt, wenn sich die Augen voneinander weg oder aufeinander zu in die entgegengesetzte Richtung bewegen. Man spricht dann von divergenten und konvergenten Bewegungen. Die Divergenz führt zu einer Entfernung der Sehachsen voneinander, während bei der Konvergenz die Sehachsen aufeinander zugeführt werden. So können Sehobjekte, die sich vom Betrachter weg- bzw. zu ihm hinbewegen, verfolgt und somit auf der Retina stabil abgebildet werden (Miller et al., 2005; Thömke, 2008). Vergenzbewegungen sind grundsätzlich langsame Augenbewegungen, können aber zusammen mit Sakkaden sehr viel schneller ausgeführt werden (Leigh and Zee, 2015).

Nähern sich die Augen und das Sehobjekt an kommt es zur Naheinstellungstrias, bei der neben der Konvergenzbewegung eine Akkommodation und Miosis eintritt, um das Objekt weiterhin scharf zu sehen (Myers and Stark, 1990). An der Konvergenzbewegung sind der M. rectus medialis und der M. rectus inferior aktiv beteiligt (Mok et al., 1992). Die präganglionären Neurone, die an der Akkommodation (M. ciliaris) und Miosis (M. sphincter pupillae) beteiligt sind liegen dabei im Edinger-Westphal-Kern (McDougal and Gamlin, 2015).

1.2 Anatomie der extraokulären Muskulatur

Umgeben von Binde- und Fettgewebe, der extraokulären Muskulatur (EOM) und Leitungsbahnen liegt der Bulbus oculi in der knöchernen Orbita (Porter et al., 1995) (Abbildung 1). Die Bewegung des Augenbulbus in der Orbita wird durch die sechs äußeren Augenmuskeln, die an ihm ansetzen, ausgeführt (Abbildung 2). In allen Vertebraten finden sich vier gerade (superior, inferior, medial und lateral) und zwei schräge (superior und inferior) extraokuläre Muskeln, die sich in Anordnung und Innervation in den einzelnen Spezies unterscheiden (Isomura, 1981). Bei Säugern findet sich außerdem ein siebter extraokulärer Muskel, der M. levator palpebrae, der als Heber des Oberlids nicht direkt an der Augenbewegung teilnimmt (Spencer and Porter, 2006). In einigen Vertebraten finden sich zusätzlich noch akzessorische extraokuläre Muskeln, z.B. in Form des M. retractor bulbi, der den Augenbulbus in die Augenhöhle zurückziehen kann (Isomura, 1981).

Die Periorbita (Periost der Orbita) ist am Canalis opticus mit der Durascheide des Sehnerven verwachsen und bildet dort einen Sehnenring, den „Anulus tendineus communis“ oder „Zinnschen Ring“ (Sevel, 1986; Benninghoff, 2004). Ausgehend von diesem fibrösen Ring ziehen die vier geraden Augenmuskeln divergierend in Richtung des Augapfels und inserieren dort vor dem Bulbusäquator in der Sklera (Sevel, 1986; Miller et al., 2005).

Der M. obliquus superior zieht, ausgehend von der Periorbita der superonasalen Orbitawand, nach anterior (Demer, 2007). Nach dem distalen Muskelsehnenübergang wird er von der Trochlea, einer fibrocartilaginösen Schlaufe an der medialen superioren Wand der Orbita, umgriffen und nach posterior umgelenkt (Miller et al., 2005). Die Sehne inseriert lateral, hinter dem Bulbusäquator in der Sklera und unterkreuzt dabei den M. rectus superior (Miller et al., 2005). Der M. obliquus inferior entspringt als einziger äußerer Augenmuskel am vorderen, vom Os lacrimale gebildeten Orbitalrand. Über dem M. rectus inferior zieht er zum dorsolateralen Bulbusquadranten und inseriert hinter dem Bulbusäquator in der Sklera (Benninghoff, 2004; Miller et al., 2005).

Der M. levator palpebrae entspringt an der Ala minor des Os sphenoidale, oberhalb des Ursprungs des M. rectus superior (Spencer and Porter, 1988). Der Muskel fächert sich in eine breite Aponeurose auf und inseriert in die Haut des Oberlids sowie im M. tarsalis superior (Spencer and Porter, 1988).

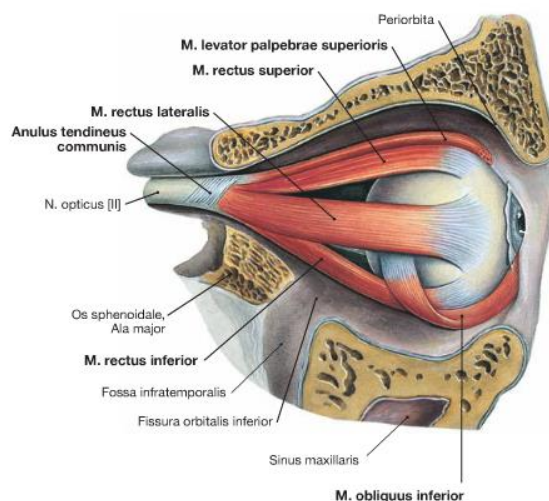


Abbildung 1: Extraokuläre Muskulatur, Ansicht des rechten Auges von lateral. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München; adaptiert aus (Sobotta, 2010).

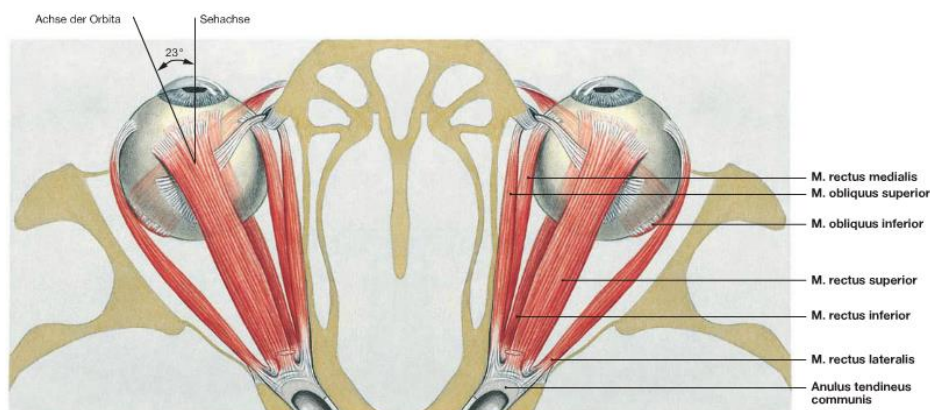


Abbildung 2: Extraokuläre Muskulatur, Ansicht von kranial. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München; adaptiert aus (Sobotta, 2010).

1.3 Funktion der äußeren Augenmuskeln

Die äußeren Augenmuskeln stehen sich jeweils als Gegenspieler paarweise gegenüber. In der horizontalen Blickebene bewirkt der M. rectus medialis eine Adduktion, der M. rectus lateralis eine Abduktion des Auges. Die Hauptfunktion der Mm. recti superior und inferior ist die Elevation bzw. Depression des Bulbus. Durch eine Abweichung der Bulbusachse um 23° medial von der Verlaufsrichtung der beiden Muskeln (Abbildung 2) kommen diesen noch weitere Nebenfunktionen zu (Tabelle 1). Die beiden schrägen Augenmuskeln setzen von anterior nach dorsal ziehend in einem Winkel von etwa 51° am oberen bzw. unteren dorsolateralen Quadranten des Augapfels an. Neben der Funktion als Innenrotator (M. obliquus superior) und Außenrotator (M. obliquus inferior), zeigen beide Muskeln als Nebenfunktion Depression bzw. Elevation und leichte Abduktion, da ihre Kontraktion zum Zug am hinteren lateralen Bulbuspol führt. Je nach Ausgangsstellung des Bulbus kommen den einzelnen Muskeln ein unterschiedlicher Anteil an den jeweiligen Bewegungen zu (Tabelle 1) (Benninghoff, 2004; Miller et al., 2005).

Augenmuskel	Innervation	Hauptfunktion	Nebenfunktion
M. rectus lateralis	N. abducens	Abduktion	Keine
M. rectus medialis	N. oculomotorius	Adduktion	Keine
M. rectus superior	N. oculomotorius	Elevation	Innenrotation und Adduktion
M. rectus inferior	N. oculomotorius	Depression	Außenrotation und Adduktion
M. obliquus superior	N. trochlearis	Innenrotation	Depression und Abduktion
M. obliquus inferior	N. oculomotorius	Außenrotation	Elevation und Abduktion
M. levator palpebrae superioris	N. oculomotorius	Heber des Oberlids	Keine

Tabelle 1: Übersicht der Funktionen der extraokulären Muskulatur, modifiziert nach (Schünke, 2009)

Um eine optimale Beweglichkeit des Bulbus zu erreichen sind die Endabschnitte der Muskeln in ein „Gurtungssystem“ aus Kollagenfasern und elastischen Fasern eingebettet (Demer et al., 1995; Demer et al., 1997). Der anteriore Anteil dieser sogenannten „Tenonkapsel“ ist dabei straff, der posteriore Anteil dagegen dünn und zart (Demer et al., 1995; Porter et al., 1996; Benninghoff, 2004). Dies verhindert zum einen den Rückzug des Bulbus in die Orbita während der Kontraktion der EOM und zum anderen ein Abrutschen der Muskeln bei Bewegungen um große Winkel (Demer et al., 2000; Ruskell et al., 2005). Der feine Aufbau des posterioren Bereichs der Tenonkapsel bietet den durchtretenden Gefäß- und Nervensträngen die nötige Flexibilität die während der Augenbewegungen nötig ist (Benninghoff, 2004). Die Tenonpforten sind Teil der Tenonkapsel und liegen in der Nähe des Bulbusäquators; sie bilden einen bindegewebigen Ring, der den globalen Teil der geraden EOM umfasst, der auch als Pulley bezeichnet wird (Demer et al., 1995). Die Pulleys werden durch Kollagen, Elastin, sowie glatte Muskulatur stabilisiert, die von der knöchernen Orbita ausgehen (Demer et al., 1995). Die globale Schicht der einzelnen Muskeln zieht dabei durch die Pulleys und setzt dann an der Sklera an, während der Großteil der Fasern der orbitalen Schicht am äußeren Bereich der Pulleys selbst ansetzen (Abbildung 3) (Demer et al., 2000; Oh et al., 2001b; Demer, 2002). Durch diesen Aufbau agieren die Pulleys, die hinter dem Bulbusäquator liegen, als funktioneller Ursprung der äußeren Augenmuskeln (Demer et al., 2000; Demer, 2007).

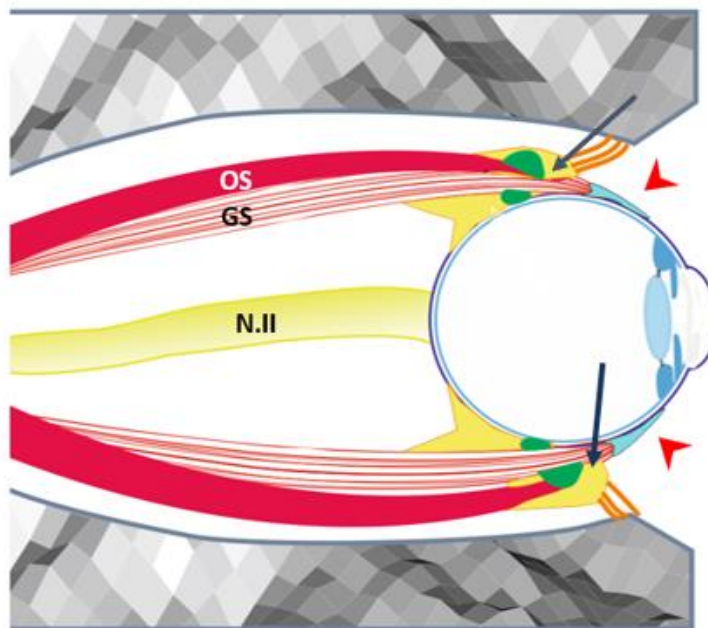


Abbildung 3: Schematische Darstellung vom Ansatz der Muskelschichten am Bulbus bzw. an den Pulleys. Ansicht von kranial. Die globale Schicht (GS) der extraokulären Muskulatur zieht durch die Tenonpforten (grün) hindurch und setzt direkt mit der Sehne (roter Pfeil) am Bulbus an. Die orbitale Schicht (OS) setzt an der äußeren Schicht der Pulleys (blauer Pfeil) an. Bild modifiziert nach (Demer, 2007).

1.4 Feinatomie der extraokulären Muskulatur

Die extraokulären Muskeln sind je nach Spezies aus zwei bzw. drei Schichten aufgebaut. In allen Säugern findet sich eine dem Bulbus anliegende globale Schicht und eine dem Knochen zugewandte orbitale Schicht (Kato, 1938). Außerdem lässt sich in einigen Spezies (z.B. Schaf) eine weitere, der orbitalen Schicht außen anliegende, marginale Schicht nachweisen (Harker, 1972). Eine vergleichbare Schicht wurde auch im Menschen beschrieben (Wasicky et al., 2000).

Diese Schichtung ist in allen extraokulären Muskeln vorhanden, mit Ausnahme des M. levator palpebrae, der aufgrund seiner Abstammung häufig auch zu der EOM gezählt wird (Porter et al., 1995). Die Muskulatur des Lidhebers ist ähnlich der globalen Schicht der restlichen EOM aufgebaut (Demer et al., 2000).

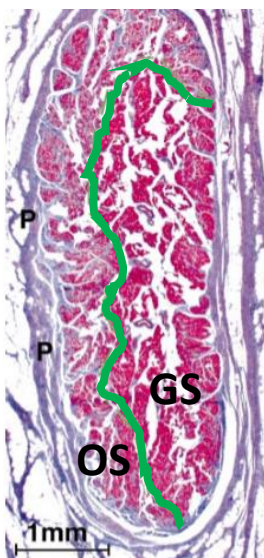


Abbildung 4: Querschnitt durch den M. rectus medialis des Menschen. In der Masson-Trichom-Färbung erscheinen die Muskelfasern rosa, das Bindegewebe blauviolett. Im Bild zeigt sich links der grünen Linie die orbitale Schicht (OS) und rechts davon die Muskelfasern der globalen Schicht (GS). Mit P wurden die Pulleys markiert, die den Muskel umgeben. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von „Association for Research in Vision and Ophthalmology“, Bild adaptiert aus (Oh et al., 2001a).

Die orbitale Schicht der geraden Augenmuskeln umgreift die globale Schicht C-förmig von außen (Abbildung 4), während die orbitale Schicht der schrägen Augenmuskeln die globale Schicht oft vollständig ringförmig umgibt (Oh et al., 2001b; Spencer and Porter, 2006). Die Muskelfasern der orbitalen Schicht haben dabei in der Regel einen kleineren Durchmesser, als die der globalen Schicht (Spencer and Porter, 2006). Die Fasern der äußeren Augenmuskulatur weisen im Vergleich zu den Skelettmuskelfasern einige Besonderheiten auf. Die Muskelfasern lassen sich abhängig von Lage, Mitochondriengehalt und Innervationstyp in sechs verschiedene Typen einteilen (Spencer and Porter, 2006). Zwei dieser EOM-Fasertypen sind in der orbitalen, die restlichen vier in der globalen Schicht zu finden (Spencer and Porter, 2006). Ausgehend vom Kontraktionstyp und der Innervation lassen sich diese in zwei Hauptgruppen einteilen: Vier schnelle (twitch) und zwei langsame (non-twitch) Faserarten (Spencer and Porter, 2006). Der Großteil der Muskelfasern, sowohl in der orbitalen als auch in der globalen Schicht, wird durch Twitch-Fasern gebildet (Spencer and Porter, 2006). Diese Fasern werden durch eine einzelne „en plaque“-Nervenendigung im mittleren Drittel der Muskelfaser innerviert (singly innervated muscle fibers = SIFs) (Spencer and Porter, 1988). Sie entsprechen den Twitch-Typen des Skelettmuskelfasersystems und antworten nach dem „alles-oder-nichts“-Prinzip nach Reizung (Leigh and Zee, 2015).

Dem gegenüber stehen die Non-twitch-Muskelfasern, die multipel über „en grappe“-Nervenendigungen innerviert werden. Die Nervenendigungen erstrecken sich über die ganze Muskellänge und bilden im gesamten Verlauf feine Muskelendplatten aus (multiply innervated muscle fibers = MIFs) (Spencer and Porter, 1988; Porter et al., 1995). Dabei unterscheiden sich die MIFs der globalen Schicht von denen der orbitalen Schicht. Bei den MIFs der globalen Schicht erfolgt eine langsame tonische Kontraktion, die nicht über den Muskel fortgeleitet wird (Siebeck and Kruger, 1955; Chiarandini and Stefani, 1979; Bondi and Chiarandini, 1983). In der orbitalen Schicht zeigen die MIFs eine besondere Innervation. Im zentralen Teil der Muskelfaser sind diese von einer en plaque-Faser innerviert und verhalten sich wie eine Twitch-Faser, während die distalen Bereiche sich durch die en grappe-Endigung wie eine Non-twitch-Faser verhalten (Pachter, 1984; Jacoby et al., 1990; Lynch et al., 1994). Multipel innervierte Muskelfasern sind eine Besonderheit beim Säuger und werden nur noch in Teilen der Larynx- und Mittelohrmuskulatur gefunden, während sie in Amphibien und Vögeln regelmäßig vorkommen (Review: Morgan and Proske, 1984). Dabei nehmen alle Muskelfasertypen an allen Arten der Augenbewegung teil (Scott and Collins, 1973).

1.5 Innervation

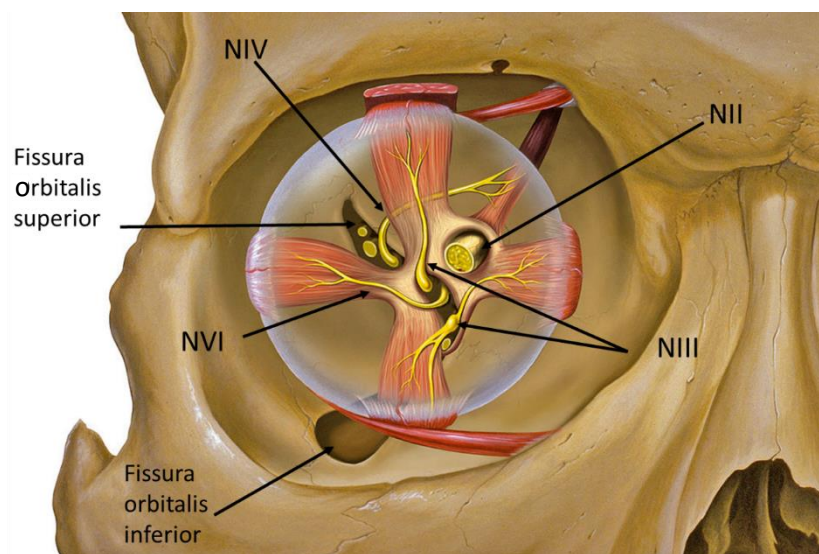


Abbildung 5: Darstellung der Innervation der EOM. Ausgehend vom Zinnschen Ring bzw. der dorsalen Periorbita ziehen die geraden Augenmuskeln und der SO Richtung Bulbus. Der IO zieht vom Os lacrimale zum dorsolateralen Bulbusquadranten. Durch die Fissura orbitalis superior treten neben dem N. ophthalmicus auch der N. oculomotorius (NIII), N. trochlearis (NIV) und N. abducens (NVI). Der N. opticus (NII) tritt durch den Canalis opticus des Keilbeins in die Orbita ein. Mit freundlicher Genehmigung von Patrick Lynch, Bild modifiziert nach Patrick Lynch, Yale University School of Medicine.

1.5.1 Motorische Innervation

Die motorische Innervation der EOM erfolgt über den N. oculomotorius, N. trochlearis und N. abducens (Abbildung 5). Die somatoefferenten Fasern des N. oculomotorius innervieren alle äußeren Augenmuskeln, ausgenommen des M. obliquus superior und des M. rectus lateralis. Der N. abducens führt die motorischen Fasern des M. rectus lateralis, der N. trochlearis die des M. obliquus superior.

Allen gemein ist der Durchtritt durch die Fissura orbitalis superior. Mit Ausnahme des N. trochlearis verlaufen alle durch den Anulus tendineus communis (Miller et al., 2005). Der Eintritt des N. trochlearis erfolgt über die orbitale Schicht des Muskels, während die restlichen Nerven über die globale Schicht in die jeweiligen Muskeln eintreten (Spencer and Porter, 1988).

Die motorischen Nervenendigungen lassen sich in zwei Typen einteilen: en plaque- und en grappe-Endigungen. Der Durchmesser der Nervenfasern, die als en plaque-Terminals an den Muskelfasern ansetzen liegt bei etwa 7-11 μm , während die Nervenfasern der en grappe-Endigungen mit nur 3-5 μm einen weitaus geringeren Durchmesser besitzen (Jacoby et al., 1989).

Eine Besonderheit bilden sogenannte Spiralendigungen (Abbildung 6) (Daniel, 1946; Sas and Appeltauer, 1963). Diese verlaufen in mehreren Windungen um einzelne Muskelfasern und terminieren dann mittels feiner fingerförmiger Varikositäten, die Muskelendplatten ähneln, an der Muskelfaser (Daniel, 1946).

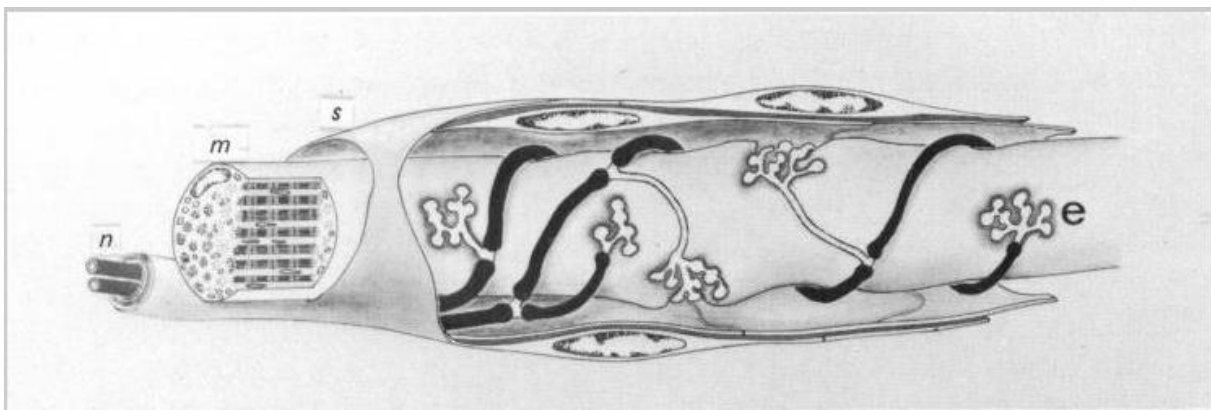


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Spiralendigung. Die Nervenendigung (n) windet sich mehrmals um eine Muskelfaser (m) und bildet feine Terminalen aus (Ruskell, 1984). Mit freundlicher Genehmigung von Wiley Global Permissions aus „Journal of Anatomy“.

1.5.2 Autonome Innervation

Insbesondere im Bereich der Blutgefäße finden sich sympathische Fasern, die sich zum Ganglion zervikale superior zurückverfolgen lassen (Hines, 1931; Fukuda, 1958). Die sympathischen Nervenfasern treten zusammen mit den Trigeminafasern bzw. als Plexus, die A. ophthalmica umschlingend, in die Orbita ein (Thakker et al., 2008).

1.5.3 Sensible Innervation

Die sensible Innervation der EOM ist bis heute nicht ausreichend geklärt. In Tracer-Studien konnte gezeigt werden, dass die Injektion eines Tracers in ausgewählte extraokuläre Muskeln zu einer retrograden Markierung von sensiblen Neuronen im Ganglion trigeminale sowie von Nervenendigungen im Nucleus spinalis nervi trigemini führt (Porter, 1986). Der N. ophthalmicus tritt

als erster Ast des N. trigeminus zusammen mit dem N. oculomotorius durch die Fissura orbitalis superior in die Orbita ein, wo er sich dann weiter in den N. frontalis, N. nasociliaris und N. lacrimalis aufteilt, und über Abzweigungen die jeweiligen nahe gelegenen Augenmuskeln innerviert werden (Miller et al., 2005). Neben Neuronen der Schmerzfasern wurden die Zellkörper propriozeptiver Afferenzen der äußeren Augenmuskulatur im Trigeminusganglion vermutet (Billig et al., 1997; Lienbacher, 2012). Allerdings treten propriozeptive Organe in unterschiedlich starker Ausprägung bei verschiedenen Spezies auf. Grundsätzlich lassen sich zwei Propriozeptoren in der EOM finden: Muskelspindeln und Golgi-Sehnenorgane (Büttner-Ennever et al., 2006). Palisadenendigungen liefern möglicherweise ebenfalls propriozeptive Informationen von der EOM zum Gehirn (Büttner-Ennever et al., 2006).

1.5.3.1 Muskelspindeln

Das Vorkommen von Muskelspindeln (MS) in den äußeren Augenmuskeln ist in verschiedenen Tierspezies sehr variabel ausgeprägt. Während Muskelspindeln in einigen Spezies völlig fehlen (z.B. in Ratten, Hunden, Katzen und den meisten Affenarten), findet man sie in anderen Spezies (z.B. in Schweinen, Schafen, Mäusen, Rindern und in wenigen Affenarten) in verschieden starker Ausprägung (Cilimbaris, 1910; Mahran and Sakla, 1965; Greene and Jampel, 1966; Maier et al., 1974; Lukas et al., 1994; Blumer et al., 2003). Wenn vorhanden, sind sie nur in der orbitalen Schicht und in der Übergangszone zwischen orbitaler und globaler Schicht zu finden, nicht aber in der globalen Schicht selbst (Cilimbaris, 1910; Lukas et al., 1994; Blumer et al., 1999; Ruskell, 1999). Im Menschen ist eine relativ hohe Anzahl gut entwickelter Muskelspindeln in der EOM vorhanden, wobei es auch innerhalb der verschiedenen Augenmuskeln zu deutlichen Unterschieden in der Anzahl der Muskelspindeln kommt (Cilimbaris, 1910; Lukas et al., 1994). So findet sich eine hohe Anzahl im IR und SO mit im Mittel 34 bzw. 27 Muskelspindeln und die geringste Anzahl von Muskelspindeln im IO mit im Mittel 4 Stück. Der MR (19 MS), LR (19 MS) und SR (16 MS) liegen im Mittelfeld. Bis auf wenige Ausnahmen sind die Muskelspindeln der äußeren Augenmuskulatur im Vergleich zu denen der Skelettmuskulatur recht schwach entwickelt und zeigen diesen gegenüber einige Anomalien (Ruskell, 1989; Blumer et al., 1999; Bruenech and Ruskell, 2000). In den Muskelspindeln der skelettalen Muskulatur befinden sich beispielsweise in der Bindegewebskapsel als intrafusale Fasern sowohl Kernsack- als auch Kernkettenfasern, dagegen finden sich in der EOM Muskelspindeln, die eine geringere Anzahl an intrafusalen Fasern und dabei nur Fasern vom Kernkettentypus beinhalten (Übersicht: Gandevia and Burke, 2004). Außerdem zeigen sich Muskelfasern, die durch die Bindegewebskapsel hindurchlaufen, allerdings nicht innerviert werden. Durch diese Variationsbreite ist fraglich, ob die Muskelspindeln der EOM in gleichem Ausmaß an der Propriozeption beteiligt sind wie die Muskelspindeln der Skelettmuskulatur (Donaldson, 2000; Büttner-Ennever, 2006).

1.5.3.2 Golgi-Sehnenorgane

In einigen Paarhufern, in der Ratte, sowie in einer Affenspezies konnten Golgi-Sehnenorgane an Non-twitch-Muskelfasern der äußeren Schicht gezeigt werden (Zelena and Soukup, 1977; Ruskell, 1979, 1990, 1999; Blumer et al., 2000). Dabei weisen sie einige Unterschiede zu den Golgi-Sehnenorganen

der Skelettmuskulatur auf. Interessant ist dabei vor allem die embryologische Entwicklung dieser Propriozeptoren. Zelená und Soukup konnten zeigen, dass die unreifen Golgi-Sehnenorgane in der Augenmuskulatur von Ratten Palisadenendigungen ähneln. So inseriert in einer recht frühen Phase eine Nervenendigung am Muskelsehnenübergang der MIFs, die sich dann im weiteren Verlauf zu einem Golgi-Sehnenorgan weiterentwickelt (Abbildung 7). In den menschlichen Augenmuskeln konnten Golgi-Sehnenorgane nicht nachgewiesen werden (Zelena and Soukup, 1977; Ruskell, 1989; Eberhorn et al., 2005c).

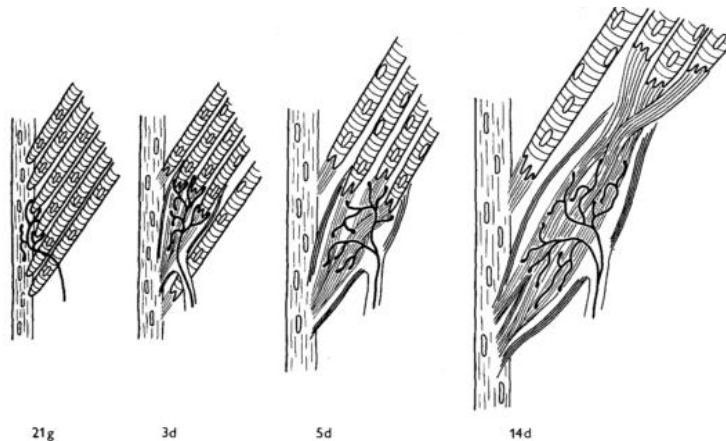


Abbildung 7: Entwicklung von Golgi-Sehnenorganen in der Ratte zwischen dem 21. Schwangerschaftstag (21g) und dem 14. Lebenstag (14d); Bild aus (Zelena and Soukup, 1977). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Verlag aus „Journal of Neurocytology“.

1.5.3.3 Palisadenendigungen

Ein weiterer Typ von Nervenspezialisierungen konnte in der äußeren Augenmuskulatur nachgewiesen werden, der möglicherweise eine propriozeptive Funktion hat. Aufgrund ihrer Anatomie werden diese als Palisadenendigungen (PEs) bezeichnet (Dogiel, 1906).

Es handelt sich dabei um Nervenendigungen, die vom zentralen Nerveneintrittsbereich nach distal ziehen, dort umschlagen und sich als Kappe an die Enden von Muskelfasern setzten (Abbildung 8) (Dogiel, 1906). Dabei inserieren sie nicht nur an den Muskelfasern selbst, sondern auch an den umgebenden Kollagenfasern der Sehne (Lukas et al., 2000). Zusammen mit einer umgebenden Kapsel aus Fibrozyten werden die PEs auch als myotendinöse Zylinder bezeichnet (Ruskell, 1978). Im Menschen wird dabei an den PEs eine Basalmembran ausgebildet (Lukas et al., 2000). Im Gegensatz zu den Muskelspindeln befinden sich die Palisadenendigungen in der globalen Schicht und sind dabei in der Regel an MIFs zu finden (Chiarandini and Stefani, 1979; Ruskell, 1999). Allerdings zeigten kürzliche Beobachtungen beim Menschen, dass manche PEs auch an Muskelfasern mit Markern für Twitch-Fasern sitzen (Laessing, 2013).

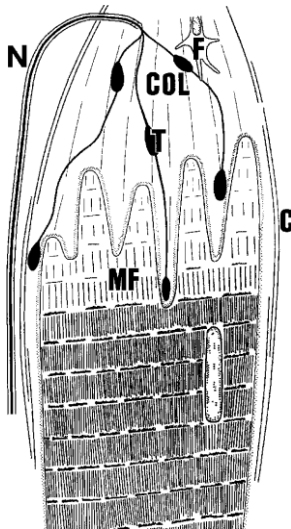


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines myotendinösen Zylinders: Die Palisadenendigung (N) zieht nach dem Umschlag an den Muskelsehnenübergang und setzt mit ihren Terminalen (T) an Kollagenfasern (COL) und der Muskelfaser (MF) an. Zusammen mit der Kapsel (C) und Fibrozyten (F) bildet die Endigung einen myotendinösen Zylinder. Bild aus (Lukas et al., 2000). Mit freundlicher Genehmigung von „Association for Research in Vision and Ophthalmology“.

Palisadenendigungen finden sich in der Regel am distalen Muskelsehnenübergang, konnten im Menschen und in der Katze allerdings auch am proximalen Übergang gezeigt werden (Cooper and Daniel, 1949; Alvarado-Mallart and Pincon-Raymond, 1979).

