

1 Einleitung

1.1 Die Entwicklung des Auges als Teil des zentralen Nervensystems

Das Wirbeltierauge ist ein hochentwickeltes photosensorisches Organ. Es besteht aus einer Vielzahl definierter zellulärer und nicht-zellulärer Komponenten, die zwei Hauptaufgaben zu erfüllen haben: Die Abbildung der Umwelt auf der Netzhaut (Retina) und die Weitergabe des verarbeiteten Bildes an das Gehirn.

Die Entwicklung eines so komplexen Organs erfordert eine zeitlich und räumlich strikte Abfolge induktiver Ereignisse, die genetisch gesteuert sind. Die Entwicklungsbiologie bemüht sich um die Aufklärung dieses Zusammenhangs von genetischer Information und Bildung eines Organs aus einer undifferenzierten Zelle bzw. eines gesamten Organismus aus der Eizelle.

Die Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) beginnt mit der Neuralinduktion, die mit der Regionalisierung des Neuroektoderms entlang der Kopf-Rumpf-(anterior-posterioren) Achse einhergeht (Lumsden und Krumlauf, 1996), wobei eine der ersten determinierten Regionen im Embryo die Augenfurche in der anterioren Neuralplatte ist (Abb. 1.1A; Sivak und Bobier, 1990).

Die Neuralplatte rollt sich entlang ihrer anterior-posterioren Achse zum Neuralrohr auf. Ihr anteriorer Teil wird zu den bläschenförmigen Anlagen für Vorder-, Mittel- und Hinterhirn und ihr posteriorer, langgestreckter Part zum Rückenmark (Lumsden und Krumlauf, 1996). In der Region des Vorderhirns bildet sich eine Ausstülpung, die dann zunächst die Augenfurche (Abb. 1.1B: „optic pit“, op) und schließlich das Augenvesikel formt (Abb. 1.1C; Chow und Lang, 2001). Das Augenvesikel kontaktiert das linsenkompetente Oberflächenektoderm und induziert darin die Verdickung zur Linsenplakode (Abb. 1.1C, LP). Daraufhin falten sich das distale Augenvesikel und die Linsenplakode ein, wobei der zweischichtige Augenbecher und das Linsenvesikel entstehen (Abb. 1.1E). Gleichzeitig verengt sich der mediale Teil des Augenvesikels zu einer länglichen Struktur, dem Augensiel, aus dem das Grundgerüst des Optischen Nerven entstehen wird (Abb. 1.1E, DOS und VOS). Die äußere Schicht des Augenbechers ist das prospektive retinale Pigmentepithel (Abb. 1.1E, RPE), aus der inneren

Schicht wird die neuronale Retina mit ihren verschiedenen Zelltypen differenziert (Abb. 1.1E, NR). Waren Augenbecher und Augenstiel bislang im ventralen Bereich noch geöffnet, schließt sich nun die Augenbecherfalte durch Fusion der jeweiligen Schicht. Das pathologische Unvermögen, die Augenbecherfalte zu schließen, wird Kolobom genannt.

