

Aus der Anatomischen Anstalt
Lehrstuhl Anatomie I – Vegetative Anatomie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Jensaschke

Quantifizierung der Palisadenendigungen assoziiert mit fast-twitch versus non-twitch Muskelfasern in den Musculi recti mediales und laterales bei menschlichen Kontrollfällen und Strabismusfällen

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

vorgelegt von
Felix Daniel Andreas
aus
Freiburg im Breisgau

Jahr
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Berichterstatter(in): Prof. Dr. med. Jens Waschke
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Ehrt
Prof. Dr. med. Chris P. Lohmann
Mitbetreuung durch:
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
Diagrammverzeichnis	10
1. Einleitung	11
1.1. Die extraokulären Augenmuskeln	11
1.1.1. Aufbau und Funktion.....	11
1.1.1.1. Morphologie	11
1.1.1.2. Histologie.....	12
1.1.1.2.1. Augenmuskelkompartimente	13
1.1.1.2.2. Muskelfasertypen.....	15
1.1.1.2.3. Feinstruktur der Muskelfasern	16
1.1.2. Innervation	17
1.1.2.1. Motorische Innervation.....	17
1.1.2.2. Sensorische Innervation	18
1.1.2.3. Palisadenendigungen	19
1.2. Binokuläres Sehen	21
1.3. Strabismus	22
1.3.1. Klinik und Therapie	22
1.3.2. Strabismusoperation	22
1.4. Fragestellungen	24
2. Methoden und Material	25
2.1. Präparate und Präparation	25
2.1.1. Augenmuskelpräparation	28
2.1.2. Augenmuskellängsschnitte am Kryostat	29
2.1.3. Auswahl verwertbarer Schnitte aus der Augenklinik.....	29
2.1.4. Augenmuskelquerschnitte in vier Ebenen am Kryostat	30
2.2. Färbungen	32
2.2.1. Kombinierte Immunperoxidasefärbung	32
2.2.2. Immunfluoreszenzfärbung	33
2.2.3. Kombinierte Peroxidase-/Fluoreszenzfärbung.....	34
2.2.4. Identifikation des Muskel-Sehnen-Übergangs	35
2.2.5. Färbung von Muskelquerschnitten	35
2.3. Verwendete Antikörper	36
2.3.1. Verwendete Antikörper gegen Nervenfasern	36
2.3.2. Verwendete Antikörper gegen Muskelfasern.....	37
2.4. Auswertung am Mikroskop	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Auswahl der Schnitte	39
3.1.1. Verwertbarkeit der Augenmuskelpräparate	39
3.2. Unterschiedliche Färbemethoden im Vergleich	41
3.2.1. Kombinierte Immunperoxidasefärbung	41
3.2.2. Immunfluoreszenzfärbung.....	41

3.2.3. Kombinierte Immunoperoxidase- und Fluoreszenzfärbung	42
3.3. Nervenendigungen in Assoziation mit verschiedenen Muskelfasertypen.....	44
3.4. Muskelfaserverteilung im Querschnitt	47
3.5. Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen	50
3.5.1. Palisadenendigungen nach Strabismusoperation	52
3.5.2. Verteilung und Anzahl der Palisadenendigungen in Abhängigkeit vom Alter	55
4. Diskussion.....	56
4.1. Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen	56
4.2. Die Problematik bei der Definition unterschiedlicher Muskelfasertypen	58
4.3. Propriozeption in den Augenmuskeln	59
4.4. Proprizeptororgane in EOM.....	60
4.3. Die Funktionen der Muskelfasern bei der Okulomotorik	61
4.4. Muskelfaser und Palisadenendigung als funktionelle Einheit.....	62
4.5. Unterschiede zwischen LR- und MR-Muskeln.....	63
4.6. Vorkommen und Verteilung der Palisadenendigungen in Abhängigkeit vom Alter ..	64
4.7. Palisadenendigungen und assoziierte Muskelfasern bei Strabismus	65
4.7.1. Strabismus und die Rolle der Muskelfasertypen	67
4.7.2. Die Folgen von Muskelresektionen bei Strabismus.....	67
4.5. Zusammenfassung.....	68
Quellenverzeichnis.....	70
Eidesstattliche Versicherung	75

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AK	Antikörper
DAB	Diaminobenzidin
DPX	Dibutylphthalat Polystyren Xylen
EAP	Extravidin-Peroxidase
EOM	extraokuläre Muskulatur
FL	Fluoreszenz
FMyHC	Fast Myosin Heavy Chain
IR	Musculus rectus inferior
IO	Musculus obliquus inferior
LR	Musculus rectus lateralis
MHCs	Myosin Heavy Chain slow
MHCf	Myosin Heavy Chain fast
MIF	Multipel-innervierte Fasern (Multiply-innervated fibers)
MR	Musculus rectus medialis
MS	Muskelspindel
MYH7B	Myosin Heavy Chain 7B
N	Nervus
N. III	Nervus oculomotorius
NDS	Normal-Donkey-Serum
NGS	Normal-Goat-Serum
Ni	Nickel
PE	Palisadenendigung
PFA	Paraformaldehyd
SIF	Einzel-innervierte Fasern (Singly-innervated fibers)
SMI81	Anti-SNAP-25 Antibody
SNAP-25	Synaptosomal-associated Protein 25
SR	Musculus rectus superior
TBS	Tris-Puffer/NaCl

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Innervation und Funktion der äußeren Augenmuskulatur

Tabelle 2: Histologische Differenzierung und Häufigkeiten der Muskelfasern in den Augenmuskelkompartimenten

Tabelle 3: Auflistung der Augenmuskelpräparate aus der Kontrollgruppe mit Daten zu Fall und Fixierung

Tabelle 4: Auflistung der Augenmuskelpräparate aus der Strabismusgruppe mit Daten zu Fall und Fixierung

Tabelle 5: Antikörper bei kombinierter Immunoperoxidasefärbung

Tabelle 6: Antikörper bei Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 7: Antikörper bei kombinierter Peroxidase- /Fluoreszenzfärbung

Tabelle 8: Antikörper bei Fluoreszenzfärbung von Muskelquerschnitten

Tabelle 9: Antikörper bei Peroxidasefärbung von Muskelquerschnitten

Tabelle 10: Antikörper gegen Nervenfasern

Tabelle 11: Antikörper gegen Muskelfasern

Tabelle 12: Auflistung der optischen Filter im Fluoreszenzmikroskop in Abhängigkeit vom fluoreszierenden Farbstoff

Tabelle 13: Auflistung von ausgewerteten **MR-Muskeln** augengesunder Körperspender

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

Tabelle 14: Auflistung von ausgewerteten **LR-Muskeln** augengesunder Körperspender

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

Tabelle 15: Auflistung von ausgewerteten **MR-Muskeln** Strabismus-operierter Patienten

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

Tabelle 16: Auflistung von ausgewerteten **LR-Muskeln** Strabismus-operierter Patienten

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Lage der Augenmuskeln innerhalb der Orbita. Ansicht des rechten Auges von kranial. Aus Prometheus LernAtlas – Kopf, Hals und Neuroanatomie, 5. Auflage, Thieme 2018, 5.16. Äußere Augenmuskeln.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Augenmuskelkompartimente im EOM. Die globale Schicht inseriert direkt an der Sklera, während die orbitale Schicht an einem elastischen Ring (Pulley Ring) Nahe des Bulbusäquators ansetzt. Abbildung aus (Demer et al. 2000). Mit freundlicher Genehmigung von der Association for Research in Vision and Ophthalmology.

Abbildung 3: Schematische Darstellung mehrerer fast-twitch Fasern (A). Diese Muskelfasern sind einfach innerviert durch eine en-plaque-Endigung im Bereich des Muskelbauchs (Bild C). B und D zeigen multipel innervierte non-twitch Fasern. Entlang des Faserverlaufs finden sich zahlreiche neuromuskuläre Verbindungen, sogenannte en-grappe-Endigungen (schwarze Pfeile). Maßstabskala 50µm. Aus Lienbacher and Horn 2012, Biological Cybernetics. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Abbildung 4: Darstellung einer Spiralenndigung unter dem Lichtmikroskop (blauer Pfeil). Die Nervenendigung windet sich mehrfach um die Muskelfaser (Ruskell 1984). Im unteren Bereich des Bildes ist eine multipel innervierte Faser mit zahlreichen „en grappe“-Endigungen dargestellt (schwarze Pfeile). Maßstabskala 50µm.

Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Palisadenendigung. Diese sitzt der Muskelfaser am proximalen und distalen Ende kappenförmig auf. Aufgrund ihrer typischen Morphologie spricht man auch von myotendinösen Zylindern. Aus (Ruskell 1978), Journal of Neurocytology. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags.

Abbildung 6: Schematische Darstellung binokulären Sehens anhand des **Horopters**. Mit freundlicher Genehmigung von Matthias Jäger (www.weir3d.de).

Abbildung 7: Seitliche Aufnahme eines Augenbulbus links mit extraokulärer Muskulatur (MR = musculus rectus medialis, LR = Musculus rectus lateralis, SO = Musculus obliquus superior, SR = Musculus rectus superior).

Abbildung 8: Kryostat mit Schneidevorrichtung und Objekthalter (1) sowie Auflage zur Entnahme angefertigter Schnitte (2).

Abbildung 9: Dargestellt ist der MR links eines Kotrollfalls im Längsschnitt. Dieser wird im Folgenden in 8 gleichgroße Muskelabschnitte unterteilt.

Abbildung 10: In der oberen Bildhälfte ist der Muskel längs in 8 ungefähr gleichgroße Abschnitte unterteilt (1-8). In der unteren Bildhälfte ist der Muskel graphisch im Längsschnitt dargestellt. Konkordant zur oberen Bildhälfte wird der Muskel in 8 gleichgroße Bereiche unterteilt, wobei Abschnitt 1 den am weitesten distal, Abschnitt 8 den am weitesten proximal gelegenen Anteil des Längsschnitts darstellt. Die Muskelabschnitte 2, 4, 6 und 8 werden gemäß der Graphik auf dem Objektträger zum Schneiden am Kryostat platziert. Die farbige Markierung stellt hierbei die Fläche des

Muskelabschnitts dar, auf welcher dieser auf dem Objektträger liegt (stets die proximale Fläche des Muskelabschnitts). Die Querschnitte werden also hintereinander von distal nach proximal angefertigt. (Präparat 08/16, MR li)

Abbildung 11: Darstellung des Muskel-Sehnen-Übergangs in der van-Gieson-Färbung. Während die Sehne (links im Bild) rot-rosa angefärbt ist, stellen die Muskelfasern (rechts und Bildmitte) sich braun-rot dar (schwarze Pfeile). Vereinzelt ziehen Sehnenanteile zwischen den Muskelfasern nach proximal (gelber Pfeil). Maßstabskala 50µm.

Abbildung 12: Die einfache Picofuchsinfärbung stellt Sehnen sowie Bindegewebe (weißer Stern) rot dar. Die Muskelfasern (schwarzer Stern) sind orange-braun angefärbt. Maßstabskala 100µm.

Abbildung 13: Digitalisierte Bilder vom Muskel-Sehnen-Übergang des M. rectus medialis einer Kontrollgruppe, gefärbt auf SNAP-25 (schwarz) mit DAB und Nickel sowie Myosinschwerketten (braun) nur mit DAB. Die Abbildung zeigt Palisadenendigungen (schwarz, Pfeile), die mit immunpositiven fast Muskelfasern assoziiert sind (A). In der kombinierten Färbung auf slow Muskelfasern sitzen Palisadenendigungen hier nur an MHCs-negativen Muskelfasern (B). T = Tendon (Sehne). Maßstabskala 50µm.

Abbildung 14: Bild A, B und C zeigen einen identischen Ausschnitt des Muskels im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs unter dem Fluoreszenzmikroskop. In A werden fast Muskelfasern über FMyHC mit DyLight-blau angefärbt. In B werden slow Muskelfasern über MYH7B mit Cy3-rot dargestellt. C zeigt eine Palisadenendigung über SNAP-25 mit Alexa-grün (weißer Blockpfeil), die an einer fast Muskelfaser sitzt (vergleiche C mit A und B). Die weißen Pfeile zeigen Lipofuszinpigmente. Maßstabskala 50µm.

Abbildung 15: Detailaufnahme einer kombinierten Immunfluoreszenz und -peroxidasefärbung eines identischen Ausschnitts eines M. rectus medialis im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs. SNAP-positive Palisadenendigungen (C, schwarz) sind mit fast Muskelfasern (A, grün, Stern) assoziiert, die in der Immunfärbung auf MYH7B für slow-Muskelfasern (B, rot) immun-negativ sind. Maßstabskala 50µm.

Abbildung 16: A, B und C zeigen identische Ausschnitte eines MR-Muskel-Längsschnitts im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs. Drei SNAP-25-positive Palisadenendigungen (A, schwarze Pfeile) sitzen fast Muskelfasern (B, grün, Sterne) kappenförmig auf. Diese Fasern sind in der Immunfärbung auf MYH7B (C, rot) immun-negativ. Maßstabskala 50µm.

Abbildung 17: Darstellung einer „en-plaque“-Endigung an einer fast Muskelfaser. A, B und C zeigen identische Ausschnitte eines MR-Muskel-Längsschnitts im Bereich des Muskelbauchs. A zeigt eine SNAP-25-positive „en-plaque“-Endigung (schwarzer Pfeil). Charakteristisch umgreift sie die komplette Muskelfaser, welche in der Immunfärbung FMyHC positiv (Bild B, gelber Pfeil) und MYH7B negativ (Bild C) und somit vom fast-Typ ist. Maßstabskala 50µm.

Abbildung 18: fast-Muskelfaser assoziiert mit mehreren „en-plaque“ Endigungen. In Bild A sind zwei en-plaque Endigungen dargestellt (schwarze Pfeile). Zum einen sitzen sie an derselben fast-Muskelfaser (Bild B, gelber Pfeil), zum anderen scheinen sie sich im weiteren Verlauf dasselbe Axon zu teilen (Bild A, blauer Pfeil). Maßstabskala 50µm.

Abbildung 19: Darstellung von Nervenstrukturen im Hellfeld (A) und von Muskelfasern unter dem Fluoreszenzmikroskop (B und C). Im unteren Bereich des Bildes A sieht man den typischen perlschnurartigen Verlauf eines non-twitch Motoneurons mit multiplen en-grappe Endigungen (schwarze Pfeile) entlang einer dünnen, MYH7B-positiven Muskelfaser (siehe Bild C, gelber Pfeil). In der Bildmitte (A) befindet sich eine Spiralendigung (blauer Pfeil), welche sich entlang einer breiten Muskelfaser windet. Maßstabskala 50µm.

Abbildung 20: Darstellung vom Randbereich eines fluoreszenzgefärbten Muskelquerschnitts aus Ebene 2 (Bereich des Muskelbauchs). Auffallend ist eine deutlich ungleiche Verteilung von slow Muskelfasern (Bild B). Ihre Dichte ist im äußeren Bereich (orbitalen Schicht) des Querschnitts deutlich höher als im Zentrum (globalen Schicht). In Bild A sind fast-Fasern grün angefärbt. Maßstabskala 100µm.

Abbildung 21: Darstellung von Muskelfasern im Querschnitt eines identischen Abschnittes eines M. rectus medialis.. Während in Bild A slow Muskelfasern mittels des Antikörpers anti-MYH7B (Santa-Cruz) dargestellt werden, diente in Bild B anti-MHCs (Millipore) als primärer Antikörper zur Detektion von slow Muskelfasern. In Bild C sind die beiden Bilder übereinander gelegt. Zu erkennen ist, dass nahezu identische Muskelfasern mit den beiden Antikörpern dargestellt werden, dass jedoch anti-MYH7B insgesamt nur eine Teilmenge der Muskelfasern anfärbt, die mit dem Antikörper anti-MHCs angefärbt werden. Exemplarisch hierfür ist eine Muskelfaser mit dem gelben Pfeil markiert. Maßstabskala 50µm.

Abbildung 22: Innervation der unterschiedlichen Muskelfasertypen in EOM und deren Assoziation mit PE. Dargestellt sind zum einen multipel-innervierte Muskelfasern (MIF), welche von non-twitch Motoneuronen über „en-grappe“ Endigungen innerviert werden (grün). Ihre Zellkörper liegen, genau wie die der PE, außerhalb der motorischen Kernegebiete im Hirnstamm (Ugolini et al. 2006). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Assoziation von PE mit fast-Fasern. Vereinfacht dargestellt, werden diese von twitch Motoneuronen über eine en-plaque Endigung (hier schwarz) innerviert. Ob es sich bei den angefärbten fast-Fasern tatsächlich um einfach-innervierte Muskelfasern mit twitch Eigenschaften handelt, konnte in der Arbeit nicht bewiesen werden (siehe 4.3.1. Die Problematik bei der Definition unterschiedlicher Muskelfasertypen). Wie auch hier dargestellt, sitzen die PE den Muskelfasern stets am distalen oder proximalen Ende des Muskels kappenförmig auf.

Abbildung 23:

Schematische Darstellung der Kompartimente in EOM. Während die orbitale Schicht an dem Pulley inseriert, gehen Muskelfasern der globalen Schicht in eine Sehne über, welche direkt am Augensbulbus ansetzt. Muskelspindeln (MS) befinden sich im menschlichen Auge im Bereich der orbitalen Zone. Palisadenendigungen (PE) sind im Bereich des myotendinösen Übergangs der globalen Zone zu finden. MIF und SIF

kommen in beiden Zonen vor und sind von separaten Gruppen von Motoneuronen innerviert. Aus (Lienbacher and Horn 2012), Biological Cybernetics. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Darstellung der prozentuellen Verteilung von Palisadenendigungen assoziiert mit slow- bzw. fast-Muskelfasern. Dabei vergleichend die Ergebnisse der Verteilung von PE in LR- und MR-Muskeln augengesunder Körperspender.

Diagramm 2: Darstellung der prozentuellen Verteilung von Palisadenendigungen assoziiert mit slow- bzw. fast-Muskelfasern. Dabei vergleichend die Ergebnisse der Verteilung von PE in LR- und MR-Muskeln Strabismus-operierter Patienten.

Diagramm 3: Vergleich der Verteilung von Palisadenendigungen an fast- und slow-Muskelfasern in MR- und LR- Muskeln zwischen Strabismus-operierten Patienten und augengesunden Körperspendern.

Diagramm 4: Vergleichende Darstellung der Verteilung von Palisadenendigungen an fast-Typ Muskelfasern zwischen den beiden Altersgruppen über 20-Jähriger und unter 20-Jähriger für LR- und MR-Fälle.

1. Einleitung

1.1. Die extraokulären Augenmuskeln

Die Muskulatur des Auges kann in innere und äußere Anteile differenziert werden. Während die inneren Augenmuskeln für die Akkommodation der Linse und Pupillenweite verantwortlich sind, dienen die äußeren Augenmuskeln der Okulomotorik, also der Bewegung des Bulbus oculi. Dazu gehören langsame Augenfolgebewegungen, Vergenzbewegungen, Sakkaden, aber auch kompensatorische Bewegungen, zum Beispiel bei Kopfbewegungen zur Blickstabilisierung (Büttner und Büttner-Ennever 2006).

Extraokuläre Augenmuskeln gehören zu den schnellsten und ermüdungsresistentesten Muskeln des menschlichen Körpers (Lennerstrand 2007). Die hohen Anforderungen an sie zeigen sich sowohl morphologisch als auch histologisch in einer komplexen Struktur und Anordnung. Im Folgenden werden zunächst topografische und histologische Eigenschaften der Augenmuskeln erläutert. Hierbei wird im Verlauf des Kapitels auch auf ultrastrukturelle Besonderheiten der Muskelfasern und ihrer Feinstruktur eingegangen. Im Anschluss daran werden Grundlagen der Innervation von extraokulären Augenmuskeln erläutert. Dies bietet Grundlage für das weitere Verständnis der Funktion der Augenmuskeln bei der Okulomotorik und der Rolle, welche ihnen bei Störungen binokulären Sehens zukommt. Auf letzteres wird in Kapitel 1.2. *binokuläres Sehen* näher eingegangen.

1.1.1. Aufbau und Funktion

Die äußere Augenmuskulatur besteht aus sechs Muskeln, welche je nach Ausgangsstellung des Auges für Adduktion, Abduktion, Innen- und Außenrotation sowie Hebung und Senkung des Bulbus verantwortlich sind (Baker 1986). Sie sind eingebettet in einen retrobulbären Fettkörper und liegen im Großteil ihres Verlaufes dem Bulbus an.

1.1.1.1. Morphologie

Man unterscheidet vier *gerade* Augenmuskeln, welche alle an einem Sehnenring, dem Anulus tendineus communis entspringen und von dort zum Augenbulbus ziehen. Hier finden sie ihren Ansatz an der Sklera, ventral des Augenmuskeläquators (Sevel 1986, Miller et al. 2005). Zu den geraden Augenmuskeln gehören der Musculus rectus lateralis (LR), Musculus rectus medialis (MR), Musculus rectus superior (SR) und der Musculus rectus inferior (IR). Zu den beiden schrägen Augenmuskeln zählt neben dem Musculus obliquus inferior (IO) auch der Musculus obliquus superior (SO). Letzterer entspringt, als einziger der sechs Augenmuskeln, an knöchernen Anteilen des Os sphenoidale der Orbita. Seine Sehne zieht durch eine bindegewebigen Trochlea zur Sklera. Die Trochlea

dient als Hypomochlion, sodass eine Kontraktion des Muskels eine Rotation nach unten und innen nach sich zieht (siehe *Abbildung 1*).

Der Musculus levator palpebrae superioris, als Lidheber, wird streng genommen ebenfalls zu den äußeren Augenmuskeln gezählt. Funktionell spielt er jedoch keine Rolle bei Bewegungen des Bulbus.

Funktion und Innervation der Augenmuskeln sind als Übersicht in *Tabelle 1* aufgelistet.

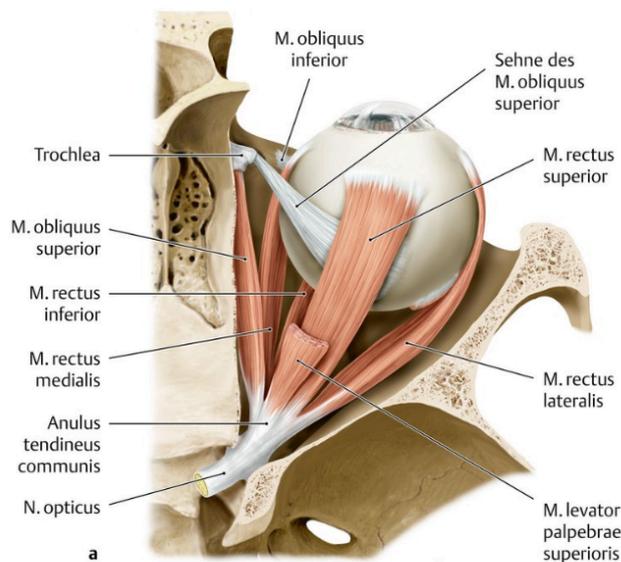


Abbildung 1: Darstellung der Lage der Augenmuskeln innerhalb der Orbita. Ansicht des rechten Auges von kranial. Aus Prometheus LernAtlas – Kopf, Hals und Neuroanatomie, 5. Auflage, Thieme 2018, 5.16. Äußere Augenmuskeln.

Muskel	M. rectus medialis	M. rectus lateralis	M. rectus superior	M. rectus inferior	M. obliquus superior	M. obliquus inferior
Innervation (Nervus...)	oculomotorius	abducens	oculomotorius	oculomotorius	trochlearis	oculomotorius
Funktion	Adduktion	Abduktion	Elevation Innenrotation Adduktion	Depression Außenrotation Adduktion	Innenrotation Depression Abduktion	Außenrotation, Elevation, Abduktion

Tabelle 1: Innervation und Funktion der äußeren Augenmuskulatur

1.1.1.2. Histologie

Ähnlich der Skelettmuskulatur wird die extraokuläre Augenmuskulatur aus parallel angeordneten Bündeln von Muskelfasern gebildet, deren Grundlage die Fusion zahlreicher Myotuben bildet (Porter et al. 1995). Die Fähigkeit des menschlichen Auges, kleinste Bewegungen in kurzer Zeit aufeinander folgend und schnell ausführen zu

können, erfordert eine komplexe und vielschichtige Struktur der einzelnen Muskel- und Nervenfasern, sowie deren geordnetes Zusammenspiel.

Grundlage hierfür ist die motorische Einheit. Diese wird gebildet aus einem Motoneuron und einer unterschiedlichen Anzahl an Muskelfasern, welche von diesem innerviert werden (Eccles und Sherrington 1930). Alle Muskelfasern einer Einheit sind vom selben Typ (siehe 1.1.1.2.2. *Muskelfasertypen*). Die Größe der motorischen Einheit spiegelt sich in der Feinheit der durch sie ausgeführten Bewegung wieder. Je größer die motorische Einheit, also je mehr Muskelfasern sie enthält, desto gröber ist die durch sie initiierte Bewegung. In EOMs sind kleinste motorische Einheiten zu finden in einem Verhältnis Nervenfasern zu Muskelfaser 1:1 (Bruenech und Kjellefold Haugen 2015). Diese spielen eine große Rolle bei Augenfolgebewegungen.

Untersuchungen bezüglich Ermüdungsresistenz und Fusionsfrequenz einzelner motorischer Einheiten des LR von Katzen ergaben eine Unterteilung in fünf verschiedene Gruppen: FF (fast fatigable), FR (fast fatigue resistant), SF (slow fatigable), SR (slow fatigue resistant) und NT (non twitch) (Shall und Goldberg 1992). Hier finden sich deutliche Überschneidungen mit der strukturellen Unterteilung der Muskelfasertypen in EOM (Spencer und Porter 1988), wie im Unterpunkt 1.1.1.2.2. *Muskelfasertypen* näher beschrieben.

Neben der funktionellen Unterteilung motorischer Einheiten können innerhalb der Augenmuskulatur verschiedene Bereiche entsprechend ihrer Topographie und Funktion gegeneinander abgegrenzt werden. Dies ist im Folgenden näher beschrieben.

1.1.1.2.1. Augenmuskelkompartimente

Die extraokulären Augenmuskeln können jeweils grob in zwei Kompartimente unterteilt werden. Hierzu gehört zum einen die äußere orbitale Schicht, welche der Periorbita und dem Orbitaknochen anliegt, sowie eine innere globale Schicht, nahe dem Bulbus (Kato 1938, Demer 2002). Letztere wird von der orbitalen Schicht C-förmig umgriffen (siehe *Abbildung 2*).

Die globale Schicht erstreckt sich über die komplette Muszellänge und geht in eine Sehne über, welche an der Sklera inseriert. Ein Großteil der orbitalen Schicht hingegen, endet Nahe des Äquators des Augenbulbus an einem oberflächlichen Ring aus Kollagenfasern und elastischen Fasern, der bindegewebig an der knöchernen Orbita befestigt ist (Demer et al. 2000). Dieser Ring bildet einen elastischen Schlauch (Pulley), welcher den distalen Verlauf der EOM vorgibt und einen Rückzug des Augenbulbus bei Kontraktion verhindert (Demer et al. 1995, Demer et al. 2000).

Ein Charakteristikum für die orbitale Schicht ist der schmalere Durchmesser der Muskelfasern (Spencer und Porter 2006). Des Weiteren findet sich hier eine höhere Mitochondriendichte und ein ausgeprägteres mikrovaskuläres System. Hierdurch ermüdet der Muskel langsamer und eine länger andauernde Kontraktion ist möglich (Bach-Y-Rita et al. 1977). Die Anzahl an motorischen Einheiten ist deutlich geringer als in der globalen Schicht (Shall und Goldberg 1995, Demer 2002). Es wird folglich

vermutet, dass die Orbitalzone vor allem für die tonische Aktivität beim Halten der Augen in Primärposition verantwortlich ist (Scott und Collins 1973).