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass die EOM aller Säuger PEs besitzen. Allerdings zeigte eine kürzlich publizierte systematische Studie, dass gut ausgebildete PEs nur in Spezies auftreten, deren Augen frontal angeordnet sind, wie Katze, Frettchen, Hund, Affe, sowie im Menschen. Dahingegen weisen Tiere mit lateral ständigen Augen entweder keine oder nur wenige sehr einfache PEs auf (z.B. Ratte) (Blumer et al., 2016).

Die Funktion der Palisadenendigungen ist nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird dabei eine sensorische, motorische oder auch kombinierte sensomotorische Funktion (Übersicht: Büttner-Ennever et al., 2006).

Für eine sensorische Funktion der Palisadenendigungen spricht die Lage der Endigungen am Muskelsehnenübergang der globalen Schicht, die nicht an den Pulleys, sondern direkt an der Sklera ansetzt (Abbildung 3) (Donaldson, 2000). Es findet sich außerdem nicht in allen Spezies eine Basalmembran. Dies trifft auf Schaf, Katze und den Rhesus-Affen zu (Ruskell, 1978; Alvarado-Mallart and Pincon-Raymond, 1979; Blumer et al., 1998). Das Fehlen einer Basalmembran im synaptischen Spalt kennzeichnet die sensorischen Terminalen der intrafusalen Muskelfasern von Muskelspindeln (Adal, 1969; Mayr, 1970; Blumer et al., 2001). Wie bereits erwähnt weisen die Palisadenendigungen Ähnlichkeit zu noch nicht vollständig entwickelten Golgi-Sehnenorganen auf (Zelena and Soukup, 1977).

Tracerversuche an Wirbeltieren erbrachten zunächst widersprüchliche Befunde für die Quelle der Palisadenendigungen. Bei einer sensorischen Funktion dieser, würde man die Zellkörper im Trigeminalganglion vermuten, bei einer motorischen Funktion eher im Bereich der Augenmuskelkerne im Hirnstamm. Nach Tracerinjektion in den Muskelsehnenübergang der EOM im Affen werden retrograd Zellkörper im Trigeminalganglion markiert (Porter et al., 1983; Fackelmann et al., 2008), womit die anterograde Anfärbung von PEs nach Tracerinjektion in das Trigeminalganglion in der Katze erklärt wurde (Billig et al., 1997). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass eine Injektion in den distalen Teil der Augenmuskeln zu einer retrograden Tracermarkierung von Neuronen im peripheren Bereich der Augenmuskelkerne führt; die

angefärbten Neurone hatten dabei einen kleineren Durchmesser als die Motorneurone, die sich nach einer zentralen Injektion in den Muskel darstellen ließen (Büttner-Ennever et al., 2001). Erneut durchgeführte Tracerversuche mit Injektion in den Okulomotorius- und Abduzenskern im Affen führten zur anterograden Markierung von PEs in der EOM (Lienbacher et al., 2011b; Zimmermann et al., 2011). Diese kombinierten Befunde bilden die Grundlage für die aktuelle Annahme, dass die Zellkörper der PEs in der Peripherie der Augenmuskelkerne liegen, gemeinsam mit den Zellkörpern der Motoneurone der MIFs (Büttner-Ennever et al., 2001).

Bei der Verwendung von immunhistochemischen Markern konnte gezeigt werden, dass sich alle PEs mit cholinergen Markern anfärben lassen (Konakci et al., 2005; Blumer et al., 2009; Lienbacher et al., 2011a; Zimmermann et al., 2013). Eine Bindung von Alpha-Bungarotoxin an der postsynaptischen Membran von PEs – als Nachweis von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren – zeigte Unterschiede in den verschiedenen Spezies (Blumer et al., 2016). Insbesondere in Spezies mit lateral ständigen Augen fand sich bei allerdings nur 10% der Endigungen eine Bindung von Alpha-Bungarotoxin an der postsynaptischen Seite von PEs, die direkt an der Muskelfaser ansetzen (Konakci et al., 2005; Blumer et al., 2009; Blumer et al., 2016).

Der Nachweis von angefärbten Neuronen im peripheren Bereich der Augenmuskelkerne nach Injektion eines Tracers in den distalen bzw. intermediären Bereich der EOM (Büttner-Ennever et al., 2001) führt zu einer weiteren Frage: Wie verhalten sich en grappe-Endigungen und Palisadenendigungen zueinander? Dazu sind zwei Hypothesen aufgestellt worden.

In der ersten Hypothese wird vermutet, dass die Palisadenendigungen als distale Ausläufer der en grappe-Endigungen an den Muskelsehnenübergängen der MIFs ansetzen – ausgehend von einem gemeinsamen Zellkörper (Abbildung 9A). In der zweiten Hypothese (Abbildung 9B) wird angenommen, dass die PEs und en grappe-Endigungen von zwei verschiedenen Neuronengruppen in der Peripherie der Augenmuskelkerne stammen (Büttner-Ennever et al., 2002; Lienbacher and Horn, 2012). Dabei würden die MIF als große „invertierte Muskelspindel“ funktionieren, wobei die PE die sensorische Komponente widerspiegelt, die en grappe-Endigung würde einem γ -Motoneuron entsprechen, die en plaque-Endigung an den SIFs den Endigungen der α -Motoneuronen (Lienbacher and Horn, 2012).

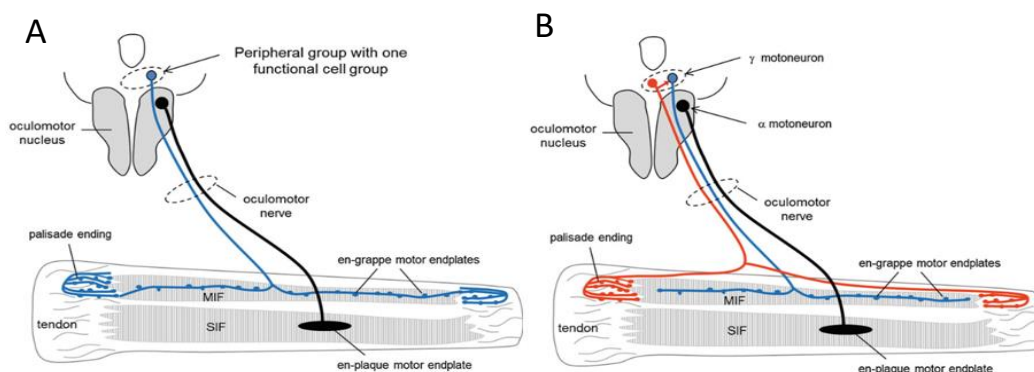


Abbildung 9A: Hypothese 1: Palisadenendigungen, die das distale Ende der en grappe-Endigungen darstellen.
 Abbildung 9B: Hypothese 2: Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen sind Axone verschiedener Zellpopulationen und funktionieren zusammen mit den en plaque-Endigungen als "invertierte Muskelspindel"; Bild aus (Lienbacher and Horn, 2012). Mit freundlicher Genehmigung von Biological Cybernetics, Springer Verlag.

1.6 Augenmuskelkerne

Die EOM wird über die drei Hirnnerven, N. oculomotorius (NIII), N. trochlearis (NIV) und N. abducens (NVI) innerviert, die von den gleichnamigen Hirnnervenkernen ihren Ausgang nehmen (Abbildung 10). Im Ncl. oculomotorius (nIII) liegen die Motoneurone des MR, IR, SR und IO topographisch organisiert. Die Motoneurone des SO liegen im Ncl. trochlearis (nIV), die des LR im Ncl. abducens (nVI) (Abbildung 10).

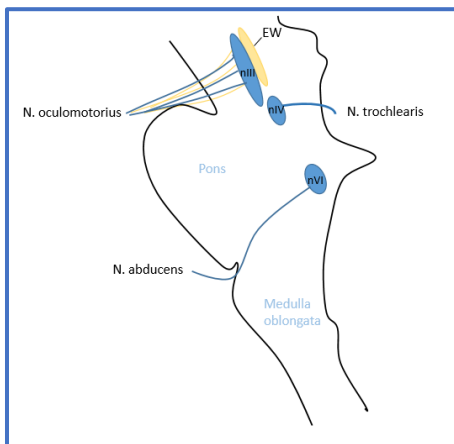


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Hirnstamms und der Lage der Augenmuskelkerne; im Mittelhirn liegt kaudal des Ncl. oculomotorius (nIII) und Edinger-Westphal-Kerns (EW) der Ncl. trochlearis (nIV); der Ncl. abducens (nVI) befindet sich im Bereich des Pons. Darstellung angelehnt an Abbildung aus (Trepel, 2012).

Der Nucleus oculomotorius liegt paarig im Mittelhirn unterhalb des Aquaeductus mesencephali im Tegmentum und wird ventrolateral vom Fasciculus longitudinalis medialis eingefasst (Miller et al., 2005). Der Okulomotoriuskern kann dabei in Subnuklei unterteilt werden (Abbildung 11) (Zeeh and Horn, 2012).

Am kaudalen Ende des Ncl. oculomotorius liegt der unpaare Nucleus centralis caudalis (CCN), der die Motorneurone des M. levator palpebrae beider Augen enthält (Büttner-Ennever and Horn, 2014). Der Nucleus Perlia (NP), liegt unpaar im rostralen Bereich in der Mittellinie zwischen den Okulomotoriuskernen. Die Funktion dieses Kerns ist noch nicht geklärt, Untersuchungen weisen auf eine mögliche Funktion bei Blickbewegungen nach oben hin (Zeeh et al., 2013).

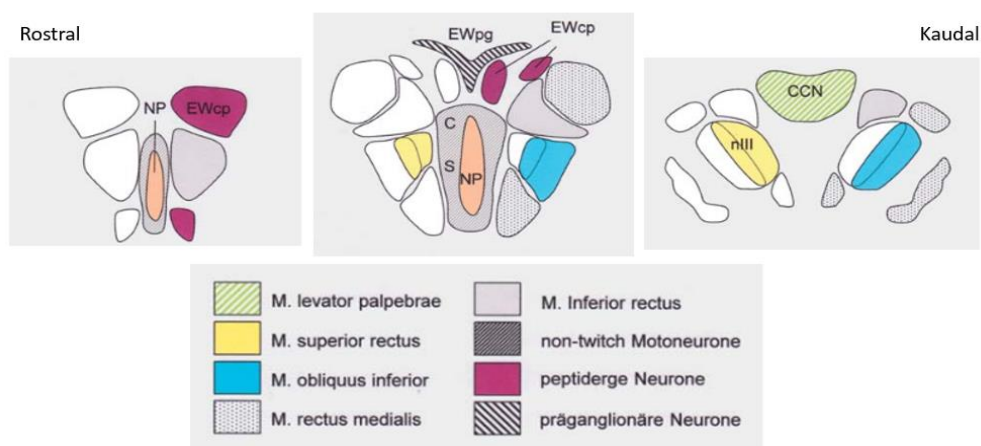


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ncl. oculomotorius mit Einteilung in die verschiedenen Neuronengruppen von rostral nach kaudal. Bild modifiziert aus (Zeeh and Horn, 2012). Mit freundlicher Genehmigung von Thieme Publishing Group, Stuttgart.

Mit retrograden Trakt-Tracer-Injektionen in verschiedene Bereiche der EOM (Muskelbauch oder Muskelsehnenübergang) konnte Büttner-Ennever im Affen zeigen, dass die Motoneurone der SIFs und MIFs räumlich getrennt voneinander liegen. Eine Tracerinjektion in den Muskelbauch, in dem die en plaque-Endigungen der SIFs lokalisiert sind führt durch den retrograden Transport der markierten Tracer im vitalen Gewebe zu einer retrograden Anfärbung der großen Motoneurone innerhalb des klassischen Augenmuskelkerns. Eine Tracerinjektion in den distalen Muskelbereich, einschließlich des Muskelsehnenübergangs erfasst dagegen eher die en grappe-Endigungen, aber auch die Palisadenendigungen, und führt retrograd zur Markierung von Neuronen mit kleinerem Durchmesser in der Peripherie des jeweiligen Augenmuskelkerns. (Büttner-Ennever et al., 2001)

Die C-Gruppe liegt dorsomedial außerhalb des Okulomotoriuskerns und enthält die Neurone der MIFs von MR und IR (Büttner-Ennever et al., 2001; Tang et al., 2015). Entlang der Mittellinie des Okulomotoriuskerns findet sich die S-Gruppe, sie enthält die Non-twitch-Motoneurone des SR und IO (Büttner-Ennever et al., 2001). Anhand der Lage und immunhistochemischen Eigenschaften konnten die Motoneuronengruppen auch im Menschen identifiziert werden, allerdings konnte keine kompakte C- und S-Gruppe gefunden werden. Die Motoneurone lagen verstreut im Bereich zwischen den beiden Augenmuskelkernen (Ardeleanu, 2007; Horn et al., 2008; Che Ngwa et al., 2014).

Rostrodorsal des Okulomotoriuskerns liegt der Edinger-Westphal-Kern (EW) (Abbildung 12), der sich durch etwas kleinere Neurone von den Motoneuronen unterscheiden lässt (Büttner-Ennever and Horn, 2014). Dabei müssen in allen Spezies zwei funktionelle Gruppen voneinander unterschieden werden: Zum einen nicht präganglionäre, peptiderge Neurone, die Urocortin enthalten. Die Projektionen dieser Neurone ziehen in Regionen des Gehirns die an Essverhalten, Alkoholkonsum, sowie an Stressbewältigung beteiligt sind und werden deshalb als EW_{cp} (central projecting) bezeichnet. Zum anderen cholinerge präganglionäre Neurone (EW_{PG}), die zum Ganglion ciliare projizieren, von wo aus der M. sphincter pupillae und der M. ciliaris innerviert werden (Horn et al., 2008; Kozicz et al., 2011; Zeeh and Horn, 2012).

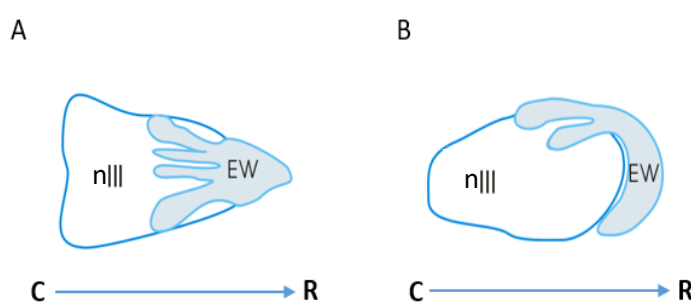


Abbildung 12: Schematische Übersichtsdarstellung des Ncl. oculomotorius (nIII) und dem ihm rostral und dorsal aufliegendem Edinger-Westphal-Kern (EW). Aufsicht von kranial (A) und lateral (B) mit Ausrichtung von kaudal (C) nach rostral (R). Abbildung modifiziert nach (Büttner-Ennever and Horn, 2013).

1.7 Propriozeption

Der Begriff „Propriozeption“ beschreibt die Wahrnehmung der eigenen Körperposition im Raum (Sherrington, 1906). Im Bereich der Skelettmuskulatur werden die propriozeptiven Funktionen durch Muskelspindeln und Golgi-Sehnenorgane ausgeführt, die auf Kontraktion und Spannung der

Muskulatur, sowie generell auf Änderungen der Muskelposition reagieren und innerhalb der verschiedenen Spezies sehr konstant vorhanden sind (Lienbacher and Horn, 2012).

Wie bereits erwähnt sind Muskelspindeln und Golgi-Sehnenorgane in der EOM der verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich ausgeprägt, während Palisadenendigungen in den meisten bisher untersuchten Spezies gefunden werden konnten. Nicht in allen Spezies zeigt sich ein Streckreflex der EOM (Keller and Robinson, 1971). Allerdings konnte ein Streckreflex auch in einigen Spezies gezeigt werden, bei keinem oder nur geringem Nachweis von Muskelspindeln oder Golgi-Sehnenorganen (Dancause et al., 2007; Wang et al., 2007; Balslev and Miall, 2008).

Während die Funktion der Propriozeptoren in der Skelettmuskulatur bekannt und allgemein anerkannt ist, führt die Propriozeption der extraokulären Muskulatur immer noch zu Diskussionen, da das Auge zusätzlich visuelle Informationen zur Bestimmung seiner Lage nutzen kann.

Da sich aber Augen und die abgebildete Umgebung unabhängig voneinander bewegen ist eine extraretinale Information der Augenposition nötig (Weir, 2006). Zwei Hypothesen versuchen die Rolle der extraretinalen Informationen an der Kontrolle der Augenposition zu erklären. Als „inflow-Theorie“ wird die Erfassung der Augenlage in der Orbita anhand der Messung der Muskelspannung bzw. –kontraktion mittels Propriozeptoren analog zur Skelettmuskulatur bezeichnet (Sherrington, 1906). Die „outflow-Theorie“ besagt, dass es zu keinem Eingang afferenter Informationen kommt und die Position der Augen allein durch eine zentrale Überwachung der efferenten Signale bestimmt wird (Helmholtz, 1867). Hier kommen die extraretinalen Informationen durch eine sogenannte „Efferenzkopie“ zustande (Von Holst, 1954). Im Bereich des Auges ist die Propriozeption eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung des binokularen Sehens und somit der Orientierung im Raum und der Tiefendiskrimination (Fiorentini et al., 1982; Graves et al., 1987; Buisseret, 1995). Dabei scheint je nach Art der Augenbewegung ein Zusammenspiel der verschiedenen Informationsgewinnungsarten eine Rolle zu spielen, wobei diese in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt sind (Horn and Leigh, 2011).

Bei einer Fehlfunktion der Propriozeption der äußeren Augenmuskulatur erhalten die propriozeptiven Organe, insbesondere die Palisadenendigungen eine erhebliche klinische Relevanz. Das Wissen um die Lokalisation der Zellkerne und der unterschiedlichen Morphologie und Calretinin-Expressionsmuster der PEs, sowie anderer Nervenendigungen in den verschiedenen äußeren Augenmuskeln im gesunden Menschen sind dabei Grundlage für eine methodische Vergleichsmöglichkeit mit Präparaten von an kongenitalem Strabismus erkrankten Patienten.

2. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der Befunde am Rhesusaffen, dass Palisadenendigungen im MR und IR das calcium-bindende Protein Calretinin exprimieren und somit andere histochemische Eigenschaften aufweisen als die Motoneurone (Lienbacher, 2012) sollen beim Menschen Calretinin-Immunfärbungen in allen äußeren Augenmuskeln und im Ncl. oculomotorius durchgeführt werden. Dabei liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Beantwortung folgender Fragen:

1. Lassen sich in den extraokulären Muskeln Palisadenendigungen auf Calretinin anfärben?
2. Welche Unterschiede finden sich in den Palisadenendigungen der einzelnen äußeren Augenmuskeln in Bezug auf die Calretinin-Expression?
3. Wie ist die Calretinin-Expression der gesamten Nervenendigungen in den unterschiedlichen äußeren Augenmuskeln?
4. Können im Bereich des Okulomotoriuskerns im Hirnstamm Calretinin-exprimierende Zellen gefunden werden?

Zur Untersuchung dieser Fragen werden immunhistochemische Färbemethoden verwendet.

3. Material und Methoden

3.1 Augenmuskeln

3.1.1. Präparate

Die verwendeten Augenmuskeln stammen von Körperspenden an das Anatomische Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München zum Zwecke der Forschung und Lehre. Die Augen samt Augenmuskulatur wurden 24 bis 48 Stunden post mortem entnommen. Bei allen Spendern wurden keine Augenbewegungsstörungen zu Lebzeiten beschrieben. Das Alter lag zwischen 60 und 98 Jahren (Tabelle 2).

Fall	Alter	Geschlecht	Fixierung	Seite	Untersuchte Muskeln
Fall A1	88 Jahre	w	4% PFA	rechts	SR, IO
Fall A2	91 Jahre	w	4% PFA	links	MR, LR
Fall A3	90 Jahre	w	4% PFA	links	MR, LR
Fall A4	80 Jahre	w	4% PFA	rechts	MR, LR, SO
Fall A5	84 Jahre	m	4% PFA	links	MR, LR
Fall A6	63 Jahre	m	4% PFA	rechts	MR, LR, SR
Fall A7	98 Jahre	m	4% PFA	rechts	MR, LR
Fall A8	92 Jahre	w	4% PFA	rechts	IR
Fall A9	96 Jahre	m	4% PFA	rechts	LR
Fall A10	78 Jahre	m	100% Methanol	rechts	MR, LR, IR, SR, SO, IO
Fall A10	78 Jahre	m	4% PFA	links	MR, LR, IR, SR, SO, IO
Fall A11	86 Jahre	w	4% PFA	rechts	LR
Fall A12	88 Jahre	w	4% PFA	beide	MR, SR, IO
Fall A13	60 Jahre	m	100% Methanol	rechts	MR, LR, IR, SR, SO, IO
Fall A13	60 Jahre	m	4% PFA	links	MR, LR, IR, SR, SO, IO
Fall A14	71 Jahre	m	direkt in Sucrose 10%	rechts	LR
Fall A15	86 Jahre	m	100% Methanol	rechts	MR, LR, SO
Fall A16	16 Monate	m	100% Methanol	rechts	LR

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Augenmuskeln.

3.1.2 Präparation der Augenmuskeln

Das Auge wurde mitsamt anhängenden Muskeln, Fett- und Bindegewebe aus der Orbita entnommen. Es wurde dabei besonders auf den Erhalt der Muskelsehnenübergänge geachtet. Bei diesem Schritt wird der SO in der Regel kurz hinter der Trochlea durchtrennt, da die Trochlea, an der Orbita befestigt, schwer zu entfernen ist. Der Übergang des SO in seine Sehne erfolgt bereits vor der Trochlea, sodass nur noch die Sehne durch die Trochlea zieht und der Muskelsehnenübergang des SO trotz Durchtrennung vollständig erhalten bleibt. Der gesamte Orbitainhalt wird nun von Fett- und Bindegewebe befreit um die EOM freizulegen. Es wurde dabei auf die Darstellung der EOM, sowie der Nervenfasern geachtet (Abbildung 13 und Abbildung 14). Die Muskeln wurden anschließend sukzessive vom Bulbus abgetrennt.

Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der kompletten Entfernung der Sehne vom Bulbus und dem unversehrten Erhalt der Muskelsehnenübergänge. Zuvor wurden noch die Abstände der einzelnen Muskelenden zum Sehnenansatz am Bulbus abgemessen.

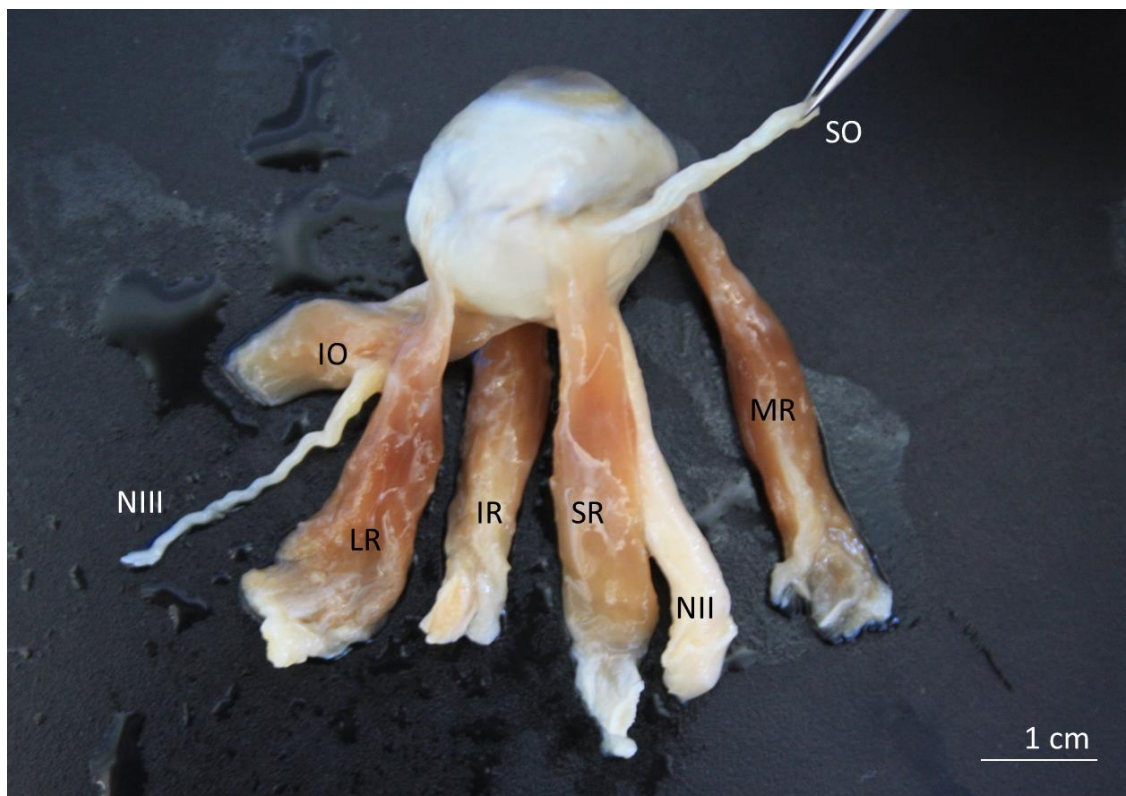


Abbildung 13: Ansicht des linken Auges (Fall A10) von kranial. Dargestellt ist der M. obliquus inferior (IO), M. rectus lateralis (LR), M. rectus inferior (IR), M. rectus superior (SR), M. rectus medialis (MR), sowie die Sehne des M. obliquus superior (SO). Im Bild sind außerdem ein Ast des N. oculomotorius (NIII) und der N. opticus (NII) zu sehen.



Abbildung 14: Abbildung des linken Auges (Fall A10) von kaudal. Zu sehen sind der M. rectus inferior (IR), M. rectus medialis (MR) und M. obliquus inferior (IO) mit inserierendem N. oculomotorius (NIII). Außerdem sind der M. rectus superior (SR), M. rectus lateralis (LR) und der N. opticus (NII) abgebildet.

Die einzelnen Augenmuskeln wurden nun in Methanol oder in 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Um die Zellen vor Gefrierschäden durch die Ausbildung von Eiskristallen während des Schneidens am Kryostat zu schützen wurden die Muskeln in aufsteigender Sucroslösung (10%, 20%, 30% in 0,1 M PBS (pH7,4) bei 4°C) inkubiert. Direkt vor dem Schneidevorgang wurden die Muskeln in Isopentan schockgefroren. Dazu wurde Isopentan in einer Küvette, die in Trockeneis eingebettet war, auf -80°C heruntergekühlt. Die Muskeln wurden in das Kryo-Einbettmedium „tissue tek O.C.T. Compound“ (Sakura Finetek, USA) auf der Probenhalterung eingebettet und in das tiefgekühlte Isopentan eingebracht und so in kürzester Zeit eingefroren. Bei langsamerem Kühlen würden sich zu Beginn des Gefriervorganges Eiskristalle, durch das im Gewebe enthaltene Wasser, bilden und so die Muskelzellen schädigen.

Bei der Einbettung in „tissue tek“ wurde darauf geachtet, dass die Muskeln der Länge nach mit der globalen Schicht nach unten auf dem Gelbett ausgebreitet wurden.

In „tissue tek“ eingebettet, wurden die Muskeln am Kryostat, beginnend von der orbitalen Schicht in 20 µm dicke Flachschnitte geschnitten. Diese wurden direkt auf „Superfrost-plus“-Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.1.3 Auswahl der Schnitte mittels Trichromfärbung nach van Gieson

Um die Schnitte zu identifizieren, die einen Muskelsehnenübergang enthalten, wurde jeder 10. Schnitt mit einer van Gieson-Färbung angefärbt. Dazu wurden die Schnitte nach kurzem Waschen in Aqua dest. mit Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach Abtrocknen der Schnitte mit Filterpapier wurde sofort die Pikrofuchsinlösung aufgetropft und für eine Minute auf den Schnitten belassen. Die Färbelösung wurde abgeschleudert und dann sofort in 96%igen und darauf in 100%igen Alkohol gespült und entwässert. Abschließend wurden die Objektträger in Xylol gegeben und mit DPX (Distyrene plasticizer and xylene, Fertiglösung zum Eindecken von histologischen Präparaten, Sigma Life Science, USA) eingedeckt.

Das Eisenhämatoxylin färbt die Zellkerne dunkel. Die Pikrofuchsinlösung besteht aus zwei Farbstoffen. Die Pikrinsäure dringt gut in das Muskelgewebe ein und stellt dies bräunlich dar. Das Säurefuchsin bindet in der kurzen Einwirkzeit nur an die grobstrukturierten Kollagenfasern und färbt diese rot. In dieser Färbung konnten die Muskelfasern gut von den intensiv rot angefärbten Sehnenfasern unterschieden werden, und dementsprechend die Schnitte mit einem Muskelsehnenübergang bestimmt werden. In regelmäßigen Abständen wurden aus diesem Bereich Schnitte ausgewählt und immunhistochemisch angefärbt (Färbeprotokolle im Anhang).

3.1.4 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen dienen der Darstellung nachzuweisender chemischer Strukturen mit Hilfe von Antikörpern (AK). Die Antikörper binden dabei an Epitope (charakteristische Aminosäuregruppen oder Oligosaccharidketten) der zu bestimmenden Struktur. Die Antikörper können dabei polyklonal oder monoklonal sein. Vorteil der polyklonalen Antikörper ist das einfachere und damit günstigere Herstellungsverfahren. Wird ein bestimmtes Epitop des Antigens beim Verarbeitungsprozess zerstört können im Gegensatz zu monoklonalen AK immer noch AK an andere Epitope des gesuchten Antigens binden. Vorteile monoklonaler Antikörper sind das geringere Auftreten von Kreuzreaktionen, die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die gleichbleibende Qualität (Lang, 2013). In dieser Arbeit wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Um die gebundenen Antikörper zu detektieren werden diese direkt mit einem Marker versehen oder in einer Mehrschritt-Methode selbst von einem markierten Antikörper gebunden. Als Marker können dabei zum Beispiel Fluorochrome, Enzyme oder Biotin verwendet werden. Fluorochrome sind Farbstoffe, die nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge selbst sichtbares Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Sind Antikörper mit Enzymen markiert, werden durch die Enzyme zugesetzte Chromogene in stabile Farbstoffe umgesetzt, die ausgewertet werden können. Biotin ist Vitamin H, dies zeigt eine hohe Affinität zum Glykoprotein Avidin. Dabei kann Avidin wiederum mit einem Enzym oder Fluorochrom markiert sein und so sichtbar gemacht werden.

Bei dieser Arbeit wurden die Zwei-Schritt-Methode und die Avidin-Biotin-Methode gewählt, um durch die Signalverstärkung eine höhere Sensitivität zu erreichen.

Bei der Zwei-Schritt-Methode wurde nach Auftragen des unkonjugierten Primärantikörpers, der an das Epitop des gesuchten Proteins bindet, ein markierter sekundärer Antikörper aufgetragen. Der Sekundärantikörper wurde in einer anderen Spezies gezüchtet und ist auf das Fc-Segment des

Primärantikörpers gerichtet. Der markierte Sekundärantikörper ist in der Regel polyklonal und bindet so an mehrere Bindungsstellen des Fc-Segments und führt dadurch zu einer Signalverstärkung.

Bei der Avidin-Biotin-Methode bindet erst ein unkonjugierter Primärantikörper an das gesuchte Epitop. Ein Sekundärantikörper, der mit Biotin markiert ist wird danach aufgetragen. Anschließend wird Avidin hinzugegeben, das mit Peroxidase gekoppelt ist. Nach Inkubation und Entfernen des überschüssigen Avidins wird ein Chromogen und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aufgetragen. Hier wurde das Chromogen Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) verwendet. Das H_2O_2 wird durch die Peroxidase zu H_2O umgesetzt (Abbildung 15). Als Elektronendonator dient dabei das DAB. Das oxidierte DAB stellt sich nun als brauner Farbstoff dar. Wird bei der Reaktion noch Nickel (Ni) hinzugefügt, kommt es zu einer schwarzen Färbung.

Da Peroxidase auch im Gewebe selbst vorkommen kann, wird die endogene Peroxidase vor Auftragen der Antikörper mittels H_2O_2 blockiert (Lang, 2013).

