

Aus dem Lehrstuhl für Vegetative Anatomie (Anatomie 1)  
Lehrstuhl der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

*Calretinin-exprimierende Palisadenendigungen –  
Prozentuale Anteile und Assoziation  
zur Myosin-Expression der Muskelfasern  
im Musculus rectus medialis  
bei Körperspendern und Strabismus-Patienten*

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

vorgelegt von

Sebastian Straßburger

aus

Idar-Oberstein

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Benedikt Schoser  
Prof. Dr. Hanna Taipaleenmäki

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2022

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	8
2 Stand der Forschung .....	9
2.1 Anatomie der extraokulären Muskulatur .....	9
2.1.1 Makroanatomie und Funktion .....	9
2.1.2 Mikroanatomie .....	11
2.2 Innervation der extraokulären Muskulatur.....	13
2.2.1 Motorische Innervation.....	13
2.2.2 Sensible Innervation .....	14
2.2.3 Propriozeptive Innervation .....	14
2.2.4 Palisadenendigungen .....	18
2.3 Augenbewegungen und Augenbewegungsstörungen .....	22
2.3.1 Physiologische Augenbewegungen .....	22
2.3.2 Krankheitsbild des Strabismus.....	23
2.4 Calretinin.....	26
2.5 SNAP-25.....	26
3 Fragestellungen.....	27
4 Material und Methoden .....	28
4.1 Herkunft der Muskelpräparate .....	28
4.1.1 Präparate von Körperspendern.....	28
4.1.2 Resektate aus der Augenklinik .....	29
4.2 Präparation der Augenmuskeln .....	30
4.2.1 Präparate von Körperspendern.....	30
4.2.2 Resektate aus der Augenklinik .....	30

---

4.3	Schneiden der Augenmuskeln .....	31
4.4	Auswahl der verwendeten Schnitte.....	31
4.4.1	Präparate von Körperspendern.....	31
4.4.2	Resektate aus der Augenklinik .....	32
4.5	Pikrofuchsinfärbung .....	32
4.6	Immunhistochemische Färbungen.....	33
4.6.1	Tripel-Immunfluoreszenz-Färbung (SNAP-25 + CR + MyH7B).....	34
4.6.2	Tripel-Immunfluoreszenz-Färbung (SYN + CR + MyH7B) .....	37
4.6.3	Tripel-Immunfluoreszenzfärbung (CR + MHCf/FMyHC + MyH7B).....	38
4.6.4	Kombinierte Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz-Färbung (CR + MHCf/ FMyHC + Myh7B).....	40
4.7	Auswertung der gefärbten Schnitte.....	43
5	Ergebnisse.....	44
5.1	Qualitative Erfassung der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis .....	44
5.1.1	Anteil der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis bei Körperspendern .....	45
5.1.2	Prozentualer Anteil der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis bei Strabismus-Patienten.....	47
5.1.3	Vergleich der prozentualen Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis bei Körperspender und Strabismus-Patienten.....	50
5.2	Qualitative Untersuchung der Assoziation der Calretinin-positiven Palisadenendigungen mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern im Musculus rectus medialis.....	52
5.2.1	Kombinierte Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz-Färbung.....	52
5.2.2	Anteil Calretinin-positiver Palisadenendigungen assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Körperspendern .....	53

---

5.2.3	Calretinin-positive Palisadenendigungen assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Strabismus-Patienten .....	56
5.2.4	Vergleich der Anteile von Calretinin-positiven Palisadenendigungen assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Körperspendern und Strabismus-Patienten .....	58
5.2.5	Weitere Nervenendigungen .....	60
5.3	Höhere absolute Anzahl Calretinin-positiver Palisadenendigungen in Strabismus-Fällen .....	62
6	Diskussion .....	63
6.1	Calretinin-Expression in Palisadenendigungen.....	63
6.2	Assoziation der Calretinin-positiven Palisadenendigungen mit Fast-Myosin exprimierenden Muskelfasern.....	69
6.3	Palisadenendigungen bei Strabismus-Patienten .....	73
7	Zusammenfassung .....	77
	Literaturverzeichnis .....	LXXX
	Abbildungsverzeichnis.....	LXXXIX
	Tabellenverzeichnis.....	XCIII
	Eigene Publikationen.....	XCVI
	Danksagung .....	XCVI
	Eidesstattliche Versicherung .....	XCVII

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
CR	Calretinin
ChAT	Cholinacetyltransferase
CR+ PE	Calretinin-exprimierende = Calretinin-positive Palisadenendigungen
CR- PE	Calretinin-negative Palisadenendigungen
EOM	Extraokuläre Muskeln
Fast-MF	Gruppe der Fast-Myosin- und Nicht-Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern
GES	Gesamtheit
GSO	Golgi-Sehnenorgan
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IR	M. rectus inferior
M	Molar
M.	Musculus
MF	Muskelfaser
MIF	multiply innervated fibers (dt.: multipel innervierte Muskelfasern)
MS	Muskelspindel
MR	M. rectus medialis
MSÜ	Muskelsehnenübergang
N.	Nervus

---

OT	Objekträger
PE	Palisadenendigung
S	Sehne
SIF	singly innervated fibers (dt.: einfach innervierte Muskelfasern)
Slow-MF	Gruppe der Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein of 25 kDa
SYN	Synaptophysin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung

## 1 Einleitung

Die Erstbeschreibung der sogenannten Palisadenendigungen (PE), Nervenendigungen im Muskelsehnenübergang (MSÜ) der extraokulären Muskeln (EOM), im Jahre 1906 liegt schon mehr als 100 Jahre zurück (Dogiel 1906). Doch noch heute ist man sich trotz modernster Untersuchungstechniken über die Funktion dieser nur in den EOM vorkommenden Nervenendigungen nicht im Klaren. Verschiedene experimentelle Vorstöße entdeckten Eigenschaften der Nervenendigungen, die teils für eine sensorische, teils für eine motorische Funktion ebendieser sprechen. Die Lage und der Aufbau der PE sowie das Fehlen klassischer propriozeptiver Organe favorisieren eine sensorische Funktion (Büttner-Ennever et al. 2006). Andere Studien zeigten, dass die PE die für motorische Zellen klassische Cholinacetyltransferase (ChAT) sowie zum Teil auch alpha-Bungarotoxin an deren postsynaptischer Membran exprimieren (Blumer et al. 2009). Calretinin (CR), ein Calcium-bindendes Protein, das auch in sensorischen Zellen vorzufinden ist, wird von einer Untergruppe der PE im M. rectus medialis (MR) des Rhesusaffen exprimiert. Im M. rectus lateralis fehlt diese Untergruppe (Lienbacher et al. 2018). Dies könnte auf eine spezialisierte Rolle der CR-positiven PE bei der Konvergenzbewegung der Augen hindeuten (Lienbacher et al. 2018). Die EOM des Menschen sind durch verschiedene Nerventypen innerviert. Darunter fallen die twitch-Muskelfasern (MF), die nur von einer einzigen en-plaque Nervenendigung innerviert werden (SIF = single innervated fibers) sowie die non-twitch MF, die multipel von en-grappe Nervenendigungen (MIF = multiply innervated fibers) innerviert werden (Mayr 1971).

Das spezifische Ziel dieser Untersuchung war es zum einen herauszufinden, zu welchen Anteilen CR-positive PE im menschlichen MR vorliegen. Zum anderen untersuchte ich die CR-positiven PE im MR auf ihre Assoziation zu Fast-Myosin-exprimierenden MF, die den SIF zugeordnet werden, und Slow-Myosin-exprimierenden MF, die mit den MIF assoziiert werden. Zudem verglich ich jeweils die Muskelpräparate menschlicher Körperspender ohne bekannte Augenerkrankung mit Operationsresektaten von Strabismus-Patienten.



## **2 Stand der Forschung**

### **2.1 Anatomie der extraokulären Muskulatur**

#### **2.1.1 Makroanatomie und Funktion**

Die extraokuläre Muskulatur (EOM) nimmt in vielerlei Hinsicht eine einzigartige Rolle unter den Muskeln der Säugetiere ein (Schiavi 2016). Anpassungen auf molekularer und histologischer Ebene ermöglichen eine außerordentliche Schnelligkeit mit gleichzeitiger Präzision und Ausdauer, wie sie durch kaum eine andere Muskelgruppe im menschlichen Körper realisiert werden kann (Schiavi 2016). Dies sind Voraussetzungen für eine stabile und zugleich scharfe Abbildung eines betrachteten Objektes auf der Netzhaut. Das betrachtete Objekt muss dafür innerhalb eines Radius von  $0,5^\circ$  um das Zentrum der Fovea, dem Bereich des schärfsten Sehens, liegen. Bei einer davon um  $2^\circ$  abweichenden Lage sinkt die Sehschärfe bereits um 50% (Leigh und Zee 2006). Im Laufe der Evolution haben sich in Wirbeltieren sechs extraokuläre Augenmuskeln entwickelt, die am Augapfel ansetzen und das scharf darzustellende Objekt auf die beim Menschen nur 1,5 mm Durchmesser große Fovea abbilden (Aumüller et al. 2010). Es werden vier gerade verlaufende Muskeln von zwei schräg verlaufenden Muskeln unterschieden (Abb. 1). Zu Ersteren gehören der M. rectus medialis (MR), der M. rectus lateralis (LR), der M. rectus inferior (IR) sowie der M. rectus superior (SR). Die beiden schräg verlaufenden Muskeln sind der M. obliquus superior und der M. obliquus inferior (Aumüller et al. 2010).

Die jeweilige Funktion der einzelnen Muskeln hängt vom Ansatz, dem Verlauf innerhalb der Orbita und dem Ort des Inserierens am Augapfel ab. Die vier geraden Muskeln verlaufen vom Anulus tendineus communis nach frontal zu ihren Ansätzen vor der Äquatorebene am Bulbus. Durch ihre Lage sind LR und MR grundsätzlich muskuläre Gegenspieler und für Abduktion (LR) bzw. Adduktion (MR) zuständig. Macht man sich aber bewusst, dass beispielsweise bei einer Abduktion des rechten Auges gleichzeitig eine Adduktion des linken Auges erfolgen muss, so können MR und LR auch als Synergisten angesehen werden. Eine Elevation wird durch den M. rectus superior, eine Depression durch den M. rectus inferior bewirkt (Aumüller et al. 2010).

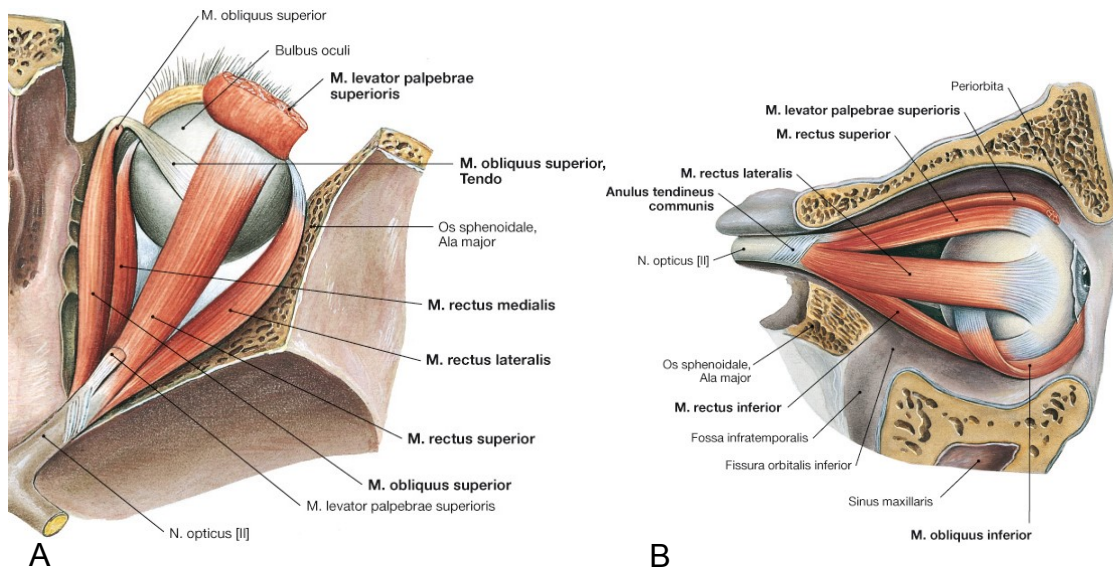


Abbildung 1: Anatomie der extraokulären Muskulatur: Darstellung eines rechten Auges und der extraokulären Muskeln mit Ansatz, Verlauf und Insertion am Bulbus mit Sicht von cranial (A) und lateral (B). Mit freundlicher Genehmigung von © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.

Da die knöcherne Augenhöhle mit einem Winkel von ca.  $23^\circ$  leicht nach lateral gerichtet ist, stehen auch die beiden parallel dazu verlaufenden Muskeln IR und SR bei Blick „geradeaus“ in  $23^\circ$  zur nach vorn gerichteten Sehachse und ermöglichen diesen Muskeln zusätzliche Funktionen. So hat der SR Anteil an der Adduktion und Innenrotation des Auges, wohingegen Adduktion und Außenrotation durch den IR unterstützt werden (Porter et al. 1995; Aumüller et al. 2010; Büttner-Ennever 2006). Der Ursprung des M. obliquus inferior ist die Wand der Maxilla am vorderen medialen Rand der Orbita. Von dort zieht er schräg nach dorsolateral und setzt hinter der Äquatorlinie am unteren Rand des Bulbus an (Benninghoff 2014). Seine Hauptaufgabe ist die Außenrotation. Er wirkt aber auch zusätzlich als Elevator und Abduktor des Auges (Porter et al. 1995; Aumüller et al. 2010). Der M. obliquus superior hingegen entspringt dem Anulus tendineus communis und verläuft mit seiner Sehne durch die Trochlea musculi obliqui superioris, ein am medialen Orbitarand gelegener Ring aus Fasern und Knorpel (Abb. 1). Mit seinem hinter der Äquatorlinie und lateral der Sehachse liegendem Ansatz am oberen Teil des Bulbus ist er essenziell für die Innenrotation. Zudem ist er an der Depression und Abduktion des Auges beteiligt (Aumüller et al. 2010; Büttner-Ennever 2006). Der übrige Raum in der Orbita ist

neben dem Bulbus und den EOM mit Nerven, Blutgefäßen und Fettgewebe gefüllt (Aumüller et al. 2010).

### 2.1.2 Mikroanatomie

Vor allem auf mikroanatomischer Ebene zeigen die EOM Unterschiede zur skelettalen Muskulatur, als auch untereinander sowie im eigenen Faserverlauf bezüglich physiologischer, morphologischer, immunzytochemischer und histochemischer Eigenschaften (Spencer und Porter 2006). So findet man bei den EOM eine innere, dem Augapfel anliegende globale Schicht, die vor ihrem Ansatz in die Sklera des Bulbus in eine Sehne übergeht (Abb. 2) (Demer et al. 2000). In diesem Muskelsehnenübergang (MSÜ) befinden sich die hier untersuchten Palisadenendigungen (PE) (siehe Kapitel 2.2.4) (Büttner-Ennever et al. 2001).

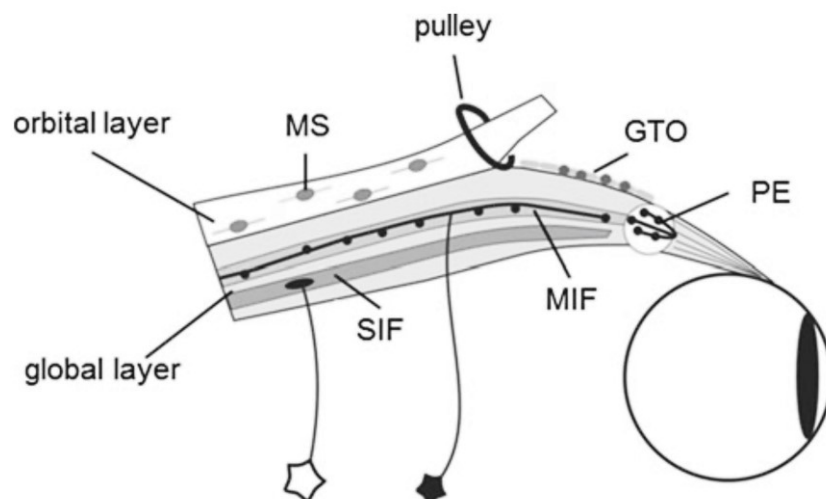


Abbildung 2: Schematische Darstellung der orbitalen (orbital layer) und globalen Schicht (global layer) der extraokulären Muskulatur sowie der Lokalisation der Palisadenendigungen (PE). Mit freundlicher Genehmigung von © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.

Daneben existiert eine äußere orbitale Schicht. Diese legt sich C-förmig um die globale Schicht und inseriert, ohne einen sehnigen Anteil auszubilden, direkt in sogenannte Pulleys (Demer 2000; Spencer und Porter 2006). Diese bestehen aus Kollagen, elastischen Fasern und glatter Muskulatur und stellen eine Art spezialisierte Muskelkapsel dar. Die Pulleys halten die Zugrichtung der geraden EOM in gleichbleibenden Bahnen relativ zur Orbitawand. Sie dienen der

Stabilisierung der Augenmuskeln bei schnellen Bewegungen und verhindern ein seitliches Abgleiten der Augenmuskeln (Demer et al. 1995; 1997). Im Jahr 2000 wurde von *Wasicky* erstmals eine weitere, dritte Schicht erwähnt, die er "marginal layer" nannte. Diese ist an der Außenseite der orbitalen Schicht lokalisiert (Wasicky et al. 2000). Die beiden Kompartimente, die globale und die orbitale Schicht, gewährleisten durch einen spezialisierten strukturellen Aufbau die Funktion der EOM (Spencer und Porter 2006). Darunter kommt insbesondere der muskulären Zusammensetzung mit verschiedenen Muskelfasertypen eine große Bedeutung zu. Bei den EOM hat sich im Vergleich zur skelettalen Muskulatur eine gesonderte Einteilung in insgesamt sechs verschiedene Muskelfasertypen ergeben. Die Einteilung berücksichtigt die Lage im Kompartiment, die Ausstattung mit Mitochondrien, sowie die Art der Innervation (Spencer und Porter 2006). Es findet sich eine breite Expression verschiedenster Myosin-Schwerketten, wie sie einzigartig unter der Muskulatur ist (Hoh 2020). Zudem treten innerhalb derselben Muskelfaser (MF) häufig unterschiedliche Myosine auf (Spencer und Porter 2006).

Anhand der Innervierung differenziert man bei den MF prinzipiell zwischen den SIF (engl.: singly innervated fiber) einerseits und den MIF (engl.: multiply innervated fiber) andererseits (Namba et al. 1968; Mayr 1971). Die am mittleren Drittel der SIF vorliegenden en-plaque Nervenendigungen entsprechen dabei am ehesten denen der skelettalen Muskulatur. Dabei wird das Aktionspotential entlang der MF weitergeleitet und es kommt zu einer schnellen Kontraktion der gesamten MF. Deshalb spricht man auch von twitch-Fasern. Die Ausstattung der SIF mit vorrangig schnellen Myosinen gewährleistet hierbei die sofortige Umsetzung der Kontraktion (Spencer und Porter 2006). Die großen SIF-Motoneurone liegen innerhalb der Augenmuskelkerne im Hirnstamm (Büttner-Ennever et al. 2001). Die an den MIF liegenden multiplen en-grappe Endigungen reihen sich im Unterschied zu den SIF entlang der gesamten Länge einer MF auf. Hier werden nur lokale Potentiale an der MF generiert. Zudem werden in MIF langsame Myosine exprimiert (Spencer und Porter 2006). Es kommt dadurch zu einer langsamen Kontraktion der MF (Bondi und Chiarandini 1983; Büttner-Ennever et al. 2001). Man spricht von sogenannten non-twitch-Fasern. Dabei weisen die in der orbitalen Schicht liegenden MIF eine zusätzliche zentrale

en-plaque Endigung auf, wodurch es zu unterschiedlichen Kontraktionseigenschaften entlang des Verlaufs der MF kommt (Jacoby et al. 1989; Horn und Straka 2021). Die Innervation der MIF erfolgt durch kleinere Motoneurone, die in der Peripherie der Augenmuskelkerne liegen (Büttner-Ennever et al. 2001). Dabei liegen die MIF-Motoneurone des MR und IR in der sogenannten C-Gruppe dorsomedial zum N. oculomotorius (Büttner-Ennever et al. 2001). MIF wurden neben den EOM ausschließlich in wenigen spezialisierten Muskeln gefunden wie beispielsweise im M. tensor tympani (Spencer und Porter 2006; Fernand und Hess 1969). In der orbitalen Schicht teilen sich die Anteile in 80% SIF und 20% MIF. In der globalen Schicht liegen sie im Verhältnis 90% SIF zu 10% MIF vor (Spencer und Porter 2006).

## **2.2 Innervation der extraokulären Muskulatur**

Bei der Innervation der Augenmuskeln wird zwischen motorischen Efferenzen und sensorischen Afferenzen unterschieden. Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit den PE, deren Funktion bisher nicht eindeutig geklärt ist.

### **2.2.1 Motorische Innervation**

Die motorische Innervation der EOM erfolgt durch drei Hirnnerven:

1. N. oculomotorius (N.III): Das Kerngebiet des N. oculomotorius liegt im Mesenzephalon, aus dem die Nervenfasern aus der Fossa interpeduncularis aus dem Hirn austreten und durch den Sinus cavernosus und die Fissura orbitalis superior in die Orbita ziehen. Hier teilt sich der Nerv auf. Der Ramus superior innerviert den M. levator palpebrae superioris und den M. rectus superior. Der Ramus inferior versorgt die Muskeln MR, IR und M. obliquus inferior. Zusätzlich versorgt der N. oculomotorius die im Augenebulbus gelegenen Muskeln M. ciliaris und M. sphincter pupillae mit parasymphathischen Fasern (Aumüller et al. 2010).

2. N. trochlearis (N.IV): Der vierte Hirnnerv, N. trochlearis, entspringt dem Mesenzephalon dorsal und zieht nach Durchquerung des Sinus cavernosus an der Oberseite der Orbita entlang, um den M. obliquus superior zu innervieren (Aumüller et al. 2010).
3. N. abducens (N.VI): Der N. abducens, der sechste Hirnnerv, hat seinen Ursprung im Tegmentum auf pontiner Ebene. Seine Fasern durchlaufen den Sinus cavernosus zentral und ziehen durch den Anulus tendineus communis. Danach legen sie sich dem M. rectus lateralis an und innervieren ebendiesen (Aumüller et al. 2010).

## 2.2.2 Sensible Innervation

Die sensible Innervation der extraokulären Muskulatur erfolgt grundsätzlich durch den N. Trigemimus, den 5. Hirnnerv (Alvarado-Mallart et al. 1975; Aumüller et al. 2010).

## 2.2.3 Propriozeptive Innervation

Propriorezeptoren dienen im Allgemeinen dazu, die Stellung der Gelenke, den Tonus der Muskulatur und die Spannung innerhalb der Sehnen zu detektieren (Welsch 2010). Im Gegensatz zur skelettalen Muskulatur existieren in den EOM bezüglich der Propriozeption viele unterschiedliche Meinungen und ungeklärte Fragen. Auch heute lässt sich die Problematik auf die von *Ruskell* 1999 aufgeführten drei Faktoren zurückführen (Ruskell 1999):

1. Die in Skelettmuskeln befindlichen propriozeptiven Organe lassen sich in den EOM nur zum Teil, in veränderter Form oder gar nicht vorfinden.
2. Innerhalb der einzelnen untersuchten Spezies fallen große Unterschiede bezüglich dieser propriozeptiven Organe in den EOM auf.
3. Auch die zugrunde liegende neuronale Innervation ist speziesabhängig.

Um Doppelbilder zu verhindern, bedarf es einer schnellen, akkuraten Adjustierung der Bulbusstellung. Das Gehirn ist also auf Feedback-Mechanismen und die Generierung propriozeptiver Informationen angewiesen, um die benötigten Informationen für eventuelle Korrekturen zu gewinnen. Auch

langfristig ist eine Propriozeption der Augenbewegung für die Kalibrierung der motorischen Efferenzen wichtig (Porter et al. 1995).

In der Theorie existieren für das Gehirn drei verschiedene Möglichkeiten, um die entsprechenden Informationen zu erhalten (Porter et al. 1995). Zum einen durch visuelle Informationen des primären visuellen Kortex, die allerdings mit einer relativ langen Latenzzeit einhergehen. Zum anderen durch die Kopie der ausgehenden Efferenzen (Outflow-Theorie), auch als corollary discharge bekannt (Helmholtz 1866; Sperry 1950). Diese zeigt nur eine kurze Latenz auf, stellt dafür aber nur eine Kopie der beabsichtigten Bewegung dar. Dennoch scheinen Bewegungen basierend auf der corollary discharge genaue Informationen über die Augenposition gewährleisten zu können (Guthrie et al. 1983). Weiter ist eine Informationsgewinnung über die Veränderung der Augenstellung durch propriozeptive Organe innerhalb der EOM denkbar (Porter et al. 1995).

Mittlerweile liegen einige Belege für die Existenz propriozeptiver Signale von den EOM im primären somatosensorischen Kortex von Affen vor (Wang et al. 2007) (siehe Kapitel 6.1). Ebenso gelang der Nachweis eines Dehnungsreflexes der EOM, der das Vorhandensein propriozeptiver Informationen erfordert (Dancause et al. 2007). Auch wurden mittels funktioneller Magnetresonanztomographie des menschlichen Cortex während aktiven und passiven Augenbewegungen Aktivitätsnachweise des somatosensorischen sowie des motorischen und prämotorischen Areals erbracht. Es existiert folglich eine Repräsentation propriozeptiver Informationen, die - vergleichbar zu der zerebralen Verarbeitung der propriozeptiven Information der skelettalen Muskulatur - bilateral verarbeitet wird. Die starke Vernetzung des somatosensorischen Kortex mit motorischen und prämotorischen Arealen könnte das Zusammenspiel propriozeptiver Informationen mit der corollary discharge widerspiegeln (Balslev et al., 2011). Auf welche Art und Weise diese propriozeptiven Informationen in den EOM generiert werden, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

Die klassischen Propriozeptoren in der skelettalen Muskulatur sind Muskelspindeln (MS) und Golgi-Sehnenorgane (GSO) (Welsch 2010). MS, deren Aufgabe die Messung der Länge der MF ist, sind als Dehnungsrezeptoren

parallel zu den MF zu finden (Abb. 3). Eine bindegewebige Kapsel umgibt zwei Arten sogenannter intrafusaler MF, die Kernketten- und Kernsackfasern. Deren Kerne liegen in der Äquatorebene der MS. Hier werden sie von sensorischen Nervenfasern umwickelt und generieren propriozeptive Dehnungsinformationen. Der myofibrillenhaltige kontraktile Abschnitt der intrafusalen MF befindet sich an den äußeren Enden der MS. Dort setzen die Gamma-Motoneurone an, die die MF motorisch innervieren. Dies ist notwendig, um eine Anpassung der MS an die dynamischen Veränderungen der extrafusalen MF zu sichern (Welsch 2010).

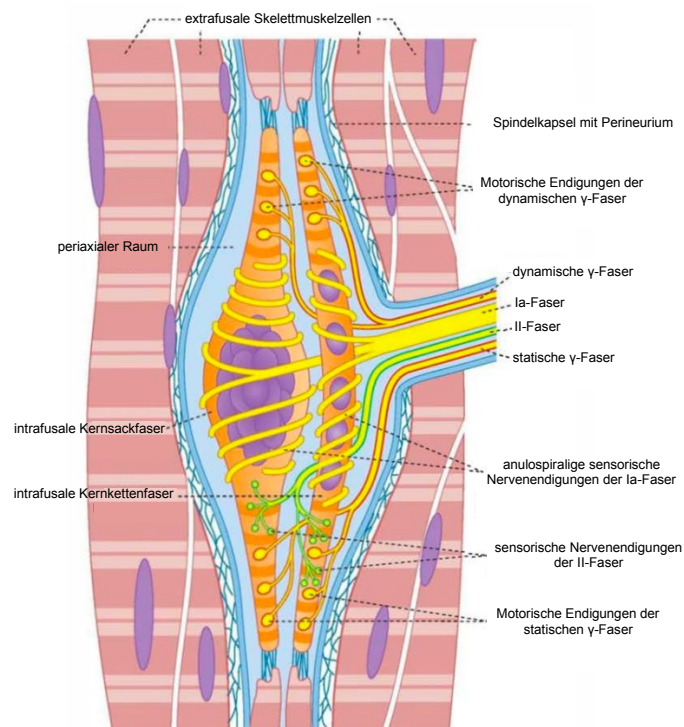


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Muskelspindel. Dargestellt sind intrafusale Fasern (orange) innerhalb der Kapsel, umgeben von extrafusalen Muskelfasern (braun). Von rechts zieht die nervale Innervation der Muskelspindel ein. Mit freundlicher Genehmigung von © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.