Studien zeigten, dass Fasern der orbitalen Zone bereits vor den Fasern der globalen Zone rekrutiert werden. Dies dient vermutlich dazu, die Position des elastischen Rings (Pulley) zu stabilisieren, bevor der Bulbus bewegt wird (Demer et al. 1995, 1997). Bei Kontraktion werden die Pulleys nach hinten bewegt. Relaxieren die Muskelfasern, schieben sie sich nach vorne. Ob die Stabilisierung der Pulleys aktiv oder nur passiv als Reaktion auf Kontraktionen der Augenmuskeln geschieht, ist bisher nicht geklärt (Demer et al. 2000, Miller 2007).

Es fanden sich darüber hinaus motorische Einheiten, die auf beide Zonen verteilt sind, sogenannte „bilayer motor units“ (Shall und Goldberg 1995). Diese sind stets vom schnell-ermüdbaren (fast fatigable - FF)-Typ. Bei einigen dieser „bilayer units“ zeigten sich Unterschiede im Ermüdungstest zwischen globaler und orbitaler Schicht (Shall et al. 1996). Dies könnte Hinweis darauf sein, dass motorische Einheiten hier unterschiedliche Muskelfasertypen beinhalten.

Neueste Studien erörterten eine weitere Unterteilung der LR- und MR-Muskeln in ein superiores und ein inferiores Segment (Demer et al. 2011, Bruenech und Kjellebold Haugen 2015).

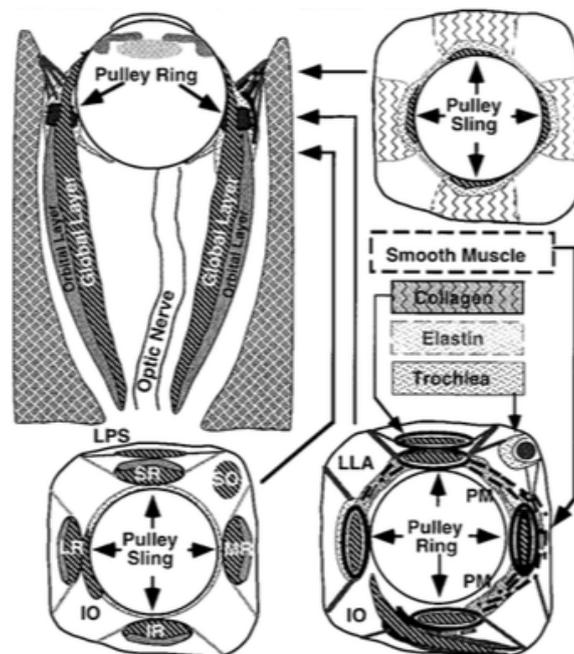


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Augenmuskelkompartimente im EOM. Die globale Schicht inseriert direkt an der Sklera, während die orbitale Schicht an einem elastischen Ring (Pulley Ring) nahe des Bulbusäquators ansetzt. Abbildung aus (Demer et al. 2000). Mit freundlicher Genehmigung von der Association for Research in Vision and Ophthalmology.

1.1.1.2.2. Muskelfasertypen

Die Heterogenität der einzelnen Muskelfasern in Lage, Innervation und Anordnung bildet die Grundvoraussetzung dafür, dass der Muskel auf unterschiedliche Anforderungen bestmöglich reagieren kann. Dazu gehören Geschwindigkeit, Dauer und Stärke der Kontraktion. Morphologisch und physiologisch unterscheidet sich die Einteilung der Muskelfasertypen der EOMs wesentlich von der klassischen Einteilung der Skelettmuskulatur.

Es können grundsätzlich zwei Muskelfasertypen voneinander unterschieden werden (Siebeck und Krüger 1955, Hess 1961). Einfach innervierte Fasern (Singly-innervated fibers = SIFs), welche fast-twitch Eigenschaften besitzen und somit den twitch Fasern in der Skelettmuskulatur entsprechen (Simpson et al. 1970) und multipel innervierte Fasern (multiply-innervated fibers = MIFs), die non-twitch Eigenschaften aufweisen und deshalb auch als non-twitch Fasern bezeichnet werden. Letztere stellen einen weitestgehend augenmuskelspezifischen Fasertypen dar. Außerhalb der Augenmuskeln wurde dieser bislang im Musculus tensor tympani und in laryngealer Muskulatur gefunden (Fernand und Hess 1969, Mascarello et al. 1982, Veggetti et al. 1982). Typisch für diesen Fasertyp sind zahlreiche neuromuskuläre Verbindungen.

Ultrastrukturell können slow-twitch Fasern, mit ihrer Felderstruktur und dem breiten Z-Band, von der Fibrillenstruktur und dem gut entwickelten endoplasmatischen Retikulum in non-twitch Fasern abgegrenzt werden (Siebeck und Krüger 1955).

Die derzeit geläufigste Klassifikation definiert sechs verschiedene Muskelfasertypen (Mayr 1977, Spencer and Porter 1988). Sie unterteilt Fasern neben ihrer Innervation auch in Lokalisation und Mitochondriengehalt (Farbe), dargestellt in *Tabelle 2*.

In der orbitalen Schicht bilden die SIF mit 80% Anteil die Mehrzahl der Muskelfasern (Spencer und Porter 2006). Sie sind charakterisiert durch eine mittig im Verlauf liegende neuromuskuläre Kontaktzone, welche sich in einer „en plaque“-Endigung darstellt. Neben der Fähigkeit zu anaerobem Stoffwechsel, enthalten sie zahlreiche oxidative Enzyme sowie Mitochondrien. Folglich gehören sie zu den ermüdungsresistentesten Skelettmuskelfasern des Menschen (Porter et al. 1995). 20% der Muskelfasern in der orbitalen Schicht sind MIFs (Spencer and Porter 1988). Diesem Typen liegen entlang seines Verlaufs zahlreiche neuronale „en-grappe“-Endigungen an, wobei die Faser im Zentrum entlang der Longitudinalachse fast-twitch Eigenschaften aufweist. Die distalen und proximalen Enden enthalten Charakteristika einer sich langsam kontrahierenden Muskelfaser. Hier wird beispielsweise die langsame Form der myofibrillären ATPase exprimiert (Jacoby et al. 1989).

Innerhalb der *globalen Schicht* können vier Muskelfasertypen voneinander unterschieden werden. Dabei weisen nur 10% aller Fasern Eigenschaften einer MIF auf. Die fast-twitch Fasern unterteilt man abhängig vom Mitochondriengehalt in: red SIF (33%), intermediate SIF (25%) und pale SIF (33%) (Spencer and Porter 2006).

In *Tabelle 2* findet sich eine Zusammenfassung der Verteilung von Muskelfasern in den Augenmuskelkompartimenten.

Kompartiment	Orbitale Schicht			Globale Schicht		
	MIF	SIF	MIF	SIF		
Mitochondrien	wenig	viel	wenig	rot, viel	intermediate, mittel	blass, wenig
Häufigkeit (%)	20	80	10	33	25	33
Faserkaliber (Mayr, 1978)	sehr dünn		mittel	dünn	mittel	dick
Kontraktion	twitch und non-twitch Merkmale	fast-twitch	non-twitch	fast-twitch	fast-twitch	fast-twitch

Tabelle 2: Histologische Differenzierung und Häufigkeiten der Muskelfasern in den Augenmuskelpartimenten

1.1.1.2.3. Feinstruktur der Muskelfasern

Betrachtet man die verschiedenen Myosin-Schwerketten-Isoformen, ist die Heterogenität der unterschiedlichen Muskelfasertypen weitaus größer. Zahlreiche Gene kodieren unterschiedliche Myosin-Schwerketten-Proteine, welche sich in ihren physiologischen und morphologischen Eigenschaften entsprechend ihrer Funktion voneinander unterscheiden (Kjellgren et al. 2003). Dabei spielen sowohl die klassischen Isoformen der adulten Skelettmuskulatur, als auch Herzmuskel- und Gewebespezifische Myosin-Schwerketten eine Rolle (Rossi et al. 2010).

Fasern der quergestreiften Skelettmuskulatur enthalten neben zahlreichen randständigen Kernen auch quergestreifte Mikrofibrillen. Die Funktionseinheiten des Muskels sind Sarkomere, welche über die Z-Streifen miteinander verbunden sind. Ein Sarkomer ist im Ruhezustand ca. 2,2µm lang und enthält Aktin- und Myosinfilamente, welche für die Kontraktion des Muskels verantwortlich sind.

Während Aktinfilamente aus kugelförmigen Aktinmolekülen gebildet werden, welche sich perlschnurartig zusammenlagern, bestehen Myosinfilamente aus 300-350 länglichen Myosin-II-Molekülen. Ein Myosinmolekül enthält zwei schwere und vier leichte Ketten. Die schweren Ketten bestehen aus langem Schwanzteil, biegsamem Halsteil und einem Kopfteil, welcher der Ort der ATPase-Aktivität ist und die Aktinbindestellen enthält (Pedrosa-Domellöf et al. 2000). Die schwere Myosinkette (MHC = Myosin Heavy Chain) definiert somit Kraft und Geschwindigkeit der Kontraktion (Staron 1997).

Es gibt zahlreiche Subtypen von Myosin-Schwerketten, daher stellen sie wichtige Bindestellen für Antikörper bei der Färbung einzelner Muskelfasertypen dar.

1.1.2. Innervation

Die einzigartige Vielseitigkeit der Bewegungsmöglichkeiten des Auges beruht nicht nur auf der Grundlage einer komplexen histologischen und molekularen Organisation der Muskulatur, sondern auch auf dem großen dynamischen Umfang der Innervation.

1.1.2.1. Motorische Innervation

Bei Augenbewegungen spielen drei Kerngebiete im Hirnstamm eine Rolle. Der Okulomotorius-Kern, von dem aus die somatomotorischen Anteile des *Nervus oculomotorius* entlang des Sinus cavernosus durch den Anulus tendineus communis zum Augensbulbus ziehen und dort die Musculi recti medialis, superior, inferior sowie den Muskel obliquus inferior innervieren. Vom Trochleariskern zieht der *Nervus trochlearis* zu seinem einzigen innervierten Muskel, dem M. obliquus superior. Der *Nervus abducens* entspringt dem Nucleus n. abducentis und innerviert als rein somatomotorischer Nerv den Musculus rectus lateralis.

Eine Besonderheit der motorischen Innervation des Auges liegt in der neuromuskulären Reizübertragung. Während die Erregung an twitch Fasern, also schnell kontrahierenden Muskelfasern, über ein relativ dickes Motoaxon (7-11µm Durchmesser) an einer „en plaque“-Endigung stattfindet, finden sich an non-twitch Fasern mehrere „en grappe“-Endigungen (3-5µm) über die komplette Muskelfaser verteilt (Jacoby et al. 1989, Büttner-Ennever et al. 2003, Büttner-Ennever 2007). An diesen „en-grappe“-Endigungen entstehen lokale Aktionspotentiale, die jedoch nicht innerhalb der Muskelfasern weitergeleitet werden können. Ihnen wird eine Funktion bei der tonischen Muskelkontraktion zugesprochen (Morgan und Proske 1984, Spencer und Porter 2006).

Aktuelle Studien haben eine weitere Form motorischer Endplatten in Form von großen, multiplen „en-plaque“-Endigungen in menschlichen EOM gefunden (Liu und Domellöf 2018). Im Vergleich zu den üblichen „en-plaque“-Endigungen sind diese flacher. Die assoziierten Muskelfasern sind breiter als jene, die mit typischen „en-grappe“-Endigungen assoziiert sind.

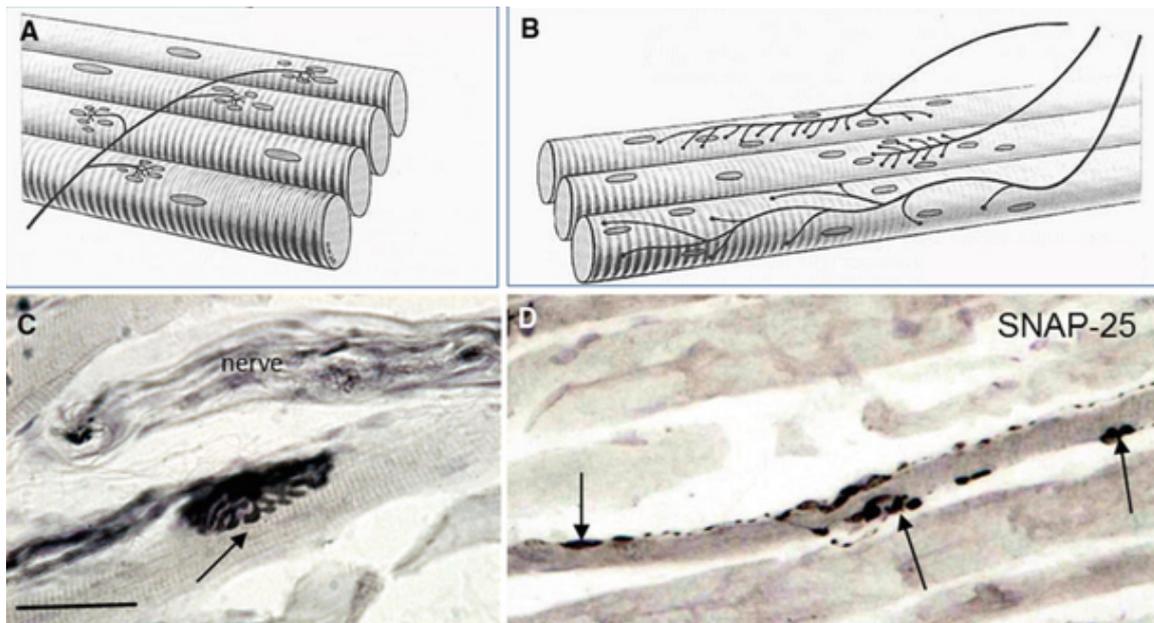


Abbildung 3: Schematische Darstellung mehrerer fast-twitch Fasern (A). Diese Muskelfasern sind einfach innerviert durch eine en-plaque-Endigung im Bereich des Muskelbauchs (Bild C). B und D zeigen multipel innervierte non-twitch Fasern. Entlang des Faserverlaufs finden sich zahlreiche neuromuskuläre Verbindungen, sogenannte en-grappe-Endigungen (schwarze Pfeile). Maßstabskala 50µm. Aus Lienbacher and Horn 2012, Biological Cybernetics. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

1.1.2.2. Sensorische Innervation

Neben Informationen über die Kopfposition und die Lokalisation eines Objektes auf der Retina, ist vor allem die Information über die Lage des Augenbulbus wichtig für präzise Augenbewegungen. Hierbei scheinen neben Efferenzkopien von motorischen Outputs auch Afferenzen von Propriozeptoren eine Rolle zu spielen (Steinbach et al. 1987).

Die Tiefensensibilität (Propriozeption) steht der Oberflächensensibilität gegenüber und dient dazu, Informationen über Lage, Bewegung und Haltung des Körpers im Raum zu vermitteln (Sherrington 1906). Dies gelingt durch spezielle Propriozeptoren in Sehnen, Muskeln und Gelenken, welche ihre Informationen vorwiegend über Dehnung und Druck erhalten.

Die Anatomie und Physiologie unterschiedlicher Propriozeptoren im menschlichen Auge wird kontrovers diskutiert. Propriozeptororgane, welche im menschlichen Auge gefunden wurden, unterscheiden sich teils grundlegend von denen der Skelettmuskulatur (Blumer et al. 1999). Funktionell scheinen sie vor allem bei langsamen Augenfolgebewegungen und Vergenzen eine entscheidende Rolle zu spielen (Miller et al. 2005, Lienbacher und Horn 2012).

In EOM konnten verschiedene Strukturen gefunden werden, denen eine Funktion bei der Propriozeption zugeschrieben werden, hierzu gehören *Muskelspindeln*. Sie sind spezialisierte Muskelfasern, welche parallel zum Muskelverlauf liegen und Veränderungen der Länge des Muskels registrieren. Diese werden über Klasse Ia- oder

Klasse II- Nervenfasern nach zentral fortgeleitet. Gamma-Motoneurone ermöglichen eine Anpassung der Empfindlichkeit. In Bezug auf die unterschiedliche Morphologie der intrafusalen Fasern der Muskelspindel kann man zwei verschiedene Typen unterscheiden. Einerseits Muskelspindeln mit Kernkettenfasern, andererseits Spindeln vom Kernsackfasertyp (Barker 1974). In menschlichen EOM findet sich eine abgewandelte Form der Muskelspindeln (Blumer et al. 1999) mit beispielsweise deutlich weniger intrafusalen Fasern, ausschließlich vom Kernkettentypus (Sevel 1986, Miller et al. 2005). Darüber hinaus kommen in EOM Muskelspindeln in unterschiedlicher Dichte vor. Im IO-Muskel finden sich nur wenige Muskelspindel während im SO- und IR-Muskel zahlreiche Spindeln gefunden werden konnten. Der LR- und MR-Muskel liegen im Mittelfeld (Sevel 1986, Miller et al. 2005). Als weitere Besonderheit kommen Muskelspindeln generell nur in der orbitalen Schicht vor (Cilimbaris 1910, Blumer et al. 1999, Ruskell 1999).

Golgi-Sehnenorgane sind mit Muskelfasern in Serie geschaltete Propriozeptoren. Sie finden sich im Muskel-Sehnen-Übergang und registrieren dort Veränderungen der Muskelspannung. Klasse Ib- Fasern bilden die Afferenzen. In menschlichen Augenmuskeln konnten bisher keine Golgi-Sehnenorgane nachgewiesen werden (Richmond et al. 1984).

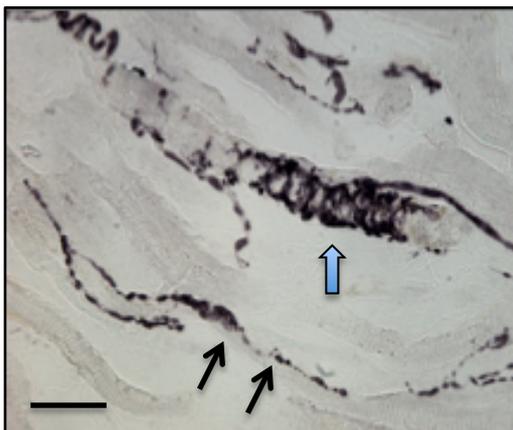


Abbildung 4: Darstellung einer Spiralendingung unter dem Lichtmikroskop (blauer Pfeil). Die Nervenendigung windet sich mehrfach um die Muskelfaser (Ruskell 1984). Im unteren Bereich des Bildes ist eine multipel innervierte Faser mit zahlreichen „en grappe“-Endigungen dargestellt (schwarze Pfeile). Maßstabskala 50µm.

1.1.2.3. Palisadenendigungen

Während Muskelspindeln in der orbitalen Schicht vermutlich als propriozeptive Organe fungieren, finden sich in der globalen Schicht augenmuskelspezifische Nervenendigungen, deren Funktion bisher unklar ist. Ihnen werden sowohl sensorische (Ruskell 1999, Donaldson 2000) als auch motorische (Lukas et al. 2000) oder kombiniert-sensomotorische Funktionen zugesprochen (Büttner-Ennever et al. 2006).

Spezielle, dünn myelinisierte Nervenfasern ziehen vom Muskel in Richtung Sehne, kehren dort um und bilden Palisadenendigungen (PE), welche kappenförmig den proximalen und distalen Muskelfaserenden aufsitzen (Dogiel 1906, Richmond et al. 1984), dargestellt in *Abbildung 5*. Umgeben von einer intakten Basalmembran bilden PE neurotendinöse Kontakte mit Kollagenfibrillen (Lukas et al. 2000), vergleichbar mit

Golgi-Sehnenorganen (Zelená und Soukup 1977). In wenigen Spezies fehlt diese Basalmembran jedoch (Blumer et al. 1998), was einen Vergleich mit sensorischen Terminalen intrafusaler Fasern von Muskelspindeln zulässt (Blumer et al. 2001).

Auch neuromuskuläre Verbindungen mit Muskelfasern der EOM kommen im menschlichen Auge vor (Richmond et al. 1984, Lukas, Blumer et al. 2000, Blumer et al. 2003). Letztere ähneln ebenfalls sensiblen Nervenendigungen an intrafusalen Fasern von Muskelspindeln.

Immunhistochemisch weisen Palisadenendigungen grundsätzlich cholinerge Transmitter auf (Lienbacher et al. 2011, Zimmermann et al. 2013). An Katzen und Ratten gab der Nachweis einer Bindung von Alpha-Bungarotoxin an die postsynaptische Membran von Palisadenendigungen Hinweise auf das Vorhandensein von postsynaptischen nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (Blumer et al. 2001, Konakci et al. 2005). Die Bindung von Alpha-Bungarotoxin an postsynaptische Membranen von Palisadenendigungen konnte vor allem in Spezies mit lateral ständigen Augen gefunden werden (Blumer et al. 2016).

Die Kontroverse über die Faserqualität der Palisadenendigungen zeigte sich darüber hinaus in widersprüchlichen Ergebnissen der Zellkörperlokalisation. Nach Tracerinjektion in den distalen Bereich der EOM konnten Ganglienzellen im Trigeminalganglion gefunden werden, was für eine sensorische Komponente spricht (Porter et al. 1983, Fackelmann et al. 2008). Darüber hinaus zeigten sich jedoch Neurone, welche ihren Ursprung im Bereich der Augenmuskelkerne haben (Büttner-Ennever et al. 2001). Auch durch anterograde Tracerinjektion in Kerngebiete des N. oculomotorius, des N. abducens und des Trigeminalganglions in Katzen konnten sowohl Vermutungen einer motorischen Komponente (Zimmermann et al. 2011) als auch einer sensorischen Komponente (Billig et al. 1997) bekräftigt werden.

Zellkörper der Palisadenendigungen, genau wie Zellkörper der MIF, wurden in der Peripherie der Augenmuskelkerne gefunden (Büttner-Ennever et al. 2001, Lienbacher et al. 2011). Man ging bisher in allen Spezies davon aus, dass PE ausschließlich mit MIF der globalen Schicht assoziiert sind (Mayr 1977, Richmond et al. 1984, Ruskell 1999). Bei Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten sich Hinweise, dass Palisadenendigungen beim Menschen auch mit fast Muskelfasern assoziiert sein könnten. Dies wird zentrales Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit sein.

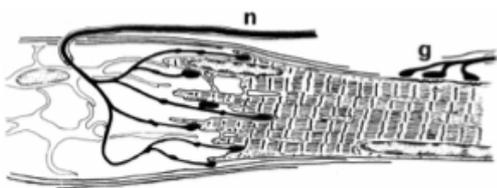


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Palisadenendigung. Diese sitzt der Muskelfaser am proximalen und distalen Ende kappenförmig auf. Aufgrund ihrer typischen Morphologie spricht man auch von myotendinösen Zylindern. Aus (Ruskell 1978), *Journal of Neurocytology*. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags.

1.2. Binokuläres Sehen

Der äußerst komplexe Aufbau extraokulärer Augenmuskeln bietet die Grundlage für binokuläres Sehen. Beim Menschen sind beide Augen nach frontal gerichtet, was dazu führt, dass sich ihre Gesichtsfelder überlappen. Die retinale Disparität ermöglicht hierbei einen räumlichen Tiefeneindruck, was unter anderem der Abschätzung von Entfernungen dient (Barlow 1967, Westheimer 2009). Man spricht auch von Stereopsis. Grundlage für räumliches Sehen sind die retinale Korrespondenz und das Simultansehen, also die *sensorische Fusion*. Beide Augen nehmen den visuellen Input gleichzeitig wahr und die aufgenommenen Eindrücke werden zentral zu einem Bild fusioniert (Howard und Rogers 1995). Um eine Fusion beider Eindrücke jederzeit zu ermöglichen, ist jedoch auch eine exakte Koordination der Augenbewegungen notwendig (Walton et al. 2017). Man spricht von *motorischer Fusion*.

Der Horopter (siehe *Abbildung 6*) zeigt die Gesamtheit aller Punkte bei einer fixierten Augenstellung, die auf korrespondierenden Stellen der Netzhaut dargestellt sind und durch Fusion zu einem Bild vereinigt werden (Linksz 1954). Sie stellt sich als gebogene Fläche dar, deren Krümmung sich mit der Distanz des fixierten Punktes ändert. Auch Punkte, die nahe vor oder hinter dem Horopter liegen, können als einfaches Bild dargestellt werden. Die Projektion dieses Bereiches auf der Netzhaut bezeichnet man als Panum-Areal (Panum 1858). Die Größe des Panumareals nimmt in Richtung Fovea centralis ab. Alle Punkte die außerhalb des Horopters und des Panumbereichs liegen, können nicht als fusioniertes Bild dargestellt werden und erzeugen Doppelbilder. Diese werden jedoch vom visuellen System herausgelöscht. Man spricht von physiologischer Diplopie (Iliescu und Timaru 2017).

Fehlstellungen eines Auges oder Störungen der motorischen Fusion, also eine fehlende Anpassung der beiden Sehachsen zueinander, zeigen sich symptomatisch als Strabismus (Walton et al. 2017).

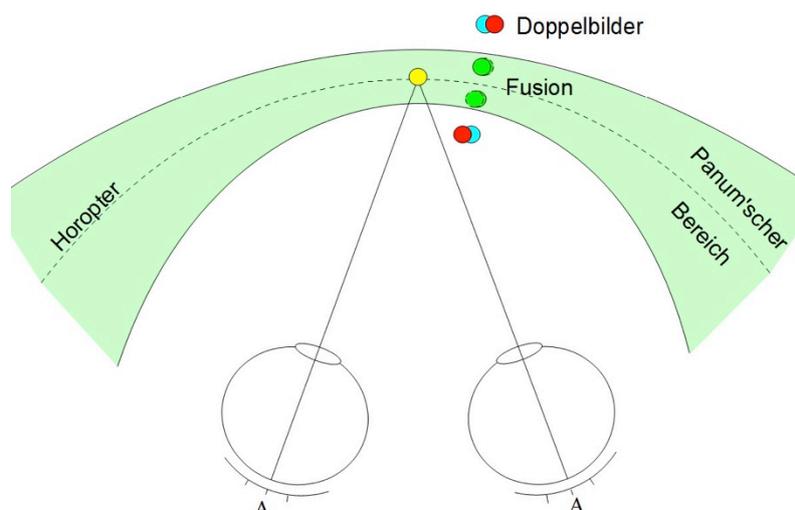


Abbildung 6: Schematische Darstellung binokulären Sehens anhand des **Horopters**. - Matthias Jäger (www.weir3d.de). Das Bild unterliegt der Creative Commons Lizenz „CC-BY-SA“

1.3. Strabismus

1.3.1. Klinik und Therapie

Strabismus oder auch Schielen bezeichnet ein Symptom, bei dem es zu einer Fehlstellung beider Augen zueinander und somit zu einer Störung binokulären Sehens kommt. Grund hierfür ist eine Gleichgewichtsstörung der auf den Augendruck wirkenden Kräfte. Am häufigsten ist angeborenes Schielen. Aber auch bestimmte Grunderkrankungen können Auslöser des Schielens sein, man spricht dann von sekundärem Strabismus.

Um Doppelbilder zu verhindern, versucht das Auge langfristig die Augenposition anzupassen. Folge ist eine dauerhafte neuronale Aktivität, welche zur Muskelhypertrophie und zu einem Umbau von Muskelfasern führt (Schiavi 2016).

Abhängig von der Schielrichtung wird die Esotropie (Innenschielen) von der Exotropie (Außenschielen) unterschieden. Letztere kommt deutlich häufiger vor (Kaufmann 2012). Man grenzt darüber hinaus latenten Strabismus, bei dem binokuläres Sehen durch retinale Fusion weiterhin möglich ist, von manifestem Strabismus ab. Letzterer tritt am häufigsten in frühkindlichem Alter auf. In der Regel zeigt sich der angeborene Strabismus in Form von Begleitschielen, auch Strabismus concomitans genannt. Hierbei ist der Schielwinkel unabhängig von der Blickrichtung weitestgehend konstant. Ungefähr 2% der Population sind von manifestem Schielen betroffen (Hashemi und Pakzad 2019).