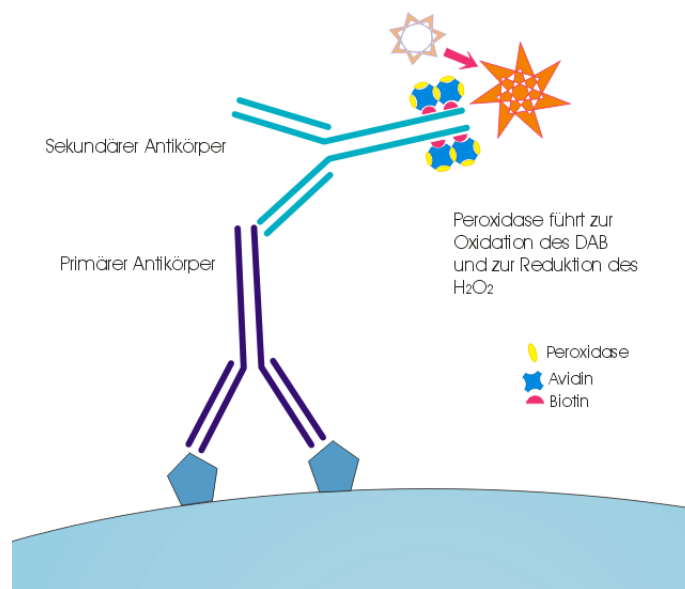


Abbildung 15: Schema der Biotin-Avidin-Methode; durch Oxidation des Chromogens DAB, wird dieses zu einem stabilen Farbstoff umgesetzt.

3.1.4.1 Verwendete primäre Antikörper

Zum gezielten Nachweis bestimmter Strukturen wurden verschiedene primäre Antikörper gegen das jeweils gesuchte Antigen verwendet.

3.1.4.1.1 Soluble NSF attachment protein 25 (SNAP-25)

SNAP-25 (soluble NSF attachment protein 25) ist Teil des SNARE-Komplexes, eines Membranfusionskomplexes (Heinrich, 2014). Beim Vesikeltransport binden Proteine der vesikulären Membran (v-SNARE) an Proteine der Zielmembran (t-SNARE), das SNAP-25-Protein ist dabei Teil des t-SNARE-Komplexes (McMahon and Sudhof, 1995; Heinrich, 2014). Dabei kommt das lipidverankerte

Protein nicht nur an den Synapsen und Vesikelwänden vor, sondern auch in der Axonwand (Garcia et al., 1995; Tao-Cheng et al., 2000). Daher können Nervenfaserverläufe mit Antikörpern gegen dieses Protein gut nachvollzogen werden. Dabei werden neben motorischen Nerven auch autonome und sensorische Nervenfasern angefärbt (Eberhorn et al., 2005b). Der verwendete SMI81-Antikörper bindet dabei an einem Epitop am N-terminalen Ende des SNAP-25-Proteins (Connell et al., 2009).

3.1.4.1.2 Calretinin (CR)

Calretinin ist ein calcium-bindendes Protein der EF-Hand-Familie (Celio et al., 1996). Dabei sind bei diesem Protein sechs EF-Hand-Bereiche (ein spezielles Aminosäuremotiv) vorhanden, an die Calcium gebunden werden kann (Schwaller, 2009). Calretinin findet sich sowohl im Zytosol als auch im Membranbereich bestimmter Zellen (Dechesne et al., 1991; Winsky and Kuznicki, 1995). Die Funktion von Calretinin ist nicht eindeutig geklärt. Calretinin scheint neben einer Calcium-Sensor-Funktion auch eine Calcium-Puffer-Funktion zu haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Zellen, die Calretinin exprimieren, widerstandsfähiger gegen eine Glutamat- und β -Amyloid-Toxizität sind (Review: Schwaller, 2009). Eine weitere mögliche Funktion von Calretinin besteht in der Modulation neuronaler Erregbarkeit (Schurmans et al., 1997). Calretinin-exprimierende Zellen wurden bereits in der Retina, in Körnerzellen des Kleinhirns, sowie im Hirnstamm im Bereich auditorischer Neurone nachgewiesen, außerdem konnte Calretinin in Zellen von Kolonadenokarzinomen und epithelialen Mesotheliomen gezeigt werden (Review: Camp and Wijesinghe, 2009). Im Bereich des Hirnstamms konnten Calretinin-exprimierende Zellen außerdem im rostralen interstitiellen Kern des medialen longitudinalen Fasciculus gefunden werden, die an der Kontrolle bzw. Generation von vertikalen Sakkaden beteiligt sind. Dabei hatten nur Neurone, die mit einer Blickrichtung nach oben verbunden sind, Calretinin-positive Eingänge (Horn et al., 2003; Adamczyk et al., 2015). Hinweise auf eine Zugehörigkeit zum sensiblen System zeigte Duc, der eine Calretinin-Expression in annulospiralen Endigungen der Muskelspindeln, sowie verschiedenen sensiblen Endigungen in der Haut nachweisen konnte (Duc et al., 1994). In Untersuchungen am Affen konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich Calretinin-positive Neurone im Randbereich des Ncl. Oculomotorius befinden (Lienbacher, 2012).

3.1.4.1.3 Slow Myosin Heavy Chain (SMHC)

Myosin ist Bestandteil der Myofibrillen in Muskelzellen. Es besteht aus zwei schweren und vier leichten Ketten, die in verschiedenen Isoformen vorliegen (Schiaffino and Reggiani, 1994; Speckmann, 2013). Insbesondere die schweren Ketten lassen sich zur Unterscheidung der verschiedenen Muskelfasertypen nutzen (Kjellgren et al., 2003). Kjellgren konnte zeigen, dass sich MIFs durch die spezifische Anfärbung mit Antikörpern, die gegen Slow Myosin Heavy Chain (SMHC) gerichtet sind, von den restlichen Muskelfasern unterscheiden lassen (Kjellgren et al., 2003).

3.1.4.1.4 Cholinacetyltransferase (ChAT)

Die Cholinacetyltransferase (ChAT) katalysiert als Enzym die Biosynthese von Acetylcholin in cholinergen Neuronen, zu denen auch die Motoneurone zählen (Heinrich, 2014). Es zeigt sehr präzise

cholinerge Neurone und Nervenfasern im zentralen und peripheren Nervensystem an (Oda, 1999). Im Bereich der Hirnnervenkerne der EOM werden daher sowohl die Neurone der SIFs, als auch der MIFs markiert (Eberhorn et al., 2005a). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Palisadenendigungen in verschiedenen Spezies, darunter auch im Menschen Cholinacetyltransferase exprimieren (Konakci et al., 2005; Blumer et al., 2009; Laessing, 2013).

3.1.4.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Um Calretinin-exprimierende Nervenendigungen, insbesondere PEs, unter allen Nervenendigungen zu identifizieren wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf Calretinin und SNAP-25 durchgeführt. Letzteres dient der Darstellung aller Nervenendigungen, sodass eine Differenzierung zwischen Calretinin-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Nervenendigungen getroffen werden konnte (Tabelle 3 und Tabelle 4). Außerdem wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf ChAT und Calretinin durchgeführt (Tabelle 5). Dies diente der selektiven Identifizierung motorischer Nervenendigungen, die auf eine zusätzliche Expression von Calretinin untersucht wurden.

Werden in einem Gewebeschnitt zwei Proteine immunhistochemisch angefärbt, liegt ein besonderes Augenmerk auf der Wahl der Antikörper um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Nach kurzem Waschen mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) wurden die Flachschnitte eine Stunde in 5% Normal Eselserum (verdünnt in 0,3% Triton in 0,1M TBS) präinkubiert. Die Verwendung eines Normalserums dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und damit einer Verminderung von Hintergrundfärbung. Dabei ist zu beachten, dass das Normalserum aus der gleichen Spezies wie der sekundäre konjugierte Antikörper stammt.

Anschließend wurden die Primärantikörper, die sich gegen SNAP-25 (SMI81 Maus monoclonal antibody to Synaptic Protein SNAP-25, Sternberger Monoclonals Incorporated, 1:2000) bzw. gegen ChAT (Ziege anti-Cholin Acetyltransferase, Chemicon, 1:50) richten und als zweiter Marker jeweils Calretinin (Kaninchen anti-Calretinin = SWant, 7699/4, 1:1000), auf die Schnitte aufgetragen und inkubiert (Tabelle im Anhang „Verwendete Antikörper“).

Nach der Inkubation wurden die Schnitte mit TBS gewaschen und daraufhin die mit Fluorochrom markierten Sekundärantikörper aufgetragen. Da die konjugierten Sekundärantikörper lichtempfindlich sind, wurden die Schnitte lichtgeschützt inkubiert.

Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte nochmals mit TBS und abschließend mit Aqua dest. gereinigt und zum Trocknen lichtgeschützt ausgelegt.

Die getrockneten Schnitte wurden in „Gel/Mount“ (Biomed, California, USA) eingedeckt und bis zur Auswertung bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

SNAP-25 & Calretinin	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (2h bei RT)
SNAP-25	5% Normal Eselserum	Maus anti-SMI81 (1:2000)	Alexa-Grün Esel anti-Maus (1:200)
Calretinin	5% Normal Eselserum	Kaninchen anti-CR (1:1000)	Cy3-Rot Esel anti-Kaninchen (1:200)

Tabelle 3: Übersicht der Doppelimmunfluoreszenzfärbung der Augenmuskulatur auf SNAP-25 und Calretinin (Version 1).

SNAP-25 & Calretinin	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (2h bei RT)
SNAP-25	5% Normal Eselserum	Maus anti-SMI81 (1:2000)	Cy3-Rot Esel anti-Maus (1:200)
Calretinin	5% Normal Eselserum	Kaninchen anti-CR (1:1000)	Alexa-Grün Esel anti-Kaninchen (1:200)

Tabelle 4: Alternativ wurde die Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25 und Calretinin mit veränderten sekundären Antikörpern durchgeführt (Version 2).

ChAT & Calretinin	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (2h bei RT)
ChAT	5% Normal Eselserum	Ziege anti-ChAT (1:50)	Cy3-Rot Esel anti-Ziege (1:200)
Calretinin	5% Normal Eselserum	Kaninchen anti-CR (1:1000)	Alexa-Grün Esel anti-Kaninchen (1:200)

Tabelle 5: Übersicht über die Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf ChAT und Calretinin.

3.1.4.3 Färbung mittels Avidin-Biotin-Methode

Die Färbung mittels Avidin-Biotin-Methode erlaubt eine Markierung zweier Antigene in Geweben, die im Hellfeld ausgewertet werden. Die Anfärbung kann mit Nickel kombiniert werden, sodass zwei verschiedene farbliche Darstellungen (mit Nickel schwarz, ohne Nickel bräunlich) möglich sind. Da es bei der Färbung von einzelnen Strukturen zu einer Überdeckung der Färbung kommen würde, können sinnvollerweise nur unterschiedliche Strukturen (hier Muskelfasern und Nervenfasern) angefärbt werden. In dieser Arbeit wurden Nervenfasern auf SNAP-25 angefärbt und Muskelfasern auf SMHC um eine Assoziation zueinander zu untersuchen.

Nach kurzem Waschen und Peroxidaseblockierung wurden die Schnitte in einem Normalserum für eine Stunde präinkubiert. Daraufhin wurde der primäre AK gegen SNAP-25 aufgetragen und für 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS wurde ein biotinierter Sekundärantikörper aufgetragen. Nach einer Stunde wurden die Schnitte mit TBS gereinigt und die Extravidin-Peroxidase (EAP) für eine weitere Stunde auf die Schnitte gegeben. Die freie EAP wurde mit TBS abgespült und daraufhin die Chromogenlösung DAB aufgetragen. Um die SNAP-25 markierten Strukturen intensiver darzustellen wurde Ammoniumnickelsulfat in 0,05M TBS aufgelöst. Die Nickellösung wurde filtriert und die 1% DAB-Stocklösung hinzugegeben. Kurz vor dem Auftragen auf die Schnitte wurde Wasserstoffperoxid (30% H₂O₂) zugegeben und so die Reaktion gestartet. Nach etwa 10 Minuten wurde nach adäquater Anfärbung die überschüssige Chromogenlösung mit TBS entfernt. Im zweiten Block erfolgt die Anfärbung des SMHC. Die mit TBS gespülten Schnitte wurden mit Normal Horse Serum für eine Stunde bei Raumtemperatur präinkubiert. Anschließend wurde der primäre, gegen SMHC gerichtete AK aufgetragen und inkubiert (Tabelle 6).

Nach dem Spülen mit TBS wurde der biotinierte sekundäre Antikörper aufgetragen und nach einer Stunde Inkubationszeit mit TBS gespült. Die EAP-Lösung wurde aufgetragen und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Nach dem Reinigen mit TBS wurde die DAB-Reaktion gestartet. Da kein Nickel zugesetzt wurde, stellten sich die Strukturen rotbraun dar. Nach Ablauf der DAB-Reaktion wurden die Schnitte mit TBS und Aqua dest. gespült und anschließend

getrocknet. Die trockenen Schnitte wurden in aufsteigender Alkoholreihe und anschließend in Xylol (Dimethylbenzol) entwässert und mit DPX (Eindeckmedium) eingedeckt (siehe Färbeprotokoll Abschnitt 7.4.3). Die Färbung auf Calretinin und SMHC geschah analog dazu in unten genannten Verdünnungen der Antikörper (siehe Tabelle 7).

SNAP-25 & SMHC	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (1h bei RT)	Extravidin-Peroxidase (1h bei RT)	Chromogen
SNAP-25	5% Normal Pferdeserum	Maus anti-SMI81 (1:2500)	Biot. Pferd anti-Maus (1:200)	Extravidin-Peroxidase (1:1000)	DAB-Nickel
SMHC	5% Normal Pferdeserum	Maus anti-SMHC (1:100)	Biot. Pferd anti-Maus (1:200)	Extravidin-Peroxidase (1:1000)	DAB

Tabelle 6: Übersicht der Doppelfärbung mittels Avidin-Biotin-Methode auf SNAP-25 und SMHC in der EOM.

Calretinin & SMHC	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (1h bei RT)	Extravidin-Peroxidase (1h bei RT)	Chromogen
Calretinin	5% Normal Ziegen Serum	Kaninchen anti-Calretinin (1:2500)	Biot. Ziege anti-Kaninchen (1:200)	Extravidin-Peroxidase (1:1000)	DAB-Nickel
SMHC	5% Normal Pferdeserum	Maus anti-SMHC (1:100)	Biot. Pferd anti-Maus (1:200)	Extravidin-Peroxidase (1:1000)	DAB

Tabelle 7: Übersicht der Doppelfärbung mittels Avidin-Biotin-Methode auf CR und SMHC in der EOM.

3.1.5 Auswertung der angefärbten Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte rein qualitativ und wurde an einem Forschungsmikroskop (Leica DMRB Bensheim, Deutschland) in Fluoreszenzbeleuchtung bzw. im Hellfeld durchgeführt. Die Dokumentation der Färberegebnisse erfolgte über eine am Mikroskop angeschlossene Digitalkamera (Pixera Pro 600 ES; Klughammer, Markt Indersdorf, Deutschland), die auf einem Computer mit der Software Pixera View Finder (Klughammer, Markt Indersdorf, Deutschland) erfasst und gespeichert wurde. Ein ausgewählter Teil der Dokumentation erfolgte mit einem Laser-Scanning-Konfokalmikroskop (Leica SP5, Mannheim, Deutschland). Die angefertigten Bilderreihen wurden vor der weiteren Bearbeitung mit „ImageJ software“ zusammengefasst. Die Bilder wurden am Computer mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet. Dabei wurden Helligkeit, Schärfe und Kontrast nur soweit verändert, dass sie der Originalansicht durch das Mikroskop entsprachen. Das Layout und die Beschriftung der Bilder erfolgten in PowerPoint (Microsoft 2010).

Insbesondere bei den fluorochrommarkierten Schnitten wurde auf eine zeitnahe Auswertung geachtet, da es im Verlauf zum Abblässen der Färbung und zunehmender Ausbildung von Luft einschüssen kam.

3.2 Hirn

3.2.1 Präparate

Es wurden Flachschnitte aus vier menschlichen Gehirnen untersucht (Tabelle 8). Diese wurden von der Hirnbank (Brain-Bank) der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Einverständnis der dortigen Ethikkommission zur Verfügung gestellt. Bei allen Fällen wurden zu Lebzeiten keine neurologischen, insbesondere keine okulomotorischen Erkrankungen diagnostiziert.

Fälle	Ge- schlecht	Alter	Todesursache	Fixierung	Einbettung	Block
Fall H1	m	67	Linksherzversagen	Paraformaldehyd	Paraffin	A2
Fall H2	m	75	Akuter Myokardinfarkt	Paraformaldehyd	Paraffin	A2
Fall H3	m	82	Linksherzversagen bei Hinterwandinfarkt	Paraformaldehyd	Paraffin	21
Fall H4	m	62	Pankreaskarzinom mit fortgeschrittener Metastasierung	Paraformaldehyd	Paraffin	I

Tabelle 8: Verwendete Fälle der Gehirnschnitte.

3.2.2 Präparation

An den bei der Obduktion entnommenen Gehirnen wurde der Bereich vom Diencephalon bis zum Hirnstamm präpariert. Von den Präparaten wurden die Hirnhautreste entfernt, die zerebralen Gefäße wurden von korpuskulären Blutbestandteilen gereinigt um spätere Färbeartefakte, insbesondere bei immunhistochemischen Färbungen durch deren übermäßige endogene Peroxidaseaktivität zu minimalisieren (Bourne, 1983).

Die Präparate wurden für mindestens 7 Tage in Paraformaldehyd (in 0,1M PBS; pH 7,4) fixiert und anschließend in ein Zentimeter dicke Blöcke geschnitten, entwässert und in Paraffin eingebettet.

3.2.3 Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke wurden in regelmäßigen Serien in zehn bzw. fünf Mikrometer dünne Schnitte geschnitten, im Wasserbad (Temperatur <math><50^{\circ}\text{C}</math>) gestreckt und auf „Superfrost-plus“-Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen. Anschließend wurden in regelmäßigen Abschnitten Nissl-Färbungen durchgeführt, um in der Übersicht die Ebene innerhalb des Okulomotoriuskerns zu bestimmen. In ausgewählten Bereichen des Okulomotoriuskerns wurden benachbarte Flachschnitte paarweise auf ChAT und Calretinin mittels immunhistochemischer ABM-Färbung angefärbt um Neurone zu identifizieren, die sowohl ChAT als auch CR exprimieren.

3.2.4 Nissl-Färbung

Zur Identifizierung der Augenmuskelkerne und der Bestimmung der Ebenen innerhalb des Okulomotoriuskerns wurden Nissl-Färbungen an den vorhandenen Paraffinschnitten der Hirnstämme im Bereich des nIII in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden erst in Xylol entparaffiniert und dann in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 70% für je 10 min) rehydriert. Nach Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte für etwa 1-2 Minuten mit 0,5% Kresylviolett in einer Küvette gefärbt. Der basische Farbstoff bindet über eine Ionenbindung an Bereiche des Zellkerns mit hohem Anteil an mRNA und rauem endoplasmatischem Retikulum, aber auch an die Myelinscheiden. Nach kurzem Waschen in reinem Aqua dest. und in Aqua dest. mit 3 Tropfen Eisessig für fünf Minuten und anschließend nochmals Aqua dest. wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 96% und 100% je 5 Minuten) wieder dehydriert. Der saure Eisessig dient einer Differenzierung der Färbung. Insbesondere die Verweildauer der Schnitte im 96%igen Alkohol beeinflusst die Intensität der Färbung. Je länger sich die Schnitte im 96%igen Alkohol befinden, desto heller und differenzierter erscheinen die Strukturen.

Nach Abschluss der Alkoholreihe wurden die Schnitte noch für 2x 15 Minuten in Xylol gegeben und anschließend mit dem Eindeckmedium DPX eingedeckt.

3.2.5 Immunhistochemische Färbung mittels Avidin-Biotin-Methode

Nach Identifizierung des Nucleus oculomotorius in der Nissl-Färbung wurden in repräsentativen Ebenen benachbarte Schnittpaare zur Färbung auf ChAT oder Calretinin ausgewählt. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und darauf in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Zur hitzeinduzierten Antigendemaskierung wurden die Schnitte in Citratpuffer (dreimal für 3 Minuten) in der Mikrowelle gekocht. Durch das Verdampfen bzw. Überkochen der Pufferlösung ist es nötig zwischen den Intervallen Aqua dest. bzw. Pufferlösung nachzufüllen, sodass die Schnitte vollständig mit Flüssigkeit bedeckt bleiben und während des Vorgangs nicht Austrocknen (Shi et al., 1991; Cattoretti et al., 1992; Cattoretti et al., 1993; Munakata and Hendricks, 1993). Nach langsamen Abkühlen des Citratpuffers wurden die Schnitte mit TBS gewaschen und daraufhin die endogene Peroxidase mit 1%igem H_2O_2 in Methanol blockiert. Nach Spülen mit TBS wurden die Schnitte mit Normal Kaninchenserum (ChAT) bzw. Normal Ziegenserum (CR) präinkubiert und anschließend der primäre Antikörper (gegen ChAT bzw. Calretinin) aufgetragen und für 48 Stunden bei 4°C aufbewahrt.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte mit TBS gespült und der biotinierte Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben und inkubiert. Nach Spülen mit TBS wurde die 30 Minuten vorher angesetzte Extravidin-Peroxidase auf die Schnitte aufgetragen und nach einer Stunde bei Raumtemperatur mit TBS abgewaschen. Anschließend wurde die DAB-Nickel-Lösung mit H_2O_2 aufgetragen und so die Farbreaktion gestartet (s.o.). Unter Mikroskopkontrolle wurde die Reaktion nach etwa 10 Minuten mit Auftragen von TBS und anschließend Aqua dest. gestoppt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte dehydriert (aufsteigende Alkoholreihe und Xylol) und abschließend in DPX eingedeckt (Tabelle 9 und Tabelle 10) (siehe Färbeprotokoll Abschnitt 7.4.5).

Calretinin	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (1h bei RT)	Extravidin- Peroxidase (1h bei RT)	Chromogen
	5% Normal Ziegenserum	Kaninchen anti-CR (1:2500)	Biot. Ziege anti- Kaninchen (1:200)	Extravidin- Peroxidase (1:1000)	DAB-Nickel

Tabelle 9: Übersicht der DAB-Färbung der Hirnschnitte auf Calretinin.

ChAT	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (1h bei RT)	Extravidin- Peroxidase (1h bei RT)	Chromogen
	5% Normal Kaninchen Serum	Ziege anti- ChAT (1:50)	Biot. Kaninchen anti-Ziege (1:100)	Extravidin- Peroxidase (1:1000)	DAB-Nickel

Tabelle 10: Übersicht der DAB-Färbung der Hirnschnitte auf ChAT.

3.2.6 Auswertung der Hirnschnitte

Um die angefertigten Hirnstammschnitte zu analysieren wurden diese mit einem Slide-Scanner (MIRAX SCAN, Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Deutschland) digitalisiert und am PC mit einer Software (Panoramic Viewer, 3D Histech, Budapest) ausgewertet.

Auf diese Weise wurden die digitalisierten Bilder korrespondierender Areale benachbarter Hirnstammschnitte, die entweder auf ChAT oder Calretinin angefärbt waren gleichzeitig am PC aufgerufen und bei gleicher Vergrößerung aneinandergespeichert. Bei hoher Vergrößerung konnten dann korrespondierende Detailansichten beider Schnitte miteinander verglichen werden und einzelne Neurone auf die Expression von ChAT und CR untersucht werden. Jede doppeltmarkierte Zelle im Bereich des Nucleus oculomotorius wurde dann geplottet.

4. Ergebnisse

4.1 Extraokuläre Muskulatur

4.1.1 Maße der Muskelsehnenübergänge der geraden EOM

Vor der Ablösung der Muskeln vom Bulbus oculi wurde an den einzelnen geraden Augenmuskeln die Länge des Muskelsehnenübergangs bestimmt. Dabei wurden die Abstände der Iris zum Muskelanfang, sowie zum Sehnenanfang gemessen (Abbildung 16 und Tabelle 11). Dabei zeigte sich die kürzeste Distanz von Muskel zu Iris im M. rectus medialis, die längste Distanz im M. rectus lateralis. Der obere und der untere gerade Augenmuskel (SR und IR) befanden sich dabei im Mittelfeld.

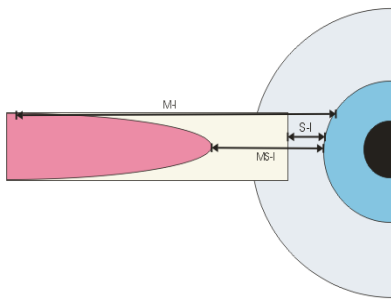


Abbildung 16: Schematische Darstellung der gemessenen Abstandswerte. Gemessen wurde der Abstand zwischen Muskelspitze zur Iris (MS-I), zwischen proximalstem Ende des Muskels und der Iris (M-I) und Abstand zwischen Sehnenansatz und Iris (S-I) an den einzelnen geraden Augenmuskeln.

Muskel	Muskelspitze-Iris	Prox. Muskelende-Iris	Sehnenansatz-Iris
MR	13	18	8
LR	20	23	9
SR	16	20	8
IR	18	21	7

Tabelle 11: Übersicht über die gemessenen Abstandswerte der geraden EOM in mm.

4.1.2 Identifizierung der Muskelsehnenübergänge

Die van Gieson-Färbung diente der Auswahl von Augenmuskelschnitten, die einen Muskelsehnenübergang aufwiesen. Die van Gieson-Färbung wurde in regelmäßigen Abschnitten bei den angefertigten Flachschnitten der Augenmuskeln durchgeführt. Die Muskelfasern zeigten sich in der van Gieson-Färbung in einer orangen bis bräunlichen Färbung (Abbildung 17, Stern), während die Sehnenzüge sich in kräftigem Rot darstellten (Abbildung 17, Pfeil). Dazwischen erschien lockeres Bindegewebe, in einer schwächeren Anfärbung in Rosa (Abbildung 17, Pfeilspitze). In einer geringen Vergrößerungsstufe ließen sich im Mikroskop die Muskelsehnenübergänge in der Übersicht gut

identifizieren. Aus den Ebenen die einen Muskelsehnenübergang enthielten wurden Schnitte ausgewählt, die anschließend immunhistochemisch angefärbt wurden.

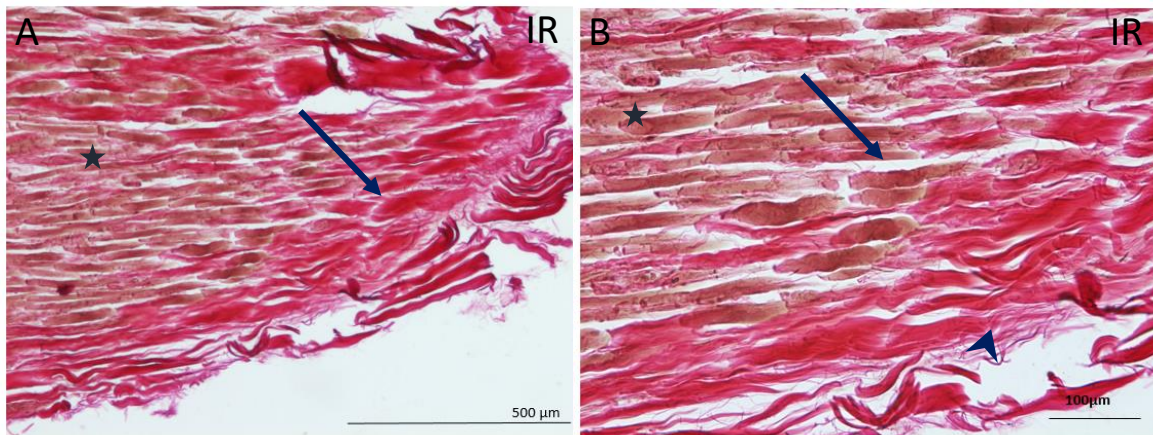


Abbildung 17: Van Gieson-Färbung. Dargestellt ist in unterschiedlicher Vergrößerung (A und B) der Übergang der bräunlichen Muskelfasern (Stern) in die intensiv Rot angefärbten Sehnenfasern (Pfeil). Das Bindegewebe erscheint in einem schwachen Rosa (Pfeilkopf). Fall A10, Schnitt 30, IR.

4.1.3 Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Augenmuskelschnitte

Nach Auswahl der geeigneten Augenmuskelschnitte mittels van Gieson-Färbung wurden mehrere Schnitte aus verschiedenen Fällen in den einzelnen Färbeserien bearbeitet. Insbesondere in der Fluoreszenzfärbung zeigten sich in den verschiedenen Schnitten deutliche Unterschiede in der Anfärbbarkeit, sodass nur ein Teil der gefärbten Schnitte ausgewertet werden konnte. So zeigten bestimmte Fälle eine sehr schwache Anfärbung, die nur zum Teil nach Anpassung der Konzentrationen der Antikörper verbessert wurde. Auch fand sich in manchen Fällen eine sehr hohe Konzentration an Lipofuszin, die ebenfalls eine Auswertung in der Fluoreszenzfärbung deutlich erschwerte. Bei Lipofuszin handelt es sich um eine Ansammlung intralysosomaler Proteinreste, die, gefördert von oxidativen Stress, entstehen (Brunk and Terman, 2002; Hutter et al., 2007; Jung et al., 2007). Die Schnitte, die eine zu schwache Anfärbung, bzw. einen zu hohen Anteil an Lipofuszin aufwiesen werden in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt.

Anzumerken ist, dass bei den Fällen, die in Methanol fixiert waren kein Unterschied in der Anfärbbarkeit zu den Fällen die in 4% PFA fixiert wurden zu finden war.

4.1.4 Identifizierung von Nervenendigungen in den extraokulären Muskeln mit SNAP-25

Mit der Immunfärbung auf SNAP-25 wurde die gesamte Innervation identifiziert. So zeigten sich die eintretenden Axone des jeweiligen Augenmuskelnervs, die sich im weiteren Verlauf im Muskel aufzweigen und an den einzelnen Muskelfasern enden. Mittels SNAP-25-Antikörpern konnten alle Axone und Nervenendigungen dargestellt werden.

An den Muskelfasern zeigten sich in der SNAP-25-Färbung unter anderem charakteristische motorische Nervenendigungen. Die en plaque-Endigungen konzentrierten sich vor allem im zentralen Bereich des Muskels und bildeten ein breites Band großer Endigungskomplexe (Abbildung 18, A). Die feineren en grappe-Endigungen fanden sich als kleinere Terminalen über die ganze Länge einzelner Muskelfasern verteilt (Abbildung 18, B). Dabei zog die Nervenfaser relativ parallel an der Muskelfaser entlang bis in die distalen Bereiche und kontrahiert die Muskelfaser über rundliche Varikositäten. Die en grappe-Endigungen fanden sich mit Non-twitch-Muskelfasern assoziiert, die mit einem Antikörper auf Myosin-Schwerketten Typ „slow“ (SMHC) angefärbt waren. Die en plaque-Endigungen hatten dabei im Vergleich zu den en grappe-Endigungen einen etwa doppelt so großen Durchmesser und zweigten sich kurz vor dem Ansetzen an SMHC-negativen Muskelfasern wie eine Baumkrone auf und bildeten einen singulären Muskelendplattenkomplex aus. Sowohl en plaque- wie auch en grappe-Endigungen bilden motorische Nervenendigungen und konnten alternativ mit einer ChAT-Färbung dargestellt werden.

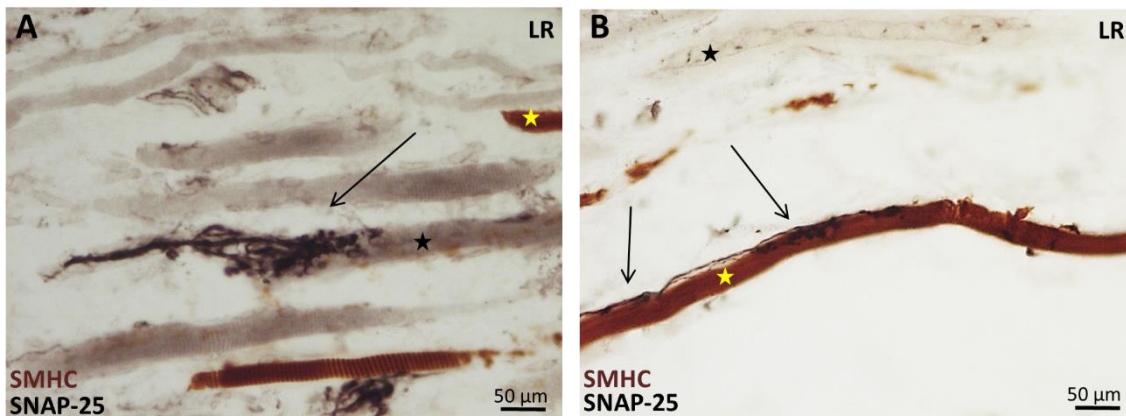


Abbildung 18: Aufnahme einer en plaque- (Bild A) und en grappe- (Bild B) Endigung im Hellfeld. In Schwarz stellt sich SNAP-25 dar, in Rotbraun SMHC. Die en plaque-Endigung (Pfeil Bild A) setzt wie eine Baumkrone an einer SMHC-negativen Muskelfaser (schwarzer Stern) an. Die en grappe-Endigung (Pfeile Bild B) setzt über die gesamte Muskelfaserlänge einer SMHC-positiven Muskelfaser (gelber Stern) mittels kleiner Varikositäten an. (Bild A: Fall A15, Schnitt 63; Bild B: Fall A15, Schnitt 31).