MS lassen sich nur zum Teil in den EOM von Säugetieren finden, zum Beispiel bei Schafen und anderen Paarhufern (Maier et al. 1974; Ruskell 1999). In anderen Spezies wie beispielsweise Katzen und Ratten fehlen sie vollständig (Maier et al. 1974; Billig et al. 1997). Beobachtungen, dass MS in den menschlichen EOM so zahlreich wie in skelettaler Muskulatur vorkommen, ließen vorerst auf eine gewohnte propriozeptive Funktion dieser schließen (Lukas et al. 1994; Cooper und Daniel 1949). Die Anzahl gezählter MS in den EOM in früheren



Untersuchungen könnte jedoch häufig zu hoch angesetzt und somit deren Beitrag zur Propriozeption überschätzt worden sein (Ruskell 1999; Friedrich et al. 2007). Eine detaillierte Untersuchung der MS in den EOM beim Menschen von *Blumer et al.* im Jahre 2006 zeigte zudem deutlich veränderte MS mit teils fehlender Innervation oder abnormalen intrafusalen MF, die sich auch in kindlichen Augenmuskeln fanden (Blumer et al. 2006). Sie können also nicht als altersbedingte Veränderungen interpretiert werden (Bruenech und Ruskell 2001; Blumer et al. 1999). Somit muss die Funktion der MS, die in der EOM in nur sehr variablem Ausmaß vorliegen und teils verändert sind, hinterfragt werden (Büttner-Ennever 2006).

Neben den MS existieren in skelettaler Muskulatur die sogenannten Golgi-Sehnen-Organ (GSO) (Abb. 4). Diese liegen im MSÜ in Reihe zu den MF und sind in der Lage, über freie Nervenendigungen die Dehnung der Sehne und somit die Spannung des Muskels zu detektieren. Die Kollagenfasern sind zum einen mit den MF und zum anderen mit der Kapsel des GSO verbunden und werden eng von aufgezweigten Nervenendigungen umflochten. Bei einer Dehnungsänderung der Kollagenfasern kommt es im afferenten Nerv zum Aktionspotential. Unmittelbare neuromuskuläre Kontakte existieren nicht (Zelená und Soukup 1977; Welsch 2010).

Mit Ausnahme von Paarhufern, wie Schafen, liegen keine Funde von GSO in den EOM vor (Billig et al. 1997; Ruskell 1990, 1999; Büttner-Ennever 2006; Blumer et al. 2006). Die in den EOM von Paarhufern gefundenen GSO weisen jedoch teils untypische intrakapsuläre MF auf (Ruskell 1990; Blumer et al. 2006), ähnlich wie bei sich noch entwickelnden GSO in den Beinmuskeln von Ratten, und könnte als ein Zeichen von Unreife interpretiert werden (Zelená und Soukup 1977; Ruskell 1990). In den menschlichen EOM konnten bisher allenfalls fragliche Funde von GSO erhoben werden (Richmond et al. 1984; Sodi et al. 1988, Bruenech und Ruskell 2000; Blumer et al. 2006). Zusammenfassend scheinen die GSO im Augenmuskel eine unbedeutende Rolle bei einer propriozeptiven Funktion zu spielen.

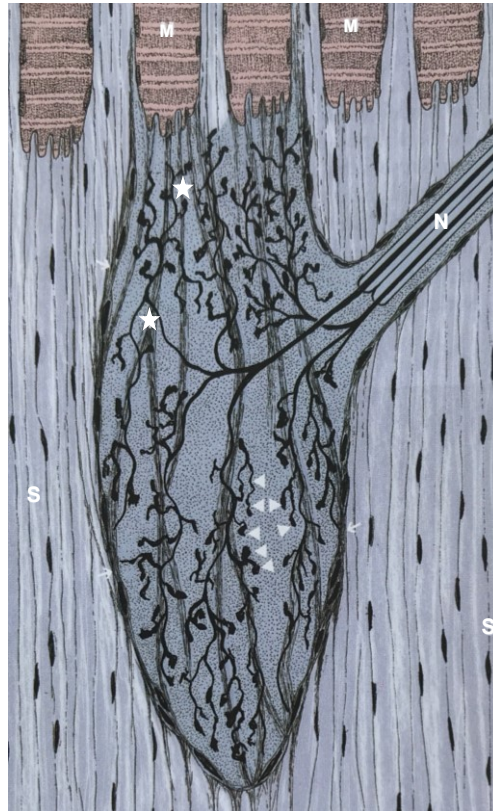


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Golgi-Sehnenorgans. Dieses steht in Kontakt mit Muskulatur (M) und Sehne (S). Es erfolgt eine nervale Innervation (N) der Kollagenfasern (Sternchen). Mit freundlicher Genehmigung von © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.

## 2.2.4 Palisadenendigungen

In den EOM existiert daneben noch ein weiterer Kandidat mit einer möglichen propriozeptiven Funktion: Die Palisadenendigungen (PE) (Büttner-Ennever et al. 2006). In den meisten untersuchten Säugetieren einschließlich dem Menschen lässt sich diese, auch "innervated myotendinous cylinders" genannte Nervenendigung, ausschließlich im MSÜ der EOM konstant vorfinden (Ruskell 1978; Alvarado-Mallart et al. 1979; Blumer et al. 1998; Lukas et al. 2000; Eberhorn et al. 2005; Paduca 2017). Die Zellkörper der PE liegen zusammen mit den MIF-Zellkörpern in der C-Gruppe nahe dem Kerngebiet des N. oculomotorius (Büttner-Ennever et al. 2001; Lienbacher et al. 2011). Die PE als solche befinden sich im distalen und proximalen MSÜ der globalen Schicht (Büttner-Ennever et al. 2001). Die Axone der PE ziehen von den MF kommend Richtung Sehne und vollführen am MSÜ eine Drehung um 180°, um sich in mehrere feine Äste aufzuzweigen (Abb. 5). Diese Nervenendigungen setzen sich dem Ende einer

MF wie eine Kappe auf (Billig et al. 1997; Lukas et al. 2000). Bereits 1906 konnte dies *Dogiel* mit einer einfachen Silber-Färbung nachweisen (Abb. 5) (Dogiel 1906).

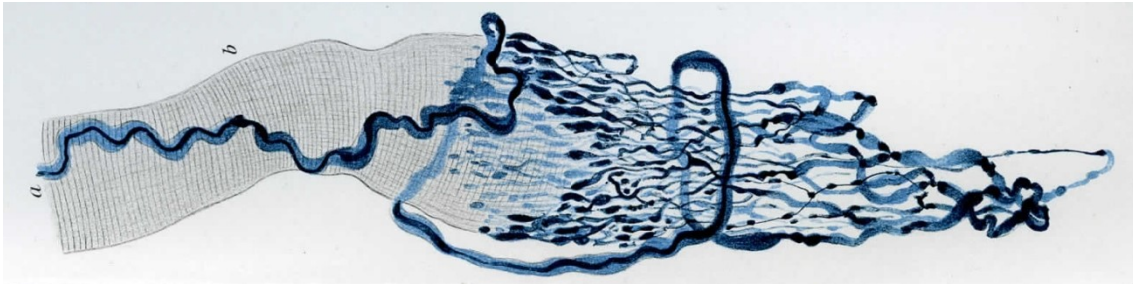


Abbildung 5: Eine Tusche-Zeichnung von A.S. Dogiel aus dem Jahre 1906 zeigt die Silber-Färbung einer Palisadenendigung. Mit freundlicher Genehmigung von © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.

PE sind von einer Kapsel umgeben, die sowohl das Ende der assoziierten MF als auch den Beginn der Sehne miteinschließt, wobei die Nervenenden Kontakte sowohl mit der MF als auch mit der Sehne ausbilden (Lukas et al. 2000; Konakci et al. 2005). Die Größe einer PE beläuft sich auf ca. 40-50  $\mu\text{m}$ . Schätzungen zur genauen Anzahl der PE variieren, wobei Einigkeit darüber besteht, dass diese im MR am höchsten ist (Blumer et al. 2016). Es gibt zudem deutliche Unterschiede bezüglich der Anzahl der PE zwischen den verschiedenen Spezies, wobei vor allem bei Tieren mit seitlich-stehenden Augen eine verminderte Anzahl der PE zu finden ist, sofern sie dort überhaupt existieren (Blumer et al. 2016).

Bislang wurde bei allen darauf untersuchten Spezies eine Assoziation der PE ausschließlich mit den langsam kontrahierenden MIF beschrieben (Lukas et al. 2000; Büttner-Ennever et al. 2001; Konakci et al. 2005). Neueste Untersuchungen beim Menschen von *Andreas* und *Laessing* liefern jedoch Hinweise für eine Assoziation der PE auch mit Fast-Myosin-exprimierenden SIF (Laessing 2013; Andreas 2021).

Die genaue Funktion der PE ist bisher noch ungeklärt. Manche morphologische und histochemische Eigenschaften befürworten eine motorische, andere eine sensorische Rolle. Die anatomische Lage im MSÜ sowie die strukturelle Verwandtschaft zu GSO sprechen für eine propriozeptive Funktion der PE. Die PE und GSO sitzen beide am MSÜ und bilden enge Kontakte mit der Sehne aus

(Konakci et al. 2005; Schoultz 1972). Wie PE weisen auch GSO zu Beginn ihrer Entwicklung neuromuskuläre Kontakte auf. GSO verlieren diese jedoch im Verlauf ihrer Entwicklung, wohingegen PE - zumindest teilweise - im Gegensatz zu adulten GSO diese neuromuskulären Kontakte ausbilden (Abb. 6) (Zelená und Soukup 1977; Alvarado-Mallart und Pincon-Raymond 1979; Konakci et al. 2005). Es liegen also Ähnlichkeiten der PE zu sich entwickelnden GSO vor.

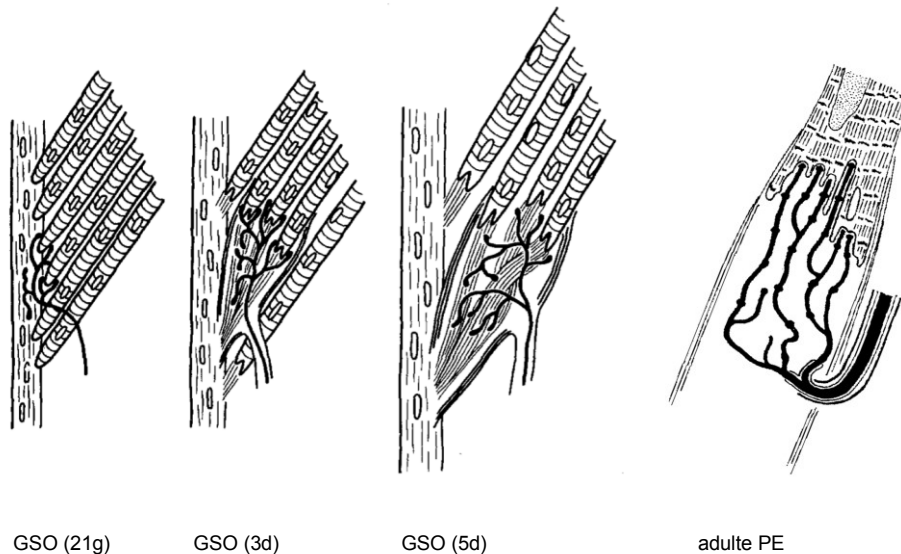


Abbildung 6: Schematische Darstellung sich entwickelnder Golgi-Sehnenorgane (GSO) und einer adulten Palisadenendigung: Die GSO sind in den verschiedenen Entwicklungsstufen im Alter des 21. Gestationstages (21g), drei Tage nach Geburt (3d) und fünf Tage nach Geburt (5d) dargestellt. Daneben ist eine adulte Palisadenendigung (PE) gezeichnet. Mit freundlicher Genehmigung von © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.

In Untersuchungen beim Affen wurden weder bei neurotendinösen noch bei neuromuskulären Kontakten der PE eine Basallamina gefunden, ebenso wenig bei Katzen und Schafen (Ruskell 1978; Alvarado-Mallart und Pincon-Raymond 1979; Blumer et al. 1998). Das könnte als Hinweis auf eine sensible Funktion der PE interpretiert werden, ähnlich wie bei den sensorischen neuromuskulären Kontakten in MS, die keine Basallamina aufweisen (Lukas et al. 1994; Rungaldier et al. 2009). Bei Katzen und Schafen zeigten die neuromuskulären Kontakte nur eine Breite von 30 – 40nm auf (Alvarado-Mallart und Pincon-Raymond 1979, Blumer 1998). Dies entspricht der Breite sensibler Synapsen in MS (Lukas et al. 1994; Rungaldier et al. 2009).

Nahezu alle neurotendinösen Synapsen von PE bei Katzen und Primaten weisen keine alpha-Bungarotoxin-Bindung auf (Lukas et al. 2000; Konakci et al. 2005; Blumer et al. 2009), im Unterschied zu den neuromuskulären Synapsen der PE (Konakci et al. 2005; Blumer et al. 2000, 2016). Beim Menschen besitzen die Synapsen der PE alle histochemischen Voraussetzungen für eine exozytotische Funktion, jedoch ohne die entsprechenden postsynaptischen Acetylcholin-Rezeptoren (Blumer et al. 2020).

Für eine motorische Funktion spricht der von den PE benutzte Transmitter Acetylcholin. *Konakci und Kollegen* fand 2005 heraus, dass PE beim Affen Cholinacetyltransferase (ChAT)-Immunreaktivität aufweisen, wie sie klassischerweise in motorischen Endplatten vorzufinden ist, was auch bei Katzen und Schafen zutrifft (Konakci et al. 2005; Rungaldier et al. 2009). Funktionelle cholinerge neuromuskuläre Kontakte der PE wurden durch die Präsenz postsynaptischer Acetylcholin-Rezeptoren über die Bindung von alpha-Bungarotoxin in verschiedenen Spezies, einschließlich Affen und Menschen, nachgewiesen (Lukas et al. 2000, Blumer et al. 2001; 2009; 2016; 2020; Khanna et al. 2003). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die motorischen Terminalen der en-grappe und en-plaque Endigungen der MIF und SIF eine Basallamina enthalten (Blumer et al. 2009). Auch bezüglich der Breite der Synapsen liegen unterschiedliche Forschungsergebnisse vor. So ergaben ultrastrukturelle Untersuchungen beim Menschen einen synaptischen Spalt von 50nm Breite. Dies stellt eine Eigenschaft motorischer Endplatten dar (Lukas et al. 2000). Eine motorische Rolle der PE wird weiterhin durch die Lokalisation ihrer Zellkörper unterstützt, die in den peripheren Gruppen der Augenmuskelkerne liegen, wo die MIF-Motoneurone lokalisiert sind (Büttner-Ennever et al. 2001; Lienbacher et al. 2011; Zimmermann et al., 2010). Für eine propriozeptive Funktion der PE hätte man die Zellkörper im Trigeminus-Ganglion erwartet (Lienbacher 2012). Zudem lieferte *Blumer und Kollegen* in Untersuchungen bei Katzen Hinweise für eine Innervation der PE und MIF über dasselbe Axon (Blumer et al. 2020).

Interessanterweise zeigte *Lienbacher et al.*, dass eine Teilpopulation der PE im MR und IR bei Affen und Menschen das Calcium-bindende Protein Calretinin (CR) exprimiert (Lienbacher et al. 2018; Sänger 2018).

Trotz Fortschritten in der Aufklärung der genaueren Anatomie mit Identifikation der Lage ihrer Zellkörper ist die Funktion der PE bislang immer noch unklar (Büttner-Ennever et al. 2006).

## **2.3 Augenbewegungen und Augenbewegungsstörungen**

### **2.3.1 Physiologische Augenbewegungen**

Augenbewegungen haben grundsätzlich zwei Funktionen (Leigh und Zee 2006). Zum einen sorgen sie für ein dauerhaft scharfes Bild, indem sie den Blick bei Eigenbewegungen oder Bewegungen des visuellen Umfelds stabilisieren. Dazu dienen der Vestibulookulare Reflex, der Optokinetische Reflex, sowie visuelle Fixierung und Folgebewegungen (Leigh und Zee 2015; Grehn 2019). Zum anderen dienen Augenbewegungen zur Erfassung von Blickzielen - unabhängig von einer Kopfbewegung. Hierzu zählt man Sakkaden und die Vergenzbewegung (Leigh und Zee 2006).

Der Vestibulookulare Reflex sorgt für die Stabilisierung des Blickes bei einer Kopfbewegung (Grehn 2019). Die Bogengänge im Innenohr dienen dabei als Detektoren der Veränderung der Kopfhaltung und führen in kürzester Zeit zu einer kompensierenden Bewegung der Augen (Leigh und Zee 2006). Durch seine minimale Latenzzeit von nur 6-15 ms ist er perfekt dafür geeignet, den menschlichen Blick auch während sehr schneller Kopfbewegungen konstant zu halten (Maas et al. 1989; Leigh und Zee 2006). Aufgrund der mechanischen Eigenschaften der Bogengänge kommt es bei langsamen Kopfbewegungen zu einer Abschwächung des vestibulären Signals. Fehlt eine Kopfbewegung vollständig, können die Augen trotzdem sich bewegende Objekte durchgehend scharfstellen. Hierfür existiert der Optokinetische Reflex sowie die Folgebewegungen, die auch unabhängig vom vestibulären System eine optische Stabilisierung des Blickes ermöglichen (Leigh und Zee 2006; Behrends et al. 2010; Grehn 2019).

Sakkaden sind gekennzeichnet durch schnelle, äußerst kurze und akkurate Stellbewegungen der Augen, um ein gewünschtes Objekt schnellstmöglich scharf auf der Fovea abzubilden. Zusätzlich existieren kurze „Nystagmus Quick Phases“, die korrigierende rasche Augenbewegungen durchführen. Sie verhindern, dass unsere Augen nach einer Kopfbewegung nicht an einer Seite der Orbita aufgrund des Vestibulookulären Reflexes und Optokinetischen Reflex „gefangen sind“. Somit stellen sie eine Art „Rückstellbewegung“ dar, indem durch eine zügige Augenbewegung in Richtung der Drehbewegung des Kopfes der Bulbus wieder in eine gerade Augenstellung gebracht wird (Leigh und Zee 2006).

Im Gegensatz zu den anderen konjugierten Augenbewegungen führen Vergenzbewegungen zu einer gegensätzlichen Bewegung der Augen, also einem Zueinanderführen (Konvergenzbewegung) oder Voneinanderwegführen (Divergenzbewegung). Dies wird notwendig, wenn das fokussierte Objekt seine Entfernung vom Betrachter verändert (Behrends et al. 2010; Grehn 2019). Nähert sich ein scharf eingestelltes Objekt den Augen über einen gewissen Punkt hinweg, so kommt es zur Naheinstellungsreaktion. Darunter versteht man eine gleichzeitige Konvergenzbewegung, Akkommodation und Miosis der Augen (Myers 1990; Grehn 2019; Trepel 2012). Dabei sind für die Konvergenzbewegung vor allem die MR beider Augen verantwortlich, unterstützend aber auch der IR und SR (Aumüller et al. 2010). Als Auslöser für das Ausführen einer Vergenzbewegung dient ein Missverhältnis der Bilder auf der Retina oder auch eine Unschärfe des abgebildeten Objektes (Leigh und Zee 2006).

### **2.3.2 Krankheitsbild des Strabismus**

Beim Strabismus (dt.: Schielen) weicht eines der beiden Augen von der normalen optischen Sehachse ab und es entstehen Doppelbilder (Grehn 2019). Es handelt sich um ein häufiges Krankheitsbild. In einer Untersuchung von 1582 Kindern auf Fehlsichtigkeit fand sich bei ca. 4% ein Strabismus (Donnelly 2005).

Eine Einteilung des Strabismus kann anhand verschiedener Kriterien erfolgen. Pathophysiologisch werden beispielsweise der Strabismus concomitans und der Strabismus incomitans unterschieden. Bei Ersterem bleibt der Winkel zwischen

dem gesunden und dem abweichenden Auge durchgehend gleich. Es liegt ein Begleitschielen vor. Dieses tritt häufig bereits innerhalb der ersten sechs Lebensmonate auf. Ist der Winkel blickrichtungsabhängig, so spricht man vom Strabismus incomitans oder Lähmungsschielen. Dieser tritt typischerweise nach einer Augenmuskelparese auf, dann Strabismus paralyticus genannt (Sitzmann 2006; Grehn 2019). Zudem existiert die Unterteilung in manifestes Schielen (Heterotropie) und latentes Schielen (Heterophorie). Ein Schielen nach innen wird Strabismus convergens (Esotropie), nach außen Strabismus divergens (Exotropie) genannt (Sitzmann 2006; Grehn 2019). Die Auslöser des Strabismus können genetischen, erworbenen, anatomischen sowie funktionellen Ursprungs sein. Man muss zudem periphere von zentralen Pathologien unterscheiden (Bui Quoc und Milleret 2014).

Strabismus führt neben dem Auftreten von Doppelbildern auch zu sozialen Folgen, wie beispielsweise Einschränkungen bei der Berufsausübung, sowie psychischen Auswirkungen (Grehn 2019). Eine schwerwiegende Komplikation des Strabismus ist das Auftreten einer Amblyopie, also einer Schwachsichtigkeit des schielenden Auges (Sitzmann 2006). Um diese zu verhindern, sollte schnellstmöglich die Diagnose gesichert und eine Therapie eingeleitet werden. Als Therapieoption steht beim kindlichem Strabismus concomitans zunächst die Möglichkeit des Tragens einer speziellen Brille zur Verfügung. Darüber hinaus kann eine Amblyopie mit einer Okklusionsbehandlung verbessert bzw. verhindert werden. Dabei wird das führende Auge abgedeckt, um das schielende Auge zu stärken (Grehn 2019). Im Anschluss daran erfolgt im Allgemeinen eine Augenoperation, um das schielende Auge langfristig zu begradigen. Dabei erfolgt die durchgeführte Operation, wenn möglich, an zwei Muskeln. Der Operateur schafft sich zunächst einen Zugang in die Orbita. Anschließend kommt es zur Kürzung des schwächeren und Lockerung des stärkeren Augenmuskels (Grehn 2019). Durch die Anwendung von Botulinum-Toxin existiert eine weitere Therapieoption bei Strabismus-Patienten im Erwachsenenalter. Dieses verhindert die Calcium-abhängige Acetylcholin-Freisetzung in den synaptischen Spalt und führt somit zu einer zeitlich-begrenzten Denervierung der Muskeln. Hierfür wird Botulinum-Toxin in den entsprechenden EOM eingespritzt und lähmt diesen temporär im Durchschnitt für etwa drei Monate (Rowe 2017).



Untersuchungen zeigten jedoch teils schlechtere Ergebnisse im Vergleich zur Operation (Ing 1992; Wright 2006). In Zukunft könnten weitere noch in der Entwicklung befindliche Verfahren als therapeutische Option hinzukommen. Als Beispiel sei hier das Einspritzen von IGF-I in einen EOM aufgeführt. Hierdurch kommt es zu einer Zunahme der Muskelstärke der entsprechenden EOM (Anderson et al. 2006).

Strabismus tritt häufig bereits im frühen Kindesalter auf (Bui Quoc und Milleret 2014). Es besteht ein hohes Interesse daran, Veränderungen sowohl pathophysiologischer als auch anatomischer Art bei Strabismus-Patienten zu entdecken und mehr über die Ätiologie des Begleitschielens herauszufinden, begrenzen sich doch die aktuellen Therapiekonzepte lediglich auf eine Symptomverbesserung, statt eine ursächliche Heilung anzustreben. Es ist aktuell noch nicht endgültig geklärt, ob es sich bei der Ätiologie des infantilen Begleitschielens um eine Pathologie der Sensorik oder Motorik handelt (Schiavi 2016). Auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt noch keine abschließende Gewissheit besteht, existieren bereits einige Hinweise auf eine mögliche Ätiologie des Strabismus im Bereich des MSÜ und den propriozeptiven Strukturen der EOM (Schiavi 2016; Corsi et al. 1990; Park et al. 2009). PE liegen vor allem bei Lebewesen mit frontal-stehenden Augen konstant vor. Eine entscheidende Rolle im binokularen Sehen wäre somit denkbar (Blumer et al. 2016). Beim Strabismus ist genau diese Fähigkeit gestört. Hierbei stellt sich die Frage nach einer pathologischen Veränderung der PE. In meiner Dissertation untersuchte ich deshalb Differenzen im Anteil der CR-positiven PE sowie der Assoziation der CR-positiven PE zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden MF im menschlichen MR zwischen Körperspender-Präparaten und OP-Resektaten von Patienten mit einem Strabismus divergens.

## 2.4 Calretinin

Calretinin (CR) gehört neben Parvalbumin und Calbindin zu den Calcium-bindenden Proteinen und ist somit ein Teil der EF-Hand-Familie (Andressen et al. 1993). Es handelt sich um ein 29-kDa Protein, das in Neuronen synthetisiert wird und erstmals 1987 in der Retina von Hühnern entdeckt wurde (Rogers 1987). Welche genaue Funktion CR inne hat, ist aktuell noch nicht eindeutig geklärt. Man konnte CR in sensiblen Neuronen im Trigemini-Ganglion (Ichikawa et al. 1993; Lienbacher 2012), in vagalen, glossopharyngealen (Ichikawa 1991) sowie in Spinalganglien (Ichikawa et al. 1993) nachweisen. Dabei wurden CR-exprimierenden Neuronen eine sensible, teils mechanosensitive Funktion zugeschrieben (Ren 1992; Flügel-Koch et al. 2009).

Beim Affen wurde eine Teilpopulation von PE gefunden, die CR ausschließlich im MR und IR exprimieren (Lienbacher et al. 2018). Auch in der Untersuchung menschlicher EOM beschränkten sich die Funde CR-positiver PE auf den MR und IR (Sänger 2018).

## 2.5 SNAP-25

Das 25kDa schwere Synaptosomen-assoziierte Protein (SNAP-25) ist als Teil des SNARE-Komplexes verantwortlich für die Freisetzung von Neurotransmittern und deren Ausschüttung in den synaptischen Spalt durch die Fusionierung der Vesikel mit der Zellmembran (Hodel 1998; Connell et al. 2009; Rassow 2008). Es findet sich sowohl in den Synapsen als auch in der Wand der Axone der Nervenzellen (Tao-Cheng, Du und McBain 2000; Hodel 1998). Somit können Axone und deren Nervenendigungen immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen SNAP-25 identifiziert und in den EOM verschiedener Spezies alle motorischen, autonomen und sensorischen Nervenfasern, einschließlich der PE, angefärbt werden (Eberhorn et al. 2005).

### 3 Fragestellungen

Palisadenendigungen (PE) sind einzigartige Nervenendigungen im Muskelsehnenübergang (MSÜ) der extraokulären Muskeln (EOM), deren Funktion noch ungeklärt ist. Befunde am Affen zeigten eine große Population Calretinin (CR)-positiver PE nur im M. rectus medialis (MR) und M. rectus inferior (IR), die eine Sonderrolle in der Konvergenz spielen könnten. Vorläufige Beobachtungen hatten CR-positive PE im MR und IR beim Menschen bestätigt, aber nicht quantifiziert (Sänger 2018). Erkenntnisse aus einer zeitgleichen Studie am Menschen zeigten, dass PE nicht nur an Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (MF) sitzen, die üblicherweise MIF repräsentieren, sondern auch an Fast-Myosin-positiven MF (Andreas 2021). Mit der Annahme, dass PE eine propriozeptive Funktion innehaben, könnte eine Fehlfunktion der PE theoretisch an der Entstehung (nicht paralytischer) Strabismus-Formen beteiligt sein. Vor diesem Hintergrund sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen an menschlichen Augenmuskeln untersucht werden, um einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der Funktion von PE zu liefern:

1. Wie hoch ist der prozentuale Anteil CR-positiver PE im MR des menschlichen Auges?
2. Gibt es Unterschiede im prozentualen Anteil CR-positiver PE im MR zwischen gesunden Körperspendern und Strabismus-Patienten?
3. Inwieweit sind CR-positive PE im menschlichen MR mit Fast- und Slow-Myosin exprimierenden MF assoziiert?
4. Existieren Differenzen bzgl. der Assoziation der CR-positiver PE mit Fast- und Slow-Myosin exprimierenden MF im menschlichen MR im Vergleich von gesunden Körperspendern mit Strabismus-Patienten?

Dazu sollten Schnittpräparate vom MSÜ des MR von Körperspendern und Strabismus-Patienten mit immunhistochemischen Methoden gefärbt werden. Die Darstellung der gesamten Innervation, einschließlich der PE, erfolgte mit einem SNAP25-AK und wurde mit Immunfärbungen auf CR kombiniert. Mit Antikörpern gegen Fast- und Slow-Myosin-Schwerketten erfolgte die Bestimmung der Muskelfasertypen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Herkunft der Muskelpräparate

#### 4.1.1 Präparate von Körperspendern

Zum einen dienten Augenmuskeln von Körperspendern des anatomischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität München zu meinem Untersuchungsgut. Diese wiesen, soweit bekannt, zu Lebzeiten keine Augenbewegungsstörungen auf. Das Alter der Körperspender lag zwischen 60 und 92 Jahren. Alle von mir durchgeführten Untersuchungen standen im Einvernehmen mit der örtlichen Ethikkommission und der 1964 unterzeichneten Deklaration von Helsinki über die Ethischen Grundsätze der Forschung am Menschen. Sämtliche Augenmuskeln wurden 24h bis spätestens 48h nach dem Versterben des jeweiligen Körperspenders entnommen. Als Fixierungsmedium dienten Paraformaldehyd (PFA) und Methanol. In Tab. 1 sind die verwendeten Muskeln aufgelistet. Die aus diesen Fällen gewonnenen Daten dienten mir als Quelle für Grundlagendaten beim Menschen und gleichzeitig als Kontroll-Gruppe zum Vergleich mit den Strabismus-Fällen.