Manifestes Schielen bedingt eine Unmöglichkeit der retinalen Fusion und somit keine Möglichkeit binokulären Sehens, wodurch es zu Doppelbildern kommt. Die Flexibilität des kindlichen visuellen Systems ermöglicht eine Kompensation durch Ausschaltung der visuellen Eindrücke eines Auges. Man spricht von Amblyopie. Die Gefahr hierbei ist eine Entwicklungsstörung des supprimierten Auges, das Erlernen des räumlichen Sehens findet nicht statt. Diesem kann durch frühzeitige intermittierende Okklusion des gesunden Auges und durch speziell angefertigte Brillen entgegengewirkt werden. Die Therapie sollte bis zum Alter von 10-12 Jahren aufrechterhalten werden um die visuelle Entwicklung während der plastischen Phase zu unterstützen. Auch eine Operation kommt bei der Therapie des Strabismus in Frage (Kaufmann 2012).

1.3.2. Strabismusoperation

Veränderungen der Muskellänge machen den Einsatz verschiedener Adaptationsmechanismen notwendig. Es ist jedoch bisher nicht ausreichend geklärt, welche Veränderungen in EOM primär Ursache und welche Veränderungen adaptive Mechanismen des Auges zum Ausgleich der Störung sind (Porter et al. 1995).

Indikationen für die „Schieloperation“ sind neben der relevanten funktionellen Störung des binokulären Sehens, welche sich in einer Unmöglichkeit der zentralen Fixation

darstellt, auch kosmetische und psychosoziale Faktoren (Kushner 2011). Ziel der Operation ist es, den Schielwinkel des Auges zu korrigieren, welcher vorab vermessen wurde. Hierfür gibt es mehrere Möglichkeiten der Behandlung, abhängig auch von der Ursache des Schielens. Durch Vordehnung eines Muskels erhöht sich dessen elastische Spannung und somit die Muskelkraft. Dieses Prinzip macht man sich auf verschiedene Weise zu Nutze:

Bei Rückverlagerung des Ansatzes eines Muskels am Bulbus nimmt dessen elastische Kraft ab und das Gleichgewicht zwischen Agonist und Antagonist wird zugunsten des Antagonisten verschoben. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Verlängerung der Sehne durch eine Schlingenoperation, bei welcher der Muskel über Fäden am ursprünglichen Ansatzpunkt fixiert wird. Auch eine Verkürzung des Muskels bewirkt eine Veränderung der Muskelkraft und somit eine Verschiebung des Gleichgewichts der Drehmomente, die am Bulbus angreifen. Die häufigste Methode hierbei ist die Resektion von Muskel und Sehne im Ansatzbereich. Das hierbei gewonnene Material diente bei der vorliegenden Arbeit zur weiteren Untersuchung und Auswertung.

Weitere Möglichkeiten der Korrektur sind die Veränderung der Stellung des Bulbus durch Verschiebung der Ansatzpunkte der muskulären Gegenspieler oder Veränderung der Muskelzugrichtung.

Es zeigte sich, dass bei Schielwinkeln über 8 Grad in der Regel eine chirurgische Behandlung eines Muskels, beispielsweise in Form von Rückverlagerung nicht ausreicht, was eine Behandlung des antagonisierenden Muskels notwendig macht. Sollte ein Muskel komplett gelähmt sein, wird dieser entfernt und sein Gegenspieler ebenfalls gelähmt oder geschwächt.

In der Regel reicht eine örtliche Betäubung bei einer Strabismusoperation aus, die Augenreflexe werden ausgeschaltet, das Auge kann nicht mehr bewegt werden. Bei Kindern und ängstlichen Patienten wird jedoch häufig stationär unter Vollnarkose operiert.

1.4. Fragestellungen

Die Funktion der Palisadenendigungen bei der Okulomotorik ist bisher nur in Teilen verstanden und daher Gegenstand aktueller Forschungen einschließlich einer möglichen Rolle bei Strabismus. Dazu sollen in der vorliegenden Arbeit einige Aspekte bei Kontrollmuskeln im Vergleich zu Strabismusresektaten untersucht werden, die möglicherweise Hinweise auf die Funktion der Palisadenendigungen liefern.

1. Sind beim Menschen Palisadenendigungen ausschließlich mit slow-Typ Muskelfasern, die vermutlich non-twitch Muskelfasern repräsentieren, assoziiert. Wenn nein, welcher prozentuale Anteil von Palisadenendigungen sitzt an non-twitch Muskelfasern?
2. Welche Unterschiede zeigen sich in LR und MR Muskeln bezüglich der Assoziation von Palisadenendigungen mit slow- oder fast-twitch Muskelfasern?
3. Zeigen sich Unterschiede in der Assoziation von Palisadenendigungen mit verschiedenen Muskelfasertypen zwischen Patienten mit Strabismus und Augengesunden?

2. Methoden und Material

Untersucht wurden Augenmuskeln von Körperspendern, bei denen zu Lebzeiten keine Erkrankungen des Auges bekannt waren, und von Patienten mit Strabismus verschiedenen Alters. Die Untersuchungen beschränkten sich dabei auf MR- und LR-Muskel-Präparate. Unterschiedliche Präparationsverfahren und Färbetechniken ermöglichten eine differenzierte Betrachtung der Strukturen unter dem Mikroskop.

Im Folgenden sind Details zur Materialherkunft und -gewinnung sowie Färbetechniken und der Auswertung unter dem Mikroskop aufgeführt.

2.1. Präparate und Präparation

Die verwendeten Augenmuskelkontrollfälle stammen von Körperspendern des Anatomischen Instituts, die zu Lebzeiten ihr Einverständnis für die Verwendung ihrer Körper für Forschung und Lehre gegeben haben, sowie aus dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Die Fälle aus dem Institut für Rechtsmedizin stammen aus einem früheren Projekt, von dem bereits einige vorgefärbte Schnitte vorlagen (Adamczyk, Büttner 2008).

Augenmuskelpräparate von Patienten mit Strabismus wurden von der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Strabismusoperation werden hierbei Augenmuskelabschnitte des Musculus rectus lateralis (Esotropie) und Musculus rectus medialis (Exotropie) reseziert (siehe 1.3.2. *Strabismusoperation*). Die Resektate wurden mit einer Nummer anonymisiert von der Augenklinik bezogen, mit Angabe des resezierten Muskels, des Alters und Geschlecht des Patienten sowie der Ursache für den Strabismus.

In allen Fällen wurde die Deklaration von Helsinki (1964) zur Forschung an menschlichem Gewebe beachtet, ein positives Ethikvotum von der Ethikkommission der LMU zur Verwendung der Resektate aus der Augenklinik und dem Institut für Rechtsmedizin lag vor.

In *Tabelle 3* sind die untersuchten Muskeln von Präparaten der Rechtsmedizin (Zeile 1-4) sowie Muskeln von Körperspendern (Zeile 5-11) aufgelistet. *Tabelle 4* zeigt eine Auflistung aller untersuchten Präparate der Augenklinik. Es werden nur Präparate aufgeführt, die ausgewertet werden konnten und somit in das Ergebnis eingingen (siehe 2.1.3.1. *Auswahl verwertbarer Augenklinikschnitte* und 3.1.1 *Verwertbarkeit der Augenmuskelpräparate*).

Die Fallnummern wurden laborintern festgelegt, die Patientendaten sind anonymisiert und damit nicht rückverfolgbar. Von der Augenklinik erhaltene Resektate erhielten wir mit Angabe von Alter, Geschlecht, Augenfehlstellung und Muskel jedoch ohne weitere Patientendaten.

Fall	Muskel	Alter	Geschlecht	Fixierung	Seite
RE-Med 002	MR und LR	51		Methanol	
RE-Med 004	MR und LR	15		Methanol	
RE-Med 005	MR und LR	1		Methanol	
RE-Med 006	MR und LR	44		Methanol	
A15-16	MR und LR	74		Methanol	
GS A5-05	MR und LR	90	m	4% PFA	links
GS A6-05	MR und LR	80	w	4% PFA	rechts
A21-07	MR und LR	86	m	Methanol	rechts
A10-06	LR	63	m	4% PFA	rechts
A14-06	LR	86	w	4% PFA	
A08-16	MR	88	w	4% PFA	links

Tabelle 3: Auflistung der Augenmuskelpreparate aus der Kontrollgruppe mit Daten zu Fall und Fixierung

Fall	Muskel	Alter	Geschlecht	Fixierung	Seite
AK197	MR	18	w	4% PFA	links
AK633	MR	68	w	Methanol	rechts
AK639	MR	21	w	Methanol	rechts
AK640	MR	27	w	Methanol	links
AK648	MR	21	w	Methanol	rechts
AK650	MR	17	w	Methanol	links
AK656	MR	76	w	Methanol	rechts
AK658	MR	43	m	Methanol	rechts
AK664	MR	57	w	Methanol	links
AK669	MR	37	w	Methanol	links
AK670	MR	4	m	Methanol	rechts
AK695	MR	55	m	Methanol	rechts
AK700	MR	62	w	Methanol	rechts
AK722	MR	9	m	Methanol	rechts
AK818	LR	5	m	Methanol	rechts
AK820	LR	5	w	Methanol	links
AK823	LR	43	w	Methanol	links
AK933	LR	6	m	Methanol	rechts
AK948	MR	31	w	Methanol	rechts
AK956	MR	26	w	Methanol	links
AK962	MR	39	m	Methanol	rechts
AK967	MR	14	m	Methanol	links
AK979	MR	36	m	Methanol	rechts
AK989	MR	38	w	Methanol	links
AK990	Mr	26	w	Methanol	rechts
AK1000	LR	4	m	Methanol	rechts
AK1006	MR	32	w	Methanol	rechts
AK1020	MR	32	w	Methanol	rechts
AK1024	MR	23	m	Methanol	links
AK1025	LR	5	w	Methanol	rechts
AK1026	MR	15	w	Methanol	links
AK1031	MR	41	N.A.	Methanol	links
AK1033	MR	68	w	Methanol	rechts
AK1046	MR	14	m	Methanol	links
AK1047	LR	6	m	Methanol	rechts
AK1057	MR	60	m	Methanol	rechts
AK1074	LR	7	m	Methanol	links
AK1075	LR	6	m	Methanol	links
AK1076	MR	35	w	Methanol	links
AK1085	MR	36	w	Methanol	links
AK1087	MR	39	w	Methanol	links
AK1092	MR	13	m	Methanol	links
AK1109	MR	31	m	Methanol	links
AK1123	MR	35	m	Methanol	rechts
AK1124	MR	4	m	Methanol	links
AK1130	MR	12	m	Methanol	rechts

Tabelle 4: Auflistung der Augenmuskelpreparate aus der Strabismusgruppe mit Daten zu Fall und Fixierung

2.1.1. Augenmuskelpreparation

Die verwendeten Augenmuskeln der Rechtsmedizin und des Anatomischen Instituts entstammen Körperspendern, bei denen zu Lebzeiten keine Augenbewegungsstörungen beschrieben wurden.

Nachdem der Augenbulbus inklusive umgebendem Fettgewebe, Nerven und Muskeln spätestens 48 Stunden post mortem aus der Orbita entnommen wurde, wurden die einzelnen Augenmuskeln der Körperspender freipräpariert, vermessen und unter Erhalt der Muskel-Sehnen-Übergänge vom Bulbus getrennt. In *Abbildung 7* ist ein frisch entnommener Augenbulbus samt extraokulärer Augenmuskulatur von medial dargestellt.

Von Patienten mit Strabismus standen keine kompletten Muskeln zur Verfügung. Dem Labor wurden postoperativ Resektate von der Augenklinik zur Verfügung gestellt. Grundlagen operativer Therapieoption sind in Kapitel 1.3.2. *Strabismusoperation* näher erläutert.

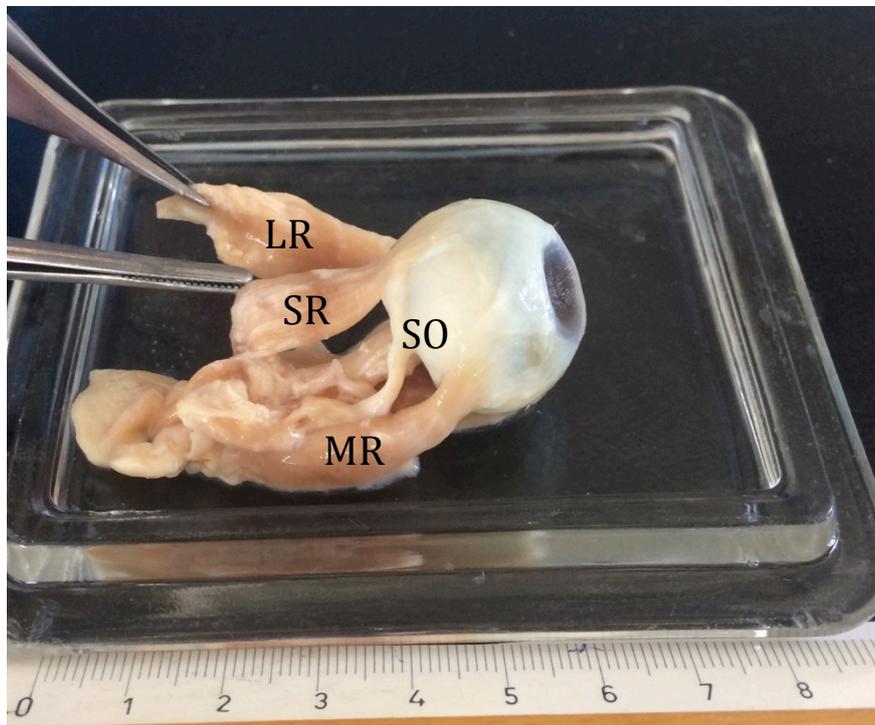


Abbildung 7: Seitliche Aufnahme eines Augenbulbus links mit extraokulärer Muskulatur (MR = musculus rectus medialis, LR = Musculus rectus lateralis, SO = Musculus obliquus superior, SR = Musculus rectus superior).

2.1.2. Augenmuskellängsschnitte am Kryostat

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Augenmuskeln in Methanol oder 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bei 4°C gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Augenmuskeln bei selbiger Temperatur in aufsteigender Sucroselösung (10%, 20%, 30% in 0,1M PBS (pH: 7,4)) über einen Zeitraum von 2 Tagen inkubiert um Eiskristalle bei der Herstellung von Gefrierschnitten zu vermeiden.

Vor dem Schneiden wurde der Muskel in Isopentan schockgefroren (-80°C). Auf einen Objekthalter wurde ein Kryo-spezifisches Einbettmedium (tissue tek O.C.T. Compound) aufgetragen, in welches der Muskel anschließend eingebettet wurde. Am Kryostat wurden nun Längs- oder Querschnitte mit 20µm Dicke angefertigt und direkt auf „Superfrost-Plus“-Objektträgern (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgebracht.

Pro Augenmuskel konnten ungefähr 100-150 Schnitte angefertigt werden. Bei Präparaten der Augenklinik hingegen deutlich weniger, da hier nur der distale Muskel-Sehnen-Übergang des Augenmuskels zur Verfügung stand.

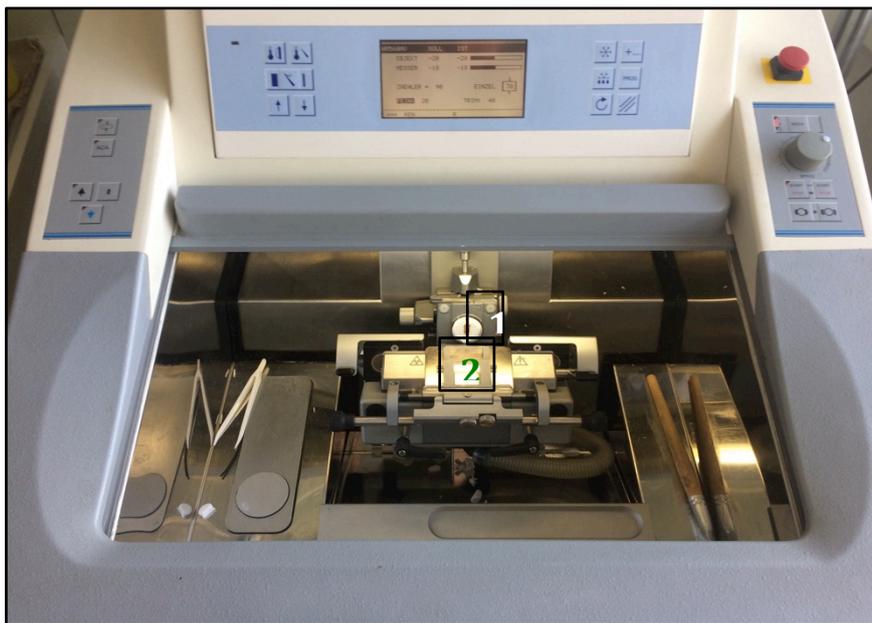


Abbildung 8: Kryostat mit Schneidevorrichtung und Objekthalter (1) sowie Auflage zur Entnahme angefertigter Schnitte (2).

2.1.3. Auswahl verwertbarer Schnitte aus der Augenklinik

Es zeigte sich, dass nur ungefähr jedes zehnte Präparat aus der Augenklinik Muskelgewebe enthielt und somit für weitere Untersuchungen in Frage kam. Alle anderen Präparate, die nur Sehne enthielten, wurden nicht weiter bearbeitet. Um die Präparate mit Muskel-Sehnen-Übergang zu ermitteln, ohne zuvor zahlreiche Schnitte zu

färben, dienten Probefärbungen des jeweils 5. und 10. Schnitts während des Schneidevorgangs. Dazu wurde eine schnelle Färbemethode mit Pikrofuchsin angewandt, welche innerhalb weniger Minuten durchführbar ist. Muskel und Sehne werden in der Darstellung im Hellfeld deutlich voneinander abgegrenzt.

Nach Anfertigung der ersten 10 Schnitte wurden die beiden Objektträger (5 und 10) mit frisch geschnittenen 20µm dicken Längsmuskelschnitten für kurze Zeit auf der Wärmeplatte getrocknet. Anschließend wurden wenige Tropfen von Pikrofuchsinlösung auf die Präparate getropft. Nach 60 Sekunden wurden die Präparate jeweils für eine Minute in 96%igen und 100%igen Alkohol getaucht, welcher anschließend durch zweimal zweiminütiges Baden in Xylol-Lösung dem Präparat entzogen wurde. Zuletzt folgte die Eindeckelung in DPX Mountant (Sigma).

Die Schnitte konnten nun unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Sofern Muskelfasern auf einem der beiden Schnitte zu sehen waren, wurde das Präparat am Kryostat weitergeschnitten.

2.1.4. Augenmuskelquerschnitte in vier Ebenen am Kryostat

Zur Beurteilung der Verteilung der Muskelfasertypen in unterschiedlichen Ebenen des Muskels wurden Querschnitte eines MR-Muskels eines augengesunden Körperspenders angefertigt. Nach Inkubation in aufsteigender Sucroslösung, wurde der Muskel in 8 ungefähr gleich große Abschnitte unterteilt. Vier dieser Abschnitte wurden in Isopentan schockgefroren und anschließend auf einen Objekthalter nebeneinander aufgelegt, mit der jeweils proximalen Seite nach unten (siehe *Abbildung 9* und *Abbildung 10*). Nach der Einbettung in tissue tek (O.C.T. Compound) wurden 50 Schnitte am Kryostat (20µm dick) angefertigt, wobei auf jedem Objektträger im Anschluss jeweils vier Schnitte aus den unterschiedlichen Ebenen des Muskels nebeneinander zu finden waren. Ziel war es bei der Präparation, den Muskel in 4 Ebenen zu unterteilen, wobei jeder Schnitt einer Ebene ungefähr den gleichen Abstand zur nächsten Ebene hat.

Bis zur Färbung wurden die Schnitte bei -20°C gelagert.



Abbildung 9: Dargestellt ist der MR links eines Kontrollfalls im Längsschnitt. Dieser wird im Folgenden in 8 gleichgroße Muskelabschnitte unterteilt

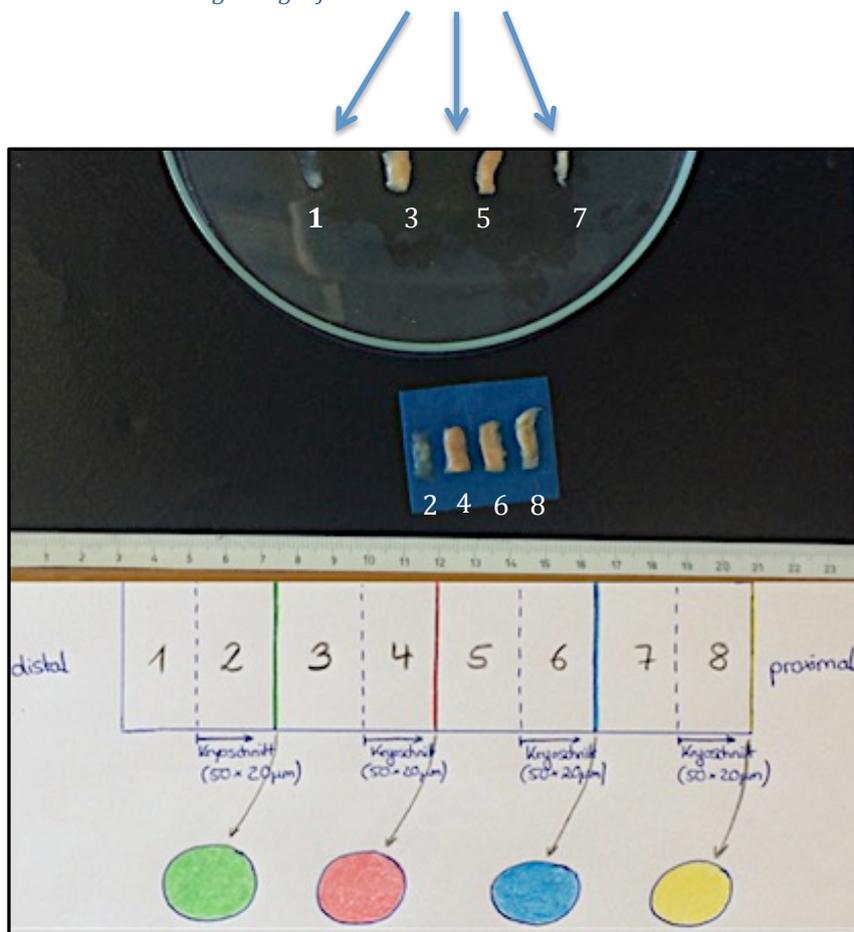


Abbildung 10: In der oberen Bildhälfte ist der Muskel längs in 8 ungefähr gleichgroße Abschnitte unterteilt (1-8). In der unteren Bildhälfte ist der Muskel graphisch im Längsschnitt dargestellt. Konkordant zur oberen Bildhälfte wird der Muskel in 8 gleichgroße Bereiche unterteilt, wobei Abschnitt 1 den am weitesten distal, Abschnitt 8 den am weitesten proximal gelegenen Anteil des Längsschnitts darstellt. Die Muskelabschnitte 2, 4, 6 und 8 werden gemäß der Graphik auf dem Objektträger zum Schneiden am Kryostat platziert. Die farbige Markierung stellt hierbei die Fläche des Muskelabschnitts dar, auf welcher dieser auf dem Objektträger liegt (stets die proximale Fläche des Muskelabschnitts). Die Querschnitte werden also hintereinander von distal nach proximal angefertigt. (Präparat 08/16, MR li)

2.2. Färbungen

Für die Darstellung von Muskeln, Nervenfasern und Nervenendigungen dienen immunhistochemische Färbemethoden. Hierbei wird ein spezifischer Primärantikörper genutzt, welcher eine feste Antigen-Antikörper-Bindung mit einem bestimmten Zellmarker eingeht. Bei Mehrschrittmethoden wird zusätzlich ein sekundärer Antikörper verwendet, dessen Epitop Teil des primären Antikörpers ist. Entweder der Primärantikörper oder der Sekundärantikörper sind an einen bestimmten Marker gekoppelt. Dies kann ein Enzym sein, welches durch Reaktion mit seinem spezifischen Substrat die Bildung eines sichtbaren Farbstoffes indiziert (z.B. DAB). Aber auch Fluorochrome kommen als Marker in Frage. Bei der Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop absorbieren diese Moleküle das Licht und geben ein Teil davon als längerwellige Strahlung wieder ab. Bei der Avidin-Biotin-Methode dient Avidin als Träger eines Enzyms oder Farbstoffes. Es bindet an Biotin. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Eine Auflistung der Antikörper erfolgt in Kapitel 2.2.6. *Verwendete Antikörper gegen Nervenfasern* und 2.2.7. *Verwendete Antikörper gegen Muskelfasern*.

Für die Untersuchungen an Augenmuskelschnitten ist es notwendig, sowohl Nervenfasern, um Palisadenendigungen (PE) und fast-twitch sowie non-twitch Motoneurone darzustellen, als auch mindestens einen Muskelfasertyp (twitch oder non-twitch) anzufärben. Für Untersuchungen an den Muskelschnitten wurden verschiedene Färbemethoden genutzt, welche im Folgenden näher erläutert werden.

2.2.1. Kombinierte Immunoperoxidasefärbung

Bei der Immunoperoxidasefärbung handelt es sich um eine Avidin-Biotin-Methode. Nach der Inkubation mit einem biotinierten Sekundärantikörper, wird im weiteren Verlauf Avidin-Peroxidase hinzugegeben. Diese bindet den Indikator Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), welcher mit Wasserstoffperoxid aufgetragen wurde. Letzteres reagiert mit der Peroxidase. Bei der stattfindenden Redoxreaktion wird das DAB oxidiert, was zu dessen Braunfärbung führt. Um Nerven- und Muskelfaser farblich unterscheiden zu können, wird bei der Färbung der Nervenfasern der DAB-H₂O₂-Lösung zusätzlich Nickel hinzugefügt, welches zu einer Schwarzfärbung führt. Die Präparate können im Anschluss am Hellfeld-Mikroskop untersucht werden. Eine Auflistung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgt in *Tabelle 5*.

Die Färbung der Muskelfasern und Nervenfasern wurde in 2 Schritten über 3 Tage durchgeführt. Nach Waschen in 0,1M TBS (pH 7,4), war als erster Schritt die Blockierung der zelleigenen Peroxidase mit 1%iger H₂O₂-Lösung (30min) notwendig. Vor dem Auftragen des primären Antikörpers (SNAP-25) wurde das Präparat erneut gewaschen und dann mit Normal Horse Serum für eine Stunde präinkubiert.

Nach 24-stündiger Inkubation mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen SNAP-25 bei Raumtemperatur wurde nach Waschen mit TBS der Sekundärantikörper (biotinyliert Horse anti-Mouse) aufgetragen. Dieser inkubierte eine Stunde bevor nach erneutem Waschen die Extravidin-Peroxidase (EAP) hinzugegeben wurde. Nach Waschen mit TBS wurde nun 1%iges DAB in Lösung mit Nickel (Ammoniumnickelsulfat in 0,05 TBS) und H₂O₂ auf das Präparat aufgetragen, worauf sich an der Bindestelle des Primärantikörpers ein schwarzer Niederschlag bildete. Nach 10 min wurde die Reaktion mit TBS gestoppt. Es schloss sich direkt die Immunfärbung auf das zweite Antigen an. Nach erneuter einstündiger Präinkubation mit Normal Horse Serum wurde der Primärantikörper für die Muskelfasern aufgetragen. Hierbei wurde entweder ein Antikörper gegen Myosinkomponenten von fast-Fasern (anti-MHCf, Maus) oder von slow-Fasern (anti-MHCs, Maus) verwendet (siehe „verwendete Antikörper“). Dieser wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen mit TBS wurde erneut der biotinylierte Sekundärantikörper (anti-Maus, Pferd) aufgetragen, nach einer Stunde gewaschen und dann erneut für eine Stunde mit EAP-Lösung inkubiert. Die DAB-Reaktion erfolgte erneut über 10 min, wobei nun kein Nickel eingesetzt wurde, die Muskelfasern wurden daher rotbraun dargestellt. Nach erneutem Waschen wurde das Präparat in Aqua dest. gespült und danach getrocknet.