Neben den zwei prominenten motorischen Endigungstypen fanden sich sogenannte Spiralendigungen, wie sie schon von Daniel beschrieben wurden, an einigen Muskelfasern (Daniel, 1946). Diese umwanden einzelne Muskelfasern mehrfach und konnten durch die fehlende Ausbildung von breiten Endigungen und das Fehlen einer Bindegewebskapsel von Muskelspindeln unterschieden werden. Die Axone wanden sich dabei unterschiedlich häufig um die einzelnen Muskelfasern und bildeten am Ende feine fingerförmige Terminalen aus, die einer Motorendplatte ähneln. Die Spiralendigungen fanden sich gehäuft im zentralen und intermediären Bereich des jeweiligen Augenmuskels, selten im Bereich des Muskelsehnenüberganges.

Doppelimmunperoxidase-Färbungen auf SNAP-25 und SMHC, bzw. Calretinin und SMHC (Abbildung 19 A) zeigten, dass die Spiralendigungen mit Non-twitch-Muskelfasern assoziiert sind.

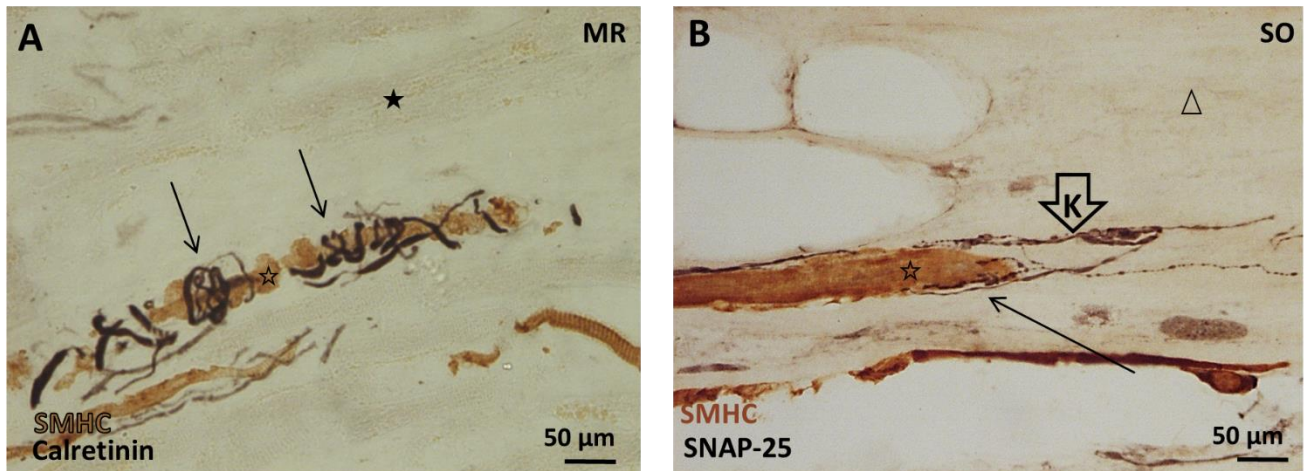


Abbildung 19: Bild A: Spiralendigungen (Pfeile) wanden sich mehrmals um SMHC-positive Muskelfasern (heller Stern). Im MR und IR konnten dabei Calretinin-positive Exemplare gefunden werden. Zum Vergleich SMHC-negative Muskelfaser (dunkler Stern) (Fall A12 MR, Schnitt 81). Bild B: Am distalen Muskelsehnenübergang (Dreieck liegt in der Sehne) finden sich in der globalen Schicht an einer SMHC-positiven Muskelfaser (heller Stern) eine Palisadenendigung (Pfeil). Die Nervenfasern schlägt distal um 180° um und setzt kappenartig (K im Pfeil) an der Muskelfaser an (Fall A4 SO rechts, Schnitt 56).

Die Palisadenendigungen zeigten sich klassisch als Axone, die vom zentralen Muskelbereich zum distalen bzw. proximalen Muskelabschnitt ziehen (Abbildung 19, B). Am Übergang von einer Muskelfaser in die Sehne schlugen die Nervenfasern um 180° um und setzten sich kappenartig auf das Ende der Muskelfaser. Der Umschlag ist dabei zum Teil nur recht kurz ausgeprägt, aber es finden sich auch Nervenfasernumschläge, die weit in den sehnigen Anteil des Muskels laufen (oft bis zu 150 µm). Dabei verzweigt sich das Axon nach dem Umschlag oft kurz vor der Muskelfaser und bildet an der Muskelfaser feine Terminalen aus, die sich als längliche Auftreibungen zeigen. An einigen Palisadenendigungen konnten am Axon vor dem Umschlag en grappe-ähnliche Auftreibungen gesehen werden. Die systematische Analyse zeigte, dass nicht an allen Übergängen von Muskelfasern zu Kollagenfasern der Sehne, Palisadenendigungen auftreten. In der Übersicht fanden sich in den geraden Augenmuskeln mehr Palisadenendigungen als in den schrägen Augenmuskeln. In vergleichsweise hoher Zahl fanden sich die Endigungen im M. rectus medialis. Palisadenendigungen zeigten sich regelmäßig an SMHC-positiven Muskelfasern, es konnten allerdings auch Exemplare an SMHC-negativen Muskelfasern gefunden werden.

Im zentralen Bereich der Augenmuskeln, nahe der Nerveneintrittsstelle konnten außerdem noch Nervenkontakte identifiziert werden, die spezielle fokale Endigungen bildeten, die sich aber klar von den en plaque-Endigungen unterschieden (Abbildung 20, A). Diese Endigungen zogen vom Nerveneintrittsbereich über eine kurze Strecke in den mittleren Bereich des Muskels und setzten sich ähnlich einer Palisadenendigung kappenartig auf das proximale Ende einer Muskelfaser auf, ohne dass es im Verlauf zu einem Umschlag käme. Diese zeigten sich auch in der ChAT-Färbung. Die Endigungen fanden sich an SMHC-negativen Muskelfasern, und waren deshalb vermutlich Twitch-Fasern.

In einzelnen Schnitten konnten Muskelspindeln nachgewiesen werden (Abbildung 20, B). Dabei werden die dünnen intrafusalen Muskelfasern von einem Axon umschlungen, das dabei viele Nervenendigungen entlang der gesamten Muskelfaser ausbildet. In der Doppelimmunperoxidasefärbung zeigte sich, dass die intrafusale Muskelfaser SMHC-positiv ist. Es traten oft mehrere Muskelspindeln in einem Bereich gehäuft auf.

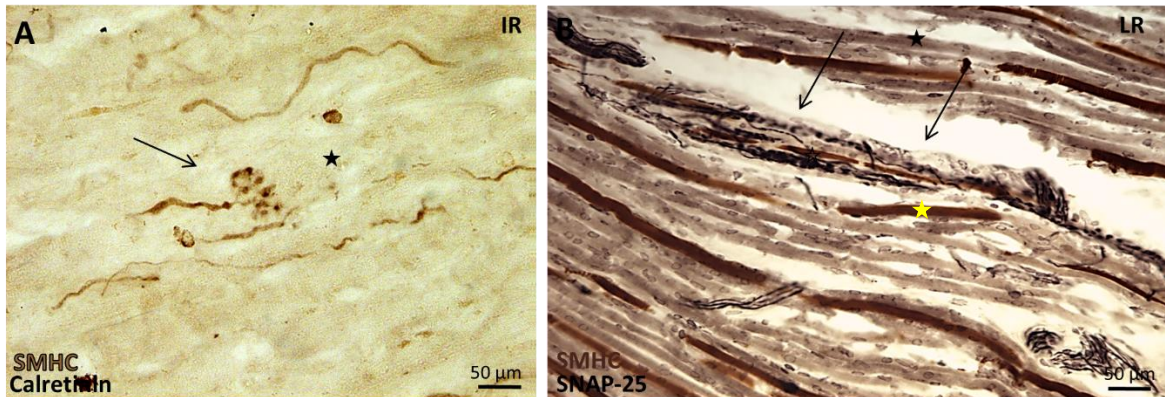


Abbildung 20: Bild A: In der Calretininfärbung zeigt sich an SMHC-negativen Muskelfasern (dunkler Stern) eine spezielle fokale Endigung (Pfeil) im IR (Fall A13, Schnitt 51). Bild B: Hier können Muskelspindeln (Pfeile) gefunden werden. Die Nervenendigungen setzen an SMHC-positiven intrafusalen Muskelfasern (heller Stern) an. Zum Vergleich SMHC-negative Muskelfasern (dunkler Stern), (Fall A16, Schnitt 72).

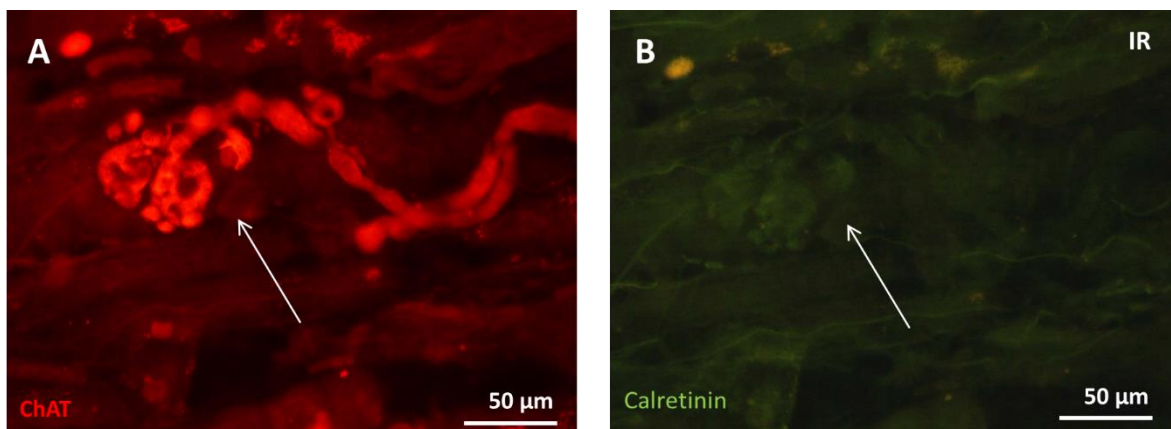


Abbildung 21: Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf ChAT (A, rot) und Calretinin (B, grün) des IR (Fall A13, Schnitt 113). Die Ausschnitte zeigen eine ChAT-exprimierende plaque-Endigung (Pfeil), die im zentralen Bereich des Muskels an einer Muskelfaser ansetzt. Das Axon der Endigung wirkt gröber als bei den en grappe-Endigungen. Die Nervenfasern zweigen sich direkt an der Muskelfaser baumartig auf und setzen fokale an der Muskelfaser an. Die en plaque-Endigung zeigt keine Calretinin-Expression.

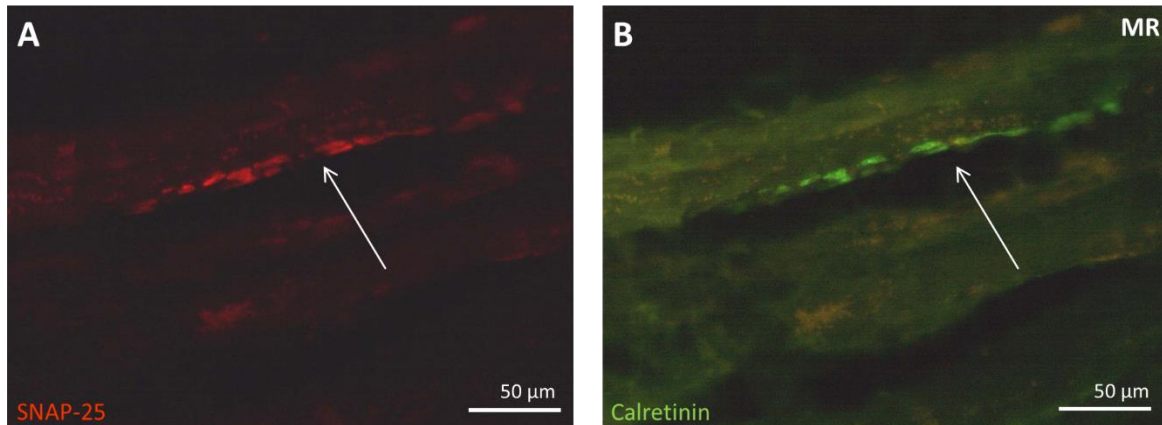


Abbildung 22: Schnitt des MR (Fall A13, Schnitt 132) mit Darstellung einer SNAP-25 (A, rot) und Calretinin (B, grün) doppelmarkierten en grappe-Endigung (Pfeil). Die Endigung verläuft entlang der Muskelfaser und bildet über die ganze Länge feine Terminalen aus.

4.1.5 Identifizierung von Nervenendigungen in den extraokulären Muskeln mit Calretinin

Zur Identifizierung möglicher Calretinin-positiver Nervenendigungen wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit SNAP-25, als Marker für die gesamte Innervation zusammen mit Calretinin an ausgewählten Schnitten aller Augenmuskeln durchgeführt. Die systematische Analyse aller äußeren Augenmuskeln zeigte, dass eine Calretinin-Expression nur in einigen Augenmuskeln und dort nur in bestimmten Nervenendigungen auftrat, die im Folgenden beschrieben wird.

Bereits in der Übersicht zeigte sich im MR ein größerer Anteil von Calretinin-positiven Nervenfasern und etwas geringer im IR. In den anderen Augenmuskeln fanden sich nur wenige Calretinin-positiv Nervenfasern. Im Folgenden wird die Calretinin-Expression der einzelnen Nervenendigungstypen genauer abgehandelt.

Zunächst erbrachte die Analyse aller Nervenendigungstypen in allen Augenmuskeln, dass die en plaque-Endigungen grundsätzlich keine Calretinin-Immunreaktivität exprimieren (Abbildung 21).

Nur im MR und IR wurden en grappe-Endigungen und Spiralendigungen identifiziert, die Calretinin-positiv sind. Daneben fanden sich für beide Nervenendigungstypen auch Calretinin-negative Formen. (Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24).

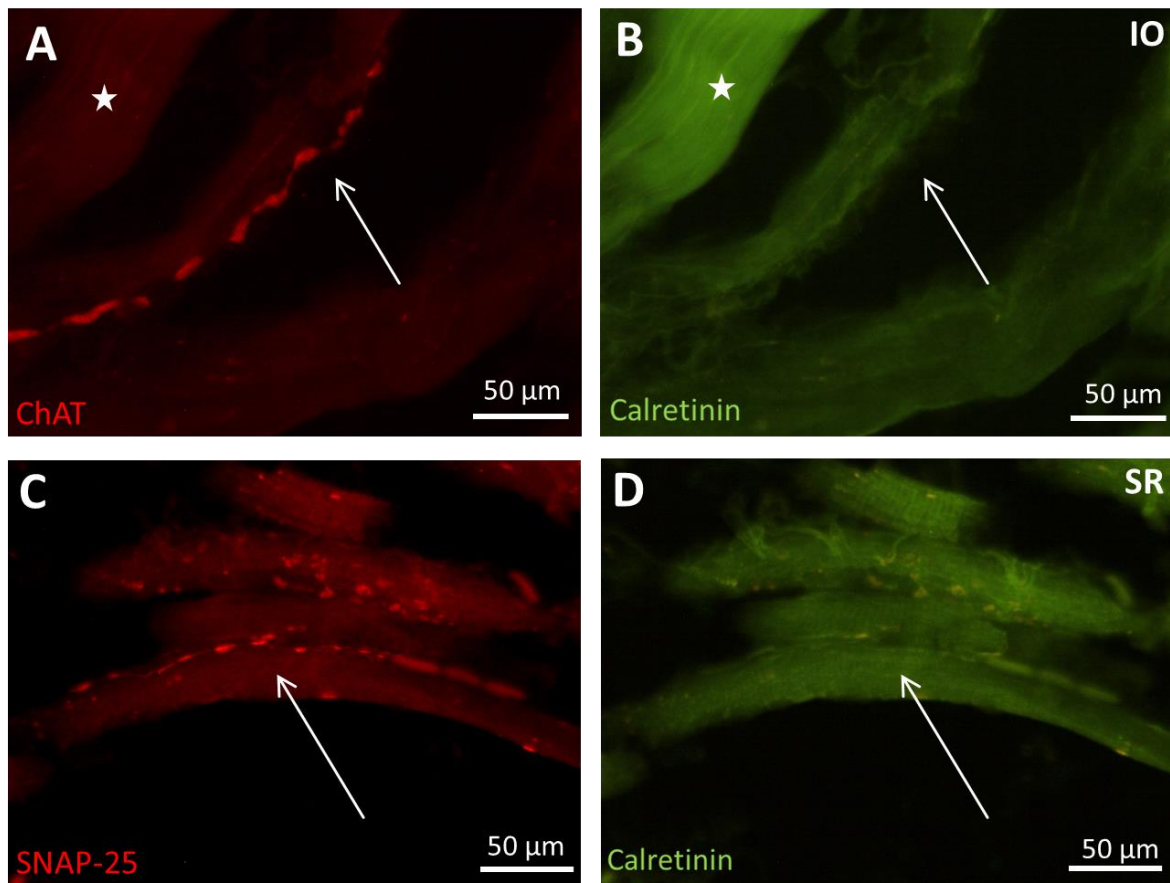


Abbildung 23: Oben: Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf ChAT (A, rot) und Calretinin (B, grün) im IO (Fall A13, Schnitt 93). Auch im peripheren Bereich (Stern liegt in Sehne) des Muskels zeigen sich en grappe-Endigungen (Pfeil). Unten: Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25 (C, rot) und Calretinin (D, grün) im SR (Fall A12, Schnitt 61). Die motorischen en grappe-Endigungen (Pfeil) zeichnen sich durch feine Terminalen entlang der gesamten Muskelfaser aus. Hier zeigt sich in beiden Fällen keine Calretininexpression.

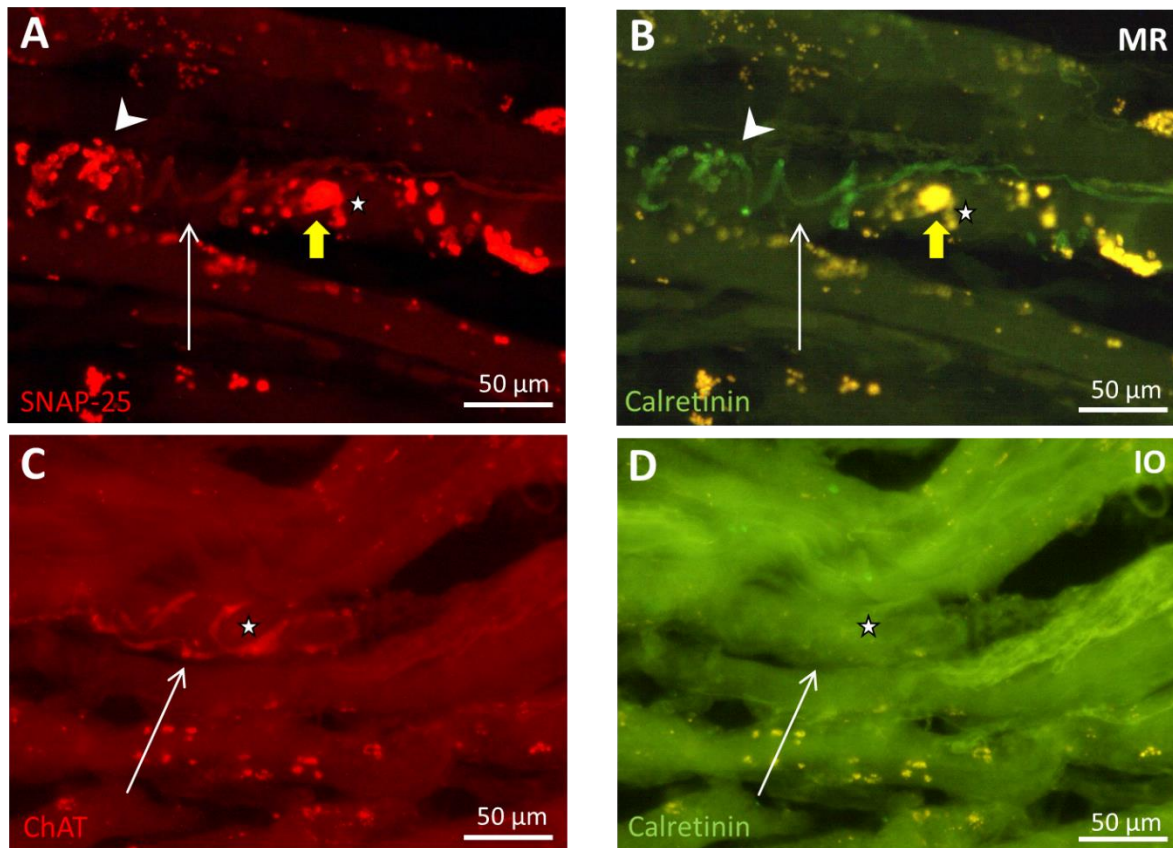


Abbildung 24: Oben: Im MR (Fall A2, Schnitt 63) zeigt sich eine doppelmarkierte SNAP-25 (A, rot) und Calretinin (B, grün) exprimierende Spiralendigung. Die Nervenendigung (Pfeil) windet sich wiederholt um die Muskelfaser (Stern) und bildet insbesondere am Ende feine Terminalen (Pfeilspitze) aus. Hier findet sich außerdem ein hoher Anteil an Lipofuszin (gelber Pfeil). Unten zeigt sich im IO (Fall A1, Schnitt 65) mit ChAT (C, rot) und Calretinin (D, grün) Fluoreszenzfärbung eine ChAT-positive Spiralendigung (Pfeil), die sich mehrmals um eine Muskelfaser (Stern) windet und kein Calretinin exprimiert.

Die detaillierte Analyse der PEs ergab, dass nur im MR und IR Calretinin-positive PEs nachweisbar waren. Wie für die en grappe- und Spiralendigungen, sind neben den Calretinin-exprimierenden PEs auch Calretinin-negative PEs gefunden worden, unabhängig ob diese am proximalen oder distalen MSÜ lagen (Abbildung 25 und Abbildung 26).

Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifizierung Calretinin-positiver Nervenendigungen mit Etablierung der Färbemethoden, weshalb keine systematische quantitative Studie durchgeführt wurde, die neues Material erforderlich gemacht hätte. Eine vorläufige Abschätzung erbrachte, dass im MR etwa 70% der identifizierten PEs Calretinin-positiv waren, im IR etwa 50%. Ähnliche Beobachtungen wurden für die en grappe-Endigungen im MR und IR gemacht.

Ein überraschender Befund war die Calretinin-Expression in einer Gruppe von speziellen fokalen Endigungen an Twitch-Muskelfasern nah der Nerveneintrittsstelle im Muskelbauch, die in allen Muskeln nachweisbar waren (Abbildung 27). Diese Terminalen unterschieden sich von den en plaque-Endigungen indem sie kleiner waren und die Muskelfasern nicht komplett umgriffen. Dabei zeigten sie sich in manchen Schnitten eher im mittleren Bereich, in anderen eher an den Rändern des Muskels. In allen Augenmuskeln wurden Calretinin-positive und Calretinin-negative spezielle fokale Endigungen nachgewiesen.

Nur im MR und IR fanden sich in den wenigen nachgewiesenen Muskelspindeln Calretinin-positive annulospirale Endigungen an den intrafusalen Muskelfasern. Daneben wurden aber auch Muskelspindeln gefunden, die keinerlei Calretinin-Expression zeigten (Abbildung 28).

Bei den Nervenendigungen die in einer Calretinin-exprimierenden und nicht-Calretinin-exprimierenden Form (en grappe-Fasern, Palisadenendigungen, „spezielle fokale Endigungen“, annulospiralen Endigungen der Muskelspindeln und Spiralendigungen) auftraten, fanden sich bei der Analyse in hoher Vergrößerung keine erkennbaren Unterschiede in der Gestalt der Nervenfasereendigungen. Doppelfärbungen auf ChAT und Calretinin zeigten, dass alle oben genannten identifizierten Calretinin-positiven Endigungen auch cholinerg sind, ebenso wie die Calretinin-negativen Exemplare. Erwartungsgemäß wurden mit der Anfärbung auf ChAT ebenso en plaque- und en grappe-Endigungen dargestellt. Ebenso zeigten die „fokalen Endigungen“ und Spiralendigungen eine ChAT-Immunfärbung.

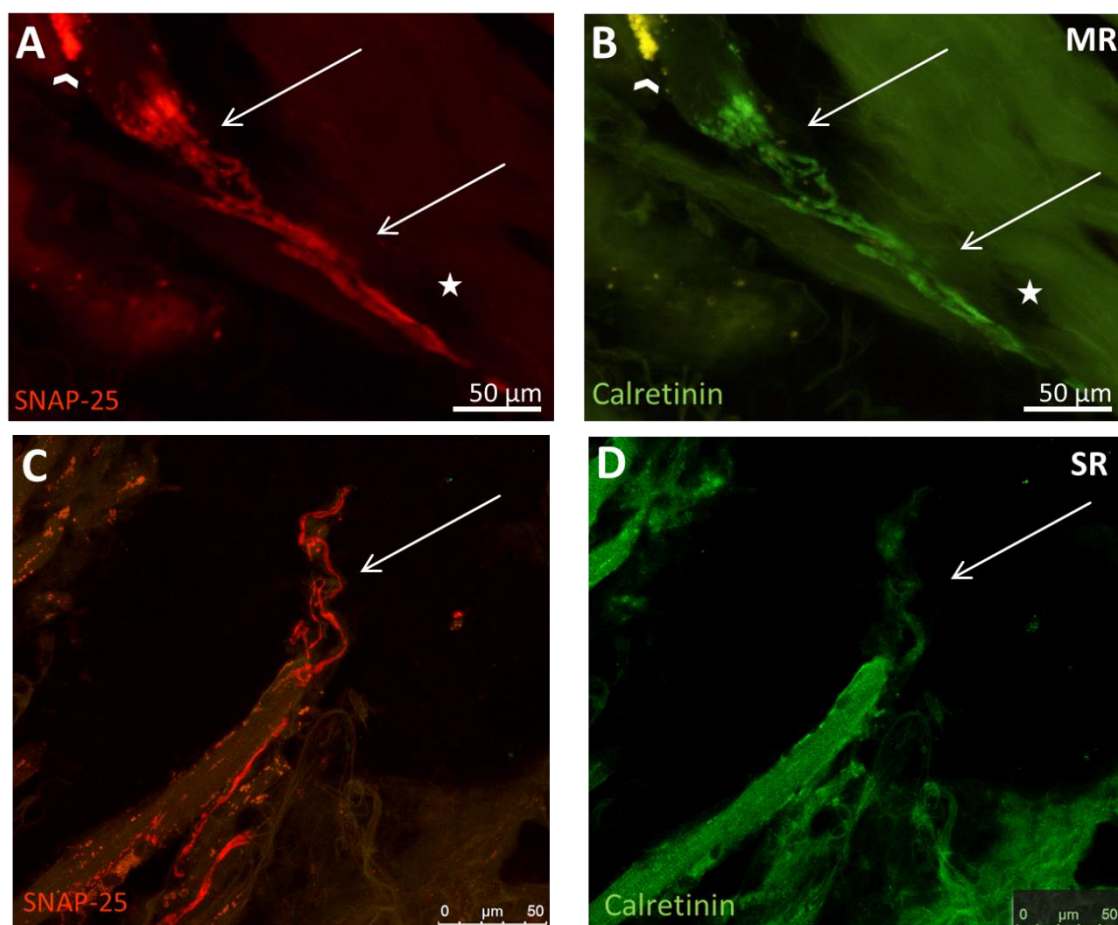


Abbildung 25: Oben: Abbildung einer Calretinin-positiven Palisadenendigung (Pfeile) im MR (Fall A4, Schnitt 65) am distalen Muskelsehnenübergang. Anfärbung auf SNAP-25 (A, rot) und Calretinin (B, grün). Die Endigung schlägt distal im Bereich der Sehne (Stern) um und setzt dann kappenartig auf die Muskelfaser auf. Lipofuszinablagerungen (Pfeilspitze) zeigten sich im Fluoreszenzfilter für Calretinin deutlich als gelbe Ablagerung, während es sich im Filter für SNAP-25 nur schwer von den markierten Strukturen abgrenzen lassen. Unten: SNAP-25- (C, rot) positive und Calretinin- (D, grün) negative Palisadenendigung (Pfeil) im SR (Fall A12, Schnitt 121).

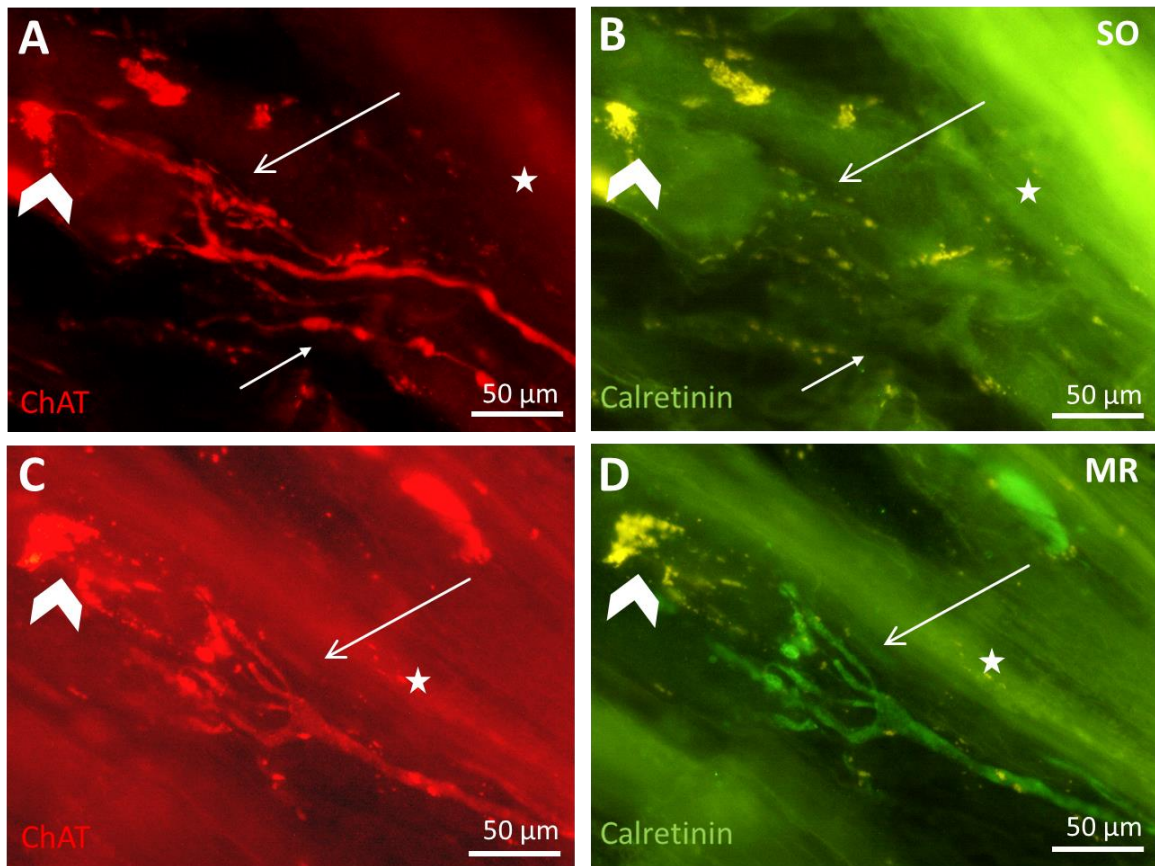


Abbildung 26: Oben: Distaler Muskelsehnenübergang im SO (Fall A4, Schnitt 52). Anfärbung auf ChAT (A, rot) und Calretinin (B, grün). Muskelfaser mit einer ChAT-exprimierenden Palisadenendigung (Pfeil mit offener Spitze), die keine Calretininanfärbung zeigt. Auffällig sind dabei die feinen Auftreibungen der Nervenfasern vor dem Umschlag (Pfeil mit geschlossener Spitze), die an eine en grappe-Endigung erinnern. Unten: ChAT (C, rot) und CR (D, grün) exprimierende Palisadenendigung (Pfeil) im MR (Fall A4, Schnitt 77). Der Umschlag der PEs verläuft dabei beide Male in der Sehne (Stern). Hier findet sich auch Lipofuszin (Pfeilspitze).