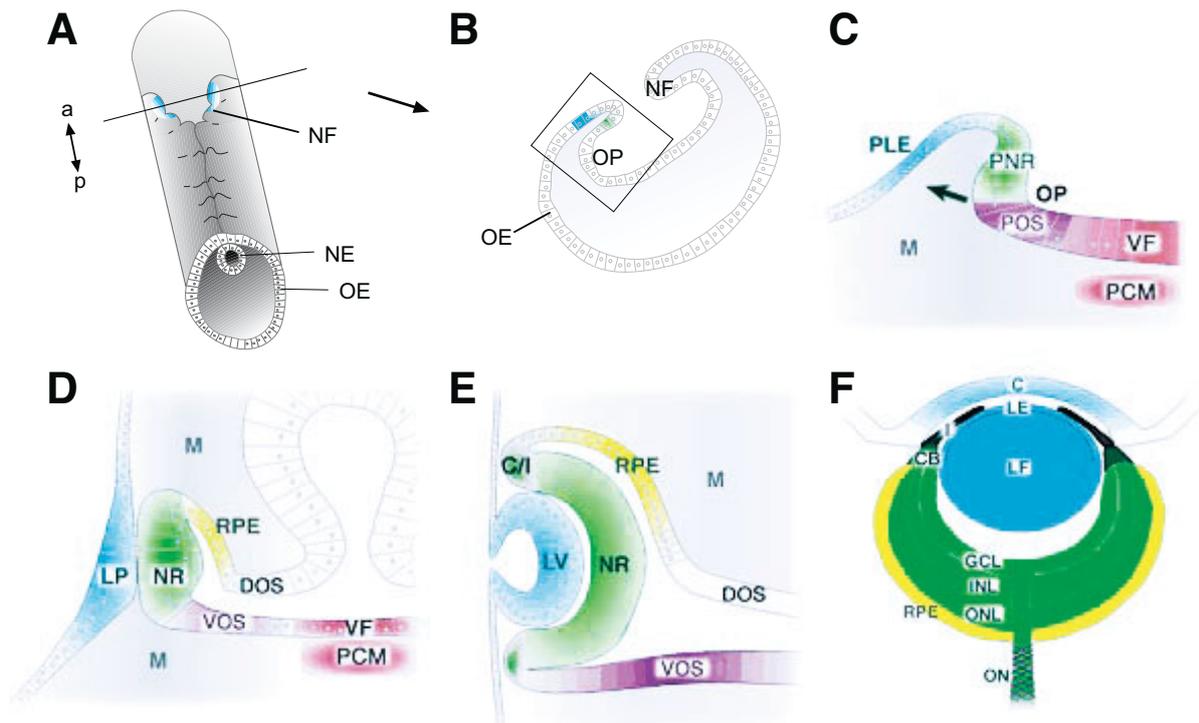


Abb. 1.1: Schematischer Überblick über die Augenentwicklung in Vertebraten. (A) Einstülpung des Neuralrohrs in Neuralfalten (NF), in deren anteriorem (a) Teil das Augengefeld (blau) entsteht. (B) Sagittaler Schnitt durch die anterioren Neuralfalten zeigt die Bildung der „optic pits“ (OP), der Augenfurche. In blau gezeigt das prospektive Linsenektoderm, in grün prospektive Augenvesikel (nach Sivak und Sivak, 2000). (C-F) Die Farben markieren in allen Stadien auseinander hervorgehende Strukturen (aus Chow und Lang, 2001). Blau: Oberflächenektoderm (PLE, C), aus dem die Linsenplakode (LP, D), später das Linsenvesikel (LV, E) und schließlich Linse und Cornea (F) entstehen. Grün: Augenvesikel (pnr, C), das als Ausstülpung des Vorderhirns das Oberflächenektoderm berührt (nr, D), dann invaginiert, um die Neuroretina (nr, E) mit der äußeren Kernschicht (onl, F), der inneren Kernschicht (inl, F) und der Ganglionzellschicht (gcl, F) zu bilden. Gelb: Das dorsale Augenvesikel (D) wird zur äußeren Augenbecherschicht (E) und schließlich zum retinalen Pigmentepithel (rpe, F). Violett: Die ventro-distale Region des Augenvesikels (pos, C; vos, D) verengt sich gemeinsam mit der dorso-distalen Region (dos, C und D), um den Augenstiel (E) und später das Gliagrundgerüst des Augennerven zu entwickeln (on, F). Abkürzungen: a, anterior; C, Cornea; CB, Zilliarkörper; C/I, Zilliarkörper/Iris; LE, Linsenepithelzellen; LF, Linsenfasern; PLE, prospektives Linsenektoderm; M, Mesenchym (grau); OE, Oberflächenektoderm; OP, „optic pit“, Augenfurche; NE, Neuraletoderm; p, posterior; PCM, prächordales Mesoderm (rot); VF, ventrales Vorderhirn (rot).

Nachdem die prinzipiellen Komponenten des Auges angelegt wurden, findet nun die Differenzierung der einzelnen Zelltypen statt, die in einer genauen zeitlichen Abfolge auftritt (Young, 1985a und 1985b; Cepko, 1996; Marquardt et al., 2001; Marquardt und Gruss, 2001).

Die adulte, ausdifferenzierte neuronale Retina besteht aus sechs verschiedenen Klassen von Zellen, die die Detektion und Verarbeitung der Lichtreize vermitteln und diese dann zum Gehirn weiterleiten. Nachdem die Lichtreize durch die Zapfen- und Stäbchenphotorezeptorzellen in der äußeren Kernschicht (Abb. 1.1F, ONL) detektiert, in elektrische Signale umgesetzt und über die Bipolarzellen in der inneren Kernschicht (Abb. 1.1F, INL) auf die Ganglionzellen (Abb. 1.1F, GCL) übertragen wurden, leiten die Axone der Ganglionzellen diese Reize durch ihre Projektionen an die primären visuellen Zentren des Gehirns weiter. Die Modulation dieser Signale wird von Horizontalzellen und Amakrinzellen vermittelt. Die Lichtreize stehen in direkter Korrelation zum erzeugten Signal im Gehirn, da die Retina in ein räumliches Raster eingeteilt ist, das sich durch die direkten axonalen Verknüpfungen im Gehirn widerspiegelt (Dräger und Olsen, 1980; Goodhill und Richards, 1999).

All diese Vorgänge erfordern das Zusammenspiel eines ganzen Netzwerks von extrazellulären und intrazellulären Signalen, das bei weitem noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

1.2 Extrinsische und intrinsische Faktoren bestimmen die Musterbildung in der Augenentwicklung

Extrazelluläre Signale bestehen aus sekretierten Molekülen, die in einer nicht-zellautonomen Weise agieren. Diese können mittels spezifischer Rezeptoren auf umliegende Zellen wirken, und so Einfluß auf die Differenzierung benachbarter Gewebe nehmen.

Zu den intrazellulären Faktoren zählen insbesondere die Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität (Expression) von anderen Proteinen auf transkriptioneller Ebene steuern. Dazu enthalten sie charakteristische DNA-Bindedomänen, die die spezifische Bindung an regulative Sequenzen anderer Gene ermöglichen, und Transaktivierungsdomänen, die die Aktivierung

oder Repression dieser Gene hervorrufen. Viele dieser Faktoren wurden bereits auf ihre Relevanz in der Augenentwicklung hin untersucht, insbesondere durch Inaktivierung des entsprechenden Gens in der Maus, der sogenannten *Knock-out*-Technologie, und durch Überexpressionstudien des Faktors.

Als erster Schritt in der Augenentwicklung muß zunächst das Augenvesikel induziert und spezifiziert werden, danach kommt es zur Determination einzelner Domänen innerhalb des Augenvesikels, aus denen dann die unterschiedlichen Komponenten des Auges entstehen.

1.2.1 Determination des Augenvesikels

An der Induktion der Neuralplattenentwicklung ist der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Otx2* beteiligt. *Otx2* ist bereits in sehr frühen Stadien, vor der Gastrulation, im embryonalen Ektoderm exprimiert (Simeone et al., 2001), nicht aber im Augengebiet selbst (Abb. 1.2A). Später ist *Otx2* allerdings im Augenvesikel aktiv und ab dem Augenbecherstadium auf das retinale Pigmentepithel (RPE, Abb. 1.2B und C) und postmitotischen Zellen in der Neuroretina beschränkt (Baas et al., 2000; Bovolenta et al., 1997; Martinez-Morales et al., 2001). In *Otx2*-defizienten Embryonen können keine Vorder- und Mittelhirnstrukturen induziert werden (Matsuo et al., 1995), während heterozygote *Otx2*-Mutanten variable Augenphänotypen zeigen, die von Hyperproliferation beider Augenbecherschichten und Abwesenheit ektodermaler Strukturen bis hin zur vollständigen Abwesenheit des Auges reichen (Matsuo et al., 1995). Doppelmutanten mit dem paralogem Faktor *Otx1* verstärkten zudem die Hinweise auf redundante Funktion von *Otx2* und *Otx1* (Acampora et al., 1998; Suda et al., 1999) insbesondere in der RPE-Spezifikation (Martinez-Morales et al., 2001).

Der am frühesten aktive augenspezifische Faktor, ist *Rx* (oder *rax*), ein Transkriptionsfaktor, der eine *paired*-ähnlich Homöodomäne enthält und der bislang in der Maus (Fukurawa et al., 1997), in der Fruchtfliege *Drosophila*, im Krallenfrosch *Xenopus* und im Zebrafisch (Mathers et al., 1997; Eggert et al., 1998) identifiziert wurde. *Rx* ist bereits in der anterioren Neuralplatte und dann hauptsächlich im Augenvesikel und später in der neuronalen Retina exprimiert (Fukurawa et al., 1997; Abb. 1.2A-C). Mausembryonen können in Abwesenheit

von *Rx* kein Augenvesikel mehr aus dem Vorderhirn ausstülpfen (Mathers et al., 1997) und exprimieren auch in der Augenfurche keine für die Augenentwicklung essentiellen Faktoren mehr (Zhang et al., 2000). Weitere Hinweise für die große Bedeutung von *Rx* in der Augenentwicklung ergaben Überexpressionsexperimente in *Xenopus* und im Zebrafisch, die zur Hyperproliferation von pigmentierter und neuronaler Retina und ektopischer Induktion von Augenmarkern führten (Andreazzoli et al., 1999; Chuang und Raymond, 2001; Mathers et al., 1997).

Rx legt zwar das Augenfeld fest, determiniert aber nicht die Bildung von zwei lateralen Augen. Die Aufteilung des Augenfeldes in zwei gleiche Teile ist unter anderem von dem Signalmolekül *sonic hedgehog* (*Shh*) abhängig, das von dem unter der Neuralplatte liegenden Mesoderm sekretiert wird (Abb. 1.1C und D; Abb. 1.2B; Chow und Lang, 2001; Ekker et al., 1995; Macdonald et al., 1995). Die Abwesenheit von *Shh* in der Maus oder im Menschen resultiert in Mißbildungen von Strukturen, die aus der Mitte der Neuralfalte entstehen (Holoprosenzephalie), wobei die Augen zu einem „Zyklopeauge“ fusioniert bleiben können (Belloni et al., 1996; Chiang et al., 1996; Roessler et al., 1996).

Ein anderer Faktor mit sehr früher Bedeutung in der Augenentwicklung ist *Lhx2*, ein LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, der im Augenvesikel und später in der inneren Kernschicht der Neuroretina exprimiert ist (Abb. 1.1B; Porter et al., 1997; Xu et al., 1993). *Lhx2*-mutante Embryonen entwickeln zwar noch ein Augenvesikel, dieses erreicht aber nie das Oberflächenektoderm, und es bleibt ohne Augenbecherbildung undifferenziert (Porter et al., 1997), was auf die wichtige Funktion von *Lhx2* bei der Initiation der Augenbecherbildung hinweist. Weit besser untersucht als die Funktion von *Lhx2* im Auge ist das Zusammenspiel der verschiedenen LIM-Homöodomänen-Faktoren in anderen Teilen des ZNS (Hobert und Westphal, 2000), wie z. B. im Thalamus (Nakagawa und O'Leary, 2001) und im Rückenmark (Tsuchida et al., 1994).

Durch ektopische Expressionsexperimente in *Drosophila* wurde die wichtige regulative Funktion von mehreren Faktoren in der Augenentwicklung entdeckt, die in einem regulatorischen Netzwerk agieren. Zu diesen teilweise als „master control genes“ bezeichneten Faktoren gehören *eyeless* (*ey*), *twin of eyeless* (*toy*), *sine oculis* (*so*), *eyes absent* (*eya*),

dachshund (*dac*), *teashirt* (*ts*) und *optix* (*opt*), die alle in der Lage sind, nach ektopischer Expression ektopische Augen in *Drosophila* hervorzurufen (zusammengefaßt in Chow und Lang, 2001; Wawersik und Maas, 2000). Interessanterweise kommen stark konvergente Homologe all dieser Faktoren - mit Ausnahme des noch nicht ausreichend untersuchten *ts* - auch in Wirbeltieren, zum Beispiel in der Maus, vor.

Wenn auch nicht jede einzelne Funktion und Regulation dieser Faktoren in den verschiedenen Spezies konserviert zu sein scheint (Heanue et al., 2002), so wird doch mittlerweile von einem gemeinsamen Grundprinzip in der Entwicklung von Augen in so unterschiedlicher Ausprägung wie dem *Drosophila*-Komplexauge und dem Linsenauge der Wirbeltiere und möglicherweise sogar von einem gemeinsamen evolutiven Ursprung ausgegangen (Pichaud et al., 2001; Kumar, 2001).

Six3 und *Otpx2* (letzteres wird auch *Six6* oder *Six9* genannt) gehören zur Six-Homöodomänen-Familie, von der als erstes Mitglied *so* in *Drosophila* identifiziert wurde. Die frühe Expression von *Six3* im Augengebiet der anterioren Neuralfalte (Jean et al., 1999; Oliver et al., 1995; Abb. 1.2A) und die spätere Koexpression von *Otpx2* und *Six3* im Augengebiet deutete auf eine frühe, möglicherweise redundante Funktion beider Faktoren hin (Jean et al., 1999; Toy und Sundin, 1999). In der Tat induzierte die ektopische Expression von *Six3* in der Maus die Bildung eines zusätzlichen Augengebietes (Lagutin et al., 2001) und im Fisch *Medaka* eine Augengebiet-ähnliche Struktur (Loosli et al., 1999). Die Überexpression von *Otpx2* im *Xenopus*-Augengebiet löste eine dramatische Vergrößerung des Auges oder die Induktion retinalen Gewebes in der Mittelhirnregion aus (Bernier et al., 2000; Zuber et al., 1999), während die ektopische Expression von Maus-*Otpx2* im Hühner-RPE zur Aktivierung von Neuroretina-spezifischen Markern führte (Toy et al., 1998). Mutationen im humanen *SIX3* führten zu schwerwiegenden Gehirn- und Augengebietdefekten (Wallis et al., 1999).

Die sicherlich intensivsten Studien wurden bislang an *ey* und *toy* und ihrem Vertebratenhomolog *Pax6* durchgeführt (Callaerts et al., 1997). Auf sie wird in Kap. 1.3 noch detailliert eingegangen.