Es folgte eine Alkoholreihe (70%, 90%, 96% ,100%) bei der die Schnitte entwässert wurden.

Als Eindeckmedium diente DPX, nachdem die Präparate für 5 min und anschließend 15 min in Xylol (Dimethylbenzol) entalkoholisiert wurden.

	Marker	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Indikator
Nervenfasern (PE)	SNAP-25	anti-SNAP 25 (Maus)	biotinyliert anti-Maus (Pferd)	DAB + Nickel
Muskelfaser slow	Myosin	anti-MHCs		DAB
Muskelfaser fast	Myosin	anti-MHCf		DAB

Tabelle 5: Antikörper bei kombinierter Immunoperoxidasefärbung

2.2.2. Immunfluoreszenzfärbung

Bei Immunfluoreszenzfärbungen dienen Fluorochrome als Farbstoffe. Sie sind an einen Sekundärantikörper gebunden. Es stehen hierbei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung, welche Licht unterschiedlicher Wellenlänge absorbieren. Es können somit, neben den Nervenfasern, sowohl Myosinmarker von Muskelfasern des slow-Typs als auch des fast-Typs in einem Präparat in unterschiedlicher Farbe unter dem Mikroskop dargestellt werden. Als Fluorochrome wurden Dylight-Blau, Cy3-Rot und Alexa-Grün verwendet. Eine Auflistung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgt in

Tabelle 6. Die Präparate wurden im Anschluss am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfilter untersucht.

Nach dem Waschen des Präparats in 0,1M TBS, wurde es mit 5% NDS (in 0,3% Triton) für eine Stunde präinkubiert. Im Anschluss daran wurden die verschiedenen Primärantikörper hinzugegeben. Hierbei stand eine große Variationsbreite an verschiedenen Antikörpern und deren Sekundärantikörper mit Fluorochromen zur Verfügung (eine Auflistung der Primärantikörper siehe in *Tabelle 6*). Nach 24 Stunden Inkubation des Primärantikörpers bei Raumtemperatur wurde nach erneutem Spülen der fluoreszierte Sekundärantikörper auf das Präparat gegeben. Hierbei war die Lichtempfindlichkeit der konjugierten Antikörper zu beachten. Nach zwei Stunden wurden alle ungebundenen Sekundärantikörper herausgewaschen und das Präparat in Aqua dest. gespült. Nachdem das Präparat getrocknet wurde, folgte die Eindeckelung in Gel/Mount. Die Präparate wurden im Anschluss bei 4°C im Dunkeln gelagert.

	Marker	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Indikator
Nervenfasern (PE)	SNAP-25	anti-SNAP 25 (Maus)	anti-Maus (Esel)	Fluorochrom (grün)
Muskelfaser slow	Myosin	anti-MYH7B (Ziege)	anti-Ziege (Esel)	Fluorochrom (rot)
Muskelfaser fast	Myosin	anti-FMyHC (Kaninchen)	anti-Kaninchen (Esel)	Fluorochrom (blau)

Tabelle 6: Antikörper bei Immunfluoreszenzfärbung

2.2.3. Kombinierte Peroxidase-/Fluoreszenzfärbung

Eine weitere Möglichkeit der Färbung ist die Kombination der beiden zuvor erläuterten Färbemethoden. Die Nervenfasern wurden zunächst mit einer Immunperoxidase-Färbung mit dem Chromogen DAB unter Zusatz von Nickel schwarz gefärbt und waren somit später unter dem Hellfeldmikroskop zu sichten. Die beiden Muskelfasertypen (slow und fast) wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung markiert. Eine Auflistung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgt in *Tabelle 7*.

Der erste Teil der Färbung entsprach dem Färbevorgang bei der Immunperoxidasefärbung (siehe 2.2.1. *kombinierte Immunperoxidasefärbung*). Vor der Präinkubation mit 5% Normal Donkey Serum wurde das Präparat erneut gewaschen. Nach einer Stunde wurden die Primärantikörper zur Markierung von Myosinketten der slow- und fast- Muskelfasern hinzugegeben und inkubierten bei Raumtemperatur. Hierbei handelte es sich um rabbit anti-FMyHC und goat anti-MYH7B (siehe 2.3.2. *Verwendete Antikörper gegen Muskelfasern*). Nach 24 Stunden wurde gespült, bevor der fluoreszierende Sekundärantikörper für 2 Stunden unter

Lichtschutz inkubierte. Nach erneutem Waschen wurde das Präparat in Aqua dest. gespült, getrocknet, anschließend in Gel/Mount eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

	Marker	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Indikator
Nervenfasern (PE)	SNAP-25	anti-SMI81 (Maus)	biotinyliert anti-Maus (Pferd)	DAB + Nickel
Muskelfaser slow	Myosin	anti-MYH7B (Ziege)	anti-Ziege (Esel)	Fluorochrom (rot)
Muskelfaser fast	Myosin	anti-FMyHC (Kaninchen)	anti-Kaninchen (Esel)	Fluorochrom (grün)

Tabelle 7: Antikörper bei kombinierter Peroxidase- /Fluoreszenzfärbung

2.2.4. Identifikation des Muskel-Sehnen-Übergangs

Zur Eingrenzung des Bereiches eines Augenmuskels, in welchem Muskelsehnenübergang zu finden ist, eignet sich eine van-Gieson Färbung. In regelmäßigem Abstand werden Schnitte mit diesem Verfahren angefärbt.

2.2.5. Färbung von Muskelquerschnitten

Bei der Färbung von Muskelquerschnitten lag das Augenmerk auf der Darstellung der Muskelfasern. Dazu diente eine Fluoreszenzfärbung, bei der Muskelfasern vom slow-Typ (MYH7B) mit Cy3-rot und vom fast-Typ (FMyHC) mit Alexa-grün markiert wurden. Eine Auflistung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgt in *Tabelle 8*.

	Marker	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Indikator
Muskelfaser slow	Myosin	anti-MYH7B (Ziege)	anti-Ziege (Esel)	Fluorochrom (rot)
Muskelfaser fast	Myosin	anti-FMyHC (Kaninchen)	anti-Kaninchen (Esel)	Fluorochrom (grün)

Tabelle 8: Antikörper bei Fluoreszenzfärbung von Muskelquerschnitten

Außerdem wurde eine Peroxidasefärbung angewandt. Hierbei wurden jeweils fünf aufeinanderfolgende Schnitte gefärbt. Auf jedem Schnitt befinden sich nebeneinanderliegend die vier Anschnitte der unterschiedlichen Muskelebenen (siehe 2.1.3. *Augenmuskelquerschnitte in vier Ebenen am Kryostat*). Es wurde für jeden Schnitt ein anderer Primärantikörper verwendet. Eine Auflistung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgt in *Tabelle 9*.

Muskelfasertyp	Präinkubation	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Indikator
fast	Normales Pferde Serum (NHS)	Maus anti- MHCf (Novocastra)	Biotinyliert anti-Maus (Pferd)	DAB
slow	Normales Pferde Serum (NHS)	Maus anti- MHCs (Novocastra)	Biotinyliert anti-Maus (Pferd)	DAB
slow	Normales Pferde Serum (NHS)	Maus anti- MHCS (Millipore)	Biotinyliert anti-Maus (Pferd)	DAB
fast	Normales Ziege Serum (NGS)	Kaninchen anti- FMyHC (Abcam)	Biotinyliert anti-Kaninchen (Ziege)	DAB
slow	Normales Kaninchen Serum (NRS)	Ziege anti- MYH7B (Santa Cruz)	Biotinyliert anti-Ziege (Kaninchen)	DAB

Tabelle 9: Antikörper bei Peroxidasefärbung von Muskelquerschnitten

2.3. Verwendete Antikörper

2.3.1. Verwendete Antikörper gegen Nervenfasern

Zur Markierung von Nervenfasern wurde in den meisten Schnitten anti-SNAP-25 (SMI81) verwendet. Vereinzelt wurde aber auch Synaptophysin angefärbt. Eine Auflistung der beiden Antikörper erfolgt in *Tabelle 10*.

SNAP-25 ist ein membranständiges Protein und bildet gemeinsam mit den Proteinen Syntaxin und Synaptobrevin den SNARE-Komplex (Membranbindekomplex) in präsynaptischen Regionen von Nervenzellen (McNew 2000). In der Plasmamembran gelegen (t-SNARE), ist es für die Fusion mit der Vesikelmembran (v-SNARE) verantwortlich. Dadurch ist eine kontrollierte Exozytose und somit die Weiterleitung von Potentialen möglich. SNAP-25 kommt jedoch auch entlang von Axonen vor (Tao-Cheng 2000). Dies macht man sich bei der Färbung von sensiblen und motorischen Nervenfasern zu nutze. Der Antikörper SMI81 bindet an SNAP-25 (Connell et al. 2009) und dient somit zur Darstellung von Motoaxonen mit Endigungen in EOM Palisadenendigungen miteingeschlossen.

Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein, welches für den Transport bestimmter Transmitter in präsynaptische Vesikel von Nervenzellen zuständig ist (Wiedenmann und Franke 1985). Durch Markierung dieses Markers mit einem spezifischen Antikörper, können Nervenfasereendigungen dargestellt werden. Es wurden sowohl Palisadenendigungen als auch „en-grappe“- und „en-plaque“-Endigungen in EOM mit diesem Antikörper markiert.

Zielmolekül	Antikörper	Firma	Mono- / polyklonal
SNAP-25	SMI81	Sternberger	Maus monoklonal
Synaptophysin	Anti-Syn	Chemicon	Kaninchen polyklonal

Tabelle 10: Antikörper gegen Nervenfasern

2.3.2. Verwendete Antikörper gegen Muskelfasern

Um Muskelfasern zu markieren, wurden Antikörper gegen verschiedene Myosinmoleküle verwendet. Hierbei spielt das unterschiedliche Expressionsmuster der verschiedenen Muskelfasertypen eine entscheidende Rolle (siehe 1.1.1.2.3. *Feinstruktur der Muskelfasern*). Es wird davon ausgegangen, dass MHCf und FMyHC Moleküle sind, die charakteristischerweise von fast-twitch Muskelfasern exprimiert werden, wohingegen MHCs und MYH7B in slow-twitch Muskelfasern vorkommen. Die Antikörper werden in *Tabelle 11* aufgelistet.

MYH7B (myosin heavy chain 7B) ist ein Gen, welches für eine Schwereketten des Myosin-II-Moleküls kodiert. Sie bildet sowohl Teile der Aktinbindestelle als auch der alpha-Helix. Diese Untereinheit ist Teil des slow-twitch Myosins. Sie kommt neben der Augenmuskulatur auch in Herzmuskeln, im Ovar und in der Niere vor (Rossi, Mammucari et al. 2010, Warkman, Whitman et al. 2012). Anti-FMyHC ist ein synthetisches Peptid welches an bestimmte Bereiche von Myosinen bindet, die mit fast Muskelfasern in EOM assoziiert sind.

Zielstruktur	Antikörper	Firma	Monoklonal/polyklonal
fast-twitch	Anti-MHCf	Novocastra	Maus monoklonal
fast-twitch	Anti-FMyHC	Abcam	Kaninchen polyklonal
slow-twitch	Anti-MHCs	Chemicon	Maus monoklonal
Slow-twitch	Anti-MYH7B	SantaCruz	Ziege polyklonal

Tabelle 11: Antikörper gegen Muskelfasern

2.4. Auswertung am Mikroskop

Die Auswertung der Schnitte im Hellfeld und unter Fluoreszenzbeleuchtung erfolgte an einem Forschungsmikroskop (*Leica DMRB Bensheim, Deutschland*).

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass bei Bestrahlung eines Präparates kurzwelliges Licht vom fluoreszierenden Farbstoff absorbiert wird, längerwelliges Licht wird hingegen abgestrahlt. Durch optische Filter wird sichergestellt, dass nur die Wellenlänge auf das Objekt geleitet wird, die zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendig ist. In *Tabelle 12* sind die verwendeten Filter, entsprechend des Fluorochroms aufgelistet.

Zur Dokumentation der Ergebnisse dienten Kameras, welche auf dem Mikroskop montiert und an einen Computer angeschlossen waren (*Pixera Pro 600 ES; Klughammer Markt Indersdorf, Deutschland, MicroFire von Optronics*). Mittels der Computersoftware „*Pixera View Finder*“ konnten vorab Helligkeit und Schärfe optimal eingestellt werden. Zur weiteren Bearbeitung von Helligkeit, Kontrast und Schärfe wurde das Programm „*Adobe Photoshop 7.0.*“ genutzt, wobei die Bilder nur soweit bearbeitet wurden, wie sie dem Präparat bei Blick durch das Mikroskop entsprachen.

Da die Fluoreszenzmoleküle im Verlauf durch das Anregungslicht des Mikroskops zerstört werden, war auf eine rasche Auswertung angefertigter Schnitte zu achten. Durch photochemische Reaktionen kann es zu einer Zerstörung des Farbstoffs und mit der Zeit zum Ausbleichen des Präparats kommen.

Fluorochrom	Cy3-Rot	Alexa-Grün	DyLight-Blau
Fluoreszenzfilter	N2.1 Filter BP 515-560nm	I3, Filter BP 450-490nm	A, Filter BP 340-380nm

Tabelle 12: Auflistung der optischen Filter im Fluoreszenzmikroskop in Abhängigkeit vom fluoreszierenden Farbstoffs

3. Ergebnisse

3.1. Auswahl der Schnitte

Untersucht wurden sowohl LR- als auch MR-Muskel-Längsschnitte von Präparaten von Körperspendern, ohne bekannte Augenfehlstellungen, und Strabismus-operierter Patienten. Die Anzahl an verfügbaren und auswertbaren LR-Muskel-Präparaten der Augenklinik war jedoch deutlich geringer, da die Sehne des LR-Muskels länger ist und so in nur wenigen Fällen bei der Operation Muskelgewebe entnommen wurde (Übersicht: von Noorden GK – binokular vision).

Um bei der Quantifizierung der Palisadenendigungen Doppelzählungen zu vermeiden, wurden keine unmittelbar benachbarten Schnitte ausgewertet. Bei einer Schnittdicke von 20µm bedeutete dies, dass mindestens 40µm Abstand zwischen zwei ausgewerteten Schnitten lag. Zur Identifikation des Bereichs eines Präparates, in welchem Muskel-Sehnen-Übergang zu finden war, diente eine van-Gieson-Färbung, bei der Muskeln rot-bräunlich und Sehnen kräftig rot angefärbt wurden (siehe *Abbildung 11*). Diese wurde bei circa jedem 15.-20. Schnitt durchgeführt. Der Muskel-Sehnen-Übergang erstreckte sich in der Regel über 40 bis 70 Schnitte. Dies entspricht, bei einer Schnittdicke von 20µm, einem Bereich von ungefähr einem Millimeter.

3.1.1. Verwertbarkeit der Augenmuskelpreparate

Im Gegensatz zu Augenmuskelpreparaten von Körperspendern der Anatomie und Rechtsmedizin, stand bei Präparaten von Patienten der Augenklinik nur das durch die Resektion bei der Operation gewonnene Material zur Verfügung. Es fanden sich in circa jedem 10. Resektat Muskelfasern. Die meisten Präparate enthielten nur Sehne. Des Weiteren war darauf zu achten, dass einige Präparate zwar Muskel enthielten, der Muskel-Sehnen-Übergang jedoch nicht angeschnitten war. Zur Identifikation verwertbarer Präparate wurde daher bereits während des Schneidevorgangs am Kryostat mithilfe einer schnellen Pikrofuchsin-Färbung eine Vorauswahl getroffen. Unter dem Hellfeld wird der Muskel rot-bräunlich dargestellt, während die Sehne kräftig rot angefärbt ist (siehe *Abbildung 12*). In einigen Fällen verwertbarer Präparate der Augenklinik, stand nur ein Teil des Muskel-Sehnen-Übergangs zur Verfügung. Somit waren deutlich weniger Schnitte pro Präparat vorhanden als bei der Auswertung ganzer Augenmuskeln von Körperspendern.

Von den ausgewählten Präparaten der Augenklinik, welche Muskulatur enthielten, konnten nur 55% in die Auswertung mit einbezogen werden. Gründe hierfür waren, neben teils fehlendem Muskel-Sehnen-Übergang oder Schneideartefakten (z.B. überlappende Muskelfasern in relevanten Bereichen), auch negative Färbeergebnisse oder das Fehlen von Palisadenendigungen.

Ganze Muskeln von Körperspendern hingegen waren in der Regel auswertbar. Selten gab es Probleme bei der Färbung, es konnte dann auf andere Färbemethoden ausgewichen werden.

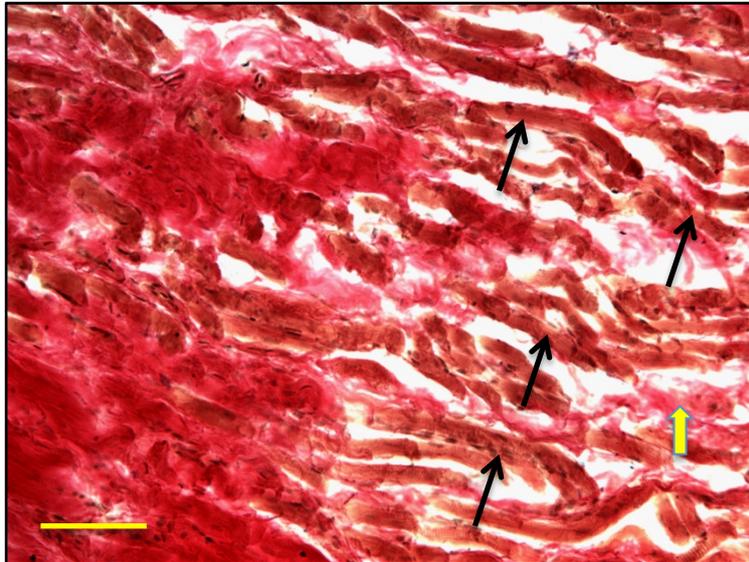


Abbildung 11: Darstellung des Muskel-Sehnen-Übergangs in der van-Gieson-Färbung. Während die Sehne (links im Bild) kräftig rot angefärbt ist, stellen die Muskelfasern (rechts und Bildmitte) sich braun-rot dar (schwarze Pfeile). Vereinzelt ziehen Sehnenanteile zwischen den Muskelfasern nach proximal (gelber Pfeil). Maßstabskala 50 μ m.

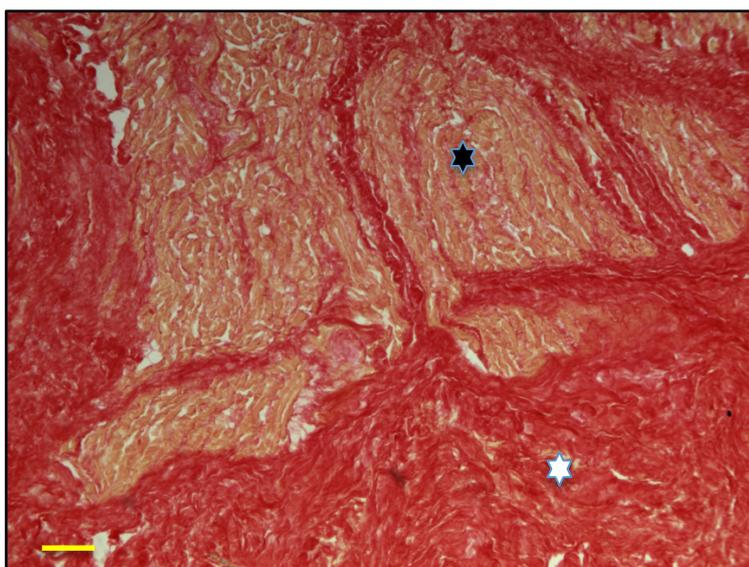


Abbildung 12: Die einfache Pikrofuchsinfärbung stellt Sehnen sowie Bindegewebe (weißer Stern) rot dar. Die Muskelfasern (schwarzer Stern) sind orange-braun angefärbt. Maßstabskala 100 μ m.

3.2. Unterschiedliche Färbemethoden im Vergleich

Zu Beginn der Studie stand die Auswahl eines geeigneten Färbeverfahrens. Besonderes Augenmerk lag darauf, die Palisadenendigungen adäquat darzustellen, um sie von anderen Nervenfasern abgrenzen zu können. Eine weitere Herausforderung war, die unterschiedlichen Muskelfasern deutlich sichtbar voneinander zu unterscheiden (slow Fasern und fast Fasern). Auch die Handhabbarkeit der Auswertung spielte eine Rolle bei der Wahl der Färbung.

3.2.1. Kombinierte Immunperoxidasefärbung

Um Nervenfasern und Palisadenendigungen an bestimmten Muskelfasertypen darstellen zu können, ist die kombinierte Immunperoxidasefärbung auf SNAP-25 oder Synaptophysin sowie Myosinproteine gut geeignet. In Verbindung mit Nickel führt die Verwendung von DAB-Stocklösung als Indikator zu einer Schwarzfärbung der Nervenfasern. Im Hellfeld sind diese gut vom weißlichen Hintergrund kontrastierbar, dargestellt in *Abbildung 13*. Die Muskelfasern werden ebenfalls mit DAB braun-rötlich markiert. Nachteil dieser Methode ist, dass aufgrund der begrenzten Farbauswahl, nicht beide Muskelfasertypen unterschiedlich angefärbt werden können. Somit werden entweder Myosinmoleküle von slow Fasern oder von fast Fasern markiert. Eine Palisadenendigung, welche nicht an der gefärbten Muskelfaser liegt, ist somit slow- bzw. fast-negativ. In der Auswertung wurde diese, soweit klar als Palisadenendigung erkenntlich, mit der ungefärbten Muskelfaser assoziiert. Als weiteres Kriterium zur Identifikation des Fasertyps diente neben der Färbung die Muskelfaserdicke. Muskelfasern vom slow-Typ hatten in der Regel einen kleineren Durchmesser.

3.2.2. Immunfluoreszenzfärbung

Alternativ zur kombinierten Peroxidasefärbung wurden in einigen Präparaten die Nervenfasern und Muskelfasern mit einer kombinierten Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Hierbei werden sowohl Nerven- als auch Muskelfasern mit einem Fluorochrom markiert werden. Um Palisadenendigungen und Muskelfasern vom slow- sowie fast-Typ unter dem Fluoreszenzmikroskop in unterschiedlicher Farbe darzustellen, werden drei verschiedene Moleküle benötigt, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge absorbieren (siehe *Abbildung 14*).

Bei nur wenigen Schnitten konnten alle drei Marker gefärbt werden. Häufig war der Marker DyLight blau nur schwach oder gar nicht unter dem Mikroskop darstellbar. Zudem war die Darstellung der Palisadenendigungen meist schwierig. Dies lag unter anderem an dem teils hohen Anteil an Lipofuszin, einem lipid- und proteinhaltigem Pigment in Körperzellen, auch Alterspigment genannt. Dieses leuchtet in allen Farben deutlich hervor und erschwert dadurch die Beurteilung angefärbter Strukturen (weißer Pfeil in *Abbildung 14*).

3.2.3. Kombinierte Immunoperoxidase- und Fluoreszenzfärbung

Aufgrund der guten Färbereigenschaften zur Darstellung von Palisadenendigungen, wurden diese mit DAB unter Hinzunahme von Nickel schwarz markiert und konnten am Mikroskop im Hellfeld dargestellt werden. Um gleichzeitig beide Muskelfasertypen deutlich voneinander abgrenzen zu können, wurden diese mit Fluorochromen markiert, welche später unter dem Fluoreszenzmikroskop gesichtet werden konnten (*Abbildung 15*).

Schnitte, bei denen nur ein Muskelfasertyp positiv auf die Färbung ansprach, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Diese Methode erwies sich, als Kombination der beiden zuvor erläuterten Färbemethoden, für die spätere Auswertung als optimal.

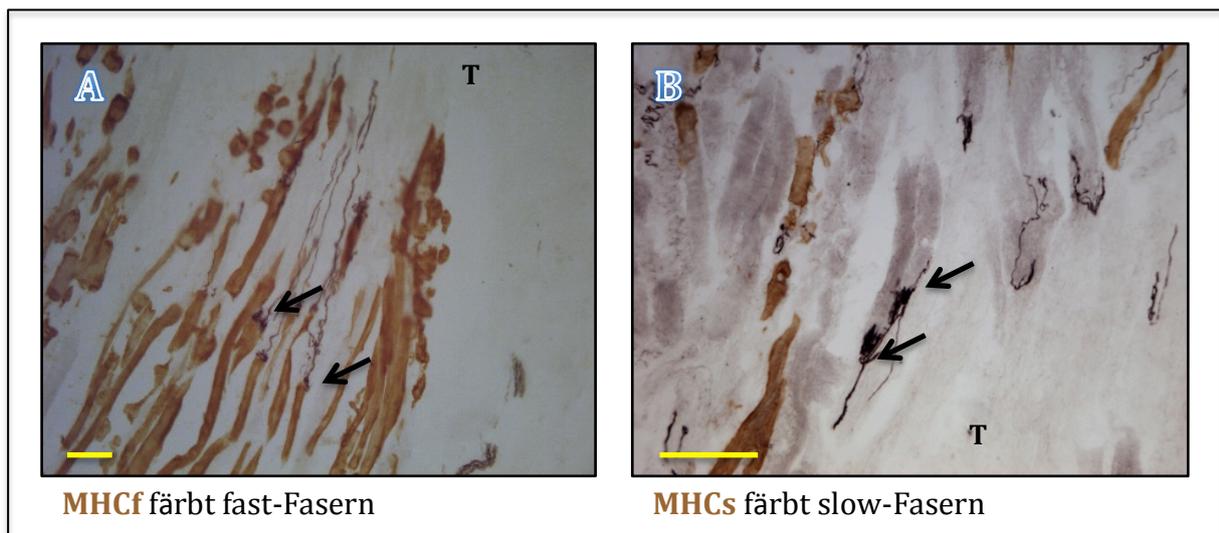


Abbildung 13: Digitalisierte Bilder vom Muskel-Sehnen-Übergang des M. rectus medialis einer Kontrollgruppe, gefärbt auf SNAP-25 (schwarz) mit DAB und Nickel sowie Myosinschwerketten (braun) nur mit DAB. Die Abbildung zeigt Palisadenendigungen (schwarz, Pfeile), die mit immunpositiven fast Muskelfasern assoziiert sind (A). In der kombinierten Färbung auf slow Muskelfasern sitzen Palisadenendigungen hier nur an MHCs-negativen Muskelfasern (B). T = Tendon (Sehne). Maßstabkala 50µm.