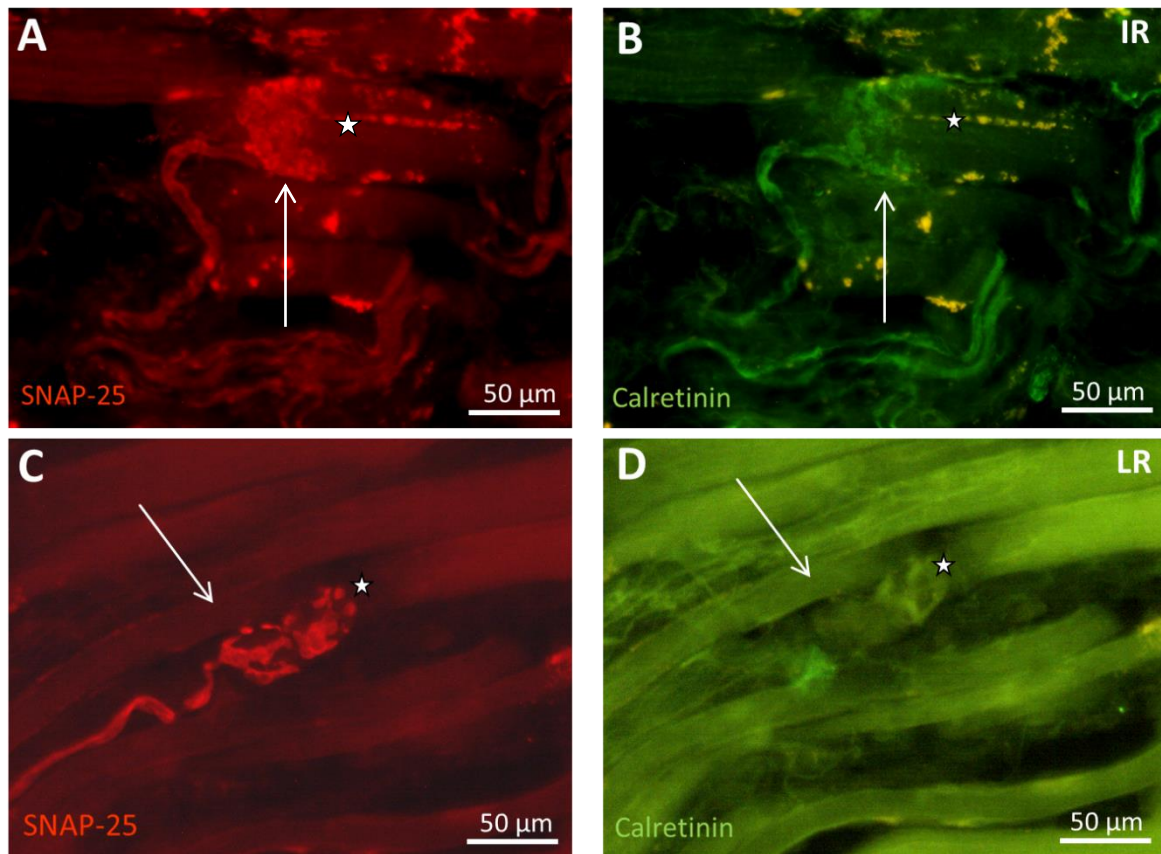


Abbildung 27: Im Bereich des Nerveneintritts in den Muskel finden sich "spezielle fokale Endigungen". Oben zeigt sich eine SNAP-25 (A, rot) und Calretinin (B, grün) exprimierende "spezielle fokale Endigung" (Pfeil) im IR (Fall A8, Schnitt 37). Die Nervenendigung setzt hier im Bereich des Nerveneintritts an einer Muskelfaser (Stern) kappenartig an. Unten: Eine Calretinin- (D, grün) negative und SNAP-25- (C, rot) positive Endigung (Pfeil), die direkt zu einer Muskelfaser (Stern) zieht und an der Muskelfaser ansetzt. (Fall A6, LR, Schnitt 47).

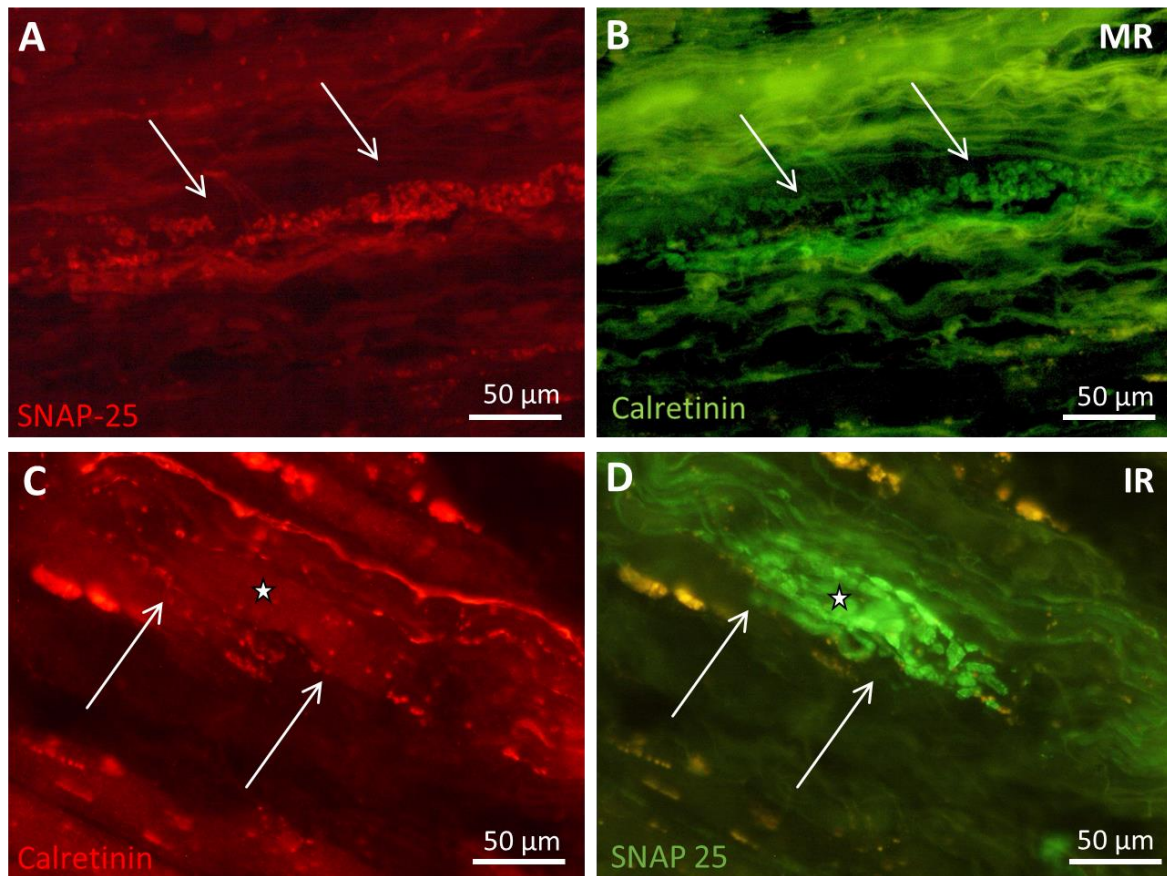


Abbildung 28: Oben: Muskelspindel (Pfeile) im MR (Fall A13, Schnitt 122) die sich sowohl auf SNAP-25 (A, rot) als auch Calretinin (B, grün) anfärben lässt. Es finden sich über die gesamte intrafusale Muskelfaser hinweg zahlreiche Terminalen. Unten: Neben Calretinin-exprimierenden Muskelspindeln zeigten sich auch Spindeln, die nur in der SNAP-25-Färbung (D, grün), nicht aber in der Calretinin-Färbung (C, rot) sichtbar waren. Hier ein Anschnitt einer Muskelspindel (Pfeile) im IR (Fall A8, Schnitt 48), die reichlich feine Terminalen an der intrafusalen Muskelfaser (Stern) ausbildet.

In den Gefäßwänden aller Muskeln konnten außerdem feine Axone identifiziert werden, die eine Anfärbung auf Calretinin aufwiesen. Die Doppelfärbung SNAP-25 und Calretinin zeigte aber auch, dass es zusätzlich Calretinin-negative Axone in den Gefäßwänden gab. Alle Nervenendigungen in den Gefäßwänden zeigten keine ChAT-Expression (Abbildung 29). Neben der Blutgefäßinnervation konnten auch feine Nervenendigungen zwischen den Muskelfasern gesehen werden, die kein ChAT exprimieren, und somit keine motorischen Endigungen repräsentieren (Abbildung 30).

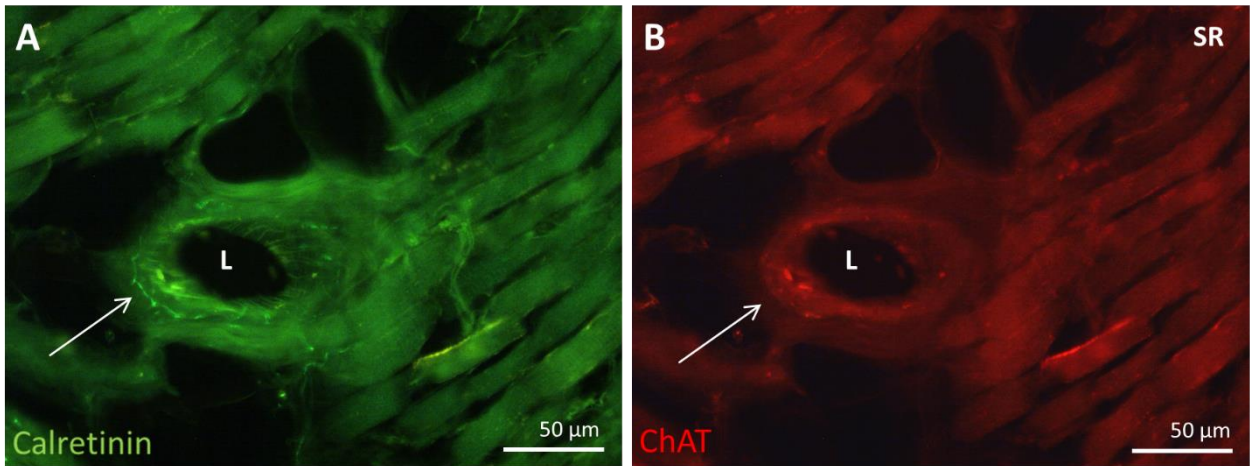


Abbildung 29: In den Gefäßwänden ziehen feine Nervenfasern (Pfeil), die Calretinin (A, grün) exprimieren, allerdings kein ChAT (B, rot). Wie hier im SR finden sich diese Fasern in den Gefäßwänden aller Muskeln (Fall A6, Schnitt 85). Das Gefäßlumen ist mit „L“ markiert.

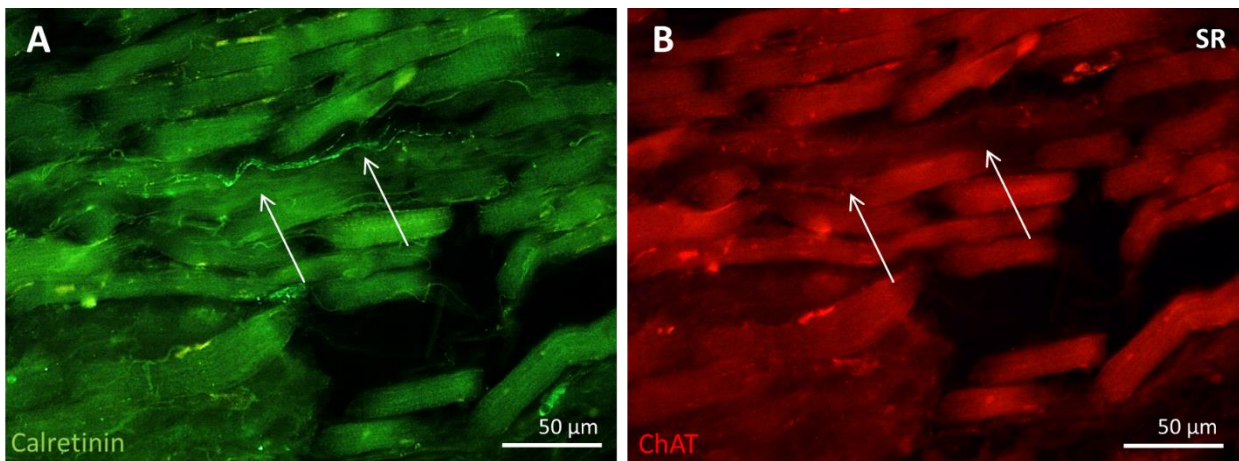


Abbildung 30: Zwischen den Muskelfasern zeigen sich in allen äußeren Augenmuskeln immer wieder feine CR (A, grün) positive, aber ChAT (B, rot) negative Nervenfasern (Pfeile). Fall A6, Schnitt 85, SR.

Die verwendeten Schnitte wurden vor Anfärbung entweder in Methanol oder in PFA fixiert. Bei der Anfärbbarkeit mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern zeigte sich zwischen den unterschiedlich fixierten Schnitten kein Unterschied.

	En grappe CR-	En grappe CR+	PE CR-	PE CR+	Spiralen CR -	Spiralen CR+	Veg. Fasern CR-	Veg. Fasern CR+
MR	+	+	+	+	+	+	+	+
LR	+	-	+	-	+	-	+	+
IR	+	+	+	+	+	+	+	+
SR	+	-	+	-	+	-	+	+
IO	+	-	+	-	+	-	+	+
SO	+	-	+	-	+	-	+	+

Tabelle 12: Vorkommen (+) bzw. Abwesenheit (-) von Nervenendigungen, die sowohl in einer Calretinin-exprimierenden (CR+) und nicht Calretinin-exprimierenden (CR-) Form vorkommen in den verschiedenen äußeren Augenmuskeln.

Nervenendigung	Proximaler Bereich	Nerveneintritt	Zentraler Bereich	Intermediärer Bereich	Distaler Bereich
En plaque	-	- +	++	-	-
En grappe	+	+	+	+	+
PE	+	-	-	-	+
„fokale Endigungen“	-	++	- +	-	-
Spiralendigungen	- +	+	++	+	- +

Tabelle 13: Übersicht über das Vorkommen der einzelnen Nervenendigungen im Längsverlauf der EOM. Semiquantitative Einteilung in sehr häufigem (++) , häufigem (+) , seltenem (- +) und fehlendem (-) Vorkommen im bezeichneten Gebiet.

4.2 Auswertung der Gehirnschnitte

Entsprechend der Befunde am Rhesusaffen sollten im menschlichen Hirnstamm die Zellkörper der Palisadenendigungen des MR und/oder IR in der Peripherie des nIII identifiziert werden. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Calretinin-Expression einer großen Gruppe von Palisadenendigungen diente dabei als histochemischer Marker.

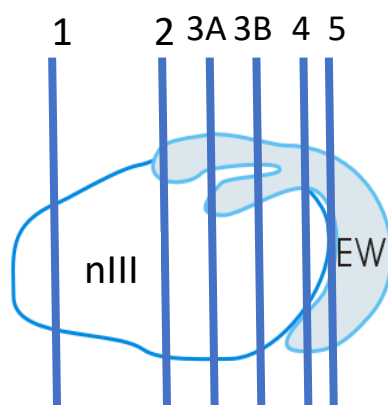
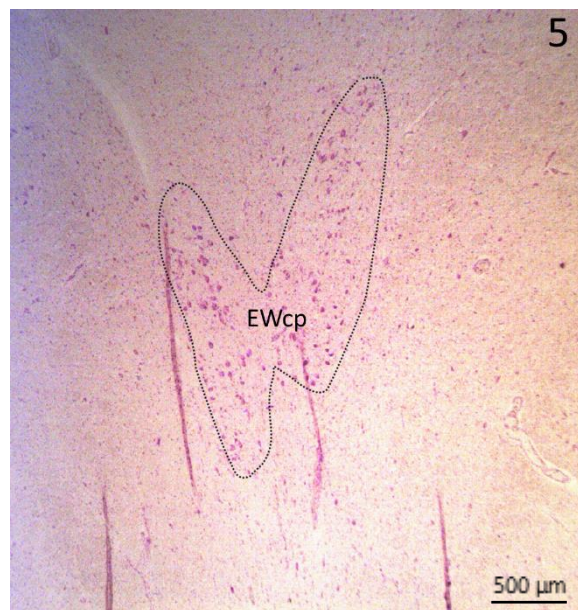
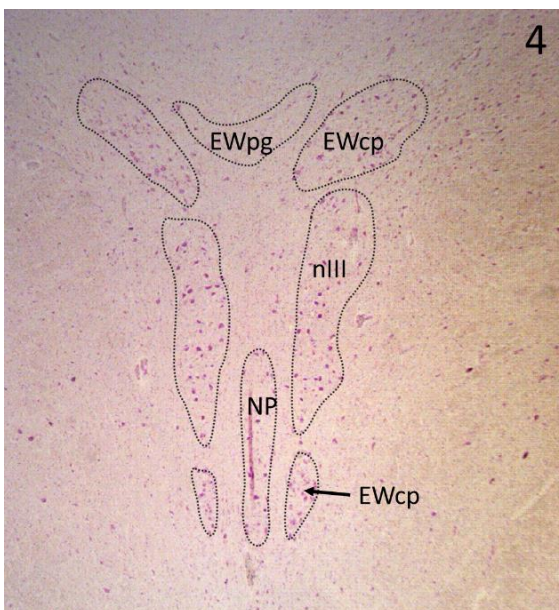
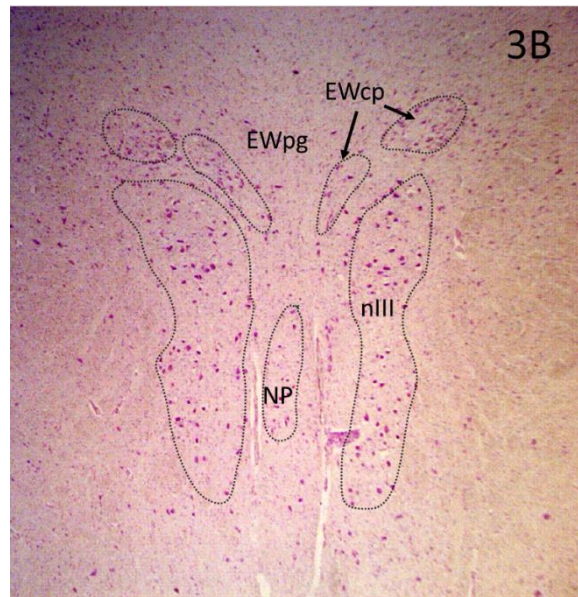
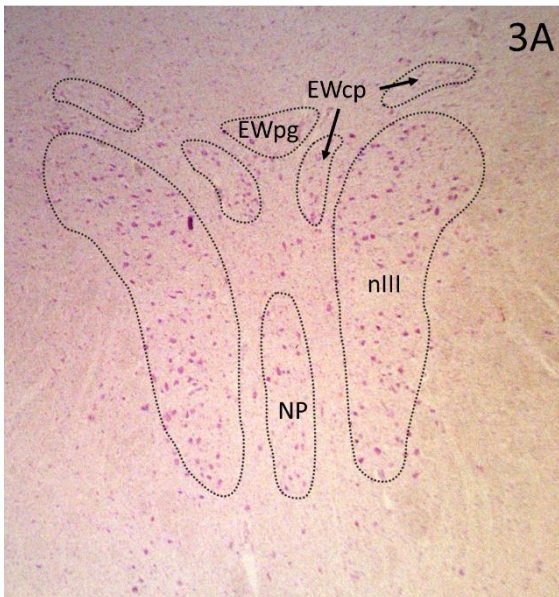
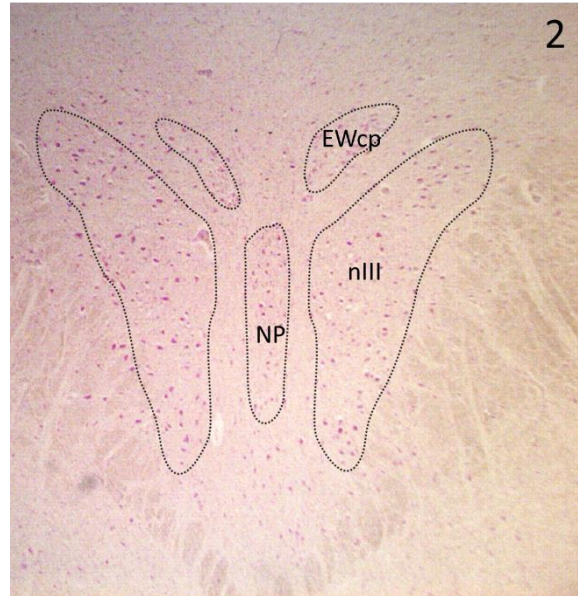
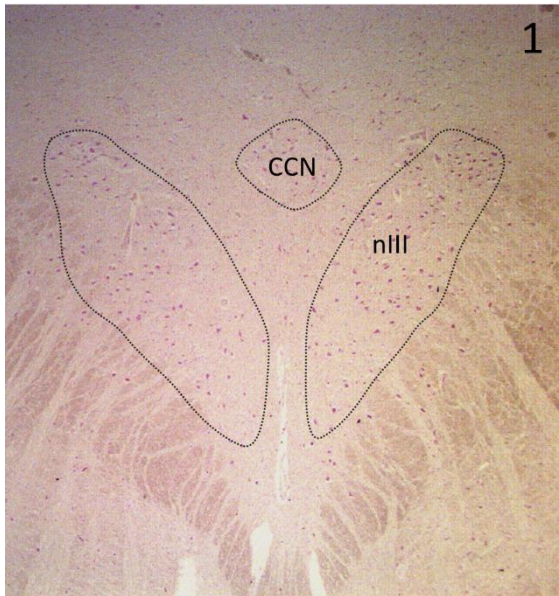


Abbildung 31: Orientierend an der Ebeneneinteilung des „Olszewski Hirnstammatlas“ wurden auch in dieser Arbeit repräsentative Schnitte aus den markierten Ebenen ausgewählt (Büttner-Ennever and Horn, 2014).

Mit Hilfe einer Kresylviolett färbung wurde zunächst der nIII in seiner gesamten rostro-caudalen Ausdehnung in den Hirnstammschnitten identifiziert. Auf verschiedenen Schnittebenen durch den nIII wurden jeweils dünne benachbarte Paraffinschnitte die auf Calretinin oder ChAT immunhistochemisch angefärbt worden waren, auf die Expression beider Marker analysiert. Die ausgewählten Ebenen orientieren sich an der Schnittführung des Hirnstammatlas von Baxter und Olszewski (Büttner-Ennever and Horn, 2014) (Abbildung 31). Als Richtstrukturen dienten neben dem nIII der NP, CCN und der EW (Abbildung 32).

Abbildung 32 (folgende Seite): Ebeneneinteilung anhand von Nisslschnitten. Markiert sind neben dem Ncl. oculomotorius (nIII) der Ncl. Perlia (NP), der Ncl. Centralis caudalis (CCN) und der Edinger-Westphal-Kern (EWcp und EWpg).



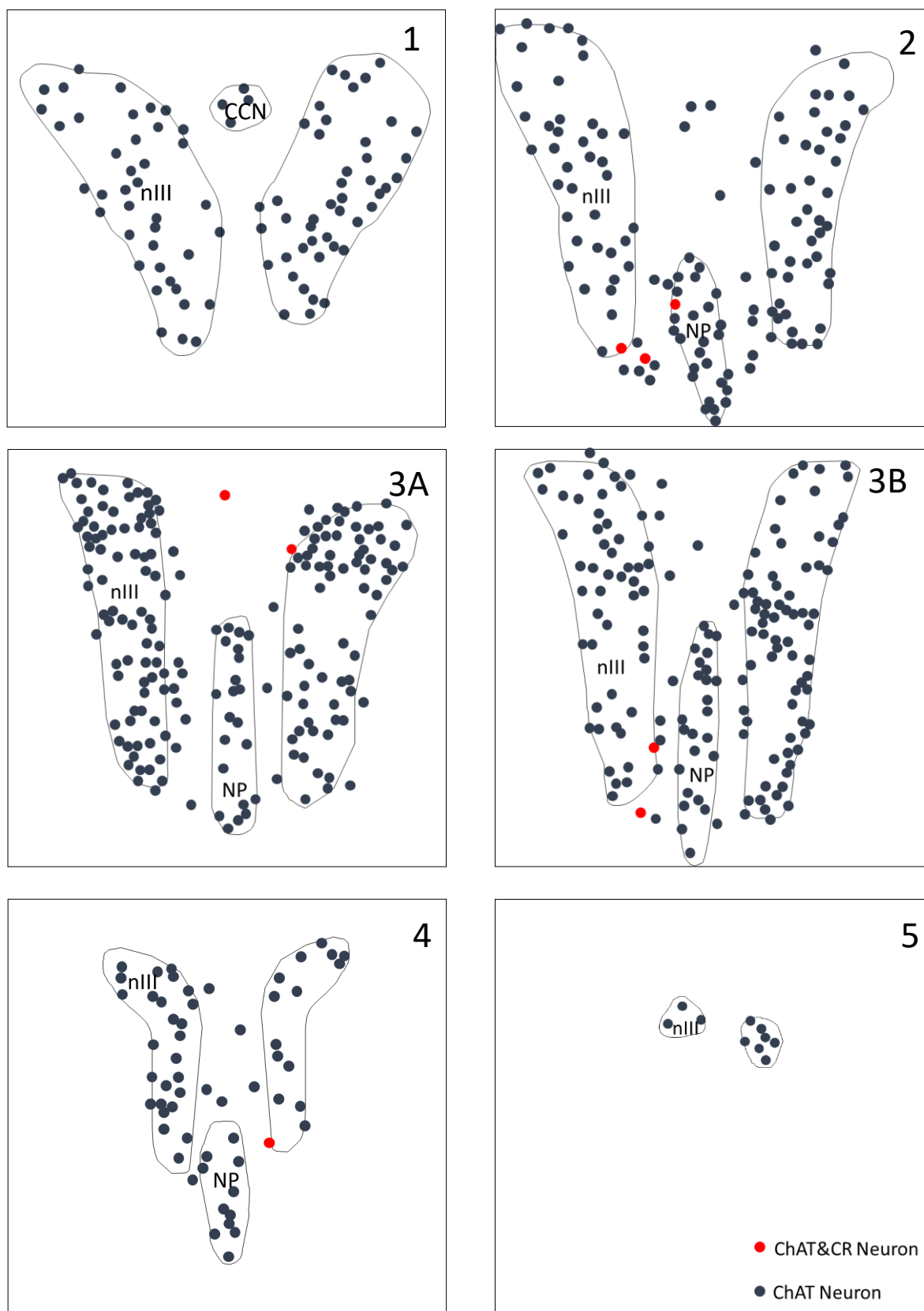


Abbildung 33: Markierte Neurone in den verschiedenen Ebenen. Rein ChAT-positive Neurone (blau) und doppelmarkierte Neurone (rot) beispielhaft an Fall H3. Der nIII, NP und CCN sind eingefasst. Die doppelmarkierten Neurone sind dabei in der Ebene 2-4 zu finden, und liegen entlang des medialen Randes des nIII.

Ebene 1	Ebene 2	Ebene 3A	Ebene 3B	Ebene 4	Ebene 5
Fall H3	Fall H3	Fall H3	Fall H3	Fall H3	Fall H3
1003-1004 (0)	920-921 (3)	907-908 (0)	832-833 (2)	760-761 (1)	691-692 (0)
	Fall H4	Fall H3	Fall H4	Fall H4	
	234-235 (0)	874-875 (2)	460-461 (1)	496-497 (2)	
	Fall H2	Fall H4			
	795-796 (4)	307-308 (1)			
	Fall H1	Fall H2			
	452-453 (2)	843-844 (1)			

Tabelle 14: Ausgewertete ChAT/CR-Schnittpaare nach Ebenen sortiert. In Klammern ist die Anzahl der gefundenen doppelmarkierten Neurone.

In der ChAT-Färbung zeigten sich innerhalb der Kerngrenzen des nIII die Motoneurone als mittelgroße multipolare Neurone. Außerhalb der medialen Kerngrenzen zwischen den beiden nIII lagen kleinere, eher ovale ChAT-positive Neurone, die bisher als die Motoneurone der multipel-innervierten Non-twitch-Muskelfasern betrachtet wurden (Horn et al., 2008).

Die Detailanalyse der CR- und ChAT-Immunreaktivität in dünnen benachbarten Schnitten zeigte folgende Neuronentypen: mittelgroße multiforme Neurone im nIII, die nur ChAT-positiv sind und die Motoneurone der Twitch-Muskelfasern repräsentieren, die sie über en plaque-Endigungen innervieren (Abbildung 34). Vereinzelt fanden sich ChAT-positive Neurone im nIII, die auch CR enthielten und den klassischen Motoneuronen ähnlich waren (Abbildung 35). In der vergleichenden Detailanalyse der kleineren ChAT-immunreaktiven Neurone außerhalb der Kerngrenzen zwischen den beiden nIII konnte eine kleine Gruppe von Neuronen mit einer zusätzlichen Calretinin-Immunreaktivität identifiziert werden, die vermutlich die Zellkörper der CR-positiven Palisadenendigungen im MR und IR repräsentieren (Abbildung 36).

Die doppelt markierten Neurone finden sich vor allem im mittleren Bereich in der rostro-caudalen Ausdehnung des nIII in den Ebenen 2-4, nicht jedoch in den weiter rostral bzw. kaudal gelegenen Ebenen 5 und 1. Die meisten doppelmarkierten Neurone lagen zwischen dem NP und dem nIII, bzw. dorsal zum NP zwischen den Okulomotoriuskernen (Abbildung 37). Obwohl aufgrund methodischer Schwierigkeiten nur wenige benachbarte Schnittpaare erfolgreich auf ChAT und CR angefärbt werden konnten, so lagen die als doppelt-markiert identifizierten Neurone in allen 5 Fällen in ähnlicher Lokalisation zwischen den beiden nIII.

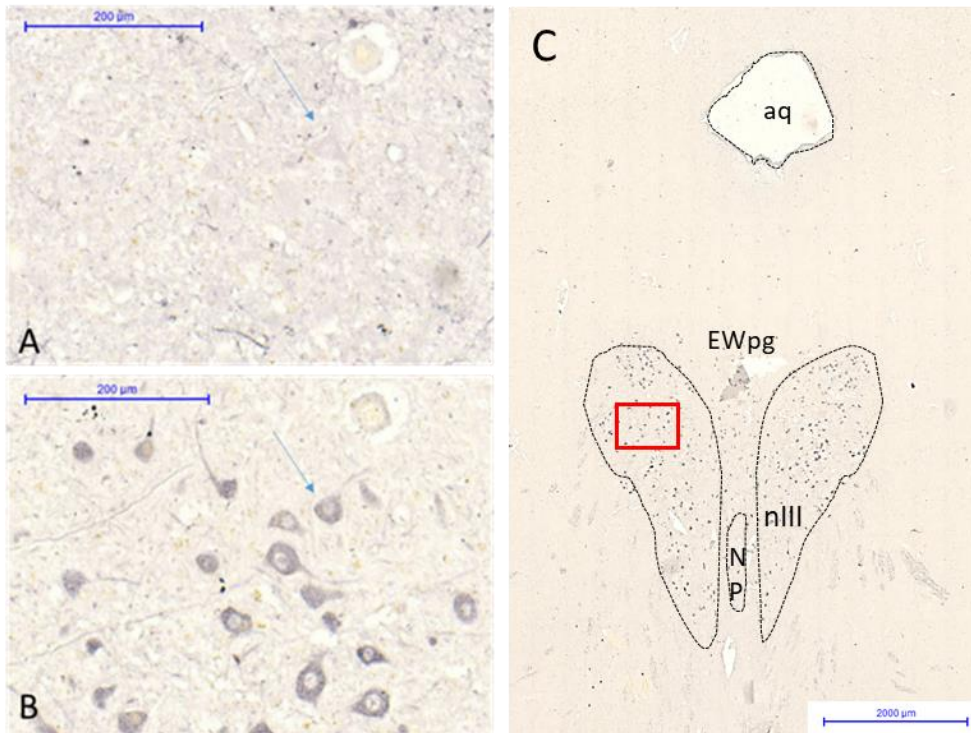


Abbildung 34: Beispiel Twitch-Neurone. In der Calretinin-Färbung (A) zeigen sich im Ausschnitt keine markierten Neurone im Bereich des klassischen Ncl. oculomotorius, die sich in der ChAT-Färbung im Nachbarschnitt (B) identifizieren lassen (Pfeilpaar). In der Übersicht in ChAT-Färbung (C) ist der Bereich der vergrößerten Ausschnitte (A und B) mit einem roten Rechteck markiert, das Aquädukt ist mit „aq“ markiert. Fall H2, ChAT 795, CR 796.