<b>Fall</b>	<b>Augenmuskel</b>	<b>Fixierung</b>	<b>Alter</b>
1	MR li	4% PFA	60
2	MR re	4% PFA	63
3	MR re	100% Methanol	74
4	MR re	4% PFA	80
5	MR li	4% PFA	84
6	MR re	4% PFA	87
7	MR li	4% PFA	90
8	MR li	4% PFA	91
9	MR li	4% PFA	92

Tabelle 1: Auflistung der ausgewerteten Augenmuskeln der Körperspender.

### 4.1.2 Resektate aus der Augenklinik

In Zusammenarbeit mit der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München erhielt ich Augenmuskelpräparate von Strabismus-Patienten im Alter zwischen 8 und 62 Jahren. Alle Patienten hatten sich aufgrund eines Strabismus divergens einem operativen Eingriff unterzogen. Ein positives Votum der Ethik-Kommission der LMU zur Verwendung der Resektate liegt vor. Neben Paraformaldehyd (PFA) wurden die Präparate vorwiegend alternativ in Methanol fixiert. In Tab. 2 sind alle ausgewerteten Strabismus-Fälle verzeichnet.

<b>Fall</b>	<b>Augenmuskel</b>	<b>Fixierung</b>	<b>Alter</b>
10	MR li	4% PFA	8
11	MR re	100% Methanol	8
12	MR li	4% PFA	9
13	MR li	4% PFA	18
14	MR li	100% Methanol	21
15	MR li	100% Methanol	22
16	MR li	100% Methanol	23
17	MR li	100% Methanol	27
18	MR re	100% Methanol	33
19	MR li	100% Methanol	35
20	MR re	100% Methanol	36
21	MR li	100% Methanol	37
22	MR re	100% Methanol	52
23	MR li	100% Methanol	57
24	MR re	100% Methanol	62

Tabelle 2: Auflistung der ausgewerteten Augenpräparate aus der Augenklinik.

## 4.2 Präparation der Augenmuskeln

### 4.2.1 Präparate von Körperspendern

Es erfolgte zunächst eine vollständige Ausräumung der Orbita. Dazu wurde das Weichgewebe vom Knochen abgelöst und das Auge mitsamt aller extraokulären Muskeln (EOM), den Nerven sowie dem Fett- und Bindegewebe als kompaktes Paket entnommen. Anschließend wurde das Fett- und Bindegewebe von der Muskulatur und den Nerven entfernt und im weiteren Verlauf die Augenmuskeln von der Sklera abgetrennt (Abb. 7). Zur längerfristigen Aufbewahrung erfolgte eine Fixierung. In früheren Jahren wurden die Präparate hierzu in 4-prozentigem Paraformaldehyd in 0,1 molaren (M) Phosphat-Puffer eingelegt. Die Fixation aktuellerer Präparate erfolgte in 100-prozentigem Methanol.

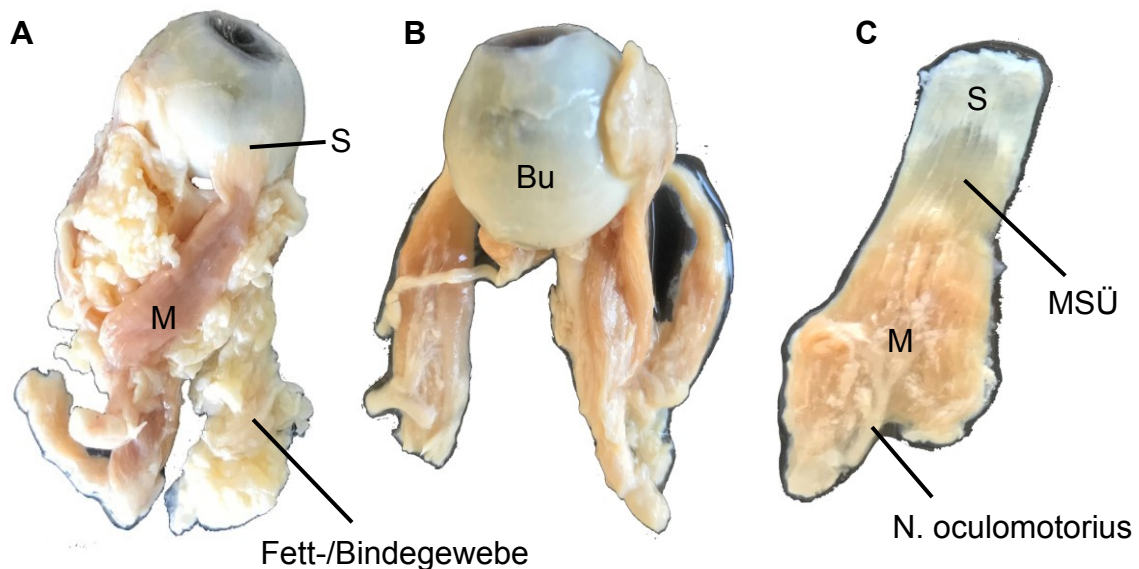


Abbildung 7: Linkes Augenpräparat von superior, vor (A) und nach Entfernung des orbitalen Fettkörpers (B) C: Ansicht des abgetrennten M. rectus medialis von globaler Seite, erkennbar an dem eintretenden Ast des N. oculomotorius. Herausgestellt ist der Muskelsehnenübergang (MSÜ) zwischen dem Muskelgewebe (M) und dem sehnigen Anteil (S) des Muskels.

### 4.2.2 Resektate aus der Augenklunik

Die Muskelpräparate aus der Augenklunik stellten Operationsresektate dar und benötigten keine weitere Präparation. Die Fixierung der Resektate erfolgte in gleicher Weise wie die der Körperspender-Präparate in 4-prozentigem Paraformaldehyd, beziehungsweise in 100-prozentigem Methanol.

### **4.3 Schneiden der Augenmuskeln**

Das Schneiden der Augenmuskel-Präparate der Körperspender und Muskelresektate aus der Augenklinik erfolgte auf die gleiche Art und Weise.

Die Objektträger (OT) mit den Muskelresektaten behandelte ich mit einem 0,1M Phosphat-Puffer (pH 7,4). Danach wurden die Augenmuskelpräparate in aufsteigenden Sucrose-Konzentrationen (10%, 20%, 30%) nacheinander mehrere Stunden inkubiert. Diese Vorbereitungen sollten spätere Schäden durch die Bildung von Eiskristallen beim Gefrieren verhindern. Dann bettete ich die Muskeln auf eine als Objekthalter dienende Metallplatte, die auf  $-45^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und mit NEC-50 (Thermo Scientific), einem Eindeckmedium für Gefrierschnitte, versehen war. Anschließend wurde das auf der Metallplatte liegende Präparat komplett mit NEC-50 bedeckt und eingefroren. Die fixierten Augenmuskeln wurden dann im Kryostat bei einer konstanten Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  auf eine Dicke von  $20\mu\text{m}$  geschnitten und mit einem auf Raumtemperatur temperierten Objektträger aufgenommen. Durch die gewählte Schnittdicke konnte später ein optimales Eindringen der Antikörper (AK) ins Gewebe gewährleistet werden. Bei einer Größe der PE von etwa  $40\mu\text{m}$  färbte ich in dieser Arbeit keine direkt benachbarten Schnitte, um eine Doppelauswertung derselben PE zu verhindern.

Alle nicht unmittelbar weiterverarbeiteten Schnitte wurden zur weiteren Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **4.4 Auswahl der verwendeten Schnitte**

#### **4.4.1 Präparate von Körperspendern**

In meiner Dissertation untersuchte ich die PE im distalen MSÜ der globalen Schicht der EOM. Da in den Präparaten der Körperspender der komplette Muskel mitsamt MSÜ enthalten war, wurden diese Muskeln ohne vorherige Vergleichsfärbungen über die gesamte Dicke hinweg flach von orbital nach global geschnitten und auf „Superfrost-Plus“-Objektträger (OT) (R. Langenbrinck, Emmendingen) aufgebracht, da diese OT eine bessere Haftkraft für das Muskelpräparat bieten. Anschließend führte ich mit einzelnen über den gesamten

Muskel verteilten Schnitten eine Pikrofuchsinfärbung durch, wie unter Kapitel 4.5 dargestellt. Der Vorteil der Färbung lag darin, dass sie sich in kürzester Zeit während des Schneidens durchführen und auswerten lies. So konnte die Lokalisation des MSÜ gut eingeschätzt werden.

#### **4.4.2 Resektate aus der Augenklinik**

Im Gegensatz zu den Präparaten der Körperspender lag mir bei den Operationsresektaten nicht der gesamte Muskel vor. Meist bestanden die Präparate der Strabismus-Patienten nur aus sehnigen Anteilen. Um herauszufinden, ob der MSÜ auf dem jeweiligen Präparat vorhanden war, verwendete ich jeweils auf Schnitt 5 und 10 eine Pikrofuchsinfärbung (siehe Kapitel 4.5). War der MSÜ in dem untersuchten Schnitt enthalten, arbeitete ich den restlichen Muskel auf und die weiteren Schnitte wurden auf „Superfrost-plus“-OT aufgebracht. Anderenfalls verwarf ich das betreffende Operationsresektat.

#### **4.5 Pikrofuchsinfärbung**

Zur Bestimmung der Lokalisation des MSÜ wandte ich eine Pikrofuchsinfärbung an: Nach kurzem Erhitzen des Objektträgers (OT) für eine Minute auf einer 37°C warmen Heizplatte, tropfte ich Pikrofuchsinlösung auf das Präparat und ließ diese für 60 Sekunden einwirken. Die Lösung wurde dann abgeschüttet und für jeweils eine weitere Minute zuerst 96-prozentiger und danach 100-prozentiger Alkohol auf den OT gegeben. Anschließend wurde der OT für wenige Minuten in Xylol inkubiert und mit dem Eindeckmedium DPX (Dibutylphthalate Polystyrene Xylene) der Firma Sigma eingedeckelt. So konnte das Präparat optimal unter einem Hellfeld-Mikroskop beurteilt werden. Wie in Abb. 8 erkennbar, erschien Muskelgewebe im Lichtmikroskop braun, Erythrozyten braun-gelb und Bindegewebe in einem blassen Rosa. Die Sehne stellte sich in einem deutlichen Rot-Ton dar.



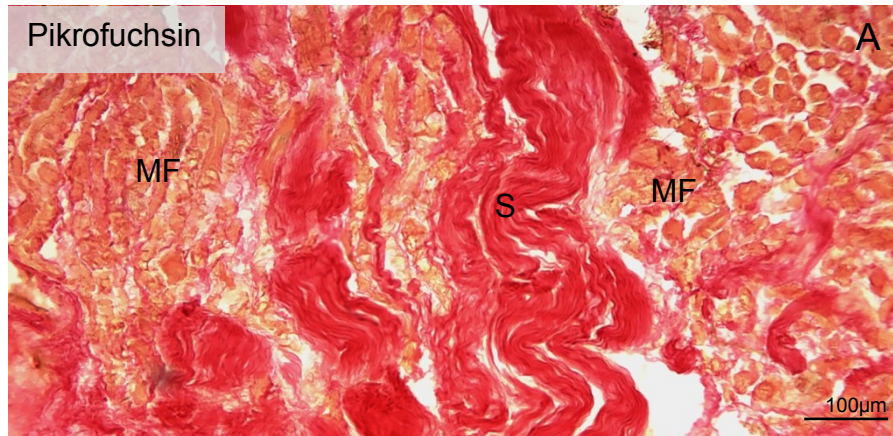


Abbildung 8: Pikrofuchsin-Färbung eines Muskelsehnenübergangs im Hellfeldmikroskop: Mit der Pikrofuchsinfärbung lassen sich innerhalb eines Muskelsehnenübergangs eines *M. rectus medialis* Muskelfasern (MF) nachweisen, die bräunlich sichtbar werden. Von diesen hebt sich das Sehngewebe (S) durch seine Rotfärbung ab.

#### 4.6 Immunhistochemische Färbungen

Unter einer immunhistochemischen Färbung versteht man die Darstellung bestimmter Zellstrukturen durch an Antikörper (AK) gebundene Farbstoffe. Man unterscheidet dabei monoklonale von polyklonalen AK (Abb. 9). Monoklonale AK sind exakt identisch zueinander, d.h. sie binden an genau das gleiche Antigen-Epitop. Sie werden von Klonen einer einzigen Plasmazelle produziert. Polyklonale AK dagegen entstehen in verschiedenen Plasmazellen desselben Wirtes. Sie binden folglich an verschiedene Antigen-Epitope (Boenisch et al. 2003).

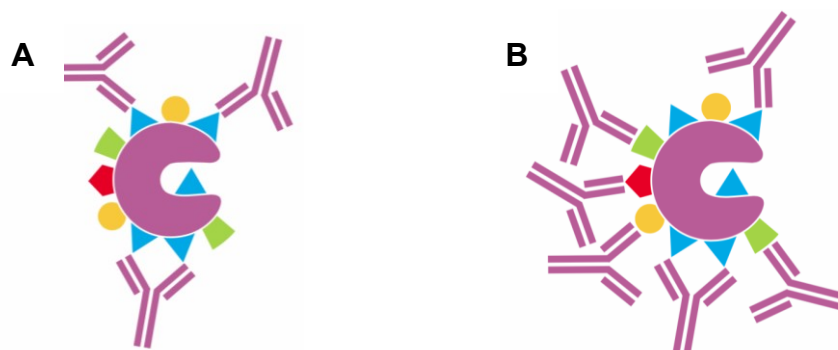


Abbildung 9: Schematische Darstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper: (A) zeigt die Bindung eines monoklonalen AK an ein identisches Antigen, (B) die an verschiedene Epitope bindenden polyklonalen AK. Mit freundlicher Genehmigung von © Agilent Technologies, Inc.

Ich verwendete die „Zwei-Schritt indirekte Methode“. Dabei bindet ein Primärantikörper in einem ersten Schritt am gesuchten Antigen. Im darauffolgenden zweiten Schritt dockt ein Sekundärantikörper an den Primärantikörper an. Dieser zweite AK ist mit einem Substrat versehen, welches ein farbloses Chromogen sichtbar macht. Man spricht deshalb von einem konjugierten AK (Abb. 10) (Boenisch et al. 2003).

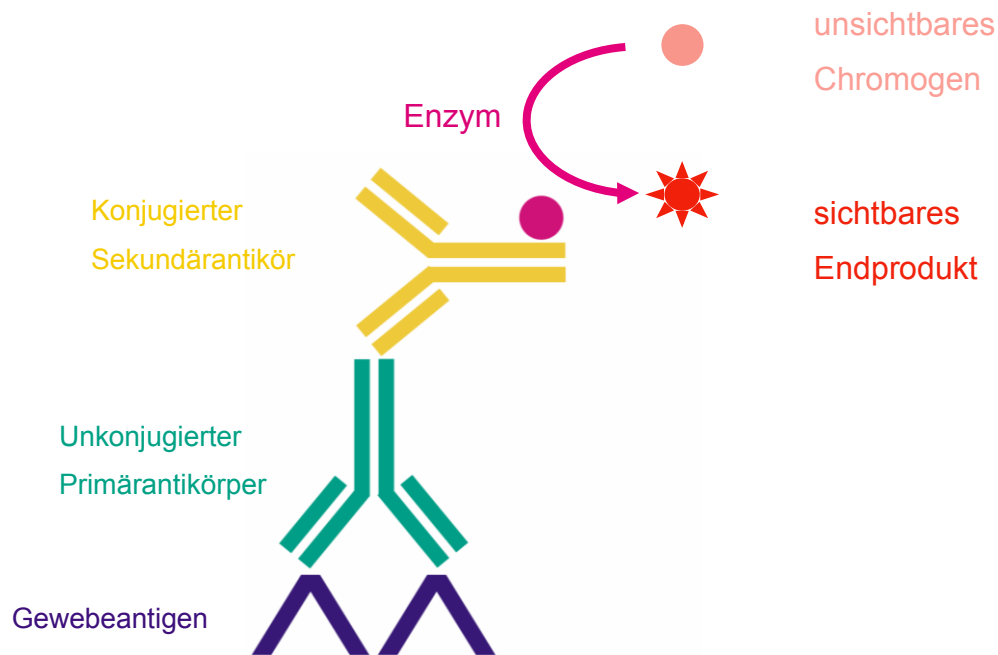


Abbildung 10: Schematische Darstellung aller beteiligten Komponenten bei der „Zwei-Schritt indirekten Methode“. Mit freundlicher Genehmigung von © Agilent Technologies, Inc.

Ich verwendete unterschiedliche Tripel-Immunfluoreszenz-Färbungen, die im Folgenden erläutert werden.

#### 4.6.1 Tripel-Immunfluoreszenz-Färbung (SNAP-25 + CR + MyH7B)

Zu Beginn dieser Färbemethode wurden die auf dem Objektträger (OT) aufgebrauchten Muskelschnitte für eine Stunde bei konstanten 60°C auf einer Wärmeplatte erhitzt. So verhinderte ich ein späteres Lösen der Muskelpräparate vom OT durch die im Folgenden aufgebrauchten Flüssigkeiten. Anschließend wurde der Muskel auf dem OT mit dem GnomePen von Invignome (Catalogue-

No.: GPF-VP5A-Y, Lot-No.: 031211-5) umfahren. Die hierdurch entstandene hydrophobe Linie grenzte die aufgetropften Lösungen auf das Gebiet des Muskels ein. Nun inkubierte ich das Muskelgewebe einmalig für 10 Minuten mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (0,1M TBS pH 7,4), um das Gewebe anzufeuchten. Im nächsten Schritt brachte ich zur Präinkubation eine TBS Lösung mit 0,3-prozentigem Triton und 5-prozentigem Normal Esel Serum für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schnitt auf. Dadurch wurden alle unspezifischen Antigene abgedeckt. Somit konnte eine relativ große Bindungsaffinität der späteren AK vorausgesetzt und die Rate der falsch-positiven AK-Antigen-Komplexe vermindert werden. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers in einer feuchten Kammer. Ich verwendete dabei eine Mischung aus drei verschiedenen AK, die alle in der Trägerlösung (TBS-Lösung mit 0,3-prozentigem Triton und 5-prozentigem Normal Esel Serum) enthalten waren (Tab. 3).

Um die gesamte Innervation der EOM darzustellen, nutzte ich den monoklonalen AK SMI81 (Sternberger Monoclonals Incorporated, Maryland, USA), der gegen SNAP-25 gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:2000 (Hodel 1998; Eberhorn et al. 2005). Als Nachweis von CR diente mir der polyklonale AK Kaninchen-Anti-CR (1:1000, SWant Swiss antibodies, Schweiz). Als dritte Struktur färbte ich Slow-Myosin mit einem polyklonalen AK Ziege-Anti-MyH7B (1:500, Santa Cruz, USA).

Antigen	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (2h bei RT)
<b>SNAP-25</b> (Sternberger M. I.)	5%iges Normal Esel Serum	Maus Anti-SNAP-25 (1:2000)	Alexa-488-Grün Esel Anti-Maus (1:200)
<b>Calretinin</b> (SWant)	5% Normal Esel Serum	Kaninchen Anti-CR (1:1000)	Cy3-Rot Esel Anti-Kaninchen (1:200)
<b>MyH7B</b> (Santa Cruz)	5% Normal Esel Serum	Ziege Anti-MyH7B (1:500)	DyLight-405-Blau Esel Anti-Ziege (1:100)

Tabelle 3: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25 (hier grün gefärbt), CR (hier rot gefärbt) und Slow-Myosin (blau gefärbt).

Nach 48h bei konstanten 4°C wurde die Pufferlösung 0,1M TBS pH 7,4 dreimalig für jeweils 10 Minuten auf die Schnitte gegeben, um die nicht-gebundenen Antikörper abzuspielen. Anschließend trug ich folgende sekundären AK in einer Trägerlösung von 0,1M TBS pH 7,4 mit 2-prozentigem Rinderserumalbumin auf: Cy3-Rot Esel Anti-Kaninchen (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., USA), Alexa-488-Grün Esel Anti-Maus (Molecular Probes, USA) und DyLight-405-Blau Esel Anti-Ziege (Jackson Immuno Research Laboratories, INC, USA). Dabei richtete sich der sekundäre AK gegen die Immunglobuline IgG der Spezies der entsprechenden Primär-AK. Nach 2h Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine dreimalige Spülung mit der Pufferlösung 0,1M TBS pH 7,4. Die OT wurden dann kurz in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend lichtgeschützt getrocknet. Die trockenen Schnitte deckelte ich mit Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma) und Deckgläsern (Menzel) ein. Die Aufbewahrung der gefärbten Schnitte während der Auswertung erfolgte in Dunkelheit bei einer Temperatur von 4°C.

Ich tauschte unter anderem die farbliche Darstellung der verschiedenen AK, um die beste Färbung für die spätere Auswertung zu erlangen. Für eine intensivere Darstellung des Nervenmarker SNAP-25 färbte ich diesen mit dem kräftigeren Rot (Tab. 4). Ich erhoffte mir so ein vereinfachtes Auffinden der PE. Allerdings gestaltete sich die Identifikation der Präparate aufgrund der starken

Autofluoreszenz des Alterspigments Lipofuszin schwierig, sodass ich auf diese farbliche Darstellung verzichtete. Stattdessen kam beim Großteil der Färbungen die in Tab. 3 aufgeführte Kombination der AK zur Anwendung.

Antigen	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (2h bei RT)
<b>SNAP-25</b> (Sternberger M. I.)	5% Normal Esel Serum	Maus Anti-SNAP-25 (1:2000)	Cy3-Rot Esel Anti-Maus (1:200)
<b>Calretinin</b> (SWant)	5% Normal Esel Serum	Kaninchen Anti-CR (1:1000)	Alexa-488-Grün Esel Anti-Kaninchen (1:200)
<b>MyH7B</b> (Santa Cruz)	5% Normal Esel Serum	Ziege Anti-MyH7B (1:500)	DyLight-405-Blau Esel Anti-Ziege (1:100)

Tabelle 4: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25 (hier rot gefärbt), Calretinin (hier grün gefärbt) und Slow-Myosin (blau gefärbt).

#### 4.6.2 Tripel-Immunfluoreszenz-Färbung (SYN + CR + MyH7B)

Anstelle des gegen SNAP-25 gerichteten AK SMI81 verwendete ich bei einigen Färbungen den AK auf Synaptophysin (SYN), ein Membranprotein synaptischer Vesikel. Nach Beobachtungen *Blumers* an Katzen exprimieren alle PE SYN (Konakci et al. 2005). Ich verwendete den AK gegen SYN (DAKO Cytomation, Dänemark) in der Verdünnung 1:20. Zudem wurden auch die sekundären AK getauscht, um Kreuzreaktionen zu vermeiden (Tab. 5). Diese können bei der Verwendung von AK derselben Tierklasse durch eine falsch-positive Anfärbung von Antigenen zustande kommen. Die Verwendung verschiedener AK zur Darstellung der gleichen Strukturen zielte darauf ab, die optimalen Bedingungen für die anschließende Analyse des verwendeten Gewebes zu erproben.

Antigen	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper (2h bei RT)
<b>Synaptophysin</b> (DAKO Cytomation)	5% Normal Esel Serum	Maus Anti-SYN (1:20)	Alexa-488-Grün Esel Anti-Maus (1:200)
<b>Calretinin</b> (SWant)	5% Normal Esel Serum	Kaninchen Anti-CR (1:1000)	Cy3-Rot Esel Anti-Kaninchen (1:200)
<b>MyH7B</b> (Santa Cruz)	5% Normal Esel Serum	Ziege Anti-MyH7B (1:500)	DyLight-405-Blau Esel Anti-Ziege (1:100)

Tabelle 5: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf Synaptophysin, Calretinin und Slow-Myosin.

### 4.6.3 Tripel-Immunfluoreszenzfärbung (CR + MHCf/FMyHC + MyH7B)

Für die zweite große Fragestellung, die Assoziation der CR-positiven PE mit Fast- und Slow-Myosinen im menschlichen MR, konnte ich auf eine Anfärbung aller neuronalen Strukturen mit SNAP-25 bzw. SYN verzichten. Die Zielstrukturen, die CR-positiven PE im MSÜ, wurden mit dem AK gegen CR sichtbar. Hierbei kam Kaninchen Anti-CR (rCR) (1:1000, SWant Swiss antibodies, Schweiz) sowie Maus Anti-CR (mCR) (1:100, SWant Swiss antibodies, Schweiz) zum Einsatz. Um die verschiedenen Muskelfasertypen zu unterscheiden, setzte ich Ziege Anti-MyH7B (gtMyH7B) der Firma Santa Cruz (USA), als AK gegen Slow-Myosin in einer Verdünnung von 1:500 ein. Kaninchen Anti-FMyHC (rFMyHc) und Maus Anti-MHCf (mMHCf) nutzte ich zur Darstellung der MF vom Fast-Typ. Ich verwendete Maus Anti-NCL-MHCf (mMHCf) der Firma Novocastra (UK) in einer Verdünnung von 1:20 (Tab. 6) und Kaninchen Anti-FMyHC (Anti-Fast Myosin Skeletal Heavy chain antibody) der Firma Abcam (UK) in einer Verdünnung von 1:250 (Tab. 7). Beide Myosine ließen sich gut anfärben. Aufgrund der besseren Auswertbarkeit der Färbung mit dem AK Kaninchen Anti-CR entschied ich mich bei dieser Tripel-Immunfluoreszenz-Färbung bei den meisten Schnitten für die in Tab. 6 aufgelisteten AK. Der grundsätzliche Ablauf war identisch zu dem bereits in Kapitel 4.6.1 beschriebenen Vorgehen.

<b>Antigen</b>	<b>Präinkubation (1h bei RT)</b>	<b>Primärer Antikörper (48h bei 4°C)</b>	<b>Sekundärer Antikörper (2h bei RT)</b>
<b>Calretinin</b> (SWant)	5% Normal Esel Serum	Kaninchen Anti-CR (1:1000)	Alexa-488-Grün Esel Anti-Kaninchen (1:200)
<b>MHCf</b> (Novocastra)	5% Normal Esel Serum	Maus Anti-NCL-MHCf (1:20)	Cy3-Rot Esel Anti-Maus (1:200)
<b>MyH7B</b> (Santa Cruz)	5% Normal Esel Serum	Ziege Anti-MyH7B (1:500)	DyLight-405-Blau Esel Anti-Ziege (1:100)

Tabelle 6: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf Calretinin, Fast- und Slow-Myosin. Hier unter Verwendung von Kaninchen Anti-Calretinin sowie MHCf für Fast-Myosin.

<b>Antigen</b>	<b>Präinkubation (1h bei RT)</b>	<b>Primärer Antikörper (48h bei 4°C)</b>	<b>Sekundärer Antikörper (2h bei RT)</b>
<b>Calretinin</b> (SWant)	5% Normal Esel Serum	Maus Anti-CR (1:1000)	Alexa-488-Grün Esel Anti-Maus (1:200)
<b>FMyHC</b> (Abcam)	5% Normal Esel Serum	Kaninchen Anti-FMyHC (1:250)	Cy3-Rot Esel Anti-Kaninchen (1:200)
<b>MyH7B</b> (Santa Cruz)	5% Normal Esel Serum	Ziege Anti-MyH7B (1:500)	DyLight-405-Blau Esel Anti-Ziege (1:100)

Tabelle 7: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf Calretinin, Fast- und Slow-Myosin. Hier unter Verwendung von Maus Anti-Calretinin sowie FMyHC für Fast-Myosin.

#### 4.6.4 Kombinierte Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz-Färbung (CR + MHCf / FMyHC + Myh7B)

Um das Auffinden von PE zu vereinfachen, benutzte ich in der Mehrzahl der Fälle bei meinen Untersuchungen zur Expression von CR in PE des MR an gesunden Probanden und Strabismus-Patienten eine bisher im Labor noch nicht etablierte Färbemethode: Die Kombination einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung mit einer Immunfluoreszenzfärbung. Dabei wurde zunächst eine Avidin-Biotin-Färbung des Präparates durchgeführt. Ich nutzte hierbei einen biotinylierten Sekundärantikörper. An diesen band die Avidin-Peroxidase, an der das hinzugegebene 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) oxidierte und dadurch sichtbar wurde (Abb. 11).