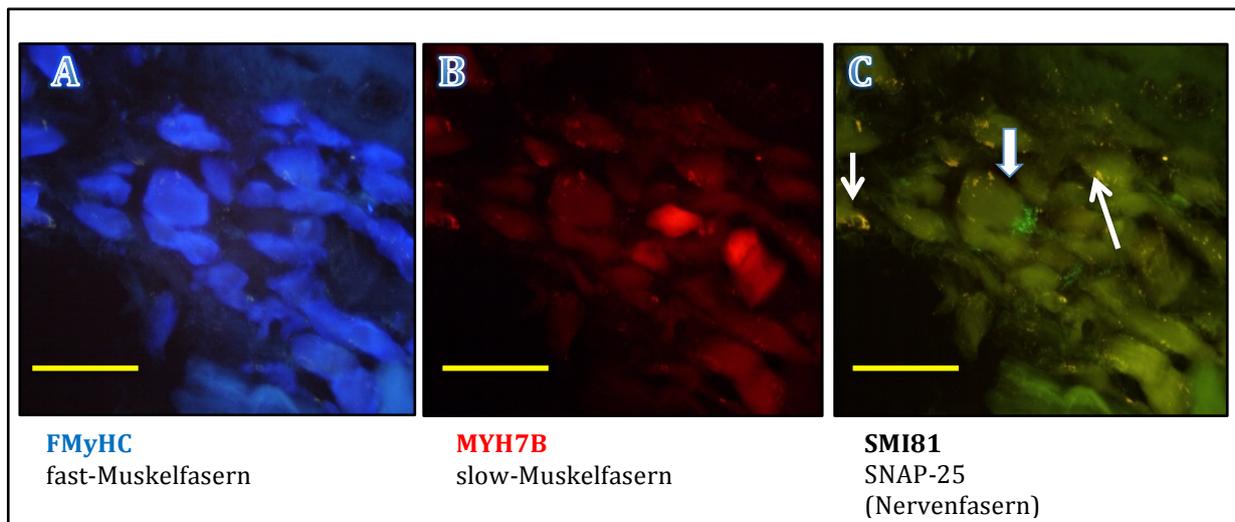


Abbildung 14: Bild A, B und C zeigen einen identischen Ausschnitt des Muskels im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs unter dem Fluoreszenzmikroskop. In A werden fast Muskelfasern über FMyHC mit DyLight-blau angefärbt. In B werden slow Muskelfasern über MYH7B mit Cy3-rot dargestellt. C zeigt eine Palisadenendigung über SNAP-25 mit Alexa-grün (weißer Blockpfeil), die an einer fast Muskelfaser sitzt (vergleiche C mit A und B). Die weißen Pfeile zeigen Lipofuszinpigmente. Maßstabskala 50µm.

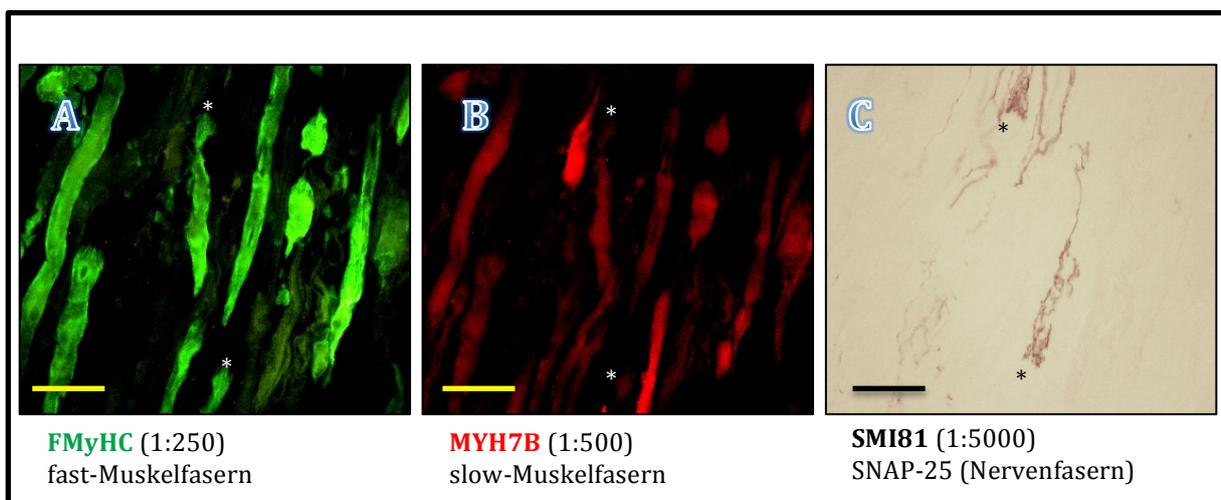


Abbildung 15: Detailaufnahme einer kombinierten Immunfluoreszenz und -peroxidasefärbung eines identischen Ausschnitts eines M. rectus medialis im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs. SNAP-positive Palisadenendigungen (C, schwarz) sind mit fast Muskelfasern (A, grün, Stern) assoziiert, die in der Immunfärbung auf MYH7B für slow-Muskelfasern (B, rot) immun-negativ sind. Maßstabskala 50µm.

3.3. Nervenendigungen in Assoziation mit verschiedenen Muskelfasertypen

Die Detektion und Quantifizierung von Palisadenendigungen in den Muskelschnitten beschränkte sich auf den Bereich des Muskelsehnenübergangs. In diesem Bereich sitzen die SNAP-25- oder Synaptophysin-positiven Palisadenendigungen einzelnen Muskelfasern kappenförmig auf (siehe *Abbildung 13-15*). Meist war zudem das Axon darstellbar, welches von der Palisadenendigung Richtung Sehne abgeht (siehe *Abbildung 16*).

Mit der Verwendung von SNAP-25 als unspezifischen Marker von Nervenfasern, wurden jedoch neben PE auch andere Nervenfasern- und endigungen angefärbt. Dabei konnten sowohl „en-grappe“- als auch „en-plaque“-Endigungen gefunden werden. Letztere waren erwartungsgemäß mit fast-Fasern assoziiert (*Abbildung 17*) und fanden sich in der Regel im Bereich des Muskelbauchs. Wie in *Abbildung 18* dargestellt, kamen teils auch mehrere „en-plaque“-Endigungen an einer einzelnen Muskelfaser vor.

„En-grappe“-Endigungen waren sowohl in Regionen des Muskelbauchs, als auch in distalen und proximalen Bereichen zu finden. Ein Beispiel ihrer charakteristischen perlkettenartigen Anreihung entlang von slow-Typ Muskelfasern ist in *Abbildung 19* dargestellt. Daneben befanden sich auch Spiraleendigungen (siehe *Abbildung 19*). Diese stellen eine Sonderform der Nervenendigung in EOMs dar und ähneln im Aussehen der sensiblen Innervation einer Muskelspindel (Daniel 1946).

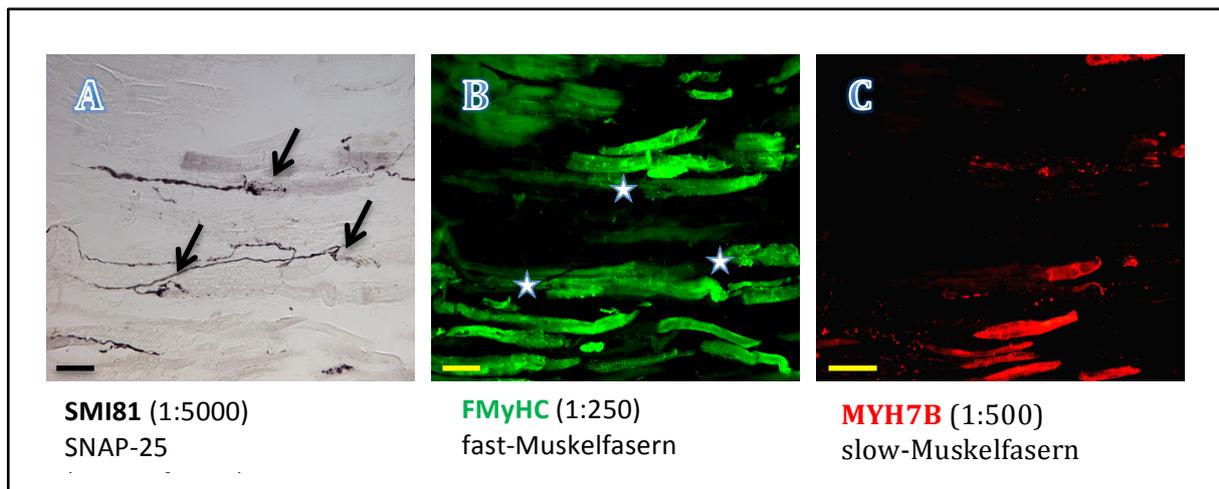


Abbildung 16: A, B und C zeigen identische Ausschnitte eines MR-Muskel-Längsschnitts im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs. Drei SNAP-25-positive Palisadenendigungen (A, schwarze Pfeile) sitzen fast Muskelfasern (B, grün, Sterne) kappenförmig auf. Diese Fasern sind in der Immunfärbung auf MYH7B (C, rot) immun-negativ. Maßstabskala 50µm.



Abbildung 17: Darstellung einer „en-plaque“-Endigung an einer fast Muskelfaser. A, B und C zeigen identische Ausschnitte eines MR-Muskel-Längsschnitts im Bereich des Muskelbauchs. A zeigt eine SNAP-25-positive „en-plaque“-Endigung (schwarzer Pfeil). Charakteristisch umgreift sie die komplette Muskelfaser, welche in der Immunfärbung FMyHC positiv (Bild B, gelber Pfeil) und MYH7B negativ (Bild C) und somit vom fast-Typ ist. Maßstabskala 50µm.

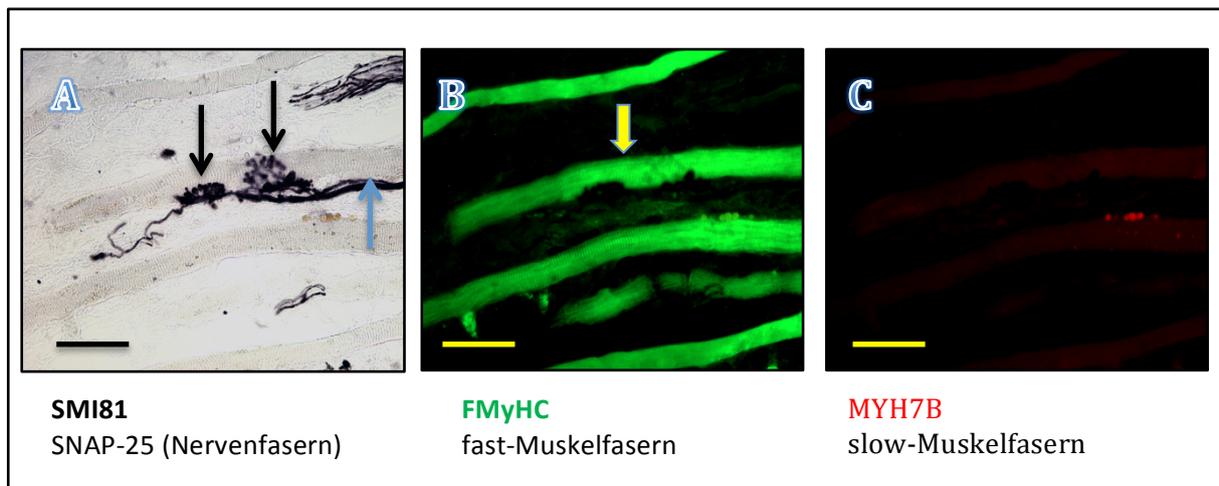


Abbildung 18: Darstellung eines identischen Ausschnitts eines *M. rectus medialis* einer Kontrollgruppe. Mehrere SNAP-25-positive „en-plaque“-Endigungen (Bild A, schwarze Pfeile) sind mit einer FMyHC-positiven fast Muskelfaser (B, gelber Blockpfeil) assoziiert, welche in der Immunfärbung auf MYH7B immun-negativ ist. Der blaue Pfeil in A stellt ein SNAP-25-positives Axon dar. Maßstabskala 50µm.

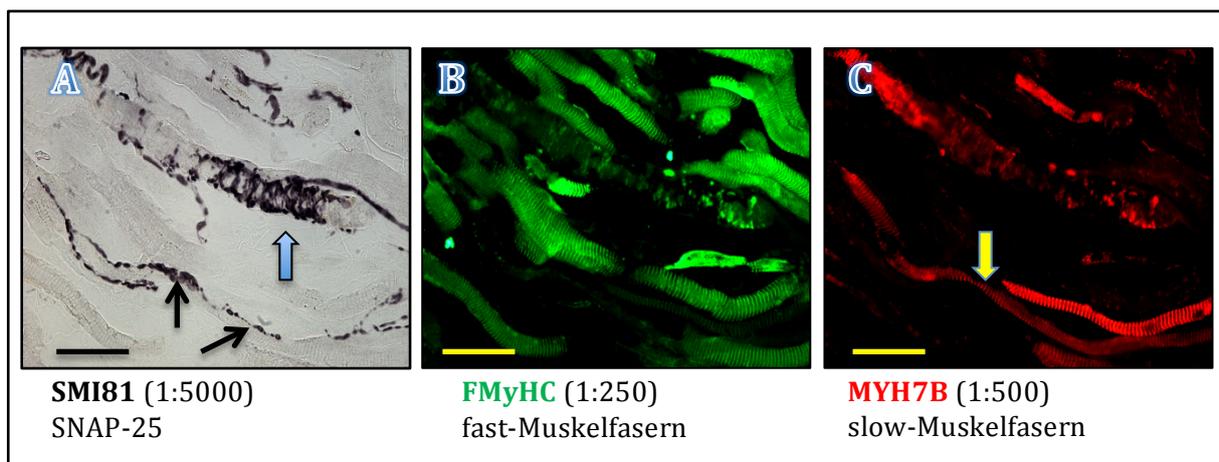


Abbildung 19: Darstellung eines identischen Abschnitts eines *M. rectus medialis* im Bereich des Muskelbauchs. SNAP-25-positive Nervenstrukturen sind im Hellfeld (A), MYH7B- und FMyHC-positiven Muskelfasern unter dem Fluoreszenzmikroskop (B und C) dargestellt. Im unteren Bereich des Bildes A sieht man den typischen perlschnurartigen Verlauf eines non-twitch Motoneurons mit multiplen „en-grappe“-Endigungen (schwarze Pfeile) entlang einer dünnen, MYH7B-positiven Muskelfaser (siehe Bild C, gelber Pfeil). In der Bildmitte (A) befindet sich eine Spiralendigung (blauer Pfeil), welche sich entlang einer breiten Muskelfaser windet. Maßstabskala 50µm.

3.4. Muskelfaserverteilung im Querschnitt

Mittels einer Fluoreszenz-Doppelfärbung an Querschnitten eines MR-Muskels wurde untersucht, ob einzelne Muskelfasern im selben Schnitt sowohl Eigenschaften einer fast- als auch einer slow- Muskelfaser aufweisen. Diese Beobachtung wurde nicht gemacht. Eine Muskelfaser war entweder FMyHC (fast)- oder MYH7B (slow)- positiv.

Entsprechend der Beobachtungen in Längsschnitten von LR- und MR-Muskeln, zeigte sich in Querschnitten eine ungleiche Verteilung von slow-Typ- und fast-Typ-gefärbten Muskelfasern in verschiedenen Ebenen des Muskels. Während sich im Bereich des Muskelbauchs nur wenige Muskelfasern mit slow-Typ-spezifischen Antikörpern darstellen ließen, zeigte sich im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs eine deutlich erhöhte Dichte dieser Fasern.

Sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch im Hellfeld war im ausgewerteten MR-Muskel auffallend, dass randständig in allen Ebenen die Dichte an Muskelfasern, welche ein slow-Typ-spezifisches Myosin-II-Molekül aufweisen, erheblich höher war als im Zentrum (siehe *Abbildung 20*). Diese Beobachtungen wurden sowohl mit dem Antikörper anti-MYH7B (SantaCruz, slow-Fasern) als auch mit dem Marker anti-MHCs (Novocastra, slow-Fasern) gemacht. Mit letzterem wurden insgesamt mehr Muskelfasern detektiert (siehe *Abbildung 21*). Immunfärbungen mit den Antikörpern MHCf (Novocastra, fast-Fasern) und MHCS (Millipore, slow-Fasern) waren in der Färbung negativ und daher nicht auswertbar.

Systematische Untersuchungen an verschiedenen Augenmuskelquerschnitten im Labor zeigten jedoch eine weitestgehend homogene Verteilung von slow-Typ Fasern über den gesamten Querschnitt. Es zeigte sich, dass die unterschiedlichen Antikörper gegen slow-Typ Muskelfasern (MHCs, MHCS, MYH7B) nahezu die gleichen Fasern markierten, anti-MYH7B insgesamt jedoch weniger Fasern färbt als anti-MHCs (vgl. *Abbildung 21*). Gleiches galt für Antikörper gegen fast-Typ Muskelfasern (MHCf, FMyHC). Auch bei diesen Untersuchungen kamen keine Muskelfasern vor, welche gleichzeitig mit slow- und fast-Typ-spezifischen Antikörpern markiert wurden.

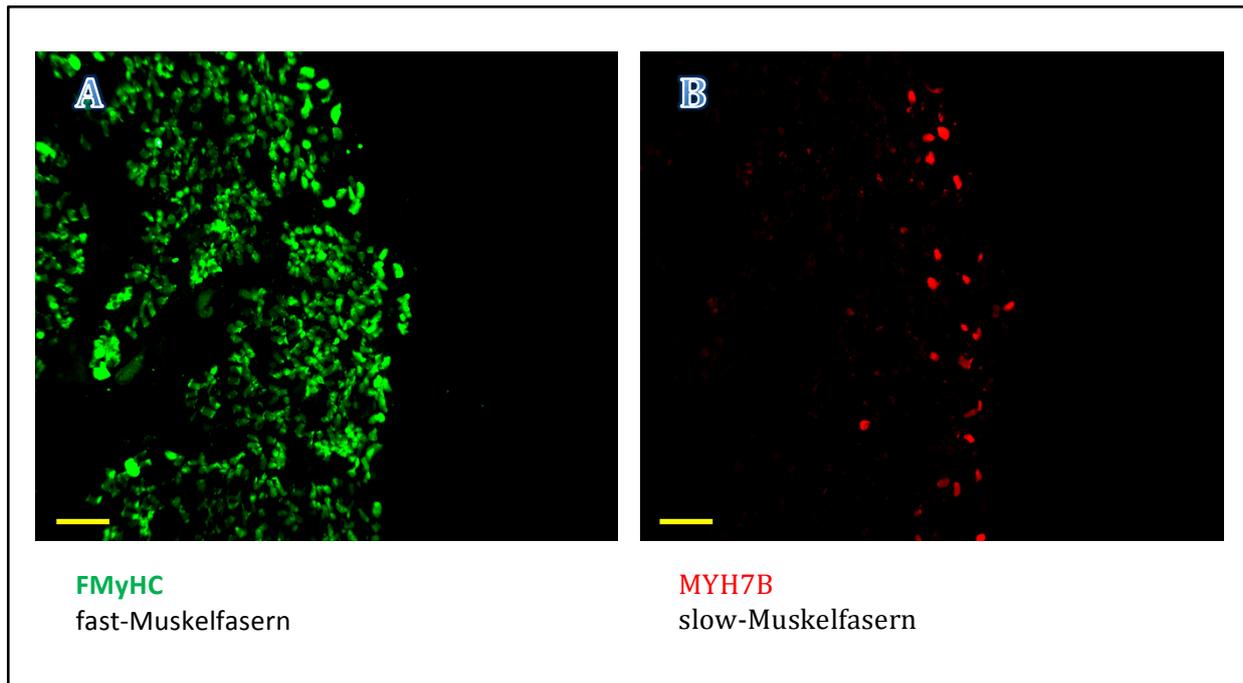


Abbildung 20: Darstellung vom Randbereich eines fluoreszenzgefärbten Muskelquerschnitts aus Ebene 2 (Bereich des Muskelbauchs). Auffallend ist eine deutlich ungleiche Verteilung von slow Muskelfasern (Bild B). Ihre Dichte ist im äußeren Bereich (orbitalen Schicht) des Querschnitts deutlich höher als im Zentrum (globalen Schicht). In Bild A sind fast-Fasern grün angefärbt. Maßstabskala 100µm.

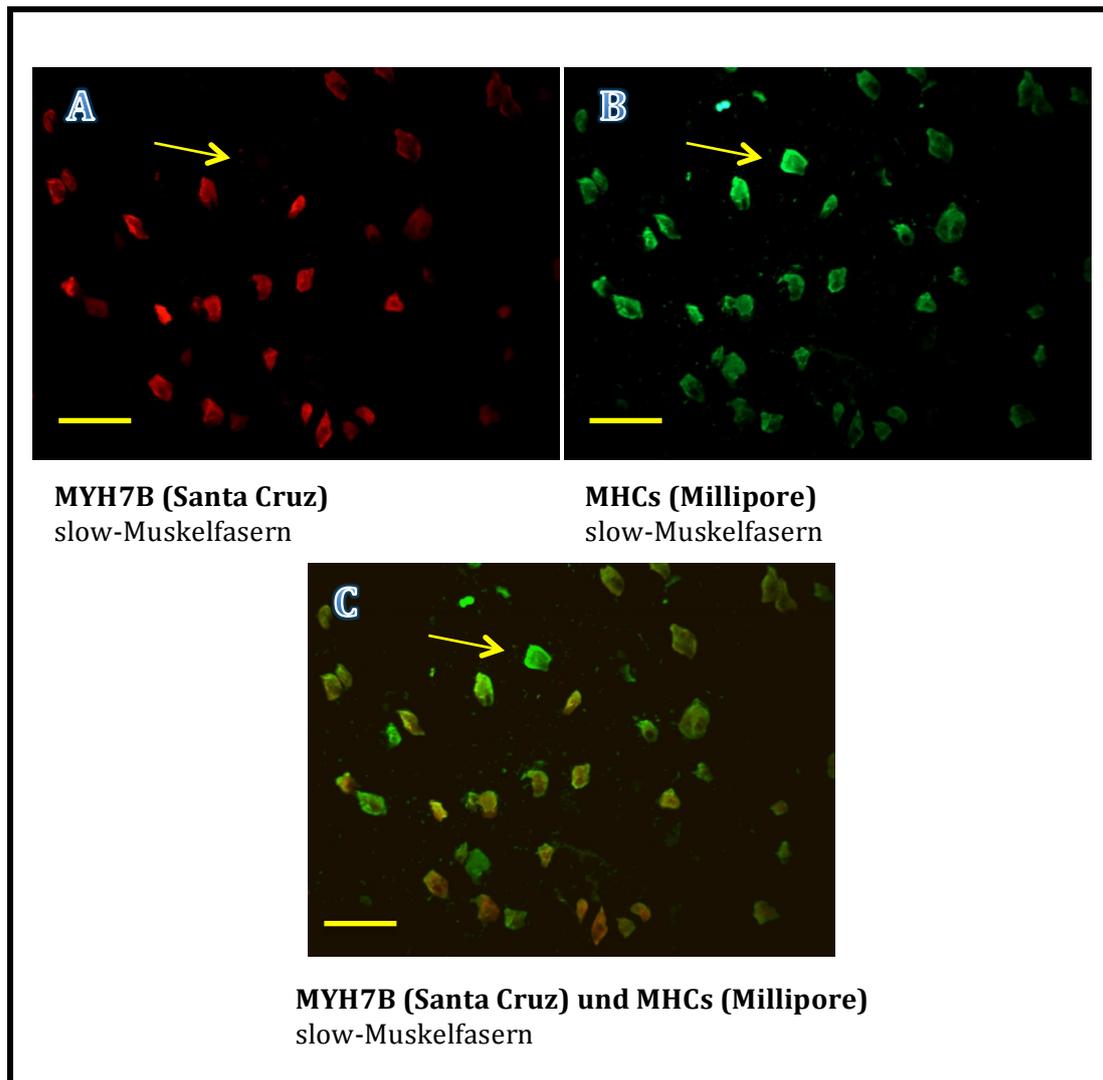


Abbildung 21: Darstellung von Muskelfasern im Querschnitt eines identischen Abschnittes eines *M. rectus medialis*. Während in Bild A slow Muskelfasern mittels des Antikörpers anti-MYH7B (Santa-Cruz) dargestellt werden, diente in Bild B anti-MHCs (Millipore) als primärer Antikörper zur Detektion von slow Muskelfasern. In Bild C sind die beiden Bilder übereinander gelegt. Zu erkennen ist, dass nahezu identische Muskelfasern mit den beiden Antikörpern dargestellt werden, dass jedoch anti-MYH7B insgesamt nur eine Teilmenge der Muskelfasern anfärbt, die mit dem Antikörper anti-MHCs angefärbt werden. Exemplarisch hierfür ist eine Muskelfaser mit dem gelben Pfeil markiert. Maßstabskala 50µm.

3.5. Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen

Pro Augenmuskel aus der Kontrollgruppe wurden durchschnittlich 8,1 Schnitte ausgewertet, in denen jeweils mindestens eine Palisadenendigung zu finden war. Es fiel auf, dass ein erheblicher Anteil an Palisadenendigungen in MR-Muskeln von augengesunden Körperspendern mit Muskelfasern assoziiert war, welche auf Marker angefärbt wurden, die mit Myosinmolekülen des fast-Typs in Verbindung gebracht werden (siehe *Diagramm 1*). Sowohl bei der Verwendung von Antikörpern gegen die slow- und fast-Typ Marker MYH7B (Santa Cruz) und FMyHC (Abcam), als auch bei der Markierung von MHCf und MHCs (beide Novocastra) waren die meisten Palisadenendigungen im Muskel-Sehnen-Übergang mit fast Fasern assoziiert (86,07%).

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich in der Anzahl und Verteilung der Palisadenendigungen zwischen LR- und MR- Muskeln von Körperspendern. Im LR-Muskel konnten deutlich weniger Palisadenendigungen gefunden werden. Pro ausgewertetem Schnitt kamen bei LR-Muskeln von Körperspendern durchschnittlich 2,1 Palisadenendigungen vor, während im MR-Muskel pro ausgewertetem Schnitt 5,9 Palisadenendigungen zu finden waren. Darüber hinaus ist mit 33,61% ein deutlich höherer Anteil an Palisadenendigungen in LR-Muskeln mit slow-Typ Fasern assoziiert, in MR-Muskeln sind es nur 13,93% aller Palisadenendigungen.

Die Verteilung der Palisadenendigungen an fast und slow Muskelfasern ist in *Tabelle 13* für den MR-Muskel und in *Tabelle 14* für den LR-Muskel dargestellt. Zum Vergleich der Verteilungsmuster der Palisadenendigungen dient das *Diagramm 1*.

In der vorliegenden Arbeit wurden, durch Färbungen als fast-twitch Fasern identifizierte Muskelfasern, die mit Palisadenendigungen assoziiert sind, stichpunktartig auf ihre strukturellen Eigenschaften, soweit unter dem Lichtmikroskop möglich, untersucht. Generell zeigten diese Fasern eine typische Querstreifung (Fibrillenstruktur), was als ein Charakteristikum für fast-twitch Fasern beschrieben ist (Siebeck and Kruger 1955).

Palisadenendigungen kamen häufig gruppiert in einer bestimmten Region des Muskel-Sehnen-Übergangs vor. Zum einen befanden sich innerhalb des Schnitts Palisadenendigungen in unmittelbarer Nachbarschaft, zum anderen konnten in nahe gelegenen Schnitten in selber Region Palisadenendigungen gefunden werden. In diesen Gruppen waren die unterschiedlichen Palisadenendigungen nicht zwangsläufig mit dem gleichen Muskelfasertyp assoziiert.