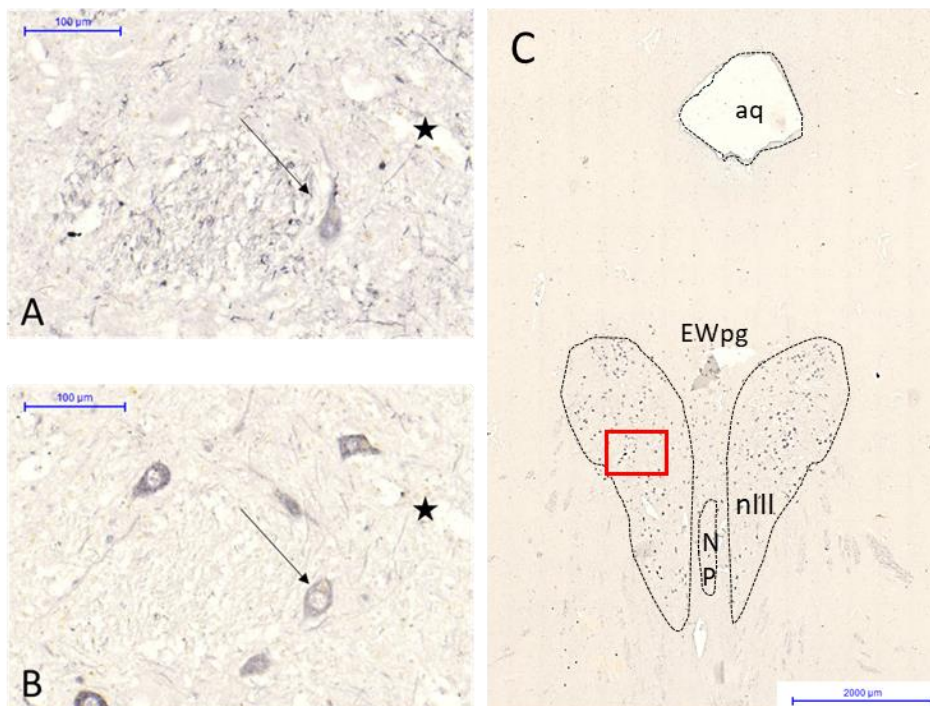


Abbildung 35: Darstellung eines Calretinin- und ChAT-positiven Neurons (Pfeil). Das Neuron findet sich im Ncl. oculomotorius, umgeben von rein ChAT-exprimierenden Neuronen. Zur Orientierung dient ein Gefäß (mit Stern markiert). Calretinin-Färbung (A), ChAT-Färbung (B) und Übersicht in ChAT-Färbung des Ncl. oculomotorius (nIII) unterhalb des Aquädukts (aq), Rechteck markiert den vergrößerten Bereich (C). Fall H2, CR 796, ChAT 795.

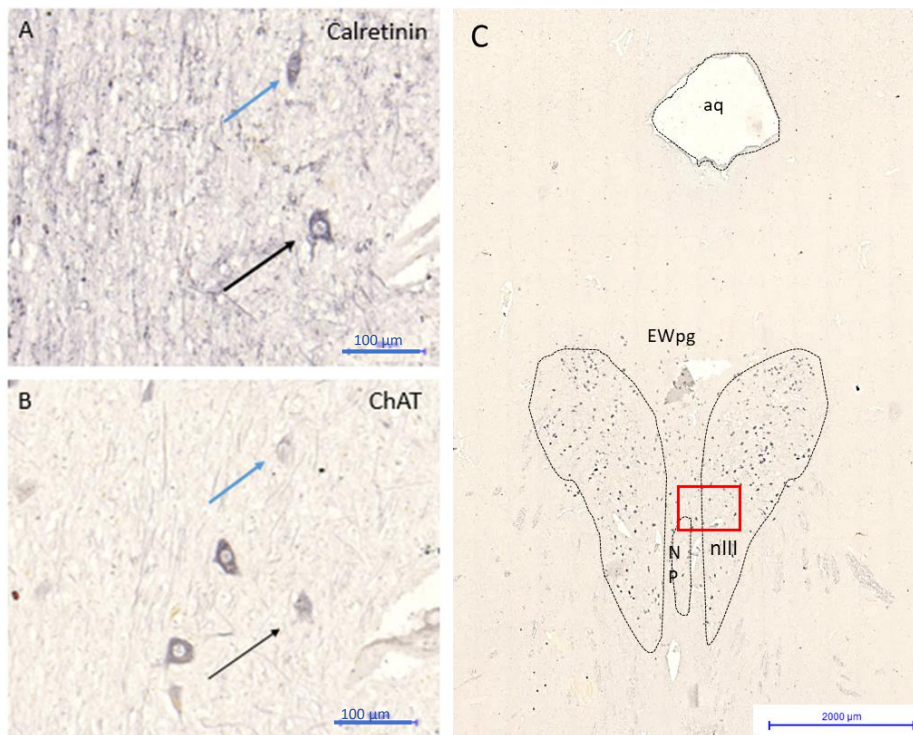


Abbildung 36: Beispiel doppelmarkierter Neurone. In der Calretinin-Färbung (A) zeigen sich im Ausschnitt zwei Neurone, die sich in der ChAT-Färbung im Nachbarschnitt (B) wieder mittels ChAT identifizieren lassen (jeweils blaues und schwarzes Pfeilpaar). In der Übersicht in der ChAT-Färbung zeigt sich die Lokalisation der doppelt markierten Neurone im Bereich zwischen den Okulomotoriuskernen (Bereich rot markiert). Die Schnitte befinden sich im Bereich der Ebene 2 des nIII. Fall H2, CR 796, ChAT 795.

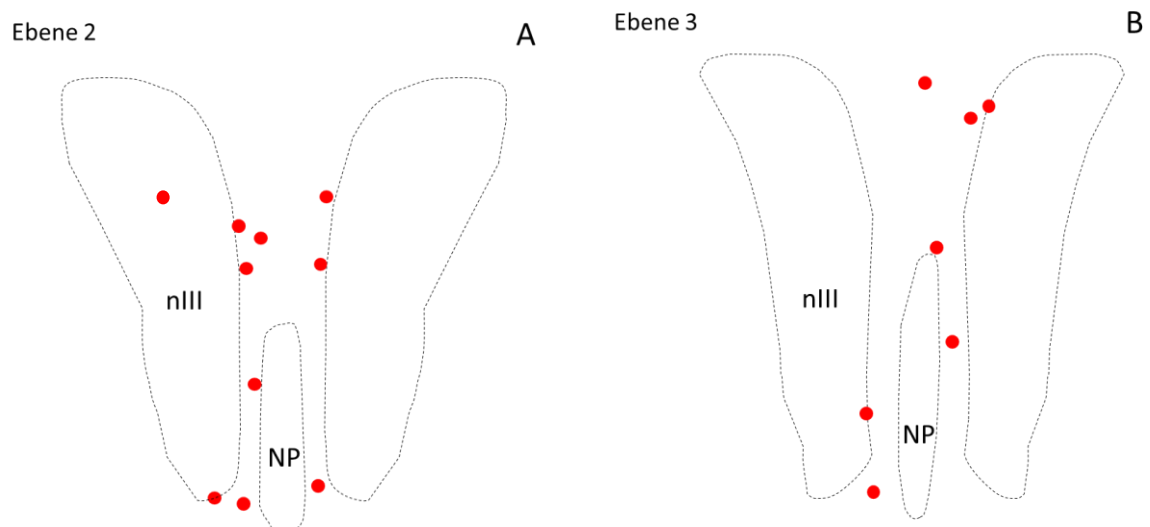


Abbildung 37: Schematische Übersicht über alle doppelmarkierten Neurone in Ebene 2 (A) und Ebene 3 (B).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Innervation der EOM beim Menschen auf Expression des calcium-bindenden Proteins Calretinin untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Untersuchung der Palisadenendigungen. In allen äußeren Augenmuskeln konnten Calretinin-negative Palisadenendigungen gezeigt werden, nur im M. rectus medialis und M. rectus inferior wurde zusätzlich eine Gruppe Calretinin-positiver PEs gefunden. In den extraokulären Muskeln konnte zudem gezeigt werden, dass en plaque-Endigungen stets Calretinin-negativ sind. En grappe-Endigungen, Spirale-Endigungen und Muskelspindeln traten wie die Palisadenendigungen in einer Calretinin-positiven und -negativen Form auf. In allen Augenmuskeln konnten dünne Calretinin-positiv-positive Nervenfasern in den Gefäßwänden und zwischen den Muskelfasern identifiziert werden, die kein ChAT exprimieren.

In einem Versuch, die Zellkörper der Calretinin-positiven Palisadenendigungen zu identifizieren, wurden Doppelfärbungen auf Calretinin und ChAT auf Mittelhirnschnitten mit dem Okulomotoriuskern (nIII) durchgeführt. An den medialen Rändern außerhalb der Kerngrenzen des nIII fand sich eine Gruppe kleinerer Neurone, die zugleich eine Calretinin- und ChAT-Immunoreaktivität zeigten, und auf Grundlage der Befunde am Affen als Zellkörper der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im M. rectus medialis und inferior angenommen werden (Lienbacher, 2012).

5.1 Methodische Probleme

Das verwendete post mortem Gewebe, das zur Auswertung verwendet wurde, war von sehr unterschiedlicher Güte, auch bedingt durch unterschiedlich lange post mortem Zeiten vor der Fixation. Die Immunfärbung, sowohl an der Augenmuskulatur, als auch an den Gehirnschnitten, führte daher zu qualitativ unterschiedlich guten Ergebnissen, die die Auswertung erschwerten.

In den Augenmuskeln, aber auch in den Gehirnschnitten, zeigten sich im Gewebe regelmäßig Lipofuszinablagerungen. Gefördert von oxidativen Stress kommt es zur Ansammlung von Lipofuszin (Brunk and Terman, 2002). Dabei handelt es sich um intralysosomale, quervernetzte Proteinreste, die sich mit zunehmenden Alter in Zellen ansammeln (Hutter et al., 2007; Jung et al., 2007). Die Ablagerungen fanden sich in unterschiedlicher Intensität in den verschiedenen Präparaten, besonders bei hohem Alter der Spender (Jung et al., 2007). Dies führte zu einer erschwerten Auswertung, insbesondere der Immunfluoreszenzfärbungen in den Augenmuskelschnitten, wo die Lipofuszinablagerungen sehr deutlich sichtbar waren. Um eine Fehlbeurteilung der angefärbten fluoreszierenden Strukturen auszuschließen, wurden diese immer auch mit anderen Fluoreszenzfiltern betrachtet, denn Lipofuszin-Granula waren mit allen Fluoreszenzfiltern erkennbar.

5.2 Darstellung der Innervation der EOM mittels SNAP-25-Antikörpern

Alle sensorischen, motorischen und vegetativen Nervenendigungen der EOM lassen sich in verschiedenen Tierspezies mit Antikörpern gegen SNAP-25 komplett anfärben (Eberhorn et al., 2005b). SNAP-25 ist ein Synaptosomen-assoziiertes Protein, das die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Membran an der Präsynapse bei der Transmitterausschüttung vermittelt und in Axon und Terminale nachweisbar ist (Sudhof, 2004). Unter Anwendung dieser Antikörperfärbung wurde auch in der vorliegenden Arbeit die gesamte Innervation der menschlichen EOM dargestellt und bestätigte frühere Beobachtungen, dass en plaque-Endigungen vor allem im mittleren Drittel und en grappe-Endigungen über die ganze Muskellänge vorkommen (Spencer and Porter, 1988). Entsprechend der Beobachtungen von Villar zeigten sich auch hier Spiralendigungen über den gesamten Muskel verstreut mit der höchsten Dichte im proximalen Drittel (Villar et al., 1994) (siehe Abschnitt 4.1). Ebenso konnte das Auftreten von Palisadenendigungen am proximalen und distalen Muskelsehnenübergang bestätigt werden (Spencer and Porter, 1988; Eberhorn et al., 2005b).

Bei Durchsicht der Präparate zeigten die Palisadenendigungen die größte Anzahl im M. rectus medialis, was den Beobachtungen von Laessing und Blumer et al. entspricht (Laessing, 2013; Blumer et al., 2016). In einer vergleichenden Studie an verschiedenen Säugetieren, einschließlich Mensch, fand sich bei allen Spezies, mit frontal ständigen Augen die höchste Anzahl von Palisadenendigungen im MR im Vergleich zu den anderen geraden Augenmuskeln (Laessing, 2013; Blumer et al., 2016). In der Arbeit von Laessing wurde bei der Auswertung zusätzlich die Zahl der Muskelfasern in der globalen Schicht berücksichtigt, woraus sich eine doppelt so hohe Dichte von Palisadenendigungen im MR ergab im Vergleich zum LR (Laessing, 2013). Wie schon im Affen und in der Katze wurden auch in der vorliegenden Arbeit am Menschen bei der Durchsicht weniger Palisadenendigungen in den schrägen im Vergleich zu den geraden Augenmuskeln gefunden (Konakci et al., 2005; Blumer et al., 2009).

In den äußeren Augenmuskeln von Schafen kann auch die sensible und motorische Innervation der dort vorhandenen, sehr gut ausgebildeten Muskelspindeln mit SNAP-25 dargestellt werden. Das gelang auch in der vorliegenden Arbeit an der menschlichen EOM (Harker, 1972; Eberhorn et al., 2005b; Lienbacher and Horn, 2012). Allerdings fanden sich in den hier untersuchten Augenmuskelschnitten wenige, oft eher schlecht ausgebildete Muskelspindeln.

Die ChAT-negativen feinen Nervenfasern in den Gefäßwänden und zwischen den Muskelfasern repräsentieren vermutlich vegetative und sensible Nervenendigungen (Hines, 1931; Fukuda, 1958; Thakker et al., 2008; Lienbacher et al., 2011b).

5.3 Calretinin-Expression in der EOM

Die Anzahl Calretinin-positiver Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen unterschied sich in den äußeren Augenmuskeln. Der Befund in der vorliegenden Arbeit, dass im MR deutlich mehr CR-positive Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen als CR-negative vorhanden sind– und im IR weniger CR-positive als CR-negative, deckt sich mit den Untersuchungen am Affen wo etwa 75% der PEs im MR CR-positiv sind (Lienbacher, 2012).

Calretinin zählt zu den calcium-bindenden Proteinen der EF-Hand-Familie und es wurde bisher in zahlreichen sensiblen Endigungen nachgewiesen (Rogers, 1987; Duc et al., 1994; Celio et al., 1996). Calretinin wird unter anderem eine modulierende Funktion neuronaler Erregbarkeit, sowie eine Calcium-Sensorfunktion und –Pufferfunktion zugeschrieben (Schurmans et al., 1997; Schwaller, 2009).

Über den Nachweis von Calretinin war ursprünglich erhofft worden, weitere histochemische Eigenschaften der Palisadenendigungen zu finden, die Aufschluss über eine sensorische oder motorische Funktion geben könnten.

In Übereinstimmung zu Beobachtungen anderer Autoren fanden sich in der vorliegenden Arbeit Muskelspindeln in der humanen EOM (Ruskell, 1989; Lukas et al., 1997; Bruenech and Ruskell, 2001). Während alle annulospiralen Endigungen der skelettalen Muskelspindeln in der Ratte Calretinin exprimierten, zeigten sich in der humanen EOM neben CR-positiven Afferenzen auch CR-negative. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar.

Besonders in der Calretinin-Färbung fielen in allen Muskeln, darunter auch in den schrägen Augenmuskeln, wenn auch in sehr geringem Ausmaß, spezielle fokale Endigungen auf, die sich im Längsverlauf auf Höhe des Nerveneintritts befanden. Das Vorkommen im Randbereich des Muskels in den verschiedenen Schnitten, könnte auf eine Lokalisation in der orbitalen Schicht hindeuten, was aber anhand der hier verwendeten Längsschnitte durch die EOM nicht bestätigt werden konnte. Zusammen mit der Morphologie weist die zusätzliche ChAT-Expression dieser fokalen Endigungen auf eine motorische Funktion hin. Möglicherweise repräsentieren diese fokalen Endigungen die en plaque-Endigungen an den multipel-innervierten Muskelfasern, die diesen Fasertyp in der orbitalen Schicht charakterisieren (Pachter, 1984; Jacoby et al., 1990; Lynch et al., 1994).

Die motorischen Neurone konnten mithilfe von ChAT-Antikörpern dargestellt werden. Cholinacetyltransferase findet sich als Enzym der Biosynthese von Acetylcholin in allen cholinergen Neuronen, zu denen Motoneurone zählen (Ichikawa and Shimizu, 1998; Oda, 1999). In der EOM liesen sich so die en grappe- und en plaque-Endigungen darstellen. Laessing konnte zeigen, dass auch Palisadenendigungen im Menschen cholinerg sind, ebenso wie dies schon in anderen Spezies, wie Affe, Schaf oder Ratte gezeigt werden konnte (Kupfer, 1960; Sadeh and Stern, 1984; Oda, 1993; Blumer et al., 2009; Laessing, 2013). Diese Arbeit zeigte darüber hinaus, dass ChAT-Immunreaktivität in allen Palisadenendigungen auftritt, aber im MR und IR zusätzlich eine Population CR enthält. In gleicher Weise zeigten alle beobachteten Spiralendigungen ChAT-Immunreaktivität – und einige davon waren zusätzlich CR-positiv.

Es fanden sich allerdings auch CR-positive und gleichzeitig ChAT-negative Nervenendigungen in der humanen EOM. Aufgrund der fehlenden ChAT-Expression handelt es sich dabei nicht um motorische oder parasympathische Nervenfasern (Klinke et al., 2009). In Tracer-Untersuchungen der EOM zeigte sich nach Injektion eines Tracers in die EOM im Affen eine retrograde Markierung von Neuronen im Trigeminalganglion (Nouriani, 2008; Lienbacher, 2012), so dass von einer trigeminalen Innervation der EOM ausgegangen werden kann. Die hier gefundenen Fasern könnten nun den sensiblen Nervenendigungen entsprechen, die vom Ganglion trigeminale kommen.

In den Gefäßwänden zeigten sich ebenso CR-exprimierende Nervenfasern, die ChAT-negativ waren. Bei diesen Nervenendigungen handelt es sich entweder um postganglionäre sympathische Nervenendigungen, die sich ausgehend vom Ganglion zervikale superior den extraokulären

motorischen Nerven beim Eintritt in die Orbita anschließen und dort die kleinen Blutgefäße umwinden und durch ihre Innervation den Blutfluss regulieren oder um sensible Endigungen, die die Gefäße umgeben. Lienbacher konnte im Affen zeigen, dass in den Gefäßwänden Substanz P-positive Nervenendigungen verlaufen. Substanz P ist ein Neuropeptid, das dem sensiblen Bereich, dort vor allem der Nozizeption, zugeordnet wird (Nielsen and Owman, 1967; Hokfelt et al., 1975; Lembeck et al., 1985; Hayakawa et al., 2000; Thakker et al., 2008; Lienbacher, 2012).

5.4 Identifizierung von Zellkörpern von Calretinin-positiven Palisadenendigungen

In allen untersuchten menschlichen Hirnstämmen wurden außerhalb der medialen Kerngrenzen der beiden Okulomotoriuskerne Neurone identifiziert, die Calretinin und ChAT exprimieren und aus folgenden Gründen als Zellkörper der Palisadenendigungen im MR beim Menschen angenommen werden:

Anhand von retrograden Trakt-Tracermethoden und immunhistochemischen Färbemethoden im Affen waren verschiedene Neuronengruppen im Bereich des Okulomotoriuskerns beschrieben worden. So liegen die SIF-Motoneurone innerhalb der Kerngrenzen des Okulomotoriuskerns und innervieren Twitch-Muskelfasern in der EOM über einzelne en plaque-Endigungen. Die Motoneurone der MIFs liegen eher in der Peripherie des Okulomotoriuskerns und lassen sich selektiv nach Injektion in den Muskelsehnenübergang retrograd markieren (Büttner-Ennever et al., 2001; Büttner-Ennever et al., 2006). Im Affen konnte außerdem gezeigt werden, dass die MIF-Neurone besondere histochemische Eigenschaften aufweisen. Im Unterschied zu den SIF-Motoneuronen exprimieren die MIF-Neurone kein Parvalbumin oder nicht-phosphorylierte-Neurofilamente, und sie tragen keine perineuronalen Netze (Eberhorn et al., 2005a). Diese histochemischen Eigenschaften wurden genutzt, um die homologen Neuronengruppen auch in menschlichem Gewebe zu charakterisieren (Ardeleanu, 2007; Horn et al., 2008). So fanden sich beim Menschen ChAT-positive Neurone, die keine perineuronalen Netze trugen zwischen den beiden Okulomotoriuskernen, die als MIF-Motoneurone betrachtet wurden (Ardeleanu, 2007; Horn et al., 2008).

Die Lage der Zellkörper der Palisadenendigungen wurde lange diskutiert. Es gab Hinweise für eine Lokalisation im Trigeminalganglion (Billig et al., 1997) oder im Hirnstamm (Büttner-Ennever et al., 2001; Zimmermann et al., 2011). Mit Tracer-Injektionen in den Bereich der Augenmuskelkerne konnten im Affen und in der Katze die Zellkörper der Palisadenendigungen als im Hirnstamm liegend identifiziert werden (Lienbacher et al., 2011b; Zimmermann et al., 2011; Zimmermann et al., 2013). Nachdem Palisadenendigungen im Muskelsehnenübergang liegen, und Tracerinjektion dort nur Neurone in der Peripherie der Augenmuskelkerne retrograd markieren, muss davon ausgegangen werden, dass die Zellkörper der Palisadenendigungen ebenfalls in den peripheren Zellgruppen liegen (Lienbacher and Horn, 2012).

In einer systemischen Analyse Tracer-markierter MR-Neurone in der peripheren C-Gruppe beim Affen konnte gezeigt werden, dass eine Teilpopulation von 12-15% innerhalb der MR-Neurone in der C-Gruppe zusätzlich CR exprimieren, aber nur sehr wenige in den IR-Neuronen in der C-Gruppe (Lienbacher et al., 2011b; Lienbacher, 2012). Dementsprechend werden diese Neurone beim Affen als Zellkörper der CR-positiven Palisadenendigungen im MR und IR betrachtet (Lienbacher, 2012).

Die Lokalisation der Neurone mit gleichzeitiger ChAT- und CR-Immunoreaktivität im Bereich des nIII beim Menschen deckt sich mit der von den vormals beschriebenen putativen MIF-Motoneuronen, die anhand ihrer ChAT-Immunoreaktivität und des Fehlens perineuronaler Netze identifiziert worden waren (Ardeleanu, 2007; Horn et al., 2008). Demzufolge können in der vorliegenden Arbeit die Neurone zwischen den beiden nIII, die zugleich ChAT- und CR-Immunreaktivität aufweisen, als die Zellkörper der CR-positiven PEs im MR betrachtet werden. Anders als beim Affen zeigte sich hier keine kompakte Gruppe von CR-/ChAT-positiven Neuronen, sondern die Neurone lagen verteilt im Bereich der Mittellinie. Die Auswertung weiterer Fälle, eventuell auch in Doppelimmunfluoreszenzfärbung, könnte dazu ein klareres Bild liefern.

5.5 Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen als anatomische Einheit?

Durch die gemeinsame Innervation von Non-twitch-Muskelfasern in der globalen Schicht durch en grappe-Endigungen und Palisadenendigungen stellt sich die Frage nach der Beziehung der Nervenendigungen zueinander. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass Palisadenendigungen und die multiplen en grappe-Endigungen von einem gemeinsamen Neuron stammen, oder eben von zwei Populationen mit möglicherweise unterschiedlichen histochemischen und physiologischen Eigenschaften (Lienbacher and Horn, 2012).

Nachdem sich gleichermaßen eine Subpopulation von Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen mit Calretinin-Antikörpern im MR anfärbten, erlauben die vorliegenden Befunde keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Frage, inwiefern Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen von einem gemeinsamen Zellkörper stammen. Im MR wurden deutlich mehr Calretinin-positive Exemplare beider Endigungstypen gefunden, als Calretinin-Negative. Im IR traten Calretinin-exprimierende Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen in weit geringeren Anteil auf als im MR. Wie beim Affen fanden sich in den restlichen Muskeln (LR, SR, IO und SO) nur Calretinin-negative en grappe- und Palisadenendigungen (Lienbacher, 2012).

Anhand dieser Daten, aber auch aufgrund der Befunde zu der Morphologie von Palisadenendigungen an Whole-Mount-Präparaten von EOM bei verschiedenen Spezies, die z.T. zeigen konnten, dass en grappe-Endigungen von Axonen ausgingen, die nach distal zum Muskelsehnenübergang ziehen und dort eine oder mehrere Palisadenendigungen bildeten, kann folgendes angenommen werden: Die Axone cholinergischer Neurone in der Peripherie der Augenmuskelkerne innervieren Non-twitch Muskelfasern über multiple en grappe-Endigungen und bilden an der Spitze der Muskelfaser am Übergang in die Sehne eine Palisadenendigung. Dafür sprechen auch neueste Befunde einer Entwicklungsstudie zu Palisadenendigungen an der Katze (Blumer et al., 2017). Bei neugeborenen Katzen findet man in der EOM nur Axone mit multiplen Endigungen, die entlang der Muskelfasern in Richtung Muskelsehnenübergang gerichtet sind. In der EOM von 2 und 8 Wochen alten Katzen sieht man Axone bis zum Muskelsehnenübergang reichend, und nach 22 Wochen lassen sich zahlreiche Palisadenendigungen identifizieren, die von den um 180° umschlagenden Axonen an den Muskelfaserspitzen gebildet werden (Blumer et al., 2017).

5.6 Welche Funktion haben die Palisadenendigungen?

Die Funktion der Palisadenendigungen ist trotz vieler Untersuchungen bis heute nicht sicher geklärt. Palisadenendigungen wurden von verschiedenen Autoren ebenso dem sensiblen wie dem motorischen System zugeordnet, auch eine kombinierte sensomotorische Funktion wurde diskutiert (Übersicht: Donaldson, 2000; Büttner and Büttner-Ennever, 2006).

Aufgrund der Lage im Muskelsehnenübergang und der zahlreichen Synapsen im Sehnenbereich würde man den Palisadenendigungen eher eine sensible Funktion zuordnen (Donaldson, 2000; Blumer et al., 2016). Allerdings konnten Tracerversuche im Affen zeigen, dass die Zellkörper der Palisadenendigungen im Randbereich des Ncl. Oculomotorius liegen, ebenso konnte in Versuchen im Affen bzw. der Katze gezeigt werden, dass es nach Läsion der motorischen Nerven oder der Hirnnervenkerne der EOM zu einer Degeneration der Palisadenendigungen kommt (Tozer and Sherrington, 1910; Sas and Scháb, 1952; Büttner-Ennever et al., 2001; Lienbacher et al., 2011b; Zimmermann et al., 2011). Neben der Lage der Neurone im Hirnstamm, spricht die Expression cholinergischer Marker für eine motorische Funktion (Konakci et al., 2005; Rungaldier et al., 2009). Obwohl die gesamte EOM Palisadenendigungen enthält, so zeigt der MR einige Besonderheiten:

Der MR enthält beim Primaten die meisten Muskelfasern (Oh et al., 2001b). In allen Spezies mit frontal ausgerichteten Augen weist innerhalb der geraden Augenmuskeln der MR die höchste Dichte an Palisadenendigungen auf (Laessing, 2013; Blumer et al., 2016). In Spezies mit lateral ständigen Augen, finden sich dagegen oft nur wenige, oder schlecht ausgebildete Palisadenendigungen in den geraden Augenmuskeln (Blumer et al., 2016). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nur der MR (und IR in geringerem Maße) einen großen Anteil von Palisadenendigungen mit besonderen histochemischen Eigenschaften, nämlich der Expression von Calretinin, enthält.

Eine besondere Funktion nimmt der MR bei Konvergenzbewegungen der Augen wahr, wie sie z.B. bei Fixierung von nahen Objekten erforderlich ist (Leigh and Zee, 2015). Vor allem bei Fixierung von Objekten im unteren Gesichtsfeld beteiligt sich außerdem der IR (Mok et al., 1992; Thömke, 2008). Die hohe Anzahl an Palisadenendigungen, sowie die Expression von Calretinin in zahlreichen Palisadenendigungen unterstützen eine besondere Rolle des MR, wie bei Konvergenzbewegung der Augen.

Im Affen konnte durch Trakt-Tracer-Studien gezeigt werden, dass die C-Gruppe, welche die Zellkörper der Palisadenendigungen des MR und IR enthält, selektive Eingänge aus dem Prätektum erhält (Büttner-Ennever et al., 1996), die gleichermaßen auf parasymphatische präganglionäre Neurone im Edinger-Westphal-Kern projizieren (Sun and May, 2014). Stimulation dieser Neurone bewirken eine Kontraktion des M. ciliaris und damit die Akkommodationsreaktion der Linse und Pupillenkonstriktion im Rahmen der Naheinstellungstrias, die noch die Konvergenzreaktion beider Augen involviert (Mays and Porter, 1984; Büttner-Ennever et al., 1996). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass Dendriten vor allem der MR-Gruppe innerhalb der C-Gruppe weit nach dorsal reichen bis zum Edinger-Westphal-Kern, und damit vermutlich dieselben Eingänge erhalten (Büttner-Ennever et al., 2001; Erichsen et al., 2014; Tang et al., 2015; Blumer et al., 2016). Diese Verknüpfungen bekräftigen die Annahme, dass Neurone der C-Gruppe, die auch die Zellkörper vor allem des MR enthält, an der Konvergenzbewegung beteiligt sind.

5.7 Calretinin als Marker für sensible Fasern?

Calretinin konnte dabei bereits in verschiedenen Systemen in sensiblen Nervenfasern nachgewiesen werden. So fand sich in primären vestibulären Afferenzen eine Calretinin-Expression (Desmadryl and Dechesne, 1992) oder in Nervenfasern im Glomus caroticus der Ratte (Ichikawa et al., 1995; Ichikawa, 2002). Häufig wiesen letztere eine Koexpression mit Substanz P auf. Die Perikaria der sensiblen Innervation des Glomus caroticus liegen dabei u.a. im Ganglion inferius des N. glossopharyngeus (Ichikawa, 2002). Einige Arbeiten zeigten, dass Calretinin in den Afferenzen der Zahnpulpa und der periodontalen Ligamente exprimiert wird (Ichikawa et al., 1995; Ochi et al., 1997). Immunhistochemische Untersuchungen in der Ratte zeigten weiterhin, dass zum einen Calretinin in großen und kleinen Spinalganglienzellen exprimiert wird, und zum anderen peripher in Nervenendigungen in Vater-Pacini-Körperchen, in den lanzettförmigen Nervenendigungen an Haarfollikeln und an Tastkörperchen (Duc et al., 1994). Daraus war gefolgert worden, dass Calretinin vor allem in Afferenzen von schnell adaptierenden Mechanorezeptoren auftritt (Duc et al., 1994). Im Rückenmark von Ratten wurden CR-positive Endigungen im Hinterhorn in der Lamina I und II und an Zellen der Clark'schen Säule identifiziert, sowie CR-positive Fasern innerhalb der Hinterstrangbahnen. Weder in den Motoneuronen noch in den absteigenden Bahnen des Tractus corticospinalis wurde CR-Immunoreaktivität beschrieben, woraus CR als ein Marker für Schmerz- und propriozeptive Afferenzen vermutet wurde (Ren et al., 1993).

In der skelettalen Muskulatur der Ratte wurde demonstriert, dass die annulospiralen Endigungen der Muskelspindeln Calretinin exprimieren (Duc et al., 1994). Annulospirale Endigungen repräsentieren die Endigungen von sensiblen 1A Afferenzen, dazu wurde kürzlich gezeigt, dass die Muskelspindelafferenzen postsynaptisch zusätzlich mit Acetylcholin-Rezeptoren assoziiert sind, wobei die funktionelle Bedeutung nicht klar ist (Schroder et al., 1989; Zhang et al., 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten Calretinin-positive annulospirale Endigungen in den Muskelspindeln in den EOM identifiziert werden – allerdings zeigten nicht alle Muskelspindeln eine Calretininexpression. Die sensible Versorgung der Muskelspindeln in den EOM erfolgt über den ophthalmischen Ast des N. trigeminus, wobei es möglicherweise Speziesunterschiede in der Lokalisation der Zellkörper gibt:

Nach Tracerinjektion in die EOM kommt es zu einer retrograden Markierung von Neuronen im ophthalmischen Teil des Trigeminalganglions oder im Nucleus mesencephalicus N. trigemini, so dass vom Vorhandensein sensibler trigeminaler Fasern in der EOM ausgegangen werden kann (Brodal, 1981; Porter and Donaldson, 1991; Usunoff et al., 1997; Lazarov, 2002; Cavallotti et al., 2005; Wang et al., 2007; Nouriani, 2008; Lienbacher, 2012).