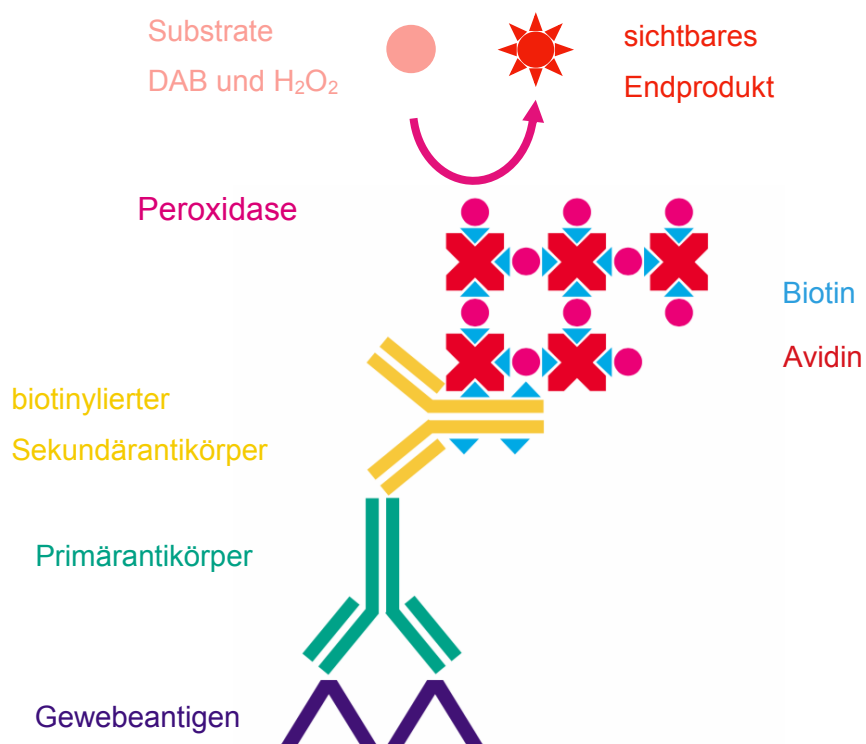


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Färbemethode. Das Substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird unter Zugabe des Chromogens DAB dem Avidin-Peroxidase-Komplex zugegeben, wonach eine Enzymreaktion abläuft. Dabei reagiert das farblose Chromogen DAB zur gefärbten oxidierten Form, die als Niederschlag an der Antigen-Antikörper-Bindungsstelle ausfällt. Mit freundlicher Genehmigung von © Agilent Technologies, Inc.



Dazu bereitete ich die Schnitte zuerst mit einem TBS-Puffer (10min 0,1M TBS PH 7,4) für das wässrige Milieu vor. In einem nächsten Schritt wurden die endogenen Peroxidasen mit der Hinzugabe von 1-prozentiger Wasserstoffperoxid-Lösung für 30 Minuten blockiert. Mit diesem Schritt wurde sichergestellt, dass diese nicht das später hinzugegebene 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) oxidierten und ein falsches Positiv-Signal erzeugen würden. Nach dreimaligem Spülen der Schnitte mit TBS-Puffer folgte die Präinkubation der Schnitte mit 5% Normal Esel Serum und 0,3% Triton für eine Stunde. Der primäre AK Kaninchen Anti-CR (Swant) verblieb daraufhin für 48 Stunden bei 4°C Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf den Schnitten, gelöst im Verhältnis 1:2500 in einer TBS Lösung mit 0,3-prozentigem Triton und 5-prozentigem Normal Esel Serum. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte mit TBS gespült und der biotinylierte zweite AK Ziege Anti-Kaninchen (Vector Laboratories, USA), 1:200 in 2-prozentigem Rinderserumalbumin in TBS verdünnt, für 1h bei Raumtemperatur aufgetragen. Es erfolgten weitere drei Spülungen mit TBS, bevor Extra-Avidin-Peroxidase im Verhältnis 1:1000 in 2-prozentigem Rinderserumalbumin in TBS auf die Schnitte gegeben wurde. Nach einer Stunde erfolgte erneut die Spülung der Schnitte mit TBS. Anschließend wurde die DAB-Lösung (0,025-prozentiges 3,3'-Diaminobenzidin + 0,015-prozentiges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS) auf die Schnitte pipettiert, zu der Ammonium-Nickel zugesetzt worden war, um ein schwarzes Färbeergebnis zu erhalten. Durch Hinzugeben des Substrates Wasserstoffperoxid lief die DAB-Nickel-Reaktion ab. Der Erfolg der DAB-Färbung konnte im Hellfeld-Mikroskop überprüft werden. Sobald schwarze Strukturen sichtbar wurden, beendete ich die Reaktion mittels Spülung mit TBS. Es schloss sich dann direkt die Immunfluoreszenz-Färbung an, wie bereits unter Kapitel 4.6.1 beschrieben. Hier verwendete ich die in Tab. 8 aufgeführten primären und sekundären Antikörper zur Anfärbung der Fast-Myosine (hier MHCf) als auch der Slow-Myosine (hier MyH7B).

Antigen	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper
<b>Calretinin</b> (SWant)	5% Normal Esel Serum	Kaninchen Anti-CR (1:2500)	Biotinylierter sek. AK Ziege Anti-Kaninchen (1:200) für 1h bei RT
<b>MHCf</b> (Novocastra)	5% Normal Esel Serum	Maus Anti-MHCf (1:30)	Cy3-Rot Esel Anti-Maus (1:200) für 2h bei RT
<b>MyH7B</b> (Santa Cruz)	5% Normal Esel Serum	Ziege Anti-MyH7B (1:500)	Alexa-488-Grün Esel Anti-Ziege (1:200) für 2h bei RT

Tabelle 8: Verwendete Antikörper der kombinierten Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz-Färbung auf Calretinin, MHCf und MyH7B. Hier unter Verwendung von Kaninchen Anti-Calretinin sowie MHCf für Fast-Myosin.

Ich nutzte auch hier verschiedene AK zur Darstellung der Fast-Myosin-exprimierenden MF (Tab. 9).

Antigen	Präinkubation (1h bei RT)	Primärer Antikörper (48h bei 4°C)	Sekundärer Antikörper
<b>Calretinin</b> (SWant)	5% Normal Esel Serum	Maus Anti-CR (1:2500)	Biotinylierter sek. AK Pferd Anti-Maus (1:200) für 1h bei RT
<b>FMyHC</b> (Abcam)	5% Normal Esel Serum	Kaninchen Anti-FMyHC (1:250)	Cy3-Rot Esel Anti-Kaninchen (1:200) für 2h bei RT
<b>MyH7B</b> (Santa Cruz)	5% Normal Esel Serum	Ziege Anti-MyH7B (1:500)	DyLight-405-Blau Esel Anti-Ziege (1:200) für 2h bei RT

Tabelle 9: Verwendeten Antikörper der kombinierten Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz-Färbung auf Calretinin, FMyHC und MyH7B. Hier unter Verwendung von Maus Anti-Calretinin sowie FMyHC für Fast-Myosin.

## 4.7 Auswertung der gefärbten Schnitte

Für die Auswertung der Hellfeld- und Fluoreszenzpräparate arbeitete ich mit zwei Mikroskopen, einem Zeiss Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Deutschland) und einem DMRB Leica Mikroskop (Bensheim, Deutschland). Die genutzten Filter sind in Tab. 10 aufgelistet. Die in dieser Arbeit abgelichteten Bilder wurden jeweils mit einer Digitalkamera aufgenommen (am Zeiss Mikroskop Microfire, Optronics; am Leica Mikroskop Pixera Pro 600 ES, Klughammer, Markt Indersdorf, Deutschland). Eine digitale Weiterbearbeitung der Bilder erfolgte in Photoshop 11.0 (Adobe, Mountain View, CA), um die Qualität des Bildes dem Anblick durch das Mikroskop mit dem bloßen Auge anzupassen.

<b>MIKROSKOP</b>	<b>CY3-ROT</b> ANREGUNG BEI 550NM	<b>ALEXA-GRÜN</b> ANREGUNG BEI 488NM	<b>DYLIGHT-BLAU</b> ANREGUNG BEI 405NM
Leica	N2.1 Filter BP 515-560nm	I3, Filter BP 450-490nm	A, Filter BP 340-380nm
Zeiss	15, Filter BP 546-590nm	44, Filter BP 475-530nm	68, Filter BP 377-464nm

Tabelle 10: Verwendete Mikroskope mit Angabe der Fluoreszenzfilter.

## 5 Ergebnisse

Von insgesamt 80 Fällen, die mir zur Verfügung standen, konnten 28 Fälle ausgewertet werden. Dies entspricht einem Anteil von 35%. Den größten Anteil der nicht auswertbaren Präparate stellten hierbei OP-Resektate der Strabismus-Patienten dar, bei denen kein MSÜ detektierbar war. Bei den Körperspendern konnten insgesamt etwas mehr als 50% der Fälle ausgewertet werden. Als Ursache der Ausfälle lassen sich zu starke oder zu schwache Anfärbungen, beziehungsweise ausgeprägt vorhandene Alterspigmente anführen. Fehler in der Durchführung der Färbeschritte erscheinen unwahrscheinlich, da die einzelnen Färbungen jeweils sowohl gut angefärbte und analysierbare wie auch nicht auswertbare Schnitte hervorbrachten. Zudem lagen innerhalb der einzelnen Präparate unterschiedliche Färbequalitäten im Bereich des Muskelbauches und des MSÜ vor. Ein weiterer Grund für den Verlust brauchbarer Schnitte lag beim Schneiden der Muskeln sowie bei der Ausdehnung der Muskelanteile. So standen mir innerhalb der verwendeten Fälle vereinzelt nur sehr kleine Anteile des MSÜ und somit auch nur sehr wenige Schnitte zur Auswertung zur Verfügung. Teils erlaubten Schneideartefakte keine sichere Identifikation und Assoziation von Strukturen.

### 5.1 Qualitative Erfassung der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis

Die Augenmuskelpräparate stammten von Körperspendern im Alter zwischen 60 und 92 Jahren. Von Diesen färbte ich insgesamt 11 Präparate, von denen 7 Fälle auswertbar waren (Abb. 14). In der Doppelimmunfluoreszenz konnten CR-positive PE neben CR-negativen PE identifiziert werden, die nur eine SNAP-25-Färbung zeigten (Abb. 12, 13). Die CR-positiven und CR-negativen PE wiesen keine Unterschiede bezüglich Größe, Aussehen und räumlicher Verteilung auf.

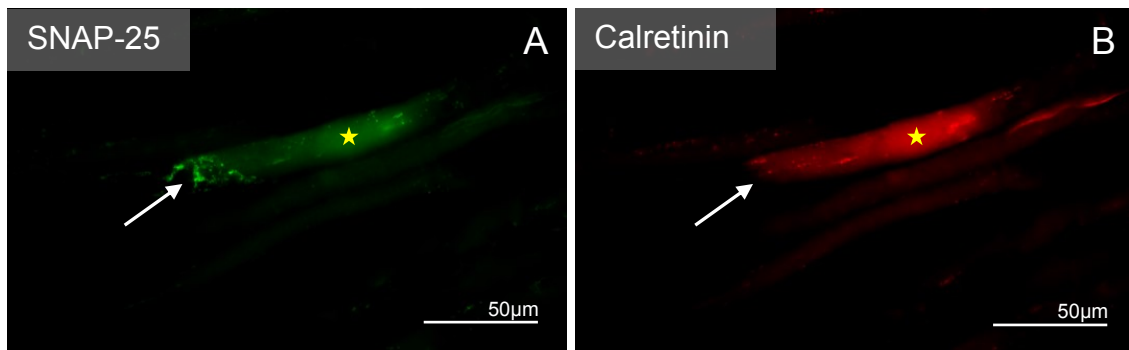


Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Färbung einer Calretinin-negativen Palisadenendigung eines Körperspender-Falles auf SNAP-25 (A) und Calretinin (B): A: Auf SNAP-25 gefärbtes Präparat zeigt eine Palisadenendigung (weißer Pfeil) am sehnigen Ende einer Muskelfaser (gelber Stern). Sie exprimiert kein Calretinin (B). Die roten Granula repräsentieren Lipofuszin.

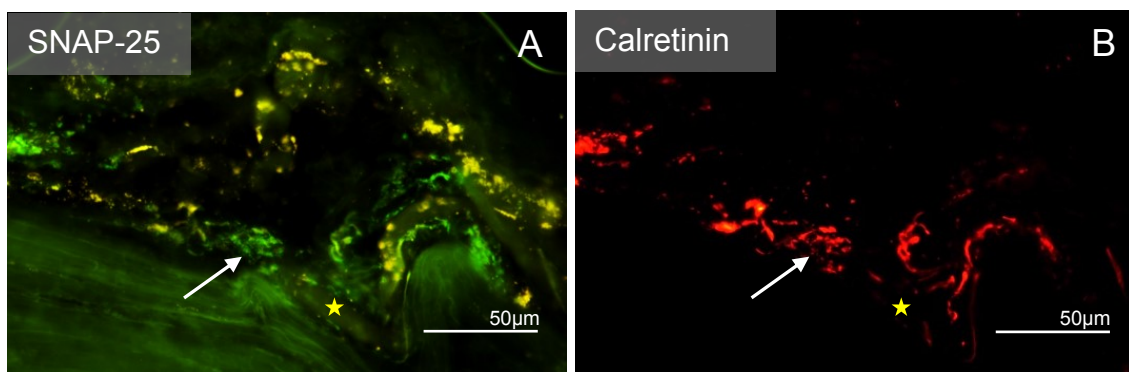


Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Färbung einer Calretinin-positiven Palisadenendigung auf SNAP-25 (A) und Calretinin (B) im M. rectus medialis eines Körperspender-Falles: Die mit SNAP-25 identifizierte Palisadenendigung (A, grün) ist CR-positiv (B, weißer Pfeil) und sitzt an dem Ende einer erkennbaren Muskelfaser (A, gelber Stern). Zudem ist in (A) gelb Lipofuszin zu erkennen.

### 5.1.1 Anteil der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis bei Körperspendern

In den 7 auswertbaren Fällen konnten insgesamt 158 PE ausgezählt werden. Die Subgruppe der CR-positiven PE stellte mit 115 PE einen prozentualen Anteil von 73% dar. Demgegenüber standen 27% (43) CR-negative PE (Tab. 11, Abb. 14).

PE Gesamt absolut	CR+ PE in %	CR+ PE absolut	CR- PE in %	CR- PE absolut	Alter in Jahren	Fälle absolut	Schnitte absolut
158	73	115	27	43	60 - 92	7	37

Tabelle 11: Darstellung der Anteile Calretinin-positiver Palisadenendigungen im M. rectus medialis bei Körperspendern.

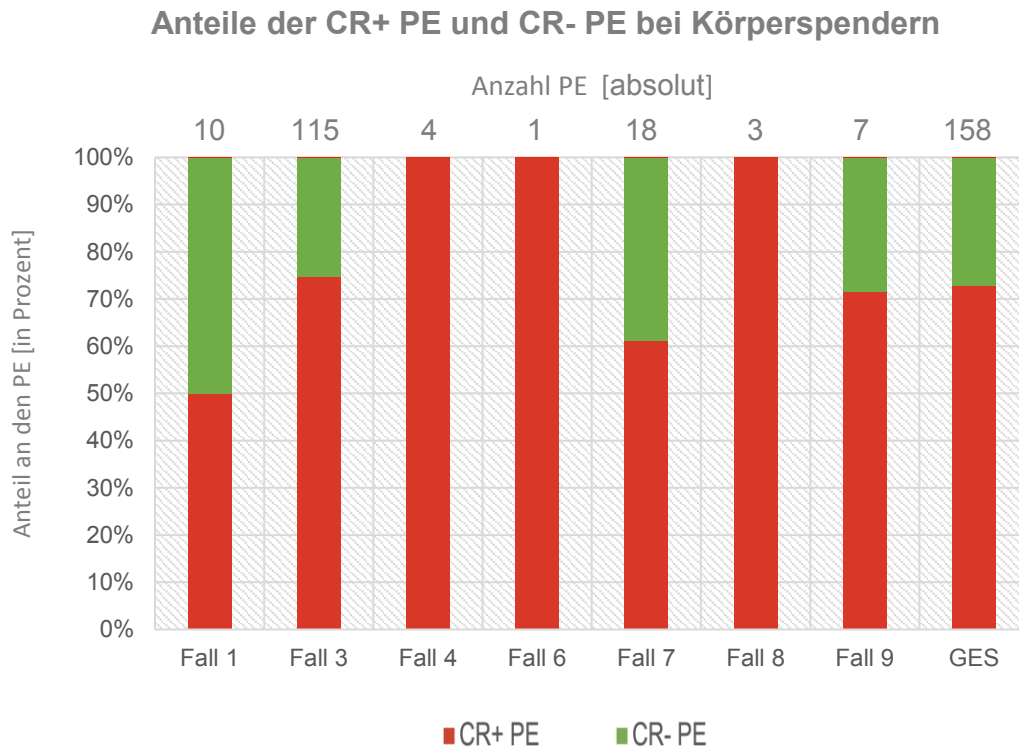


Abbildung 14: Darstellung der prozentualen Anteile der Calretinin-positiven (CR+) und Calretinin-negativen (CR-) Palisadenendigungen im M. rectus medialis bei Körperspendern.

In der Mehrzahl der Fälle lag die Anzahl der ausgewerteten PE im Durchschnitt bei 7 pro Fall. Ein Einzelfall stach mit einer Gesamtzahl von 150 PE aus dem gewonnenen Datensatz heraus. Die zur Auswertung zur Verfügung stehende sehr große Anzahl an Schnitten allein erklärt diese enorme Häufung der PE in diesem Fall nicht ausreichend. Morphologisch konnten keine Auffälligkeiten beobachtet werden. Da meine Ergebnisse durch den Fall 3 nicht in ihrer Aussage verändert wurden, entschied ich mich dazu, diesen Fall in der Auswertung meiner Untersuchungen zu berücksichtigen (Abb. 15). Das Vorliegen einer deutlich erhöhten absoluten Anzahl an PE im Fall 3 im Vergleich zu allen anderen Fällen kann vorerst nicht erklärt werden. In dieser Fragestellung könnte eine weitere Aufarbeitung dieses Falles Thema einer zukünftigen Untersuchung sein.

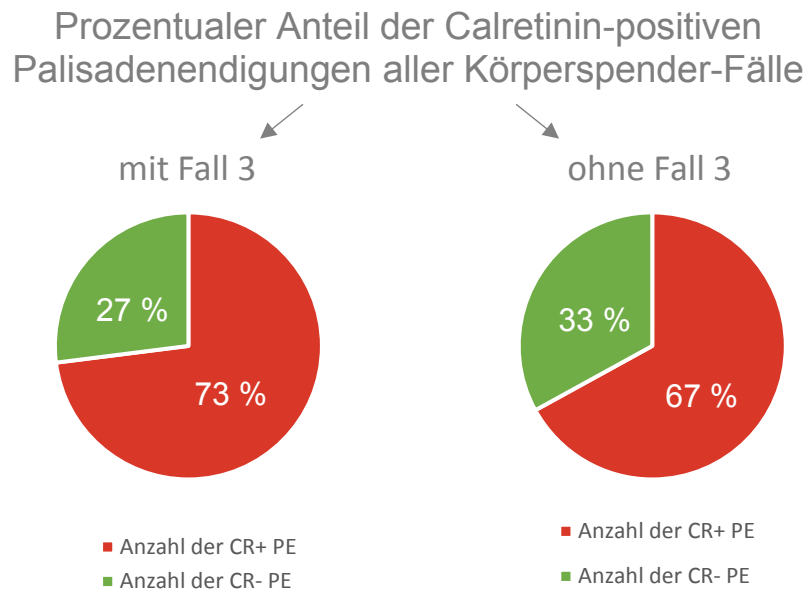


Abbildung 15: Darstellung der prozentualen Anteile der Subgruppe der Calretinin-positiven Palisadenendigungen an der Gesamtheit der Palisadenendigungen mit und ohne den Sonderfall 3.

### 5.1.2 Prozentualer Anteil der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis bei Strabismus-Patienten

Von den insgesamt zur Verfügung stehenden 43 Strabismus-Präparaten aus der Augenklinik konnten 10 Fälle ausgewertet werden. Das Patientenalter lag zwischen 8 und 62 Jahren.

Diese Auswertung erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie bei den Präparaten der Körperspender, die mir als Kontroll-Gruppe dienten. Die Befundung der Strabismus-Fälle geschah zeitgleich zur Auswertung der Körperspender-Präparate. Bezüglich der Anordnung und des mikroskopischen Aussehens der PE fielen keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf. Auch bei den Resektaten aus der Augenklinik fanden sich sowohl CR-negative als auch CR-positive PE (Abb. 16,17).

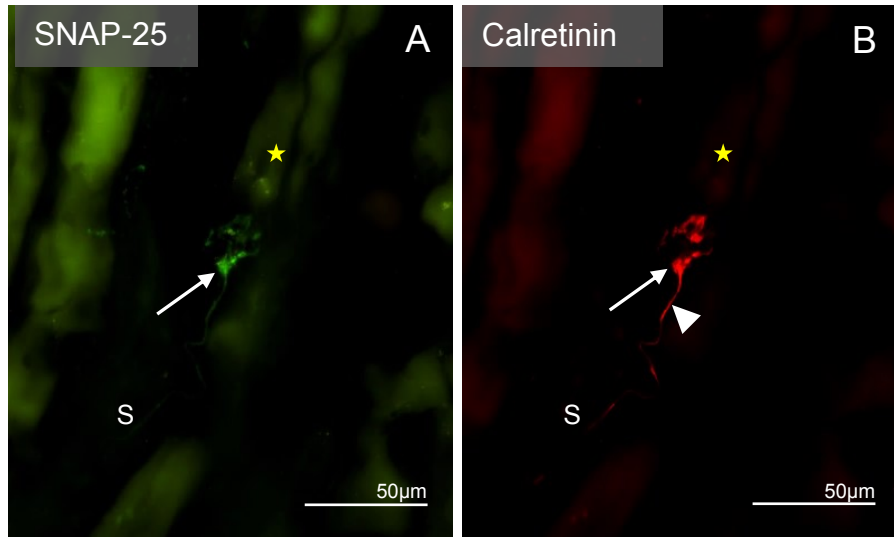


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung eines Strabismus-Falles auf SNAP-25 (A, grün) und Calretinin (B, rot): Der Bildausschnitt liegt im Muskelsehnenübergang. Zu erkennen ist eine Calretinin-positive Palisadenendigung (weißer Pfeil), deren Axon (weißes Dreieck) von der Sehne (S) kommend verläuft (gelber Stern = mit der Palisadenendigung assoziierte Muskelfaser).

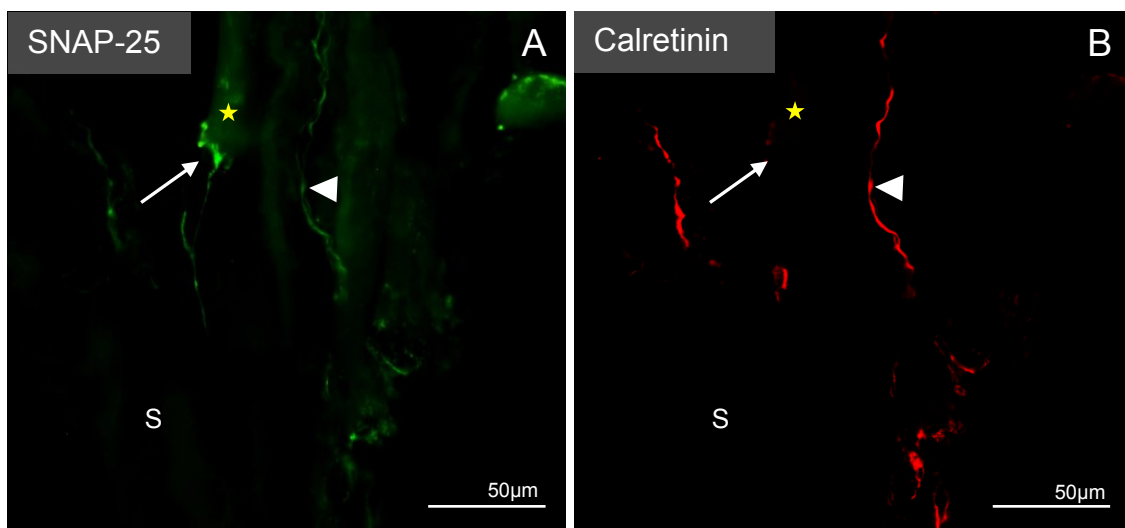


Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Färbung auf SNAP-25 (A) und Calretinin (B) einer Calretinin-negativen Palisadenendigung eines Strabismus-Falles: Im Muskelsehnenübergang des hier aufgeführten M. rectus medialis schmiegt sich eine Calretinin-negative PE (weißer Pfeil) an eine sichtbare Muskelfaser (A, gelber Stern). CR-positive Nervenfasern (weißes Dreieck) dienen dem Nachweis der erfolgreichen Calretinin-Färbung (B). Sehnhige Anteile erscheinen schwarz (S).



In den auswertbaren Strabismus-Fällen wurden insgesamt 486 PE gefunden, innerhalb derer ein Anteil von 62% CR-Immunreaktivität aufzeigte (Tab. 12, Abb. 18).

PE Gesamt absolut	CR+ PE in %	CR+ PE absolut	CR- PE in %	CR- PE absolut	Alter in Jahren	Fälle absolut	Schnitte absolut
486	62	299	38	185	8 - 62	10	32

Tabelle 12: Anführen der absoluten Zahlen und prozentualen Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen (CR+ PE) im M. rectus medialis der Strabismus-Fälle.

### Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im M. rectus medialis bei Strabismus-Patienten

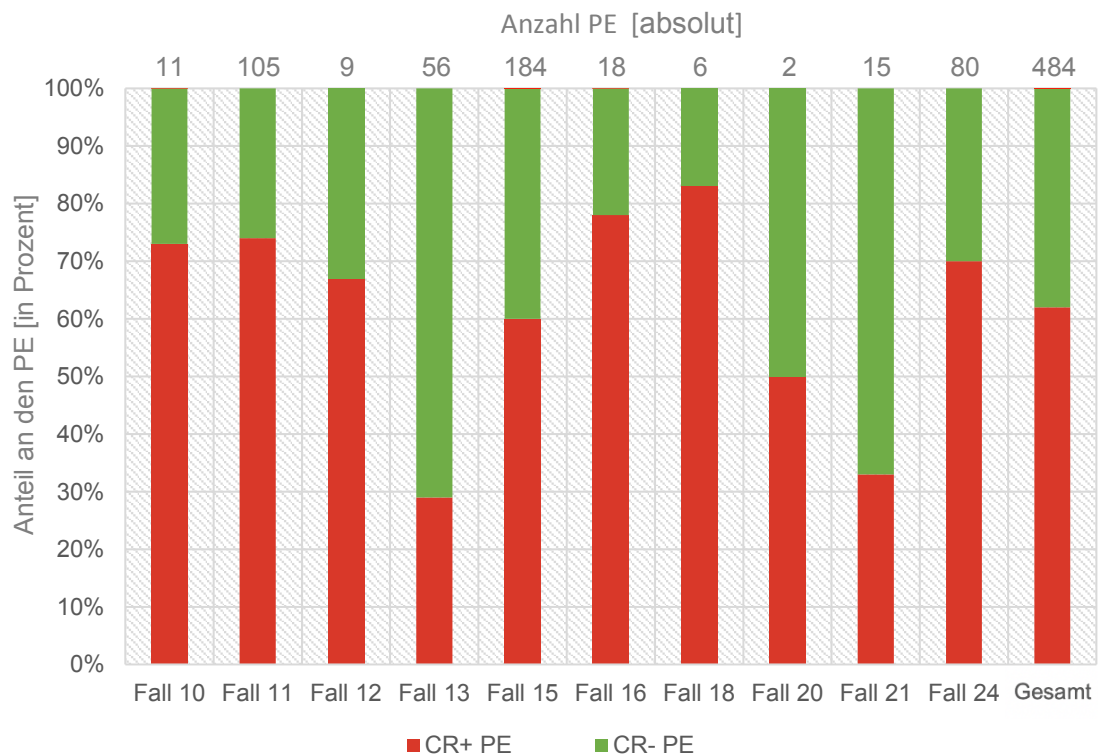


Abbildung 18: Strabismus-Fälle mit den entsprechenden absoluten Anzahlen der Palisadenendigungen und jeweiligen prozentualen Anteilen der CR-positiven (CR+) und CR-negativen (CR-) Palisadenendigungen.

### 5.1.3 Vergleich der prozentualen Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im Musculus rectus medialis bei Körperspender und Strabismus-Patienten

Ich verglich die Daten von 7 Körperspender-Fällen mit 9 Resektaten von Strabismus-Patienten. Dabei betrug das Alter der Körperspender 60 – 92 Jahre. Es lag somit über der Altersspanne der Strabismus-Patienten, die sich von 8 – 62 Jahren erstreckte. Morphologisch stellten sich die PE in den begutachteten Präparaten unabhängig vom Alter in den Körperspender- und Strabismus-Fällen gleich dar (Tab. 13).

Kategorie	PE Ges absolut	CR+ PE in %	CR+ PE absolut	CR- PE in %	CR- PE absolut	Alter in Jahren	Fälle absolut	Schnitte absolut
Körperspender	158	73	115	27	43	60 - 92	7	37
Strabismus-P.	484	62	299	38	185	8 – 62	10	32

Tabelle 13: Tabellarische Gegenüberstellung der wichtigsten Eckdaten gezählter Palisadenendigungen in Körperspender- und Strabismus-Fällen im M. rectus medialis. Aufgeführt sind die jeweiligen Daten Calretinin-positiver sowie -negativer Palisadenendigungen.

In der direkten Gegenüberstellung der gesammelten Daten der Körperspender- und Strabismus-Fälle zeigte sich ein um 10% geringerer Anteil der CR-positiven PE in den Strabismus-Fällen (Abb. 19).

Auffallend ist zudem die deutlich höhere Anzahl absolut gezählter PE in den Strabismus-Fällen. Trotz der geringen Anzahl untersuchter Schnitte belief sich die Anzahl der durchschnittlich gezählten PE, bezogen auf den einzelnen Schnitt, in den Strabismus-Fällen auf nahezu den vierfachen Wert in Relation zu den Körperspender-Resektaten (Abb. 20) (siehe auch Kapitel 5.3).

## Vergleich der Calretinin-positiven Palisadenendigungen im M. rectus medialis bei Körperspendern und Strabismus-Pat.

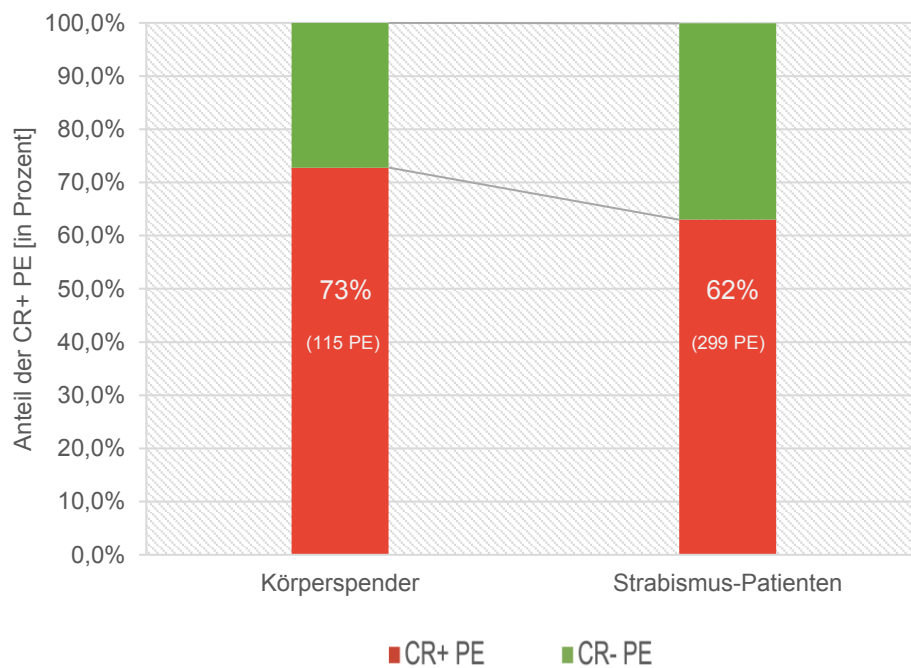


Abbildung 19: Vergleich der prozentualen Anteile Calretinin-positiver (CR+PE) und Calretinin-negativer Palisadenendigungen (CR-PE) zwischen Körperspender- und Strabismus-Fällen im M. rectus medialis. Im Vergleich ließ sich mit ca. 10% weniger Calretinin-positiver Palisadenendigungen in den Strabismus-Fällen ein Trend beobachten. In den Strabismus-Fällen konnte zudem mit 299 Palisadenendigungen eine deutlich höhere Anzahl an Palisadenendigungen gezählt werden.

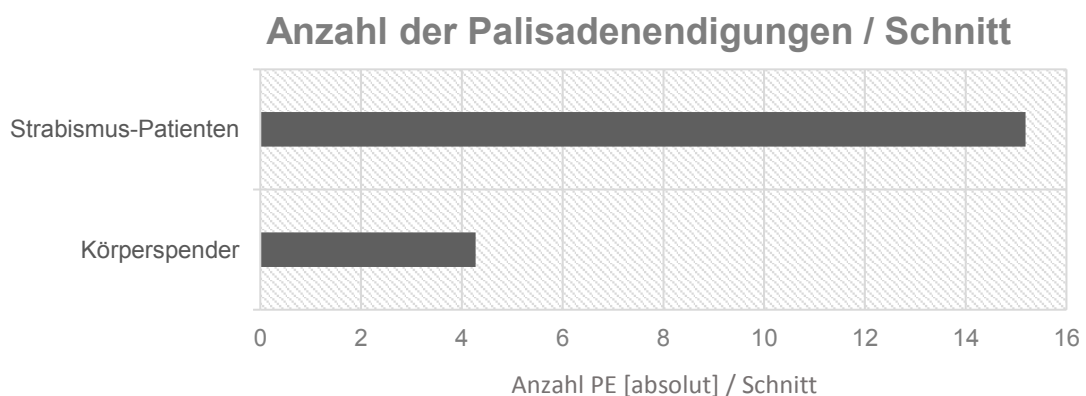


Abbildung 20: Vergleich der absoluten Anzahl der Palisadenendigungen (PE) pro ausgewertetem Muskelschnitt zwischen Körperspender- und Strabismus-Fällen. Die hier gezeigten Daten stammen ausschließlich aus den Färbungen des Vergleichs der prozentualen Anteile der CR-positiven Palisadenendigungen im M. rectus medialis bei Körperspender und Strabismus-Patienten.

## 5.2 Qualitative Untersuchung der Assoziation der Calretinin-positiven Palisadenendigungen mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern im Musculus rectus medialis

### 5.2.1 Kombinierte Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz-Färbung

Mittels einer kombinierten Immunperoxidase und Immunfluoreszenzfärbung ließen sich die PE sehr gut und sicher identifizieren. Es war dabei durch die entsprechende Einstellung des Kondensators am Leica-Mikroskop möglich, die CR-exprimierenden neuronalen Strukturen in der DAB-Hellfeld-Färbung gleichzeitig mit den Myosin-Färbungen in der Fluoreszenzfärbung am Mikroskop zu betrachten (Abb. 21). Somit konnte den einzelnen PE noch leichter und genauer eine bestimmte MF zugeordnet werden.

Eine Auswertung im Hellfeld-Mikroskop sollte aufgrund der Gefahr des Ausbleichens der Fluoreszenz-AK zeitlich begrenzt erfolgen. In meiner Auswertung der Fälle stellte dies kein Problem dar.

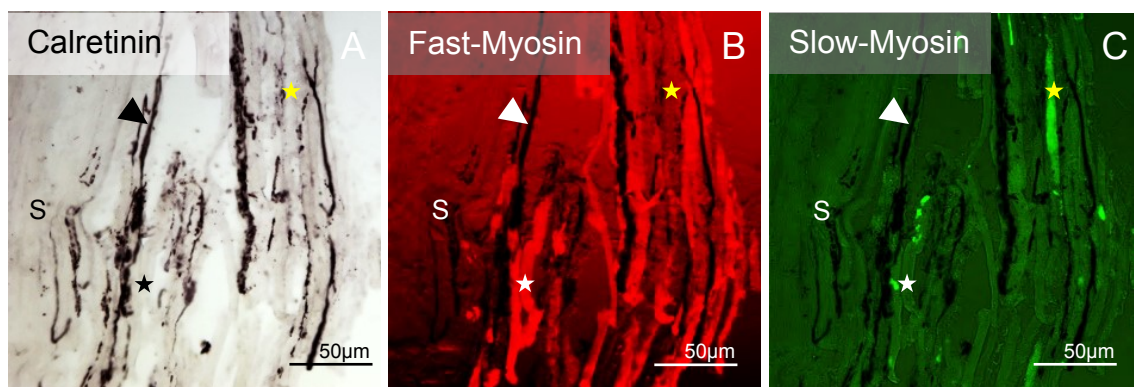


Abbildung 21: Gleichzeitige Betrachtung von Hellfeld- und Fluoreszenz-Färbungen durch das Mikroskop: Mittels der kombinierten DAB-Fluoreszenz-Färbung können Calretinin-positive Nervenfaser (weißer Pfeil) im Hellfeldmikroskop (A) gleichzeitig mit den Fast-Myosin-exprimierenden- (B, weißer Stern) und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (C, gelber Stern) mit den Fluoreszenzfiltern im Mikroskop betrachtet werden. Davon können sehnige Anteile abgegrenzt werden (S).

Neben den CR-positiven PE im MSÜ wurden mit der kombinierten Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz-Färbung weitere CR-positive Strukturen im Muskelkörper dargestellt (siehe Kapitel 5.2.5).

## 5.2.2 Anteil Calretinin-positiver Palisadenendigungen assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Körperspendern

Es wurden insgesamt 14 Körperspender-Fälle untersucht. Die Präparate stammten von Körperspendern im Alter von 63 bis 91 Jahren. Von diesen waren sechs Fälle auswertbar. Hierbei fand ich in 57 Schnitten insgesamt 90 CR-positive PE. Diese konnten gut an ihrer typischen Struktur erkannt werden und lagen sowohl an Fast- als auch an Slow-Myosin-exprimierenden MF (Abb. 22).

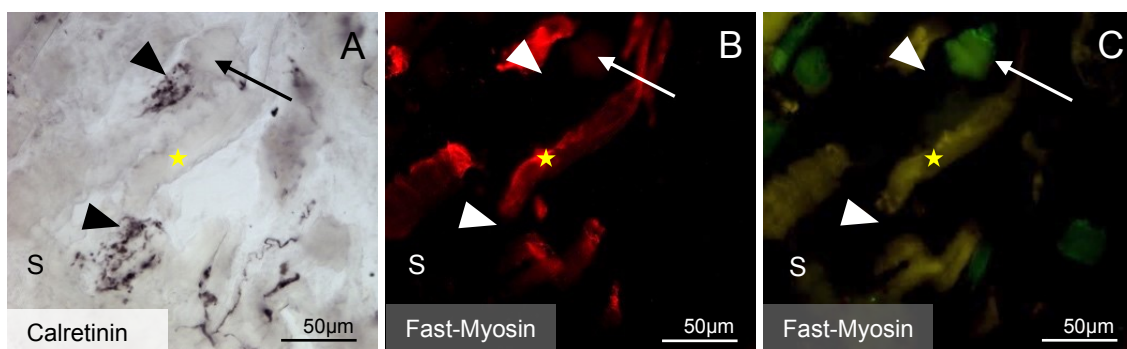


Abbildung 22: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung eines Körperspender-Falles auf Calretinin (A, schwarz), Fast-Myosin (B, rot) und Slow-Myosin (C, grün) von Calretinin-positiven Palisadenendigungen, assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin: Zwei Palisadenendigungen (PE) (weiße Dreiecke) sind in der Calretinin-Färbung zu erkennen. Die untere PE liegt einer in B rot angefärbten Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfaser an (gelber Stern). Die obere PE ist assoziiert mit einer in C sichtbaren Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfaser (weißer Pfeil).

Die durchgeführten Färbungen mit Fast-Myosin zeigten sich oft inkonstant und am MSÜ nicht immer sicher auswertbar. Die Färbung auf Slow-Myosin zeigte dagegen konsistente Ergebnisse. Aufgrund dieser Beobachtungen entschied ich mich dafür, die PE im weiteren Verlauf anhand der zwei Gruppen „Fast- /Non-Slow-Myosin“ - im Folgenden „Fast-Myosin“ genannt - und „Slow-Myosin“ zu differenzieren. Zur Gruppe „Fast-Myosin“ zählte ich die CR-positiven PE, die an einer Fast-Myosin-exprimierenden MF lagen und auch diejenigen CR-positiven PE, die sich bei einer Färbung auf Slow-Myosin-exprimierenden MF nicht anfärbten. Die Gruppe „Slow-Myosin“ bildete folglich den Anteil derer CR-positiver PE, die mit Slow-Myosin-exprimierenden MF assoziiert waren.

Färbungen zur Klärung der Myosin-Spezifität und -Anfärbung in unserem Labor zeigten, dass mit unseren verwendeten AK jeder einzelnen MF entweder ein

Fast- oder ein Slow-Myosin zugeordnet werden konnte. Die durchgeführten Färbungen auf Fast-Myosin MyHf im Muskelbauch der extraokulären Muskulatur zeigten erwartungsgemäß en-grappe-Endigungen der MIF an Fast-Myosin-negativen Slow-MF und en-plaque-Endigungen der SIF an Fast-Myosin-exprimierenden MF (Abb. 23) (siehe auch Abb. 32).

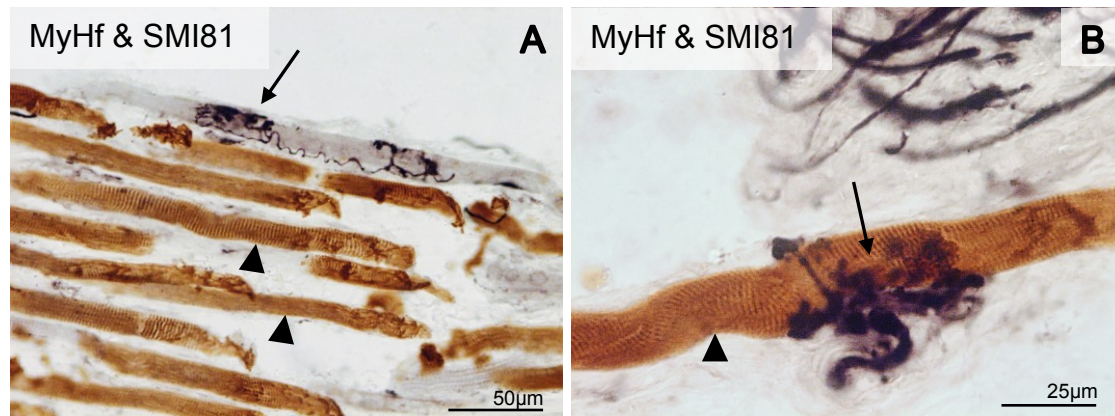


Abbildung 23: En-grappe-Endigung auf einer Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfaser und en-plaque-Endigung auf einer Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfaser: Die Färbung eines M. rectus lateralis im Bereich des Muskelbauches auf Fast-Myosin und SMI-81 zeigt in (A) eine MyHf-negative Muskelfaser (Dreieck) mit multipeln en-grappe-Endigungen (Pfeil). (B) zeigt im Bereich des Muskelbauches desselben Muskels eine MyHf-positive Muskelfaser (Dreieck) mit einer en-plaque-Endigung (Pfeil).

In den durchgeführten Doppelfärbungen auf Fast- und Slow-Myosin waren die CR-positiven PE entweder den Slow- und Fast-Myosin-exprimierenden MF oder ungefärbten MF zugeordnet. Eine Doppelfärbung der MF lag nicht vor (Abb. 24).

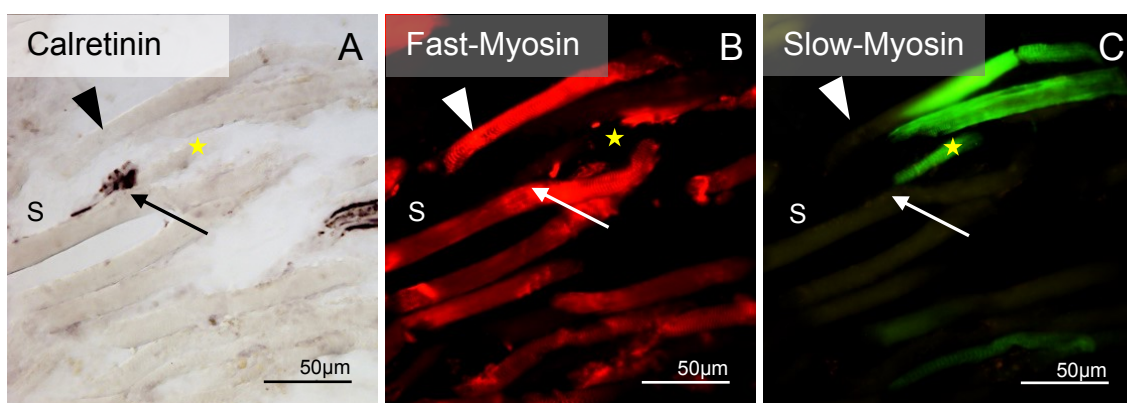


Abbildung 24: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung eines Körperspender-Falles auf Calretinin (A, schwarz), Fast-Myosin (B, rot) und Slow-Myosin (C, grün) zeigt eine mit Slow-Myosin assoziierte Palisadenendigung: Eine Calretinin-exprimierende PE (weißes Dreieck) eines M. rectus medialis ist mit einer Slow-Muskelfaser (gelber Stern) assoziiert, die in (B) entsprechend negativ und in (C) positiv ist. Beispielfhaft ist in (B) eine Fast-Myosin-exprimierende Muskelfaser hervorgehoben (weißer Pfeil), die in (C) entsprechend Slow-Myosin-negativ ist.

Der Anteil der CR-positiven PE in der Gruppe „Fast-Myosin“ belief sich auf 92%. Die Gruppe „Slow-Myosin“ beinhaltete 8% aller CR-positiven PE (Tab. 14).

PE Gesamt	Fast-MF	Fast-MF	Slow-MF	Slow-MF	Alter	Fälle	Schnitte
absolut	in %	absolut	in %	absolut	in Jahren	absolut	absolut
90	92	83	8	7	63 - 91	6	57

Tabelle 14: Darstellung der Assoziation Calretinin-positiver Palisadenendigungen zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern der Körperspender.

In drei der ausgewerteten Fälle mit einer relativ geringen absoluten Anzahl an CR-positiven PE konnte ich keine Assoziation von CR-positiven PE mit Slow-Myosin-exprimierenden MF nachweisen (Abb. 25).

### Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen an Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Körperspendern

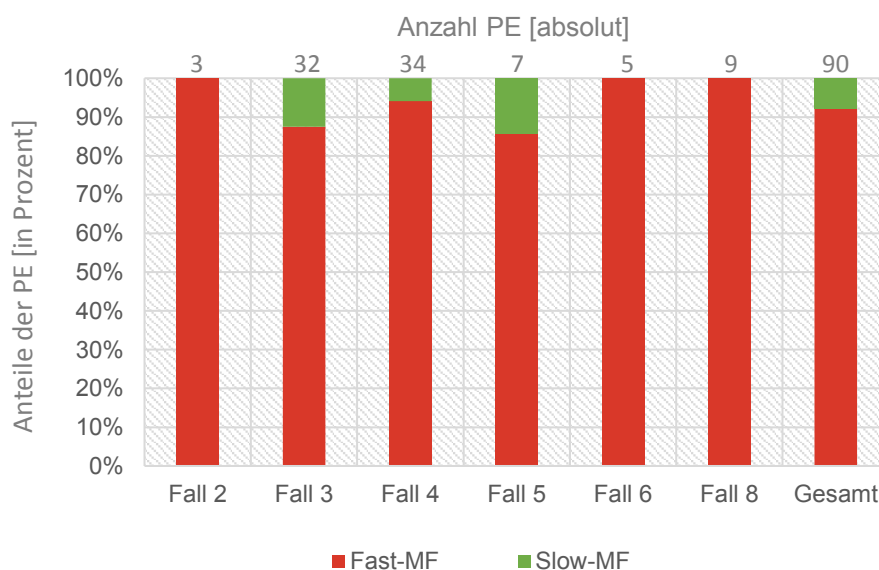


Abbildung 25: Prozentuale Darstellung der Calretinin-positiven Palisadenendigungen bezüglich der Assoziation zu Fast- bzw. Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern der einzelnen Fälle, sowie dem Durchschnitt aller ausgewerteten Palisadenendigungen (Gesamt).

Die Färbungen aus der ersten Fragestellung konnte ich hier nicht in die Auswertung einbringen. Mein Ziel, mit der Triple-Immunfluoreszenzfärbung auch eine Aussage über eine Assoziation der CR-positiven PE zu Slow-MF treffen zu können, war aufgrund der schlechten Auswertbarkeit dieser MF-Färbung nicht möglich.

Es fiel auf, dass PE teils lokal gehäuft vorkamen (Abb. 26). Diese Tatsache wurde bereits 1984 von *Richmond* erwähnt und bleibt bis heute ungeklärt (Richmond et al. 1984).

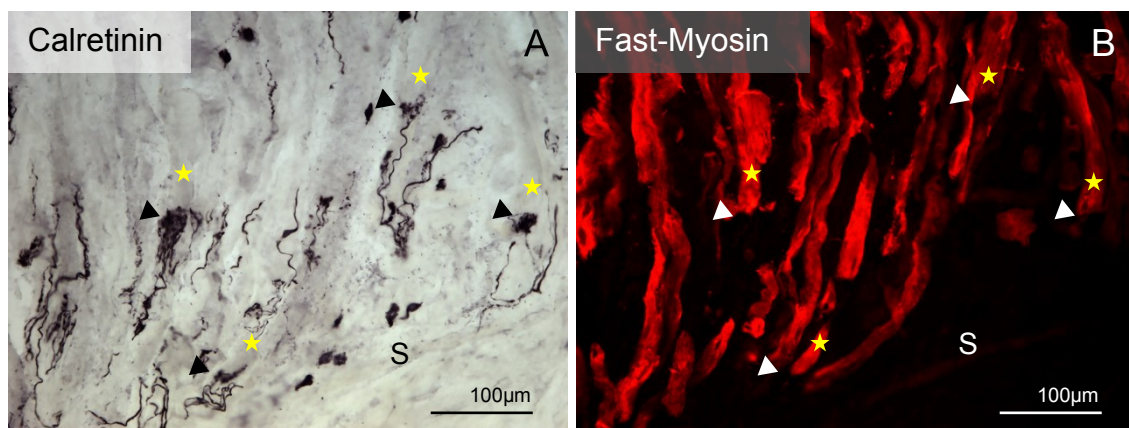


Abbildung 26: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung eines Körperspender-Falles auf Calretinin (A, schwarz) und Fast-Myosin (B, rot): Es zeigt sich deutlich eine räumlich begrenzte Häufung von Calretinin-positiven Palisadenendigungen (weiße Dreiecke, A), die sich alle jeweils mit einer Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfaser (gelber Stern, B) assoziieren lassen.

### 5.2.3 Calretinin-positive Palisadenendigungen assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Strabismus-Patienten

Von insgesamt zwölf Strabismus-Fällen konnten in fünf Fällen zwölf Schnitte ausgewertet werden. In den Strabismus-Fällen lag das Alter der Patienten im Mittel bei knapp 39 Jahren, wobei eine Spannweite von 36 Jahren vorlag. Hier fand ich insgesamt 125 PE. In der verwendeten kombinierten DAB-Fluoreszenzfärbung fand ich CR-exprimierenden PE sowohl mit Fast-Myosin-exprimierenden MF (Abb. 27) als auch mit Slow-Myosin-exprimierenden MF (Abb. 28) assoziiert.



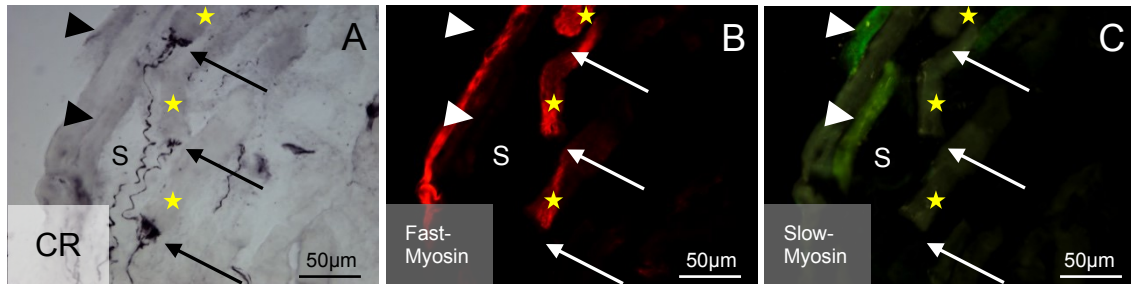


Abbildung 27: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung auf Calretinin (A, schwarz), Fast-Myosin (B, rot) und Slow-Myosin (C, grün) dreier an Fast-Myosin liegenden Calretinin-positiven Palisadenendigungen in einem Strabismus-Fall: Drei nahe beieinanderliegende Palisadenendigungen (weiße Pfeile) finden sich jeweils am Ende einer mit mMHCf markierten Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (gelber Stern). In (C) leuchten zwei mit gtMyH7B markierte Slow-Myosin-exprimierende Muskelfasern stark grün (weißes Dreieck), wohingegen die entsprechenden Muskelfasern aus (B) nur aufgrund der Hintergrundfärbung sichtbar sind.

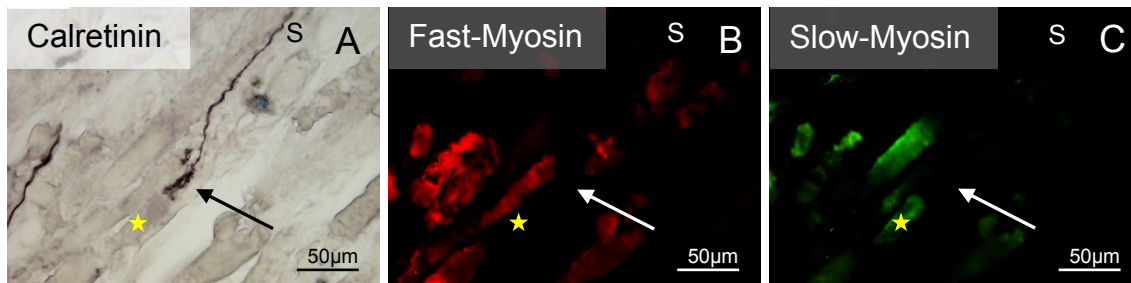


Abbildung 28: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung auf Calretinin (A, schwarz), Fast-Myosin (B, rot) und Slow-Myosin (C, grün) einer Slow-Myosin-assoziierten Calretinin-positiven Palisadenendigung eines Strabismus-Falles: Zur Darstellung kommt eine in (A) sichtbare Calretinin-positive PE in der Nähe des Muskelsehnenübergangs. Diese ist assoziiert mit einer Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfaser (C, gelber Stern) in einem Strabismus-Fall.

Der Anteil der Fast-Myosin-assoziierten CR-positiven PE entsprach dabei 91%. Der PE-Anteil, der mit Slow-Myosin-exprimierenden MF assoziiert war, belief sich somit auf 9% (Tab. 15, Abb. 28).

PE Gesamt absolut	Fast-MF in %	Fast-MF absolut	Slow-MF in %	Slow-MF absolut	Alter in Jahren	Fälle absolut	Schnitte absolut
125	91	114	9	11	21 - 57	5	12

Tabelle 15: Darstellung der Assoziation Calretinin-positiver Palisadenendigungen zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Strabismus-Patienten.

### Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen an Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Strabismus-Patienten

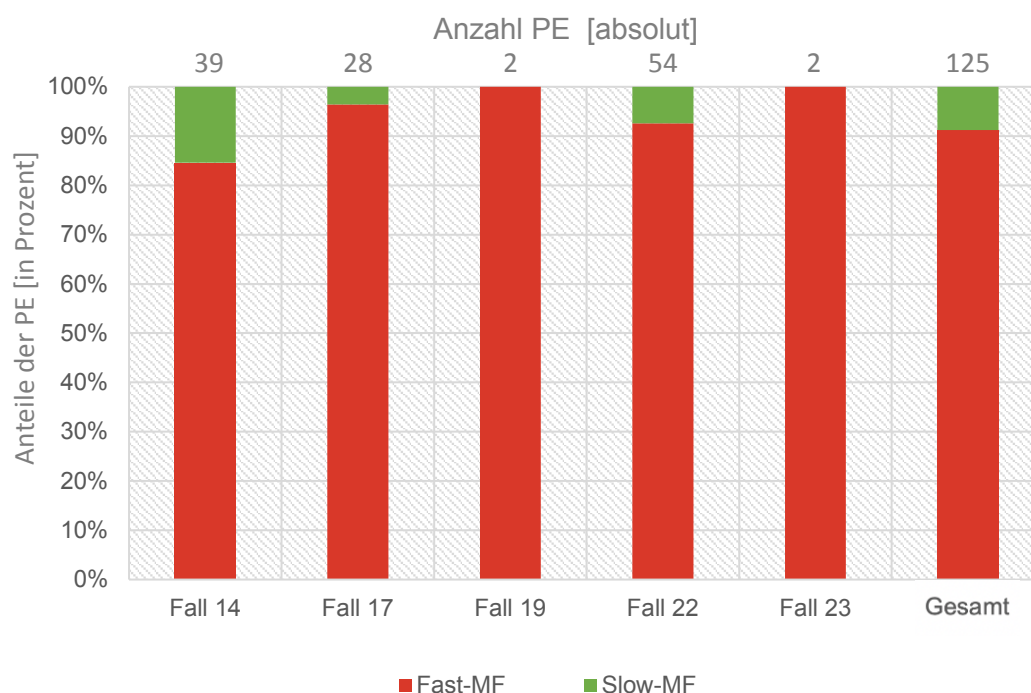


Abbildung 29: Darstellung der prozentualen Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen (PE) an Fast-Myosin-exprimierenden (Fast-MF) und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (Slow-MF) bei Strabismus-Patienten, aufgezeigt für die einzelnen Fälle und im Durchschnitt (Gesamt), jeweils mit Angabe der absoluten Anzahl der Palisadenendigungen.

#### 5.2.4 Vergleich der Anteile von Calretinin-positiven Palisadenendigungen assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Körperspendern und Strabismus-Patienten

Im Vergleich der Anteile der Fast-Myosin assoziierten CR-positiven PE zwischen Körperspender- und Strabismus-Fällen zeigten sich die Anteile an Fast-Myosin assoziierten CR-positiven PE mit 91% und 92% nahezu identisch (Tab. 16). Anhand der vorliegenden Daten konnte diesbezüglich keine Veränderung in den extraokulären Muskeln von Strabismus-Patienten beobachtet werden. Dazu zeigt Abb. 30 ein vergleichendes Balkendiagramm.

Kategorie	PE Gesamt absolut	Fast-MF in %	Fast-MF absolut	Slow-MF in %	Alter in Jahren	Fälle absolut	Schnitte absolut
Körperspender	90	92 %	83	8 %	63 - 91	6	57
Strabismus-P.	125	91 %	114	9 %	21 - 57	5	12

Tabelle 16: Übersicht über die Durchschnittswerte von Körperspender- und Strabismus-Fällen, insbesondere bzgl. des Vergleiches der Anteile der Assoziation Calretinin-positiver Palisadenendigungen zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern.

### Vergleich der Assoziation der Calretinin-positiven Palisadenendigungen zu Fast- und Slow-Muskelfasern im M. rectus medialis bei Körperspender- und Strabismus-Fällen

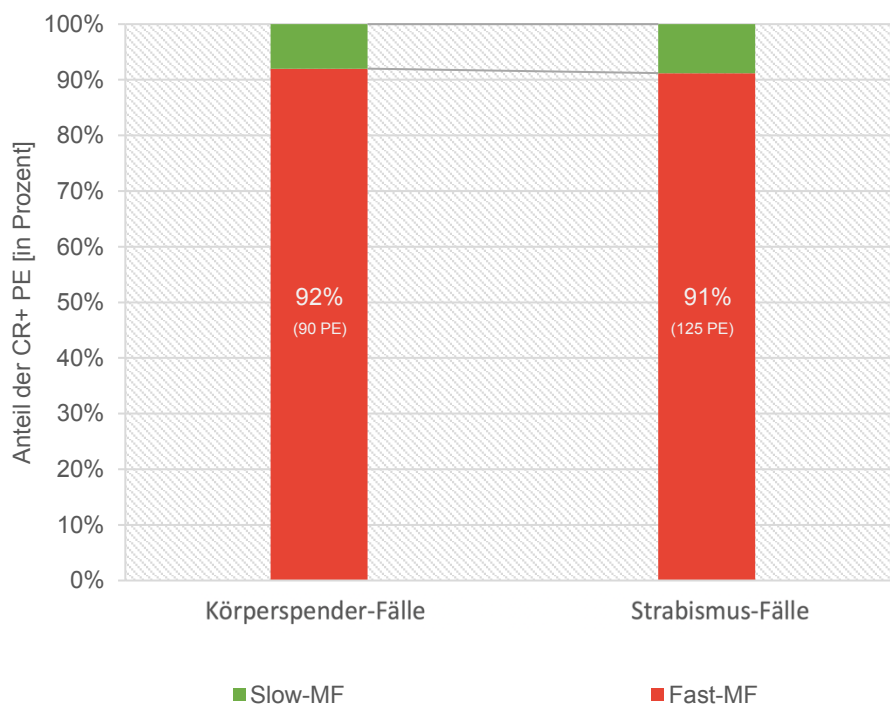


Abbildung 30: Vergleich der prozentualen Anteile der mit Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (Fast-MF) und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (Slow-MF) assoziierten Calretinin-positiven (CR+) Palisadenendigungen (PE) im M. rectus medialis bei Körperspender- und Strabismus-Fällen. In Klammern angegeben ist die absolute Anzahl der Fast-Myosin-assoziierten Calretinin-positiven Palisadenendigungen.

Auch in der Betrachtung der Assoziation der CR-positiven PE zu Fast- bzw. Slow-Myosin-exprimierenden MF fiel eine deutliche höhere Anzahl der CR-positiver PE auf. Von insgesamt 90 CR-positiven PE bei den Körperspender-Resektaten

wurden bei den Strabismus-Fällen durchschnittlich 125 CR-positive PE gefunden (Abb. 31).

### Vergleich der Anzahl der Calretinin-positiven Palisadenendigungen / Schnitt bei Körperspendern und Strabismus-Patienten

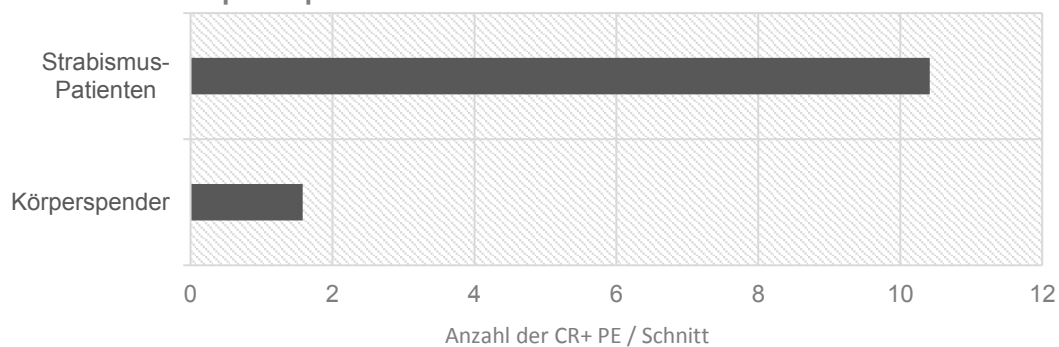


Abbildung 31: Vergleich der absoluten Anzahl der Calretinin-positiven Palisadenendigungen (CR + PE) pro Schnitt bei Körperspendern und Strabismus-Patienten.

### 5.2.5 Weitere Nervenendigungen

Mit der kombinierten DAB-Fluoreszenzfärbung auf CR wurden neben den CR-positiven PE auch en-grappe-Endigungen (Abb. 32) und MS (Abb. 33) sichtbar. En-plaque-Endigungen zeigten, wie bereits von *Lienbacher et al.* beschrieben, keine CR-Expression (Lienbacher et al. 2019).

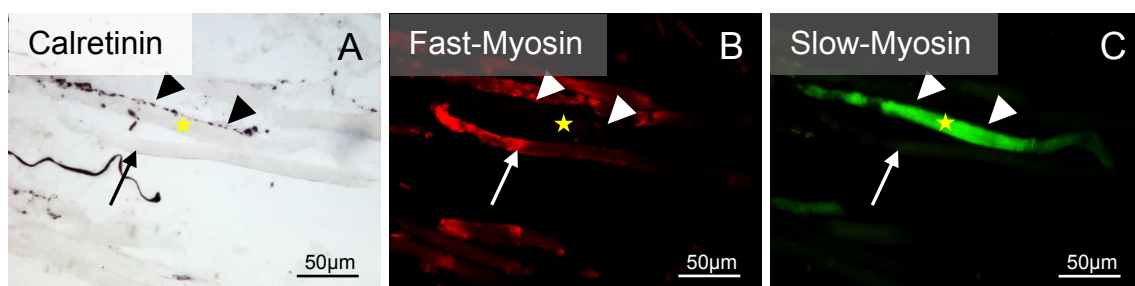


Abbildung 32: Calretinin-positiv En-grappe-Endigung an einer Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfaser: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung auf Calretinin (A, schwarz), Fast-Myosin (B, rot) und Slow-Myosin (C, grün) eines Körperspender-Falles: Eine typische en-grappe-Endigung (A, weiße Dreiecke) liegt am Rande einer Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfaser (C, gelber Stern), umgeben von verschiedenen Muskelfasern vom Fast-Typ (B, weißer Pfeil).

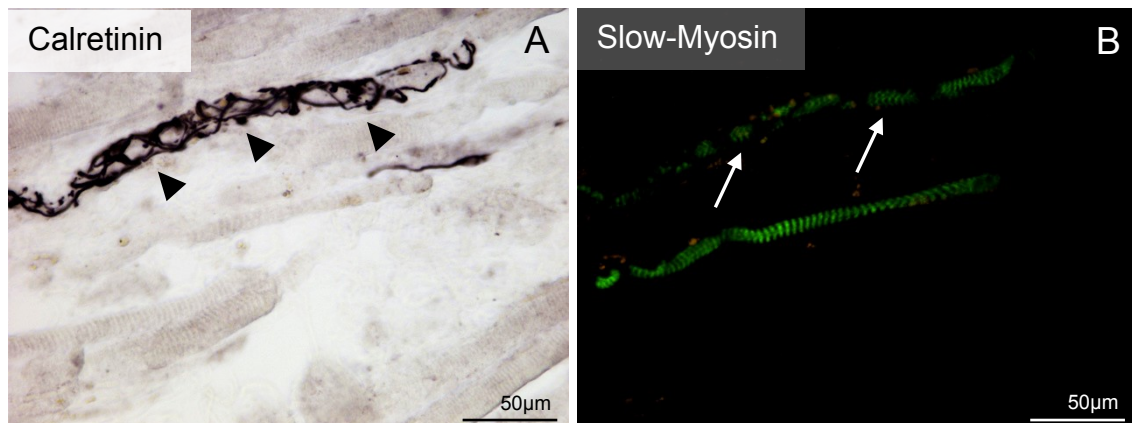


Abbildung 33: Calretinin-positive anulospiralige Nervenfasern einer Muskelspindel: Die Abbildung zeigt eine kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung auf Calretinin (A, schwarz) und Slow-Myosin (B, grün) eines Körperspender-Falles. Sichtbar ist eine intrafusale Faser einer Muskelspindel (weiße Pfeile, B), die anulospiralige Endigungen kontaktiert wird. Diese Endigungen sind Calretinin-positiv (weiße Dreiecke, A).

Auch Spiralendigungen, wie sie bereits im Jahre 1946 von *Daniel* beschrieben wurden, konnten mit der CR-Färbung sichtbar gemacht werden (Daniel 1946). Diese Nerven umwickeln einzelne MF mehrfach und bilden Endplatten mit klassischen motorischen Merkmalen aus (Ruskell 1984). Wie aus der Doktorarbeit von *Sänger* hervorgeht, existieren daneben aber auch CR-negative Spiralendigungen (Sänger 2018). CR-positive Spiralendigungen waren mit Slow-Myosin-exprimierenden MF assoziiert (Abb. 34). Hierauf lag jedoch nicht das Augenmerk dieser Arbeit.

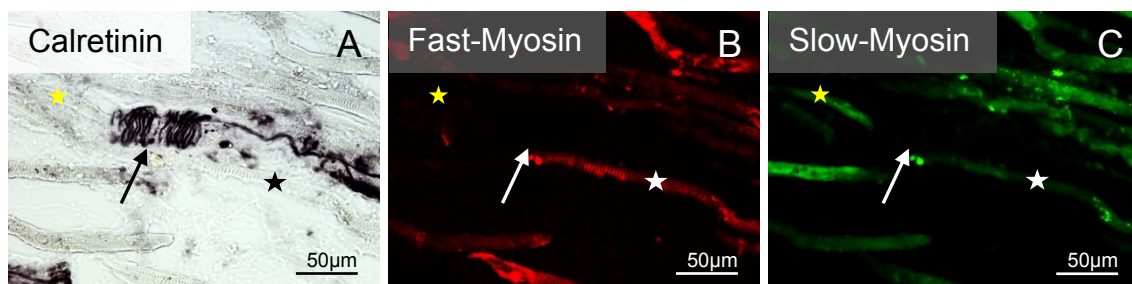


Abbildung 34: Calretinin-positive Spiralendigung: Eine Calretinin-exprimierende Spiralendigung (weißer Pfeil, A) windet sich um eine Slow-Myosin-exprimierende Muskelfaser (gelber Stern, C). In der näheren Umgebung liegen einige Fast-Myosin-exprimierende Muskelfasern, die mit mMHCf markiert wurden (weißer Stern, B). Der Ausschnitt stammt aus einem Körperspender-Fall und wurde mit der kombinierten DAB-Fluoreszenzfärbung auf Calretinin (A, schwarz), Fast-Myosin (B, rot) und Slow-Myosin (C, grün) gefärbt.

### 5.3 Höhere absolute Anzahl Calretinin-positiver Palisadenendigungen in Strabismus-Fällen

In den durchgeführten Färbungen zu den verschiedenen Fragestellungen fiel jeweils eine deutlich erhöhte absolute Anzahl der PE bei den Strabismus-Resektaten auf (Abb. 20, 30).

Summiert man die absolute Anzahl der PE der verschiedenen Fragestellungen, so lagen bei den Körperspendern in 94 Schnitten 248 PE vor, also ca. 2,5 PE / Schnitt. Bei den Strabismus-Patienten fand ich in insgesamt 44 Schnitten 611 PE, was 14 PE / Schnitt entspricht und somit mehr als fünfmal so viele PE im Vergleich zu den Körperspendern beobachtet wurden (Abb. 35).

#### Anzahl der Palisadenendigungen / Schnitt

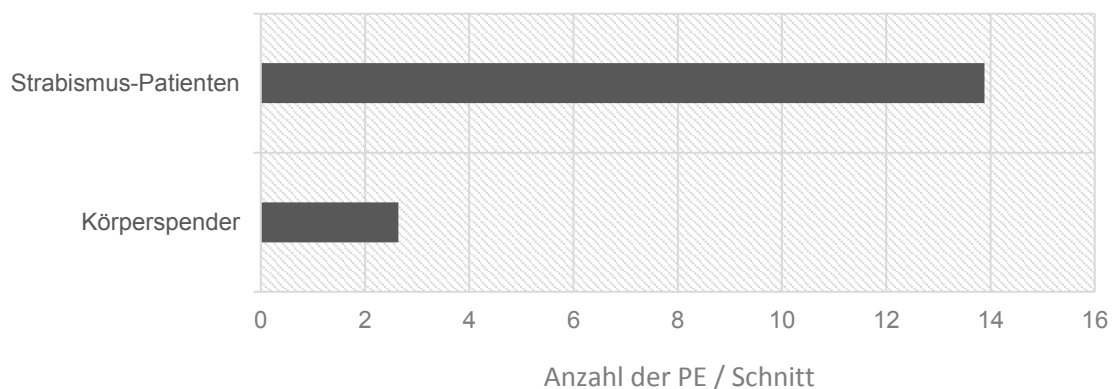


Abbildung 35: Vergleich der absoluten Anzahl der Palisadenendigungen (PE) pro Schnitt bei Strabismus-Patienten und Körperspendern mit Einbeziehung aller gezählter Palisadenendigungen (Calretinin-positive und -negative Palisadenendigungen).

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Palisadenendigungen (PE) im distalen Muskelsehnenübergang (MSÜ) des M. rectus medialis (MR) von Körperspendern und Strabismus-Patienten mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Dabei wurden folgende neue Befunde erhoben: Es konnte aufgezeigt werden, dass die Subgruppe der Calretinin (CR)-positiven PE im MR von menschlichen Körperspendern einen Anteil von ca. 73% aller PE ausmacht. Zudem wurde ein hoher Anteil (92%) CR-positiver PE an MF mit histochemisch nachgewiesenen Fast-Twitch-Eigenschaften beobachtet. Im Vergleich der Ergebnisse zwischen Körperspendern und Strabismus-Patienten zeigte sich ein um 10% geringerer Anteil der CR-positiven PE in den Strabismus-Fällen. Auffallend war die deutlich höhere Anzahl absolut gezählter PE in den Strabismus-Fällen. Bezüglich der Assoziation der CR-positiven PE zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden MF konnten keine Unterschiede zwischen Körperspendern und Strabismus-Patienten gezeigt werden.

### 6.1 Calretinin-Expression in Palisadenendigungen

Entsprechend früherer Arbeiten konnte hier bei Körperspendern und Strabismus-Patienten die gesamte Innervation mit dem gegen SNAP-25 gerichteten Antikörper SMI81 konsistent dargestellt werden (Lienbacher und Horn 2012; Eberhorn et al. 2005). Die erzielten Ergebnisse der CR-Expression im MR stehen in Einklang zu den Befunden am Affen und vorläufigen Beobachtungen am Menschen, wobei in der hier systematischen Studie gezeigt werden konnte, dass ein durchgängig hoher Anteil von ca. 73% der PE im MR CR-positiv war (Lienbacher et al. 2018; Sängler 2018). Dieser Befund geht einher mit dem Nachweis CR-positiver und Cholinacetyltransferase-positiver Zellkörper in der C-Gruppe des Rhesusaffen und in Neuronen in der Peripherie des Ncl. oculomotorius beim Menschen (Lienbacher et al. 2018; Lienbacher et al. 2019).

Eine eindeutige Zuordnung des Calcium-bindenden Proteins CR zu bestimmten funktionellen Neuronengruppen existiert bislang nicht. Es findet sich über das gesamte Nervensystem hinweg verteilt und ist Bestandteil verschiedenster

neuronaler Schaltkreise (DeFelipe 1997). Eine CR-Expression konnte beispielsweise in Motorneuronen des Rückenmarks bei Ratten beobachtet werden (Laslo 2000). Allerdings wird CR in vielen Untersuchungen eher mit sensiblen Funktionen assoziiert. So konnte ich in den von mir untersuchten EOM CR-positive anulospirale Nervenendigungen darstellen, die sich um die intrafusale Faser einer Muskelspindel legen (siehe Kapitel 5.2.5). In Untersuchungen von *Duc et al.* konnten CR-exprimierende Nerven in den Spinalganglien bei Ratten und auch Hühnchen spezifisch zu MS, Vater-Pacini-Körperchen und anderen Mechanorezeptoren der Haut als Zielstruktur zurückgeführt werden. Daraus schlussfolgerte *Duc et al.*, dass die CR-Expression mit sich schnell anpassenden Mechanorezeptoren in Verbindung steht (Duc et al. 1993, 1994). Weitere Untersuchungen des Rückenmarks bei Ratten konnten das Lagemuster CR-positiver Zellen sensiblen und nozizeptiven Leitungsbahnen zuordnen (Ren K 1992). Untersuchungen des Ziliarmuskels zeigten ebenfalls einige CR-exprimierende Endigungen, die eine mechanorezeptive Funktion innehaben könnten (Flügel-Koch et al. 2009). Inwieweit die CR-Expression einer Subgruppe von PE für deren sensible Funktion spricht, bleibt vor den widersprüchlichen Befunden einer propriozeptiven Rolle offen.

### Funktion der Palisadenendigungen

Nachweise für propriozeptive Signale der EOM existieren seit einiger Zeit. 2007 gelang *Wang* und seinen Kollegen der Nachweis eines propriozeptiven Signals von den EOM im somatosensorischen Cortex beim Affen (Wang et al. 2007). Die Autoren demonstrierten in ihrer Arbeit, dass die Neurone in diesem kortikalen Bereich abhängig von der Lage des Augapfels feuern und bei einer Anästhesie der kontralateralen EOM verstummen (Wang et al. 2007). Außerdem konnte *Dancause et al.* in elektromyographischen Untersuchungen an den EOM einen Muskeldehnungsreflex nachweisen, der in skelettaler Muskulatur durch ein sensorisches Organ initiiert wird. Folglich würde man auch in den EOM propriozeptive Endigungen erwarten (Dancause et al. 2007; Behrends et al. 2010). In den EOM liegen die klassischen propriozeptiven Rezeptoren der skelettalen Muskulatur wie beispielsweise die MS in den unterschiedlichen



Spezies nur in sehr variablem Ausmaß vor und deren Funktion wird aufgrund veränderter Morphologie teils in Frage gestellt (siehe Kapitel 2.2.3) (Büttner-Ennever 2006). Für GSO konnten in den EOM des Menschen bisher keine oder nur fragliche Funde erhoben werden (Richmond et al. 1984; Sodi et al. 1988, Bruenech und Ruskell 2000; Blumer et al. 2006). PE finden sich dagegen in allen bisher darauf untersuchten Spezies mit frontal-ständigen Augen, allerdings inkonsistent in Spezies mit lateral-ständigen Augen (Blumer et al. 2016). Daher ist eine Annahme, dass PE propriozeptive Signale aus dem Sehnenübergang der EOM weiterleiten könnten.

Den Überlegungen, dass PE in den EOM eine sensible Rolle übernehmen, stehen Theorien einer motorischen Funktion der PE gegenüber. Die Interpretation der bisherigen Forschungsergebnisse lässt zwei unterschiedliche Sichtweisen zu. Für beide Anschauungen lassen sich untermauernde Argumente vorbringen. In der Zusammenschau aller Eigenschaften der PE finden sich also einerseits Argumente für eine motorische Funktion (Expression von ChAT, Vorhandensein von alpha-Bungarotoxin an neuromuskulären Kontakten, Vorhandensein einer Basallamina in neuromuskulären Kontakten, Lage der Zellkörper nahe dem Kerngebiet des N. oculomotorius, anatomischen Einheit mit den MIF) (Konakci et al. 2005; Khanna et al. 2003; Lukas et al. 2000, Blumer et al. 2001, 2009, 2016, 2020; Büttner-Ennever et al. 2001; Lienbacher et al. 2011). Andererseits finden sich diese Eigenschaften zum Teil nicht konstant, und die Expression von ChAT oder die Lage der Zellkörper der PE außerhalb des Trigemini-Ganglions beweist noch keine motorische Funktion. So liegen die Zellkörper der propriozeptiven Afferenzen zu den Kaumuskeln im mesencephalen Ncl. nervi trigemini, der auch Zellkörper der MS in den EOM beim Affen aufweist (Wang und May 2008). Für eine sensorische Funktion der PE sprechen die Lage der PE im MSÜ, das Fehlen von alpha-Bungarotoxin und eine ausschließlich bei neurotendinösen Kontakten ausgebildete Basallamina, sowie die Tatsache, dass bisher keine andere anatomische Struktur gefunden wurde, die eine propriozeptive Funktion überzeugend ausüben könnte (Schoultz 1972; Ruskell 1978; Alvarado-Mallart und Pincon-Raymond 1979; Blumer et al. 1998; Lukas et al. 2000; Büttner-Ennever et al. 2001; Konakci et al. 2005; Blumer et al. 2009).

Durch die Untersuchung der CR-Expression der PE beim Menschen konnte, wie bereits beim Affen gezeigt, eine Subgruppe CR-positiver PE identifiziert werden (Lienbacher et al. 2018). Eine endgültige Aussage bezüglich einer sensorischen oder motorischen Funktion der PE anhand der CR-Expression konnte nicht geleistet werden. Allerdings lieferten die Daten der vorliegenden Arbeit weiterführende Hinweise für eine wichtige Rolle der PE bei Konvergenzbewegungen der Augen.

### Calretinin-positive Palisadenendigungen mit Sonderrolle bei Konvergenz?

Unabhängig davon, ob sie motorisch oder sensibel sind, spielen die CR-positiven PE möglicherweise eine Sonderrolle bei der Konvergenzbewegung der Augen (Blumer 2016). Die vorliegende Arbeit steht in Einklang mit Befunden am Affen und Menschen, wo nur im MR und IR CR-positive PE gefunden wurden (Lienbacher et al. 2018; Sänger 2018). Dabei umfasste der Anteil der CR-positiven PE mehr als 86% im MR beim Affen (Lienbacher et al. 2018). Eine ähnlich hohe Population von 73% CR-positiven PE im MR wurde in vorliegender Arbeit in den menschlichen Körperspender-Fällen ermittelt, was auf eine wichtige Funktion dieser PE hinweist. Dabei scheinen die PE im MR allgemein eine besondere Rolle zu spielen, auf die ich hier zunächst eingehen möchte.

Die PE zeigen Unterschiede bezüglich der Anzahl und Form innerhalb der verschiedenen Spezies und auch der unterschiedlichen EOM. So fanden sich konstant zahlreiche, gut entwickelte PE bei Lebewesen mit frontal stehenden Augen, wie beispielsweise Katzen, Affen und Menschen, die aber vornehmlich neurotendinöse Endigungen aufwiesen (Blumer et al. 2016). Sehr variabel bezüglich Anwesenheit, Häufigkeit und Aussehen zeigten sich PE dagegen bei Tieren mit seitlich stehenden Augen. Hier konnte generell nur eine verminderte Anzahl der PE vorgefunden werden. Und während beispielsweise bei Kaninchen sehr gut ausgebildete PE mit überwiegend neuromuskulären Kontakten beobachtet wurden, so sind bei Ratten nur vereinzelte PE identifizierbar (Eberhorn et al. 2005; Blumer et al. 2001, 2016). Beobachtungen von *Blumer et al.* bei verschiedenen Spezies ergaben eine durchgehend erhöhte Anzahl der PE

im MR im Vergleich zu den anderen geraden EOM. Diese war vor allem in Tieren mit frontal-stehenden Augen deutlich ausgeprägt, wobei im SR und IR auch noch relativ viele PE gezählt wurden. Im LR lagen so gut wie keine PE vor. Bei Tieren mit lateral-ständigen Augen war die Anzahl der PE generell vermindert, lag aber mit geringerer Anzahl im MR und LR vergleichbar ausgeprägt vor. Dagegen fanden sich hier kaum Beobachtungen von PE im SR und IR (Blumer et al. 2016). Dies führt zur Vermutung, dass den PE beim binokularen Sehen von Lebewesen mit frontal-stehenden Augen eine wichtige Rolle zukommt (Blumer et al. 2016).

In einer vergleichenden Entwicklungsstudie an den geraden EOM von Katzen wurde gezeigt, dass die PE eine ähnliche morphologische Entwicklung durchlaufen, sich aber in Hinblick auf die am Ende vorliegende Dichte und den zeitlichen Ablauf der Entwicklung unterscheiden. Diese vollzog sich am schnellsten im MR. Hier lagen nach Beendigung der Entwicklung nach ca 45 Tagen postnatal die PE in der höchsten Dichte vor (Blumer et al. 2017).

Die Anzahl der PE scheint im MR beim Menschen im Bereich von 40 – 130 PE zu liegen (Laessing 2013; Blumer et al. 2016). Bei Affen fällt sie etwas niedriger aus (Blumer et al. 2016). Andere Angaben in der Literatur schwanken zwischen 350 PE in einem einzelnen MR eines Rhesus-Affen bis hin zu groben Schätzungen der Anzahl der PE beim Menschen mit 20-30 PE (Ruskell 1978; Lukas et al. 2000). In meinen Beobachtungen augengesunder Körperspender zählte ich mit max. 18 PE im Fall 7 durchgehend weniger PE als in der sonstigen Literatur angegeben. Mir stand in der Mehrzahl der Fälle der Muskel nicht in seiner gesamten Länge zur Auswertung zur Verfügung, wodurch ich zur absoluten Anzahl der PE in den untersuchten Fällen keine endgültige Aussage treffen kann. Die hier gezählten Beobachtungen beschreiben damit Mindestwerte der sicher höheren Anzahl von PE.

Diese Erkenntnisse führen in der Gesamtheit zur Vermutung, dass den PE insbesondere des MR bei Konvergenzbewegungen, die für ein binokulares Sehen erforderlich sind, bei Lebewesen mit frontal-stehenden Augen eine wichtige Rolle zukommt (Blumer et al. 2016). Auffallend ist, dass bei Primaten einschließlich des Menschen nur im MR und IR CR-positive PE gefunden wurden, nicht aber bei Tieren mit lateral-ständigen Augen, wie beispielsweise

Ratten (Porcellato, Lienbacher und Horn 2013 unveröffentlichte Daten; Lienbacher et al. 2018). Diese beiden Muskeln sind bei der Konvergenz der Augen beteiligt, wobei dem MR die wichtigere Rolle zukommt (Aumüller et al. 2010). Anders als bei dem Calcium-bindenden Protein Parvalbumin, das vornehmlich in stark feuernenden Neuronen vorkommt (Celio 1990), gibt es keine entsprechende klare Korrelation zu CR-positiven Neuronen. *Rogers et al.* vermutete aufgrund seiner Beobachtungen, dass die CR-Expression Neurone mit einem „fine tuning“ für die betreffende Funktion versieht (Rogers und Resibois 1992). *Duc et al.* schlussfolgerte aus den beobachteten spezifischen Assoziationen CR-exprimierender Nerven zu MS, Vater-Pacini-Körperchen und anderen Mechanorezeptoren der Haut, dass die CR-Expression mit sich schnell anpassenden Mechanorezeptoren in Verbindung steht (Duc et al. 1993; 1994). Darüber hinaus konnte die Forschungsgruppe rund um *Gall* eine beeindruckende Zunahme der Erregbarkeit von Nervenzellen im Cerebellum in Knock-Out-Mäusen mit fehlendem CR nachweisen. Hierbei kommen die Autoren zu der Auffassung, dass CR durch seine Calcium-Buffer-Eigenschaften die intrinsische Erregbarkeit von Zellen verändert und somit auf die physiologische Funktion der neuronalen Vorgänge Einfluss nimmt (Gall et al. 2005).

Da nicht alle PE CR exprimieren, könnte dies ein Hinweis auf Spezialisierungen innerhalb der PE darstellen. Spielen die PE möglicherweise allgemein eine Rolle bei der Feinjustierung der Augen bei Fixation, so könnte die Subgruppe der CR-positiven PE dabei eine besondere Rolle bei der Konvergenzbewegung der Augen innehaben. Denkbar ist auch, dass das CR seine Funktion nicht an den Synapsen in der Peripherie, sondern im zentral gelegenen Zellkörper innehat. Es könnte hier durch seine Eigenschaften folglich dazu dienen, die neuronale Erregbarkeit für prämotorische Eingänge von „near response“-Input, beispielsweise von der zentralen mesencephalen *Formatio reticularis* bei Vergenzbewegungen, zu modulieren (Bohlen et al. 2017).