Fall	Alter	Färbung	Anzahl PE Gesamt	Anzahl PE fast	Anzahl PE slow
RE-Med 002	51	Hellfeld	6	4	2
RE-Med 004	15	Hellfeld	20	17	3
RE-Med 005	1,5	Hellfeld	62	41	21
RE-Med 006	44	Hellfeld	105	94	11
A15-16	74	FL	86	80	6
GS A5-05	90	FL	23	22	1
GS A6-05	80	FL	57	52	5
A21-07	85	FL	7	5	2
	55*		366**	315**	51**

Tabelle 13: Auflistung von ausgewerteten **MR-Muskeln** augengesunder Körperspender

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

Fall	Alter	Färbung	Anzahl PE Gesamt	Anzahl PE fast	Anzahl PE slow
RE-Med 002	51	Hellfeld	7	2	5
RE-Med 004	15	Hellfeld	10	8	2
RE-Med 005	1	Hellfeld	32	19	13
RE-Med 006	44	Hellfeld	24	15	9
A15-16	74	FL	16	11	5
A21-07	85	Hellfeld	18	14	4
A5-05	90	FL	6	5	1
A6-05	80	FL	3	3	0
A10-06		FL	2	1	1
A14-06	86	FL	4	3	1
	58,4*		122**	81**	41**

Tabelle 14: Auflistung von ausgewerteten **LR-Muskeln** augengesunder Körperspender

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

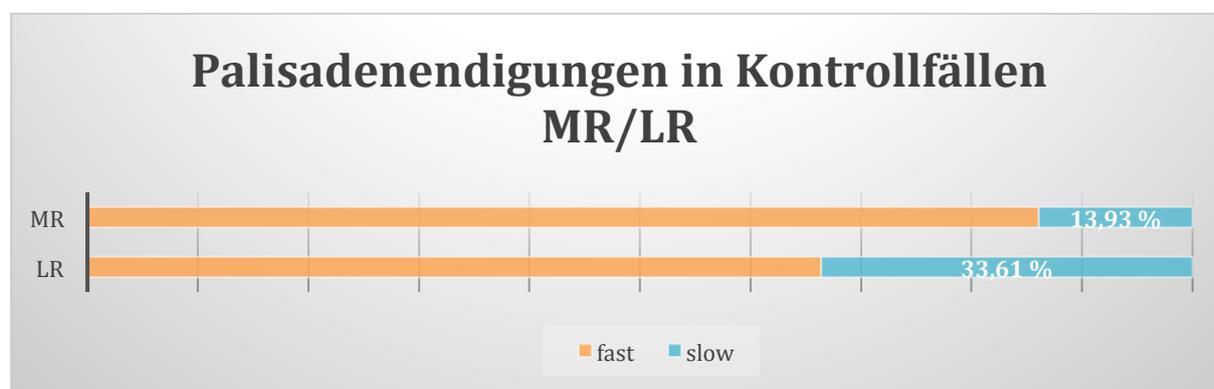


Diagramm 1: Darstellung der prozentuellen Verteilung von PE assoziiert mit slow- bzw. fast- Muskelfasern. Dabei vergleichend die Ergebnisse der Verteilung von PE in LR- und MR-Muskeln augengesunder Körperspender.

3.5.1. Palisadenendigungen nach Strabismusoperation

Für die Auswertung von MR-Muskeln Strabismus-operierter Patienten standen insgesamt 23 Präparate zu Verfügung, in denen 1456 Palisadenendigungen gefunden wurden.

Wie bei den Kontrollfällen waren Palisadenendigungen bei den Resektaten Strabismus-operierter Patienten sowohl mit slow- als auch fast Muskelfasern assoziiert. Bei der prozentualen Verteilung von PE, assoziiert mit fast-Typ Muskelfasern, zeigten sich zwischen Patienten mit Strabismus und augengesunden Körperspendern keine signifikanten Unterschiede. Eine Auflistung aller untersuchten Strabismusfälle erfolgt in *Tabelle 15* für MR-Muskeln und in *Tabelle 16* für LR-Muskeln.

Vergleichbar mit den Ergebnissen aus den Kontrollgruppen waren auch in der Kohorte Strabismus-operierter Patienten zwischen LR- und MR-Muskeln auffallende Unterschiede bei der Assoziation von Palisadenendigungen mit den unterschiedlichen Muskelfasertypen zu erkennen. Während bei MR-Muskeln 84,27% mit fast Muskelfasern assoziiert waren, waren es bei LR-Muskeln nur 57,97%. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass nur vier LR-Muskel-Präparate für die Auswertung zur Verfügung standen. Eine Übersicht zur Verteilung von Palisadenendigungen in Strabismusfällen gibt *Diagramm 2*. In *Diagramm 3* werden die Ergebnisse der Untersuchungen an Strabismusfällen den Kontrollfällen gegenüber gestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Auffallend war jedoch, dass in einigen MR-Muskel-Präparaten von Patienten mit Strabismus außergewöhnlich viele Palisadenendigungen vorkamen. In drei MR-Muskel-Präparaten (AK633, AK639 und AK648) konnten mehr als 150 Palisadenendigungen gezählt werden. Die durchschnittliche Anzahl an Palisadenendigungen pro Schnitt lag bei diesen Präparaten zwischen 8,01 und 14,75.

Fall	Alter	Färbung	Anzahl PE Gesamt	Anzahl PE fast	Anzahl PE slow
AK633	68	Hellfeld	225	188	37
AK639	21	Hellfeld	155	133	22
AK640	27	Hellfeld	81	60	21
AK648	21	Hellfeld	236	191	45
AK650	17	Hellfeld	42	34	8
AK656	76	Hellfeld	60	54	6
AK670	4	Hellfeld	101	83	18
AK197	18	FL	32	30	2
AK658	43	FL	118	104	14
AK669	37	FL	24	21	3
AK695	55	FL	39	33	6
AK700	62	FL	78	65	13
AK722	9	FL	81	64	17
AK967	14	FL	23	18	5
AK979	36	FL	12	9	3
AK1020	32	FL	32	31	1
AK1031	41	FL	2	1	1
AK1046	14	FL	2	1	1
AK1057	60	FL	7	7	0
AK1087	39	FL	91	86	5
AK1109	31	FL	3	3	0
AK1123	35	FL	8	7	1
AK1130	12	FL	4	4	0
	33,57*		1456**	1227**	229**

Tabelle 15: Auflistung von ausgewerteten MR-Muskeln Strabismus-operierter Patienten

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

Fall	Alter	Färbung	Anzahl PE Gesamt	Anzahl PE fast	Anzahl PE slow
AK818	5	Hellfeld	10	5	5
AK820	5	Hellfeld	14	5	9
AK823	43	Hellfeld	44	30	14
AK1000	4	FL	1	0	1
	14,25*		69**	40**	29**

Tabelle 16: Auflistung von ausgewerteten LR-Muskeln Strabismus-operierter Patienten

*Altersdurchschnitt

**Gesamtanzahl

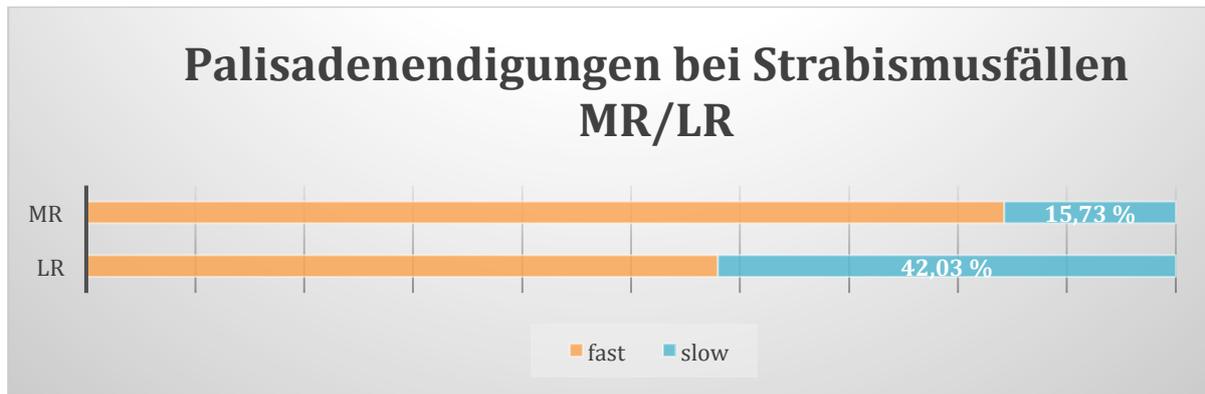


Diagramm 2: Darstellung der prozentuellen Verteilung von PE assoziiert mit slow- bzw. fast- Muskelfasern. Dabei vergleichend die Ergebnisse der Verteilung von PE in LR- und MR-Muskeln Strabismus-operierter Patienten.

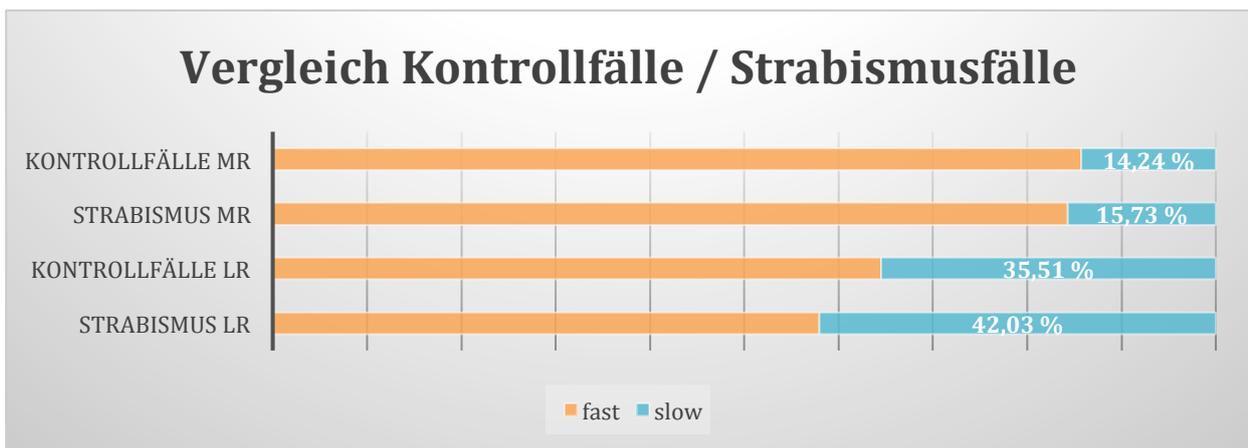


Diagramm 3: Vergleich der Verteilung von PE an fast- und slow- Muskelfasern in MR- und LR-Muskeln zwischen Strabismus-operierten Patienten und augengesunden Körperspendern.

3.5.2. Verteilung und Anzahl der Palisadenendigungen in Abhängigkeit vom Alter

Das durchschnittliche Alter der Patienten aus der Strabismusgruppe lag zum Entnahmedatum bei 33 Jahren, während das Durchschnittsalter der Körperspender bei 48 Jahren lag. Es zeigte sich, wie oben beschrieben, keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Zur Untersuchung der Rolle des Alters auf die Verteilung der Palisadenendigungen an slow- und fast-Typ Muskelfasern wurden zum Vergleich zwei Altersgruppen angelegt. Hierbei wurden die MR-Muskel-Kontroll- und Strabismusfälle gemeinsam betrachtet, gleiches galt für LR-Muskel-Fälle. Gruppe 1 beinhaltet Muskeln von Körperspendern bzw. Patienten, die bei Entnahmedatum unter 20 Jahre alt waren, Gruppe 2 enthält ausgewertete Muskelschnitte aller Personen älter als 20 Jahre. Die Anzahl an vorhanden Fällen und gezählten Palisadenendigungen war in der Gruppe der über 20 Jährigen deutlich höher.

Der Anteil an Palisadenendigungen, assoziiert mit slow Muskelfasern, war sowohl in LR- als auch MR-Muskel-Fällen bei unter 20 Jährigen höher. Während 86% aller Palisadenendigungen in MR-Muskeln älterer Patienten mit fast-Typ Muskelfasern assoziiert waren, waren es bei unter 20 Jährigen nur 79%. Bei LR-Muskel-Fällen waren sogar nur 55% aller Palisadenendigungen in jungen Patienten mit fast Fasern assoziiert, in der Gruppe der über 20 Jährigen hingegen 68%.

Bei der Gesamtzahl der Palisadenendigungen pro Schnitt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der beiden Altersgruppen sind in *Diagramm 4* veranschaulicht.

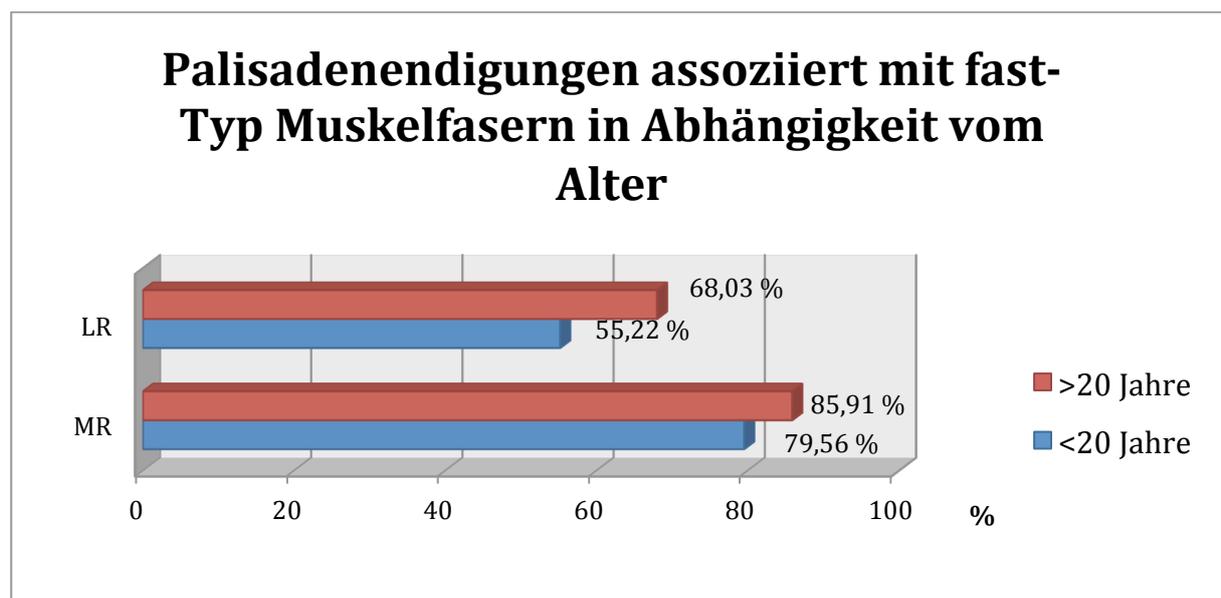


Diagramm 4: Vergleichende Darstellung der Verteilung von PE an fast-Typ Muskelfasern zwischen den beiden Altersgruppen über 20-Jähriger und unter 20-Jähriger für LR- und MR-Muskel-Fälle.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation von Palisadenendigungen mit unterschiedlichen Muskelfasern im M. rectus medialis und lateralis untersucht. Dabei wurden Muskelresektate Strabismus-erkrankter Patienten mit Augenmuskeln von Körperspender, ohne bekannte Augenfehlstellungen, verglichen. Es zeigte sich, dass ein Großteil der Palisadenendigungen im LR- und MR-Muskel in der Kontrollgruppe sowie in der Gruppe Strabismus-operierter Patienten mit fast-Myosin-exprimierenden Muskelfasern assoziiert war. Damit bestätigen die hier vorliegenden Daten frühere vereinzelte Beobachtungen bei Kontrollfällen (Laessing 2013) und belegen das erstmals auch bei Strabismus-Patienten.

Damit knüpft die vorliegende Arbeit an die Diskussion über die Rolle der Palisadenendigungen in der extraokulären Augenmuskulatur an. Darüber hinaus beschäftigt sie sich mit dem Zusammenhang von Propriozeption und Strabismus, bei dem es zu Störungen des binokulären Sehens kommt, sowie mit den Auswirkungen der Schädigung des myotendinösen Übergangs, beispielsweise durch Muskelresektionen im Rahmen einer Strabismusoperation.

Das Vorkommen von Palisadenendigungen, identifiziert als neuronale Endorgane spezieller, dünn myelinisierter Nervenfasern, ist - laut bisherigem Wissenstand - auf die globale Schicht extraokulärer Augenmuskeln beschränkt. Die genaue Funktion dieser speziellen Nervenendigungen am myotendinösen Übergang ist bisher jedoch weitgehend ungeklärt. Ihnen werden sowohl motorische als auch sensorische Funktionen zugesprochen (*siehe 1.1.2.3. Palisadenendigungen*).

4.1. Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen

Bisher wurde angenommen, dass Palisadenendigungen ausschließlich mit multipel-innervierten, non-twitch Fasern der globalen Schicht assoziiert sind (Mayr 1977, Richmond et al. 1984, Ruskell 1999). Palisadenendigung und MIF wurden in Folge dessen eine Rolle als funktionelle Einheit im propriozeptiven Apparat der Augenmuskulatur zugeschrieben (Lienbacher und Horn 2012). Dies erscheint einleuchtend, da sowohl MIF als auch Palisadenendigungen weitestgehend augenmuskelspezifisch sind (Fernand und Hess 1969, Mascarello et al. 1982, Veggetti et al. 1982). „En-grappe“-Endigungen an MIF wie auch Palisadenendigungen entstammen von Neuronen, deren Ursprung in der Peripherie des motorischen Kerngebiets liegt (Lienbacher et al. 2011, Zimmermann et al. 2011). Fast-twitch Fasern hingegen werden von Nervenfasern direkt aus dem motorischen Kerngebiet innerviert.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass ein nicht unerheblich großer Anteil an Palisadenendigungen in LR- und MR- Muskeln mit fast-Typ Fasern assoziiert ist. Dies ist in *Abbildung 23* schematisch dargestellt. Über 80% aller Palisadenendigungen im Bereich des myotendinösen Übergangs von MR-Muskeln sind mit fast-Typ Fasern assoziiert. Hierbei ist zu beachten, dass im untersuchten Bereich,

also der globalen Schicht des Augenmuskels, in welcher der myotendinöse Übergang liegt, nur 10% aller Muskelfasern vom slow-Typ sind (siehe 1.1.1.2.2. *Muskelfasertypen*). In der Gesamtzahl sind dennoch die meisten Palisadenendigungen mit Muskelfasern assoziiert, die das fast-Myosin exprimieren. Zu beachten sind hierbei auch die Ergebnisse der Untersuchungen von Muskelquerschnitten in dieser Arbeit (siehe 3.4. *Muskelfaserverteilung im Querschnitt*). Im Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs konnten mehr slow-Typ Fasern identifiziert werden als im Muskelbauch.

Bei Untersuchungen des myotendinösen Übergangs in der vorliegenden Arbeit wurden die Muskelfasern vom fast-Typ als einheitliche Gruppe behandelt. In der globalen Schicht kommen jedoch mehrere Untertypen von fast-twitch Fasern vor (siehe 1.1.1.2.2. *Muskelfasertypen*). Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang, die Assoziation von PE mit den unterschiedlichen Unterformen der fast-Typ Fasern zu untersuchen, um den funktionellen Zusammenhang von fast-twitch Faser und Palisadenendigung besser zu verstehen.

In neuesten Studien wurde ein neuer Muskelfasertyp entdeckt, welcher mit multiplen „en-plaque“ Endigungen assoziiert ist. Welche Rolle dieser in EOM spielt, ist bisher nicht bekannt (Liu und Domellöf 2018). Seine Assoziation mit Palisadenendigungen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht im Speziellen untersucht.

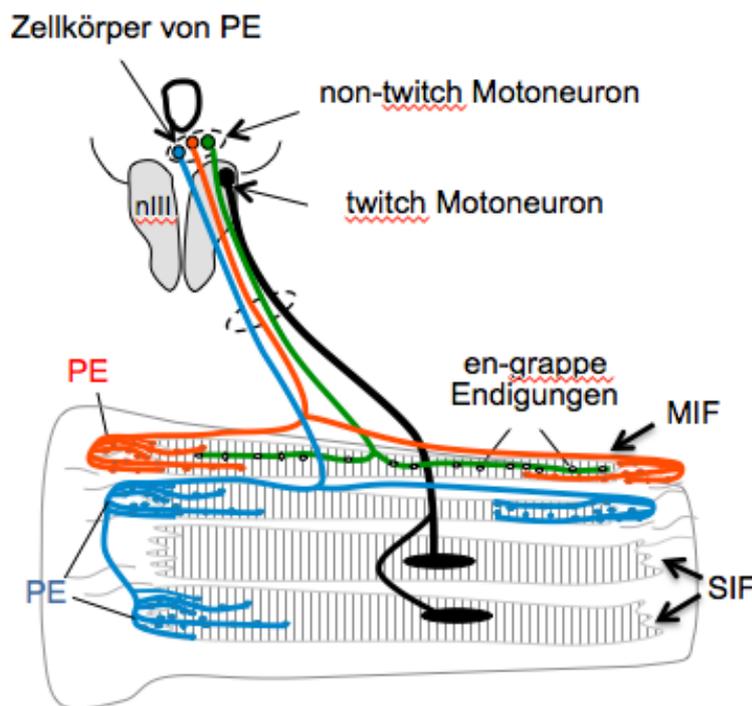


Abbildung 22: Innervation der unterschiedlichen Muskelfasertypen in EOM und deren Assoziation mit PE. Dargestellt sind zum einen multipel-innervierte Muskelfasern (MIF), welche von non-twitch Motoneuronen über „en-grappe“ Endigungen innerviert werden (grün). Ihre Zellkörper liegen, genau wie die der PE, außerhalb der motorischen Kernegebiete im Hirnstamm (Ugolini et al. 2006, Lienbacher et al. 2011). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Assoziation von PE mit fast-Fasern. Vereinfacht dargestellt, werden diese von twitch Motoneuronen über eine en-plaque Endigung (hier schwarz) innerviert. Ob es sich bei den angefärbten fast-Fasern tatsächlich um einfach-innervierte Muskelfasern mit twitch Eigenschaften handelt, konnte in der Arbeit nicht bewiesen werden (siehe 4.3.1. Die Problematik bei der Definition

unterschiedlicher Muskelfasertypen). Wie auch hier dargestellt, sitzen die PE den Muskelfasern stets am distalen oder proximalen Ende des Muskels kappenförmig auf.

4.2. Die Problematik bei der Definition unterschiedlicher Muskelfasertypen

Die Unterteilung der Muskelfasern in verschiedene Typen und Untergruppen wird durch das Vorkommen und die Verteilung von unterschiedlichen Isoformen von Myosin-Schwerketten bedingt. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper verwendet, die an unterschiedliche Isoformen binden. Zum einen Antikörper, die typischerweise mit fast-twitch Fasern (FMyHC, MHCf) assoziiert sind, zum anderen solche, die mit slow-twitch Fasern (MYH7B, MHCs) in Zusammenhang gebracht wurden und in EOM tonische Fasern markieren (siehe 2.2.7. *Verwendete Antikörper gegen Muskelfasern*).

Die Heterogenität und die Verteilung von Myosinunterformen in verschiedenen Muskelfasern ist jedoch sehr komplex und Gegenstand aktueller Forschungen. In der vorliegenden Arbeit wird vereinfacht davon ausgegangen, dass es sich bei Muskelfasern, in denen Myosine markiert werden konnten, die typischerweise mit fast-Typ Fasern assoziiert sind, um einfach-innervierte fast-twitch Fasern (SIF) handelt (Spencer und Porter 2006). Genau genommen müsste man sie als fast-Myosin-exprimierend bezeichnen. Muskelfasern hingegen, die Charakteristika einer slow Faser zeigen, werden als multipel-innervierte non-twitch Fasern (MIF) bezeichnet. Um zu beweisen, dass die angefärbten Fasern wirklich einfach-, bzw. multipel-innerviert sind, müsste man die gesamte Muskelfaser betrachten, um entweder mehrere „en-grappe“- oder eine „en-plaque“-Endigung zu identifizieren.

Darüber hinaus scheint auch die Komplexität der Innervation umfangreicher zu sein, als zunächst gedacht. Neueste Studien haben, wie zuvor beschrieben, eine weitere Form motorischer Endplatten gefunden, bestehend aus großen, multiplen „en-plaque“-Endigungen (Liu und Domellöf 2018). Entsprechend hierzu konnten in der vorliegenden Arbeit Fasern identifiziert werden, die gleichzeitig mit mehreren typischen „en-plaque“-Endigungen assoziiert waren und positiv auf FMyHC gefärbt wurden (siehe 3.3. *Nervenendigungen in Assoziation mit verschiedenen Muskelfasertypen, Abbildung 18*). Fast Myosin Heavy Chain (FMyHC) kommt typischerweise in fast-Typ Muskelfasern vor.

Neben der Verteilung und des Vorkommens von Myosinen dient die Ultrastruktur der Unterteilung der Muskelfasertypen (Siebeck und Krüger 1955). In der vorliegenden Arbeit zeigten als fast-twitch gefärbte Fasern auch typische strukturellen Eigenschaften einer fast-twitch Fasern (siehe 3.5. *Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen*), was deren Assoziation mit Palisadenendigungen nochmals unterstreicht.

Ungeklärt bleibt jedoch, ob die Muskelfaser über ihre ganze Länge dieselben Eigenschaften aufweist, also die gleichen Myosine exprimiert. In der orbitalen Schicht konnten bereits MIF identifiziert werden, die entlang ihres Verlaufs zahlreiche neuronale „en grappe“-Endigungen hatten, im Zentrum entlang der Longitudinalachse jedoch fast-twitch Eigenschaften aufwiesen (Spencer und Porter 2006). Bei Querschnittuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigte sich zudem eine ungleiche

Verteilung von slow-Typ- und fast-Typ-gefärbten Muskelfasern in verschiedenen Ebenen des Muskels. Während sich im Bereich des Muskelbauchs nur wenige Muskelfasern mit slow-Typ-spezifischen Antikörpern darstellen ließen, wies der Bereich des Muskel-Sehnen-Übergangs eine deutlich höhere Dichte an Muskelfasern auf, welche ein slow-Typ-spezifisches Myosin-II-Molekül enthalten (siehe 3.4. *Muskelfaserverteilung im Querschnitt*).

Die Tatsache, dass sich im Querschnitt keine Muskelfasern fanden, die beide Myosine gleichzeitig exprimierten, widerlegt nicht, dass es innerhalb einer Muskelfaser regionale Unterschiede bei der Expression unterschiedlicher Myosine gibt. Hierzu muss die Faser in ihrer ganzen Länge verfolgt werden. Untersuchungen isolierter Muskelfasern der orbitalen Schicht von Ratten beispielsweise bestätigten unterschiedliche Expressionsmuster entlang der Faser (Jacoby et al. 1990).

Es ist zudem nicht klar, ob alle Muskelfasern der globalen Schicht tatsächlich vom Ursprung zur Sehne durchgängig verlaufen. Auch myomyo-Kontakte sind denkbar. Dies würde bedeuten, dass Muskelfasern bereits vor Erreichen des Muskel-Sehnen-Übergangs enden, wie es bei Muskelfasern der orbitalen Schicht der Fall ist (Wong 2008).

Die vorliegenden Daten zeigen deutlich, dass Muskelfasern, die mit Palisadenendigungen assoziiert sind, nicht identische Färbereigenschaften aufweisen. Ob es sich hierbei um multipel-innervierte Muskelfasern handelt, die an ihren Enden fast-Myosin-Eigenschaften aufweisen oder wirklich um fast-twitch Fasern mit einer „en-plaque“-Endigung am Muskelbauch, muss in weiteren Studien an Hand von z.B. „whole mount Präparaten geklärt werden. Die folgenden Überlegungen sind hypothetisch und können teilweise nur dann berücksichtigt werden, wenn Fasern, die fast-Myosin-exprimierend sind, auch wirklich einfach-innervierten fast-twitch Fasern entsprechen. Das gleiche gilt für multipel-innervierte non-twitch Fasern.

4.3. Propriozeption in den Augenmuskeln

Im Gegensatz zur extraokulären Skelettmuskulatur verfügt das Auge über die Möglichkeit auf visuelle Informationen zur Wahrnehmung der Lage des Bulbus zurückzugreifen. Auch Efferenzkopien motorischer Outputs liefern hierzu Informationen (Lewis et al. 1998). Ob zusätzlich auch die Propriozeption eine Rolle bei der Okulomotorik spielt, ist bisher nicht bewiesen und weiterhin Gegenstand der Forschung (Ruskell 1999).

Brindley und Merton zeigten 1960, dass bei einem okkludierten und anästhesierten Auge keine passiven Bewegungen wahrgenommen werden können (Brindley und Merton 1960). Damit widersprachen sie damals der allgemeinen Annahme, dass afferente Nervenfasern Informationen über die Lage des Bulbus liefern. Sensorische Informationen innerhalb des Auges werden dem Hirnstamm generell über den Nervus ophthalmicus, ein Ast des Trigemini, geliefert. Bei einer Durchtrennung des Nerven bleiben laut Guthrie und Kollegen die Kontrolle über die Lage des Auges und die

Anpassungsmöglichkeiten unbeeinflusst (Guthrie et al. 1983). Es scheint somit keine absolute Notwendigkeit darin zu bestehen, die Augenhaltung über sensorische Informationen innerhalb der Augenmuskulatur zu steuern.

Dies schließt jedoch nicht aus, dass es dennoch ein propriozeptives System gibt. Andere Studien zeigten nach Durchtrennung des Nervus ophthalmicus in Katzen eine Störung binokulären Sehens (Büttner-Ennever et al. 2003). Zudem konnten auch bei komplettem Fehlen visueller Stimulation propriozeptive Signale im Kortex von Menschen detektiert werden (Balslev und Miall 2008). Wie in 1.1.2.2. *Sensorische Innervation* näher beschrieben, weist das Vorhandensein von Muskelspindeln in EOM zudem auf ein propriozeptives System hin. Die Rolle der Palisadenendigungen wird in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert. Im folgenden Kapitel, 4.2. *Propriozeptororgane in EOM*, wird hierauf näher eingegangen.

Geht man davon aus, dass visuelle Informationen, Efferenzkopien sowie Propriozeptoren bei der Okulomotorik beteiligt sind, scheinen diese in unterschiedlichem Umfang bei verschiedenen Augenbewegungen eine Rolle zu spielen (Horn und Leigh 2011). Bei widersprüchlichen Informationen sind jedoch wohl stets visuelle Eingänge dominant (Skavenski et al. 1994).

4.4. Propriozeptororgane in EOM

Während Golgi-Sehnenorgane im menschlichen Augenmuskel laut bisherigem Wissensstand keine Bedeutung zukommt (Richmond et al. 1984), konnten sowohl Muskelspindeln (Cilimbaris 1910) als auch Palisadenendigungen in EOM gefunden werden (*siehe 1.1.2.2. Sensorische Innervation*).

Die Relevanz der Muskelspindel als propriozeptive Organe in EOM ist umstritten (Bruenech und Ruskell 2001). Dies ist unter anderem dem Umstand geschuldet, dass Muskelspindel nicht in allen Spezies in EOM vorkommen (Ruskell 1999, Büttner-Ennever 2006). In Menschen und Affen ist ihr Vorkommen zudem lediglich auf die orbitale Schicht der EOM beschränkt. (Maier et al. 1974, Lukas et al. 1994). Darüber hinaus unterscheidet sich ihre Morphologie grundlegend von der in extraokulären Skelettmuskeln (Büttner-Ennever et al. 2006).

Während Muskelspindeln sich auf das orbitale Kompartiment beschränken, können Palisadenendigungen an den myotendinösen Übergängen der globalen Schicht gefunden werden (*siehe Abbildung 23*). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Da sich die Funktion der beiden Muskelkompartimente grundlegend unterscheidet, könnten sich hieraus weitere Hinweise auf die Funktion der Muskelspindel und Palisadenendigungen ergeben. Die globale Schicht spielt bei Rotationen des Bulbus eine wichtige Rolle, die orbitale Schicht scheint hingegen vor allem die Position des elastischen Rings vorzugeben (Demer 2002). Aufgrund morphologischer Charakteristika (*siehe 1.1.1.2.1. Augenmuskelkompartimente*), einer verminderten Ermüdbarkeit und einer geringeren Anzahl an motorischer Einheiten (Shall und Goldberg 1995) wird vermutet, dass die Orbitalzone vor allem für die tonische Aktivität beim Halten der

Augen in Primärposition verantwortlich ist (Scott und Collins 1973). Für schnelle, phasische Bewegungen, wie z.B. Sakkaden, ist hingegen vorrangig die globale Zone verantwortlich (Demer 2002). Da Palisadenendigungen bisher nur in der globalen Zone nachgewiesen werden konnten, wäre anzunehmen, dass sie zu einem reibungslosen Ablauf von schnellen, phasischen Bewegungen beitragen. Muskelspindel und MIF hingegen, welche anteilig häufiger in der orbitalen Schicht vorkommen, könnten eine Rolle bei der Fixation des Auges in Primärposition durch die Beeinflussung der Lage des Pulleys zukommen.

Allgemein zeigte sich, dass Palisadenendigungen häufiger und zahlreicher in Spezies vorkommen, deren Blick nach frontal und nicht nach seitlich gerichtet ist. Bei Nagetieren beispielsweise konnten meist keine Palisadenendigung gefunden werden (Blumer et al. 2016). Dies ist Hinweis auf deren Funktion beim binokularen Sehen (siehe 1.2. *binokulares Sehen*) und weist daher auf eine Rolle der Palisadenendigungen als Propriozeptoren hin.

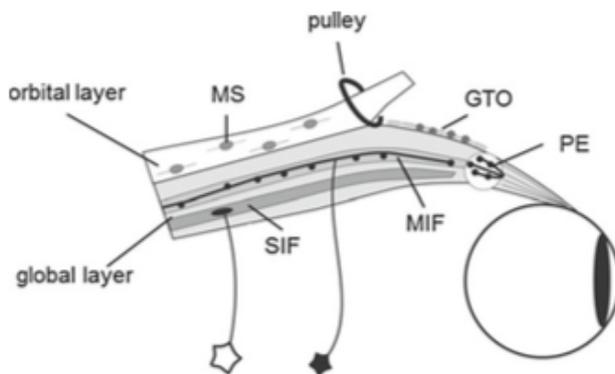


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Kompartimente in EOM. Während die orbitale Schicht an dem Pulley inseriert, gehen Muskelfasern der globalen Schicht in eine Sehne über, welche direkt am Augenbulbus ansetzt. Muskelspindeln (MS) befinden sich im menschlichen Auge im Bereich der orbitalen Zone. Palisadenendigungen (PE) sind im Bereich des myotendinösen Übergangs der globalen Zone zu finden. MIF und SIF kommen in beiden Zonen vor und sind von separaten

Gruppen von Motoneuronen innerviert. Aus (Lienbacher and Horn 2012), Biological Cybernetics. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

4.3. Die Funktionen der Muskelfasern bei der Okulomotorik

Geht man davon aus, dass Palisadenendigungen Teil des propriozeptiven Apparats in EOM sind, stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, welche Bedeutung die assoziierten Muskelfasertypen bei der Okulomotorik und Tiefensensibilität haben.

Studien zeigten, dass die unterschiedlichen Muskelfasertypen nicht für eine bestimmte Bewegung des Auges verantwortlich sind, beispielsweise fast-twitch Fasern nur für Sakkaden, sondern dass vielmehr alle Fasertypen in unterschiedlicher Ausprägung anteilig bei jeder Bewegung des Auges mitwirken (Scott und Collins 1973). Darüber hinaus scheint die Aktivität einzelner motorischer Einheiten abhängig von der Augenposition, weniger von der Augenbewegung zu sein (Scott und Collins 1973). Alle Motoneurone und ihre motorische Einheit beteiligen sich sowohl an Vergenzbewegungen als auch an Sakkaden und dem vestibulo-okkulären Reflex (Mays und Porter 1984).

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen des Abduzenskerns von Katzen konnten neben einer geringeren Rate an Aktionspotentialen in MIF-assoziierten Motoneuronen auch signifikante Unterschiede bei der Empfindlichkeit gegenüber der Augenposition und Geschwindigkeit gefunden werden (Hernandez et al. 2019). Letztere sind in SIF-Motoneuronen höher. MIF-Motoneurone spielen hingegen vor allem bei solchen Augenbewegungen eine Rolle, bei denen bereits kleinste Veränderungen der Muskelkontraktion zu Bewegungen des Bulbus führen, zum Beispiel beim Blick nach nasal (Davis-López de Carrizosa et al. 2011). Auch bei präziser Blickeinstellung sind MIF-Motoneuronen von Bedeutung (Hernandez et al. 2019).

Die hohe Empfindlichkeit der SIF-Motoneurone gegenüber der Augenposition und Geschwindigkeit könnte eine Erklärung für den Zusammenhang mit Palisadenendigungen liefern. Versteht man Palisadenendigungen als propriozeptive Organe, liefern sie notwendige Informationen über Augenposition und Geschwindigkeit.

4.4. Muskelfaser und Palisadenendigung als funktionelle Einheit

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Palisadenendigungen nicht ausschließlich mit multipel-innervierten non-twitch Fasern assoziiert sind. Daraus ergeben sich gänzlich neue Überlegungen über den funktionellen Zusammenhang zwischen Muskelfaser und Palisadenendigung.

Eine Hypothese von (Lienbacher und Horn 2012) ging davon aus, dass diejenigen Neurone, die Muskelfasern mit non-twitch Eigenschaften über zahlreiche „en-grappe“-Endigungen motorisch innervieren, auch sensorische Qualitäten enthalten und in ihrem Endpunkt eine PE bilden. Bei Dehnung der Sehne während einer Muskelkontraktion würde die Nervenfaser im Bereich der PE aktiviert werden, was zu einer Verstärkung der Muskelaktivierung der assoziierten MIF führt. Wenn jedoch die Sehne durch eine Augenbewegung in die entgegengesetzte Richtung gedehnt werden würde, müsste die motorische Aktivität der MIF in diesem Fall gehemmt werden. Die gleichzeitige Aktivierung von einer Palisadenendigung und der non-twitch Faser des antagonistierenden Muskels konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Lienbacher und Horn 2012). Geht man dennoch von dieser Hypothese aus, müsste das Neuron sowohl motorische als auch sensorische Qualität haben. Die Palisadenendigungen wären in ihrer Funktion vergleichbar mit Golgi-Sehnenorganen.

Eine weitere Hypothese von Lienbacher und Horn vergleicht die Funktion der Palisadenendigungen mit der Funktion von Muskelspindeln. Die Kontraktion einer Muskelfaser (MIF) verändert die Dehnung der Sehne. PE würden dort die Kontraktion der Muskelfaser ermitteln und die gewonnenen Informationen über direkten neuronalen Kontakt im Hirnstamm an die motorischen Fasern weitergeben. Die Aktivität der Muskelfaser würde im Folgenden angepasst werden (Lienbacher et al. 2011).

Tatsächlich gibt es einige Gemeinsamkeiten zwischen non-twitch Fasern in EOM und intrafusalen Fasern von Muskelspindeln der extraokulären Skelettmuskulatur. Beide

sind multipel-innerviert und zeigen ähnliche Expressionsmuster der Myosine (Rossi et al. 2010). Geht man davon aus, dass Palisadenendigungen sensorischer Qualität sind, würden MIF, genau wie intrafusale Fasern, sowohl motorisch, durch die multiplen „en grappe“-Endigungen, als auch sensorisch, durch die Palisadenendigungen, innerviert werden. Man könnte in diesem Fall die Motoneurone von MIF als Gamma-Motoneurone verstehen, während Palisadenendigungen als Teil des propriozeptiven Apparates die Muskelspannung registrieren.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch, dass im menschlichen Auge Palisadenendigungen nicht nur mit slow-Typ Fasern sondern auch mit fast-Typ Fasern assoziiert sind. In Bezug auf die obigen Überlegungen zum Zusammenspiel von Muskelfaser und Palisadenendigung kann vermutet werden, dass mit fast-twitch Fasern assoziierte Palisadenendigungen andere Funktionen haben als solche, die mit non-twitch Fasern (MIF) assoziiert sind. Wie in 4.3. *Die Funktion der Muskelfasern bei der Okulomotorik* erläutert, haben MIF und SIF gänzlich unterschiedliche Funktionen. Gemeinsam ist Ihnen, dass sie bei allen Augenbewegungen in unterschiedlichem Ausmaß anteilig eine Rolle spielen (Scott und Collins 1973).

Es ergeben sich weitere Überlegungen aus der Tatsache, dass Palisadenendigungen scheinbar mit unterschiedlichen Muskelfasertypen assoziiert sind. Geht man davon aus, dass Palisadenendigungen, unabhängig von der assoziierten Muskelfaser, eine einheitliche Morphologie und Funktion aufweisen, ist die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Einheit aus Muskelfaser und Palisadenendigung gering. Es macht darüber hinaus die Hypothese unwahrscheinlich, dass MIF und Palisadenendigung von einem gemeinsamen Neuron mit sensorischer und motorischer Komponente innerviert werden.

Dass MIF dennoch eine Funktion am myotendinösen Übergang zugeschrieben werden kann, zeigten Ergebnisse bei Untersuchungen der Faserverteilung von non-twitch Fasern im Querschnitt eines MR-Muskels (*siehe 3.4. Muskelfaserverteilung im Querschnitt*). Multipel-innervierte Fasern - ähnlich der Palisadenendigungen - kamen vor allem in Bereichen des myotendinösen Übergangs vor. Dennoch scheinen nur wenige ihrer Fasern auch mit Palisadenendigungen assoziiert zu sein.

4.5. Unterschiede zwischen LR- und MR-Muskeln

Betrachtet man die Länge der Sehne in menschlichen Augenmuskeln, ist die Sehne des LR mit 4-11mm die längste, die Sehne des MR mit 1-7 mm die kürzeste (Übersicht: von Noorden GK – binokular vision).

Auch bei der Verteilung von Palisadenendigungen an den unterschiedlichen Muskelfasern zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen LR- und MR- Muskeln. Während sowohl in LR-als auch in MR- Muskeln anteilig mehr Palisadenendigungen mit fast-twitch Fasern assoziiert sind, kommen in LR-Muskeln jedoch mit ca. 36% verhältnismäßig deutlich mehr Palisadenendigungen vor, die mit MIF assoziiert sind. In

MR-Muskeln sind es nur 14% (siehe 3.5. *Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen*).

Um die Bedeutung dieser Unterschiede in der Verteilung von Palisadenendigungen zu verstehen und eventuell Rückschlüsse auf deren Funktion zu erlangen, dient ein Blick auf die unterschiedlichen Funktionen der Muskeln, sowie der Muskelfasern. Letzteres wird in 4.3.2. *Die Funktion der MIF und SIF bei der Okulomotorik* ausführlich erläutert. LR-Muskeln sind wesentlich für die Abduktion des Bulbus, also die Blickbewegung nach temporal verantwortlich. Hierbei sind im speziellen einfach-innervierte twitch Fasern von Bedeutung (Hernandez et al. 2019). Kontraktionen im MR-Muskel hingegen führen unter anderem zu Konvergenzbewegungen.

Betrachtet man das Vorkommen von Palisadenendigungen, enthält der MR-Muskel die höchste Anzahl und Dichte an Palisadenendigungen (Blumer et al. 2016). Bei Spezies, deren Blick nach frontal gerichtet ist, bei denen also durch Fusion binokuläres Sehen ermöglicht wird, zeigten sich in der Anzahl von Palisadenendigungen im MR-Muskel im Vergleich zum LR-Muskel deutliche Unterschiede (Laessing 2013). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe 3.5. *Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen*). Bei Spezies mit lateral stehenden Augen finden sich hingegen keine relevanten Unterschiede bei der Anzahl an Palisadenendigungen zwischen LR- und MR-Muskeln (Blumer et al. 2016). Dies könnte Hinweis auf eine zusätzlich spezialisierte Rolle der Palisadenendigungen bei Konvergenzbewegungen sein. Unterstützt wird diese Vermutung durch die enge Verbindung von mit Palisadenendigungen assoziierten neuronalen Fasern des Okulomotoriusnerven zu Neuronen des Edinger-Westphal-Kerns (Büttner-Ennever et al. 2001). Der N.III innerviert den MR-Muskel. Darüber hinaus wurde ein zusätzlicher Typ an Palisadenendigungen identifiziert, der das Calcium-bindende Protein Calretinin exprimiert und nur im MR und IR auftritt (Lienbacher et al. 2018). Beide Muskeln sind maßgeblich bei Konvergenzbewegungen beteiligt.

Auch wenn man die Anzahl der MIF in der orbitalen Schicht zwischen den beiden Muskeln vergleicht, zeigen sich Unterschiede. In der orbitalen Schicht von MR-Muskeln ist der Anteil der non-twitch Fasern um 20% höher als in LR-Muskeln (Oh et al. 2001). Nach Gabe von Succinylcholin, welches die Aktivität der SIF hemmt und eine langanhaltende Kontraktion von MIF bewirkt, zeigten sich jedoch keine Unterschiede bei der Muskelspannung in LR- und MR-Muskeln (Lennerstrand et al. 2010). Dies wirft die Frage auf, ob MIF - unabhängig ihrer motorischen Funktion - auch andere Funktionen, ähnlich derer von Palisadenendigungen haben.

4.6. Vorkommen und Verteilung der Palisadenendigungen in Abhängigkeit vom Alter

Im Alter von Anfang 20 ist die biologische Reifung des menschlichen Gehirns in der Regel abgeschlossen (Arain 2013). Bei der Einteilung der Kontroll- und Strabismusfälle in verschiedene Altersgruppen (siehe 3.5.2. *Verteilung und Anzahl der Palisadenendigungen in Abhängigkeit vom Alter*) wurde dies berücksichtigt. Es zeigten sich bei der Anzahl der Palisadenendigungen in den beiden Gruppen keine relevanten

Unterschiede. Sowohl im LR- als auch MR-Muskel waren bei der Gruppe der über 20-Jährigen Palisadenendigungen in geringem Umfang verhältnismäßig weniger häufig mit SIF assoziiert als in jüngeren Patienten.

Bruenech und Ruskell untersuchten im Jahr 2000 den myotendinösen Übergang bei Säuglingen. Nur bei einem bereits 47 Monate alten Kind konnten damals (unreife) Nervenendigungen gefunden werden (Bruenech und Ruskell 2000). Sie postulierten daher, dass aufgrund der scheinbar verzögerten Entwicklung von Palisadenendigungen gegenüber der Entwicklung binokulären Sehens, kein direkter Zusammenhang zwischen binokulärem Sehen und Palisadenendigungen bestehen könne. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch bei einem 16 Monate altem Kind 32 scheinbar morphologisch unauffällige Palisadenendigungen gefunden werden (siehe *Tabelle 13* in Kapitel 3.5. *Palisadenendigungen assoziiert mit unterschiedlichen Muskelfasertypen*). Es ist folglich denkbar, dass sich binokulares Sehen und Palisadenendigungen gleichermaßen in der frühkindlichen Phase entwickeln und somit im Zusammenhang stehen (Blumer 2017).

4.7. Palisadenendigungen und assoziierte Muskelfasern bei Strabismus

Bei Patienten mit Strabismus zeigten sich bei den grundlegenden anatomischen und histologischen Eigenschaften der Augenmuskulatur keine relevanten Veränderungen gegenüber den Kontrollen (Lennerstrand 2007). Vielmehr waren Abweichungen im zellulären und biochemischen Gerüst zu erkennen, vor allem im Bereich der einfach-innervierten fast-twitch Fasern in der orbitalen Zone (Spencer und Porter 1988, Lennerstrand 2007). Beispielsweise fanden sich bei Untersuchungen von EOMs in Katzen mit Störungen binokulären Sehens schmalere Muskelfasern und eine verringerte Dichte an Kapillaren (Lennerstrand 2007). In Untersuchungen von Muskelresektaten Strabismus-operierter Patienten fanden sich eine Downregulation von bestimmten Myosinen und Tropomyosinen, aber auch vermehrte Expressionen bestimmter Wachstumsfaktoren, die an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Agarwal 2016). Funktionell zeigten sich bei Strabismus-Erkrankten eine langsamere Kontraktion und eine geringere Ermüdungsresistenz der Muskulatur (Hanson et al. 1980). Möglicherweise entstehen diese Veränderungen sekundär als Folge von Störungen binokulären Sehens.

Bisher ist jedoch die Pathogenese des angeborenen Schielens ungeklärt. Ob sensorische Veränderungen Ursache oder Folge des Strabismus sind und ob der Grund des Schielens peripher oder zentral gelegen ist sind ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung (Schiavi 2016). Sowohl genetische als auch erworbene Faktoren scheinen eine Rolle bei funktionellen Veränderungen des motorischen und/oder sensorischen Systems zu spielen (Bui Quoc und Milleret 2014). Vermutlich variiert die Pathogenese zusätzlich bei den unterschiedlichen Schielformen.

Während die motorischen Endigungen der EOM von Strabismuspatienten grundsätzlich keine Auffälligkeiten aufwiesen (Martinez et al. 1980), konnten ultrastrukturelle Veränderungen im Bereich des distalen myotendinösen Übergangs gefunden werden. Es zeigten sich Hinweise auf eine veränderte propriozeptive Innervation (Corsi et al. 1990,

Domenici-Lombardo et al. 1992). Palisadenendigungen in Patienten mit angeborenem Strabismus oder auch erworbenem Nystagmus unterschieden sich signifikant von Palisadenendigungen augengesunder Menschen (Park et al. 2009). Beispielsweise waren die Nervenendigungen kleiner und Axone erschienen degeneriert. Diese Veränderungen wurden jedoch nur bei Patienten mit angeborenem Strabismus gefunden (Park et al. 2009). Da Propriozeptoren in EOM mit großer Wahrscheinlichkeit neben der Okulomotorik auch an der Entwicklung des binokulären Sehens beteiligt sind (*siehe 4.1. Propriozeption im Auge*), sind sie vermutlich während der Entwicklung des visuell-sensorischen Systems in der frühkindlichen Phase von zentraler Bedeutung (Buisseret 1995). Man geht davon aus, dass innerhalb der ersten 3-6 Monate nach der Geburt wichtige Strukturen in der Augenmuskulatur gebildet werden, welche binokuläres Sehen ermöglichen (Spencer und Porter 2006). In dieser kritischen Phase ist die Augenmuskulatur folglich anfälliger gegenüber Veränderungen. Die Schädigung propriozeptiver Organe im myotendinösen Übergang scheint somit vor allem während der frühkindlichen Entwicklungsphase des visuell-sensorischen Systems eine zentrale Rolle bei der Entstehung von angeborenem Strabismus zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl in LR- als auch in MR-Muskeln keine relevanten Unterschiede bei der Assoziation von Palisadenendigungen mit verschiedenen Muskelfasertypen zwischen augengesunden und an Strabismus-erkrankten Patienten gefunden werden. Die strukturellen Veränderungen von Palisadenendigungen in Patienten mit angeborenem Strabismus scheinen auf den ersten Blick keine Auswirkungen auf die Assoziation mit verschiedenen Muskelfasertypen zu haben. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass unklar ist, ob das gesunde oder das kranke Auge operiert wurde. Die Muskelresektion dient lediglich dazu, das Auge wieder in eine funktionelle Position zu bringen. Es kann beispielsweise sein, dass mit einer Operation lediglich eine Parese des antagonistischen Auges ausgeglichen wird.

Die Gesamtzahl der Palisadenendigungen in Strabismusfällen und Kontrollfällen war schwer zu vergleichen, da bei Resektaten der Augenklinik in der Regel nur Teile des myotendinösen Übergangs zur Verfügung standen und somit nicht alle Palisadenendigungen erfasst werden konnten. Es zeigte sich dennoch, dass in einigen Präparaten besonders viele Palisadenendigungen gefunden werden konnten (*siehe 3.5.1. Palisadenendigungen nach Strabismusoperation*). Mögliche Ursache hierfür könnte der Versuch sein, Störungen binokulären Sehens durch vermehrte Bildung von Propriozeptoren zu kompensieren. Eine Hypothese ist, dass Palisadenendigungen aufgrund ihrer ultrastrukturellen Veränderungen fehlerhaft sind (Corsi et al. 1990) und daher ihrer Funktion als Propriozeptoren beim binokulären Sehen nicht ausreichend nachkommen können. Der Körper würde somit versuchen, durch die vermehrte Bildung von Palisadenendigungen, diesen Mangel an Informationen auszugleichen. Eine andere Überlegung wäre, dass die Veränderungen von Palisadenendigungen nicht die Ursache von Strabismus sind, sondern vielmehr ein Versuch, Störungen binokulären Sehens, die aufgrund anderer Pathogenese zustande kommen, auszugleichen.

4.7.1. Strabismus und die Rolle der Muskelfasertypen

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem auch die Rolle und Funktion der unterschiedlichen Muskelfasertypen diskutiert. Welche Rolle die Muskelfasertypen im Detail bei pathophysiologischen Mechanismen des Strabismus haben ist bislang nicht geklärt. Da die orbitale Schicht zur Aufrechterhaltung der Augenposition dauerhaft aktiv ist, kann angenommen werden, dass Muskelfasern dieser Zone bei Strabismuserkrankungen involviert sind (Porter et al. 1995). Die Tatsache, dass sich die orbitale Schicht jedoch nicht über die gesamte Muskellänge erstreckt und somit in der Regel nicht in Muskelresektaten nach Strabismusoperation vorkommt, macht Untersuchungen auf Veränderungen innerhalb dieser Zone schwierig.

Bei Untersuchungen von Muskelresektaten des IO nach Strabismusoperation, konnten jedoch auch spezifische Veränderungen in SIF der globalen Schicht gefunden werden. Hierzu zählten beispielsweise zentrale Ansammlungen von Mitochondrien (Spencer und McNeer 1980). Diese Pathologie ist jedoch nicht nur bei Patienten mit Strabismus, sondern auch bei zahlreichen anderen Veränderungen der Okulomotorik gefunden worden (Porter et al. 1995).

4.7.2. Die Folgen von Muskelresektionen bei Strabismus

Bei invasiven Operationsmethoden, wie Muskelresektionen und -verkürzungen, kommt es postoperativ unter anderem zu Veränderungen und Verletzungen von Nervenstrukturen am myotendinösen Übergang. Bei Resektionen von Augenmuskelabschnitten zeigten sich bei Versuchen an Rektusmuskeln von Katzen langfristige Schädigungen myotendinöser Nervenendigungen (Kim und Cho 2005). Elektronenmikroskopisch war auch nach vier Wochen keine Regeneration der Nervenendigungen feststellbar.

Forschungsergebnisse beim Menschen ergaben, dass Patienten nach einer zweiten Strabismusoperation, im Gegensatz zu Patienten nach nur einer Operation, signifikant mehr Fehler in der Wahrnehmung von Veränderungen der Augenposition zeigten (Steinbach und Smith 1981). Diese Veränderungen sind mit einer Zerstörung propriozeptiver Organe vereinbar. In der vorliegenden Arbeit wurden auch Präparate der Augenklinik bei Patienten untersucht, die im Rahmen einer zweiten Strabismusoperation am selben Muskel gewonnen wurden. Ziel weiterer Forschungsarbeit könnte sein, festzustellen, ob bei diesen Präparaten besondere Auffälligkeiten bestehen.

Die Auswirkungen von Muskelresektionen auf die Kontraktilität von Muskelfasern sind nicht im Detail geklärt. Bei der langfristigen Einstellung und Aufrechterhaltung der optimalen Stellung der beiden Sehachsen zueinander, scheint eine Anpassung der Sarkomere eine wichtige Rolle zu spielen (Guyton und Weingarten 1994). Vermutlich erfordern Veränderung der Muskellänge gleichzeitig Veränderungen in der Anzahl der Sarkomere in Muskelfasern. Andernfalls wäre die Überlappung der Aktin- und Myosinfilamente fehlerhaft (Porter et al. 1995).

Zusammenfassend führen Muskelresektionen zu Veränderungen von Nerven- und Muskelstrukturen, deren Folgen nicht bekannt sind. Es gibt neben Muskelresektionen weitere Möglichkeiten, Strabismus operativ zu behandeln (siehe 1.3.2. *Strabismusoperation*). Sehnenverlängerung oder Rücklagerung des Ansatzpunktes der Sehne, bei denen der myotendinöse Übergang und dessen Strukturen in der Regel nicht beschädigt werden, sind relevante Alternativen (Steinbach et al. 1987, Corsi et al. 1990).

4.5. Zusammenfassung

Über die letzten Jahre zeigte sich, dass der Aufbau der extraokulären Augenmuskulatur, die Innervation und die Feinstruktur der Muskelfasern deutlich komplexer ist als ursprünglich angenommen. Petrosa-Domellöf und Kollegen fanden 2017 einen weiteren Muskelfasertyp, der von multiplen „en-plaque“-Endigungen innerviert wird. Neuere Studien erörtern eine weitere Unterteilung der LR- und MR-Muskeln. Neben der Einteilung in globale und orbitale Schicht könnten diese weiter in superiore und inferiore Anteile untergliedert werden (Demer et al. 2011, Bruenech und Kjellevoid Haugen 2015). Man kann davon ausgehen, dass eine komplexere funktionelle Unterteilung des Muskels auch differenziertere neuronale Feedback-Mechanismen erfordert, beispielsweise durch Propriozeptoren.

Ob und wie genau Propriozeption in extraokulärer Augenmuskulatur stattfindet, ist jedoch nicht geklärt. Bisher ging man davon aus, dass Palisadenendigungen und multipel-innervierte Muskelfasern als funktionelle Einheit einen Teil des propriozeptiven Apparates bilden (Lienbacher und Horn 2012). Entsprechend haben Palisadenendigungen und MIF einige Gemeinsamkeiten in Lage und Funktion. Beide kommen häufiger im MR-Muskel vor (Blumer et al. 2016, Oh et al. 2001) und könnten daher vor allem an Konvergenzbewegungen beteiligt sein. Zudem liegen die Kerngebiete von Neuronen der Palisadenendigungen sowie der „en-grappe“-Endigungen multipel-innervierter Fasern im selben Areal in der Peripherie motorischer Kerngebiete im Hirnstamm (C-Gruppe) (Lienbacher et al. 2011). Wie in Kapitel 3.4. *Muskelfaserverteilung im Querschnitt* näher beschrieben, fanden sich slow-Typ Fasern gehäuft im Bereich des myotendinösen Übergangs, wo generell auch Palisadenendigungen liegen.

In der vorliegenden Arbeit waren jedoch ein Großteil der untersuchten Palisadenendigungen mit fast-Typ Muskelfasern assoziiert. Ob es sich hierbei tatsächlich um einfach-innervierte Muskelfasern handelt, ist nicht bewiesen (siehe 4.3.1. *Die Problematik bei der Definition unterschiedlicher Muskelfasertypen*). MIF könnten in diesem Fall komplett eigenständige Funktionen bei der Propriozeption oder zumindest bei der primären Einstellung des Augenbulbus haben. Da sie anteilig häufiger in der orbitalen Schicht vorkommen (Spencer und Porter 1988), könnten sie an der Stabilisation und Einstellung des Pulleys beteiligt sein. Palisadenendigungen hingegen kommen in der globalen Schicht vor. Diese scheint vor allem für schnelle, phasische Bewegungen, wie z.B. Sakkaden, verantwortlich zu sein (Demer 2002).

Dass Palisadenendigungen eine Rolle beim binokulären Sehen haben, zeigten Studien an Patienten mit Strabismus. Palisadenendigungen wiesen bei Patienten mit angeborenem Strabismus signifikante ultrastrukturelle Veränderungen auf (Park et al. 2009). Dies kann Hinweis darauf sein, dass Veränderungen oder Anomalitäten von Palisadenendigungen zu Störungen binokulären Sehens führen und könnte ein wichtiger Hinweis auf die Funktion der Palisadenendigungen als Propriozeptoren bedeuten. In der vorliegenden Arbeit konnten keine Veränderungen bei der Assoziation von Palisadenendigungen mit unterschiedlichen Muskelfasern in Patienten mit Strabismus festgestellt werden. Es fiel lediglich auf, dass in wenigen Augenmuskeln von Patienten mit Strabismus besonders viele Palisadenendigungen vorkamen (siehe 3.5.1. *Palisadenendigungen nach Strabismusoperation*). Letzteres könnte bei der Pathogenese von Strabismus relevant sein. Aber auch ein Kompensationsmechanismus des Körpers durch vermehrte Bildung funktionsfähiger Propriozeptoren wäre denkbar, also die vermehrte Bildung von Palisadenendigungen als Folge der Erkrankung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen einige Überlegungen über die Funktion der Palisadenendigungen und deren Zusammenwirken mit MIF in Frage und lassen neue Überlegungen über den funktionellen Zusammenhang von Palisadenendigungen und Muskelfasern zu. Zunächst wäre es sinnvoll, die Muskelfaser über ihre ganze Länge zu betrachten, um zu beweisen, dass tatsächlich ein Großteil der Palisadenendigungen mit SIF assoziiert ist. Während der vergangenen Jahre wurden immer wieder neue Erkenntnisse über die Muskelfasern und ihre Feinstruktur gewonnen. Die Komplexität scheint deutlich umfangreicher zu sein, als erahnt. Zahlreiche Untertypen von Muskelfasern haben vermutlich gänzlich unterschiedliche Funktionen bei der Okulomotorik. Diese Funktionen zu entschlüsseln könnte ein wichtiger Schritt dahin sein, die Funktion der Palisadenendigungen besser zu verstehen.

Quellenverzeichnis

- Agarwal, A. (2016). "Altered Protein Composition and Gene Expression in Strabismic Human Extraocular Muscles and Tendons ". Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 16(10) 5576-5585
- Arain, M. (2013). "Maturation of the adolescent brain." Neuropsych. Dis. Treat.
- Bach-Y-Rita, P., J. Alvarado, K. Nichols and G. McHolm (1977). "Extraocular muscle fibres: ultrastructural identification of iontophoretically labeled fibers contracting in response to succinylcholine." Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 16(6): 561-565
- Baker, R. (1986). "Brainstem neurons are peculiar for oculomotor organization." Prog. Brain Res. 64: 257-271
- Balslev, D. and C. Miall (2008). "Eye position representation in human anterior parietal cortex." J. Neurosci. 28(36): 8968-8972
- Barker, D. (1974). "The morphology of muscle receptors". Handbook of sensory physiology Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag: 1-190
- Billig, I., C. Buisseret-Delmas and P. Buisseret (1997). "Identification of nerve endings in cat extraocular muscles." Anat. Rec. 248: 566-575
- Blumer, R., K. Z. Konakci, P. C. Brugger, M. J. F. Blumer, D. Moser, C. Schoefer, J.-R. Lukas and J. Streicher (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., J. R. Lukas, M. Aigner, R. Bittner, I. Baumgartner and M. Mayr (1999). "Fine structural analysis of extraocular muscle spindles of a two-year-old human infant." Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 40(1): 55-64
- Blumer, R., J. R. Lukas, R. Wasicky and R. Mayr (1998). "Presence and structure of innervated myotendinous cylinders in sheep extraocular muscle." Neurosci. Lett. 248: 49-52
- Blumer, R., B. Maurer-Gesek, B. Gesslbauer, M. Blumer, E. Pechriggl, M. A. Davis-López de Carrizosa, A. K. Horn, P. J. May, J. Streicher, R. R. de la Cruz and Á. M. Pastor (2016). "Palisade Endings Are a Constant Feature in the Extraocular Muscles of Frontal-Eyed, But Not Lateral-Eyed, Animals Palisade Endings in Extraocular Muscles of Mammals." Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 57(2): 320-331
- Blumer, R., R. Wasicky, P. C. Brugger, W. Hoetzenecker, W. L. Wicke and J. R. Lukas (2001). "Number, distribution, and morphologic particularities of encapsulated proprioceptors in pig extraocular muscles." Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 42(13): 3085-3094
- Blumer, R., Streicher, J., MA Davis-López de Carrizosa, R.R. de la Cruz,, A. M. Pastor. "Palisade Endings of Extraocular Muscles Develop Postnatally Following Different Time Courses" Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 12: 5105-5121
- Brindley, G. S. and P. A. Merton (1960). "The absence of position sense in the human eye." J. Physiol. 153: 127-130
- Bruenech, J. R. and I. B. Kjellefold Haugen (2015). "How does the structure of extraocular muscles and their nerves affect their function[quest]." Eye 29(2): 177-183
- Bruenech, J. R. and G. L. Ruskell (2000). "Myotendinous nerve endings in human infant and adult extraocular muscles." Anat. Rec. 260: 132-140
- Bruenech, J. R. and G. L. Ruskell (2001). "Muscle spindles in extraocular muscles of human infants." Cells T. Org. 169: 388-394
- Bui Quoc, E. and C. Milleret (2014). "Origins of strabismus and loss of binocular vision." Front. integr. neurosci. 8: 71-71
- Buisseret, P. (1995). "Influence of extraocular muscle proprioception on vision." Physiol. Rev. 75(2): 323-338
- Buttner, U. and J. A. Buttner-Ennever (2006). "Present concepts of oculomotor organization." Prog. Brain Res. 151: 1-42
- Büttner-Ennever, J. A. (2006). "Neuroanatomy of the oculomotor system." Boston, Elsevier: p. 1-574
- Büttner-Ennever, J. A. (2007). "Anatomy of the oculomotor system." Dev. Ophthalm. 40: 1-14
- Büttner-Ennever, J. A., A. C. Eberhorn and A. K. E. Horn (2003). "Motor and sensory innervation of extraocular eye muscles." Ann. NY. Acad. Sci. 1004:40-9

- Büttner-Ennever, J. A., A. K. E. Horn, H. Scherberger and P. D'Ascanio (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, J. A., K. Z. Konakci and R. Blumer (2006). "Sensory control of extraocular muscles." Prog. Brain Res. 151: 81-93
- Cilimbaris, P. A. (1910). "Histologische Untersuchungen über die Muskelspindeln der Augenmuskeln." Arch. f. mikrosk. Anat. und Entwicklungsgeschichte 75: 692-747
- Connell, E., F. Darios, S. Peak-Chew, M. Soloviev and B. Davletov (2009). "N-terminal acetylation of the neuronal protein SNAP-25 is revealed by the SMI81 monoclonal antibody." Biochemistry 48(40): 9582-9589
- Corsi, M., A. Sodi, G. Salvi and M. S. Faussonne-Pellegrini (1990). "Morphological study of extraocular muscle proprioceptor alterations in congenital strabismus." Ophth. 200: 154-163
- Daniel, P. (1946). "Spiral nerve endings in the extrinsic eye muscles of man." J. Anat. 80(4):189-93
- Davis-López de Carrizosa, M., J. Miller and R. de la Cruz (2011). "Dual encoding of muscle tension and eye position by abducens motoneurons." J. Neurosci. 31(6) 2271-2279
- Demer, J. L. (2002). "The orbital pulley system: A revolution in concepts of orbital anatomy." Ann. NY. Acad. Sci. 956: 17-32
- Demer, J. L., R. A. Clark, R. M. da Silva Costa, J. Kung and L. Yoo (2011). "Expanding repertoire in the oculomotor periphery: selective compartmental function in rectus extraocular muscles." Ann. NY. Acad. Sci. 1233(1): 8-16
- Demer, J. L., J. M. Miller and V. Poukens (1995). "Evidence for fibromuscular pulleys of the recti extraocular muscles." Invest. Ophth. Vis. Sci. 36(6): 1125-1136
- Demer, J. L., V. Poukens, J. M. Miller and P. Micevych (1997). "Innervation of extraocular pulley smooth muscle in monkeys and humans." Invest. Ophth. Vis. Sci. 38(9): 1774-1785
- Demer, J. L., S. Yeul Oh and V. Poukens (2000). "Evidence for active control of rectus extraocular muscle pulleys." Invest. Ophth. Vis. Sci. 41: 1280-1290
- Dogiel, A. S. (1906). "Die Endigungen der sensiblen Nerven in den Augenmuskeln und deren Sehnen beim Menschen und den Säugetieren." Archiv für mikroskopische Anatomie 68: 501-526
- Domenici-Lombardo, L., M. Corsi, R. Mencucci, M. Scrivanti, M. S. Faussonne-Pellegrini and G. Salvi (1992). "Extraocular muscles in congenital strabismus: muscle fiber and nerve ending ultrastructure according to different regions." Ophth. 205: 29-39
- Donaldson, I. M. L. (2000). "The functions of the proprioceptors of the eye muscles." Phil. Trans. R. Soc. London B 355: 1685-1754
- Eccles, J. and C. Sherrington (1930). "Reflex summation in the ipsilateral spinal flexion reflex." J. Physiol. 69(1) 1-28
- Fackelmann, K., A. Nouriani, A. K. Horn and J. A. Büttner-Ennever (2008). "Histochemical characterisation of trigeminal neurons that innervate monkey extraocular muscles." Progr. Brain Res. 171: 17-20
- Fernand, V. S. V. and A. Hess (1969). "The occurrence, structure and innervation of slow and twitch muscle fibres in the tensor tympani and stapedius of the cat." J. of Physiol. 200: 547-554
- Guthrie, B. L., J. D. Porter and D. L. Sparks (1983). "Corollary discharge provides accurate eye position information to the oculomotor system." Sci. 221: 1193-1195
- Guyton, D. L. and P. E. Weingarten (1994). "Sensory torsion as the cause of primary oblique muscle overaction/underaction and A- and V-pattern strabismus." Binocular Vis. & Eye Muscle Surg. Qtrly 9(3): 209-236
- H.B. Barlow, J. D. P. (1967). "The neural mechanism of binocular depth discrimination." J. of Physiol.: 14
- Hanson, J., G. Lennerstrand and K. C. Nichols (1980). "The postnatal development of the inferior oblique muscle of the cat. III. Fiber sizes and histochemical properties." Acta Physiol. Scand. 108: 61-71
- Hashemi, H. and R. Pakzad (2019). "Global and regional prevalence of strabismus: a comprehensive systematic review and meta-analysis." Strabismus 19/06: 54-65
- Hernandez, G. R., R. Blumer, R. R. de la Cruz and A. M. Pastor (2019). "Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 116(9): 3837-3846

- Hess, A. (1961). "The structure of slow and fast extrafusal muscle fibers in the extraocular muscles and their nerve endings in guinea pigs." J. Cell. Comp. Physiol. 58: 63-79
- Horn, A. K. and R. J. Leigh (2011). "The anatomy and physiology of the ocular motor system." Handb. Clin. Neurol. 102: 21-69
- Howard und Rogers (1995) "Binocular Vision and Stereopsis" Centr. Vis. Res.
- Iliescu, D. and C. Timaru (2017). "Management of diplopia." Rom. J. Ophth. 2017 61(3): 168-170
- Jacoby, J., D. J. Chiarandini and E. Stefani (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. and Rushbrook JI.. "Systematic variation in myosin expression along extraocular muscle fibres of the adult rat." J. of Musc. Res. And Cell Mot. 11: 25-40
- Kato, T. (1938). "Über histologische Untersuchungen der Augenmuskeln von Menschen und Säugetieren." Okajimas Folia Anat. Jap. 16: 131-145
- Khanna, S., C. R. Richmonds, H. Kaminski and J. D. Porter (2003). "Molecular organization of the extraocular muscle neuromuscular junction: partial conservation of and divergence from the skeletal muscle prototype." Invest. Ophth. Vis. Sci. 44: 1918-1926
- Kaufmann (2012). "Strabismus." Thieme 4. Aufl.
- Kim, S. and Y. A. Cho (2005). "Ultrastructural changes of myotendinous nerve endings following recession or resection procedures of extraocular muscle surgeries in cats." Korean J. Ophth. 19: 47-54
- Kjellgren, D., L.-E. Thornell, J. Andersen and F. Pedrosa-Domellöf (2003). "Myosin heavy chain isoforms in human extraocular muscles." Invest. Ophth. Vis. Sci. 44(4): 1419-1425
- Konakci, K. Z., J. Streicher, W. Hoetzenecker, I. Haberl, M. J. F. Blumer, G. Wieczorek, J. G. Meingassner, S. L. Paal, D. Holzinger, J.-R. Lukas and R. Blumer (2005). "Palisade endings in extraocular muscles of the monkey are immunoreactive for choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter." Invest. Ophth. Vis. Sci. 46(12): 4548-4554
- Kushner, B. (2011). "The efficacy of strabismus surgery in adults: a review for primary care physicians" J. Postgrad. Med. 87:269-273
- Lässing J. (2013). "Neuroanatomische Untersuchungen der Palisadenendigungen beim Menschen im Musculus rectus medialis und Musculus rectus lateralis" Dis. LMU Muc.
- Lennerstrand, G. (2007). "Strabismus and eye muscle function." Acta Ophthalmol. Scand. 85: 711-723
- Lennerstrand, G., R. Bolzani, S. Tian, M. Benassi, M. Fusari, E. Campos and C. Schiavi (2010). "Succinylcholine activation of human horizontal eye muscles." Acta Ophthalmol. 88(8): 872-876
- Lewis, R. F., B. M. Gaymard and R. J. Tamargo (1998). "Efference copy provides the eye position information required for visually guided reaching." J Neurophysiol. 80(3): 1605-1608
- Lienbacher, K., A. Horn, S. Ono, J. Fleuriet and M. Mustari (2018). "A subset of Palisade Endings only in the medial and inferior rectus muscle in Monkey contain Calretinin" Invest. Ophth. Vis. Sci. 59(7) 2944-2954
- Lienbacher, K. and A. E. Horn (2012). "Palisade endings and proprioception in extraocular muscles: a comparison with skeletal muscles." Biol. Cybern. 106(11-12): 643-655
- Lienbacher, K., M. Mustari, B. Hess, J. Buttner-Ennever and A. K. Horn (2011). "Is there any sense in the Palisade endings of eye muscles?" Ann. NY. Acad. Sci. 1233: 1-7
- Lienbacher, K., M. Mustari, H. S. Ying, J. A. Büttner-Ennever and A. K. E. Horn (2011). "Do Palisade Endings in Extraocular Muscles Arise from Neurons in the Motor Nuclei?" Invest. Ophth. Vis. Sci. 52(5): 2510-2519
- Linksz, A. (1954). "The Horopter: An Analysis." Trans Am Ophthalmol. Soc. : 70
- Liu, J. X. and F. P. Domellof (2018). "A Novel Type of Multiterminal Motor Endplate in Human Extraocular Muscles." Invest. Ophth. Vis. Sci. 59(1): 539-548
- Lukas, J. R., M. Aigner, R. Blumer, H. Heinzl and R. Mayr (1994). "Number and distribution of neuromuscular spindles in human extraocular muscles." Invest. Ophth. Vis. Sci. 35: 4317-4327
- Lukas, J. R., R. Blumer, M. Denk, I. Baumgartner, W. Neuhuber and R. Mayr (2000). "Innervated myotendinous cylinders in human extraocular muscles." Invest. Ophth. Vis. Sci. 41: 2422-2431
- Maier, A., M. DeSantis and E. Eldred (1974). "The occurrence of muscle spindles in extraocular muscles of various vertebrates." J.Morph. 143: 397-408

- Martinez, A. J., A. W. Biglan and D. A. Hiles (1980). "Structural features of extraocular muscles of children with strabismus." Arch Ophthalmol. 98(3): 533-539
- Mascarello, F., E. Carpenè, A. Veggetti, A. Rowlerson and E. Jenny (1982). "The tensor tympani muscle of cat and dog contains IIM and slow-tonic fibres: an unusual combination of fibre types." J Muscle Res Cell Motil. 3(3): 363-374
- Mayr, R. (1977). "Funktionelle Morphologie der Augenmuskeln." Augenbewegungsstörungen/Disorder Of Ocular Motility: 1-16
- Mays, L. E. and J. D. Porter (1984). "Neural control of vergence eye movements: activity of abducens and oculomotor neurons." J. Neurophysiol. 52: 743-761
- McNew, J. (2000). "SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors " J Cell Biol. 150(1): 105-117
- Miller, J. M. (2007). "Understanding and misunderstanding extraocular muscle pulleys." J. Vis. 7(11): 1-15.
- Miller, N. R., F. B. Walsh and W. F. Hoyt (2005). "Anatomy and physiology of the autonomic nervous system." Walsh & Hoyt's clinical neuro-ophthalmol. 1: 673-677
- Morgan, D. L. and U. Proske (1984). "Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties." Physiol. Rev. 64: 103-138
- Oh, S. Y., V. Poukens and J. L. Demer (2001). "Quantitative analysis of rectus extraocular layers in monkey and humans." Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 42: 10-16
- Panum, P. L. (1858). "Über die einheitliche Verschmelzung verschiedenartiger Netzhautindrücke beim Sehen mit zwei Augen ". Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin 1861: 63-111
- Park, S.-E., H.-S. Sa and S. Y. Oh (2009). "Innervated Myotendinous Cylinders Alterations in Human Extraocular Muscles in Patients With Strabismus." J. Ophthalmol. Korean 23(2): 93-99
- Pedrosa-Domellöf, F., Y. Holmgren, C. A. Lucas, J. F. Y. Hoh and L.-E. Thornell (2000). "Human extraocular muscles: unique pattern of myosin heavy chain expression during myotube formation." Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 41(7): 1608-1616
- Porter, J. D., R. S. Baker, R. J. Ragusa and J. K. Brueckner (1995). "Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function." Surv. Ophthalmol. 39(6): 451-484
- Porter, J. D., B. L. Guthrie and D. L. Sparks (1983). "Innervation of monkey extraocular muscles: localization of sensory and motor neurons by retrograde transport of horseradish peroxidase." J. Comp. Neurolog. 218: 208-219
- Richmond, F. J. R., W. S. W. Johnston, R. S. Baker and M. J. Steinbach (1984). "Palisade endings in human extraocular muscle." Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 25: 471-476
- Rossi, A. C., C. Mammucari, C. Argentini, C. Reggiani and S. Schiaffino (2010). "Two novel/ancient myosins in mammalian skeletal muscles: MYH14/7b and MYH15 are expressed in extraocular muscles and muscle spindles." J. Physiol. 588(Pt 2): 353-364
- Ruskell, G. L. (1978). "The fine structure of innervated myotendinous cylinders in extraocular muscles in rhesus monkey." J. Neurocytol. 7: 693-708
- Ruskell, G. L. (1984). "Spiral nerve endings in human extraocular muscles terminate in motor end plates." J. Anat. 139: 33-43
- Ruskell, G. L. (1999). "Extraocular muscle proprioceptors and proprioception." Prog. Retin. Eye Res. 18(3): 269-291
- Schiavi (2016). "Extraocular Muscles Tension, Tonus, and Proprioception in Infantile Strabismus: Role of the Oculomotor System in the Pathogenesis of Infantile Strabismus - Review of the Literature ". Scientifica (Cairo) 2016
- Scott, A. B. and C. C. Collins (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. Am Ophthal. Soc. 84: 488-526.
- Shall, M. S. and S. J. Goldberg (1992). "Extraocular motor units - type classification and motoneuron stimulation frequency-muscle unit force relationships." Brain Res. 587: 291-300

- Shall, M. S. and S. J. Goldberg (1995). "Lateral rectus EMG and contractile responses elicited by cat abducens motoneurons." Muscle & Nerve 18: 948-955
- Shall, M. S., K. E. Wilson and S. J. Goldberg (1996). "Extraocular motoneuron stimulation frequency effects on motor unit tension in cat." Acta Anat. 157: 217-225
- Sherrington, C. S. (1906). "On the proprioceptive system, especially in its reflex aspect." Brain 29: 16
- Siebeck, R. and P. Kruger (1955). "[The histological structure of the extrinsic ocular muscles as an indication of their function]." Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol 156(6): 636-652
- Simpson, J. I., R. E. Soodak and R. Hess (1970). "The accessory optic system and its relation to the vestibulocerebellum." R. Granit and O. Pompeiano. North Holland, Elsevier: 715-724
- Skavenski, A. A., C. Acocella, S. J. Heinen and A. Witofsky (1994). "Patterns of eye movement adaption to foveal lesions in adult primates." New York, Georg Thieme Verlag: 134-141
- Spencer, R. F. and K. W. McNeer (1980). "Structural alterations in overacting inferior oblique muscles." Arch. Ophthalmol. 98: 128-133
- Spencer, R. F. and J. D. Porter (1988). Structural organization of the extraocular muscles. Rev. Oculomot. Res. Elsevier: 33-79
- Spencer, R. F. and J. D. Porter (2006). "Biological organization of the extraocular muscles." Prog. Brain Res. 151: 43-80
- Staron, R. (1997). "Human skeletal fiber types: declination, development, and distribution." Can J. Appl Physiol. 22(4): 307-27
- Steinbach, M. and D. Smith (1981). "Spatial localization after strabismus surgery: evidence for inflow." Sci. 213: 1407-1409
- Steinbach, M. J., E. L. Kirshner and M. J. Arstikaitis (1987). "Recession vs marginal myotomy surgery for strabismus: effects on spatial localization." Invest. Ophth. Vis. Sci. 28: 1870-1872.
- Tao-Cheng, J. (2000). "Snap-25 is polarized to axons and abundant along the axolemma: an immunogold study of intact neurons" J. Neurocytol. 27: 67-77
- Ugolini G, Klam F, Doldan Dans M, Dubayle D, Brandi A-M, Büttner-Ennever JA, Graf W. 2006. Horizontal eye movement networks in primates as revealed by retrograde transneuronal transfer of rabies virus: Differences in monosynaptic input to "slow" and "fast" abducens motoneurons. J. Comp. Neurol 498:762-785.
- Veggetti, A., F. Mascarello and E. Carpena (1982). "A comparative histochemical study of fibre types in middle ear muscles." J. Anat. 135: 333-352
- Walton, M. M. G., A. Pallus, J. Fleuriet, M. J. Mustari and K. Tarczy-Hornoch (2017). "Neural mechanisms of oculomotor abnormalities in the infantile strabismus syndrome." J. Neurophysiol. 118(1): 280-299
- Warkman, A., S. Whitman and P. Krieg (2012). "Developmental expression and cardiac transcriptional regulation of Myh7b, a third myosin heavy chain in the vertebrate heart." Cytoskeleton (Hoboken) 69(5): 324-35
- Westheimer, G. (2009). "The third dimension in the primary visual cortex." J. Physiol. 587(12): 2807-2816
- Wiedenmann, B. and W. W. Franke (1985). "Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles." Cell 41: 1017-1028
- Wong (2008). "Eye movement disorders" Oxford University Press Inc.: p.10
- Zelená, J. and T. Soukup (1977). "The development of Golgi tendon organs." J. Neurocytol. 6: 171-194
- Zimmermann, L., P. J. May, A. M. Pastor, J. Streicher and R. Blumer (2011). "Evidence that the extraocular motor nuclei innervate monkey palisade endings." Neurosci. Lett 489(2): 89-93
- Zimmermann, L., C. J. Morado-Diaz, M. A. Davis-Lopez de Carrizosa, R. R. de la Cruz, P. J. May, J. Streicher, A. M. Pastor and R. Blumer (2013). "Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features." J. Neurosci. 33(7): 2784-2793

Eidesstattliche Versicherung

Felix Daniel Andreas

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Quantifizierung der Palisadenendigungen assoziiert mit fast-twitch versus non-twitch Muskelfasern im Musculus rectus medialis und lateralis bei menschlichen Kontrollfällen und Strabismusfällen“

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.

Regensburg, den 10.07.2021

Felix Daniel Andreas

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich dem gesamten Laborteam für die umfangreiche Unterstützung über die gesamte Zeit danken. Die stets gute Stimmung im gesamten Team hat die Arbeit sehr angenehm gestaltet.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Horn-Bochtler für die Betreuung der Arbeit und die stets freundliche Unterstützung sowohl bei den Arbeiten im Labor als auch bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.