In einer gezielten Untersuchung mit Doppelmarkierungsmethoden im Affen konnten nach Tracerinjektion in die EOM auch eine kleine Anzahl retrograd markierter Calretinin-positiver Neurone im Trigeminalganglion gefunden werden (Lienbacher, 2012). Diese repräsentieren oder enthalten vermutlich die Zellkörper der Calretinin-positiven Muskelspindelafferenzen. Warum nicht alle Muskelspindelafferenzen Calretinin enthalten ist unklar.

5.8 Funktionelle Relevanz von Calretinin in PEs von MR und IR

Ebenso wie Calretinin gehört auch Parvalbumin zu den calcium-bindenden Proteinen der EF-Hand-Familie (Hof et al., 1999). Dieser Proteingruppe werden verschiedene Funktionen zugesprochen, insbesondere die Aufrechterhaltung der Homöostase intrazellulärer Calcium-Ionen (Baimbridge et al., 1992). Parvalbumin konnte in verschiedenen Spezies in en plaque-Nervenendigungen der EOM und im Bereich der SIF-Motoneuronen in den Augenmuskelkernen gefunden werden (de la Cruz et al., 1998; Eberhorn et al., 2005a; Mai and Paxinos, 2011; Lienbacher, 2012). Parvalbumin fand sich dabei nicht in den en grappe- oder Palisadenendigungen. Dazu passt gut die Beobachtung, dass Parvalbumin mit einigen Neuronengruppen im okulomotorischen System – einschließlich der selektiven Expression in SIF-Motoneuronen – assoziiert sind, die schnell-feuernde Neurone repräsentieren (Horn et al., 1995; Horn et al., 2003; Eberhorn et al., 2005a; Leigh and Zee, 2015). Es zeigt sich ebenso, dass Parvalbumin mit Neuronen mit hohem Energieverbrauch assoziiert ist, der nötig ist um hohe Feuerraten zu ermöglichen (Baimbridge et al., 1992; Blumcke and Celio, 1992; Eberhorn et al., 2005a).

Das Vorkommen einer Calretininexpression in en grappe- und Palisadenendigungen im MR und IR könnte ein Hinweis auf eine spezielle Rolle der Palisadenendigungen an der Konvergenzbewegung sein, da diese beiden Muskeln vornehmlich an der Konvergenzbewegung beteiligt sind (Leigh and Zee, 2015). Unter der Annahme, dass Palisadenendigungen an der Konvergenzbewegung im Rahmen der Naheinstellungstrias funktionell beteiligt sind, könnte den Endigungen in diesem Zusammenhang eine propriozeptive Rolle zukommen. Im Ziliarmuskel messen die Calretinin-exprimierenden Propriozeptoren die Dehnung der Sehne (Flugel-Koch et al., 2009). Aufgrund der Lage der Palisadenendigungen am Muskelsehnenübergang und der Calretinin-Expression könnten die Palisadenendigungen bei der Messung des Dehnungsgrades der Sehne während der Konvergenzbewegung eine Rolle spielen (Büttner and Büttner-Ennever, 2006; Lienbacher, 2012).

5.9 Spiralendigungen

Eine Sonderstellung nehmen auch die in der EOM beschriebenen Spiralendigungen ein (Daniel, 1946; Sas and Appeltauer, 1963), die hier ebenfalls in zwei Gruppen auftraten: Calretinin- positive und Calretinin-negative Endigungen. Ebenso wie bei den Palisadenendigungen wurden auch die Spiralendigungen aufgrund ihrer Aufwicklung um einzelne Muskelfasern und ihrer histochemischen Eigenschaften von verschiedenen Autoren einmal dem motorischen, ein andermal dem sensorischen System zugeordnet. Wegen struktureller Gemeinsamkeiten mit motorischen Axonen sah Ruskell eher Hinweise für eine motorische Funktion von Spiralendigungen: Er konnte zeigen, dass die synaptischen Vesikel in den Synapsen der Spiralendigungen Acetylcholin enthalten, eine Basallamina im synaptischen Spalt ausbilden und die postsynaptische Membran eingefaltet ist, ähnlich wie bei den motorischen Endplatten (Ruskell and Wilson, 1983; Ruskell, 1984; Blumer et al., 2001). Die Aufwicklung um einzelne Muskelfasern, weshalb eine Änderung des Querschnittes der Muskelfasern und damit der Kontraktion wahrgenommen werden könnte, wurde als Indiz für eine sensible Funktion der Spiralendigungen gesehen (Dogiel, 1906; Cooper and Fillenz, 1955; Batini and Horcholle-Bossavit, 1979; Donaldson, 2000).

In einer Trakt-Tracer-Studie in der Katze wurden nach Injektion in den Ncl. Oculomotorius, aber auch nach Injektion in das Trigeminalganglion Spiraleindigungen anterograd markiert (Billig et al., 1997). Billig schloss daraus, dass es unter den Spiraleindigungen in der Katze sowohl afferente, als auch efferente Exemplare geben könnte, die dann möglicherweise über Calretinin-positive und -negative Spiraleindigungen repräsentiert werden könnten. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass alle Spiraleindigungen ChAT exprimieren, was auf eine motorische Funktion hindeutet. In einer Tracer-Untersuchung am Affen konnte nach einer Injektion in den nIII eine anterograde Anfärbung von vereinzelt Spiraleindigungen in der EOM gefunden werden (Lienbacher, 2012). Unter den ChAT-markierten Exemplaren fanden sich CR-positive und CR-negative Exemplare, sodass anhand dieser Färbemethode keine Unterscheidung in efferente bzw. afferent Subgruppen gemacht werden konnte.

5.10 Klinische Relevanz

Mit der Annahme, dass Palisadenendigungen eine propriozeptive Funktion zukommt, insbesondere im Bereich der Konvergenzbewegung, stellt sich die Frage, inwieweit es zu einer Beeinträchtigung der Augenbewegung bei einem Defekt der Palisadenendigungen kommt.

In einer Untersuchung der EOM von Patienten mit erworbenen bzw. kongenitalem Strabismus, sowie kongenitalem Nystagmus fanden sich bei Patienten mit kongenitalen Störungen Palisadenendigungen, die sich in ihrer Morphologie von Palisadenendigungen von nicht erkrankten Patienten, bzw. Patienten mit erworbenem Strabismus unterschieden (Park et al., 2009). Die Nervenendigungen waren bei den kongenitalen Pathologien kleiner und Axone und Schwannzellen erschienen degeneriert (Park et al., 2009). Morphologische Auffälligkeiten der Nervenendigungen am distalen Muskelsehnenübergang in Patienten mit kongenitalem Strabismus zeigte bereits Corsi et al. 1990 (Corsi et al., 1990). Diese Ergebnisse in Patienten mit kongenitalen Störungen weisen auf einen Defekt der Propriozeption der EOM hin, der eine wichtige Rolle in der Entstehung dieser Krankheitsbilder hat.

Nach mehrmaligen Resektionen des Augenmuskelsehnenübergangs, und damit der Mitentfernung von Palisadenendigungen in diesem Bereich bei Strabismusoperationen kam es entgegen der Erwartung eher zu einer Verschlechterung der Blickeinstellung (Steinbach and Smith, 1981), so dass von einer funktionellen Beteiligung der Palisadenendigungen am binoculären Sehen im Menschen ausgegangen werden kann.

Auch in der Genexpression fanden sich in der EOM Unterschiede zwischen Proben von Strabismuspatienten und der Muskulatur von nicht erkrankten Patienten. So fanden Veränderungen in der Genexpression sowohl von Genen die mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind, aber von solchen im intrazellulären Bereich der Muskelfasern, darunter auch von Regulatoren des Calciumhaushalts in der Zelle (z.B. eine Downregulation von verschiedenen Troponinen oder der Myosin Heavy Chain-2-Expression in den Strabismusfällen) (Altick et al., 2012).

5.11 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen nochmals das funktionelle Zusammenspiel von en grappe-Endigungen und Palisadenendigungen. Wie genau diese beiden Nervenendigungen zusammengehören konnte auch hier nicht geklärt werden.

Aufgrund der Schnittführung der Flachschnitte konnten die Nervenendigungen hier oft nicht weiter verfolgt werden um eine sichere morphologische Kontinuität von Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen im Muskel zu zeigen. Eine Untersuchung der extraokulären Muskulatur mittels „Whole Mount“-Technik dieser Präparate könnte theoretisch einen Nachweis der Zusammengehörigkeit dieser Nervenfasern innerhalb der EOM zeigen, allerdings ist die komplette Penetration der relativ dicken Augenmuskeln mit den Antikörpern Voraussetzung.

Aufgrund der bereits morphologischen Untersuchungen von Palisadenendigungen in kongenitalen Strabismus- und Nystagmusfällen und den dabei gefundenen Auffälligkeiten, wäre eine systematische Analyse der immunhistochemischen Eigenschaften sinnvoll. Besonders die Untersuchung der pathologischen Fälle auf die Expression von Calretinin, als Marker mit Assoziation zum propriozeptiven System in den Nervenendigungen der EOM wäre von großen Interesse (Park et al., 2009).

Eine weitere systematische Untersuchung der speziellen fokalen Endigungen anhand von Querschnitten in den einzelnen äußeren Augenmuskeln könnte weitere Hinweise auf die Lokalisation der Endigungen liefern. Von besonderem Interesse wäre dabei die Einordnung der Endigungen in die orbitale bzw. globale Schicht. Auch die Lage der Zellkörper der fokalen Endigungen ist noch ungeklärt. Im Kernbereich des nIII konnten in dieser Untersuchung wenige Calretinin und ChAT exprimierende Neurone gefunden werden. Durch ihre Lage und histochemischen Eigenschaften könnten sie die Zellkörper der fokalen Endigungen im Bereich des Nerveneintritts darstellen. Dies bedarf allerdings noch weitergehenden Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Nur durch ein präzises Zusammenspiel der äußeren Augenmuskulatur ist es möglich, unsere Umwelt als scharfes Bild wahrzunehmen. Neben den visuellen Informationen scheint das Auge ebenfalls Propriozeptoren für das binokulare Sehen zu nutzen. Die motorische Innervation der Muskelfasern erfolgt über en plaque-Endigungen an Twitch-Muskelfasern (SIF) und multiple en grappe-Endigungen an Non-twitch-Muskelfasern (MIF). Anhand vorheriger Untersuchungen besagt eine Hypothese, dass Palisadenendigungen an der propriozeptiven Funktion zusammen mit den en grappe-Endigungen beteiligt sind. Um ein besseres Verständnis über die Funktion dieser Endigungen zu erhalten, wurde in dieser Arbeit, wie schon zuvor in Untersuchungen im Affen, die Calretinin-Expression in der Innervation der äußeren Augenmuskulatur, anhand von immunhistochemischen Färbungen an Flachschnitten untersucht. Calretinin (CR) ist ein calcium-bindendes Protein, das unter anderem mit dem sensiblen System assoziiert ist. Um die Zellkörper der Palisadenendigungen auch im Menschen zu identifizieren wurden außerdem Neurone in Hirnstammschnitten im Bereich des Okulomotoriuskerns (nIII) auf die Expression von CR und Cholinacetyltransferase (ChAT) untersucht.

In dieser Arbeit konnte in den Augenmuskelschnitten gezeigt werden, dass en plaque-Endigungen stets Calretinin-negativ sind. In allen Augenmuskeln fanden sich Calretinin-negative Palisadenendigungen und en grappe-Endigungen, nur im M. rectus medialis und M. rectus inferior gab es zusätzlich Calretinin-positive Exemplare. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch Spiralendigungen und Muskelspindeln in einer Calretinin-positiven und Calretinin-negativen Form in der äußeren Augenmuskulatur vorkommen. In allen Augenmuskeln konnten dünne Calretinin-positive Nervenfasern in den Gefäßwänden und zwischen den Muskelfasern identifiziert werden, die kein ChAT exprimieren und vermutlich vegetative oder sensible Endigungen darstellen. Bei der Auswertung der Gehirnschnitte fanden sich zwischen den Okulomotoriuskernen, im Bereich der MIF-Motoneurone eine Subgruppe, die sowohl Calretinin, als auch ChAT exprimiert. An Hand der Daten beim Affen werden diese Neurone als eine Subgruppe der Zellkörper von Palisadenendigungen angesehen. Das selektive Auftreten von Calretinin-positiven Palisadenendigungen nur in den Mm. rectus medialis und rectus inferior legt eine funktionelle Rolle dieser Population von Palisadenendigungen bei Konvergenzbewegungen der Augen nahe. Allerdings konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, ob die en grappe- und Palisadenendigungen die Nervenendigungen eines Zellkörpers, oder von zwei unterschiedlichen Zellkörpern sind, es bekräftigt allerdings die Annahme, dass die beiden Endigungen eine funktionelle Einheit bilden.

7. Anhang

7.1 Verwendete Augenmuskelschnitte

M. rectus medialis			
Fall	SNAP-25/CR	ChAT/CR	CR/SMHC (ABM)
Fall A2	58	53	
	63	65	
	79		
Fall A3	37	25	
	41	53	
	57		
Fall A4	65	77	
	79	95	
Fall A5	53	153	
	143	167	
	175		
Fall A6	133	125	
Fall A7	49		
Fall A10	35		
	45		
	55		
Fall A12	52		81
	53		
	59		
	61		
	68		
	71		
	73		
Fall A13	81	143	141
	122		
	132		
	153		
Fall A15	33		

Tabelle 15: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus medialis. SNAP-25/CR und ChAT/CR in Immunfluoreszenzfärbung, CR/SMHC in Avidin-Biotin-Methode (ABM).

M. rectus lateralis			
Fall	SNAP-25/CR	ChAT/CR	SNAP-25/SMHC (ABM)
Fall A2	65	73	
	69	75	
Fall A3	87	69	
	91	89	
Fall A4	45	67	
	53	75	
	69		
Fall A5	49	57	
	63	69	
	67		
Fall A6	47		
Fall A7	13	30	
	36	38	
Fall A9	37		
Fall A10	37		
	43		
	47		
Fall A11	79		
Fall A13	121		
	131		
	142		
Fall A14	38		
Fall A15			31
			63
Fall A16			72

Tabelle 16: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus lateralis.

M. rectus inferior			
Fall	SNAP-25/CR	ChAT/CR	CR/SMHC (ABM)
Fall A8	37	41	
	48	44	
	50		
Fall A10	16		63
	23		
	32		
	36		
	42		
Fall A13	32	33	51
	61	93	61
	62	113	
	92	131	
	102		
	112		

Tabelle 17: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus inferior.

M. rectus superior			
Fall	SNAP-25/CR	ChAT/CR	CR/SMCH (ABM)
Fall A1	68	75	
	72	80	
	75		
	77		
	80		
Fall A6	31	66	88
	91	84	
		85	
Fall A12	11		77
	61		
	77		
	121		
	131		
Fall A13	21		
	32		
	42		
	52		
	61		
	71		
Fall A10	23		
	27		
	33		
	84		

Tabelle 18: Verwendete Augenmuskelschnitte M. rectus superior.

M. obliquus inferior			
Fall	SNAP-25/CR	ChAT/CR	CR/SMHC (ABM)
Fall A1	60	57	58
	68	65	69
	70		
Fall A10	7		
	17		
	22		
Fall A12	25	36	
	34		
Fall A13	12	13	11
	32	33	21
	42	63	31
	52	93	61
	81		

Tabelle 19: Verwendete Augenmuskelschnitte M. obliquus inferior.

M. obliquus superior			
Fall	SNAP-25/CR	ChAT/CR	SNAP-25/SMHC (ABM)
Fall A4	34	39	56
	33	52	
	42		
Fall A10	63		
	67		
	72		
	76		
	84		
	88		
Fall A13	61		
	71		
	81		
	91		
	102		
Fall A15	38	47	
	43	57	
	52		

Tabelle 20: Verwendete Augenmuskelschnitte M. obliquus superior.

7.2 Verwendete Lösungen

4% Paraformaldehyd in 0,1 M PBS pH 7,4 für 3 Liter:

> Lösung A:

- * 1500 ml Aqua dest.auf 60°C erwärmen
- * 120 g Paraformaldehyd.....langsam unter Rühren dazugeben
- * 5 Tropfen 40% NaOH/ Natriumhydroxid.....dazugeben
- * Anschließend filtrieren

> Lösung B: 1500 ml 0,2M PBS, pH 7,4

- * Lösung A und Lösung B.....kurz vor dem Gebrauch zusammenführen
- * pH-Wert auf 7,4 einstellen
- * Die Gesamtlösung im Kühlschrank aufbewahren

Methanol:

Fertiglösung: Merck, CH₃OH, 1 Liter = 0.79 kg, M = 32,04 g/Mol,

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany

Sucroselösung:

> 10%ig: 50 g Sucrose in 500 ml 0,1M PBS, pH 7,4

> 20%ig: 100 g Sucrose in 500 ml 0,1M PBS, pH 7,4

> 30%ig: 150 g Sucrose in 500 ml 0,1M PBS, pH 7,4

Phosphat Buffer Saline (PBS) 0,1M pH 7,4:

> für 5 Liter:

- Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	72,1 g
- NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	13,1 g
- NaCl	40 g
- KCl	1,0 g

in 5 Liter Aqua dest. lösen und pH 7,4 mit NaOH oder HCl einstellen

Tris-Puffer (TBS/Tri buffered saline) 0,1M, pH 7,4:

- Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethane	24,2 g
- NaCl	17,0 g

und pH 7,4 einstellen

Tris-Puffer (TBS/Tri buffered saline) 0,05M, pH 7,6:

- Trizma HCl 3,3g
- Trizma Base 0,48g

in 500 ml Aqua dest. lösen und pH 7,6 einstellen

0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4:

1,5 ml Triton in 500 ml 0,1M TBS pH 7,4

2% Rinderserumalbumin:

1 g Albumin bovine in 50 ml 0,1M TBS pH 7,4

0,9% NaCl-Lösung:

für 1Liter

- 9 g NaCl in 1000 ml Aqua dest. lösen

- Aufbewahrung im Kühlschrank

ExtrAvidin-Peroxidase:

Fertiglösung: Sigma-Aldrich, Co.,3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA (314-771-5765, E2886-1ML)

Citrate Puffer 0,01M pH 6,0:

für Mikrowellenbad Paraffinschnitte

- 2,1 g Zitronensäuremonohydrat

- 900 ml Aqua dest.

- mit 2M NaOH auf pH-Wert 6,0 einstellen

- mit Aqua dest. bis 1000 ml auffüllen

(2M NaOH = 8 g NaOH in 200 ml Aqua dest. gelöst)

DPX:

Fertiglösung: Mountant for histology, Sigma Life Science, USA, Einschlussmittel für die Histologie

Enthält: Distyrene plasticizer and xylene

7.3 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper						
F vs. H	Antikörper	Wirt	Antigen	Nr.	Hersteller	Verdünnung
F	Calretinin	Kaninchen	Calretinin	7699/4	SWant, Swiss	1:1000
H	Calretinin	Kaninchen	Calretinin	7699/4	SWant, Swiss	1:2500
F	ChAT	Ziege	Cholinacetyltransferase	AB144P	Chemicon, USA	1:50
H	ChAT	Ziege	Cholinacetyltransferase	AB144P	Chemicon, USA	1:50
F	SMI81	Maus	SNAP-25	SMI81 1R	Sternberger, USA	1:2000
H	SMI81	Maus	SNAP-25	SMI81 1R	Sternberger, USA	1:2500
H	SMHC	Maus	Myosin Heavy Chain Slow	NCL-MHCs	Novocastra, UK	1:100

Table 21: Auflistung der verwendeten primären Antikörper. Es finden sich unterschiedliche Verdünnungen bei Verwendung für Fluoreszenzschnitte (F) und Hellfeldschnitte (H).

Sekundäre Antikörper						
Wirt	Antigen	Nr.	Marker	Hersteller	Verdünnung	
Pferd	Maus	BA2001	Biotin	Vector, USA	1:200	
Ziege	Kaninchen	BA1000	Biotin	Vector, USA	1:200	
Esel	Kaninchen	A21206	Alexa-Grün	Life technologies, USA	1:200	
Esel	Maus	715-165-151	Cy3-Rot	Jackson Immuno Research, USA	1:200	
Esel	Maus	A21201	Alexa-Grün	Life technologies, USA	1:200	
Esel	Kaninchen	711-165-152	Cy3-Rot	Jackson Immuno Research, USA	1:200	
Esel	Ziege	705-165-147	Cy3-Rot	Jackson Immuno Research, USA	1:200	

Table 22: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.

7.4 Färbeprotokolle

7.4.1 Van Gieson-Färbung

Färbelösung:

Weigert's Eisenhämatoxylin

- Lösung A: 1 g Hämatoxylin in 100 ml 96% Alkohol
(Die Lösung sollte eine Woche reifen)
- Lösung B: 1,5 g Eisen-(III)-Chlorid wasserfrei in 100 ml Aqua dest. lösen und 1 ml 37%ige Salzsäure zusetzen
- Endlösung = Lösung C: Vor Gebrauch Lösung A und Lösung B 1:1 mischen (diese Gebrauchslösung hält nur wenige Tage)

Pikrofuchsin

- Lösung A: 1000 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure abfiltrieren
- Lösung B: 1 g Säurefuchsin in 50 ml Aqua dest. lösen
- Lösung C: 1000 ml Lösung A und 50 ml Lösung B mischen
- Vor Gebrauch 100 ml Lösung C + 1 ml 1%ige Essigsäure

Anleitung:

- * Aqua dest.2-5 min waschen
- * Weigert's Eisenhämatoxylin.....2 min
- * Fließendes Leitungswasser.....10 min
- * Abtrocknen mit Filterpapier
- * Pikrofuchsinlösung.....1 min
- * Abschleudern der Farblösung
- * Alkohol 96%.....2 min
- * Alkohol 100%.....5 min
- * Xylol.....2x 15 min
- * Eindecken

7.4.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

7.4.2.1 SNAP-25 und Calretinin Version 1 (SNAP-25 grün, CR rot)

Mouse anti- SNAP-25 (SMI 81) (Alexa - Grün) + Rabbit anti-Calretinin (Cy³ - Rot)

Antikörper

- Mouse anti SNAP-25 = Sternberger Monoclonas Incorporated; Cat Nr. SMI 81

- Rabbit anti-Calretinin = SWant, 7699/4

Anleitung:

1. Tag

* 0,1M TBS pH 7,4.....10 min

* Präinkubation:1h bei RT

- 5% Normal Donkey Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

* 1. Antikörper:48 h bei 4°C

- Mouse anti-SMI 81 (1:2000) + Rabbit anti-CR (1:1000)

- in [5% Normal Donkey Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2. Tag

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* 2. fluoreszenzmarkierter Antikörper:2 h bei RT

- Alexa-Grün: Donkey anti-Mouse (1:200)

- Cy³-Rot: Donkey anti-Rabbit (1:200)

- in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* Aqua dest.5 min

* Trocknen lassen

* Eindecken in Gel/Mount

7.4.2.2 SNAP-25 und Calretinin Version 2 (SNAP-25 rot, CR grün)

Rabbit anti-Calretinin (Alexa - Grün) + Mouse anti- SNAP-25 (SMI 81) (Cy³ - Rot)

Antikörper:

-Rabbit anti-Calretinin = SWant, 7699/4

-Mouse anti SNAP-25 = Sternberger Monoclonas Incorporated; Cat Nr. SMI 81

Anleitung:

1.Tag

* 0,1M TBS pH 7,4.....10 min

Präinkubation:1h bei RT

- 5% Normal Donkey Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

* 1. Antikörper:24 h bei RT

- Rabbit anti-CR (1:1000) + Mouse anti-SMI81 (1:2000)

- in [5% Normal Donkey Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2. Tag

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* 2. fluoreszenzmarkierter Antikörper:2 h bei RT

- Alexa-Grün: Donkey anti-Rabbit (1:200)

- Cy³-Rot: Donkey anti-Mouse (1:200)

- in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* Aqua dest.5 min

* Trocknen lassen

* Eindecken in Gel/Mount

7.4.2.3 ChAT und Calretinin

Rabbit anti-Calretinin (Alexa - Grün) + Goat anti-ChAT (Cy³ - Rot)

Antikörper:

- Polyclonal goat anti-choline Acetyltransferase = Chemicon, AB144P
- Rabbit anti-Calretinin = SWant, 7699/4

Anleitung:

1.Tag

- * 0,1M TBS pH 7,4.....10 min
- * Präinkubation:1h bei RT
 - 5% Normal Donkey Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4
- * 1. Antikörper:24 h bei RT
 - Goat anti-ChAT (1:50) + Rabbit anti-Calretinin (1:1000)
 - in [5% Normal Donkey Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2. Tag

- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * 2. fluoresziert Antikörper:2 h bei RT
 - Alexa-Grün: Donkey anti-Rabbit (1:200)
 - Cy³-Rot: Donkey anti-Goat (1:200)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * Aqua dest.5 min
 - * Trocknen lassen
 - * Eindecken in Gel/Mount
-

7.4.3 Doppelfärbung mittels Avidin-Biotin-Methode

7.4.3.1 SNAP-25 und SMHC

Mouse anti-SMI81 (EAP + DAB-Ni) + Mouse anti-MHCS (EAP + -DAB)

Antikörper:

- Mouse monoclonal Myosin Heavy Chain (slow) NCL-MHCs = Novocastra
- Mouse monoclonal antibody to SNAP-25 = Sternberger Monoclonals Incorporated; Cat. Nr. SMI81

Anleitung:

1.Tag

- * 0,1M TBS pH 7,4.....10 min
- * Peroxidaseblockierung:30 min
 - 1% H₂O₂ in 100% Methanol
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Präinkubation:1h bei RT
 - 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4
- * 1. Antikörper:24 h bei RT
 - Mouse anti-SMI81 (SNAP-25) (1:2500)
 - in [5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2.Tag

- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Biotinlierter 2. Antikörper: 1h bei RT
 - Biot. Horse anti-Mouse (1:200)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Extravidin-Peroxidase.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT
 - Extravidin-Peroxidase (1:1000)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

- * DAB-Nickel-Reaktion:10 min
- 0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6
 - > Lösung A = 40 mg Ammonium Nickel in 20 ml 0,05M TBS pH 7,6 >> gut filtrieren
 - > Lösung B = 0,025% DAB= 0,5 ml von 1%iger DAB-Stocklösung in Lösung A
 - > Lösung C = Endlösung= 10 µl 30% H₂O₂ in Lösung B für etwa 10 Minuten
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Peroxidaseblockierung:30 min
- 1% H₂O₂ in 0,1M TBS pH 7,4
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Präinkubation:1h bei RT
- 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4
- * 1. Antikörper: 24 h bei RT
- Mouse anti-MHCS (1:100)
 - in [5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]
- 3.Tag**
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Biotinlierter 2. Antikörper: 1h bei RT
- Biot. Horse anti-Mouse (1:200)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Extravidin-Peroxidase.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT
- Extravidin-Peroxidase (1:1000)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * DAB Reaktion:10 min
- 0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6
 - > Lösung A = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 20ml 0,05M TBS pH 7,6
 - > Endlösung = Lösung A + 10 µl 30%H₂O₂
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* Kurz in Aqua dest.

* Trocknen lassen

* Eindecken

7.4.3.2 Calretinin und SMHC

Rabbit anti-Calretinin (EAP + DAB-Ni) + Mouse anti-MHCS (EAP + -DAB)

Antikörper:

- Mouse monoclonal Myosin Heavy Chain (slow) NCL-MHCs = Novocastra

- Polyclonal Rabbit anti-Calretinin = SWant, 7699/4

Anleitung:

1.Tag

* 0,1M TBS pH 7,4.....10 min

* Peroxidaseblockierung:30 min

- 1% H₂O₂ in 100% Methanol

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* Präinkubation:1h bei RT

- 5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4

* 1. Antikörper:24 h bei RT

- Polyclonal rabbit anti-Calretinin (1:2500)

- in [5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2.Tag

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* Biotinlierter 2. Antikörper: 1h bei RT

- Biot. Goat anti-Rabbit (1:200)

- in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* Extravidin-Peroxidase.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT

- Extravidin-Peroxidase (1:1000)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * DAB-Nickel-Reaktion:10 min
 - 0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6
 - > Lösung A = 40 mg Ammonium Nickel in 20 ml 0,05M TBS pH 7,6 >> gut filtrieren
 - > Lösung B = 0,025% DAB= 0,5 ml von 1%iger DAB-Stocklösung in Lösung A
 - > Lösung C = Endlösung= 10 µl 30% H₂O₂ in Lösung B für etwa 10 Minuten
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * Peroxidaseblockierung:30 min
 - 1% H₂O₂ in 0,1M TBS pH 7,4
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * Präinkubation:1h bei RT
 - 5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4
 - * 1. Antikörper: 24 h bei RT
 - Mouse anti-MHCS (1:100)
 - in [5% Normal Horse Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]
- 3.Tag**
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * Biotinlierter 2. Antikörper: 1h bei RT
 - Biot. Horse anti-Mouse (1:200)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * Extravidin-Peroxidase.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT
 - Extravidin-Peroxidase (1:1000)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * DAB Reaktion:10 min
 - 0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6

> Lösung A = 0,5 ml von 1% DAB-Stocklösung in 20ml 0,05M TBS pH 7,6

> Endlösung = Lösung A + 10 µl 30% H_2O_2

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

* Kurz in Aqua dest.

* Trocknen lassen

* Eindecken

7.4.4 Nisslfärbung für Paraffinschnitte

Farblösung:

0,5 g Kresylviolett in 100 ml Aqua dest. pH 7,4

Anleitung:

* Xylol.....2x 30 min

* Absteigende Alkoholreihe:

- 10 min 100% Alkohol

- 10 min 96% Alkohol

- 10 min 90% Alkohol

- 10 min 70% Alkohol

* Aqua dest.2x 5 min

* Kresylviolett.....1-2 min

* Aqua dest.kurz spülen

* 3 Tropfen Eisessig in 100 ml Aqua dest.5 min

* Aqua dest.kurz waschen

* Aufsteigende Alkoholreihe:

- 5 min 70% Alkohol

- 5 min 90% Alkohol

- 5 min 96% Alkohol

> Kurze Kontrolle der Schnitte, bei zu geringer Differenzierung 96%igen Alkohol mit 3 Tropfen Eisessig

- 5 min 100% Alkohol

* Xylol.....2x 15 min

* Eindecken

7.4.5 Immunhistochemische Färbung mit DAB der Gehirnschnitte

7.4.5.1 Vorbehandlung

Vorbehandlung der Gehirnschnitte am 1. Färbetag

* Schnitte entparaffinieren und rehydrieren

- 15 min Xylol
- 15 min Xylol (2. Küvette)
- 10 min 100% Alkohol
- 10 min 96% Alkohol
- 10 min 90% Alkohol
- 10 min 70% Alkohol
- kurz in Aqua dest.