## 6.2 Assoziation der Calretinin-positiven Palisadenendigungen mit Fast-Myosin exprimierenden Muskelfasern

Frühere Beobachtungen, dass beim Menschen PE auch an MF mit Fast-twitch-Eigenschaften sitzen, wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Ergebnisse dieser Dissertation bezüglich der Assoziation der Subgruppe der CR-positiven PE mit Fast- und Slow-Myosin exprimierenden MF im MR beim Menschen zeigten, dass in diesen EOM rund 90% der CR-positiven PE an Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (Fast-MF) vorliegen. Dies steht in Kontrast zu Beobachtungen bei Tieren. Bei Katzen und Affen konnte eine Assoziation der PE ausschließlich zu Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (Slow-MF) und somit den MIF aufgezeigt werden (Alvarado-Mallart und Pincon-Raymond 1979; Lienbacher et al. 2011; Eberhorn et al. 2005). Untersuchungen, die morphologische Beobachtungen wie beispielsweise das Erscheinungsbild der MF heranzogen, unterstützten diese Beobachtungen (Büttner-Ennever et al. 2001; Konakci et al. 2005). Untersuchungen am menschlichen Gewebe liegen nur in geringer Menge vor. *Lukas et al.* vermutete aufgrund der elektronenmikroskopischen Eigenschaften der an den PE liegenden MF beim Menschen eine Assoziation dieser zu den MIF. Funde von en-grappe-Endigungen in der Nähe der PE bestärkten ihn in seiner Vermutung (Lukas et al. 2000). Richmond und Kollegen konnten in der Untersuchung von PE in den menschlichen EOM keine eindeutige Assoziation der PE zu den MIF detektieren (Richmond et al. 1984). Zudem liegen Beobachtungen vor, dass in menschlichen EOM PE an MIF aber auch an SIF sitzen; jedoch ohne dies zu quantifizieren (Laessing 2013). Diese Beobachtung wurde für PE beim MR und LR in der Arbeit von Andreas bestätigt und für 86% aller PE gefunden (Andreas 2021). In gleicher Weise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit für den MR, dass nahezu alle (90%) der CR-positiven PE mit Fast-twitch MF assoziiert sind und nur ein kleiner Anteil mit Slow-non-twitch MF. Dieser ungewöhnliche Befund zur Assoziation von PE an Fast-MF soll im Folgenden diskutiert werden.

Wie bereits in Kapitel 5.2.2 angesprochen, zeigten sich die durchgeführten Färbungen mit Fast-Myosin oft inkonstant und am MSÜ nicht immer sicher auswertbar. Ich nahm eine Einteilung der PE in die zwei Gruppen der Fast-

Myosin- und Nicht-Slow-Myosin-exprimierenden MF („Fast-MF“) einerseits und der Slow-Myosin-exprimierenden MF („Slow-MF“) andererseits vor (siehe Kapitel 5.2.2). Die Handhabung, dass mit Fast-Myosin inkonsistent gefärbte MF als „Fast“ angenommen wurden, sofern sie nicht Slow-Myosin exprimierten, beruhte auf folgenden Tatsachen: Arbeiten von *Liu et al.* hatten gezeigt, dass beide Myosine nicht ko-lokalisiert in MF des MSÜ auftreten (Liu 2021). Zudem war an anderen Abschnitten der EOM verifiziert worden, dass en-plaque-Endigungen nur an Fast- und en-grappe-Endigungen nur an „nicht-Fast“-MF sitzen (siehe Abb. 23). Es zeigte sich, dass die Antikörper am besten an Material, das nicht fixiert war, funktionierten. Ein Großteil des mir zur Verfügung stehenden Materials war jedoch fixiert und teilweise über Jahre bei  $-64^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Somit stellte möglicherweise die Art der Fixierung und Lagerung der Schnitte einen Einflussfaktor bei der Immunreaktivität der Myosinisoformen dar. Denkbare Kreuzreaktionen der Antikörper erschienen als unwahrscheinlich, da kombinierte Färbungen zeigten, dass einzelne MF auf einer Schnittebene entweder Fast- oder Slow-Myosin exprimierten. Damit können Fehlinterpretationen aufgrund von methodischen Problemen ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Erklärung für den ungewöhnlichen Befund von PE an Fast-Myosin-positiven MF könnte auch in der unterschiedlichen Myosin-Expression entlang der einzelnen MF zu finden sein. Einige Beobachtungen berichten über Unterschiede der Myosin-Ausstattung im Verlauf einer einzelnen MF bei Tieren (Korfage 2016; McLoon et al. 1999). So zeigte *Lucas et al.*, dass in der orbitalen Schicht der EOM bei Ratten sowohl SIF als auch MIF innerhalb ihres Verlaufs verschiedene Myosine exprimieren (Lucas et al. 2018). Ein solches Muster ist bekannt für die orbitalen MIF, die im zentralen Bereich von en-plaque-Endigungen kontaktiert werden und dort auch twitch-Eigenschaften aufweisen und entsprechend Fast-Myosin exprimieren (Jacoby et al., 1989). Auch im menschlichen EOM wurden deutliche Differenzen der Myosin-Expression bei der Untersuchung von Querschnitten entlang des Muskelverlaufs entdeckt (Kjellgren et al. 2003). Die am MSÜ Fast-Myosin exprimierenden MF könnten also prinzipiell im weiteren Verlauf nach zentral Slow-Myosine exprimieren. Inwieweit die von PE kontaktierten Fasern insgesamt klassische SIF repräsentieren, ließe sich nur über Studien an whole-mount-Muskelpräparaten, in denen man den

gesamten Verlauf der MF beurteilen kann, untersuchen. Trotz eines Myosin-Wechsels innerhalb der MF liegen in einer bestimmten MF jedoch grundsätzlich ähnliche Myosine vor. So liegen in MIF eher langsamere Myosine vor und in SIF eher Schnellere (Lucas, Rhee und Hoh 2018).

Die Organisation der EOM ist durch eine sehr hohe Komplexität sowie enorme Diversität der Myosin-Ausstattung der MF gekennzeichnet, um die sehr breit gefächerten Herausforderungen der Augenbewegungen zu ermöglichen. Diese erhebliche Differenziertheit der menschlichen EOM im Vergleich zu denen von anderen Arten spiegeln in Ansicht von *Kjellgren* eventuell die hervorragende Stellung des binokulären Sehens und der Konvergenz beim Menschen wider (Kjellgren et al. 2003).

Untersuchungen bei Katzen, die ein whole-mount-Verfahren verwendeten, zeigten zumindest für den distalen Muskelbereich, dass die PE in dieser Spezies von demselben Axon ausgehen, welches auch die multiplen en-grappe-Endigungen der MIF ausbildet (Zimmermann et al. 2013; Blumer et al. 2017; Blumer et al. 2020). Der Nachweis dieser Theorie konnte beim Menschen bisher noch nicht erbracht werden (Lienbacher und Horn 2012). Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass Differenzen in der Häufigkeit der CR-positiven PE und den CR-positiven en-grappe-Endigungen existieren: Der Anteil der CR-positiven PE im MR ist sehr hoch; der Anteil der CR-positiven en-grappe-Endigungen dagegen nur gering (Lienbacher et al. 2019).

Wie bereits oben berichtet, liegen die Zellkörper der PE des MR und IR zusammen mit den MIF-Motoneuronen in der C-Gruppe (Büttner-Ennever et al. 2001; Lienbacher et al. 2011). Davon sind beim Affen 20% CR-positiv und repräsentieren höchstwahrscheinlich die Zellkörper der PE und multiplen en-grappe-Endigungen (Lienbacher et al. 2018). Eine entsprechende Gruppe von CR- und ChAT-positiven Zellen erschien im Menschen lockerer in der Peripherie des N. oculomotorius verteilt (Lienbacher et al. 2019). Die SIF-innervierenden Neurone, die Fast-Myosin-exprimierende MF innervieren, liegen dagegen im Kerngebiet des N. oculomotorius (Horn et al. 2008). Eine CR-Expression konnte bei diesen SIF-Motoneuronen bisher nicht nachgewiesen werden (Lienbacher et al. 2019). Neueste Untersuchungen bestärken die

Theorien, dass die PE und die en-grappe-Endigungen vom selben Zellkörper ausgehen (Blumer et al. 2020). Umso erstaunlicher sind die in dieser Dissertation gewonnenen Befunde mit der Mehrzahl der PE auf Fast-Myosin-positiven MF. Die multiplen Endigungen enden dagegen immer auf Slow-Myosin-positiven MF. Eine Beobachtung aus früheren Studien ist in diesem Kontext sehr interessant. Die Zellkörper der PE und MIF in der Peripherie der Augenmuskelkerne besitzen andere histochemische Eigenschaften als die SIF-Motoneurone. Letztere zeigen eine starke Expression von Parvalbumin und spannungsgesteuerten Kv3.1b-Kanälen und sind von perineuronalen Netzen umgeben, was mit der hochfrequenten Feuerrate dieser Neurone einhergeht (Eberhorn et al. 2005; Horn et al. 2008; Hernandez et al., 2019; Mayadali et al. 2021). Den weniger hochfrequent feuernden peripheren Neuronen, einschließlich der CR-positiven Neurone, fehlen all diese Eigenschaften (Eberhorn et al., 2005; Mayadali et al., 2021). Folgt man jetzt aber den etablierten Erkenntnissen, dass die Feuerraten von Motoneurone die Kontraktionseigenschaften in den von ihnen innervierten MF bestimmen, findet sich bei einer motorischen Funktion der PE ein Widerspruch (Buller et al. 1960; Lomo et al., 1974): Bei den mit den Fast-myosin-exprimierenden MF assoziierten PE würde man im Falle einer Efferenz dementsprechend eine hohe Feuerrate voraussetzen können. Da PE von den peripheren Neuronengruppen stammen, werden von diesen allerdings keine hochfrequenten Aktivitätsmuster erwartet. Wie auch bereits bei zahlreichen Spezies beobachtet, würde man eine Assoziation der PE deshalb mit Slow-Myosin-exprimierenden MF vermuten (Eberhorn et al. 2006). Vielleicht liefert gerade dieser Befund der PE an Fast-Myosin-positiven MF einen Hinweis darauf, dass die PE statt einer efferenten eine sensible Funktion innehaben. Denkbar wäre, dass die PE am MSÜ die Dehnung in der Sehne durch Kontraktion des Muskels wahrnehmen und die Informationen über einen direkten intrinsischen Reflex auf die MIF weiterleiten, um eine adäquate Augenbewegung zu ermöglichen.

Eine endgültige Klärung der Funktionsweise der PE erscheint aktuell unter Einbeziehung aller bisherigen Fakten nicht möglich. Zu unterschiedlich sind die vorliegenden Beobachtungen, die die Wissenschaftler bezüglich der Grundfrage einer afferenten oder efferenten Funktion spaltet. In der hier vorliegenden Arbeit



wurde die Assoziation der CR-positiven PE zu der jeweiligen Myosin-Expression der MF im MSÜ untersucht. Ausgehend von der Myosin-Ausstattung und den daraus resultierenden Kontraktionseigenschaften der MF scheint der Großteil der CR-positiven PE an Fast-MF vom „twitch“-Typ zu liegen. Dies sollte in weiteren Untersuchungen zur Innervierung, z.B. an whole-mount Präparaten, untersucht werden.

### **6.3 Palisadenendigungen bei Strabismus-Patienten**

Im Vergleich der prozentualen Anteile der CR-positiven PE zeichnete sich bei den erhobenen Daten im MR ein Trend mit einem verminderten Anteil CR-positiver PE bei den Strabismus-Fällen im Vergleich zu den Kontrollen ab (siehe Kapitel 5.1.3). Bezüglich der Assoziation der CR-positiven PE zu Fast- und Slow-Myosin exprimierenden MF existierten in den vorliegenden Fällen keine signifikanten Veränderungen (siehe Kapitel 5.2.4). Dies steht in Einklang zu Ergebnissen von *Andreas*, der nahezu identische prozentuale Anteile aller PE bezüglich der Assoziation zur Fast- und Slow-Myosin-Expression der MF im Vergleich zwischen gesunden Probanden und Strabismus-Patienten erhob (*Andreas* 2021). Auffallend war jedoch meine Beobachtung einer deutlichen Zunahme der absoluten Anzahl gezählter PE in den Strabismus-Fällen. Diese Zunahme entsprach im Durchschnitt aller untersuchter Fälle einem Faktor von mehr als 5 (siehe Kapitel 5.3). Dabei standen mir in den Körperspender-Fällen mehr Schnitte für meine Untersuchungen zur Verfügung und innerhalb dieser Schnitte war der MSÜ auf einer deutlich längeren Distanz beurteilbar. Die tatsächliche absolute Anzahl der CR-positiven PE in den Strabismus-EOM ist folglich noch höher einzuschätzen. Eine Zunahme der absoluten Anzahl der PE bei Strabismus-Patienten wurde auch in den Untersuchungen von *Andreas* bestätigt (*Andreas* 2021). In meinen Beobachtungen fiel keine veränderte Anatomie der EOM und insbesondere im Bereich des MSÜ auf. Dies deckt sich mit Beobachtungen *Lennerstrands*, der ebenfalls keine großen Veränderungen der grundlegenden anatomischen Gegebenheiten der EOM inklusive der Pulleys sowie der Histologie der MF bei Strabismus-Patienten beobachtete (*Lennerstrand* 2007). Auch fanden sich im Großteil der bisherigen Untersuchungen der Muskelkraft und Muskeldehnung der horizontalen EOM bei

Strabismus-Patienten keine Änderungen im Vergleich zu gesunden Probanden (Schiavi 2016).

Elektronenmikroskopische Veränderungen wurden bei Strabismus-Patienten in früheren Untersuchungen vor allem im Bereich des MSÜ beobachtet. Hier entdeckte man neben einer gestörten Innervation auch eine komplett fehlende Innervation von MF (Domenici-Lombardo et al. 1992). In Untersuchungen der PE von Strabismus-Patienten im Lichtmikroskop als auch im Elektronenmikroskop lagen teils Veränderungen der Schwann-Zellen vor, die ein Hinweis auf eine gestörte Funktion dieser sein könnten: Teils fehlte die neuronale Versorgung der PE oder deren Aufbau war komplett unstrukturiert (Corsi et al. 1990; Park et al., 2009). Inwieweit die Veränderungen der PE die zugrundeliegende Ursache oder eine Folge der Krankheit bilden, ist unklar (Corsi et al. 1990). Die Ätiologie des infantilen Strabismus könnte theoretisch in einer gestörten Propriozeption der EOM zu suchen sein (Schiavi 2016). Der Schlüssel zukünftiger Erkenntnisse in der Strabismus-Forschung könnte in der gezielten Untersuchung propriozeptiver Mechanismen der EOM liegen (Lennerstrand 2007). Mittlerweile finden sich bei Strabismus-Patienten auch Hinweise für Veränderungen auf genetischer Ebene. Hier zeigten sich Abweichungen in der Gen-Expression bezüglich der Regulierung von Motor-Proteinen, Proteinen der extrazellulären Matrix sowie des Bindegewebes der EOM. Aber auch Gene, die den Calcium-Haushalt verändern, lagen bei Strabismus-Patienten in abgewandelter Form vor (Altick et al. 2012; Agarwal et al. 2016).

Das Alter der Körperspender lag mit 60 – 92 Jahren über der Altersspanne der Strabismus-Patienten, deren Alter zwischen 8 und 62 Jahren lag. Die unterschiedliche Altersspanne spielt aber vermutlich keine entscheidende Rolle in der Auswertung und dem Vergleich der Fälle. In Beobachtungen der PE bei Kaninchen unterschiedlichen Alters und Geschlechts lagen keine Alters- oder geschlechtsspezifischen Variationen der PE vor (Blumer et al. 2001). Auch in meinen Untersuchungen stellten sich die PE unabhängig vom Alter strukturell gleich dar. *Andreas* verglich in seiner Arbeit die absolute Anzahl der PE im MR und LR in den Altersgruppen „<20 Jahre“ und „>20 Jahre“. Hierbei konnten keine signifikanten zahlenmäßigen Unterschiede beobachtet werden (Andreas 2021).

Zwei meiner untersuchten 10 Fälle wiesen einen deutlich reduzierten Anteil an CR-positiven PE von etwa 30% auf. Es bestanden in diesen Fällen keine Besonderheiten bezüglich der Fixierung und Färbung. Mit 18 und 37 Jahren lagen zwei unterschiedliche Altersstufen vor. In meinen Untersuchungen zeigte sich insgesamt eine große Variabilität der Anteile von CR-positiven PE im MR bei Strabismus-Patienten. Diese lagen zwischen 30% und 80%. Ursächlich ist eine Klärung dieses Sachverhaltes zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Die CR-Expression der PE bei Strabismus-Patienten zeigte in meinen Untersuchungen nur geringe Veränderungen im Vergleich mit den Körperspendern auf und scheint somit nicht im Mittelpunkt der Veränderungen bei Strabismus-Patienten zu stehen. Stattdessen könnte der deutlichen Zunahme der absoluten Anzahl der PE eine wichtige Rolle zukommen. Die vorliegende Dissertation war jedoch im Ziel nicht auf die Zählung der absoluten Anzahl der PE hin ausgerichtet. Eine entsprechende Bezugsgröße wurde hierbei deshalb nicht festgelegt. Dennoch kann über eine deutliche Zunahme der absoluten Anzahl der PE, sowie der Subgruppe der CR-positiven PE nicht hinweggesehen werden. Die hier entdeckte erhöhte Anzahl der PE könnte zum einen den Versuch des Körpers darstellen, aufgrund einer etwaigen anderen Pathologie die Symptome des Strabismus zu vermindern. Denkbar ist zum anderen auch den Anstieg der absoluten Anzahl der PE als Ausdruck einer pathologischen Veränderung eben dieser zu interpretieren. Im Rahmen zukünftiger Untersuchungen könnte zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse in unterschiedlichen Schnitten beispielsweise die absolute Anzahl der PE in Bezug auf die Anzahl der MF hin untersucht werden.

Nachdem die Entwicklung der EOM vorgeburtlich vor allem durch genetische Faktoren beeinflusst wird, übernehmen nach der Geburt Wachstumshormone und Zelladhäsions-Moleküle eine wichtigere Rolle (Schiavi 2016). *Blumer et al.* untersuchte die Entwicklung von PE bei Katzen von den ersten Wochen nach Geburt an bis ins erwachsene Lebensalter. Die Entwicklung der PE fällt dabei genau in den Zeitraum der Entwicklung der binokularen Sehfähigkeit (Blumer et al. 2017). In dieser vulnerablen Zeit könnte der Ursprung des infantilen Begleitschielens bedingt durch eine Störung der Propriozeption in Kombination

mit einem noch nicht ausgereiften visuellen sensorischen System liegen (Schiavi 2016). Dass eine Pathologie der PE somit Einfluss auf die Sehentwicklung hat, ist denkbar. Besonders wenn man der Bedeutsamkeit der Propriozeption in der Entwicklung des binokularen Sehens bedenkt (Park et al., 2009). In Untersuchungen kindlicher EOM beim Menschen liegen gegensätzliche Daten vor, in denen PE das eine mal nicht auffindbar und das andere mal darstellbar waren (Bruenech und Ruskell 2000; Lukas et al. 2000).

Grundsätzlich muss folgender Umstand bedacht werden. Die Strabismus-Operationen werden symptombezogen mit dem Ziel einer funktionellen Verbesserung durchgeführt. Dies wird beim Strabismus unter anderem mit der Exzision eines Teils der Sehne, ggf. mit Anteilen des Muskels, und anschließender Reposition des gekürzten Muskels am Bulbus erreicht. Ich untersuchte in meiner Arbeit diese entnommenen Resektate. Ausschlaggebend dafür, welcher Muskel gekürzt wird, ist dabei die Abweichung des Auges von der normalen Sehachse. Somit muss der operierte und damit von mir untersuchte EOM nicht unbedingt mit dem pathologisch veränderten Muskel übereinstimmen. Eine mögliche Pathologie im nicht resezierten EOM wäre theoretisch denkbar. Insgesamt ist es schwierig an Augenmuskeln von Strabismus-Fällen zu forschen, da es beim Kürzen des Muskels intraoperativ oft nur zu einer Entnahme von Sehngewebe kommt. Eine Mitentnahme von Muskelanteilen und somit auch des MSÜ erfolgt selten. In der Zukunft könnten weitere Forschungsergebnisse, zum Beispiel durch die immunhistochemische Untersuchung beider Augen von Strabismus-Patienten, neue Erkenntnisse zu Tage bringen.

## 7 Zusammenfassung

Noch immer ist die genaue Funktion der Palisadenendigungen (PE) im menschlichen M. rectus medialis (MR) ungeklärt. Theorien einer motorischen Funktion stehen denen einer sensorischen entgegen. Ich nutzte Calretinin (CR) zur Identifikation einer Subgruppe CR-positiver PE und untersuchte deren prozentualen Anteil an der Gesamtheit der PE, sowie die Assoziation der CR-positiven PE mit Fast-Myosin- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern (MF).

Meine Ergebnisse zeigen, dass mit über 70% der Großteil der PE im menschlichen MR, ähnlich zu Befunden beim Affen, CR exprimieren (Lienbacher et al. 2018). Gut ausgebildete und zahlreiche PE wurden vor allem in Lebewesen mit frontal stehenden Augen gefunden. Die zahlenmäßig größten Funde von PE wurden dabei im MR und IR erbracht (Blumer et al. 2016). Die Erkenntnisse dieser Dissertation unterstützen bisherige Überlegungen, dass die PE insgesamt eine wichtige Funktion im binokularen Sehen einnehmen und der Subgruppe der CR-positiven PE eine bedeutende Rolle in der Konvergenzbewegung der Augen zukommen könnte. Das CR muss jedoch nicht in den peripheren Terminalen der PE eine entscheidende Rolle spielen, sondern könnte stattdessen in der zentralen Verschaltung der PE von Bedeutung sein.

Im Gegensatz zur bisher geglaubten Assoziation der PE zu den Slow-Myosin-exprimierenden MIF wurde in den Untersuchungen dieser Dissertation im menschlichen MR eine fast ausschließliche Assoziation der CR-positiven PE zu Fast-Myosin-exprimierenden MF nachgewiesen. Diese Myosine findet man in schnell kontrahierenden MF, die über eine einzelne en-plaque-Endplatte am Muskelbauch innerviert werden, den single innervated fibers (SIF) (Spencer und Porter 2006). Erklärbar ist ein solcher Befund möglicherweise durch die unterschiedliche Myosin-Expression innerhalb einer einzelnen MF. Da die Kontraktionseigenschaften der MF durch die Feuerrate der Motoneurone bestimmt werden, würde man aufgrund der histochemischen Eigenschaften der in der C-Group gelegenen Zellkörper der PE nach aktuellem wissenschaftlichem Kenntnisstand bei einer motorischen Funktion der PE eine Assoziation dieser zu Slow-Myosin-exprimierenden MF erwarten, wie dies auch bei den MIF gegeben

ist (Buller et al. 1960; Lomo et al. 1974). Gerade die Tatsache, dass PE im menschlichen MR überwiegend mit Fast-MF assoziiert sind, könnte auf eine sensible Funktion ebendieser hinweisen. Im Kontext immer wieder neuer Erkenntnisse, auch bezüglich beispielsweise der Myosin-Ausstattung der MF der extraokulären Muskulatur, bleibt eine endgültige Einschätzung dieser Ergebnisse aktuell offen und eine abschließende Klärung vorerst nicht möglich.

Bei den untersuchten Strabismus-Fällen deutet sich im Vergleich zu den Körperspendern ein leicht verminderter Anteil CR-positiver PE ab. In Hinblick auf die gleichzeitig deutlich erhöhte absolute Anzahl der Subgruppe der CR-positiven PE sowie der PE insgesamt bei Strabismus-Patienten scheint der erniedrigte prozentuale Anteil der CR-positiven PE eher keine bedeutende Rolle in den Veränderungen bei Strabismus-Patienten zuzukommen. Inwieweit der enorme Anstieg der absolut gezählten PE eine Folge oder die zugrundeliegende Ätiologie der Erkrankung darstellt, kann hier nicht endgültig geklärt werden. Im Kontext ultrastrukturell veränderter propriozeptiver Organe im MSÜ und daraus resultierender fehlerhafter propriozeptiver Information könnte die erhöhte Anzahl der PE einen Versuch der quantitativen Kompensation einer möglicherweise gestörten Propriozeption darstellen. In Hinblick auf eine zukünftige Grundlagenforschung im Feld des Strabismus stellt der MSÜ und insbesondere die hier liegenden mutmaßlichen propriozeptiven Organe, die PE, einen interessanten Fokus weiterer Untersuchungen des pathophysiologischen Verständnisses der Strabismus-Erkrankung dar.

Insgesamt gestaltet sich die Erforschung der PE schwierig. Untersuchungen menschlicher EOM-Präparate liegen bisher nur in geringer Menge vor und je mehr Details die Wissenschaft über die Eigenschaften und Zusammensetzung der extraokulären Muskulatur herausfinden, umso komplexer wird das entstehende Gesamtbild. Auch existieren zwischen den verschiedenen Spezies sowohl bezüglich der klassischen propriozeptiven Organe, den GSO und den MS, als auch der PE bedeutende Unterschiede.

Weiterhin sind viele Fragen offen. Um in der Grundlagenforschung der PE und der Subgruppe der CR-positiven PE neue Erkenntnisse zu erzielen, bedarf es weiterer Studien. So können möglicherweise Analysen der C-Group und des

neuronalen okulomotorischen Systems mehr darüber ans Tageslicht bringen, auf welche Weise die Zellkörper der PE mit anderen Gehirnzentren verschaltet sind. Neue Untersuchungsmöglichkeiten der menschlichen EOM, wie beispielsweise die Anwendung des whole-mount-Verfahrens, versprechen zukünftig neue bedeutsame Aufschlüsse über die Assoziation der PE mit den unterschiedlichen MF-Typen sowie Myosin-Verläufe innerhalb einer einzelnen MF. So bleibt das Forschungsfeld der nervalen Innervation der extraokulären Muskulatur und hier insbesondere der PE spannend geladen durch scheinbar nicht miteinander zu vereinbarender Gegensätze.

## Literaturverzeichnis

- Agarwal A.B., C.-Y. Feng, A.L. Altick, D.R. Quilici, D. Wen, L.A. Johnson, C.S. von Bartheld, 2016. Altered protein composition and gene expression in strabismic human extraocular muscles and tendons. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 57: 5576–5585
- Altick A.L., C.-Y. Feng, K.L. Schlauch, A. Johnson, C.S. von Bartheld, 2012. Differences in gene expression between strabismic and normal human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 53: 5168– 5177
- Alvarado-Mallart R.M., C. Batini, C. Buisseret-Delmas, J. Corvisier, 1975. Trigeminal representations of the masticatory and extraocular proprioceptors as revealed by horseradish peroxidase retrograde transport. *Exp. Brain Res.*, 23: 167-79
- Alvarado-Mallart R.M., M. Pincon-Raymond, 1979. The palisade endings of cat extraocular muscles: a light and electron microscope study. *Tissue Cell*, 11: 567-84.
- Anderson B.C., S.P. Christiansen, S. Grandt, R.W. Grange, L.K McLoon, 2006. Increased extraocular muscle strength with direct injection of insulin-like growth factor-I. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47: 2461-67.
- Anderson M.J., M.W. Cohen, 1974. Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. *J.Physiol.*, 237: 385-400.
- Andreas F., 2021. Quantifizierung der Palisadenendigungen assoziiert mit fast-twitch versus non-twitch Muskelfasern in den Musculi recti mediales und laterales bei menschlichen Kontrollfällen und Strabismusfällen. Dissertation, LMU München.
- Andressen C., I. Blümcke, M.R. Celio, 1993. Calcium-binding proteins - selective markers of nerve cells. *Cell Tiss. Res.*, 271: 181-208.
- Aumüller G., G. Aust, A. Doll, u.a. 2010. *Duale Reihe Anatomie*. 2. Auflage © 2010 Georg Thieme Verlag KG , Stuttgart.
- Baizer J.S., J.F. Baker, 2006. Immunoreactivity for calretinin and calbindin in the vestibular nuclear complex of the monkey, *Exp. Brain Res.*, 172: 103-13.
- Balslev D., N.B. Albert, C. Miall, 2011. Eye muscle proprioception is represented bilaterally in the sensorimotor cortex. *Hum. Brain Mapp.*, 32: 624-31.
- Behrends J.C., J. Bischofberger et al., 2010. *Duale Reihe Physiologie*. © 2010 Georg Thieme Verlag KG , Stuttgart.
- Benninghoff A., D. Drenckhahn, 2014. *Taschenbuch Anatomie*. © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.
- Billig I., C. Buisseret-Delmas, P. Buisseret, 1997. Identification of nerve endings in cat extraocular muscles. *Anat. Rec.*, 248: 566-75.
- Blumer R., J. Streicher, G. Carrero-Rojas, P.M. Calvo, R.R. de la Cruz, A.M. Pastor, 2020. Palisade endings have an exocytotic machinery but lack acetylcholine receptors and distinct acetylcholinesterase activity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 61(14): 31



- Blumer R., K.Z. Konakci, C. Pomikal, G. Wieczorek, J.R. Lukas, J. Streicher, 2009. Palisade endings: cholinergic sensory organs or effector organs?. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50: 1176-86.
- Blumer R., K.Z. Konakci, J. Streicher, 2006. Proprioception in the extraocular muscles of mammals and man. *Strabismus*, 14: 101-06.
- Blumer R., J.R. Lukas, M. Aigner, R. Bittner, I. Baumgartner, M. Mayr, 1999. Fine structural analysis of extraocular muscle spindles of a two-year-old human infant. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40: 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., R. Wasicky, W. Hötzenecker, J.R. Lukas, 2001. Presence and structure of innervated myotendinous cylinders in rabbit extraocular muscle. *Exp. Eye Res.*, 73: 787-96.
- 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, Á. M. Pastor, 2016. Palisade endings are a constant feature in the extraocular muscles of frontal-eyed, but not lateral-eyed, animals. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 57: 320–331.
- Blumer R., J. Streicher, M. A. Davis-López de Carrizosa, R. R. de la Cruz, Á. M. Pastor, 2017. Palisade endings of extraocular muscles develop postnatally following different time courses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 58: 5105-21.
- Boenisch T., A.J. Farmilo, R.H. Stead, 2003. *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. © Agilent Technologies, Inc. 2003.
- Bohlen M.O., 2017. A central mesencephalic reticular formation projection to medial rectus motoneurons supplying singly and multiply innervated extraocular muscle fibers. *J. Comp. Neurol.*, 525: 2000-2018.
- Bondi A.Y., D.J. Chiarandini, 1983. Morphologic and electrophysiologic identification of multiply innervated fibers in rat extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 24: 516-19.
- Bruenech J.R., G.L. Ruskell, 2000. Myotendinous nerve endings in human infant and adult extraocular muscles. *Anat. Rec.*, 260: 132-40.
- , 2001. Muscle spindles in extraocular muscles of human infants. *Cells Tissues Organs*, 169: 388-94.
- Bui Quoc E., C. Milleret, 2014. Origins of strabismus and loss of binocular vision. *Front. Integr. Neurosci.*, 8: 71-71.
- Buller A.J., J.C. Eccles, R.M. Eccles, 1960. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J. Physiol.*, 150: 417–439.
- Büttner-Ennever J.A, 2006. *Neuroanatomy of the oculomotor system* © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.

- Büttner-Ennever J.A., A.K.E. Horn, H. Scherberger, 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: 318-35.
- Büttner-Ennever J.A., K.Z. Konakci, R. Blumer, 2006. Sensory control of extraocular muscles, *Prog. Brain Res.*, 151: 81-93.
- Celio M.R., 1991. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35: 375-475.
- Connell E., F. Darios, S. Peak-Chew, M. Soloviev, B. Davletov, 2009. N-terminal acetylation of the neuronal protein SNAP-25 is revealed by the SMI81 monoclonal antibody. *Biochemistry*, 48: 9582-9.
- Cooper S., P.M. Daniel, 1949. Muscle spindles in human extrinsic eye muscles, *Brain*, 72: 1-24.
- Corsi M., A. Sodi, G. Salvi, M.S. Faussonne-Pellegrini, 1990. Morphological study of extraocular muscle proprioceptor alterations in congenital strabismus, *Ophthalmologica*, 200: 154-63.
- Dancause N., M.D. Taylor, E.J. Plautz, J.D. Radel, T. Whittaker, R.J. Nudo, A.G. Feldman, 2007. A stretch reflex in extraocular muscles of species purportedly lacking muscle spindles, *Exp. Brain Res.*, 180: 15-21.
- Daniel P.M., 1946. Spiral nerve endings in the extrinsic eye muscles of man. *J. Anat.*, 80: 189-93.
- DeFelipe J., 1997. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J. Chem. Neuroanat.*, 14: 1-19.
- de la Cruz R.R., A.M. Pastor, F.J. Martinez-Guijarro, C. Lopez-Garcia, J.M. Delgado-Garcia, 1998. Localization of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k in identified extraocular motoneurons and internuclear neurons of the cat. *J. Comp Neurol*, 390: 377-91.
- Demer J.L., 2000. Evidence for active control of rectus extrocular muscle pulleys. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 1280-90.
- Demer J.L., V. Poukens, J.M. Miller, P. Micevych, 1997. Innervation of extraocular pulley smooth muscle in monkeys and humans. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38: 1774-85.
- Demer J.L., J.M. Miller, V. Poukens, 1995. Evidence for fibromuscular pulleys of the recti extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36: 1125-36.
- Dogiel A.S., 1906. Die Endigungen der sensiblen Nerven in den Augenmuskeln und deren Sehnen beim Menschen und den Säugetieren. *Archiv für mikroskopische Anatomie* © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, 68: 501-26.
- Domenici-Lombardo L., M. Corsi, R. Mencucci, M. Scrivanti, M.S. Faussonne-Pellegrini, G. Salvi, 1992. Extraocular muscles in congenital strabismus: muscle fiber and nerve ending ultrastructure according to different regions. *Ophthalmologica*, 205: 29-39.

- Donnelly S., M. Hollinger, N.M. Stewart, 2005. Prevalence and Outcomes of Childhood Visual Disorders. *Ophthalmic Epidemiology*, 12: 243–250.
- Duc C., I. Barakat-Walter, B. Droz, 1993. Peripheral projections of calretinin-immunoreactive primary sensory neurons in chick hindlimbs. *Brain Res.*, 622: 321-4.
- , 1994. Innervation of putative rapidly adapting mechanoreceptors by calbindin- and calretinin-immunoreactive primary sensory neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 6: 264-71.
- Eberhorn, A.C., A.K.E. Horn, N. Eberhorn, P. Fischer, K.-P. Boergen, J.A. Büttner-Ennever, 2005. Palisade endings in extraocular eye muscles revealed by SNAP-25 immunoreactivity. *J. Anat.*, 205: 307-15.
- Fernand V.S., A. Hess, 1969. The occurrence, structure, and innervation of slow and twitch muscle fibres in the tensor tympani and stapedius of the cat. *J. Physiol.*, 200: 547–554.
- Flügel-Koch C., W.L. Neuhuber, P.L. Kaufman, E. Lutjen-Drecoll, 2009. Morphologic indication for proprioception in the human ciliary muscle. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50: 5529-36.
- Friedrich C., B. Lemm, T. Soukup, G. Asmussen, 2007. Determination of slow-tonic MyHC immunoreactivity is an important step in the evaluation of muscle spindles in porcine extraocular muscles. *Exp. Eye Res.*, 85: 54-64.
- Gall D., C. Roussel, T. Nieuw, G. Cheron, L. Servais, E. D'Angelo, S.N. Schiffmann, 2005. Role of calcium binding proteins in the control of cerebellar granule cell neuronal excitability: experimental and modeling studies. *Prog. Brain Res.*, Vol. 148
- Grehn F., 2019. *Augenheilkunde*. 32. Auflage © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.
- Guthrie B.L., J.D. Porter, D.L. Sparks, 1983. Corollary discharge provides accurate eye position information to the oculomotor system. *Science*, 221: 1193-95.
- Hernandez G.R., R. Blumer, R.R. de la Cruz, A.M. Pastor, 2019. Functional diversity of motoneurons in the oculomotor system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 116: 3837-46.
- Hodel A., 1998. SNAP-25. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30: 1069-73.
- Hoh, J.F.Y., 2020. Myosin heavy chains in extraocular muscle fibres: Distribution, regulation and function. *Acta. Physiol.*, 231: e13535.
- Horn A.K., A. Eberhorn, W. Härtig, P. Ardelanau, A. Messoudi, J.A. Büttner-Ennever, 2008. Periocolomotor cell groups in monkey and man defined by their histochemical and functional properties: reappraisal of the Edinger-Westphal nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 507: 1317-35.
- Horn A.K.E., H. Straka. 2021. Functional organization of extraocular motoneurons and eye muscles. *Annu Rev Vis Sci.* 7:793-825.
- Ichikawa H., Jacobowitz D.M., Winsky L., Heike C.J., 1991. Calretinin-immunoreactivity in vagal and glossopharyngeal sensory neurons of the

- rat: distribution and coexistence with putative transmitter agents. *Brain Res.*, 557 (1-2): 316-21.
- Ichikawa H., D.M. Jacobowitz, T. Sugimoto, 1993. Calretinin-immunoreactive neurons in the trigeminal and dorsal root ganglia of the rat. *Brain Res.*, 617: 96-102.
- Ing M.R., 1992. Botulinum Alignment For Congenital Esotropia. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 90: 361–371.
- Jacoby J., D.J. Chiarandini, E. Stefani, 1989. Electrical properties and innervation of fibers in the orbital layer of rat extraocular muscles. *J Neurophysiol.* 61:116-25
- Khanna S., C.R. Richmonds, H. Kaminski, J.D. Porter, 2003. Molecular organization of the extraocular muscle neuromuscular junction: partial conservation of and divergence from the skeletal muscle prototype. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 1918-26.
- Kjellgren D., L.-E. Thornell, J. Andersen, F. Pedrosa-Domellöf, 2003. Myosin heavy chain isoforms in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44: 1419-25.
- Konakci K.Z., J. Streicher, W. Hoetzenecker, M.J.F. Blumer, J.-R. Lukas, R. Blumer, 2005. Molecular characteristics suggest an effector function of palisade endings in extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46: 155-65.
- 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, R. Blumer, 2005. Palisade endings in extraocular muscles of the monkey are immunoreactive for choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46: 4548-54.
- Korfage J.A.M, K.E. Kwee, V. Everts, G.E.J. Langenbach, 2016. Myosin heavy chain expression can vary over the length of jaw and leg muscles. *Cells Tissues Organs*, 201:130–137.
- Laslo P., J. Lipski, F.B. Nicholson, G.B. Miles, G.D. Fun, 2000. Calcium binding proteins in motoneurons at low and high risk for degeneration in ALS. *Neuroreport.*, 11:3305–3308.
- Laessing J.M. 2013. Neuroanatomische Untersuchungen der Palisadenendigungen beim Menschen im Musculus rectus medialis und Musculus rectus lateralis. Dissertation, LMU München.
- Leigh R.J., D.S. Zee, 2006. *The neurology of eye movements*. fourth edition © Oxford University Press.
- , 2015. *The neurology of eye movements*. fifth edition © Oxford University Press.
- Lennerstrand G., 2007. Strabismus and eye muscle function. *Acta Ophthalmol. Scand.*, 85: 711-23.

- Li Z.S., J.B. Furness, 1998. Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.*, 294: 35-43.
- Lienbacher K., 2012. The source of innervation and function of palisade endings in the extraocular muscles of *Macaca mulatta*. Dissertation, LMU München.
- Lienbacher K., S. Ono, J. Fleuriet, M. Mustari, A.K.E. Horn, 2018. A subset of palisade endings only in the medial and inferior rectus muscle in monkey contain calretinin. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 59: 2944-54.
- Lienbacher K., A.K.E. Horn, 2012. Palisade endings and proprioception in extraocular muscles: a comparison with skeletal muscles. *Biol. Cybern.*, 106: 643-55.
- Lienbacher K., M. Mustari, H.S. Ying, J.A. Büttner-Ennever, A.K.E. Horn, 2011. Do palisade endings in extraocular muscles arise from neurons in the motor nuclei?. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 52: 2510-19.
- Lienbacher K., K. Sängler, S. Straßburger, O. Ehrt, G. Rudolph, M. Barnerßoi, A.K.E. Horn, 2019. Extraocular muscles involved in convergence are innervated by an additional set of palisade endings that may differ in their excitability: A human study. *Prog. Brain Res.* 248: 127-137.
- Liu J.-X., F. Pedrosa-Domellöf, 2021. Cytoskeletal proteins in myotendinous junctions of human extraocular muscles', *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 62(2): 19.
- Lomo T., R.H. Westgaard., H.A. Dahl, 1974. Contractile Properties of Muscle: Control by Pattern of Muscle Activity in the Rat. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 187:99-103.
- Lucas C.A., H.S.M. Rhee, J.F.Y. Hoh, 2018. Changes in myosin heavy chain isoforms along the length of orbital Ffibers in rabbit extraocular muscle. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 59: 1178-90.
- Lukas J.R., M. Aigner, R. Blumer, H. Heinzl, R. Mayr, 1994. Number and distribution of neuromuscular spindles in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35: 4317-27.
- Lukas J.R., R. Blumer, M. Denk, I. Baumgartner, W. Neuhuber, R. Mayr, 2000. Innervated myotendinous cylinders in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 2422-31.
- Maas E.F., W.P. Huebner, S.H. Seidman, R.J. Leigh, 1989. Behavior of human horizontal vestibulo-ocular reflex in response to high-acceleration stimuli. *Brain Res.*, 499: 153-56.
- Maier A., M. DeSantis, E. Eldred, 1974. The occurrence of muscle spindles in extraocular muscles of various vertebrates. *J. Morph.*, 143: 397-408.
- Mayadali Ü.S., J. Fleuriet , M. Mustari, H. Straka, A.K. Horn, 2021. Transmitter and ion channel profiles of neurons in the primate abducens and trochlear nuclei, *Brain Struct. Funct.*, 226: 2125–2151.
- Mayr R., 1971. Structure and distribution of fibre types in the external eye muscles of the rat. *Tissue Cell*, 3: 433-62.

- McConalogue K., J.B. Furness, 1996. Calretinin immunoreactivity of motor neurons in the guinea-pig distal colon and taenia coli. *Cell Tissue Res.*, 284: 367–372.
- McLoon L.K., L. Rios, J.D. Wirtschafter, 1999. Complex three-dimensional patterns of myosin isoform expression: differences between and within specific extraocular muscles. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 20: 771-83.
- Myers G.A., L. Stark, 1990. Topology of the near response triad. *Ophthalmic Physiol. Opt.*, 10:175-81.
- Namba T., T. Nakamura, A. Takahashi, D. Grob, 1968. Motor nerve endings in extraocular muscles. *J. Comp. Neurol.*, 134: 385-96.
- Paduca A., J.R. Bruenech, 2018. Neuroanatomical structures in human extraocular muscles and their potential implication in the development of oculomotor disorders. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus*, 55: 14-22.
- Park S.-E., H.-S. Sa, S.Y. Oh, 2009. Innervated myotendinous cylinders alterations in human extraocular muscles in patients with strabismus. *Korean J. Ophthalmol.*, 23: 93-99.
- Pedrosa-Domellöf F., J.-X. Liu, 2018. A novel type of multiterminal motor endplate in human extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 59: 539–548.
- Porter J.D., R.S. Baker, R.J. Ragusa, J.K. Brueckner, 1995. Extraocular muscles: Basic and clinical aspects of structure and function. *Surv. Ophthalmol.*, 39: 451-84.
- Rassow J., K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann, 2008. *Duale Reihe Biochemie*. 2. Auflage © 2010 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Ren K., M.A. Ruda, D.M. Jacobowitz, 1992. Immunohistochemical localization of calretinin in the dorsal root ganglion and spinal cord of the rat. *Brain Res. Bull.*, 31: 13-22.
- Richmond F.J.R., W.S.W. Johnston, R.S. Baker, M.J. Steinbach, 1984. Palisade endings in human extraocular muscle. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25: 471-76.
- Rogers J.H., A. Resibois, 1992. Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: Patterns of partial co-localization. *Neuroscience*, 51: 843-65.
- Rowe F.J., C.P. Noonan, 2017. *Botulinum toxin for the treatment of strabismus*. © The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons, Ltd.
- Rungaldier S., S. Heiligenbrunner, R. Mayer, C. Hanefl-Krivanek, M. Lipowec, J. Streicher, R. Blumer, 2009. Ultrastructural and molecular biologic comparison of classic proprioceptors and palisade endings in sheep extraocular muscles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50: 5697-706.
- Ruskell G.L., 1978. The fine structure of innervated myotendinous cylinders in extraocular muscles in rhesus monkey. *J. Neurocytol.*, 7: 693-708.
- , 1984. Spiral nerve endings in human extraocular muscles terminate in motor end plates. *J. Anat.*, 139: 33-43.

- , 1990. Golgi tendon organs in the proximal tendon of sheep extraocular muscles. *Anat. Rec.*, 227: 25-31.
- , 1999. Extraocular muscle proprioceptors and proprioception. *Prog. Retin. Eye Res.*, 18: 269-91.
- Sänger K., 2018. Calretinin-Expression in Nervenendigungen der äußeren Augenmuskeln beim Menschen. Dissertation, LMU München.
- Schiavi C., 2016. Extraocular muscles tension, tonus, and proprioception in infantile strabismus: Role of the oculomotor system in the pathogenesis of infantile. Scientifica, Hindawi Publishing Corporation. 5790981.
- Schoultz T.W., J.E. Swett, 1972. The fine structure of the golgi tendon organ. *J. Neurocytol.*, 1: 1-26.
- Sitzmann F.C., 2006. Duale Reihe Pädiatrie. 3. Auflage © 2010 Georg Thieme Verlag KG , Stuttgart.
- Sodi A., M. Corsi, G. Salvi, M.S. Faussonne-Pellegrini, 1988. Fine structure of the receptors at the myotendinous junction of human extraocular muscles. *Histol. Histopathol.*, 3: 103-113.
- Spencer R.F., J.D. Porter, 2006. Biological organization of the extraocular muscles. *Prog. Brain Res.*, 151: 43-80.
- Sperry R.W., 1950. Neural basis of the spontaneous optokinetic response produced by visualinversion. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 43: 482-9.
- Tao-Cheng J.-H., J. Du, C.J. McBain, 2000. Snap-25 is polarized to axons and abundant along the axolemma: an immunogold study of intact neurons. *J. Neurocytol.*, 29: 67-77.
- Trepel M., 2012. Neuroanatomie. 5. Auflage © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.
- von Helmholtz H., 1867. Handbuch der physiologischen Optik. Voss, Hamburg.
- Wang N., J.M. Paul, 2008. Peripheral muscle targets and central projections of the mesencephalic trigeminal nucleus in macaque monkeys. *Anat. Rec.*, 291: 974–987.
- Wang X., M. Zhang, I.S. Cohen, M.E. Goldberg, 2007. The proprioceptive representation of eye position in monkey primary somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.*, 10: 640-46.
- Wasicky R., F. Zhya-Ghazvini, R. Blumer, J.R. Lukas, R. Mayr, 2000. Muscle fiber types of human extraocular muscles: a histochemical and immunohistochemical study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 980-90.
- Welsch U., 2010. Lehrbuch Histologie. 3. Auflage © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.
- Wright K.W., P.H. Spiegel, L.S. Thompson, 2006. Handbook of pediatric strabismus and amblyopia © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.
- Zelená J., T. Soukup, 1977. The development of Golgi tendon organs. *J. Neurocytol.*, 6: 171-94.

- Zimmermann L., P.J. May, A.M. Pastor, J. Streicher, R. Blumer, 2010. Evidence that the extraocular motor nuclei innervate monkey palisade endings. *Neurosci. Lett.*, 489: 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, R. Blumer, 2013. Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features. *J Neurosci.*, 33: 2784-93.



## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Anatomie der extraokulären Muskulatur. Aus Paulsen, Waschke, "Sobotta Atlas der Anatomie", 24. Auflage 2017 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.....
- Abbildung 2: Darstellung der orbitalen und globalen Schicht der extraokulären Muskulatur, sowie der Lokalisation der Palisadenendigungen. Aus Lienbacher, Horn, "Palisade endings and proprioception in extraocular muscles - a comparison with skeletal muscles", 2012 © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg .....
- Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Muskelspindel. Aus Welsch, "Lehrbuch Histologie", 5.A. 2018 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München .....
- Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Golgi-Sehnenorgans. Mit freundlicher Genehmigung von © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München .....
- Abbildung 5: Tusche-Zeichnung einer Palisadenendigung. Aus Dogiel, "Die Endigungen der sensiblen Nerven in den Augenmuskeln und deren Sehnen beim Menschen und den Säugetieren", Archiv für Mikroskopische Anatomie, 1906 © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.....
- Abbildung 6: Schematische Darstellung sich entwickelnder Golgi-Sehnenorgane und einer adulten Palisadenendigung. Aus Zelená, "The development of Golgi tendon organs", 1976, J. Neurocytol. © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg und aus Ruskell, "The incidence and variety of Golgi tendon organs in extraocular muscles of the rhesus monkey", 1979, J. Neurocytol. © Springer-Verlag GmbH, Heidelberg.....
- Abbildung 7: Linkes Augenpräparat von superior, vor und nach Präparation, sowie der vom Bulbus gelöste M. rectus medialis.....
- Abbildung 8: Pikrofuchsin-Färbung eines Muskelsehnenübergangs im Hellfeldmikroskop.....

- Abbildung 9: Schematische Darstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper. Aus Boenisch, "Handbuch Immunchemische Färbemethoden", 3. Auflage © Agilent Technologies, Inc. 2003, Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc. ....
- Abbildung 10: Schematische Darstellung der Zwei-Schritt indirekten Methode. Modifizierte Abbildung aus Boenisch, "Handbuch Immunchemische Färbemethoden", 3. Auflage © Agilent Technologies, Inc. 2003, Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc. ....
- Abbildung 11: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Färbemethode. Modifizierte Abbildung aus Boenisch, "Handbuch Immunchemische Färbemethoden", 3. Auflage, 2003 © Agilent Technologies, Inc., Reproduced with Permission, Courtesy of Agilent Technologies, Inc. ....
- Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Färbung einer Calretinin-negativen Palisadenendigung eines Körperspender-Falles auf SNAP-25 und Calretinin .....
- Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Färbung einer Calretinin-positiven Palisadenendigung eines Körperspender-Falles auf SNAP-25 und Calretinin .....
- Abbildung 14: Darstellung der prozentualen Anteile der Calretinin-positiven und -negativen Palisadenendigung im M. rectus medialis bei Körperspendern .....
- Abbildung 15: Darstellung der prozentualen Anteile der Subgruppe der Calretinin-positiven Palisadenendigung an der Gesamtheit der Palisadenendigungen mit und ohne den Sonderfall 3 .....
- Abbildung 16: Immunfluoreszenz-Färbung auf SNAP-25 und Calretinin einer Calretinin-positiven Palisadenendigung eines Strabismus-Falles .....
- Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Färbung auf SNAP-25 und Calretinin einer Calretinin-negativen Palisadenendigung eines Strabismus-Falles .....
- Abbildung 18: Strabismus-Fälle mit den entsprechenden absoluten Anzahlen der Palisadenendigungen und jeweiligen prozentualen Anteilen der Calretinin-positiven und Calretinin-negativen Palisadenendigungen.....

- Abbildung 19: Vergleich der prozentualen Anteile Calretinin-positiver und Calretinin-negativer Palisadenendigungen zwischen Körperspender- und Strabismus-Fällen im M. rectus medialis.....
- Abbildung 20: Vergleich der absoluten Anzahl der Palisadenendigungen pro ausgewertetem Muskelschnitt zwischen Körperspender- und Strabismus-Fällen .....
- Abbildung 21: Gleichzeitige Betrachtung von Hellfeld- und Fluoreszenzfärbungen durch das Mikroskop.....
- Abbildung 22: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung eines Körperspender-Falles auf Calretinin, Fast-Myosin und Slow-Myosin einer Calretinin-positiven Palisadenendigung, assoziiert mit Fast- und Slow-Myosin .....
- Abbildung 23: En-grappe-Endigung auf einer Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfaser und en-plaque-Endigung auf einer Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfaser .....
- Abbildung 24: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung eines Körperspender-Falles auf Calretinin, Fast-Myosin und Slow-Myosin zeigt eine mit Slow-Myosin assoziierte Palisadenendigung .....
- Abbildung 25: Prozentuale Darstellung der Calretinin-positiven Palisadenendigungen bezüglich der Assoziation zu Fast- bzw. Slow-Muskelfasern der einzelnen Fälle, sowie dem Durchschnitt aller ausgewerteten Palisadenendigungen .....
- Abbildung 26: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung eines Körperspender-Falles auf Calretinin und Fast-Myosin mit räumlich begrenzter Häufung Calretinin-positiver Palisadenendigungen .....
- Abbildung 27: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung auf Calretinin, Fast-Myosin und Slow-Myosin dreier an Fast-Myosin liegenden Calretinin-positiven Palisadenendigungen in einem Strabismus-Fall .....
- Abbildung 28: Kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung auf Calretinin, Fast-Myosin und Slow-Myosin einer Slow-Myosin assoziierten Calretinin-positiven Palisadenendigung eines Strabismus-Falles .....

- Abbildung 29: Darstellung der prozentualen Anteile der Calretinin-positiven Palisadenendigungen an Fast- Myosin- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Strabismus-Patienten, aufgezeigt für die einzelnen Fälle und im Durchschnitt jeweils mit Angabe der absoluten Anzahl der Palisadenendigungen.....
- Abbildung 30: Vergleich der prozentualen Anteile der mit Fast-Myosin-exprimierenden Muskelfasern und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern assoziierten Calretinin-positiven Palisadenendigungen im M. rectus medialis bei Körperspender- und Strabismus-Fällen.....
- Abbildung 31: Vergleich der absoluten Anzahl der Calretinin-positiven Palisadenendigungen pro Schnitt bei Körperspendern und Strabismus-Patienten.....
- Abbildung 32: Calretinin-positive En-grappe-Endigung an einer Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfaser.....
- Abbildung 33: Calretinin-positive anulospirale Nervenfasern einer Muskelspindel.....
- Abbildung 34: Calretinin-positiv Spiralendigung.....
- Abbildung 35: Vergleich der absoluten Anzahl der Palisadenendigungen pro Schnitt bei Strabismus-Patienten und Körperspendern mit Einbeziehung aller gezählter Palisadenendigungen.....

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der ausgewerteten Augenmuskeln der Körperspender .....	
Tabelle 2: Auflistung der ausgewerteten Augenpräparate aus der Augenklinik .....	
Tabelle 3: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25, Calretinin und Slow-Myosin .....	
Tabelle 4: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf SNAP-25, Calretinin und Slow-Myosin .....	
Tabelle 5: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf Synaptophysin, Calretinin und Slow-Myosin .....	
Tabelle 6: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf Calretinin, Fast- und Slow-Myosin. Hier unter Verwendung von Kaninchen Anti-Calretinin sowie MHCf für Fast-Myosin.....	
Tabelle 7: Verwendete Antikörper der Tripel-Immunfluoreszenzfärbung auf Calretinin, Fast und Slow-Myosin. Hier unter Verwendung von Maus Anti- Calretinin sowie FMyHC für Fast-Myosin .....	
Tabelle 8: Verwendete Antikörper der Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz- Färbung auf Calretinin, MHCf und MyH7B. Hier unter Verwendung von Kaninchen Anti-Calretinin sowie MHCf für Fast-Myosin.....	
Tabelle 9: Verwendeten Antikörper der Avidin-Biotin-Immunfluoreszenz- Färbung auf Calretinin, FMyHC und MyH7B. Hier unter Verwendung von Maus Anti-Calretinin sowie FMyHC für Fast-Myosin .....	
Tabelle 10: Verwendete Mikroskope mit Angabe der Fluoreszenzfilter .....	
Tabelle 11: Darstellung der Anteile Calretinin-positiver Palisadenendigungen im M. rectus medialis bei Körperspendern .....	
Tabelle 12: Anführen der absoluten Zahlen und prozentualen Anteile der Calretinin-exprimierenden Palisadenendigungen im M. rectus medialis der Strabismus-Fälle .....	

- Tabelle 13: Tabellarische Gegenüberstellung der wichtigsten Eckdaten gezählter Palisadenendigungen in Körperspender- und Strabismus-Fällen im M. rectus medialis .....
- Tabelle 14: Darstellung der Assoziation Calretinin-positiver Palisadenendigungen zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern der Körperspender .....
- Tabelle 15: Darstellung der Assoziation Calretinin-positiver Palisadenendigungen zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern bei Strabismus-Patienten .....
- Tabelle 16: Übersicht über die Durchschnittswerte von Körperspender- und Strabismus-Fällen, insbesondere bzgl. des Vergleiches der Anteile der Assoziation Calretinin-positiver Palisadenendigungen zu Fast- und Slow-Myosin-exprimierenden Muskelfasern .....

## Eigene Publikationen

### Ko-Autorschaft in

Lienbacher K., K. Sänger, S. Straßburger, O. Ehrt, G. Rudolph, M. Barnerssoi, A.K.E. Horn, 2019. Extraocular muscles involved in convergence are innervated by an additional set of palisade endings that may differ in their excitability: A human study. *Prog. Brain Res.* 248: 127-137.

## Danksagung

Bedanken möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Jens Waschke. Er gab mir die Möglichkeit, meine Dissertation am Anatomischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München erarbeiten zu können.

Insbesondere gilt mein Dank meiner Betreuerin Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler, die mir jederzeit mit professionellem Rat und motivierenden Gedanken zur Seite stand.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei MPh. Ahmet Messoudi, Dr. Karoline Lienbacher, Christine Unger und Christine Glombik sowie dem gesamten Team der „Oculomotoriusgroup“ für eine wunderbare Zeit im Labor, den familiären Umgang und die außerordentliche Betreuung.

Mein Dank gilt auch meiner Familie für die immerwährende Unterstützung. Insbesondere danke ich meinem Vater Dr. Harald Straßburger für die aufschlussreichen kritischen Gespräche. Meiner Partnerin Dr. Dorothea Mund danke ich für ihre Geduld und Motivation.



## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Calretinin-exprimierende Palisadenendigungen – Prozentuale Anteile und  
Assoziation zur Myosin-Expression der Muskelfasern im M. rectus medialis bei  
Körperspendern und Strabismus-Patienten

selbständig verfasst habe. Ich habe 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 zudem, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in ähnlicher oder in gleicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, den 08.12.2022

Sebastian Straßburger

Sebastian Straßburger