* Schnitte in Citrat-Puffer 0,01M pH 6,0 in Kunststoff-Küvette.....5x3 min in Mikrowelle
(dazwischen Citrat-Puffer nachfüllen)

* In Citrat-Puffer abkühlen lassen.....etwa 10 min bei RT

* 3x 0,1M TBS pH 7,4.....5 min

7.4.5.2 Calretinin

Rabbit anti-Calretinin (DAB-Nickel)

Antikörper:

- Polyclonal rabbit anti-Calretinin -= SWant, 7699/4

Anleitung:

1.Tag

- * 0,1M TBS pH 7,4.....10 min
- * Peroxidaseblockierung:30 min
 - 1% H₂O₂ in 100% Methanol
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Präinkubation:1h bei RT
 - 5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4
- * 1. Antikörper:48 h bei 4°C
 - Rabbit anti-CR (1:2500)
 - in [5% Normal Goat Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2.Tag

- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Biotinlierter 2. Antikörper: 1h bei RT
 - Biot. Goat anti-Rabbit (1:200)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * EAP.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT
 - Extravidin-Peroxidase (1:1000)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min

- * DAB-Nickel-Reaktion:10 min
- 0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6
 - > Lösung A = 40 mg Ammonium Nickel in 20 ml 0,05M TBS pH 7,6 >> gut filtrieren
 - > Lösung B = 0,025% DAB= 0,5 ml von 1%iger DAB-Stocklösung in Lösung A
 - > Lösung C = Endlösung= 10 µl 30% H₂O₂ in Lösung B für etwa 10 Minuten
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Aqua dest.5 min
- * Trocknen lassen
- * In Alkoholreihe 70, 90, 96, 100%.....je 5 min
- * 3x Xylol.....2x 5 min und 15 min
- * Eindecken mit DPX
-

7.4.5.3 ChAT

Goat anti-ChAT (DAB-Nickel)

Antikörper:

- Polyclonal goat anti-ChAT =Chemicon, AB144P

Anleitung:

1.Tag

- * 0,1M TBS pH 7,4.....10 min
- * Peroxidaseblockierung:30 min
- 1% H₂O₂ in 100% Methanol
- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
- * Präinkubation:1h bei RT
- 5% Normal Rabbit Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4
- * 1. Antikörper:48 h bei 4°C
- Goat anti-ChAT (1:50)
 - in [5% Normal Rabbit Serum + 0,3% Triton in 0,1M TBS pH 7,4]

2.Tag

- * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * Biotinlierter 2. Antikörper: 1h bei RT
 - Biot. Goat anti-Rabbit (1:200)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * EAP.....30 min vorher ansetzen.....1h bei RT
 - Extravidin-Peroxidase (1:1000)
 - in [0,1M TBS + 2% Rinderserumalbumin (TBS-RSA)]
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * DAB-Nickel-Reaktion:10 min
 - 0,025% DAB + 0,015% H₂O₂ in 0,05M TBS pH 7,6
 - > Lösung A = 40 mg Ammonium Nickel in 20 ml 0,05M TBS pH 7,6 >> gut filtrieren
 - > Lösung B = 0,025% DAB= 0,5 ml von 1%iger DAB-Stocklösung in Lösung A
 - > Lösung C = Endlösung= 10 µl 30% H₂O₂ in Lösung B für etwa 10 Minuten
 - * 3x 0,1M TBS pH 7,4.....je 10 min
 - * Aqua dest.5 min
 - * Trocknen lassen
 - * In Alkoholreihe 70, 90, 96, 100%.....je 5 min
 - * 3x Xylol.....2x 5 min und 15 min
 - * Eindecken mit DPX
-

8. Literatur

- Adal MN. 1969. The fine structure of the sensory region of cat muscle spindles. *J. ultrastruc. Res.* 26:332-353.
- Adamczyk C, Strupp M, Jahn K, Horn AK. 2015. Calretinin as a Marker for Premotor Neurons Involved in Upgaze in Human Brainstem. *Front. Neuroanat.* 9:153.
- Altick AL, Feng CY, Schlauch K, Johnson LA, von Bartheld CS. 2012. Differences in gene expression between strabismic and normal human extraocular muscles. *IOVS* 53:5168-5177.
- Alvarado-Mallart RM, Pincon-Raymond M. 1979. The palisade endings of cat extraocular muscles: a light and electron microscope study. *Tissue & cell* 11:567-584.
- Ardeleanu P. 2007. Abgrenzung funktioneller Nervenzellgruppen in den Augenmuskelkernen des Mittelhirns beim Menschen. Dissertation.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS* 15:303-308.
- Balslev D, Miall RC. 2008. Eye position representation in human anterior parietal cortex. *J. Neurosci.* 28:8968-8972.
- Batini C, Horcholle-Bossavit G. 1979. Extraocular muscle afferents and visual input interactions in the superior colliculus of the cat. *Prog. Brain Res.* 50:335-344.
- Benninghoff AD, D. 2004. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. XII, 876 S.: III., graph. Darst. p.
- Billig I, Buisseret Delmas C, Buisseret P. 1997. Identification of nerve endings in cat extraocular muscles. *Anat. Rec.* 248:566-575.
- Blumcke I, Celio MR. 1992. Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities coexist within cytochrome oxidase-rich compartments of squirrel monkey area 18. *Exp. Brain Res.* 92:39-45.
- Blumer R, Konakci KZ, Brugger PC, Blumer MJ, Moser D, Schoefer C, Lukas JR, Streicher J. 2003. Muscle spindles and Golgi tendon organs in bovine calf extraocular muscle studied by means of double-fluorescent labeling, electron microscopy, and three-dimensional reconstruction. *Exp. Eye Res.* 77:447-462.
- Blumer R, Konakci KZ, Pomikal C, Wieczorek G, Lukas JR, Streicher J. 2009. Palisade endings: cholinergic sensory organs or effector organs? *IOVS* 50:1176-1186.
- Blumer R, Lukas JR, Aigner M, Bittner R, Baumgartner I, Mayr R. 1999. Fine structural analysis of extraocular muscle spindles of a two-year-old human infant. *IOVS* 40:55-64.
- Blumer R, Lukas JR, Wasicky R, Mayr R. 1998. Presence and structure of innervated myotendinous cylinders in sheep extraocular muscle. *Neurosci. Lett.* 248:49-52.
- Blumer R, Lukas JR, Wasicky R, Mayr R. 2000. Presence and morphological variability of Golgi tendon organs in the distal portion of sheep extraocular muscle. *Anat. Rec.* 258:359-368.
- Blumer R, Maurer-Gesek B, Gesslbauer B, Blumer M, Pechriggl E, Davis-Lopez de Carrizosa MA, Horn AK, May PJ, Streicher J, de la Cruz RR, Pastor AM. 2016. Palisade Endings Are a Constant Feature in the Extraocular Muscles of Frontal-Eyed, But Not Lateral-Eyed, Animals. *IOVS* 57:320-331.
- Blumer R, Wasicky R, Hotzenecker W, Lukas JR. 2001. Presence and structure of innervated myotendinous cylinders in rabbit extraocular muscle. *Exp. Eye Res.* 73:787-796.
- Blumer R, Streicher J, Davis-López de Carrizosa MA, de la Cruz RR, Pastor AM. 2017. Palisade Endings of Extraocular Muscles Develop Postnatally Following Different Time Courses. *IOVS* 58:5105-5121.
- Bondi AY, Chiarandini DJ. 1983. Morphologic and electrophysiologic identification of multiply innervated fibers in rat extraocular muscles. *IOVS* 24:516-519.
- Bourne JA. 1983. Handbook of immunoperoxidase staining methods: Dako corporation.
- Brodal A. 1981. Neurological anatomy in relation to clinical medicine: Oxford University Press, USA.
- Bruenech JR, Ruskell GL. 2001. Muscle spindles in extraocular muscles of human infants. *Cell Tiss. Org.* 169:388-394.

- Bruenech R, Ruskell GL. 2000. Myotendinous nerve endings in human infant and adult extraocular muscles. *Anat. Rec.* 260:132-140.
- Brunk UT, Terman A. 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Rad. Biol. Med.* 33:611-619.
- Buisseret P. 1995. Influence of extraocular muscle proprioception on vision. *Physiol. Rev.* 75:323-338.
- Büttner-Ennever JA. 2006. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. *Prog. Brain Res.* 151:95-125.
- Büttner-Ennever JA, Cohen B, Horn AK, Reisine H. 1996. Pretectal projections to the oculomotor complex of the monkey and their role in eye movements. *J. Comp. Neurol.* 366:348-359.
- Büttner-Ennever JA, Horn AK. 2014. Olszewski and Baxter's Cytoarchitecture of the Human Brainstem. *Neuroepi.* 42:69-138.
- Büttner-Ennever JA, Horn AK, Graf W, Ugolini G. 2002. Modern concepts of brainstem anatomy: from extraocular motoneurons to proprioceptive pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 956:75-84.
- Büttner-Ennever JA, Horn AK, Scherberger H, D'Ascanio P. 2001. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 438:318-335.
- Büttner-Ennever JA, Konakci KZ, Blumer R. 2006. Sensory control of extraocular muscles. *Prog. Brain Res.* 151:81-93.
- Büttner U, Buttner-Ennever JA. 2006. Present concepts of oculomotor organization. *Prog. Brain Res.* 151:1-42.
- Camp AJ, Wijesinghe R. 2009. Calretinin: modulator of neuronal excitability. *Int. Journ. Biochem. & Cell Biol.* 41:2118-2121.
- Carpenter RH. 1988. *Movements of the eyes* (2nd rev: Pion Limited).
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* 168:357-363.
- Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, et al. 1993. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Pathol.* 171:83-98.
- Cavallotti C, Frati A, Sagnelli P, Pescosolido N. 2005. Re-evaluation and quantification of the different sources of nerve fibres supplying the rat eye. *J. Anat.* 206:217-224.
- Celio MR, Pauls TL, Schwaller B. 1996. *Guidebook to the Calcium-binding Proteins: Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press.*
- Che Ngwa E, Zeeh C, Messoudi A, Buttner-Ennever JA, Horn AK. 2014. Delineation of motoneuron subgroups supplying individual eye muscles in the human oculomotor nucleus. *Front Neuroanat* 8:2.
- Chiarandini DJ, Stefani E. 1979. Electrophysiological identification of two types of fibres in rat extraocular muscles. *J. Physiol.* 290:453-465.
- Cilimbaris PA. 1910. Histologische Untersuchungen über die Muskelspindeln der Augenmuskeln. *Arch. Mikrosk. Anat.* 75:692-747.
- Connell E, Darios F, Peak-Chew S, Soloviev M, Davletov B. 2009. N-terminal acetylation of the neuronal protein SNAP-25 is revealed by the SMI81 monoclonal antibody. *Biochemistry* 48:9582-9589.
- Cooper S, Daniel PM. 1949. Muscle spindles in human extrinsic eye muscles. *Brain* 72:1-24.
- Cooper S, Fillenz M. 1955. Afferent discharges in response to stretch from the extraocular muscles of the cat and monkey and the innervation of these muscles. *J. Physiol.* 127:400-413.
- Corsi M, Sodi A, Salvi G, Faussonne-Pellegrini MS. 1990. Morphological study of extraocular muscle proprioceptor alterations in congenital strabismus. *Zeitsch. Augenheil.* 200:154-163.
- Dancause N, Taylor MD, Plautz EJ, Radel JD, Whittaker T, Nudo RJ, Feldman AG. 2007. A stretch reflex in extraocular muscles of species purportedly lacking muscle spindles. *Exp. Brain Res.* 180:15-21.

- Daniel P. 1946. Spiral nerve endings in the extrinsic eye muscles of man. *J. Anat.* 80 (Pt 4):189-193.
- de la Cruz RR, Pastor AM, Martinez-Guijarro FJ, Lopez-Garcia C, Delgado-Garcia JM. 1998. Localization of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k in identified extraocular motoneurons and internuclear neurons of the cat. *J Comp. Neurol.* 390:377-391.
- Dechesne CJ, Winsky L, Kim HN, Goping G, Vu TD, Wenthold RJ, Jacobowitz DM. 1991. Identification and ultrastructural localization of a calretinin-like calcium-binding protein (protein 10) in the guinea pig and rat inner ear. *Brain Res.* 560:139-148.
- Demer JL. 2002. The orbital pulley system: a revolution in concepts of orbital anatomy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 956:17-32.
- Demer JL. 2007. Mechanics of the orbita. *Developments in ophthalmology* 40:132-157.
- Demer JL, Miller JM, Poukens V. 1995. Evidence for fibromuscular pulleys of the recti extraocular muscles. *IOVS* 36:1125-1136.
- Demer JL, Oh SY, Poukens V. 2000. Evidence for active control of rectus extraocular muscle pulleys. *IOVS* 41:1280-1290.
- Demer JL, Poukens V, Miller JM, Micevych P. 1997. Innervation of extraocular pulley smooth muscle in monkeys and humans. *IOVS* 38:1774-1785.
- Desmadryl G, Dechesne CJ. 1992. Calretinin immunoreactivity in chinchilla and guinea pig vestibular end organs characterizes the calyx unit subpopulation. *Exp. Brain Res.* 89:105-108.
- Dogiel A. 1906. Die Endigungen der sensiblen Nerven in den Augenmuskeln und deren Sehnen beim Menschen und den Säugetieren. *Arch. Mikrosk. Anat.* 68:501-526.
- Donaldson IM. 2000. The functions of the proprioceptors of the eye muscles. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B*, 355:1685-1754.
- Duc C, Barakat-Walter I, Droz B. 1994. Innervation of putative rapidly adapting mechanoreceptors by calbindin- and calretinin-immunoreactive primary sensory neurons in the rat. *Europ. J. Neurosci.* 6:264-271.
- Eberhorn AC, Ardeleanu P, Buttner-Ennever JA, Horn AK. 2005a. Histochemical differences between motoneurons supplying multiply and singly innervated extraocular muscle fibers. *J. Comp. Neurol.* 491:352-366.
- Eberhorn AC, Horn AK, Eberhorn N, Fischer P, Boergen KP, Buttner-Ennever JA. 2005b. Palisade endings in extraocular eye muscles revealed by SNAP-25 immunoreactivity. *J. Anat.* 206:307-315.
- Eberhorn AC, Horn AK, Fischer P, Buttner-Ennever JA. 2005c. Proprioception and palisade endings in extraocular eye muscles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1039:1-8.
- Erichsen JT, Wright NF, May PJ. 2014. Morphology and ultrastructure of medial rectus subgroup motoneurons in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 522:626-641.
- Fackelmann K, Nouriani A, Horn AK, Buttner-Ennever JA. 2008. Histochemical characterisation of trigeminal neurons that innervate monkey extraocular muscles. *Prog. Brain Res.* 171:17-20.
- Fiorentini A, Berardi N, Maffei L. 1982. Role of extraocular proprioception in the orienting behaviour of cats. *Exp. Brain Res.* 48:113-120.
- Flügel-Koch C, Neuhuber WL, Kaufman PL, Lutjen-Drecoll E. 2009. Morphologic indication for proprioception in the human ciliary muscle. *IOVS* 50:5529-5536.
- Fukuda M. 1958. Studies on the nerve endings in the extrinsic eye muscles of the rabbit. *Jap J Ophthal* 2:93-101.
- Gandevia SC, Burke D. 2004. Peripheral motor system. *The human nervous system*, 2nd edn Elsevier, Amsterdam:113-133.
- Garcia EP, McPherson PS, Chilcote TJ, Takei K, De Camilli P. 1995. rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J. Cell Biol.* 129:105-120.
- Graves AL, Trotter Y, Fregnac Y. 1987. Role of extraocular muscle proprioception in the development of depth perception in cats. *J. Neurophysiol.* 58:816-831.
- Greene T, Jampel R. 1966. Muscle spindles in the extraocular muscles of the macaque. *J. Comp. Neurol.* 126:547-549.

- Harker DW. 1972. The structure and innervation of sheep superior rectus and levator palpebrae extraocular muscles. I. Extrafusal muscle fibers. *IOVS* 11:956-969.
- Hayakawa T, Itoh M, Miki T, Kaneto T, Tomiyama H, Takeuchi Y. 2000. Sympathetic fibers innervating the extraocular muscles: cells of origin in the cat superior cervical ganglion. *Okajimas folia anatomica Japonica* 77(4):119-124.
- Heinrich PC. 2014. Löffler, Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin [u.a.]: Springer. XXIX, 1073 S. p.
- Helmholtz Hv. 1867. 1909–11. *Handbuch der physiologischen Optik*. Leipzig: L Voss Translated by James PC Southall(1924–25) *Treatise on Physiological Optics* 3.
- Hines M. 1931. Studies on the innervation of skeletal muscle. III. Innervation of the extrinsic eye muscles of the rabbit. *Amer. J. Anat* 47:1-53.
- Hof PR, Glezer, II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM. 1999. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J. Chem. Neuroanat.* 16:77-116.
- Hokfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. 1975. Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 190:889-890.
- Horn AK, Bruckner G, Hartig W, Messoudi A. 2003. Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J. Comp. Neurol.* 455:341-352.
- Horn AK, Büttner-Ennever JA, Suzuki Y, Henn V. 1995. Histological identification of premotor neurons for horizontal saccades in monkey and man by parvalbumin immunostaining. *J. Comp. Neurol.* 359:350-363.
- Horn AK, Eberhorn A, Hartig W, Ardeleanu P, Messoudi A, Buttner-Ennever JA. 2008. Periocolomotor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 507:1317-1335.
- Horn AK, Leigh RJ. 2011. The anatomy and physiology of the ocular motor system. *Handbook of clinical neurology* 102:21-69.
- Hutter E, Skovbro M, Lener B, Prats C, Rabol R, Dela F, Jansen-Durr P. 2007. Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell* 6:245-256.
- Ichikawa H. 2002. Innervation of the carotid body: Immunohistochemical, denervation, and retrograde tracing studies. *Microsc. Res. and techn.* 59:188-195.
- Ichikawa H, Deguchi T, Nakago T, Jacobowitz DM, Sugimoto T. 1995. Parvalbumin- and calretinin-immunoreactive trigeminal neurons innervating the rat molar tooth pulp. *Brain Res.* 679:205-211.
- Ichikawa T, Shimizu T. 1998. Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey. *Brain Res.* 779:96-103.
- Isomura G. 1981. Comparative anatomy of the extrinsic ocular muscles in vertebrates. *Anat. Anz.* 150:498-515.
- Jacoby J, Chiarandini DJ, Stefani E. 1989. Electrical properties and innervation of fibers in the orbital layer of rat extraocular muscles. *J. Neurophysiol.* 61:116-125.
- Jacoby J, Ko K, Weiss C, Rushbrook JI. 1990. Systematic variation in myosin expression along extraocular muscle fibres of the adult rat. *J. Mus. Res. Cell Mot.* 11:25-40.
- Jung T, Bader N, Grune T. 2007. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1119:97-111.
- Kato T. 1938. Über histologische Untersuchungen der Augenmuskeln von Menschen und Säugetieren. *Ok. Fol. Anat.* 16:131-145.
- Keller EL, Robinson DA. 1971. Absence of a stretch reflex in extraocular muscles of the monkey. *J. Neurophysiol.* 34:908-919.
- Kjellgren D, Thornell LE, Andersen J, Pedrosa-Domellof F. 2003. Myosin heavy chain isoforms in human extraocular muscles. *IOVS* 44:1419-1425.

- Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. 2009. Physiologie: Georg Thieme Verlag.
- Konakci KZ, Streicher J, Hoetzenecker W, Blumer MJ, Lukas JR, Blumer R. 2005. Molecular characteristics suggest an effector function of palisade endings in extraocular muscles. *IOVS* 46:155-165.
- Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M, Horn AK, Toledo CA, Ryabinin AE. 2011. The Edinger-Westphal nucleus: a historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J. Comp. Neurol.* 519:1413-1434.
- Kupfer C. 1960. Motor innervation of extraocular muscle. *J. Physiol.* 153:522-526.
- Laessing J. 2013. Dissertation, Neuroanatomische Untersuchungen der Palisadenendigungen beim Menschen im Musculus rectus medialis und Musculus rectus lateralis
- Lang G. 2013. Histotechnik Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. Wien [u.a.]: Springer. XXI, 444 S. p.
- Lazarov NE. 2002. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog. Neurobiol.* 66:19-59.
- Leigh RJ, Zee DS. 2015. The neurology of eye movements: Oxford University Press, USA.
- Lembeck F, Bernatzky G, Gamse R, Saria A. 1985. Characterization of substance P-like immunoreactivity in submammalian species by high performance liquid chromatography. *Peptid.* 6 Suppl 3:231-236.
- Lienbacher K. 2012. Dissertation: The source of innervation and function of palisade endings in the extraocular muscles of *Macaca mulatta*.
- Lienbacher K, Horn AK. 2012. Palisade endings and proprioception in extraocular muscles: a comparison with skeletal muscles. *Biol. Cybern.* 106:643-655.
- Lienbacher K, Mustari M, Hess B, Buttner-Ennever J, Horn AK. 2011a. Is there any sense in the Palisade endings of eye muscles? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1233:1-7.
- Lienbacher K, Mustari M, Ying HS, Buttner-Ennever JA, Horn AK. 2011b. Do palisade endings in extraocular muscles arise from neurons in the motor nuclei? *IOVS* 52:2510-2519.
- Lukas JR, Aigner M, Blumer R, Heinzl H, Mayr R. 1994. Number and distribution of neuromuscular spindles in human extraocular muscles. *IOVS* 35:4317-4327.
- Lukas JR, Blumer R, Aigner M, Denk M, Baumgartner I, Mayr R. 1997. [Proprioception of extra-ocular muscles in the human: on the morphology of muscle spindles]. *Klin. Mon. F. Augenheil.* 211:183-187.
- Lukas JR, Blumer R, Denk M, Baumgartner I, Neuhuber W, Mayr R. 2000. Innervated myotendinous cylinders in human extraocular muscles. *IOVS* 41:2422-2431.
- Lynch GS, Frueh BR, Williams DA. 1994. Contractile properties of single skinned fibres from the extraocular muscles, the levator and superior rectus, of the rabbit. *J. Physiol.* 475:337-346.
- Mahran ZY, Sakla FB. 1965. The pattern of innervation of the extrinsic ocular muscles and the intra-orbital ganglia of the albino mouse. *Anat. Rec.* 152:173-183.
- Mai JK, Paxinos G. 2011. The human nervous system: Academic press.
- Maier A, DeSantis M, Eldred E. 1974. The occurrence of muscle spindles in extraocular muscles of various vertebrates. *J. Morphol.* 143:397-408.
- Mayr R. 1970. [Two electron-microscopically different forms of secondary sensory endings in a muscle spindle of the rat]. *Zeitsch. Zellforsch Mikrosk. Anat.* 110:97-107.
- Mays LE, Porter JD. 1984. Neural control of vergence eye movements: activity of abducens and oculomotor neurons. *J. Neurophysiol.* 52:743-761.
- McDougal DH, Gamlin PD. 2015. Autonomic control of the eye. *Compr. Physiol.* 5:439-473.
- McMahon HT, Sudhof TC. 1995. Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J. Biol. Chem.* 270:2213-2217.
- Miller NR, Walsh FB, Hoyt WF. 2005. Walsh and Hoyt's clinical neuro-ophthalmology: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mok D, Ro A, Cadera W, Crawford JD, Vilis T. 1992. Rotation of Listing's plane during vergence. *Vis. Res.* 32:2055-2064.

- Morgan DL, Proske U. 1984. Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties. *Physiol. Rev.* 64:103-138.
- Munakata S, Hendricks JB. 1993. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 41:1241-1246.
- Myers GA, Stark L. 1990. Topology of the near response triad. *Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)* 10(2):175-181.
- Nielsen KC, Owman C. 1967. Adrenergic innervation of pial arteries related to the circle of Willis in the cat. *Brain Res.* 6:773-776.
- Nouriani A. 2008. Neuroanatomische Charakterisierung von Neuronen im Trigemini-Ganglion, die den extraoculären Augenmuskel des Primaten innervieren Dissertation.
- Ochi K, Wakisaka S, Youn SH, Hanada K, Maeda T. 1997. Calretinin-like immunoreactivity in the Ruffini endings, slowly adapting mechanoreceptors, of the periodontal ligament of the rat incisor. *Brain Res.* 769:183-187.
- Oda K. 1993. Differences in acetylcholine receptor-antibody interactions between extraocular and extremity muscle fibers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 681:238-255.
- Oda Y. 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol. Int.* 49:921-937.
- Oh SY, Poukens V, Cohen MS, Demer JL. 2001a. Structure-function correlation of laminar vascularity in human rectus extraocular muscles. *IOVS* 42:17-22.
- Oh SY, Poukens V, Demer JL. 2001b. Quantitative analysis of rectus extraocular muscle layers in monkey and humans. *IOVS* 42:10-16.
- Pachter BR. 1984. Rat extraocular muscle. 3. Histochemical variability along the length of multiply-innervated fibers of the orbital surface layer. *Histochem.* 80:535-538.
- Park SE, Sa HS, Oh SY. 2009. Innervated myotendinous cylinders alterations in human extraocular muscles in patients with strabismus. *Kor. J. Ophthalmol.* 23:93-99.
- Porter JD. 1986. Brainstem terminations of extraocular muscle primary afferent neurons in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 247:133-143.
- Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. 1995. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. *Surv. Ophthalmol.* 39:451-484.
- Porter JD, Donaldson IM. 1991. The anatomical substrate for cat extraocular muscle proprioception. *Neurosci* 43:473-481.
- Porter JD, Guthrie BL, Sparks DL. 1983. Innervation of monkey extraocular muscles: localization of sensory and motor neurons by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 218:208-219.
- Porter JD, Poukens V, Baker RS, Demer JL. 1996. Structure-function correlations in the human medial rectus extraocular muscle pulleys. *IOVS* 37:468-472.
- Ren K, Ruda MA, Jacobowitz DM. 1993. Immunohistochemical localization of calretinin in the dorsal root ganglion and spinal cord of the rat. *Brain Res. Bull.* 31:13-22.
- Rogers JH. 1987. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.* 105:1343-1353.
- Rungaldier S, Pomikal C, Streicher J, Blumer R. 2009. Palisade endings are present in canine extraocular muscles and have a cholinergic phenotype. *Neurosci Lett* 465(3):199-203.
- Ruskell GL. 1978. The fine structure of innervated myotendinous cylinders in extraocular muscles of rhesus monkeys. *J. Neurocytol.* 7:693-708.
- Ruskell GL. 1979. The incidence and variety of Golgi tendon organs in extraocular muscles of the rhesus monkey. *J. Neurocytol.* 8:639-653.
- Ruskell GL. 1984. Spiral nerve endings in human extraocular muscles terminate in motor end plates. *J. Anatol.* 139:33-43.
- Ruskell GL. 1989. The fine structure of human extraocular muscle spindles and their potential proprioceptive capacity. *J. Anat.* 167:199-214.
- Ruskell GL. 1990. Golgi tendon organs in the proximal tendon of sheep extraocular muscles. *Anat. Rec.* 227:25-31.

- Ruskell GL. 1999. Extraocular muscle proprioceptors and proprioception. *Prog. Retin. Eye Res.* 18:269-291.
- Ruskell GL, Kjellevoid Haugen IB, Bruenech JR, van der Werf F. 2005. Double insertions of extraocular rectus muscles in humans and the pulley theory. *J. Anat.* 206:295-306.
- Ruskell GL, Wilson J. 1983. Spiral nerve endings and dapple motor end plates in monkey extra-ocular muscles. *J. Anat.* 136:85-95.
- Sadeh M, Stern LZ. 1984. Observations on the innervation of human extraocular muscles. *J. Neurol. Sci.* 66:295-305.
- Sas J, Appeltauer C. 1963. ATYPICAL MUSCLE SPINDLES IN THE EXTRINSIC EYE MUSCLES OF MAN. *Acta Anat.* 55:311-322.
- Sas J, Scháb R. 1952. Die sogenannten "Palisaden-Endigungen" der Augenmuskeln. *Acta Morph. Acad.* 2:259-266.
- Schiaffino S, Reggiani C. 1994. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 77:493-501.
- Schroder JM, Bodden H, Hamacher A, Verres C. 1989. Scanning electron microscopy of teased intrafusal muscle fibers from rat muscle spindles. *Muscle & nerve* 12:221-232.
- Schünke M. 2009. Prometheus - Lernatlas der Anatomie Kopf, Hals und Neuroanatomie ; 115 Tabellen. Stuttgart [u.a.]: Thieme. XV, 541 S. p.
- Schurmans S, Schiffmann SN, Gurden H, Lemaire M, Lipp HP, Schwam V, Pochet R, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M. 1997. Impaired long-term potentiation induction in dentate gyrus of calretinin-deficient mice. *PNAS* 94:10415-10420.
- Schwaller B. 2009. The continuing disappearance of "pure" Ca²⁺ buffers. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:275-300.
- Scott AB, Collins CC. 1973. Division of labor in human extraocular muscle. *Arch. Ophthalmol.* 90:319-322.
- Sevel D. 1986. The origins and insertions of the extraocular muscles: development, histologic features, and clinical significance. *Trans. Amer. Ophthalmol. Soc.* 84:488-526.
- Sherrington CS. 1906. On the proprioceptive system, especially in its reflex aspect. *Brain* 29:16.
- Shi SR, Key ME, Kalra KL. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39:741-748.
- Siebeck R, Kruger P. 1955. [The histological structure of the extrinsic ocular muscles as an indication of their function]. *Graefe's Arch. Ophthal.* 156:636-652.
- Sobotta J. 2010. Atlas der Anatomie des Menschen: Kopf., Hals und Neuroanatomie. Bd. 3: Elsevier Health Sciences.
- Speckmann E-J. 2013. Physiologie mit 88 Tabellen. München: Elsevier, Urban & Fischer. XVII, 870 S. p.
- Spencer RF, Porter JD. 1988. Structural organization of the extraocular muscles. In: Büttner-Ennever JA, ed. *RevOculomotRes.* Amsterdam; New York; Oxford;: Elsevier. p 33-79.
- Spencer RF, Porter JD. 2006. Biological organization of the extraocular muscles. *Prog. Brain Res.* 151:43-80.
- Steinbach MJ, Smith DR. 1981. Spatial localization after strabismus surgery: evidence for inflow. *Science* 213:1407-1409.
- Sudhof TC. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Ann. Rev. Neurosci.* 27:509-547.
- Sun W, May PJ. 2014. Central pupillary light reflex circuits in the cat: II. Morphology, ultrastructure, and inputs of preganglionic motoneurons. *J. Comp. Neurol.* 522:3978-4002.
- Tang X, Büttner-Ennever JA, Mustari MJ, Horn AK. 2015. Internal organization of medial rectus and inferior rectus muscle neurons in the C group of the oculomotor nucleus in monkey. *J. Comp. Neurol.* 523:1809-1823.
- Tao-Cheng JH, Du J, McBain CJ. 2000. Snap-25 is polarized to axons and abundant along the axolemma: an immunogold study of intact neurons. *J. Neurocyt.* 29:67-77.
- Thakker MM, Huang J, Possin DE, Ahmadi AJ, Mudumbai R, Orcutt JC, Tarbet KJ, Sires BS. 2008. Human orbital sympathetic nerve pathways. *Ophth. Plast. Reconstr. Surg.* 24:360-366.

- Thömke F. 2008. Augenbewegungsstörungen ein klinischer Leitfaden für Neurologen ; 75 Tabellen. Stuttgart ; New York: Thieme. X, 358 S. p.
- Tozer FM, Sherrington CS. 1910. Receptors and afferents of the third, fourth, and sixth cranial nerves. Proc. Roy. Soc. Lond. :450-457.
- Trepel M. 2012. Neuroanatomie Struktur und Funktion. München: Elsevier, Urban & Fischer. XII, 420 S. p.
- Usunoff KG, Marani E, Schoen JH. 1997. The trigeminal system in man. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 136:I-X, 1-126.
- Villar MJ, Mansi HD, Mascitti TA. 1994. Simple spiral nerve endings in human extraocular muscles. Bull. Ass. Anatom. 78:37-40.
- Von Holst E. 1954. Relations between the central nervous system and the peripheral organs. Brit. J. Animal Behav. 2:89-94.
- Wang X, Zhang M, Cohen IS, Goldberg ME. 2007. The proprioceptive representation of eye position in monkey primary somatosensory cortex. Nat. Neurosci. 10:640-646.
- Wasicky R, Ziya-Ghazvini F, Blumer R, Lukas JR, Mayr R. 2000. Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study. IOVS 41:980-990.
- Weir CR. 2006. Proprioception in extraocular muscles. J. Neuro-ophthalm. 26:123-127.
- Winsky L, Kuznicki J. 1995. Distribution of calretinin, calbindin D28k, and parvalbumin in subcellular fractions of rat cerebellum: effects of calcium. J. Neurochem. 65:381-388.
- Zeeh C, Hess BJ, Horn AK. 2013. Calretinin inputs are confined to motoneurons for upward eye movements in monkey. J. Comp. Neurol. 521:3154-3166.
- Zeeh C, Horn AK. 2012. [The subnuclei of the oculomotor nucleus in humans]. Klin. Monatsbl. Augenheil. 229:1083-1089.
- Zelena J, Soukup T. 1977. The development of Golgi tendon organs. J. Neurocytol. 6:171-194.
- Zhang Y, Wesolowski M, Karakatsani A, Witzemann V, Kroger S. 2014. Formation of cholinergic synapse-like specializations at developing murine muscle spindles. Dev. Biol. 393:227-235.
- Zimmermann L, May PJ, Pastor AM, Streicher J, Blumer R. 2011. Evidence that the extraocular motor nuclei innervate monkey palisade endings. Neurosci. Lett. 489:89-93.
- Zimmermann L, Morado-Diaz CJ, Davis-Lopez de Carrizosa MA, de la Cruz RR, May PJ, Streicher J, Pastor AM, Blumer R. 2013. Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features. J. Neurosci. 33:2784-2793.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jens Waschke für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Doktorarbeit am Anatomischen Institut der LMU und für die Überlassung des Themas.

Besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler für die unermüdliche Unterstützung bedanken und die hervorragende fachliche Betreuung und Beratung während der gesamten Zeit.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei MPh. Ahmet Messoudi, Dr. Karoline Lienbacher, Christine Unger und Christine Glombik und dem gesamten Team der „Oculomotoriusgroup“ für die herzliche Aufnahme im Team, die uneingeschränkte Unterstützung und die große Geduld, die mir entgegengebracht wurde, bedanken.

Ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ich möchte meiner Familie und meinen Freunden danken für ihre Unterstützung, die sie mir in meinem Leben gegeben haben.

Eidesstattliche Versicherung

Kathrin Ernestine Sänger

19.02.1988

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Calretinin-Expression in Nervenendigungen der äußeren Augenmuskeln beim Menschen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.01.2018

K. Sänger

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin